

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 769**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2008 E 08805446 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.01.2015 EP 2191023**

54 Título: **Diagnóstico de linfoma de linfocitos B**

30 Prioridad:

20.09.2007 US 973871 P

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

28.04.2015

73 Titular/es:

**VALIPHARMA (100.0%)
24 Greville Street
London EC1N 8SS, GB**

72 Inventor/es:

KROHN, KAI

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 534 769 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

Diagnóstico de linfoma de linfocitos B

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a los campos de la genética y la oncología y proporciona procedimientos y medios para el diagnóstico y seguimiento de pacientes que tienen linfomas de linfocitos B, tales procedimientos y medios permiten un diagnóstico precoz del linfoma de linfocitos B. Específicamente la invención se refiere a un nuevo procedimiento y un biomarcador para diagnosticar linfomas de linfocitos B y para diferenciar los linfomas de linfocitos B en grupos de pronóstico de linfomas de linfocitos B indolentes y agresivos.

Antecedentes de la invención

10 El concepto actual del desarrollo del cáncer incluye el desarrollo de la inestabilidad cromosómica, aneuploidía y una serie de aberraciones genéticas adquiridas que afectan genes importantes para el crecimiento y la supervivencia de la célula. Se ha sugerido que las células madre tienen un papel crítico en el desarrollo del cáncer, y que la regulación epigenética es relevante para la expresión genética asociada con pluripotencia. También las aberraciones genéticas únicas pueden tener influencia en el proceso completo de la patogénesis, y además, pueden ser útiles
15 como marcadores de cáncer. Durante los pasados años se han encontrado aberraciones genéticas adquiridas en varios cánceres (por ejemplo HER/neu en cáncer de mama) y los ensayos citogenéticos moleculares basados en estos genes se encuentran en el mercado y son de uso rutinario en el diagnóstico de cáncer en los laboratorios clínicos.

20 Los linfomas son cánceres del tejido linfoide. Comprenden un grupo de cánceres heterogéneos, divididos en linfomas no Hodgkin (NHL) y linfomas de Hodgkin (HL). Hay más de 40 subgrupos, dependiendo del tipo y madurez de la célula linfoide maligna subyacente. El NHL se origina habitualmente en tejidos linfoides y se puede clasificar como linfoma de linfocitos T o linfocitos B. La mayoría de los NHL (es decir, el 80-90%) son de origen de linfocitos B. Los linfomas no Hodgkin de linfocitos B incluyen el linfoma de Burkitt, el linfoma difuso de linfocitos B grandes, el linfoma folicular, linfoma de células inmunoblásticas grandes, linfoma linfoblástico precursor B, y el linfoma de
25 células del manto. Los linfomas no Hodgkin de linfocitos T incluyen micosis fungoides, linfoma de células anaplásicas grandes, y linfoma linfoblástico precursor T. Los linfomas relacionados con los trastornos linfoproliferativos después del trasplante de médula ósea o células madre son normalmente linfomas no Hodgkin de linfocitos B.

30 El pronóstico del NHL depende del tipo histológico, estadio, y tratamiento. Basándose en estas variables, los NHL se pueden dividir en dos grupos pronósticos: los linfomas indolentes y los linfomas agresivos. Los tipos de linfoma NHL indolente tienen un pronóstico relativamente bueno pero no son curables en estadios avanzados. La mayoría de los tipos indolentes son de morfología nodular (o folicular). El linfoma folicular (FL) es con mucho el más común de los NHL indolentes y representa casi el 25% de todos los nuevos casos de NHL. El tipo de NHL agresivo (por ejemplo el linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL)) tiene una expectativa de vida más corta. Con el tratamiento moderno
35 de los pacientes con NHL, la supervivencia total a los 5 años es del 50% al 60% aproximadamente. De los pacientes con NHL agresivo, del 30% al 60% se pueden curar pero la gran mayoría de recaídas se producen en los primeros 2 años tras la terapia.

La incidencia de los distintos linfomas aumenta continuamente y actualmente es alrededor de 363.000 nuevos casos anualmente por todo el mundo.

40 En el tratamiento de los linfomas, es crucial un diagnóstico precoz, debido a que la enfermedad tiende a recidivar en estados más tardíos. En el diagnóstico de linfoma, se obtiene una biopsia de un ganglio linfático y se lleva a cabo un análisis histopatológico. El tipo de linfoma se puede identificar por la apariencia física de las células cancerosas bajo el microscopio o por la utilización de marcadores que identifican moléculas especiales de las células de linfoma. La graduación del linfoma folicular se basa en el número medio de células grandes transformadas en 10 folículos neoplásicos en un campo de examen de alta potencia a x10-40. La reproductibilidad de la graduación del linfoma folicular depende de la experiencia del observador; por lo tanto, se producen variaciones significativas.

Actualmente, no hay biomarcadores biológicos moleculares disponibles en el ámbito clínico para identificar pacientes con NHL lo antes posible, o para identificar pacientes en los que persisten clones celulares malignos a pesar de una terapia clínicamente eficaz.

50 Frecuentemente se ven aberraciones cromosómicas en los linfomas y bastante a menudo tales aberraciones se producen en la región 12q (Bea y col., 1996, Benz y col., 1996, Horsman y col., 2001, Hernandez y col., 2001, Lestou y col., 2003, Chui y col., 2003, Hallerman y col., 2004). La anomalía cromosómica más común que se asocia con el NHL es la translocación t(14;18)(q32;q21) que se encuentra en el 85% de los linfomas foliculares y en el 25-30% de NHL de grado intermedio. Esta translocación da como resultado la yuxtaposición del oncogén inhibidor apoptótico
55 *bcl-2* en la banda cromosómica 18q21 a la región de cadena pesada del locus de inmunoglobulina (Ig) en la banda cromosómica 14q32, lo que da como resultado su sobre-expresión. La translocación t(11;14)(q13;q32) da como resultado la sobre-expresión de *bcl-1* (ciclina-D1/*PRAD1*), un gen de control de ciclo celular en la banda

5 cromosómica 11q13, y es diagnóstico del linfoma de células del manto. En los linfomas foliculares se ha revelado un aumento de la frecuencia de ganancia cromosómica que implica al cromosoma 12 entre otros, por análisis MFISH (Benz y col., 1996, Horsman y col., 2001, Lestou y col., 2003), y se observó el aumento de expresión genética de las bandas cromosómicas con ganancia, que incluyen el gen SAS en 12q13-q14 (Lestou y col., 2003). Se considera que los acontecimientos de translocación son responsables primariamente del inicio de la enfermedad FL, mientras que las ganancias y pérdidas cromosómicas desequilibradas (que también reflejan los patrones de expresión genética) caracterizan la evolución de los clones y la progresión de la enfermedad. En consecuencia, se ha demostrado que la eliminación (17p) y la ganancia/amplificación del cromosoma 12 se correlacionan con un resultado clínico adverso o la transformación en linfoma difuso de células grandes (DLCL) (Martinez-Climent y col., 2003, Höglund y col., 2004).
 10 Hasta ahora, sin embargo, se desconoce cuál gen o genes son los que están afectados por los cambios cromosómicos en el cromosoma 12 mencionados anteriormente.

15 Recientemente, se demostró que un nuevo gen NAV3 supuesto supresor tumoral está eliminado/ translocado en la mayoría de los tipos de linfoma de linfocitos T cutáneos comunes (CTCL) (Karenko y col., 2005, documento WO03066898). En los linfomas de linfocitos B, se han descrito aberraciones en Bcl-2, CD20, PAX-5, y BCL-6 pero no han conseguido aplicaciones clínicas amplias.

Por lo tanto, están justificados los nuevos biomarcadores para proporcionar diagnósticos más eficaces y precoces de linfomas de linfocitos B susceptibles de terapias dirigidas. Se necesitan también nuevos marcadores para diferenciar linfomas.

Breve descripción de la invención

20 La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

El objeto de la invención por tanto es proporcionar nuevos procedimientos y medios para el diagnóstico y seguimiento de pacientes que tienen síntomas de linfoma de linfocitos B, permitiendo tales procedimientos y medios un diagnóstico precoz y específico del linfoma de linfocitos B e identificando linfomas de linfocitos B susceptibles a las terapias dirigidas.

25 Otro objeto de la invención es proporcionar nuevos procedimientos y medios que permitan la identificación prematura de pacientes con un aumento del riesgo de desarrollar un linfoma agresivo y así posibilitar una prevención eficaz del cáncer.

30 Un objeto más de la invención es proporcionar nuevos procedimientos y medios para el desarrollo de nuevas directrices para el seguimiento de intervenciones terapéuticas. También se describe en el presente documento, aunque no se reivindica, el desarrollo de nuevas modalidades de tratamiento para los linfomas de linfocitos B, tales procedimientos y medios prolongan el estadio de remisión de la enfermedad e introducen nuevas posibilidades para combatir la enfermedad y para la recuperación del paciente.

Otro objeto de la invención es proporcionar nuevos procedimientos y medios para diferenciar linfomas de linfocitos B en grupos de pronóstico de formas indolentes y agresivas.

35 La presente invención se refiere a un procedimiento que se caracteriza por detectar aberraciones genéticas del gen NAV3 en una muestra biológica, específicamente cambios en el número de copias del gen NAV3, indicando la presencia de aberraciones un linfoma de linfocitos B.

40 La presente invención se refiere además a un procedimiento para detectar aberraciones genéticas del gen NAV3, preferentemente la pérdida o ganancia, potenciando la pérdida o ganancia de NAV3 la diferenciación de los linfomas de linfocitos B en grupos pronósticos de linfomas indolentes y agresivos.

En una realización preferida de la invención las aberraciones genéticas se determinan por hibridación fluorescente in situ (FISH).

En otra realización preferida de la invención el linfoma de linfocitos B es un linfoma folicular o un linfoma difuso de linfocitos B grandes.

45 La presente invención también se refiere a un uso del gen NAV3 para el diagnóstico o la terapia de linfomas de linfocitos B.

La presente invención se refiere además a un uso del gen NAV3 como biomarcador para linfomas de linfocitos B, preferentemente se utiliza el gen NAV3 como marcador de la malignidad del linfoma de linfocitos B.

50 La presente invención abre nuevas posibilidades en el avance de terapias para los linfomas de linfocitos B. Clasificando los pacientes en los dos grupos de formas indolente y agresiva del linfoma permitirá a los médicos encargados del tratamiento del paciente seleccionar modalidades terapéuticas individuales, las más eficaces para ese paciente determinado.

Con el invento de nuevos biomarcadores, tales como diferencias cromosómicas o genéticas en un grupo con linfoma que tienen el mismo diagnóstico original, la lista de tipos diferentes de linfomas aumentará y proporcionará en el futuro medios y bases para una terapia más específica (que se caracteriza por la expresión “medicina personalizada”).

5 **Breve descripción de los dibujos**

A continuación la invención se describirá con más detalle por medio de realizaciones preferidas con referencia a los dibujos adjuntos, en los que

10 La figura 1 muestra los resultados de la FISH específica de NAV3 con el linfoma folicular. Cada triángulo representa un caso por separado. Se analizaron cinco casos y se hizo el recuento de 200 células para cada caso. Las células se agruparon como células normales, poliploides, células con NAV3 eliminado o células con NAV3 amplificado. Los resultados se muestran como el porcentaje de cada tipo celular.

15 La figura 2 muestra la FISH específica de NAV3 con muestras de linfoma difuso de linfocitos B grandes. Cada triángulo representa un caso por separado. Se analizaron siete casos y se hizo el recuento de 200 células de cada caso. Las células se agruparon como células normales, poliploides, células con NAV3 eliminado o células con NAV3 amplificado. Los resultados se muestran como el porcentaje de cada tipo celular.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en un procedimiento para detectar aberraciones genéticas en el gen NAV3, en el que las aberraciones se detectan por desviaciones del número de copias respecto a lo normal.

20 Como se utiliza en el presente documento “aberración genética” se refiere a eliminaciones (pérdidas) o amplificaciones (ganancias) del gen NAV3, que se pueden detectar por el cambio en el número de copias del gen.

Como se utiliza en el presente documento “eliminación” se refiere a la ausencia de un fragmento del gen NAV3, un gen o un fragmento cromosómico que contiene el gen. En un procedimiento de análisis preferido la eliminación significa menos de dos copias de la señal NAV3.

25 Como se utiliza en el presente documento la expresión “amplificación” se refiere a la ganancia de material genético tal como un fragmento genético, un gen o un fragmento cromosómico que contiene el gen. En un procedimiento de análisis preferido amplificación significa más de dos copias del centrómero del cromosoma.

Como se utiliza en el presente documento la expresión “célula poliploide” se refiere a células que tienen más de dos copias del centrómero del cromosoma.

30 Como se utiliza en el presente documento la expresión “linfoma de linfocitos B” se refiere a linfomas no Hodgkin malignos (cancerosos) producidos por linfocitos B.

35 El NAV3 (navegador neuronal, también llamado POMFIL1) es un gen empalmado (40 exones) localizado en el cromosoma 12q21 y que se expresa en el tejido cerebral, linfocitos T activados, placenta, colon, y ciertas líneas celulares cancerosas (Coy y col. 2002; Maes y col., 2002; Karenko y col. 2005). La expresión de NAV3 está fuertemente reducida en el 40% de los tumores primarios de origen neuronal o glial, por otra parte, está regulado positivamente tras una lesión cerebral (Coy y col., 2002).

40 La secuencia de aminoácidos de NAV3 está bien conservada entre especies, lo que indica que la NAV3 tiene un papel importante en los procesos celulares. Como se ha previsto a partir de la secuencia de aminoácidos, la NAV3 puede tener un papel en la señalización celular o la supresión tumoral. También muestra las propiedades de una helicasa (enzima que desenrolla la estructura helicoidal del ADN); las helicasas tienen un papel en el mantenimiento de la estabilidad de los cromosomas, y su deficiencia podría producir un fenotipo de hiper-recombinación con mutantes de eliminación, y también la pérdida de heterocigisidad y el incremento de intercambio de cromátidas hermanas.

45 En la presente invención, se estudiaron los cambios en el número de copias en una serie de muestras a partir de los dos linfomas de linfocitos B más frecuentes por hibridación fluorescente in situ (FISH) utilizando sondas específicas del locus. Además de la eliminación en NAV3, se registró el número de células con poliploidía y amplificación en NAV3. La amplificación en NAV3 se encontró en el linfoma folicular (Figura 1), pero se encontró tanto amplificación como eliminación en la forma más agresiva del linfoma de linfocitos B, el linfoma difuso de células grandes (Figura 2). Por lo tanto, las aberraciones genéticas del gen NAV3 que se caracterizan por la pérdida o ganancia del NAV3 se muestran como un marcador de la malignidad de linfomas que se originan de linfocitos B (células B).

50 De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, la presencia o ausencia del gen NAV3 en una muestra biológica se puede detectar por cualquier procedimiento de detección adecuado para detectar la expresión de un gen o el número de copias, es decir, procedimientos que se basan en el número de copias del gen (o ADN) y/o los que se basan en la detección de los productos de la expresión genética (ARNm o proteína). Tales procedimientos los reconocen fácilmente los expertos en la técnica e incluyen procedimientos convencionales de

reacción en cadena de polimerasa (PCR), RT-PCR, hibridaciones in situ, tales como FISH, matriz-CGH, hibridación de ARNm in situ, matrices de polimorfismo de nucleótidos únicos de alta densidad (SNP), análisis de Northern, análisis de Southern y Western, inmunohistoquímica, y otros inmunoensayos, tales como ELISA. Los procedimientos preferidos son los adecuados para su uso rutinario en laboratorios clínicos. El más preferido es el cambio del número de copias de NAV3 detectado por FISH.

En el procedimiento de la invención, la muestra biológica puede ser cualquier muestra de tejido adecuada, tal como una biopsia del ganglio linfático o médula ósea. La muestra biológica puede pre-tratarse, si fuera necesario, de una manera adecuada conocida por los expertos en la técnica.

También se describe en el presente documento aunque no se reivindica la restauración terapéutica de la función normal del gen NAV3. Esto se puede conseguir aumentando la expresión de genes funcionalmente homólogos, introduciendo un gen NAV3 intacto o utilizando una forma alterada del gen NAV3 u oligonucleótido antisentido contra el NAV3 con cualquier técnica disponible actualmente de terapia genética para prevenir la progresión de una enfermedad proliferativa. En particular, se puede disminuir o incluso parar el crecimiento celular por medio de tal terapia. Tales técnicas incluyen los procedimientos de terapia *ex vivo* e *in situ*, comprendiendo el primero la transducción o transfección de un gen NAV3 alterado o intacto (o sus dominios funcionales) en forma recombinante o peptídica o como oligonucleótidos antisentido o en un vector al paciente, y que comprende el último la inserción del gen alterado u oligonucleótido en un portador, que se introduce entonces en el paciente. Dependiendo de la enfermedad que se va a tratar, se puede conseguir una cura transitoria o una cura permanente. De manera alternativa, se pueden utilizar anticuerpos monoclonales o humanizados o péptidos que se unen a la proteína NAV3 o al gen de fusión que se genera como resultado de la translocación, para suprimir la función de la proteína NAV3 alterada y de esta manera se puede ralentizar el crecimiento de células tumorales o incluso pararse. Se podrían también utilizar anticuerpo contra NAV3 para llevar otros agentes, tales como sustancias citotóxicas, a las células cancerosas que sobre expresan el gen NAV3. Tales agentes se podrían utilizar entonces para destruir específicamente las células cancerosas.

Los siguientes ejemplos se dan para una mayor ilustración de la invención.

Ejemplo 1

ANÁLISIS FISH ESPECÍFICO DE NAV3 DE LINFOMAS DE LINFOCITOS B

MUESTRAS

Las muestras para el ensayo FISH se prepararon a partir de 12 casos de linfoma de linfocitos B seleccionados aleatoriamente. Cinco casos representados por linfoma folicular (FL) y siete casos de linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL). Todas las muestras de tejido eran muestras denominadas de impronta, que se prepararon de material de biopsia reciente presionando con delicadeza la biopsia contra un portaobjetos Super Frost Plus de forma que se depositaban las células en el portaobjetos. Las preparaciones de impronta se almacenaron a -70 °C.

MARCADO DE LAS SONDAS

Se marcaron dos clones del cromosoma artificial bacteriano (BAC) específico para el ADN NAV3 (RP11-36P3 y RP11-136F16; Research Genetics Inc., Huntsville, AL, EE. UU.) con Alexa594-5-dUTP (Invitrogen) y se marcó la sonda del centrómero del cromosoma 12 (pA12H8; Cultivo Americano de células Tipo) con Alexa488-5-dUTP (Invitrogen) utilizando traducción nick (Hyytinen y col. 1994). Se mezclaron en conjunto 50-75 ng de cada BAC marcado y 30 ng de la sonda de centrómero con 1 µg de ADN COT1 humano (Invitrogen) y se precipitaron en acetato sódico y etanol. La mezcla de sonda precipitada se diluyó en 10 µl de tampón de hibridación (un 15% p/v de sulfato de dextrano, un 70% de formamida en 2x SSC, pH 7,0).

HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE IN SITU

Se fijaron los portaobjetos con paraformaldehído al 4% en PBS durante 1 minuto en hielo. Tras los lavados con PBS, se llevó a cabo la digestión enzimática de los portaobjetos con proteinasa K (Sigma; 0,66 µg/ml en 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 2 mM de CaCl₂) a +37 °C durante 6 minutos. Tras la deshidratación y el secado al aire, la mezcla de sonda se dispuso con pipetas en portaobjetos y los portaobjetos se desnaturalizaron durante 5 min a +75 °C en una placa caliente. Se llevó a cabo la hibridación durante 48 h a +37 °C. Se lavaron los portaobjetos tres veces con 1,5 M de Urea, 0,1x SSC a +47 °C durante 10 minutos, una vez con 0,1 x SSC durante 10 minutos a +47 °C, seguido por tres lavados con PBS, 0,1% de NP-40 a temperatura ambiente. Finalmente, los portaobjetos se aclararon con agua destilada, se secaron al aire y se montaron en Medio de Montaje Vectashield con dihidrocloruro 4',6-diamino-2 fenilindol (DAPI; Vector).

ANÁLISIS Y RESULTADOS

Se evaluaron los resultados de la FISH utilizando un microscopio Olympus BX61 (Tokyo, Japón) equipado con un objetivo de inmersión en aceite de 60x y un filtro de triple banda de paso para la detección simultánea de Alexa488, Alexa594 y DAPI (Chroma Technology Corp., Brattleboro, VT, EE. UU.). Se analizaron 200 células de cada caso y

5 se agruparon las células como normales si tenían dos marcadores por centrómero del cromosoma 12 y dos para el NAV3. Las células poliploides tenían tres o más marcadores del centrómero. La eliminación en NAV3 se definía cuando el número de marcadores del centrómero era mayor que el número de los marcadores de NAV3 y la amplificación en NAV3 se definió cuando el número de los marcadores de NAV3 era mayor que los marcadores del centrómero. Los análisis se hicieron ciegos para el diagnóstico o identidad de muestra por dos analizadores independientes. 3/5 casos de linfoma folicular estudiados (60%) mostraban una amplificación en NAV3 clara. No se detectó ninguna eliminación en NAV3 (Figura 1). En el caso de linfomas difusos de linfocitos B grandes 1/7 (14%) de las muestras mostraban amplificación NAV3 y 1/7 (14%) de las muestras mostraban eliminación NAV3 (Figura 2).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para el diagnóstico de un linfoma de linfocitos B, **caracterizado por** la detección de aberraciones genéticas del gen NAV3 en una muestra biológica, indicando la presencia de aberraciones un linfoma de linfocitos B.
- 5 2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado porque** las aberraciones genéticas son cambios en el número de copias del gen NAV3.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la pérdida o ganancia de NAV3 permite la diferenciación de los linfomas de linfocitos B en grupos de pronóstico.
- 10 4. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3, en el que los grupos de pronóstico son las formas indolente y agresiva de linfomas de linfocitos B.
5. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** las aberraciones se determinan por hibridación fluorescente *in situ* (FISH).
6. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el linfoma de linfocitos B es un linfoma folicular.
- 15 7. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado porque** el linfoma de linfocitos B es un linfoma difuso de linfocitos B grandes.
8. El uso del gen NAV3 como un biomarcador para los linfomas de linfocitos B.
9. El uso según la reivindicación 8, **caracterizado porque** la pérdida o ganancia del gen NAV3 es un marcador de la malignidad del linfoma de linfocitos B.

20

Figura 1.

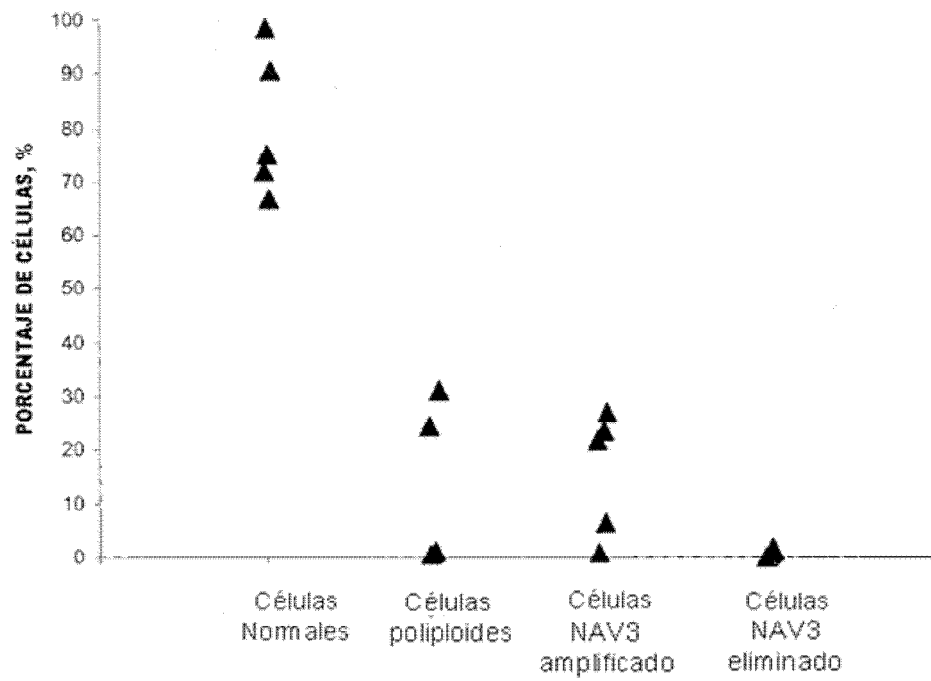


Figura 2.

