

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 168**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2006 E 06827486 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 1943516**

54 Título: **Perfiles compuestos de antígenos celulares y proteínas diana de transducción de señales para el análisis y la gestión de la asistencia clínica de los cánceres hematológicos**

30 Prioridad:

**04.11.2005 US 267948**

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

**11.03.2015**

73 Titular/es:

**CASE WESTERN RESERVE UNIVERSITY (20.0%)  
10900 Euclid Avenue  
Cleveland, Ohio 44106 , US;  
ALLEGHENY-SINGER RESEARCH INSTITUTE  
(20.0%);  
BECKMAN COULTER, INC. (20.0%);  
NORTHWESTERN UNIVERSITY (20.0%) y  
UNIVERSITY HEALTH NETWORK (20.0%)**

72 Inventor/es:

**GOOLSBY, CHARLES;  
SHANKEY, VINCENT, T.;  
HEDLEY, DAVID;  
JACOBBERGER, JAMES y  
SHACKNEY, STANLEY**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 531 168 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

5 Perfiles compuestos de antígenos celulares y proteínas diana de transducción de señales para el análisis y la gestión de la asistencia clínica de los cánceres hematológicos

**Antecedentes de la invención**

10 La leucemia es un cáncer maligno de la médula ósea y la sangre. La leucemia se caracteriza por una producción excesiva de leucocitos anómalos, que se acumulan en la médula ósea y la sangre periférica. Como resultado, se reduce la producción y función de las células sanguíneas normales. La leucemia linfocítica crónica (LLC) es uno de los cuatro principales tipos de leucemia en los seres humanos; los otros son la leucemia mielógena aguda (LMA), la leucemia mielógena crónica (LMC) y la leucemia linfocítica aguda (LLA).

15 Los pacientes con leucemia tienen una evolución clínica heterogénea. El tratamiento de la leucemia es muy complejo y depende del tipo de leucemia. También se observa una enorme variabilidad clínica entre las remisiones en los pacientes con leucemia, incluso las que se producen tras un ciclo de terapia. Algunos sobreviven durante períodos prolongados sin un tratamiento definitivo, mientras que otros mueren rápidamente a pesar de recibir tratamientos radicales. Los pacientes resistentes a la terapia tienen tiempos de supervivencia muy cortos, con independencia de cuándo se desarrolla la resistencia. Aunque se han desarrollado varios sistemas de estadificación para abarcar esta heterogeneidad clínica, no se puede predecir con exactitud si un paciente en un estadio precoz o intermedio experimentará una evolución de la enfermedad de escasa o elevada malignidad. En concreto, dado que estos sistemas tienen en cuenta las manifestaciones globales de la enfermedad, incluyendo el recuento de linfocitos en la sangre y la médula, el tamaño y la distribución de los ganglios linfáticos, el tamaño del bazo, el grado de anemia y el recuento de plaquetas del individuo, solo pueden identificar 20 25 pacientes con un mal resultado pronóstico cuando la enfermedad ha progresado a un estadio más avanzado.

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es la leucemia diagnosticada con más frecuencia en Estados Unidos y Europa, con más de 10.000 nuevos casos en EE. UU. en 2004, y en la mayor parte de los casos se presenta en hombres de más de 40 años. Se caracteriza por la expansión clonal de linfocitos pequeños, en general con marcadores de superficie CD5 y CD19 compatibles con un subgrupo de linfocitos B. En la mayor parte de los casos, la enfermedad es de escasa malignidad y los 30 35 pacientes sobreviven durante períodos prolongados sin un tratamiento definitivo. Además el sexo es también importante, ya que los hombres sobrepasan en número a las mujeres en una proporción de aproximadamente 2:1. En una minoría de casos, con frecuencia en individuos jóvenes, la enfermedad progresa rápidamente a pesar de los tratamientos radicales. En la forma más común, menos activa, el inicio es gradual y puede no provocar incomodidad o dolor al paciente durante varios años.

La LLC se caracteriza por un gran número de linfocitos maduros cancerosos y un aumento de los ganglios linfáticos. Las células cancerosas desplazan a las células normales en la médula ósea y los ganglios linfáticos. Los pacientes sufren anemia y el número de leucocitos normales y plaquetas en la sangre disminuye, mientras que el recuento total de leucocitos aumenta debido a la proliferación de leucocitos anormales. También disminuye el nivel y la actividad de los anticuerpos. Como resultado, el sistema inmunitario del paciente se deteriora. Es más frecuente que los individuos con LLC mueran por las consecuencias de un sistema inmunitario deteriorado, como las infecciones, que de la propia LLC. 40

La estadificación clínica de la LLC, caracterizada mediante los sistemas de Rai (estadios O-IV) y Binet (estadios A-C), sigue siendo el principal factor predictivo de la supervivencia de los pacientes con LLC. Ambos sistemas se basan en la cantidad de tejido linfático afectado y en la presencia de anemia y/o trombocitopenia. En general, los pacientes en los últimos estadios tienen un pronóstico significativamente peor y una supervivencia más corta. Los pacientes con estadio IV de Rai o estadio C de Binet tienen una supervivencia media de solo 1,5 a 2 años. 45

*Knezevic y col., Proteomics 2001: Vol 1, págs. 1271-1278, describe un estudio sobre análisis proteómico ultrarrápido de cortes histológicos congelados, derivados de carcinomas epidermoides de la cavidad bucal.* 50

*Wagner y col., Hematology Journal 2004: Vol. 5, N.º 3., págs. 197-201, revisa una serie de marcadores pronósticos para decidir cuándo iniciar el tratamiento y asignar un pronóstico en la leucemia linfocítica crónica (LLC) y las distintas técnicas disponibles para medir esos marcadores.* 55

*La patente EP-1777523 se refiere a un método in vitro para determinar el pronóstico de los pacientes respecto a la progresión del cáncer. La patente EP-1777523 se publicó el 25 de abril de 2007, después de la fecha de presentación de esta solicitud. Por lo tanto, solo se cita como técnica anterior a efectos de innovación conforme al artículo 54(3) EPC.* 60

*Zoltan Matrai. Hematology 2005, Vol. 10. N.º 1, págs. 39-46, revisa el uso de la expresión de CD38 en la superficie celular como un marcador de enfermedad progresiva y mal resultado en la leucemia linfocítica crónica (LLC).*

*US-2003/148321 describe métodos e instrumentos para diferenciar entre las células hematopoyéticas que expresan y que no expresan heparanasas.* 65

Por el momento no existe un tratamiento conocido para la LLCB que haya demostrado un aumento significativo de la esperanza de vida. En consecuencia, solo los pacientes con LLCB en estadios avanzados se consideran adecuados para recibir tratamientos radicales como quimioterapia, radioterapia, cirugía, inmunoterapia o trasplante. Tales tratamientos pueden afectar gravemente al estado físico y emocional del paciente, sin conducir necesariamente a una mejoría de su estado; en algunos casos, los pacientes con LLCB pueden incluso fallecer a causa del tratamiento, más que por los efectos de la LLCB. Los pacientes con LLCB en estadios precoces, cuyo estado físico puede ser más adecuado para recibir un tratamiento experimental o más intensivo, por lo general no reciben tratamiento, en la medida en que su enfermedad permanezca estable, por dos motivos. En primer lugar, las terapias actualmente disponibles no aumentan la esperanza de vida. En segundo lugar, no existen en estos momentos indicadores fiables de qué pacientes en estadios precoces responderán bien y cuáles no lo harán. Además, la evolución impredecible de la enfermedad puede dificultar la interpretación de los resultados de los ensayos clínicos, ya que algunos pacientes en estadios precoces tendrán una evolución de escasa malignidad, incluso sin los beneficios del tratamiento.

En vista de las distintas evoluciones clínicas y la enorme variabilidad clínica entre las remisiones en los pacientes con leucemia, se impone la necesidad de un indicador fiable para predecir la evolución de la enfermedad en cada caso individual, a fin de ayudar a los médicos a identificar a los pacientes que progresan hacia un estadio más avanzado de la enfermedad y tener la opción de un tratamiento experimental o más intensivo en un estadio mucho más precoz. Además, los ensayos clínicos de nuevos fármacos o terapias experimentales podrían dirigirse a los pacientes en función de su pronóstico, lo que haría que los resultados de los ensayos clínicos tuvieran una mayor relevancia.

La presente invención cubre esta necesidad y aporta las ventajas que de ello se derivan.

### Sumario de la invención

La presente invención se refiere a métodos para establecer un perfil de marcadores compuesto para muestras de individuos que se sospecha sufren un proceso neoplásico. El perfil de marcadores compuesto de la invención permite identificar subgrupos de procesos neoplásicos relevantes desde el punto de vista del pronóstico y de la terapia, y la predicción de la evolución clínica de un individuo. Los métodos de la invención ofrecen herramientas útiles para la elección de un tratamiento para un individuo aquejado de un proceso neoplásico, incluidos métodos para la asignación a un grupo de riesgo, métodos para predecir un aumento del riesgo de recidiva, métodos para predecir un aumento del riesgo de desarrollar complicaciones secundarias, métodos para elegir una terapia para un individuo, métodos para predecir la respuesta a una terapia para un individuo, métodos para determinar la eficacia de una terapia en un individuo y métodos para determinar el pronóstico de un individuo. En particular, el método de la presente invención describe un método para establecer un perfil de marcadores compuesto que pueda servir como indicador pronóstico para predecir si la evolución de un proceso neoplásico en un individuo será de elevada o de escasa malignidad, lo cual ayudará al médico en la gestión de la asistencia al paciente y a la hora de evaluar la modalidad de tratamiento que debe utilizar. La invención se define en las reivindicaciones.

En determinadas realizaciones descritas en la presente invención los métodos de la invención están dirigidos a establecer un perfil de marcadores compuesto para una leucemia seleccionada del grupo que consiste en leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC) y leucemia linfocítica aguda (LLA). Un perfil de marcadores compuesto establecido mediante los métodos descritos puede resultar útil para todos los aspectos de la gestión de la asistencia clínica de un individuo afectado de leucemia, incluyendo, por ejemplo, asignar a un individuo afectado de leucemia a un grupo de riesgo de la leucemia, predecir si un individuo afectado de leucemia presenta un mayor riesgo de recidiva, predecir si un individuo afectado de leucemia presenta un mayor riesgo de desarrollar una leucemia secundaria; métodos para ayudar a determinar el pronóstico para un individuo afectado de leucemia, métodos para elegir un tratamiento para un individuo afectado de leucemia y métodos para vigilar el estado de la enfermedad en un individuo sometido a una o más terapias para la leucemia.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un diagrama esquemático que ilustra la preparación de muestras para métodos para establecer un perfil de marcadores compuesto.

La Figura 2 muestra paneles de citometría de flujo obtenidos mediante un protocolo para una estrategia de selección de poblaciones de partículas para el análisis de ZAP-70 en una muestra de LLC.

La Figura 3 muestra paneles de citometría de flujo obtenidos mediante la estrategia de selección de poblaciones de partículas para el análisis de ZAP-70 en una muestra de LLC.

La Figura 4 muestra un diagrama que representa la expresión de ZAP-70 en el conjunto de células presentes en una muestra de LLC (rojo: linfocitos B; verde: linfocitos T normales; violeta: linfocitos. linfocitos NK

La Figura 5 muestra paneles de citometría de flujo que representan la activación de S6 mediante mTOR en una muestra de LMA.

La Figura 6 muestra un perfil compuesto de citoblastos movilizados (CD34+) en sangre periférica. Los histogramas ofrecen una comparación entre las respuestas de tres proteínas de transducción de señales distintas, P-ERK, P-S6 y P-PKB/AKT, en citoblastos movilizados, granulocitos normales, monocitos normales y linfocitos normales tras la estimulación con PMA (azul), factor citoblástico (verde) o IGF-1 (naranja), comparado con la muestra sin tratar (rojo).

La Figura 7 muestra un perfil compuesto de un paciente con una única LMA. Las alícuotas de sangre se estimularon con PMA, con o sin inhibidores de la vía de transducción de señales específica (“mapa” de la esquina inferior derecha) o con factor citoblástico. Las respuestas se miden como gráficas bivariantes de P-ERK frente a P-S6 (paneles de la derecha), en los que la población en rojo corresponde a los blastocitos de la LMA, la azul a los linfocitos internos y la verde a los granulocitos internos. Los blastocitos de la LMA (rojo), los linfocitos (azul) y los granulocitos (verde) se identificaron mediante CD34 frente a SSC, como se representa en los dos recuadros de la izquierda.

La Figura 8 muestra perfiles compuestos de la expresión de ZAP-70 en la LLC. Verde: linfocitos B CD5neg; azul: linfocitos B CD5+; rosa: linfocitos T (CD5+/CD3+); violeta: linfocitos NK (CD5neg/CD56+). Los histogramas superpuestos se muestran con cada histograma por separado autoescalado para el número de eventos de cada subconjunto.

### Descripción detallada de la invención

Esta invención se dirige a métodos para establecer un perfil de marcadores compuesto para muestras de individuos que se sospecha que tienen un proceso neoplásico. El perfil de marcadores compuesto de la invención permite identificar subgrupos de procesos neoplásicos relevantes desde el punto de vista pronóstico y terapéutico, y la predicción de la evolución clínica de un individuo. Los métodos de la invención ofrecen herramientas útiles para la gestión de la asistencia clínica de un individuo aquejado de un proceso neoplásico, incluyendo métodos para la asignación a un grupo de riesgo, métodos para predecir un aumento del riesgo de recidiva, métodos para predecir un aumento del riesgo de desarrollar complicaciones secundarias, métodos para elegir una terapia para un individuo, métodos para determinar la eficacia de una terapia en un individuo y métodos para determinar el pronóstico de un individuo.

La invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que, al correlacionar la presencia de marcadores asociados a una población celular única con una o más proteínas diana seleccionadas, es posible preparar un perfil de marcadores compuesto que representa una medición cuantitativa basada en la comparación de poblaciones celulares internas en las muestras positiva y negativa para la medición de interés.

En particular, el método de la presente invención describe una forma de establecer un perfil de marcadores compuesto que puede servir como indicador pronóstico para predecir si la evolución clínica de un proceso neoplásico en un individuo será de elevada o de escasa malignidad, lo cual ayudará al médico en la gestión de la asistencia al individuo y a la hora de evaluar la modalidad de tratamiento que debe utilizar.

En determinadas realizaciones descritas en la presente invención, los métodos de la invención están dirigidos a establecer un perfil de marcadores compuesto para una leucemia seleccionada del grupo que consiste en leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC) y leucemia linfocítica aguda (LLA). Un perfil de marcadores compuesto establecido mediante los métodos descritos puede resultar útil para todos los aspectos de la gestión de la asistencia clínica de un individuo afectado de leucemia incluidos, por ejemplo, asignar a un individuo afectado de leucemia a un grupo de riesgo de la leucemia, predecir si un individuo afectado de leucemia presenta un mayor riesgo de recidiva, predecir si un individuo afectado de leucemia presenta un mayor riesgo de desarrollar una leucemia secundaria; métodos para ayudar a determinar el pronóstico para un individuo afectado de leucemia, métodos para elegir un tratamiento para un individuo afectado de leucemia y métodos para vigilar el estado de la enfermedad en un individuo sometido a una o más terapias para la leucemia.

Un perfil compuesto establecido por los métodos de la invención abarca hacer reaccionar la muestra biológica con una serie de moléculas de unión, en donde la serie de moléculas de unión contiene dos o más grupos de moléculas de unión específicas para marcadores asociados a una población celular única. Los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores identifican poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra y se utilizan para identificar la presencia de poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra mediante la detección de los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores que identifican poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra. Por último, al correlacionar los niveles de marcadores de cada una de las poblaciones celulares normales y neoplásicas con la presencia de una proteína diana, el método de la invención permite establecer un perfil de marcadores compuesto para una muestra procedente de un individuo que se sospecha que tiene un proceso neoplásico. La proteína diana es una molécula de señalización.

Un perfil compuesto establecido por el método de la invención presenta ventajas inesperadas y soluciona diversos problemas que se encuentran en la técnica de predicción de la evolución de una enfermedad basada en la presencia de marcadores celulares en una muestra biológica. Como se ha descrito en la presente memoria, una proteína diana de la invención permite determinar los niveles semicuantitativos de una diana celular de interés en referencia a las múltiples poblaciones celulares presentes en la muestra que se sabe son positivas o negativas para la diana celular de interés. En los métodos descritos en la presente memoria, la presencia y el nivel de la diana celular de interés se correlacionan de forma independiente con múltiples poblaciones de referencia positivas presentes en la muestra y caracterizadas por

niveles variables de la diana celular de interés. Además, el método correlaciona la presencia y el nivel de la diana celular de interés con una o más poblaciones celulares internas presentes en la muestra que se sabe son negativas para la proteína diana. Por tanto, en vez de utilizar un antígeno no relacionado como estándar interno para la cuantificación, los métodos de la invención correlacionan múltiples poblaciones internas positivas para la diana celular de interés y permiten el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas, basadas en el perfil compuesto de un individuo. Los métodos ofrecidos por la invención pueden generalizarse para la cuantificación de cualesquiera dianas celulares para las cuales existan poblaciones negativa y positiva de referencia dentro de la muestra.

En una realización, la invención ofrece un método para establecer un perfil de marcadores compuesto para una muestra procedente de un individuo que se sospecha que tiene una enfermedad neoplásica, que incluye las etapas de hacer reaccionar la muestra biológica con una colección de moléculas de unión, donde la colección de moléculas de unión contiene dos o más grupos de moléculas de unión específicas para marcadores asociados a una población celular única, y donde los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores identifican poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra; identificar la presencia de poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra mediante la detección de los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores que identifican poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra y, posteriormente, correlacionar los niveles de marcadores en cada una de las poblaciones celulares normales y neoplásicas con la presencia de una proteína diana para establecer un perfil de marcadores compuesto, en donde la proteína diana es una molécula de señalización.

En realizaciones concretas, los métodos de la invención se aplican a un cáncer que puede definirse como “cáncer hematológico”, un término que se refiere a neoplasias malignas de tejidos formadores de sangre y que abarca leucemia, linfoma y mieloma múltiple. Las leucemias incluyen leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia linfocítica aguda (LLA), tricoleucemia (TL), síndromes mielodisplásicos (SMD) o leucemia mielógena crónica en fase blástica (LMC-FB), así como todos los subtipos de estas leucemias, definidos mediante técnicas morfológicas, histoquímicas e inmunológicas bien conocidas por los expertos en la técnica. En realizaciones concretas de la invención, el cáncer hematológico se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC) y leucemia linfocítica aguda (LLA).

Las leucemias se dividieron originariamente en agudas y crónicas, basándose en la esperanza de vida; sin embargo, ahora se clasifican en función de la maduración celular. En las leucemias agudas predominan las células inmaduras (por lo general formas de blastocitos) mientras que en las leucemias crónicas consisten en células más maduras. Las leucemias agudas se caracterizan por el rápido crecimiento de células sanguíneas inmaduras. Esta proliferación incapacita a la médula ósea para producir células sanguíneas sanas. Las leucemias agudas se dividen además en linfoblásticas (LLA) y mielógenas (LMA), que a su vez pueden subdividirse por aspectos morfológicos y citoquímicos, según la clasificación FAB (del French-American-British Cooperative Group) o el inmunofenotipo. Los linfocitos B y T específicos y los anticuerpos monoclonales contra antígenos mielógenos, junto con la citometría de flujo, resultan muy útiles para diferenciar la LLA de la LMA, lo cual es fundamental para el tratamiento.

Las leucemias agudas comprenden la leucemia linfoblástica aguda (LLA) y la leucemia mielógena aguda (LMA). Las células leucémicas se acumulan en la médula ósea, donde sustituyen a las células hematopoyéticas normales, y se extienden al hígado, el bazo, los ganglios linfáticos, el SNC, los riñones y las gónadas. Dado que son células formadoras de sangre, pueden infiltrarse en cualquier órgano o lugar del cuerpo. La LLA afecta a menudo al SNC, mientras que la leucemia monoclonal aguda afecta a las encías y la LMA provoca acumulaciones localizadas en cualquier lugar (sarcomas granulocíticos o cloromas).

Las leucemias crónicas se dividen en linfocítica (LLC) y mielógena (LMC). La LLC implica la expansión clonal de linfocitos de aspecto maduro a los ganglios y otros tejidos linfáticos, con infiltración progresiva de la médula ósea y presencia en la sangre periférica. La LLC descrita tradicionalmente es el subtipo más frecuente, en particular de los linfocitos B, que representa casi todos los casos. Entre el 2% y el 3% de los casos la expansión clonal es de linfocitos T, e incluso en este grupo hay un subtipo, en particular, el de linfocitos granulares grandes con citopenias. Además, se han descrito otros tipos de leucemias crónicas dentro de las LLC: leucemia prolinfocítica, fase leucémica del linfoma cutáneo de linfocitos T (síndrome de Sézary), tricoleucemia y linfoma/leucemia (cambios leucémicos observados en estadios avanzados de linfoma maligno). La distinción entre estos subtipos y la LLC típica suele ser sencilla.

En una realización, la invención ofrece un método para establecer un perfil de marcadores compuesto para una muestra procedente de un individuo que se sospecha que tiene leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (LLCB) mediante la reacción de la muestra biológica con una serie de moléculas de unión que contiene dos o más grupos de moléculas de unión específicas para marcadores asociados a una población celular única e identificar la presencia de poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra mediante la detección de los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores que identifican las poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra, y correlacionar los niveles de marcadores en cada una de las poblaciones celulares normales y neoplásicas con la presencia de ZAP-70 para establecer un perfil de marcadores compuesto para una muestra procedente de un individuo que se sospecha que tiene leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (LLCB).

La LLCB se caracteriza por la acumulación clonal de células CD5<sup>+</sup> (Caligaris-Cappio, y col., J Exp Med 155:623-8, 1982). La expresión de marcadores de superficie celular específicos permite distinguir subgrupos de linfocitos B

humanos normales que difieren en sus etapas de diferenciación y activación y en sus propiedades biológicas (Clark and Lane, *Ann Rev Immunol* 9:97-127, 1991). En particular, los análisis de la expresión de CD38 e IgD han sido especialmente útiles para distinguir los linfocitos B en distintas etapas de diferenciación, desde los indiferenciados hasta las células con memoria (Pascual, y col., *J Exp Med* 180:329-339, 1994; Zupo, y col., *Blood*, 88:1365-1374, 1996).

En otra realización, la presente invención ofrece un método para establecer un perfil de marcadores compuesto para una muestra procedente de un individuo que se sospecha que tiene LMC, mediante la reacción de la muestra biológica con una serie de moléculas de unión que contiene dos o más grupos de moléculas de unión específicas para marcadores asociados a una población celular única, donde los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores identifican poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra; identificar posteriormente la presencia de poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra mediante la detección de los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores que identifican las poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra, y correlacionar los niveles de marcadores en cada una de las poblaciones normales y neoplásicas con la presencia de al menos una proteína diana para establecer un perfil de marcadores compuesto para la muestra de un individuo que se sospecha que tiene LMC. En esta realización, la proteína diana puede seleccionarse del grupo que consiste en proteínas de transducción de señales que se activan por fosforilación, marcadores de proliferación, marcadores de diferenciación y marcadores de apoptosis.

La leucemia mielógena crónica (LMC) es una enfermedad que tiene características clínicas y patológicas distintas de otras formas de leucemia. Se acepta ampliamente que la causa de la LMC es una translocación cromosómica específica entre los cromosomas 9 y 22 humanos. El cromosoma anómalo resultante de esta translocación se conoce habitualmente como cromosoma Filadelfia (Darnell, J. y col., *Molecular Cell Biology*, 2nd Ed., W. H. Freeman and Co., New York (1990), p. 992). El gen para c-abl (ABL), una tirosina-cinasa que se considera implicada en el control del crecimiento, se encuentra en el brazo distal del cromosoma 9 humano, mientras que el gen para c-bcr (BCR) se encuentra en el cromosoma 22 humano. La translocación coloca tres exones distales del promotor del ABL, incluyendo los elementos que codifican el dominio de la tirosina-cinasa, en la dirección 3' del primer o segundo exón del BCR. Chung, S. and Wong, P. M. C., *Oncogene*, 10:1261-1268 (1995). El resultado de la translocación entre los cromosomas 9 y 22 humanos es un gen híbrido BCR-ABL que codifica una proteína de fusión, a menudo denominada p185<sup>bcr-abl</sup> o p210<sup>bcr-abl</sup>, dependiendo de la inserción del segundo exón del BCR. Bartram, C. R., y col., *Nature*, 306:277-280 (1983). p185<sup>bcr-abl</sup> produce leucemia aguda, de forma típica linfoblástica; p210<sup>bcr-abl</sup> suele provocar LMC, pero a veces también causa leucemia aguda.

La LMC implica mieloproliferación clonal provocada por transformación maligna de un citoblasto pluripotente, y se caracteriza clínicamente por la producción excesiva de granulocitos, principalmente en la médula ósea, pero también en puntos extramedulares (p. ej., el bazo o el hígado). Aunque predomine la producción de granulocitos, el clon neoplásico incluye eritrocitos, megacariocitos, monocitos e incluso algunos linfocitos T y B. Los citoblastos normales se mantienen y pueden proliferar tras la supresión farmacológica del clon de la LMC. La médula ósea es hipercelular, pero en el 20% al 30% de los pacientes se desarrolla mielofibrosis, normalmente al cabo de varios años. En la mayor parte de los pacientes el clon de la LMC evoluciona hacia una fase acelerada y una crisis hemoblástica final. A partir de ese momento pueden desarrollarse tumores blastocíticos en otros puntos extramedulares como el hueso, el SNC, los ganglios linfáticos y la piel.

La leucemia mielógena crónica (LMC) presenta una evolución clínica característica, con hiperplasia granulocítica crónica inicial que evoluciona invariablemente a una leucemia aguda provocada por la expansión clonal de una célula con un fenotipo menos diferenciado (es decir, la etapa de crisis hemoblástica de la enfermedad). La LMC es una enfermedad inestable que, en último término, progresa hacia una etapa terminal que se asemeja a la leucemia aguda. Esta mortal enfermedad afectó a aproximadamente 9.730 pacientes en EE. UU. en 2004. Agentes de quimioterapia como hidroxiaurea o busulfano pueden reducir la masa leucémica, pero no mejoran la esperanza de vida del paciente (p. ej., aproximadamente 4 años). En consecuencia, los pacientes con LMC son candidatos al trasplante de médula ósea (TMO). Sin embargo, en los pacientes que sobreviven al TMO, la recurrencia de la enfermedad es un obstáculo importante (Apperley y col., 1988 *Br. J. Haematol.* 69, 239).

En otra realización, la presente invención ofrece un método para establecer un perfil de marcadores compuesto para una muestra procedente de un individuo que se sospecha que tiene LMA, mediante la reacción de la muestra biológica con una serie de moléculas de unión que contiene dos o más grupos de moléculas de unión específicas para marcadores asociados a una población celular única, donde los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores identifican poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra; identificando posteriormente la presencia de poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra mediante la detección de los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores que identifican las poblaciones celulares normales y neoplásicas en la muestra, y correlacionando los niveles de marcadores en cada una de las poblaciones celulares normales y neoplásicas con la presencia de al menos una proteína diana para establecer un perfil de marcadores compuesto para la muestra de un paciente que se sospecha que tiene LMA. En esta realización, la proteína diana puede seleccionarse del grupo que consiste en proteínas de transducción de señales, marcadores de proliferación y marcadores de apoptosis.

En otra realización, la presente invención ofrece un método para establecer un perfil de marcadores compuesto para una muestra procedente de un individuo que se sospecha que tiene leucemia linfocítica aguda (LLA), mediante la reacción de la muestra biológica con una serie de moléculas de unión que contiene dos o más grupos de moléculas de unión específicas

para marcadores asociados a una población celular única, donde los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores identifican poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra; identificar posteriormente la presencia de poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra mediante la detección de los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores que identifican las poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra, y correlacionar los niveles de marcadores en cada una de las poblaciones celulares normales y neoplásicas con la presencia de al menos una proteína diana para establecer un perfil de marcadores compuesto para la muestra procedente de un individuo que se sospecha que tiene LLA. En esta realización, la proteína diana puede seleccionarse del grupo que consiste en proteínas de transducción de señales, marcadores de proliferación y marcadores de apoptosis.

En la presente memoria, el término “proceso neoplásico” se refiere a una enfermedad asociada a la proliferación de células que se caracteriza por una pérdida de los controles normales que da como resultado uno o más síntomas como crecimiento no regulado, falta de diferenciación, invasión de los tejidos locales y metástasis. Como se describe en la presente memoria, para establecer un perfil de marcadores compuesto para una muestra procedente de un individuo que se sospecha que tiene un proceso neoplásico, se pone en contacto una muestra biológica con una serie de moléculas de unión que contiene dos o más grupos de moléculas de unión específicas para marcadores asociados a una población celular única que identifican poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra.

La muestra biológica se toma preferiblemente directamente del individuo, en especial de una persona que se sospecha que tiene cáncer, y posteriormente se dispone en una forma adecuada para establecer un perfil compuesto. En una realización, el fluido biológico puede ser, por ejemplo, sangre completa, células mononucleares de sangre periférica (CMSP), aspirado de médula ósea o tejido linfático. Las muestras biológicas adecuadas incluyen cualquier tejido corporal o fluido corporal. En realizaciones preferidas, el tejido puede ser aspirado de médula ósea, biopsia de médula ósea, aspirado de ganglio linfático, biopsia de ganglio linfático, tejido del bazo, aspirado con aguja fina, biopsia cutánea o biopsia tisular de un órgano, secciones tisulares y células desagregadas. Otras realizaciones incluyen muestras donde el fluido corporal es sangre periférica, linfa, ascitis, líquido seroso y líquido cefalorraquídeo. En las leucemias agudas, la sangre completa y el aspirado de médula ósea son muestras biológicas especialmente adecuadas. En realizaciones donde la muestra biológica comprende sangre completa, la preparación de la muestra puede incluir la fijación y permeabilización de los leucocitos y la lisis de los eritrocitos. Se entiende, además, que preparar muestras biológicas que contengan niveles significativos de eritrocitos puede implicar un tratamiento para eliminarlos mediante, por ejemplo, lisis hipotónica, tratamiento detergente y centrifugación en gradiente de densidad.

Como se describe en la presente memoria, en un método de la invención se pone en contacto una muestra biológica con una serie de moléculas de unión que contiene dos o más grupos de moléculas de unión específicas para marcadores asociados a una población celular única que identifican poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra. En la presente memoria, el término “molécula de unión” se refiere a cualquier molécula capaz de unirse a un antígeno con suficiente afinidad para demostrar una actividad de unión selectiva. Ejemplos de moléculas de unión incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o moléculas similares a los anticuerpos. Los anticuerpos los pueden producir los linfocitos B o los hibridomas y anticuerpos híbridos o humanizados o cualquier fragmento de ellos, p. ej., fragmentos F(ab')<sub>2</sub> y Fab, así como anticuerpos monocatenarios o de dominio simple.

Una molécula de unión útil en la práctica de los métodos de la invención puede ser un anticuerpo monocatenario que consiste en los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo unidos covalentemente a un péptido conector que consiste normalmente en 10 a 30 aminoácidos, preferiblemente 15 a 25 aminoácidos. Por tanto, una estructura de este tipo no incluye la parte constante de las cadenas pesada y ligera y se cree que el pequeño espaciador del péptido sería menos antigénico que la parte constante completa. Una molécula de unión útil en la práctica de los métodos de la invención puede ser también un anticuerpo híbrido, es decir, un anticuerpo en el que las regiones constantes de las cadenas pesada o ligera, o ambas, son de origen humano, mientras que los dominios variables de ambas cadenas son de origen no humano, por ejemplo, de origen murino. Una molécula de unión útil en la práctica de los métodos de la invención también puede ser un anticuerpo humanizado cuyas regiones hipervariables (CDR) son de origen no humano, por ejemplo, de origen murino, mientras que todas o prácticamente todas las demás partes de la inmunoglobulina, en particular las regiones constantes y las partes altamente conservadas de los dominios variables, en particular las secuencias estructurales, son de origen humano. Un anticuerpo humanizado puede conservar unos pocos aminoácidos de la secuencia murina en las partes de las secuencias estructurales adyacentes a las regiones hipervariables. Las regiones hipervariables pueden asociarse a cualquier tipo de secuencias estructurales, preferiblemente de origen murino o humano. Las secuencias estructurales adecuadas son bien conocidas y se han descrito en la técnica. Todas las moléculas de unión anteriormente mencionadas son útiles en la práctica de los métodos de la invención.

Una serie de moléculas de unión utilizada en un método de la invención contiene dos o más grupos de moléculas de unión específicas para marcadores asociados a una población celular única que identifican poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra. En la presente memoria, un “marcador asociado a una población celular” se refiere a un antígeno que, solo o en combinación con uno o más antígenos distintos, se utiliza para identificar una o más poblaciones celulares internas en una muestra biológica mediante la unión selectiva a una molécula de unión. Como es sabido en la técnica, las poblaciones celulares pueden distinguirse por una combinación exclusiva de marcadores, por ejemplo los marcadores de superficie celular, que se expresan en la superficie de la célula. En las leucemias agudas, marcadores asociados a una población celular pueden incluir, por ejemplo, CD45, CD2, CD3, CD7, CD10, CD11b, CD13, CD14, CD15, CD19, CD20, CD33, CD34, CD56, CD71, CD117 y HLA-DR. Pueden añadirse otros marcadores

suplementarios, según determine el usuario, como por ejemplo CD1a, cCD3, CD4, CD5, CD8, cCD22, CD61, glucoforina A y TdT. Como se describe en la presente memoria, para una muestra biológica de un individuo que se sospecha que tiene LMA, los marcadores asociados a una población celular útiles para establecer un perfil de marcadores compuesto pueden incluir, por ejemplo, CD45, CD33, CD34, CD11b, CD13, CD14, CD15, CD16, MPL (mieloperoxidasa), CD64 y CD117 (receptor c-kit). Además, para las leucemias de la categoría M6-M7 pueden añadirse marcadores definidos por el usuario, como por ejemplo CD41, CD42, CD61, CD62P, CD71, glucoforina A y hemoglobina. Se entiende que se analizarán menos marcadores cuando la muestra contenga pocas células. Las moléculas CD son marcadores diagnósticos adecuados para identificar y cuantificar poblaciones celulares mediante citometría de flujo. La citometría de flujo es una técnica para contar, examinar y catalogar partículas microscópicas suspendidas en un fluido. Los procedimientos de citometría de flujo comienzan con la obtención de las células o tejidos, seguido de los procedimientos de tinción y lavado, continúan con la adquisición de datos de flujo en el citómetro y terminan con el análisis de datos y el informe de resultados.

Las poblaciones celulares de interés en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria incluyen varios tipos de leucocitos, en particular granulocitos, linfocitos y monocitos. Existen tres tipos de granulocitos: neutrófilos, basófilos y eosinófilos. Los leucocitos además incluyen linfocitos, que abarcan linfocitos B y T y linfocitos citotóxicos naturales (NK). Los linfocitos citotóxicos o "linfocitos NK" son grandes linfocitos granulares que comprenden de 2% a 15% de las CMSP en las personas sanas. Aunque la mayoría de los linfocitos NK son CD3:TCR, CD16<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>, existe una considerable variabilidad fenotípica y funcional en esta población celular (Trinchieri, Adv. Immunol., 47:187 (1989)). Por ejemplo, se ha observado que la densidad superficial de CD56 define poblaciones de linfocitos NK funcionalmente distintas. Los linfocitos NK CD56<sup>bright</sup> son fundamentalmente linfocitos CD16<sup>+</sup>, agranulares, con deficiente función efectora citolítica, que proliferan intensamente en respuesta a la IL-2 exógena. Los linfocitos NK CD56<sup>dim</sup> son linfocitos de los ganglios linfáticos CD16<sup>+</sup> (CD16<sup>+</sup> LGL por sus siglas en inglés) con una potente función efectora citolítica, que no proliferan en respuesta a la IL-2. Dado que algunos linfocitos T expresan tanto CD16 como CD56, estas moléculas en sí mismas no pueden definir la población de linfocitos NK. Además, puesto que la expresión de CD56 en poblaciones de linfocitos NK funcionalmente distintas es baja, no pueden utilizarse anticuerpos monoclonales reactivos con CD56 para distinguir de forma fiable esta subpoblación de linfocitos NK de otras células en una muestra. Además de ser capaces de distinguir entre poblaciones celulares normales, las moléculas de unión se utilizan en un método de la invención para identificar poblaciones celulares neoplásicas internas en la muestra. Las moléculas CD son marcadores diagnósticos adecuados para identificar y cuantificar poblaciones celulares mediante citometría de flujo. En realizaciones preferidas de la invención, el nivel de expresión del marcador asociado a una población celular, por ejemplo, CD38<sup>+</sup> para la expresión de la LLCB, se determina utilizando citometría de flujo en la que las células se han marcado con anticuerpos monoclonales conjugados con colorantes o enzimas fluorescentes, aunque también puede usarse la inmunofluorescencia visual u otros métodos. En realizaciones específicas, en las muestras biológicas se analiza la expresión superficial de combinaciones de marcadores asociados a una población celular, por ejemplo, mediante inmunofluorescencia multicolor, utilizando una serie de moléculas de unión específica para una población particular de un tipo celular asociado. Se entiende que puede seleccionarse cualquier combinación de moléculas de unión que sea específica para identificar una población particular de un tipo celular asociado en una muestra biológica.

Como se describe en la presente memoria, para una muestra biológica de un individuo que se sospecha que tiene LLC, los marcadores asociados a una población celular útiles para establecer un perfil de marcadores compuesto pueden incluir, por ejemplo, CD3 para identificar linfocitos T, CD5 para identificar linfocitos T normales y linfocitos B neoplásicos, CD19 para identificar linfocitos B normales y linfocitos B neoplásicos, CD56 para identificar linfocitos NK normales, CD23 para identificar linfocitos B activados o linfocitos B de la capa folicular, CD38 para identificar la activación y/o diferenciación celular, CD79b como marcador citoplásmico del linaje linfocítico B, y FMC7 como marcador del linaje linfocítico B normal, que es característicamente negativo en la LLCB. Por tanto, las combinaciones de marcadores útiles para identificar poblaciones celulares en la LLCB incluyen CD5 positivo y CD19 positivo; CD5 positivo y CD20 negativo; CD3 positivo o CD56 positivo, y CD3 positivo.

El método puede llevarse a cabo utilizando cualquier tejido que contenga células de la LLCB, incluyendo de forma no limitativa, bazo, ganglios linfáticos, médula ósea, linfa, sangre periférica, una muestra de sangre completa del paciente o una muestra de sangre entera que ha sido tratada y procesada para aislar las células mononucleares de sangre periférica ("CMSP").

El resultado de la transformación neoplásica de un hemocitoblasto precoz, la LMC, se caracteriza clínicamente por la acumulación de células mielógenas inmaduras y maduras en la circulación periférica y, citogenéticamente, por la presencia del cromosoma Filadelfia. Los antígenos mielógenos CD33, CD13, CD11c, CD45 y la isoforma CD45RO se expresan en la LMC, pero no el CD45RA, lo que ayuda a diferenciar la LMC de la LMA. Dado que las células de la LMC expresan el antígeno HLA-DR, pueden diferenciarse de los precursores normales en la médula ósea. En realizaciones de la invención que implican a un individuo que se sospecha que tiene LMC, los marcadores asociados a una población celular se seleccionan del grupo que consiste en CD45 y CD34 para identificar poblaciones celulares inmaduras o "blastocitos"; CD11b para identificar células mielógenas normales y neoplásicas; CD13 y CD15 para identificar células mielógenas normales y neoplásicas; CD14, CD33, CD79a y CD79b para identificar linfocitos B normales y neoplásicos; CD22, CD10, CD16 y Bcr/Abl para identificar células neoplásicas, y desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) para identificar el grado de diferenciación de las poblaciones normales y neoplásicas.

Como se describe en la presente memoria, las poblaciones celulares pueden distinguirse mediante una combinación exclusiva de marcadores asociados, por ejemplo marcadores de superficie celular, que se expresan en la superficie de

la célula. En los métodos de la invención, la identificación de poblaciones celulares internas normales y neoplásicas basada en la expresión y el nivel de los marcadores asociados precede a la etapa de correlación de los niveles del marcador en cada una de las poblaciones celulares con la presencia de al menos una proteína diana. Así, inicialmente se utilizan combinaciones de marcadores asociados a poblaciones celulares internas para identificar poblaciones celulares normales y neoplásicas, que posteriormente se correlacionan con la presencia de al menos una proteína diana. Se entiende que las combinaciones de presencia y nivel de expresión de marcadores asociados a poblaciones celulares pueden seleccionarse en función de las poblaciones celulares particulares internas en una muestra biológica que se desea identificar para la posterior correlación con la proteína diana de interés. Se entiende también que los métodos para la cuantificación de las tinciones basados en la comparación de poblaciones control de células internas pueden generalizarse para aplicaciones en las que las poblaciones de referencia no están presentes en la muestra, mediante la adición exógena, o enriquecimiento de las poblaciones celulares de referencia apropiadas en la muestra.

Las poblaciones celulares internas normales y neoplásicas particulares, identificadas mediante la expresión y el nivel de marcadores asociados para las realizaciones asociadas a la LLCB, pueden abarcar una población que sea CD5 positiva y CD19 positiva, una población que sea CD5 positiva y CD20 negativa, una población que sea CD3 positiva y CD56 positiva y una población que sea CD3 positiva. Como ejemplo del principio de esta invención, los linfocitos T normales o reactivos (CD3+) y los linfocitos NK (CD56+) son positivos para la expresión de la proteína ZAP-70, mientras que los linfocitos B normales (CD 19+/CD5-) y los granulocitos normales (identificados mediante características de dispersión de la luz, exclusivamente o en combinación con CD45) son negativos para la expresión de la proteína ZAP-70. Estas poblaciones celulares internas de la muestra se utilizan para determinar el nivel de expresión de la proteína ZAP-70 en la población (neoplásica) de la LLCB identificada por ser CD19+/CD5+ (posiblemente junto con marcadores adicionales, p. ej., FCM7-) en relación con las poblaciones celulares internas positivas y negativas, y se usan de forma conjunta para establecer un perfil compuesto.

En las realizaciones dirigidas a la LMC, los marcadores asociados a una población celular pueden identificar una población celular que abarque granulocitos leucémicos y también una población celular adicional que abarque monocitos leucémicos, además de linfocitos, monocitos y granulocitos normales. Por tanto, la presente invención proporciona un método para establecer un perfil de marcadores compuesto para una muestra procedente de un individuo que se sospecha que tiene LMC mediante reacción de la muestra biológica con una serie de moléculas de unión que contiene dos o más grupos de moléculas de unión específicas para marcadores asociados a una población celular única, donde los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores identifican poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra; identificando posteriormente la presencia de poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra mediante la detección de los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores que identifican las poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra, y correlacionar los niveles de marcadores en cada una de las poblaciones celulares normales y neoplásicas con la presencia de al menos una proteína diana para establecer un perfil de marcadores compuesto para una muestra procedente de un individuo que se sospecha que tiene leucemia mielógena crónica (LMC). En esta realización, la proteína diana puede seleccionarse del grupo que consiste en proteínas de transducción de señales, marcadores de proliferación, marcadores de diferenciación y marcadores de apoptosis.

Una muestra biológica puede procesarse para establecer un perfil de marcadores compuesto utilizando cualquier procedimiento de preparación y tinción celular seleccionado por el experto y adecuado para la muestra en particular. Se entiende que los procedimientos de preparación y tinción celular, que generalmente incluyen lisis, tinción, fijación y permeabilización de eritrocitos (RBC por sus siglas en inglés), con algunas variaciones en el orden de las etapas, pueden utilizarse en la medida en que se mantengan los marcadores asociados a la población celular de interés para permitir la identificación de poblaciones celulares tal como se describe en la presente memoria. En la técnica se describen y son bien conocidos procedimientos de preparación adecuados, por ejemplo la lisis de eritrocitos en sangre completa, médula ósea, ascitis, etc., utilizando lisis hipotónica (para obtener poblaciones de leucocitos purificadas (WBC por sus siglas en inglés)) o el uso de técnicas de gradiente de densidad (p. ej., Hypaque/Ficoll) para obtener muestras enriquecidas en linfocitos mononucleares.

Así, en un método de la invención para establecer un perfil de marcadores compuestos para una muestra procedente de un individuo que se sospecha que tiene un proceso neoplásico, la muestra se hace reaccionar primero con una serie de moléculas de unión que contiene dos o más grupos de moléculas de unión específicas para marcadores asociados a una población celular única que identifican poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra. Como se ha indicado anteriormente, el usuario puede seleccionar los grupos de moléculas de unión para identificar poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra. Una vez identificadas las poblaciones celulares normales y neoplásicas, las poblaciones celulares se correlacionan con la presencia de una proteína diana para establecer un perfil de marcadores compuesto.

En la presente memoria, el término “proteína diana” se refiere a una proteína que, como resultado de su papel en la mediación de la respuesta celular, el comportamiento o la función de las poblaciones celulares neoplásicas y normales, puede utilizarse para establecer un perfil de marcadores compuesto. Para establecer un perfil de marcadores compuesto de la invención, se mide la respuesta funcional de una o más proteínas diana a un estímulo modulador y se compara entre las poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra. Una proteína diana útil en un método de la invención puede ser, por ejemplo, una molécula de señalización que medie en un efecto relacionado con el metabolismo, el crecimiento, la diferenciación y la apoptosis celulares o que desempeñe cualquier otro papel fisiológico. Por tanto, el estado

de modulación de una proteína diana puede medirse por la respuesta biológica como un sustrato específico o preferente, un adaptador molecular o un componente de una vía de señalización. Para establecer un perfil de marcadores compuesto de la presente invención, puede medirse el estado de modulación de la proteína diana, por ejemplo su estado de fosforilación, en las poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra.

5 En la presente memoria, la expresión “perfil de marcadores compuesto” se refiere a una matriz de niveles de expresión de una proteína diana comparando poblaciones celulares internas únicas de una muestra biológica. El perfil de marcadores compuesto representa una cuantificación de la proteína diana en una muestra biológica basada en la estandarización de la expresión de la proteína diana en células neoplásicas respecto a los niveles de tinción de la proteína diana en poblaciones celulares normales positivas para la proteína diana. Las poblaciones celulares normales positivas para la proteína diana sirven como control positivo para diversos niveles de expresión de la proteína diana. Una o más poblaciones celulares internas normales que no expresan la proteína diana pueden servir como control negativo. En muestras de tejidos, la contaminación con sangre periférica puede hacer que existan suficientes granulocitos como para servir de control negativo interno.

15 En un método para establecer un perfil de marcadores compuesto para una muestra procedente de un individuo que se sospecha que tiene LMA o LMC, la proteína diana puede ser una proteína de transducción de señales, como por ejemplo Abl, CRKL, Hck, STAT1, STAT3, STAT5,

20 Flt3, Akt/PKB, ERK, mTOR o S6. La Figura 5 muestra paneles de citometría de flujo que representan la activación de S6 mediante mTOR en una muestra de LMA. De forma adicional, en un método para establecer

25 un perfil de marcadores compuesto para una muestra procedente de un individuo que se sospecha que tiene LMC, la proteína diana puede ser un marcador de proliferación, por ejemplo ciclina D1 o ciclina A2, o un marcador de apoptosis, por ejemplo caspasa-3 escindida o Bcl-X1. La Figura 6 muestra un perfil compuesto de citoblastos movilizados en sangre periférica, establecido comparando las respuestas de tres proteínas de transducción de señales distintas, P-ERK, P-S6 y P-PKB/AKT, en citoblastos CD34+ con las de las poblaciones de referencia internas (linfocitos, granulocitos y monocitos) a tres estímulos diferentes. La Figura 7 representa un perfil compuesto establecido mediante la invención en una muestra de un paciente con LMA, midiendo la expresión de las proteínas diana de transducción de señales P-ERK y P-S6 en la muestra de sangre y comparando la expresión en blastocitos de LMA (rojo) con la observada en poblaciones de referencia internas de linfocitos (azul) y granulocitos (verde).

35 En una realización particular de la invención, la cuantificación de ZAP-70 en la LLCB puede lograrse mediante estandarización frente a los niveles de tinción de ZAP-70 en linfocitos citotóxicos y linfocitos T normales, ambos positivos para ZAP-70. En esta realización, dirigida a establecer un perfil de marcadores compuesto para una muestra procedente de un individuo que se sospecha que tiene LLCB, los linfocitos citotóxicos y los linfocitos T normales brindan dos controles positivos de intensidad variable, ofreciendo los linfocitos citotóxicos una tinción más brillante que los linfocitos T. En esta realización, los granulocitos y linfocitos B normales en muestras biológicas de sangre periférica y médula ósea no presentan ZAP-70 y pueden servir como controles negativos.

40 En determinadas realizaciones de los métodos descritos en la presente memoria, la proteína diana se detecta por modificaciones, por ejemplo, del estado de fosforilación, que pueden correlacionarse con una enfermedad. Las células dependen en gran medida de moléculas extracelulares como medio para recibir estímulos de su entorno inmediato. Estas señales extracelulares son esenciales para la correcta regulación de diversos procesos celulares como diferenciación, contractilidad, secreción, división, inhibición por contacto y metabolismo, y pueden correlacionarse con procesos anómalos o potencialmente deletéreos, como la interacción con receptores víricos, la inflamación y la transformación celular de un estado canceroso. Una característica central de este proceso, por lo que se refiere a la transducción de señales, es la fosforilación reversible de algunas proteínas. La fosforilación es un proceso dinámico que implica reacciones competitivas de fosforilación y desfosforilación; el nivel de fosforilación en un momento dado refleja las actividades relativas, en ese instante, de las proteína-cinasas y fosfatasa que catalizan estas reacciones.

50 Por tanto, un perfil de marcadores compuesto de la invención puede correlacionarse con la fosforilación o desfosforilación de una proteína diana, en lugar de simplemente su expresión, ya que tales cambios conformacionales en las proteínas reguladas alteran sus propiedades biológicas. Aunque la mayor parte de la fosforilación de las proteínas se produce en los restos aminoácidos de serina y treonina, también se produce en los restos de tirosina, lo cual ha comenzado a despertar un fuerte interés desde que se descubrió que muchos productos de oncogenes y receptores de factores de crecimiento poseen actividad intrínseca de tirosina-cinasa. Ahora ha quedado demostrada la importancia de la fosforilación de la tirosina en la transducción de señales del factor de crecimiento, la progresión del ciclo celular y la transformación neoplásica (Cantley y col., 1991, *Cell* 64:281-302; Hunter T., 1991, *Cell* 64:249-270; Nurse, 1990, *Nature* 344:503-508; Schlessinger y col., 1992, *Neuron* 9:383-391; Ullrich y col., 1990, *Cell* 61:203-212). Se ha demostrado que la alteración de las vías de control normal del crecimiento que da lugar a la oncogénesis está causada por la activación y la expresión en exceso de tirosina-cinasas, que constituyen un gran grupo de proteínas oncogénicas dominantes (revisado en Hunter, T., 1991, *Cell* 64:249- 270). Como se describe en la presente memoria, un perfil de marcadores compuesto de la invención puede correlacionar el estado de fosforilación de una proteína diana en cada una de las poblaciones celulares normales y neoplásicas con la presencia de una proteína diana para establecer un perfil de marcadores compuesto para una muestra procedente de un individuo que se sospecha que tiene un proceso neoplásico.

En una realización preferida, todas las poblaciones celulares que componen el perfil de marcadores compuesto son internas a la muestra biológica. En la presente memoria, el término “interno”, cuando se utiliza en referencia a una muestra biológica, significa que todas las poblaciones celulares están presentes inicialmente en la muestra, más bien que añadidas o “agregadas” en la muestra antes de establecer el perfil de marcadores compuesto. Si no existe una población celular que pueda servir como control negativo, la matriz de comparación establecida comparando las poblaciones internas de células normales y de células neoplásicas positivas para la proteína diana permite la determinación semicuantitativa de niveles de proteína diana suficientes para establecer un perfil de marcadores compuesto conforme a los métodos descritos en la presente invención. Se contempla también que puedan añadirse a una muestra biológica poblaciones celulares internas de control, positivo y negativo, en caso de que no haya tales poblaciones internas de control en la muestra.

Como se ha descrito anteriormente, la invención proporciona un método para establecer un perfil de marcadores compuesto para una muestra procedente de un individuo que se sospecha que tiene leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (LLCB) mediante reacción de la muestra biológica con una serie de moléculas de unión que contiene dos o más grupos de moléculas de unión específicas para marcadores asociados a una población celular única e identificar la presencia de poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra mediante la detección de los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores que identifican las poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra, y correlacionar los niveles de marcadores en cada una de las poblaciones celulares normales y neoplásicas con la presencia de ZAP-70 para establecer un perfil de marcadores compuesto para una muestra procedente de un individuo que se sospecha que tiene leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (LLCB).

La cuantificación de ZAP-70 en la LLCB puede lograrse mediante estandarización frente a los niveles de tinción de ZAP-70 en linfocitos citotóxicos y linfocitos T normales, ambos positivos para ZAP-70. Esto proporciona dos controles positivos de intensidad variable, teniendo los linfocitos citotóxicos una tinción más brillante que los linfocitos T. En esta realización, los granulocitos o los linfocitos B normales en muestras biológicas de sangre periférica y médula ósea no presentan ZAP-70 y pueden servir como controles negativos.

En muestras de tejidos, la contaminación con sangre periférica puede hacer que haya presentes suficientes granulocitos para permitir su uso como control negativo interno. Si no es así, el cociente de referencia respecto a los linfocitos T normales es adecuado para la determinación “semicuantitativa”. Para que esto se cumpla en la LLC, una combinación específica de antígenos además de ZAP-70 es CD 19, CD5 y CD56. Pueden utilizarse otras combinaciones de anticuerpos para seleccionar poblaciones relevantes tanto normales como neoplásicas. Además de lo señalado anteriormente, esto podría incluir, de forma no limitativa, CD3, CD20, CD23, CD79a, MCF7 y las cadenas ligeras de inmunoglobulina. Los métodos descritos en la presente memoria pueden ponerse en práctica con muestras sometidas a tinción específica para una determinada proteína diana, de superficie o intracelular, en caso de que se encuentren presentes poblaciones celulares normales, tanto positivas como negativas para la misma proteína diana, o propiedad celular susceptible de tinción, y pueden servir como referencia biológica para determinar si una población celular de interés es positiva o no para el mismo antígeno o marcador. Las poblaciones celulares internas biológicas también sirven como comparación para determinar el nivel semicuantitativo de ese antígeno o marcador en las células de interés. Las poblaciones celulares internas pueden seleccionarse a partir de otras propiedades celulares que incluyen, de forma no limitativa, la detección de antígenos y la luz dispersada. Los marcadores específicos necesarios dependerán de la aplicación específica del método de la invención, y los seleccionará el experto convenientemente.

Según las realizaciones descritas anteriormente, los métodos para preparar perfiles compuestos de marcadores para cánceres hematológicos concretos pueden hacerse extensivos a los métodos de diagnóstico. Puede utilizarse un perfil de marcadores compuesto según los métodos de la invención para el diagnóstico de un proceso neoplásico en un individuo que se sospeche esté afectado por un proceso neoplásico, mediante la comparación del perfil de marcadores compuesto con uno o más perfiles de marcadores compuestos de referencia, donde la comparación permite predecir la evolución clínica del proceso neoplásico.

En la presente memoria, la expresión “predecir la evolución clínica” significa tanto el diagnóstico como el pronóstico de cualquier factor relacionado con la enfermedad o el tratamiento, incluyendo la supervivencia, el pronóstico de la evolución de la enfermedad y el pronóstico de la respuesta al tratamiento.

En la presente memoria, el término “referencia”, utilizado en el contexto de los perfiles de marcadores compuestos, se refiere a un perfil de marcadores compuesto que se sabe puede asociarse a un parámetro particular frente al cual se está comparando el perfil de marcadores compuesto obtenido de la muestra biológica sometida a ensayo. Un perfil de marcadores compuesto de referencia puede ser representativo de un proceso neoplásico concreto, de una etapa de un proceso neoplásico o de la evolución de una enfermedad conocida, por ejemplo, de escasa o de gran malignidad. Por ejemplo, un marcador compuesto de referencia para un método diagnóstico de la invención puede ser representativo de la enfermedad concreta que se sospecha presenta el individuo. Un perfil de marcadores compuesto de referencia puede ser representativo de una etapa particular del proceso neoplásico o de la evolución de una enfermedad conocida, por ejemplo, de gran malignidad.

En realizaciones preferidas de los métodos de diagnóstico y pronóstico de la invención, el perfil de marcadores compuesto de un individuo se compara con más de un perfil de marcadores compuesto de referencia. Por ejemplo, en una aplicación para diagnóstico, un perfil de marcadores compuesto de un individuo puede compararse con una serie de

dos o más perfiles de marcadores compuestos de referencia que representen un espectro de estadificaciones clínicas para posibilitar así una clasificación matizada del estadio de la enfermedad del individuo.

5 De la misma forma, en una aplicación para pronóstico, un perfil de marcadores compuesto de un individuo puede compararse con dos o más perfiles de marcadores compuestos de referencia que representen un espectro que abarque de no maligno a maligno o un espectro que abarque de respuesta a no respuesta al tratamiento.

10 Un perfil de marcadores compuesto según los métodos de la invención puede utilizarse para el diagnóstico de un cáncer hematológico en un individuo que se sospecha que padece un cáncer hematológico, mediante la comparación entre un perfil de marcadores compuesto obtenido con los métodos descritos anteriormente y uno o más perfiles de marcadores compuestos de referencia, donde la comparación permite predecir la evolución clínica del cáncer hematológico, que se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC) y leucemia linfocítica aguda (LLA).

15 En una realización, puede utilizarse un perfil de marcadores compuesto según los métodos de la invención para el diagnóstico en un individuo que se sospecha que padece una leucemia linfocítica crónica (LLC) de linfocitos B sin mutaciones para Ig, mediante la comparación del perfil compuesto con uno o más perfiles compuestos de referencia, donde la comparación permite predecir la evolución clínica de la leucemia linfocítica crónica (LLC) sin mutaciones para Ig (Hamblin y col., *Blood* 94:1848-1854 (1999)). La invención proporciona un método para predecir la evolución clínica de la leucemia linfocítica crónica (LLC) de linfocitos B sin mutaciones para Ig en un individuo que consiste en utilizar una muestra biológica procedente del individuo; hacer reaccionar la muestra biológica con una serie de moléculas de unión que contiene dos o más grupos de moléculas de unión específicas para marcadores asociados a una población celular única, donde los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores identifican poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra; identificar la presencia de poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra mediante la detección de los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores que identifican las poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra; correlacionar los niveles de marcadores en cada una de las poblaciones normales y neoplásicas con la presencia de ZAP-70 para establecer un perfil de marcadores compuesto para una muestra procedente de un individuo que se sospecha que tiene leucemia linfocítica crónica (LLCB), en donde el perfil compuesto representa una cuantificación relativa de los niveles de ZAP-70; y comparar el perfil compuesto con uno o más perfiles compuestos de referencia, donde la comparación permite predecir la evolución clínica de la leucemia linfocítica crónica (LLC) de linfocitos B sin mutaciones para Ig.

En otras realizaciones, la invención proporciona un método para predecir la evolución clínica de la leucemia linfocítica crónica (LLC) de linfocitos B sin mutaciones para Ig en un individuo que consiste en utilizar una muestra biológica procedente del individuo; hacer reaccionar la muestra biológica con una serie de moléculas de unión que contiene dos o más grupos de moléculas de unión específicas para marcadores asociados a una población celular única, donde los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores identifican poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra; identificar la presencia de poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra mediante la detección de los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores que identifican poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra; correlacionar los niveles de marcadores en cada una de las poblaciones normales y neoplásicas con la presencia de una proteína diana seleccionada del grupo que consiste en ZAP-70, lectina de tipo C inducida por activación (AICL) y lipoproteína-lipasa, para establecer un perfil de marcadores compuesto para una muestra procedente de un individuo que se sospecha que tiene leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (LLCB), donde el perfil compuesto representa una cuantificación relativa del nivel de la proteína diana; y comparar el perfil compuesto con uno o más perfiles compuestos de referencia, donde la comparación permite predecir la evolución clínica de la leucemia linfocítica crónica (LCC) de linfocitos B sin mutaciones para Ig.

En una realización, puede utilizarse un perfil de marcadores compuesto según los métodos de la invención para el diagnóstico de un individuo que se sospecha que padece leucemia linfocítica crónica (LLC) de linfocitos B con mutaciones para Ig, mediante la comparación del perfil compuesto con uno o más perfiles compuestos de referencia, donde la comparación permite predecir la evolución clínica de la leucemia linfocítica crónica (LLC) de linfocitos B con mutaciones para Ig. En otras realizaciones, la invención proporciona un método para predecir la evolución clínica de la leucemia linfocítica crónica (LLC) de linfocitos B con mutaciones para Ig en un individuo que consiste en utilizar una muestra biológica procedente del individuo; hacer reaccionar la muestra biológica con una serie de moléculas de unión que contiene dos o más grupos de moléculas de unión específicas para marcadores asociados a una población celular única, donde los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores identifican poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra; identificar la presencia de poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra mediante la detección de los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores que identifican las poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra; correlacionar los niveles de marcadores en cada una de las poblaciones normales y neoplásicas con la presencia de una proteína diana seleccionada del grupo que consiste en IM68532, IM1286077 y LC15506 para establecer un perfil de marcadores compuesto para una muestra derivada de un individuo que se sospecha que tiene leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (LLCB), donde el perfil compuesto representa una cuantificación relativa del nivel de la proteína diana; y comparar el perfil compuesto con uno o más perfiles compuestos de referencia, donde la comparación permite predecir la evolución clínica de la leucemia linfocítica crónica (LLC) de linfocitos B con mutaciones para Ig.

65 En otra realización puede utilizarse un perfil de marcadores compuesto según los métodos de la invención para el diagnóstico de la LMC en un individuo que se sospecha que padece LMC, mediante la comparación del perfil de marcadores compuesto

- obtenido por los métodos descritos anteriormente, con uno o más perfiles compuestos de referencia, donde la comparación permite predecir la evolución clínica de la LMC. En una realización adicional, puede utilizarse un perfil de marcadores compuesto obtenido por los métodos descritos anteriormente para el diagnóstico de la LMA en un individuo que se sospecha que padece LMA, mediante la comparación de un perfil compuesto con uno o más perfiles compuestos de referencia, donde la comparación permite predecir la evolución clínica de la LMA. En otra realización para diagnóstico adicional, puede utilizarse un perfil de marcadores compuesto obtenido por los métodos descritos anteriormente para el diagnóstico de la LLA en un individuo que se sospecha que padece LLA, mediante la comparación de un perfil compuesto con uno o más perfiles compuestos de referencia, donde la comparación permite predecir la evolución clínica de la LLA.
- 5
- 10 En otra realización de la invención, los métodos para preparar perfiles de marcadores compuestos para cánceres hematológicos específicos pueden hacerse extensivos a los métodos de pronóstico. En particular, puede utilizarse un perfil compuesto obtenido por los métodos descritos anteriormente para seleccionar la gestión de la asistencia clínica y las modalidades de tratamiento adecuadas para un individuo que padece un proceso neoplásico.
- 15 Un perfil de marcadores compuesto según los métodos de la invención puede ser útil para identificar individuos que se prevé respondan eficazmente a un tratamiento en particular, respecto de aquellos que nunca progresarían a un estadio más avanzado de la enfermedad con independencia del tratamiento. Por tanto, puede utilizarse un perfil compuesto de la invención para predecir la evolución clínica de un individuo, a pesar del estadio convencional de la enfermedad, y ayudar a los médicos a evaluar mejor las opciones de tratamiento, así como para mejorar enormemente el valor de los estudios clínicos al permitir distinguir mejor los efectos de un tratamiento concreto.
- 20
- Puede utilizarse un perfil de marcadores compuesto según los métodos de la invención para predecir la progresión clínica de cualquier proceso neoplásico en individuos que se sospecha que padecen un proceso neoplásico, mediante la comparación del perfil de marcadores compuesto con uno o más perfiles de marcadores compuestos de referencia, donde la comparación permite predecir la progresión clínica del proceso neoplásico. Un perfil de marcadores compuesto según los métodos de la invención puede utilizarse para predecir la progresión clínica de un cáncer hematológico en un individuo que se sospecha que padece un cáncer hematológico, mediante la comparación entre un perfil de marcadores compuesto obtenido con los métodos descritos anteriormente y uno o más perfiles de marcadores compuestos de referencia, donde la comparación permite predecir la evolución clínica del cáncer hematológico, que se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC) y leucemia linfocítica aguda (LLA).
- 25
- 30
- En una realización, puede utilizarse un perfil de marcadores compuesto según los métodos de la invención para predecir la progresión clínica en un individuo que padece leucemia linfocítica crónica (LLC) de linfocitos B sin mutaciones para Ig, mediante la comparación del perfil compuesto con uno o más perfiles compuestos de referencia, donde la comparación permite predecir la progresión clínica de la leucemia linfocítica crónica (LLC) de linfocitos B sin mutaciones para Ig. La invención proporciona así un método para predecir la progresión clínica de la leucemia linfocítica crónica (LLC) de linfocitos B sin mutaciones para Ig en un individuo que consiste en utilizar una muestra biológica procedente del individuo; hacer reaccionar la muestra biológica con una serie de moléculas de unión que contiene dos o más grupos de moléculas de unión específicas para marcadores asociados a una población celular única, donde los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores identifican poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra; identificar la presencia de poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra mediante la detección de los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores que identifican las poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra; correlacionar los niveles de marcadores en cada una de las poblaciones normales y neoplásicas con la presencia de ZAP-70 para establecer un perfil de marcadores compuesto para una muestra procedente del individuo que padece LLCB, donde el perfil compuesto representa una cuantificación relativa de los niveles de ZAP-70; y comparar el perfil compuesto con uno o más perfiles compuestos de referencia, donde la comparación permite predecir la progresión clínica de la leucemia linfocítica crónica (LLC) de linfocitos B sin mutaciones para Ig.
- 35
- 40
- 45
- 50 Un perfil de marcadores compuesto según los métodos de la invención puede resultar útil a la hora de elegir un tratamiento experimental o más intensivo para un individuo, al permitir determinar si dicho tratamiento tendrá beneficios tangibles o si empeorarán los riesgos asociados. Por ejemplo, algunos pacientes con LLCB sucumben a los efectos combinados del tratamiento y la enfermedad, más que a los efectos de la LLCB en sí.
- 55
- Un perfil de marcadores compuesto según los métodos de la invención puede resultar útil a la hora de elegir tratamientos más intensivos, como radioterapia, quimioterapia, trasplantes e inmunoterapia, al permitir identificar a los pacientes con LLCB que ya se encuentran en estadios avanzados de la LLCB, sin depender de los sistemas de estadificación de Rai y Binet convencionales.
- 60
- 65 En otra realización, puede utilizarse un perfil de marcadores compuesto según los métodos de la invención para predecir la progresión clínica de la LMC en un individuo que padece LMC, mediante la comparación del perfil de marcadores compuesto obtenido por los métodos descritos anteriormente con uno o más perfiles compuestos de referencia, donde la comparación permite predecir la progresión clínica de la LMC. En una realización adicional, puede utilizarse un perfil de marcadores compuesto según los métodos descritos anteriormente para predecir la progresión clínica de la LMA en pacientes que padecen LMA, mediante la comparación de un perfil compuesto con uno o más perfiles compuestos de referencia, donde la comparación permite predecir la progresión clínica de la LMA. En otra realización para diagnóstico adicional, puede utilizarse un perfil de marcadores compuesto según los métodos descritos anteriormente para predecir la progresión clínica de la

LLCenun individuo que se sospecha que padece LLC, mediante la comparación de un perfil compuesto con uno o más perfiles compuestos de referencia, donde la comparación permite predecir la progresión clínica de la LLC.

5 En otra realización más, los métodos de la invención permiten establecer un perfil compuesto que resulta útil para monitorizar el tratamiento en curso de un individuo que padece un cáncer hematológico. Por ejemplo, en un paciente con LMC, un perfil compuesto puede ser útil para monitorizar la respuesta al tratamiento con Gleevec, mientras que en un paciente con LMA, puede monitorizarse la respuesta al tratamiento con rapamicina, que inhibe el mTOR. Además, un perfil compuesto puede ser de utilidad en el desarrollo de fármacos y de terapias moleculares dirigidas. Se entiende que los expertos en la técnica apreciarán en la presente memoria descriptiva que existen muchas otras aplicaciones útiles del método de la invención para establecer un perfil compuesto, incluyendo, por ejemplo, la determinación de la importancia relativa de distintas vías de transducción de señales en el desarrollo y/o progresión de la enfermedad en pacientes concretos, lo que permitiría diseñar una terapia personalizada.

15 Los siguientes son algunos de los ejemplos que pretenden ilustrar, y no limitar, la presente invención.

### Ejemplo I

#### Preparación de muestras para establecer un perfil compuesto

20 Este ejemplo muestra la preparación de una muestra para establecer un perfil compuesto para un individuo que se sospecha que tiene leucemia linfocítica crónica de células B (LLCB).

25 En resumen, se depositaron 10 µl de una mezcla de reactivos que contenía los marcadores de superficie celular CD5-FTTC, más CD3-ECD, más CD56-PC5, más CD19-PC7 en un tubo y se añadieron 100 µl de sangre completa. Tras 20 minutos de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 64 µl de fijador (formaldehído al 10%) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadió 1 ml de reactivo de lisis/permeabilización (Triton X-100 al 0,1%) y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente, antes de someterlo a centrifugación. Las células se lavaron dos veces con tampón (PBS con 2% de BSA), se resuspendieron en 10 µl de anti-ZAP-70-PE, más 90 µl de tampón, se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min y después se lavaron una vez con tampón y se resuspendieron en tampón que contenía 0,1% de paraformaldehído. La muestra se analiza entonces en un citómetro de flujo. La Figura 1 muestra un diagrama esquemático que ilustra la preparación de muestras para métodos para establecer un perfil de marcadores compuesto.

### Ejemplo II

#### Análisis de muestras para establecer un perfil compuesto

35 Este ejemplo muestra el análisis de la muestra mediante citometría de flujo para establecer un perfil compuesto.

40 Como se muestra en la Figura 2, se estableció un perfil compuesto utilizando un algoritmo de selección de poblaciones de partículas/análisis de ZAP-70 de la siguiente manera: La primera selección de una muestra de sangre completa normal identifica linfocitos (azul más verde) mediante dispersión de luz en el histograma de la parte superior izquierda. Si se desea, puede utilizarse CD45 frente a dispersión lateral (escala lineal) para definir las selecciones alrededor de linfocitos brillantes CD45- en sangre periférica para la enumeración de CD4, y CD45 frente a dispersión lateral (escala logarítmica) para identificar poblaciones de blastocitos en la médula ósea para fenotipado.

45 En la Figura 2, el histograma de CD19 frente a CD5 identifica linfocitos B normales (violeta, cuadrante superior izquierdo), linfocitos T normales (azul, cuadrante inferior derecho) y linfocitos “pre”-B normales en sangre periférica (CD19+5+, cuadrante superior derecho). Las células neoplásicas en la LLCB también se encuentran en el cuadrante superior derecho pero, a diferencia de las células normales, no expresan ZAP-70. El gráfico superpuesto de la parte inferior de la Figura 2 resume los perfiles de composición y muestra dónde se sitúan las células de la LLCB en este histograma (expresión de ZAP-70) en relación con los linfocitos B normales internos (CD19+), los linfocitos T normales (CD5+3+) y los linfocitos NK (CD56+). La Figura 3 muestra paneles de citometría de flujo obtenidos mediante la estrategia de selección de poblaciones de partículas para el análisis de ZAP-70 en una muestra de LLC. La Figura 4 muestra un diagrama que representa la expresión de ZAP-70 en el conjunto de células presentes en una muestra de LLC (rojo: linfocitos B; verde: linfocitos T normales; violeta: células NK).

55 La Figura 5 muestra paneles de citometría de flujo que representan la activación de S6 mediante mTOR en una muestra de LMA.

60 La Figura 6 muestra un perfil compuesto de células precursoras movilizadas (CD34+) en sangre periférica. Los histogramas ofrecen una comparación entre las respuestas de tres proteínas de transducción de señales distintas, P-ERK, P-S6 y P-PKB/AKT, en cada una de los citoblastos movilizados, los granulocitos normales, los monocitos normales y los linfocitos normales tras la estimulación con PMA (azul), factor citoblástico (verde) o IGF-1 (naranja), comparado con la muestra sin tratar (rojo). [...] presenta una muestra de sangre completa (humana) tratada primero *in vivo* para movilizar los citoblastos (CD34+). Los dos histogramas de la izquierda muestran cómo se identifican los citoblastos CD34+ (parte inferior) y los granulocitos, monocitos y linfocitos normales (parte superior). Para estos experimentos se tratan (*in vitro*)

5 varias muestras procedentes de un único donante con factores que estimulan las vías de transducción de señales: PMA (azul), factor citoblástico (verde) o IGF-1 (naranja); comparados con muestra no tratada (rojo). Los conjuntos de histogramas del lado derecho muestran la respuesta (o su falta) de tres proteínas distintas de transducción de señales: P-ERK, P-S6 y P-PKB/AKT. Los resultados comparan las respuestas de los citoblastos CD34+ con las poblaciones internas de referencia (linfocitos, granulocitos y monocitos) y demuestran que las células CD34+ responden a esos estímulos.

10 La Figura 7 muestra un perfil compuesto de un paciente con LMA. Las alícuotas de sangre se estimulan con PMA, con o sin inhibidores de la vía de transducción específica de señales (“mapa” de la esquina inferior derecha) o con factor citoblástico. Las respuestas se miden como gráficas bivariantes de P-ERK frente a P-S6 (paneles de la derecha), en los que la población en rojo corresponde a los blastocitos de la LMA, en azul a los linfocitos internos y en verde a los granulocitos internos. Los blastocitos de la LMA (rojo), los linfocitos (azul) y los granulocitos (verde) se identificaron mediante CD34 frente a SSC, como se representa en los dos recuadros de la izquierda. Se muestran los niveles de expresión de P-ERK y P-S6 en muestras de sangre completa no tratada (comenzando desde la parte superior), tratadas con PMA, PMA + U0126 (inhibidor de P-ERK), PMA + rapamicina (mTOR > inhibidor de S6), PMA + Ly294002 (inhibidor de PKB/AKT) y tratadas con factor de células precursoras (parte inferior). En todos los histogramas del epítipo P, las casillas muestran el nivel de P-ERK y P-S6 en la muestra no estimulada, indicando la expresión del “valor inicial”. Los histogramas muestran el efecto de distintos tratamientos sobre blastocitos (rojo) de la LMA comparado con linfocitos (azul) y granulocitos (verde).

20 La Figura 8 muestra un perfil compuesto en la LLC. El pico negativo para linfocitos B y los picos positivos para linfocitos T son consistentes entre especímenes, mientras que la expresión del pico positivo para linfocitos NK es mayor en especímenes de ZAP70 muy positivos, con menos coincidencias entre los especímenes. La LLC con ZAP70\* presenta 0,2% de “linfocitos B normales”, pero en raros casos agrupaciones equivalentes a los picos negativos en otros especímenes. Se observa una clara desviación en la LLC con ZAP70 intermedia respecto a los linfocitos B normales – S/N 2.15

25

**REIVINDICACIONES**

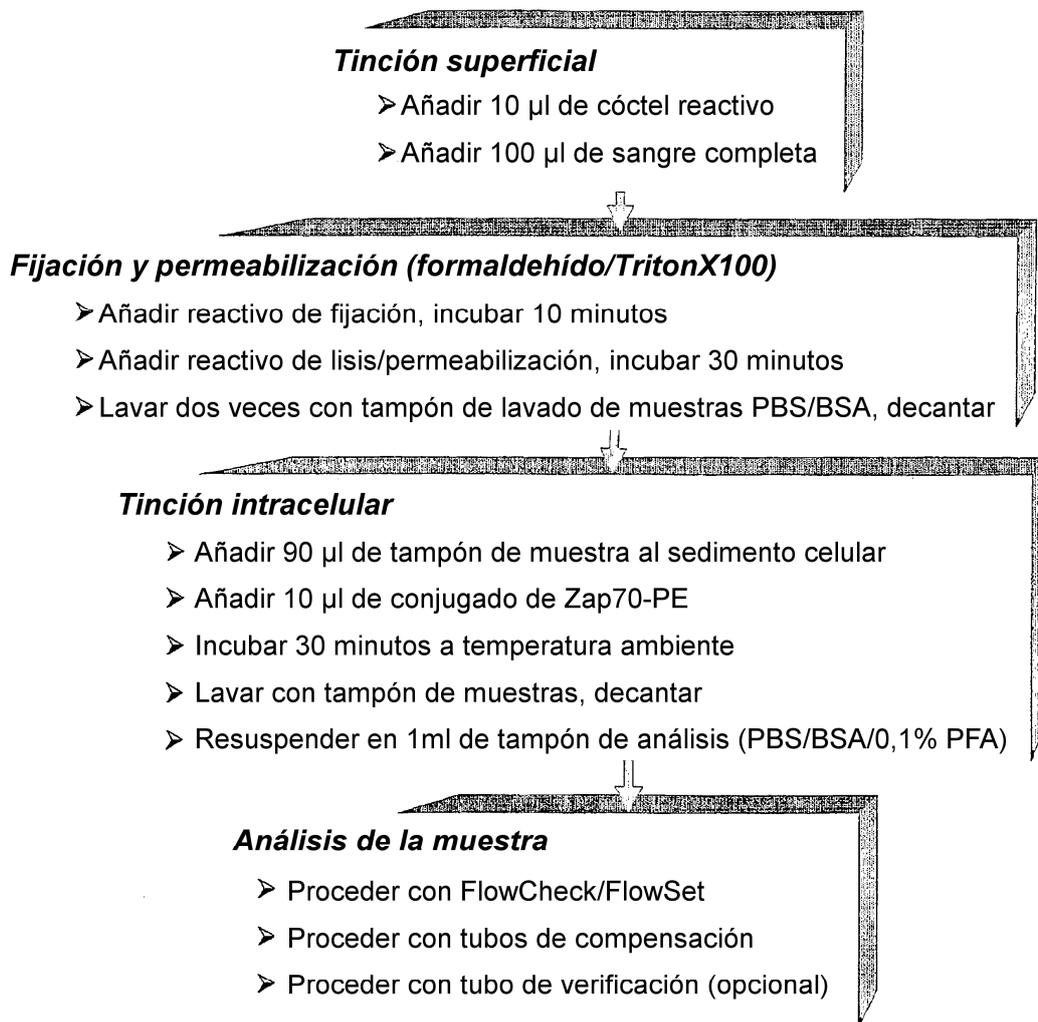
- 5 1. Un método para establecer un perfil de marcadores compuesto para una muestra procedente de un individuo que se sospecha que tiene un proceso neoplásico, comprendiendo el método las etapas de:
  - 10 (a) hacer reaccionar la muestra biológica con una serie de moléculas de unión, en donde la serie de moléculas de unión contiene dos o más grupos de moléculas de unión específicas para marcadores asociados a una población celular única, en donde los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores identifican poblaciones celulares normales y neoplásicas internas a la muestra;
  - 15 (b) identificar la presencia de poblaciones celulares normales y neoplásicas internas a la muestra mediante la detección de los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores que identifican las poblaciones celulares normales y neoplásicas internas a la muestra, y
  - 20 (c) correlacionar los niveles de marcadores de cada una de las poblaciones celulares normales y neoplásicas con la presencia de una proteína diana para establecer un perfil de marcadores compuesto para una muestra procedente de un individuo que se sospecha que tiene un proceso neoplásico, en donde la proteína diana es una molécula de señalización.
- 25 2. El método de la reivindicación 1, en donde dicha proteína diana es una proteína de transducción de señales que se activa por fosforilación.
- 30 3. El método de la reivindicación 1, que además comprende una determinación de la modificación de la proteína diana.
- 35 4. El método de la reivindicación 1, en donde el proceso neoplásico se selecciona del grupo que consiste en leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia mielógena aguda (LMA), leucemia mielógena crónica (LMC) y leucemia linfocítica aguda (LLA).
- 40 5. El método de la reivindicación 1, en donde los marcadores asociados a la población celular comprenden marcadores de superficie celular seleccionados del grupo que consiste en CD3, CD5, CD10, CD11b, CD13, CD15, CD14, CD15, CD16, CD19, CD22, CD 23, CD56, CD45, CD33, CD34, CD15, CD16, MPL (mieloperoxidasa), CD64, CD79a, CD79b y CD117 (receptor de c-kit).
- 45 6. El método de la reivindicación 5, en donde los marcadores además incluyen cadenas ligeras kappa y lambda de las inmunoglobulinas para determinar la clonalidad.
- 50 7. El método de la reivindicación 4, en donde dicho cáncer es una leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (LLCB).
- 55 8. El método de la reivindicación 7, en donde dicha proteína diana se selecciona del grupo que consiste en ZAP-70, lectina de tipo C inducida por activación (AICL), lipoproteína-lipasa e IM68532.
- 60 9. El método de la reivindicación 8, en donde la leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (LLCB) es una LLCB con mutaciones para Ig.
- 65 10. El método de la reivindicación 7, en donde los marcadores asociados a la población celular se seleccionan del grupo que consiste en CD3, CD5, CD19, CD23, CD38, CD56, CD79b y fmc7.
11. El método de la reivindicación 10, en donde los marcadores asociados a la población celular identifican una población celular que comprende linfocitos B leucémicos.
12. El método de la reivindicación 11, en donde los linfocitos B leucémicos son ZAP-70 positivos.
13. El método de la reivindicación 10, en donde una o más de las poblaciones celulares comprende poblaciones celulares ZAP-70 negativas.
14. El método de la reivindicación 10, en donde una o más de las poblaciones celulares comprende linfocitos B normales.
15. El método de la reivindicación 13, en donde la población celular ZAP-70 negativa comprende granulocitos.
16. Un método para predecir la evolución clínica de la leucemia linfocítica crónica (LLC) de linfocitos B sin mutaciones para Ig en un individuo, comprendiendo el método las etapas de:
  - (a) obtener una muestra biológica procedente del individuo;

- 5
- (b) hacer reaccionar la muestra biológica con una serie de moléculas de unión, en donde la serie de moléculas de unión contiene dos o más grupos de moléculas de unión específicas para marcadores asociados a una población celular única, en donde los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores identifican poblaciones celulares internas normales y neoplásicas en la muestra,
- 10
- (c) identificar la presencia de poblaciones celulares normales y neoplásicas internas a la muestra mediante la detección de los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores que identifican las poblaciones celulares normales y neoplásicas internas a la muestra,
- 15
- (d) correlacionar los niveles de marcadores de cada una de las poblaciones celulares normales y neoplásicas con la presencia de ZAP-70 para establecer un perfil de marcadores compuesto para una muestra procedente de un individuo que se sospecha que tiene leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (LLCB), en donde el perfil compuesto representa una cuantificación relativa de los niveles de ZAP-70, y
- 20
- (e) comparar el perfil compuesto con uno o más perfiles compuestos de referencia, en donde la comparación permite predecir la evolución clínica de la leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (LLCB) sin mutaciones para Ig.
- 25
17. Un método para establecer un perfil de marcadores compuesto para una muestra procedente de un individuo que se sospecha que tiene leucemia mielógena crónica (LMC), comprendiendo el método las etapas de:
- 30
- (a) hacer reaccionar la muestra biológica con una serie de moléculas de unión, en donde la serie de moléculas de unión contiene dos o más grupos de moléculas de unión específicas para marcadores asociados a una población celular única, en donde los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores identifican poblaciones celulares normales y neoplásicas internas a la muestra,
- 35
- (b) identificar la presencia de poblaciones celulares normales y neoplásicas internas a la muestra mediante la detección de los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores que identifican las poblaciones celulares normales y neoplásicas internas a la muestra, y
- 40
- (c) correlacionar los niveles de marcadores de cada una de las poblaciones celulares normales y neoplásicas con la presencia de al menos una proteína diana seleccionada del grupo que consiste en proteínas de transducción de señales que se activan por fosforilación, marcadores de proliferación, marcadores de diferenciación y marcadores de apoptosis para establecer un perfil de marcadores compuesto para una muestra procedente de un individuo que se sospecha que tiene leucemia mielógena crónica (LMC).
- 45
18. El método de la reivindicación 17, en donde los marcadores asociados a la población celular se seleccionan del grupo que consiste en CD45, CD34, CD11b, CD13, CD15, CD14, CD33, CD79a, CD79b, CD22, CD10, CD16, Bcr/Abl y TdT.
- 50
19. El método de la reivindicación 17, en donde la proteína diana es una proteína de transducción de señales que se activa por fosforilación.
- 55
20. El método de la reivindicación 19, en donde la proteína de transducción de señales que se activa por fosforilación se selecciona del grupo que consiste en Abl, CRKL, Hck, STAT1, STAT3, STAT5, Akt/PKB y S6.
- 60
21. El método de la reivindicación 17, en donde la proteína diana es un marcador de proliferación o un marcador de apoptosis.
- 65
22. El método de la reivindicación 21, en donde la proteína diana es un marcador de proliferación seleccionado del grupo que consiste en ciclina D1 y ciclina A2.
23. El método de la reivindicación 21, en donde la proteína diana es un marcador de apoptosis seleccionado del grupo que consiste en caspasa-3 y Bcl-X1.
24. Un método para predecir la evolución clínica de la leucemia mielógena crónica (LMC) en un individuo, comprendiendo el método las etapas de:
- (a) obtener una muestra biológica procedente del individuo;
- (b) hacer reaccionar la muestra biológica con una serie de moléculas de unión, en donde la serie de moléculas de unión contiene dos o más grupos de moléculas de unión específicas para marcadores asociados a una población celular única, en donde los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores identifican poblaciones celulares normales y neoplásicas internas a la muestra,

- (c) identificar la presencia de poblaciones celulares normales y neoplásicas internas a la muestra mediante la detección de los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores que identifican las poblaciones celulares normales y neoplásicas internas a la muestra,
- 5 (d) correlacionar los niveles de marcadores de cada una de las poblaciones celulares normales y neoplásicas con la presencia de al menos una proteína diana seleccionada del grupo que consiste en proteínas de transducción de señales que se activan por fosforilación, marcadores de proliferación y marcadores de apoptosis para establecer un perfil de marcadores compuesto para una muestra procedente de un individuo que se sospecha que tiene leucemia mielógena crónica (LMC), y
- 10 (e) comparar el perfil compuesto con uno o más perfiles compuestos de referencia, en donde la comparación permite predecir la evolución clínica de la leucemia mielógena crónica (LMC).
- 15 25. Un método para establecer un perfil de marcadores compuesto para una muestra procedente de un individuo que se sospecha que tiene leucemia mielógena aguda (LMA), comprendiendo el método las etapas de:
- (a) hacer reaccionar la muestra biológica con una serie de moléculas de unión, en donde la serie de moléculas de unión contiene dos o más grupos de moléculas de unión específicas para marcadores asociados a una población celular única, en donde los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores identifican poblaciones celulares normales y neoplásicas internas a la muestra,
- 20 (b) identificar la presencia de poblaciones celulares normales y neoplásicas internas a la muestra mediante la detección de los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores que identifican las poblaciones celulares normales y neoplásicas internas a la muestra, y
- 25 (c) correlacionar los niveles de marcadores de cada una de las poblaciones celulares normales y neoplásicas con la presencia de al menos una proteína diana seleccionada del grupo que consiste en proteínas de transducción de señales que se activan por fosforilación, marcadores de proliferación, y marcadores de apoptosis para establecer un perfil de marcadores compuesto para una muestra procedente de un individuo que se sospecha que tiene leucemia mielógena aguda (LMA).
- 30 26. El método de la reivindicación 25, en donde los marcadores asociados a la población celular se seleccionan del grupo que consiste en CD45, CD33, CD34, CD11b, CD13, CD14, CD15, CD16, MPL (mieloperoxidasa), CD64 y CD117 (receptor de c-kit).
- 35 27. El método de la reivindicación 26, en donde los marcadores asociados a la población celular identifican una población celular que comprende granulocitos leucémicos o monocitos leucémicos.
- 40 28. El método de la reivindicación 25, en donde la proteína diana es una proteína de transducción de señales que se activa por fosforilación.
29. El método de la reivindicación 25, en donde la proteína de transducción de señales que se activa por fosforilación se selecciona del grupo que consiste en Abl, CRKL, Hck, STAT1, STAT3, STAT5, Akt/PKB y S6.
- 45 30. El método de la reivindicación 25, en donde la proteína diana es un marcador de proliferación o un marcador de apoptosis.
31. El método de la reivindicación 30, en donde la proteína diana es un marcador de proliferación seleccionado del grupo que consiste en ciclina D1 y ciclina A2.
- 50 32. El método de la reivindicación 30, en donde la proteína diana es un marcador de apoptosis seleccionado del grupo que consiste en caspasa-3 y Bcl-X1.
33. Un método para predecir la evolución clínica de la leucemia mielógena aguda (LMA) en un individuo, comprendiendo el método las etapas de:
- 55 (b) hacer reaccionar la muestra biológica obtenida del individuo con una serie de moléculas de unión, en donde la serie de moléculas de unión contiene dos o más grupos de moléculas de unión específicas para marcadores asociados a una población celular única, en donde los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores identifican poblaciones celulares normales y neoplásicas internas a la muestra,
- 60 (c) identificar la presencia de poblaciones celulares normales y neoplásicas internas a la muestra mediante la detección de los niveles de marcadores y las combinaciones de marcadores que identifican las poblaciones celulares normales y neoplásicas internas a la muestra,
- 65

- 5
- (d) correlacionar los niveles de marcadores de cada una de las poblaciones celulares normales y neoplásicas con la presencia de al menos una proteína diana seleccionada del grupo que consiste en proteínas de transducción de señales que se activan por fosforilación, marcadores de proliferación y marcadores de apoptosis para establecer un perfil de marcadores compuesto para una muestra procedente de un individuo que se sospecha que tiene leucemia mielógena aguda (LMA), y
  - (e) comparar el perfil compuesto con uno o más perfiles compuestos de referencia, en donde la comparación permite predecir la evolución clínica de la leucemia mielógena aguda (LMA).

## Diseño del protocolo - Preparación de la muestra

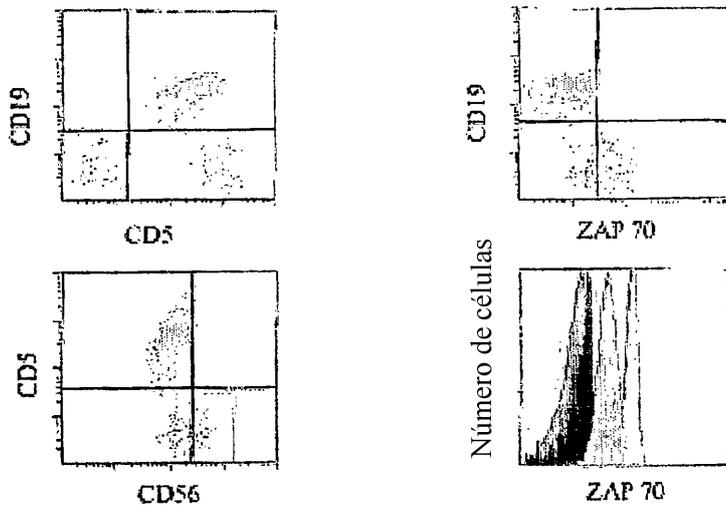


**FIGURA 1**



### Análisis de ZAP-70 en muestras de LLC

Estrategia de selección de poblaciones de partículas:  
Análisis de Zap-70 en muestras de LLC  
(control Zap70 negativo: granulocitos)



**FIGURA 3**

### Expresión de ZAP-70 en LLC

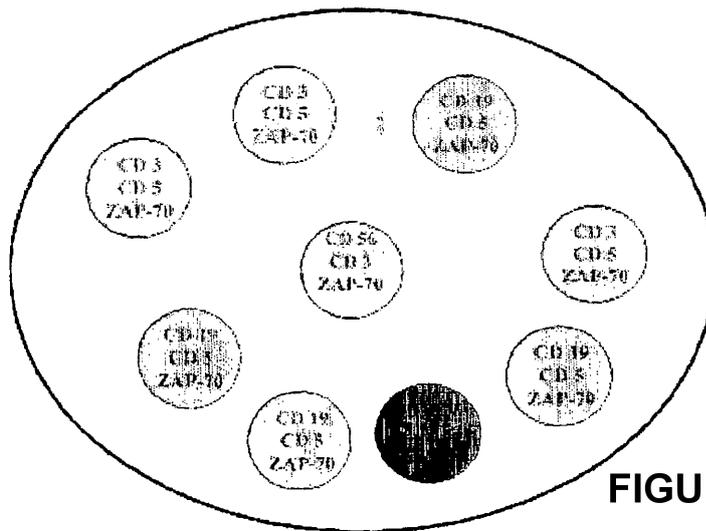
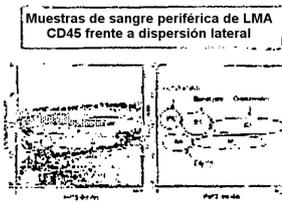


FIGURA 4



Los monocitos muestran activación de S6 por mTOR

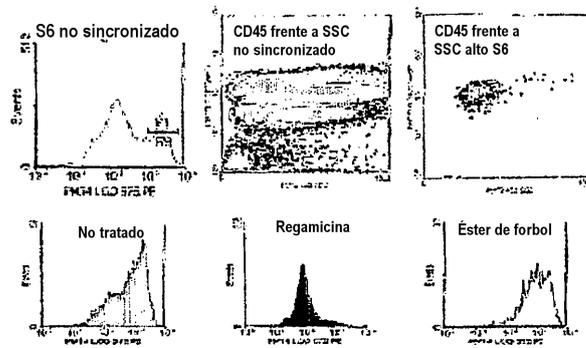
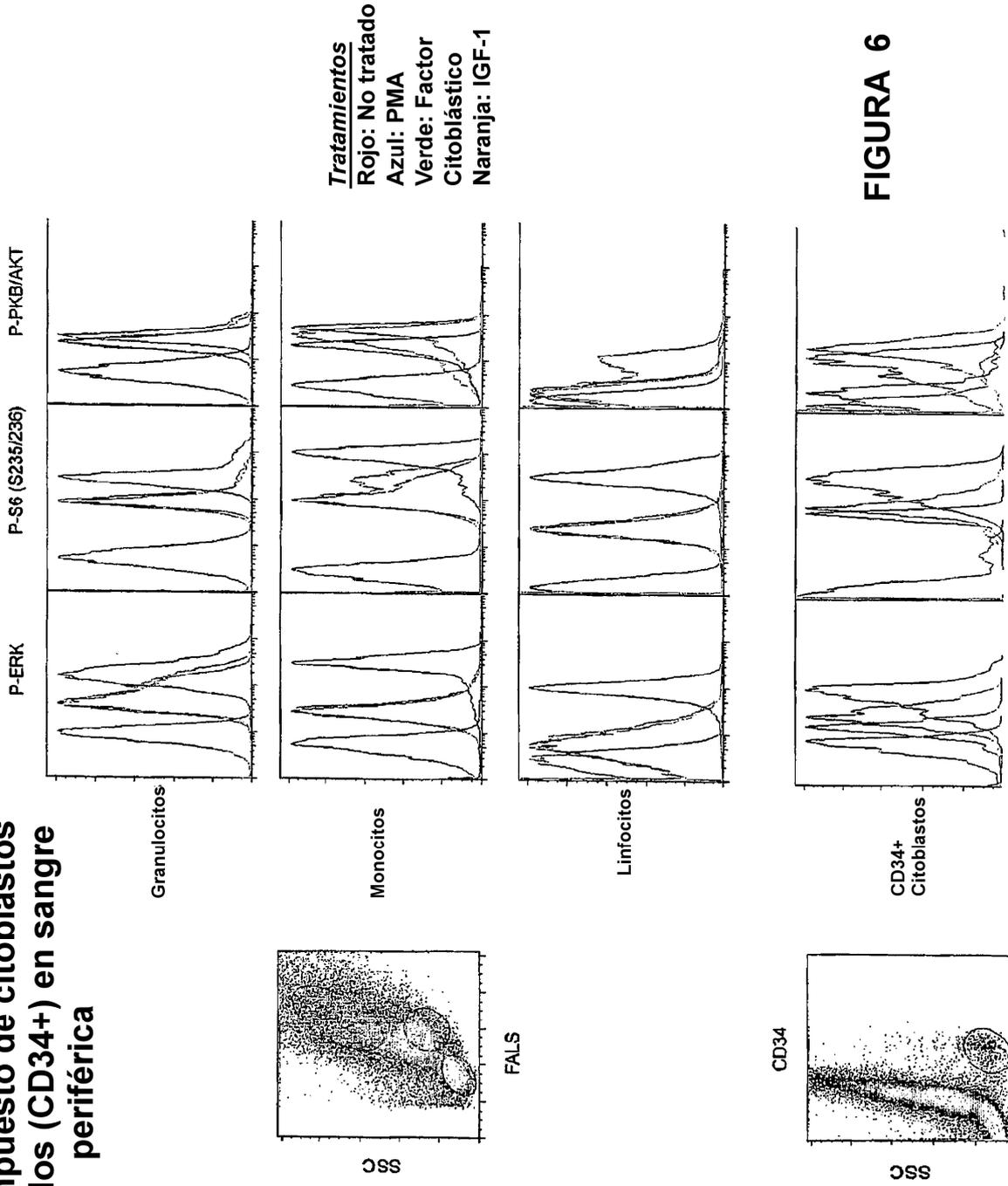


FIGURA 5

# Perfil compuesto de citoblastos movilizados (CD34+) en sangre periférica



**FIGURA 6**



# Perfiles compuestos de la expresión de ZAP-70 en la LLC

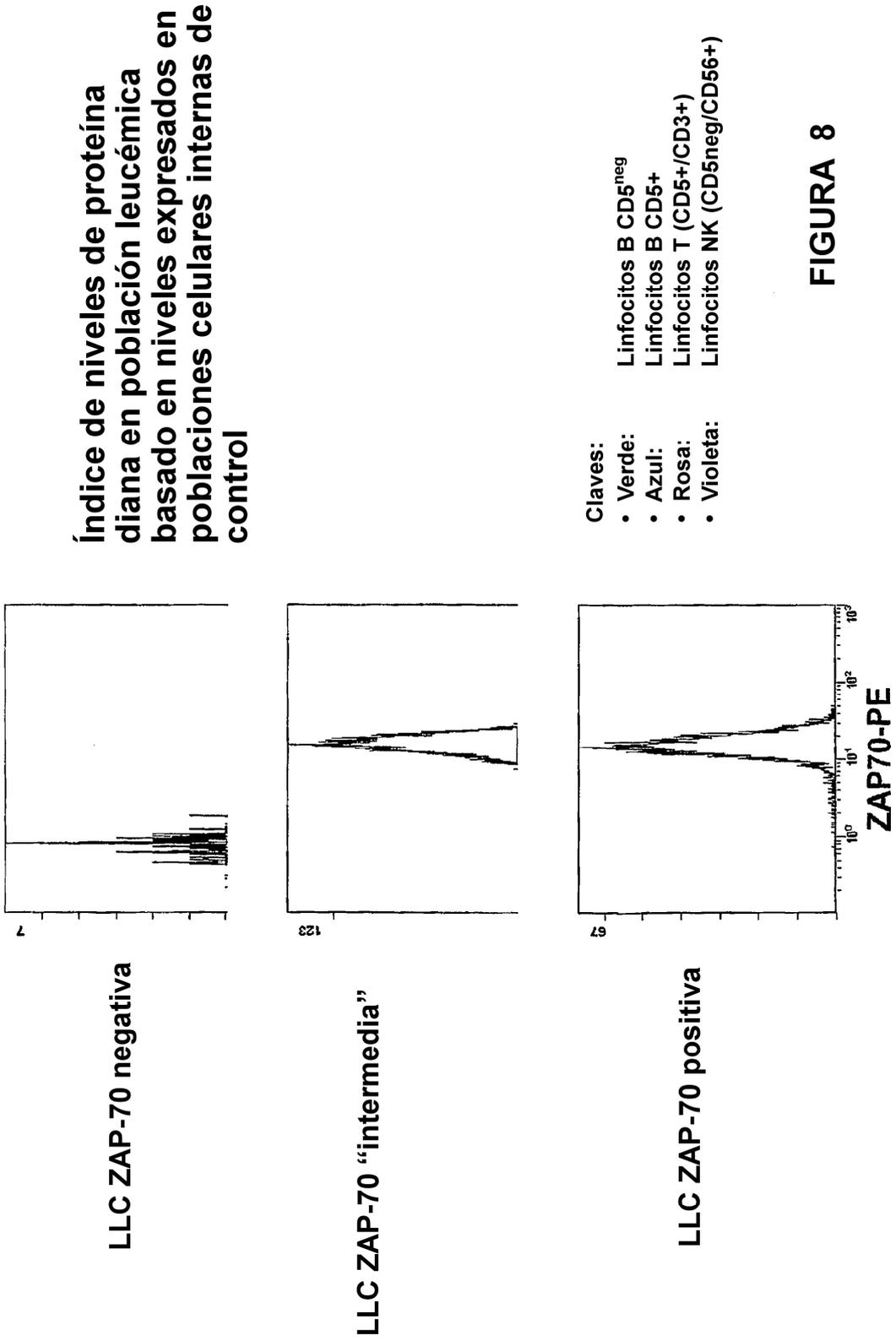


FIGURA 8