

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 604 763**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.05.2008 PCT/GB2008/001625**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **20.11.2008 WO08139169**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.05.2008 E 08750561 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2148932**

54 Título: **Expresión de Sox11 en linfomas malignos**

30 Prioridad:

**11.05.2007 GB 0709092**

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

**09.03.2017**

73 Titular/es:

**IMMUNOVIA AB (100.0%)**

**Medicon Village**

**223 81 Lund, SE**

72 Inventor/es:

**BORREBAECK, CARL, ARNE, KRISTER y  
EK, SARA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques  
o Bemerkungen) en el folleto original publicado  
por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 604 763 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

Expresión de Sox11 en linfomas malignos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al factor de transcripción Sox11 y al uso de agentes de unión que se unen al mismo en la formación de imágenes y/o el diagnóstico de linfomas, por ejemplo linfoma de células del manto (LCM) y linfoma difuso de células B grandes (LDCBG).

10

**Introducción**

El término linfoma refiere a todas las neoplasias malignas de los linfocitos, siendo las más frecuentes las neoplasias malignas de células B y T. La clasificación de los linfomas es aún objeto de debate y lejos de ser concluyente. La clasificación actual que se utiliza es la Clasificación Americana Europea Revisada de Linfomas (Harris et al., 1994, Blood 84:1361–1392). Sin embargo, este sistema tiene que dividirse adicionalmente para permitir un diagnóstico lo más preciso posible, permitiendo con ello un tratamiento óptimo para los pacientes.

15

Los linfomas de células B son neoplasias malignas de linfocitos B y se pueden dividir en varios subgrupos en función de sus propiedades morfológicas y fenotípicas, según la clasificación de la OMS (Harris et al., 2000, Pathol 13: 193–207). Los principales grupos de neoplasias de células B son leucemia/linfoma linfoblastico de células B precursoras, leucemia/linfoma linfocítico crónico (LLC), mieloma de células plasmáticas, linfoma de células B de la zona B extraganglionar de tipo de tejido linfoide asociado a la mucosa, linfoma folicular (LF), linfoma de células del manto (LCM), linfoma difuso de células B grandes y linfoma de Burkitt (Harris et al., 2000, Pathol 13: 193–207).

20

25

Se han publicado varios estudios de la expresión génica de los diferentes tipos de linfomas de células B. Por ejemplo, Golub et al., 1999 Science 286:531–537 han mostrado que la leucemia mieloide aguda (LMA) y la leucemia linfoblástica aguda (LLA) se pueden distinguir en función de su análisis de la expresión génica. Además, Alizadeh et al., 2000 Nature 403:503–511 encontraron dos tipos diferentes de linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) en el análisis de la expresión génica de estos tumores en el Lymphochip.

30

Las células B pasan por varias etapas de diferenciación durante el desarrollo. La célula B inmadura migra desde la médula ósea a los ganglios linfáticos, en los que la célula B intacta es estimulada para que migre a los folículos de células B, formando los centros germinales, antes de, finalmente, diferenciarse en una célula plasmática secretora de anticuerpos. Para cada una de estas diferentes etapas, se ha encontrado un homólogo maligno que se asemeja al origen normal de las células B (Pascual et al., 1997, Baillieres Clin Haematol 10:525–538).

35

Se cree que los linfomas de células del manto (LCM) derivan de una célula B intacta, aunque la relación con las células CD5<sup>+</sup> B-1 también se ha discutido (Pascual *et al.*, citado anteriormente Capello et al., 2000, *Haematologica* 85:195–201). Los LCM son indolentes y no muestran ninguna mutación somática de sus genes de inmunoglobulina, asemejándose así a su origen en las células B intactas. La mediana de la edad del trastorno para los pacientes con LCM es de 60 años y la mediana de la supervivencia es de 2 a 5 años, con una mala respuesta a los regímenes terapéuticos convencionales (Weisenburger et al., 2000, Am J Hematol 64:190–196). El setenta por ciento de los pacientes tienen afectación de la médula ósea y el predominio varones:mujeres es de 3: 1 (Kurtin, 1998, Adv Anat Pathol 5:376–398). Las células del LCM expresan los marcadores de células pan-B CD5, CD19, CD20, CD22, CD79a y CD79b y son negativas para CD10 y CD23 (Kurtin, 1998, Adv Anat Pathol 5:376–398). Los tumores del LCM pueden crecer en tres patrones de crecimiento diferentes, el patrón de zona del manto, ganglionar y difuso. También hay varias variantes morfológicas con distinta mediana de la supervivencia (similar a monocitoide de células B o variante pleomórfica o anaplásica, variante de células grandes y variante blastoide) que cumplen los criterios para su designación como LCM (neoplasias CD20<sup>+</sup> que son CD43<sup>+</sup>, CD5<sup>+</sup>, CD23<sup>-</sup>, CD10<sup>-</sup> y positivas para ciclina D) (Kurtin de 1998, Adv Anat Pathol 5: 376-398). A menudo se puede ver la red de células dendríticas foliculares positivas para CD21, CD23 y CD35 en el tejido tumoral de la LCM (Kurtin, 1998, Adv Anat Pathol 5:376–398).

40

45

50

55

La subagrupación de los linfomas de células B es necesaria para la decisión de la estrategia terapéutica, ya que se sabe que diferentes tipos de linfomas responden de forma diferente a diversos tratamientos. Por lo tanto, la posibilidad de un diagnóstico exacto de diferentes linfomas de una manera robusta y simple es crucial para la capacidad de iniciar de inmediato el tratamiento del paciente en consecuencia.

60

Actualmente, los LCM se separan de la leucemia/linfoma linfocítica crónica y del linfoma folicular según la expresión de CD23 y CD10, que generalmente son negativas en el LCM, pero positivas en la leucemia/linfoma linfocítica crónica y el linfoma folicular, respectivamente. Además, la sobreexpresión de ciclina D1, el sello distintivo del LCM, se utiliza para el diagnóstico de LCM y lo separa de otras neoplasias malignas.

65

Sin embargo, algunos LCM muestran la translocación característica t(11;14), que pone al gen BCL1 (ciclina D1) bajo el control del promotor de la cadena pesada de inmunoglobulina, pero carece de expresión de la proteína (Stacey et

al., 2003, *Curr Opin Cell Biol* 15: 158–63; Donnellan et al., 1998, *Mol Pathol* 51: 1–7). La situación opuesta, en la que se detecta la proteína pero la translocación no se puede confirmar, también es frecuente debido a la heterogeneidad de la región puntual de ruptura de translocación. La ciclina D1 estimula la transición de la fase a la fase S y se cree que es una de las características principales que contribuyen al comportamiento maligno en el LCM.

5 El LCM está reconocido como una de las formas más graves de linfoma, exhibiendo en general una resistencia a la quimioterapia convencional y una progresión clínica rápida en muchos casos a neoplasias malignas incurables con una mediana del tiempo de supervivencia de 3 años (Kurtin 1998 citado anteriormente).

10 El linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) es una entidad heterogénea y solo curable en menos de 50 % de los pacientes. El índice pronóstico internacional (IPI) se utiliza para predecir el resultado para los pacientes de acuerdo con los parámetros clínicos, tal como la elevación de la LDH, el número de sitios extraganglionares y el estadio, pero incluyendo también el estado funcional y la edad como un factor de riesgo. Se han buscado marcadores moleculares con relevancia biológica y la utilización de pronóstico y se ha demostrado que tanto *bcl-2* como *bcl-6* se correlacionan con la supervivencia. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que los pacientes tratados con R-CHOP (terapia de combinación con CHOP y Retuximab) los marcadores ya no son útiles. Una versión revisada del IPI sigue siendo el único marcador pronóstico de LDCBG tratado con R-CHOP.

20 Por lo tanto, también hay una necesidad de mejores métodos de diagnóstico y pronóstico de linfomas, tales como linfomas de células del manto (LCM) y linfoma difuso de células B grandes (LDCBG).

25 El documento WO 2005/002417 está dirigido (en parte) a métodos para diagnosticar/pronosticar cáncer a través de la medición de la expresión de Sox11. No se menciona el diagnóstico de linfoma, linfoma de células del manto (LCM) o linfoma difuso de células B grandes (LDCBG).

El documento WO 2004/060304 está dirigido (en parte) a métodos de diagnosticar/pronosticar cáncer mediante la medición de la expresión de diversos biomarcadores que se ha informado que están asociados al cáncer (incluyendo Sox11). No trata si Sox11 está sobreexpresado en cualquier tipo de linfoma.

30 Bernd et al., 2005, *Oncology Reports*, 13(1):139–144 y Ching–Jung et al., 2002, *J. Neuro–oncology*, 57(3):201–214 divulgan cebadores de oligonucleótidos específicos de Sox11. Sin embargo, ninguno de los documentos divulga una asociación entre la expresión de SOX11 y un linfoma (se refieren a glioma y meduloblastoma, respectivamente).

35 Jay et al., 1996, n.º de acceso en Genbank U23752 (ARNm de SOX–11 humano) es un extracto de GenBank de la secuencia de ADNc de SOX11. No obstante, no se atribuye uso a la secuencia divulgada.

Ek et al., 2008, *Blood*, 111(2):800–805 enseña la idoneidad de SOX11 como biomarcador para el linfoma de células del manto (LCM) y divulga anticuerpo policlonal anti-SOX11 para su uso en el diagnóstico/pronóstico del LCM.

#### 40 **Resumen de la invención**

El primer aspecto de la divulgación proporciona un resto de unión que es capaz de unirse selectivamente a la proteína Sox11, o a una molécula de ácido nucleico que codifica la misma, para el diagnóstico o el pronóstico de un linfoma.

45 La invención proporciona el uso de un resto de unión que es capaz de unirse selectivamente a la proteína Sox11, o a una molécula de ácido nucleico que codifica la misma, en la preparación de un agente de diagnóstico o pronóstico para el linfoma de células del manto.

50 Todos los aspectos de la invención son como se define en las reivindicaciones adjuntas.

En una realización, el linfoma es un linfoma de células del manto (LCM). Por ejemplo, el resto de unión puede ser para el diagnóstico de LCM.

55 En una realización adicional, el linfoma es un linfoma difuso de células B grandes (LDCBG). Por ejemplo, el resto de unión puede ser para pronosticar el LDCBG.

60 SOX11 pertenece a la familia de genes Sox y las proteínas se agrupan en esta familia si contienen un dominio HMG de unión a ADN (grupo de movilidad alta) con una fuerte similitud de aminoácidos (normalmente > 50 %) al dominio HMG de Sry, una proteína determinante del sexo (Wegner, 1999, *Nucleic Acids Res* 27: 1409–20). Más de 20 miembros de la familia génica Sox se han identificado en diferentes especies y se han agrupado en 7 subgrupos de acuerdo con la homología dentro y fuera del dominio de HMG. El Sox11 humano pertenecen al subgrupo C y es homólogo a Sox4 con una identidad del 55 % a nivel de aminoácidos dentro del dominio de transactivación C-terminal y una identidad del 86 % para el dominio de HMG (Wegner, 1999, *Nucleic Acids Res* 27: 1409–20).

65 También se ha mostrado que Sox11 y Sox4 presentan funciones complementarias en el sistema nervioso en desarrollo (Cheung et al., 2000, *Brain Res Mol Brain Res* 79: 180–91). Mientras que se ha demostrado que sox4 es

crucial para los linfocitos B (Smith y Sigvardsson, 2004, J Leukoc Biol 75: 973–81), no hay ningún informe anterior sobre la expresión de SOX11 en las células B normales ni malignas.

5 Por lo tanto, por "proteína Sox11" se incluye la secuencia de aminoácidos de la proteína Sox11 humana como se muestra en la Figura 4 en el presente documento, así como homólogos de origen natural de la misma.

10 Los presentes inventores han identificado, sorprendentemente, Sox11 como un antígeno de diagnóstico para linfomas, tales como LCM, utilizando un análisis de inmunohistoquímica. No sólo es este es el primer informe que muestra la expresión de Sox11 en las células del linaje de células B, la localización diferencial y la intensidad de la tinción diferencian el LCM de las células B de las amígdalas NO malignas, sino también de otros tipos de linfomas, tales como la leucemia/linfoma linfocítico crónico, el linfoma folicular y el linfoma difuso de células B grandes. Por lo tanto, Sox11 proporciona un valioso marcador para el diagnóstico de pacientes con LCM y facilita el diagnóstico preciso de este tipo de neoplasia maligna agresiva.

15 Por "diagnosticar", los inventores incluyen el acto o proceso de identificación de la existencia y el tipo de un linfoma por el cual un individuo puede estar sufriendo. Por tanto, en una realización, el diagnóstico incluye la diferenciación de un tipo de linfoma concreto, tal como LCM o LDCBG, a partir de uno o más de otros linfomas.

20 Por "pronóstico", los inventores incluyen el acto o proceso de predecir el curso probable y el resultado de un linfoma, por ejemplo, determinar la probabilidad de supervivencia.

Por "resto de unión" se quiere decir una molécula o segmento de una molécula que es capaz de unirse a otra molécula o moléculas.

25 Los expertos en la técnica apreciarán que los restos de unión de la invención pueden usarse *in vivo* o *in vitro*.

30 En una realización, el resto de unión de la invención es para su uso en la detección de la expresión de Sox11 como un único biomarcador para la diferenciación de un tipo concreto de linfoma, tal como LCM o LDCBG, de uno o más de otros linfomas. Alternativamente, o además, la expresión d Sox11 se puede usar como un único biomarcador para el pronóstico de un linfoma, tal como LDCBG.

35 Como alternativa, el resto de unión de la invención puede ser para su uso en combinación con uno o más restos de unión para la detección adicional de uno o más biomarcadores adicionales para el linfoma. Por lo tanto, el resto de unión puede ser para su uso en combinación con menos de 20 restos de unión adicionales, por ejemplo menos de 15, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 restos de unión adicionales

En una realización particular, el resto de unión es para la detección de la expresión nuclear de Sox11.

40 Por "unión de forma selectiva", los inventores incluyen restos de unión que se unen más fuertemente a Sox11 que a otros polipéptidos o ácidos nucleicos; preferentemente con una fuerza al menos 10 veces mayor, preferentemente con una fuerza al menos 50 veces mayor y, aún más preferentemente, con una fuerza al menos 100 veces mayor. Preferentemente, los restos de unión se unen solamente a polipéptidos Sox11 o ácidos nucleicos. Preferentemente, los restos de unión se unen solamente a polipéptidos o ácidos nucleicos Sox11.

45 El término "polipéptido" tal como se usa en el presente documento significa una pluralidad de aminoácidos que están unidos entre sí mediante un enlace peptídico. El término "péptido" se puede usar de forma intercambiable con el término "polipéptido", sin embargo, un péptido puede estar compuesto por dos o más polipéptidos.

50 El término "aminoácido" como se utiliza en el presente documento incluye los veinte aminoácidos estándar codificados genéticamente y sus estereoisómeros correspondientes en la forma 'D' (en comparación con la forma natural 'L'), aminoácidos omega, otros aminoácidos de origen natural, aminoácidos no convencionales (por ejemplo, aminoácidos  $\alpha,\alpha$ -disustituidos, aminoácidos N-alquilo, etc.) y aminoácidos derivatizados químicamente (véase más adelante).

55 Cuando un aminoácido se está enumerando específicamente, tal como "alanina" o "Ala" o "A", el término se refiere tanto a L-alanina como a D-alanina, a menos que se indique explícitamente lo contrario. Otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para polipéptidos de la presente invención, siempre que el polipéptido retenga la propiedad funcional deseada. Para los péptidos mostrados, cada resto de aminoácido codificado, cuando sea apropiado, está representado por una designación de una sola letra, correspondiente al nombre trivial del aminoácido convencional.

60

La molécula de ácido nucleico puede ser ADN, ARN o PNA, y, preferentemente, ADN. La molécula de ácido nucleico puede o no contener intrones en la secuencia de codificación; preferentemente, la molécula de ácido nucleico es un ADNc.

65

Por lo tanto, la molécula de ácido nucleico aislada es adecuada para la expresión de un polipéptido de la invención. Por "adecuado para la expresión" se entiende que la molécula de ácido nucleico es un polinucleótido que puede traducirse para formar el polipéptido, por ejemplo ARN, o que el polinucleótido (que es, preferentemente ADN,) que codifica el polipéptido de la invención se inserta en un vector de expresión, tal como un plásmido, en orientación apropiada y marco de lectura correcto para la expresión. polinucleótido puede estar unido a las secuencias de nucleótidos de control regulador de la transcripción y la traducción adecuadas reconocidas por cualquier huésped deseado; estos controles se pueden incorporar en el vector de expresión.

5

Generalmente, la molécula de ácido nucleico se inserta en un vector de expresión, tal como un plásmido, en orientación apropiada y marco de lectura correcto para la expresión. Si es necesario, la molécula de ácido nucleico puede estar unida a las secuencias de nucleótidos de control regulador de la transcripción y la traducción adecuadas reconocidas por cualquier huésped deseado; estos controles se pueden incorporar en el vector de expresión. A continuación, el vector se introduce en el huésped a través de técnicas estándar. Generalmente, no todos los huéspedes serán transformados por el vector. Por lo tanto, será necesario seleccionar las células huésped transformadas. Una técnica de selección implica la incorporación en el vector de expresión de una secuencia de polinucleótidos, con cualquier elemento de control necesario, que codifica un rasgo seleccionable en la célula transformada, tal como la resistencia a antibióticos. Alternativamente, el gen para tal rasgo seleccionable puede estar en otro vector, que se utiliza para co-transformar la célula huésped deseada

10

15

Las células huésped que han sido transformadas por la molécula de ácido nucleico recombinante de la invención se cultivan después durante un tiempo suficiente y en condiciones apropiadas conocidas por los expertos en la técnica en vista de las enseñanzas divulgadas en el presente documento para permitir la expresión del polipéptido, que entonces se puede recuperar.

20

Se conocen muchos sistemas de expresión, incluyendo bacterias (por ejemplo *E. coli* y *Bacillus subtilis*), levaduras (por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae*), hongos filamentosos (por ejemplo *Aspergillus*), células vegetales, células de mamíferos y células de insectos.

25

Los vectores generalmente incluyen un replicón procariota, tal como el ColE1 ori, para la propagación en un procariota, incluso si el vector se va a usar para la expresión en otros tipos de células no procariotas. Los vectores también pueden incluir un promotor apropiado, tal como un promotor procariota capaz de dirigir la expresión (transcripción y traducción) de los genes en una célula huésped bacteriana, tal como *E. coli*, transformada con el mismo. Las secuencias promotoras compatibles con huéspedes bacterianos de ejemplo se proporcionan normalmente en vectores plasmídicos que contienen sitios de restricción convenientes para la inserción de un polinucleótido de la presente invención.

30

35

Los plásmidos de vectores procarióticos típicos son pUC18, pUC19, pBR322 y pBR329 disponibles en Biorad Laboratories, (Richmond, CA, EE.UU.) y pTrc99A y pKK223-3 disponibles en Pharmacia, Piscataway, NJ, EE.UU.

40

Un plásmido vector de células de mamífero típico es pSVL disponible en Pharmacia, Piscataway, NJ, EE.UU. Este vector usa el promotor tardío SV40 para dirigir la expresión de genes clonados, encontrándose el nivel más alto de expresión en las células productoras de antígeno T, tales como las células COS-1.

45

Un ejemplo de un vector de expresión de mamífero inducible es pMSG, también disponible en Pharmacia. Este vector usa el promotor inducible por glucocorticoides de la repetición terminal larga del virus de tumor mamario de ratón para dirigir la expresión del gen clonado.

50

Los vectores plasmídicos de levaduras útiles son pRS403-406 y pRS413-416 y generalmente están disponibles en Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE.UU. Los plásmidos pRS403, pRS404, pRS405 y pRS406 son plásmidos de integración en levaduras (YIps) e incorporan los marcadores seleccionables de levadura HIS3, TRP1, LEU2 y URA3. Los plásmidos pRS413-416 son plásmidos del centrómero de levadura (YCps).

55

60

La presente divulgación también se refiere a una célula huésped transformada con una construcción de vector polinucleótido de la presente invención. La célula huésped puede ser procariota o eucariota. Las células bacterianas son células huésped procariotas preferidas y normalmente son una cepa de *E. coli* tal como, por ejemplo, las cepas de *E. coli* DH5 disponible en Bethesda Research Laboratories Inc., Bethesda, MD, EE.UU., y RR1 disponible en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) de Rockville, MD, EE.UU. (ATCC nº 31343). Las células huésped eucariotas preferidas incluyen levaduras, células de insectos y de mamíferos, preferentemente células de vertebrados, tales como las de ratón, rata, mono o las líneas celulares fibroblásticas y de riñón humanas. Las células huésped de levadura incluyen YPH499, YPH500 y YPH501, que generalmente están disponibles en Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA 92037, EE.UU. Las células huésped de mamífero preferidas incluyen células de ovario de hámster chino (CHO) disponibles en la ATCC como CCL61, células embrionarias de ratón NIH Swiss NIH/3T3 disponibles en la ATCC como CRL 1658, células COS-1 derivadas de riñón de mono disponibles en la ATCC como CRL 1650 y células 293 que son células de riñón embrionario humano. Las células de insecto preferidas son células Sf9 que pueden transfectarse con vectores de expresión de baculovirus.

65

La transformación de los huéspedes celulares adecuados con una molécula de ácido nucleico de la presente invención se lleva a cabo por procedimientos bien conocidos que normalmente dependen del tipo de vector usado. Con respecto a la transformación de las células huésped procarióticas, véase, por ejemplo, Sambrook & Russell (Sambrook y Russell, 2001, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). La transformación de células de levadura se describe en numerosas revisiones, por ejemplo, véase Gietz y Woods (2001) Biotechniques 30:816–228. Con respecto a las células de vertebrados, los reactivos útiles en la transfección de tales células, por ejemplo fosfato de calcio y formulaciones de DEAE-dextrano o liposomas, están disponibles en Stratagene Cloning Systems, or Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD 20877, EE.UU.

La electroporación también es útil para transformar y/o transfectar células y es bien conocida en la técnica para la transformación de células de levadura, células bacterianas, células de insectos y células de vertebrados. Por ejemplo, muchas especies bacterianas pueden ser transformadas por los métodos descritos en Luchansky et al. (1988) Mol. Microbiol. 2:637–646. Los métodos para la transformación de levaduras mediante electroporación se divulgan en Becker & Guarente (1990) Methods Enzymol. 194:182.

Las células transformadas con éxito, es decir las células que contienen una molécula de ácido nucleico de la presente invención, se pueden identificar mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, las células resultantes de la introducción de una construcción de expresión de la presente invención se pueden cultivar para producir el polipéptido de la invención. Las células pueden recogerse y lisarse, y examinar su contenido de ADN para determinar la presencia de ADN usando un método tal como el descrito por Sambrook y Russell (citado anteriormente). Como alternativa, la presencia de la proteína en el sobrenadante se puede detectar usando anticuerpos.

Además de ensayar directamente la presencia de ADN recombinante, la transformación con éxito puede confirmarse mediante métodos inmunológicos bien conocidos cuando el ADN recombinante es capaz de dirigir la expresión de la proteína. Por ejemplo, las células transformadas con éxito con un vector de expresión producen proteínas que presentan la antigenicidad apropiada. Las muestras de células que se sospecha que se han transformado se cosechan y se analizan para determinar la proteína usando anticuerpos adecuados.

El segundo aspecto de la divulgación proporciona un resto de unión que es capaz de unirse selectivamente a la proteína Sox11, o a una molécula de ácido nucleico que codifica la misma, para la detección de células de linfoma en una muestra (por ejemplo LCM o LDCBG).

Una realización de la invención proporciona el uso de acuerdo con el primero o segundo aspecto en el que el resto de unión es capaz de unirse selectivamente a la proteína Sox11.

Convenientemente, el resto de unión es capaz de unirse selectivamente a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (véase la figura 4) y/o variantes naturales de la misma.

Por "variantes naturales", los inventores incluyen, por ejemplo, variantes alélicas. Normalmente, estas variarán con respecto a la secuencia dada en solo uno, dos o tres, y, por lo general, no más de 10 o 20 restos de aminoácidos. Normalmente, las variantes tienen sustituciones conservadoras.

Las variantes de polipéptidos incluyen polipéptidos que comprenden una secuencia con al menos 60 % de identidad con las secuencias de aminoácidos conocidas, preferentemente al menos 70 % u 80 % u 85 % o 90 % de identidad con dichas secuencias, y, más preferentemente, al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con dichas secuencias de aminoácidos.

El porcentaje de identidad puede determinarse mediante, por ejemplo, el programa LALIGN (Huang y Miller, Adv. Appl. Math. (1991) 12:337–357) en el centro Expasy ([http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html)) usando como parámetros la opción de alineación global, la matriz de puntuación BLOSUM62, penalización por abertura de hueco –14, penalización por extensión de hueco –4. Como alternativa, el porcentaje de identidad de secuencia entre dos polipéptidos se puede determinar usando programas de ordenador adecuados, por ejemplo el programa GAP de la University of Wisconsin Genetic Computing Group y se apreciará que el porcentaje de identidad se calcula en relación con los polipéptidos cuya secuencia se ha alineado de forma óptima.

Preferentemente, el resto de unión comprende o consiste en un polipéptido.

Los restos de unión de polipéptidos se pueden identificar por medio de una criba. Un método adecuado o criba para la identificación de péptidos u otras moléculas que se unen selectivamente a una proteína o polipéptido diana puede comprender poner en contacto la proteína o polipéptido diana con un péptido de ensayo otra molécula en condiciones en las que se puede producir la unión y, a continuación, determinar si la molécula o péptido de ensayo se ha unido a la proteína o péptido diana. Los métodos de detección de la unión entre dos restos son bien conocidos en la técnica de la bioquímica. Preferentemente, la técnica conocida de presentación en fagos se utiliza para identificar péptidos u otras moléculas de ligando adecuadas para su uso como restos de unión. Un método

alternativo incluye el sistema de dos híbridos de levadura.

Más preferentemente, el segundo agente de unión comprende o consiste en un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno o variante del mismo.

5 Por "anticuerpo", los inventores incluyen, no solo las moléculas de inmunoglobulina enteras, sino también fragmentos de las mismas, tales como Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv y otros fragmentos de los mismos que retienen el sitio de unión al antígeno. Del mismo modo el término "anticuerpo" incluye derivados modificados genéticamente de anticuerpos, tales como moléculas Fv de cadena sencilla (scFv) y anticuerpos de dominio único (dAb). El término  
10 también incluye moléculas similares a anticuerpos que pueden producirse utilizando técnicas de presentación en fagos u otras técnicas de selección aleatorias.

15 Los dominios variable de la cadena pesada (V<sub>H</sub>) y variable de la cadena ligera (V<sub>L</sub>) del anticuerpo están implicados en el reconocimiento del antígeno, un hecho reconocido primero por los experimentos de digestión precoz con proteasa. Otra confirmación se encontró mediante "humanización" de anticuerpos de roedores. Los dominios variables procedentes de roedores se pueden fusionar con dominios constantes de origen humano de forma que el anticuerpo resultante retiene la especificidad antigénica del anticuerpo emparentado con el roedor (Morrison et al, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855).

20 Dicha especificidad antigénica es conferida por los dominios variables y es independiente de los dominios constantes, como se sabe a partir de experimentos que implican expresión bacteriana de fragmentos de anticuerpos, conteniendo todos uno o más dominios variables. Estas moléculas incluyen moléculas de tipo Fab (Better et al, 1988, Science 240: 1041); moléculas Fv (Skerra et al (1988) Science 242, 1038); moléculas Fv de cadena sencilla (scFv) en las que los dominios de V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> están unidos a través de un oligopéptido flexible (Bird et al, 1988, Science  
25 242:423; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879) y anticuerpos de dominio único (dAb) que comprenden dominios V aislados (Ward et al., 1989, Nature 341:544 Una revisión general de las técnicas implicadas en la síntesis de fragmentos de anticuerpos que retienen sus sitios de unión específicos se encuentra en Winter y Milstein, 1991, Nature 349:293-299.

30 Por "moléculas "ScFv", los inventores quieren decir moléculas en las que los dominios de pareja V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> están unidos a través de un oligopéptido flexible.

35 Las ventajas del uso de fragmentos de anticuerpos, en lugar de anticuerpos enteros, son varias. El menor tamaño de los fragmentos puede conducir a mejores propiedades farmacológicas, tales como una mejor penetración en el sitio diana. Se eliminan las funciones efectoras de los anticuerpos completos, tales como la unión al complemento. Los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv, ScFv y dAb se pueden expresar todos ellos en *E. coli* y secretarse a partir de la misma, de modo que permite la producción fácil de cantidades grandes de dichos fragmentos.

40 Los anticuerpos completos y los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> son "bivalentes". Por "bivalente", los inventores quieren decir que dichos anticuerpos y fragmentos F(ab')<sub>2</sub> tienen dos sitios de combinación antigénica. Por el contrario, los fragmentos Fab, Fv, ScFv y dAb son monovalentes y solo tienen un sitio de combinación antigénica.

45 Aunque el anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, se prefiere que sea un anticuerpo monoclonal. En algunas circunstancias, en particular si el anticuerpo va a administrarse varias veces a un paciente humano, se prefiere que el anticuerpo monoclonal sea un anticuerpo monoclonal humano o un anticuerpo monoclonal humanizado.

50 Los anticuerpos monoclonales adecuados se pueden preparar por técnicas conocidas, por ejemplo las divulgadas en "Monoclonal Antibodies; A manual of techniques", H Zola (CRC Press, 1988) y en "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Application", SGR Hurrell (CRC Press, 1982). Se pueden producir anticuerpos policlonales que sean poliespecíficos o mono-específicos. Se prefiere que sean mono-específicos.

Los anticuerpos quiméricos se tratan en Neuberger et al (1998, 8th International Biotechnology Symposium Part 2, 792-799).

55 Adecuadamente, los anticuerpos no humanos preparados pueden "humanizarse" de maneras conocidas, por ejemplo mediante la inserción de las regiones CDR de anticuerpos de ratón en el marco de anticuerpos humanos.

60 Los anticuerpos pueden ser anticuerpos humanos en el sentido de que tienen la secuencia de aminoácidos de anticuerpos humanos con especificidad para una de las proteínas identificadas en la Tabla 1, pero que se pueden preparar usando métodos conocidos en la técnica que no requieren la inmunización de seres humanos. Por ejemplo, se dispone de ratones transgénicos que contienen, en esencia, genes de inmunoglobulina humana (véase, Vaughan et al., 1998, Nature Biotechnol 16:535-539).

65 Por lo tanto, en una realización preferida de la invención, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno o variante del mismo se selecciona del grupo que consiste en fragmentos Fv, fragmentos similares a Fab, dominios variables individuales y anticuerpos de dominio.

Una realización preferida adicional de la invención es un uso en el que el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno o variante del mismo se ha humanizado.

5 Una realización adicional de la presente invención proporciona un uso de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos uno o dos, en los que el resto de unión es capaz de unirse selectivamente a una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína Sox11.

10 Preferentemente, el resto de unión es capaz de unirse selectivamente a una molécula de ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y/o variantes naturales de la misma.

Más preferentemente, el resto de unión comprende o consiste en una molécula de ácido nucleico. Incluso más preferentemente, el resto de unión comprende o consiste en una molécula de ADN. Ventajosamente, el resto de unión comprende o consiste en un fragmento de la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 2 (véase la figura 5), o un fragmento o una variante del mismo. Convenientemente en la invención, la molécula de ácido nucleico tiene de 5 a 100 nucleótidos de longitud. Más convenientemente, la molécula de ácido nucleico tiene de 15 a 35 nucleótidos de longitud. Más preferentemente, el resto de unión comprende un resto detectable.

20 Por "resto detectable", los inventores incluyen el significado de que la fracción es una que, si se encuentra en el sitio diana después de la administración del compuesto de la invención en un paciente, puede detectarse, normalmente de manera no invasiva desde el exterior del cuerpo y el sitio del objetivo situado. Por lo tanto, los compuestos de esta realización de la invención son útiles en la formación de imágenes y el diagnóstico.

25 Normalmente, el resto detectable es o comprende un átomo radioactivo que es útil en la obtención de imágenes. Entre los átomos radioactivos adecuados se incluyen  $^{99m}\text{Tc}$  y  $^{123}\text{I}$  para gammagrafías. Otros restos fácilmente detectables incluyen, por ejemplo, marcadores de espín para imagen por resonancia magnética (RMN) tales como  $^{123}\text{I}$  de nuevo,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{17}\text{O}$ , gadolinio, manganeso o hierro. Claramente, el compuesto de la invención debe tener suficiente de los isótopos atómicos apropiados para que la molécula sea fácilmente detectable.

30 El radio u otros marcadores pueden incorporarse en el compuesto de la invención de maneras conocidas. Por ejemplo, si el resto de unión es un polipéptido, se puede biosintetizar o se puede sintetizar mediante síntesis química de aminoácidos utilizando precursores de aminoácidos adecuados que implican, por ejemplo, flúor-19 en lugar de hidrógeno. Los marcadores tales como  $^{99m}\text{Tc}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{186}\text{Rh}$ ,  $^{188}\text{Rh}$  y  $^{111}\text{In}$  pueden, por ejemplo, unirse mediante residuos de cisteína en el resto de unión. El itrio-90 se puede unir a través de un residuo de lisina. El procedimiento IODOGEN (Fraker et al., 1978, Biochem. Biophys. Res. Comm. 80:49–57) se puede usar para incorporar  $^{123}\text{I}$ . La referencia ("Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy", J-F Chatal, CRC Press, 1989) describe otros procedimientos con detalle.

40 Por tanto, en una realización adicional de la invención, el átomo radiactivo se selecciona del grupo que consiste en tecnecio-99m, yodo-123, yodo-125, yodo-131, indio-111, flúor-19, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, fósforo-32, azufre-35, deuterio, tritio, renio-186, renio-188 e itrio-90.

Un tercer aspecto de la invención proporciona un método de detección de un linfoma en un individuo, comprendiendo el método:

- 45 (a) proporcionar una muestra de células del individuo; y  
(b) determinar la cantidad de proteína Sox11 y/o ARNm en la muestra de células.

en la que los niveles de proteína Sox11 y/o ARNm son indicativos del individuo que tiene LCM o LDCBG.

50 En una realización adicional, el linfoma es un linfoma difuso de células B grandes (LDCBG). Por ejemplo, el método puede ser para pronosticar el LDCBG.

Los expertos en la técnica apreciarán que los métodos del tercer aspecto de la invención se pueden realizar *in vivo* o *in vitro*.

55 En una realización, el método comprende la detección de la expresión Sox11 como un único biomarcador para el linfoma (como se ha tratado anteriormente).

60 Como alternativa, el resto de unión de la invención puede usarse en combinación con uno o más restos de unión para la detección adicional de uno o más biomarcadores adicionales para el linfoma. Por lo tanto, el resto de unión puede usarse en combinación con menos de 20 restos de unión adicionales, por ejemplo menos de 15, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 restos de unión adicionales

65 Preferentemente, la muestra de células que se va a analizar están en forma de una muestra de tejido. Más preferentemente, la muestra de células que se va a analizar comprende o consiste en células de ganglios linfáticos. Incluso más preferentemente, la cantidad de proteína Sox11 y/o ARNm en la muestra se realiza usando un resto de

unión como se ha descrito anteriormente.

5 Una realización adicional del tercer aspecto de la invención comprende comparar la cantidad de proteína Sox11 y/o ARNm en la muestra de células que se va a analizar con la cantidad de proteína Sox11 y/o ARNm en una muestra de control. Ventajosamente, la muestra de control es una muestra de control negativo que comprende o consiste en células B no cancerosas. Más ventajosamente, la muestra de control es una muestra de control positivo que comprende o consiste en células cancerosas. Convenientemente, las células cancerosas son células B.

10 Preferentemente, la muestra de control comprende células seleccionadas del grupo que consiste en células de linfoma de células del manto, células de linfoma/leucemia linfoblástica de células B precursoras, células de linfoma/leucemia linfocítica crónica (LLC), células de mieloma de células plasmáticas, linfoma de células B de la zona marginal extranodal de células de tipo de tejido linfoide asociado a la mucosa, células de linfoma folicular (LF), células de linfoma difuso de células B grandes (LDCBG), células de leucemia de células peludas (LCP) y células de linfoma de Burkitt.

15 Normalmente, la etapa (b) del tercer aspecto de la invención se realiza usando un método seleccionado del grupo que consiste en cribado en macromatriz, cribado en micromatriz, cribado en nanomatriz, PCR con transcripción inversa, PCR en tiempo real o PCR *in situ*.

20 Una realización adicional del tercer aspecto de la invención comprende la determinación de los niveles de CD23 y/o CD10 y/o la proteína BCL1 y/o CD5 y/o el ARNm en la muestra de las células que se van a analizar.

25 Un cuarto aspecto de la invención proporciona un método de obtención de imágenes de células de linfoma en el cuerpo de un individuo, comprendiendo el método administrar al individuo una cantidad eficaz de un resto de unión como se ha descrito anteriormente, en el que el linfoma es un linfoma de células del manto (LCM) o un linfoma difuso de células B grandes (LDCBG).

30 La expresión "cantidad eficaz, como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad que proporciona una señal suficientemente detectable para un régimen de administración determinado. Esta es una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir una fuerza de la señal deseada en asociación con el aditivo y diluyente requeridos, es decir, un soporte o vehículo de administración. Como apreciarán los expertos en la técnica, la cantidad de un compuesto puede variar en función de su actividad específica. Las cantidades de dosificación adecuadas pueden contener una cantidad predeterminada de la composición activa calculada para producir la fuerza de la señal deseada en asociación con el diluyente requerido. En los métodos y el uso para la fabricación de composiciones de la invención, se proporciona una cantidad eficaz del componente activo. Una cantidad eficaz puede determinarla el trabajador médico o veterinario experto ordinario basándose en las características del paciente, tales como la edad, el peso, el sexo, el estado, las complicaciones, otras enfermedades, etc., como es bien conocido en la técnica (véase el Ejemplo 8 a continuación).

40 Normalmente, el cuarto aspecto de la invención comprende la etapa de detectar la localización del resto unión en el individuo. Preferentemente la proteína Sox11 y/o el ARNm que codifica la misma se utiliza como marcador para células de linfoma de células del manto.

45 Un quinto aspecto de la invención proporciona el uso de un resto de unión como se ha definido anteriormente en la preparación de un medicamento para el diagnóstico o el pronóstico de linfoma de células del manto.

La invención proporciona adicionalmente el uso de proteína Sox11 y/o el ARNm que codifica la misma como un biomarcador para células de linfoma.

50 En una realización, el linfoma es un linfoma de células del manto (LCM).

En una realización adicional, el linfoma es un linfoma difuso de células B grandes (LDCBG).

55 Se apreciará que Sox11 se puede usar como un biomarcador único para el linfoma.

Alternativamente, Sox11 se puede usar en combinación con uno o más biomarcadores adicionales. Preferentemente, sin embargo, Sox11 se utiliza en combinación con menos de 20 biomarcadores adicionales, en el método se usan, por ejemplo, menos de 15, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 biomarcadores adicionales.

60 Un aspecto adicional de la invención proporciona un método de cribado de una molécula con eficacia en el diagnóstico y/o el pronóstico de un linfoma, comprendiendo el método las etapas de:

(a) poner en contacto una molécula que se va a analizar con la proteína Sox11 y/o el ARNm que codifica la misma (o con un fragmento de dicha proteína o ARNm); y

65

(b) detectar la presencia de un complejo que contiene la proteína y/o el ARNm (o fragmento de la misma) y la molécula que se va a analizar.

En una realización, el linfoma es un linfoma de células del manto (LCM).

5 En una realización adicional, el linfoma es un linfoma difuso de células B grandes (LDCBG).

Los expertos en la materia conocen bien los procedimientos de detección y/o medición de la concentración de proteína y/o ácido nucleico, véase por ejemplo Sambrook y Russell (citado anteriormente).

10 Métodos preferidos para la detección y/o medición de proteínas incluyen transferencia de tipo Western, transferencia de tipo North-Western, ensayos de inmunoabsorción (ELISA), micromatrices de anticuerpos, micromatrices de tejidos (TMA), inmunoprecipitación, hibridación *in situ* y otras técnicas de inmunohistoquímica, radioinmunoensayo (RIA), ensayos inmunoradiométricos (IRMA) y ensayos inmunoenzimáticos (IEMA), incluyendo ensayos de tipo sándwich usando anticuerpos monoclonales y/o policlonales. Ejemplos de ensayos de tipo sándwich se describen en David et al., en las patentes de EE.UU. n.º 4.376.110 y 4.486.530. La tinción de anticuerpos de las células en los portaobjetos se puede usar en procedimientos bien conocidos en las pruebas diagnósticas de laboratorio de citología, como conocen bien los expertos en la materia.

20 Normalmente, el ensayo ELISA implica el uso de enzimas que dan un producto de reacción coloreado, normalmente en ensayos de fase sólida. Las enzimas como la peroxidasa de rábano y la fosfatasa se han usado ampliamente. Un modo de amplificar la reacción de la fosfatasa es utilizar el NADP como sustrato para generar NAD, que ahora actúa como coenzima para un segundo sistema enzimático. La pirofosfatasa de *Escherichia coli* proporciona un buen conjugado porque la enzima no está presente en los tejidos, es estable y proporciona una buena reacción de color. También se pueden usar sistemas quimioluminiscentes basados en enzimas, tales como la luciferasa.

Con frecuencia se usa la conjugación con la vitamina biotina, ya que esto se puede detectar fácilmente mediante su reacción con avidina o estreptavidina unida a enzima a la que se une con gran especificidad y afinidad.

30 Los procedimientos preferidos para la detección y/o medición de ácido nucleico (p. ej., ARNm) incluyen transferencia de tipo Southern, transferencia de tipo Northern, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR), PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), nanomatrices, micromatrices, macromatrices, autorradiografía e hibridación *in situ*.

35 En una realización típica, la presencia de células de linfoma se detecta mediante detección de la proteína Sox11 y/o el ácido nucleico en los núcleos celulares. Preferentemente, los núcleos de las células de linfoma expresan la proteína Sox11 y/o el ácido nucleico en una cantidad relativamente alta, como se indica, por ejemplo, mediante tinción brillante de los núcleos durante el análisis de hibridación *in situ*. Característicamente, la expresión ausente o relativamente baja de la proteína Sox11 y/o el ácido nucleico de núcleos de células es indicativa de células que no son de linfoma.

De forma preferida, a continuación se describirán ejemplos no limitantes que abarcan ciertos aspectos de la invención con referencia a las siguientes figuras:

45 **Figura 1.** Un montaje de TMA de señales representativas de IHQ de Sox11 en cada categoría analizada incluye filas de centros germinales benignos de amígdalas (CG), linfoma folicular (LF, con el grado del tumor en la parte inferior derecha), leucemia linfática crónica/linfoma de células pequeñas (LLC) y linfoma de células del manto (incluyendo la variante blastoide en la tercera imagen de la izquierda). Cada sección en las tres primeras filas muestra tinción citoplásmica granular. Un único núcleo positivo en la segunda sección del LF es, probablemente, endotelial. En contraste, la mayoría de los núcleos de LCM expresan Sox11 con intensidad variable. Contratinción con hematoxilina, 185x

50 **Figura 2.** Análisis inmunohistoquímico de Sox11 de casos de LCM negativos para ciclina D1 que muestran tinción de un solo caso con alta frecuencia (22 %) de núcleos positivos para la translocación t(11;14) como se determina con el análisis FISH, mientras que el resto de los casos son negativos.

60 **Figura 3.** Se ilustra el nivel transcripcional promedio (valores en bruto a escala) de *SOX11* y *ciclina D1* para diferentes muestras de linfomas de células B primarios, líneas celulares de LCM y LF y material de referencia benigno de amígdalas y células B en sangre. Los genes están representados por dos (*ciclina D1*) o tres (*Sox11*) sondas diferentes sobre la matriz como se describe en materiales y métodos. El nivel de expresión de *SOX11* es, en promedio, 10-100 veces mayor para las líneas celulares de LCM, L-LCM y LCM que los otros casos, como es la expresión de *ciclina D1*. con la excepción de LCP, que también expresan *ciclina D1*.

65 **Figura 4.** Secuencia de aminoácidos de la proteína Sox11 de *Homo sapiens*.

**Figura 5.** Secuencia de ácido nucleico del ARNm de *SOX11* de *Homo sapiens*.

**Figura 6.** Tiempo de supervivencia para los pacientes con LDCBG con niveles altos o bajos niveles de Sox11.

**Figura 7.** Tiempo hasta la recaída para los pacientes con LDCBG con niveles altos o bajos niveles de Sox11.

5 **Ejemplos**

**Ejemplo A: Linfoma de células del manto**

Materiales y métodos

10 *Análisis de inmunohistoquímica*

15 **Sox-11.** La expresión de Sox11 se investigó mediante análisis inmunohistoquímico (IHQ) de diferentes tipos de linfomas de células B y tejidos de control no malignos (véase la Tabla 1-4). Brevemente, secciones de tejido en parafina de 2-4 µm de diferentes subtipos de linfoma o leucemia, así como células B benignas (Department of Pathology, Lund University Hospital archives or Division of Pathology, Malmö University Hospital) se desparafinizaron y se rehidrataron. Una cámara de destape eléctrico se utilizó para la recuperación de antígenos, las secciones se sumergieron en BORGdecloaker (Biocare, Concord, CA, USA) a pH 9,0 y después se tiñeron con un anticuerpo primario de conejo anti-Sox11 humana (1/100) a temperatura ambiente durante 25 minutos. El anticuerpo está dirigido a la siguiente secuencia proteica:

FMVWSKIERRKIMEQSPDMHNAEISKRLGKRWKMLKDSEKIPFIREA  
 ERLRLKHMADYDPDYKYRPRKPKMDPSAKPSASQSPEKSAAGGGG  
 GSAGGGAGGAKTSKGSSKK

**[SEQ ID NO: 3]**

25 y se produjo mediante el proyecto-HPR como se ha descrito anteriormente (Ek et al., 2006, Mol Cell Proteomics., 5:1072–1081; Agaton et al., 2003, Mol Cell Proteomics., 2:405–414). Las señales se detectaron usando el sistema de detección de Dako REAL, que contiene el anticuerpo secundario biotinilado de cabra anti-conejo/ratón, el complejo de estreptavidina/peroxidasa/rábano picante como sustrato y 3,3'-diaminobenzidina, según el protocolo del fabricante. Los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina Mayers (Sigma-Aldrich).

30 **Ciclina D1.** Para la determinación IHQ de la ciclina D1 (CCND1), las secciones se sometieron a microondas en tampón de EDTA para la recuperación del antígeno y se inmunotiñeron como se ha indicado anteriormente utilizando un anticuerpo monoclonal anti-CCND1 de conejo altamente sensible de conejo (NeoMarkers, EE.UU.) una dilución de 1:100 (Cheuk et al, 2004, Am J Surg Pathol., 28: 801- 807) para las secciones completas y anticuerpo monoclonal anti-CCND1 de ratón diluido 1:50 (Clon DSC-6, DAKO a/S, Dinamarca) para las secciones de micromatrices de tejidos.

*Micromatriz de tejido*

40 La expresión de SOX11 también se analizó en un TMA que contiene una mezcla de los linfomas derivados de células B diagnosticados en el Department of Pathology, Malmö University Hospital. Después de la reevaluación histopatológica, incluyendo los perfiles inmunohistoquímicos con un panel estándar de diagnóstico de anticuerpos (Bcl-2, Bcl-6, CD3, CD5, CD10, CD23, CD30, CD79, Ciclina D1), se seleccionaron 10 casos de LCM, 27 casos de LLC, 27 casos de LF y 30 casos de LDCBG para la construcción de TMA. Las amígdalas a partir de 3 individuos sanos se utilizaron como tejido de referencia. Las áreas tumorales representativas, no necróticas se marcaron en secciones de H & E teñidas dos núcleos de tejido de 1,00 mm se retiraron a continuación de cada bloque de parafina correspondiente y se montan en un nuevo bloque receptor usando un dispositivo automatizado (ATA-27, Beecher Inc., Wisconsin, EE.UU.).

*Análisis por PCR*

50 Se eliminó la identificación de todo el material biológico y se usó de acuerdo con los principios éticos de investigación establecidas para la institución de los inventores. En cuatro " muestras de LCM-CCND1 crioconservadas se utilizó un molde de ADN en una PCR con un conjunto de cebadores para detectar ~40 % de las fusiones BCL1/IGH resultantes de t(11;14) (q13; q32), característica del LCM (van Dongen et al, 2003, Leukemia, 17: 2257-2317).

*Análisis qRT-PCR de la ciclina D1*

60 El tejido de las anteriores cuatro muestras se alteró y se extrajo el ARN en un tampón de isotiocianato de guanidinio, se aisló en una membrana de gel de silicio (Qiagen RNeasy®) y se trató con DNasa I. La síntesis de ADNc utilizó hexámeros aleatorios (Invitrogen), 1x tampón de RT, mezcla de, 0,5 mM/dNTP y 4 unidades de transcriptasa inversa

(todo de Omniscript<sup>®</sup>, Qiagen), más 20 unidades de inhibidor de RNasa (Invitrogen). Los inventores usaron un ensayo de 5' nucleasa fluorogénico para determinar los valores de  $C_{T_{au}}$  en un software de ciclado con termociclador Rotorgene, versión de software 6 (Corbett Research). TBP, TBP, que codifica una proteína de unión a la caja TATA en el complejo TFIIID con la participación de la ARN polimerasa II se ha validado previamente como un gen de referencia en linfocitos y su expresión es relativamente estable; el producto PDD (73 pb) se extendió por dos intrones de 2,3 kpb y el producto CCND1 (70 pb) abarcó un solo intrón (1,4 kpb). Cada conjunto de cebadores se realizó en reacciones separadas y cada muestra se realizó por triplicado. Cada ejecución también tenía la línea celular 519 Granta ADNc como control positivo, un control negativo de agua y dos controles que no son molde utilizando RNA tratado con DNasa I, que no se había sometido a transcripción inversa,

La mezcla de reacción CCND1 contenía en un volumen final de 25  $\mu$ l: TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix, No AmpErase<sup>®</sup> UNG, 12,5  $\mu$ l (Applied Biosystems), cebador directo CCND1 0,9  $\mu$ M, 0,3  $\mu$ M de cebador inverso, sonda 0,2  $\mu$ M y 2  $\mu$ l de ADNc. Para TBP, ambos cebadores estaban en 0,3  $\mu$ M. Condiciones de los ciclos fueron 95 °C durante 10 minutos, seguido de 50 ciclos a 95 °C/15 s e renaturalización a 60 °C/1 min.

Las expresiones génicas se calcularon para determinar el aumento de los valores de  $C_T$  de CCND1 normalizados relativos a un llamado calibrador, en este caso un ganglio benigno, utilizando las fórmulas (Livak y Schmittgen, 2001, Métodos, 25: 402-408):

$\Delta C_T = (C_{T,CCND1} - C_{T,TBP})$  donde  $\Delta C_T$  es la diferencia entre los números de ciclo umbral de la diana y los genes de referencia genes a los que la concentración de los amplicones diana alcanza un nivel fijo; y

$-\Delta\Delta C_T = -(\Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,Cb})$  donde  $-\Delta\Delta C_T$  es la diferencia en la ecuación anterior para cualquier muestra q en comparación con el calibrador, cb. La validez de este método se confirmó en un conjunto más amplio de LCM en el que los cambios del ARNm correspondían a la expresión del gen CCND1 (datos no mostrados, manuscrito presentado).

#### FISH

El análisis de hibridación de fluorescencia *in situ* (FISH) se utilizó para identificar los casos con la translocación t(11; 14). Con el fin de evitar artefactos asociados al corte (Ventura et al., 2006, J Mol Diagn., 8:141-151), los inventores aislaron los núcleos enteros de secciones de parafina de 40  $\mu$ m de espesor desparafinadas en xileno y, después, hidratadas. Las muestras fueron digeridas en 4 mg/ml de pepsina (Sigma P7012, 0,9 % De NaCl, pH 1,5), se pasaron a través de un filtro de nylon red 41  $\mu$ m, se sedimentaron, se suspendieron en PBS, se lavaron y se extendieron sobre un portaobjetos ThinPrep (Cytoc, EE.UU), que se secó 1 hora, se fijó en fijador de Carnoy (3:1 metanol: ácido acético) 10 minutos y se secó al aire durante 1 hora.

**Prehibridación.** Los portaobjetos se colocaron en PBS con 0,1 % de Triton-100 durante 2 minutos, se aclararon, se digirieron en 0,3 mg/ml de pronasa (Roche, Alemania) en Tris 50 mM/HCl, 5 mM EDTA, a pH 7,6 durante 5 minutos, se deshidrataron en etanol y se secaron al aire.

**Hibridación.** Se preparó la sonda LSI<sup>®</sup> IGH/CCND1 XT de color doble de translocación de fusión doble (Vysis, Downers Grove, EE.UU.) marcada con SpectrumOrange (CCND1) y SpectrumGreen (IGH) y se hibridó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Esta sonda se hibrida con ambos genes diana y sus secuencias flanqueantes, lo que permite la visualización de los cromosomas derivados en t(11;14) (q13; q32) como señales de fusión de color amarillo separadas.

**Posthibridación.** Se retiró el cubreobjetos se retiró y el portaobjetos se enjuagó en SSC (NaCl 299 mM, citrato de sodio 30 mM, pH 7,0 con 50 % de formamida) en un baño de agua a 45 °C durante 1 minuto. Después, el portaobjetos se trató con 2 x SSC, 1 min a TA aclarado con 2 x SSC/0,1 % de NP-40, 2 x 1 min a TA. Después de secar al aire durante 10 minutos, el portaobjetos se recubrió con 10  $\mu$ l de DAPI II (125 ng/ml de 4, 6-diamidino-2-fenilindol en 1, 4-fenilendiamina, Vysis Inc.), se cubrió y se miró en un microscopio Olympus BX-40 de epifluorescencia equipado con una lámpara de 100 W y un filtro con un paso de banda doble rojo-verde (588 nm/538 nm).

**Puntuación.** Para cada espécimen se puntuaron 50 núcleos para determinar la serie de señales de fusión utilizando un valor de corte de 2 % basado en los recuentos de de fusión en 350 núcleos totales que no están en ganglios no-LCM.

#### Análisis del ARNm de Sox11 y ciclina D1

Todos los linfomas de células B y las muestras de referencia se purificaron mediante citometría de flujo de células asistida por citometría y el ARN aislado se usó en Affymetrix U133 Plus 2.0 como se ha descrito anteriormente (véase Andreasson et al., 2008, Cancer Lett. 259(2): 138-45). Los conjuntos de sondas para los genes SOX11 es 204913\_s\_at, 204914\_s\_at y 204915\_s\_at. La ciclina D1 está representada por 208711\_s\_at y 208712\_at. El valor de los distintos conjuntos de sondas se muestra en la Figura 3 en el orden mencionado.

Resultados

En este estudio, se ha investigado a Sox11 como antígeno potencial para el diagnóstico diferencial de los linfomas de células B. Se usó material de archivo de diagnóstico incluido en parafina para evaluar la expresión de Sox11 en diversas entidades de linfomas de células B y material de referencia. Curiosamente, tanto las secciones de tejido de LCM (17/18, Tabla 1 y 2) como TMA de LCM (9/10, Tabla 3) mostraron tinción nuclear de Sox11, mientras que otros linfomas generalmente fueron negativos o mostraron tinción citoplásmica. Una visión general de los resultados del análisis inmunohistoquímico se muestra en la Figura 1.

10 *Análisis inmunohistoquímico*

**Tinción IHQ de Sox-11 de secciones de tejido entero de linfomas de células B y material de referencia de amígdalas.** La tinción para Sox11 en secciones de tejidos enteros de LCM dio lugar a la tinción nuclear de la mayoría de los casos (17/18, Tabla 1 y 2). Para la mayoría de estos casos positivos, la tinción nuclear era brillante y se encontró en la mayoría de las células tumorales (14/17), mientras que tres casos mostraron un menor número de núcleos positivos, pero tenía una tinción citoplásmica distinta de la mayoría de las células tumorales (Figura 1). El análisis de secciones de tejido enteras de linfoma folicular (LF), leucemia/linfoma linfocítico crónico (LLC) y el material de referencia mostraron que para el LF, 15/20 casos fueron negativos y los cinco casos restantes mostraron tinción citoplásmica de Sox11, las de LLC fueron negativos en 18/20 casos y mostraron tinción citoplásmica en los dos restantes y, por último, el material de referencia de amígdalas no mostraron tinción citoplásmica en 2/4 de los casos, respectivamente. La tinción citoplásmica de los diversos linfomas se distinguió fácilmente de la tinción nuclear brillante de la mayoría de los LCM.

**Tinción IHQ de Sox11 de micromatrices de tejidos de linfomas de células B y material de referencia de amígdalas.** Las micromatrices de tejido de LCM, CLL, LF, LDCBG (linfoma difuso de células grandes B) y el material de amígdalas de referencia también se analizaron (tabla 3 y figura 1). El LCM mostró tinción nuclear positiva de Sox11 en 9/10 casos y tinción citoplásmica en 1/10 casos. Las secciones de LLC no mostraron tinción en la mayoría de los casos (19/27) y tinción citoplásmica de Sox11 en ocho casos. El LF mostró resultados similares en los casos 22/27 mostraron ninguna tinción y los cinco casos restantes mostraron tinción citoplásmica. Como el LLC y el LF, el LDCBG fueron negativos en la mayoría de los casos (17/30) y mostraron tinción citoplásmica de Sox11 en diez casos. Por otra parte, algunos casos de LDCBG (3/30) mostraron una tinción nuclear débil y difusa, claramente distinta de la tinción nuclear brillante del LCM. Las secciones de tejido de amígdalas se utilizaron como material de referencia y 2/3 de los casos en el TMA no mostraron tinción mientras que un solo caso mostró tinción citoplásmica de Sox11 en las células que pueblan el folículo de células B. En todos los casos de material de amígdalas referencia, se observó una fuerte tinción nuclear de células epiteliales

**Tinción de IHQ de Sox11 de los casos de LCM negativos para ciclina D1.** La tinción de Sox11 se analizó en cuatro casos de LCM negativo para ciclina D1 (Figura 2). Estos casos habían sido diagnosticados según las características morfológicas (tres casos), ya que no hubo detección de ninguno de transcrito de ciclina D1, proteína ciclina D1 o transcrito de BCL1/G. Además, tres de los cuatro casos mostraron ninguna o muy baja frecuencia de translocación de ciclina D1 (t(11;14)), tal como se evaluó mediante análisis FISH, mientras que un solo caso mostró signo de t(11; 14) en el 22 % de los núcleo analizados.

Sox11 fue negativa o mostró una débil tinción citoplásmicas para la mayoría de los casos, pero se observó una tinción nuclear brillante para el caso de LCM negativo para ciclina D1 con una frecuencia elevada de de t(11;14).

**Tinción IHQ de Sox11 de varios materiales de referencia.** Para investigar más ampliamente la expresión de Sox11 en diferentes tejidos humanos se usó un TMA centrado en el material no maligno (Tabla 4). La tinción nuclear de Sox11 solo se observó en los queratinocitos y células escamosas, mientras que todos los otros tejidos incluyendo la médula ósea y el cerebro, tenían células con núcleo negativo. Sin embargo, varios tipos de células y tejidos mostraron tinción citoplásmica para Sox11, incluyendo los enterocitos, hepatocitos, así como células en el páncreas y la próstata.

**Niveles de ARNm de SOX11 y CCND1/BCL1 en varios linfomas de células B y las muestras de referencia.** El nivel de ARNm de SOX11 y CCND1/BCL1 se evaluó utilizando un material de diferentes linfomas de células B y muestras de referencia se pasado por matrices Affymetrix U133 Plus 2.0 (Figura 3). El nivel transcripcional SOX11 es 10-100 veces mayor para las muestras de LCM en comparación con la mayoría de los demás linfomas de células B (Figura 3). No solo los LCM primarios mostraron una elevada expresión de SOX11 sino que también se observaron niveles elevados en las muestras de LCM leucémico (L-LCM) y líneas celulares de LCM. Algunas muestras de LDCBG también muestran niveles elevados ARNm de SOX11, como representa un valor promedio aumentado, que se correlaciona bien con la variación que se observa en el nivel de proteínas utilizando el análisis de IHQ.

Los niveles del transcrito de CCND1/BCL1 fueron tan elevados como se esperaba en todos los tipos de muestras de LCM, incluyendo el LCM ganglionar y leucémico, y también en las muestras de leucemia de células peludas (LCP).

**Tabla 1.** Tinción IHQ de Sox11 y ciclina D1 en secciones de tejido entero de LCM

Entidad	ID del caso	Sox11	Descripción	Ciclina D1	t(11;14)*
LCM	1	Positivo	tinción nuclear	Positivo	Positivo
LCM-VB	2	Positivo	Fuerte tinción nuclear	Positivo	Positivo
LCM	3	Positivo	Tinción positiva y tinción citoplásmica localizada	Positivo	n.d.
LCM	4	Algunas células nucleares positivas	Tinción citoplásmica y débil tinción nuclear en una fracción de las células tumorales	Positivo	n.d.
LCM	5	Positivo	tinción nuclear	Positivo	Positivo
LCM-VB	6	Negativa	Negativo, algo de fondo	Positivo	Positivo
LCM	7	Positivo	Fuerte tinción nuclear	Positivo	n.d.
LCM	8	Algunas células positivas	Tinción citoplásmica y tinción nuclear granular en una fracción de las células tumorales	Positivo	n.d.
LCM-FP	9	Positivo	Fuerte tinción nuclear	Positivo	n.d.
LCM	10	Positivo	Tinción nuclear y tinción citoplásmica localizada	Positivo	n.d.
LCM	11	Positivo	Fuerte tinción nuclear	Positivo	n.d.
LCM	12	Positivo	tinción nuclear	Positivo	n.d.
LCM	13	Positivo	Fuerte tinción nuclear	Positivo	n.d.
LCM	14	Positivo	tinción nuclear	Positivo	n.d.
LCM	15	Positivo	tinción nuclear	Positivo	n.d.
LCM	16	Positivo	Fuerte tinción nuclear	Positivo	n.d.
LCM	17	Positivo	tinción nuclear	Positivo	n.d.
LCM	18	Algunas células nucleares positivas	Tinción citoplásmica y tinción nuclear granular en una fracción de las células tumorales	Positivo	n.d.

LCM-VB, LCM con variante blastoide; LCM-FP, LCM con tipo pleomorfo, n.d., no determinado  
La translocación t(11;14) se evaluó usando FISH

**Tabla 2.** Resumen de las tinciones IHQ de Sox11 en secciones de tejido enteras de linfomas de células B y material de referencia de amígdalas

Entidad	Número de casos	Sin tinción	Tinción citoplásmica y débil tinción nuclear	Tinción nuclear
LCM	18	1	3	17
LLC	20	18	2	0
LF	20	15	5	0
Amígdala-CG	4	2	2	0

5

**Tabla 3.** Resumen de las tinciones IHQ de Sox11 en secciones TMA de linfomas de células B y material de referencia de amígdalas.

Entidad	Número de casos*	Sin tinción	Tinción citoplásmica	Tinción nuclear
LCM**	10		1	9 (fuerte)
LLC	27	19	8	0
LF	27	22	5	0
LDCBG	30	17	11	2 (débil o moderada)
amígdala	3	2	1	0

\*todos los casos se realizaron por duplicado

\*\* un caso de LCM se diagnosticó inicialmente como LDCBG pero cambió a LCM según las tinciones inmunohistoquímicas que mostraban positividad para ciclina D1/CD5 y negatividad para CD10/bcl-6.

**Tabla 4.** Resumen de las tinciones IHQ de Sox11 en secciones de TMA secciones de diversos tejidos.

Tipo de célula	Órgano	Nuclear	Tinción IHQ Citoplásmica
Schwann	Nervio periférico	Positiva	Negativa
Queratinocito	Piel	Positiva	Positiva
Escamoso	Amígdalas	Positiva	Negativa
Epitelio	Bronquio	Positiva disperso	Positiva
Epitelio folicular	Tiroideo	Occ. débil positivo	Positiva
Enterocito	Apéndice	Negativa	Positiva
	Colon	Negativa	Positiva
Hematopoyético	Médula ósea	Negativa	Negativa
Corteza cerebral	Cerebro adulto	Negativa	Negativa
Epitelio acinar	Mama	Negativa	Negativa
	Páncreas	Negativa	Positiva
	Próstata	Negativa	Positiva

Hepatocito	Hígado	Negativa	Positiva
Túbulo renal	Riñón	Negativa	Positiva
Glomérulos		Negativa	Negativa
Melanoma	Piel	Negativa	Positiva
Músculo esquelético		Negativa	Negativa
Trofoblasto	Placenta	Negativa	Negativa
Músculo liso	Útero	Negativa	Positiva

### Discusión

5 En el presente documento, los inventores presentan el nuevo hallazgo de que el factor de transcripción que no es de linaje de células B Sox11 se expresa específicamente en el LCM en comparación con otros linfomas de células B y con tejido no maligno (Tablas 1-4 y la Figuras 1-3).

10 Sox11 normalmente se expresa en todo el sistema nervioso central en el embrión humano y, por lo tanto, parece tener un papel en el sistema nervioso en desarrollo (Cheung et al., 2000, Brain Res Mol Brain Res., 79:180–191). El análisis Q-RT-PCR no solo ha confirmado la expresión en el cerebro fetal, sino que también mostró sobreexpresión de Sox11 en gliomas malignos en comparación con el cerebro adulto normal y otros órganos (Weigle Weigle et al., 2005, Oncol Rep., 13:139–144).

15 En contraste, se ha demostrado que muchos tejidos adultos, por ejemplo, bazo, timo, próstata, testículo, ovarios, intestino delgado, colon, sangre periférica, leucocitos, corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñón y páncreas, son negativos para el ARNm de Sox11 (Jay et al., 1995, Genomics., 29:541–545). La falta de expresión en el cerebro y los leucocitos adultos se correlaciona con los resultados de los inventores, pero, frente al estudio realizado con el ARNm, inventores detectaron tinción citoplásmica de la proteína Sox11 en riñón, hígado, pulmón y páncreas (Tabla 4).

20 La función de Sox11 y de muchos de los otros miembros de la superfamilia de la caja HMG de Sox no está clara (Wegner M et al., 1999, Nucleic Acids Res., 27:1409–1420). Se ha descubierto que los dominios HMG de Sox se unen a la secuencia de consenso 5'-(A/T)(A/T)CAA(A/T)G-3' en el surco menor del ADN (Harley VR, 1994, Nucleic Acids Res., 22:1500–1501) e inducen un cambio conformacional grande en el ADN (Werner et al., 1995, Cell, 81:705–714). Se ha sugerido que la función de las proteínas Sox es, al menos en parte, arquitectónica, permitiendo que otros factores de transcripción se unan al surco mayor y/o juntando elementos reguladores y facilitando de este modo la formación de complejos de proteínas (Dong et al., 2004, Cytogenet Genome Res. 105:442–447).

30 Además, se ha descubierto que Sox11 tiene, de manera similar, otros factores de transcripción, que tienen una región autoinhibidora que reprime la capacidad de unión del ADN y reduce la activación de genes *in vivo* (Wiebe et al., 2003, J Biol Chem. 278:17901–17911). Es probable que la unión al ADN se permita al neutralizar el dominio de autoinhibición a través de una modificación postraduccional y/o interacciones directas con proteínas asociadas mediante unión específica (Wiebe et al., 2003, J Biol Chem. 278:17901–17911).

35 Existe un creciente apoyo a un modelo en el que el dominio HMG sirve para dos funciones, (i) unión al ADN y (ii) la selección de parejas, que puede permitir el reclutamiento selectivo de proteínas sox individuales a genes específicos. Entre otras, la función de Sox11 y Sox2 y su interacción con dos proteínas Pit-Oct-Unc (POU), Oct-3 y Brn-2 se ha estudiado en el sistema humano. Se demostró que ambas proteínas cooperaron con Oct-3, mientras que solo Sox11 se podía asociar a Brn-2 para activar la transcripción (Wiebe et al., 2003, J Biol Chem. 278:17901–17911). Previamente se ha demostrado que Brn-2 está implicada en la proliferación de células tumorales de melanoma y puede, como ciclina D1, ser inducida por la vía de WNT/Beta-catenina (Larue y Delmas, 2006, Front Biosci., 11:733–742).

45 Curiosamente, se ha demostrado que uno de los otros miembros de la familia Sox, Sox6, suprime la actividad del promotor de la ciclina D1 mediante la interacción con Beta-catenina (Iguchi et al., 2007, J Biol Chem.), de modo que se ilustra la compleja regulación de los genes. En consecuencia, la expresión y el uso de proteínas sox individuales pueden estimular específicamente la actividad de determinados factores de transcripción, como las proteínas POU, y, por lo tanto, influir en las funciones celulares vitales. Ya se ha demostrado que Oct-2, que es un factor de transcripción de POU, actúa como un factor de supervivencia celular en células de linfoma que albergan la translocación t(14;18), mediante activación directa del gen antiapoptótico bcl-2 (Heckman et al., 2006, Oncogene., 25:888–898). Aunque esto no se ha asociado a la activación de Sox, indica el efecto que podría tener la activación de la proteína POU inducida por Sox.

55 Se han realizado más estudios funcionales en el sistema murino y se ha demostrado usando cultivos de células primarias y continuos que la supervivencia de las neuronas y el crecimiento de las neuritas depende de Sox11 (Jankowski et al., 2006, Neuroscience, 143:501–514). Su papel en la remodelación tisular también se ha estudiado en un modelo de ratón defectivo que muestra diversas malformaciones, lo que indica que Sox11 es importante para la remodelación de tejidos y que Sox11 mutada en seres humanos potencialmente puede corresponder a síndromes de malformaciones (Sock et al., 2004, Mol Cell Biol., 24:6635–6644). Además, se demostró mediante el uso de

deficiencia de ARNip en una línea celular de neuroblastoma y en neuronas cultivadas de ganglios de la raíz dorsal de ratón dorsales que la deficiencia de Sox11 modulaba el nivel de ARNm que codifican varios genes relacionados con la supervivencia y la muerte celular, por ejemplo, aumento de la expresión del gen proapoptótico BNIP3 y disminución de la expresión del gen antiapoptótico TANK (activador de NFκB asociado al miembro de la familia del factor asociado al receptor de TNF) (Jankowski et al., 2006, Neuroscience, 143:501–514).

Por lo tanto, aunque la función en el sistema humano no está clara, se puede hipotetizar que la sobreexpresión de Sox11 en el LCM puede conducir a la regulación aberrante de los genes implicados en la supervivencia y/o la muerte celular. Esto se ve apoyado por el hecho de que se ha demostrado que muchos de los genes de Sox estar involucrados en diferentes tipos de cáncer, tal como revisaron Dong *et al.* (Dong et al., 2004, Cytogenet Genome Res. 105:442–447) Sox4, que es altamente homóloga a Sox11, se ha identificado como un regulador potencial del oncogén de cáncer de mama humano, HER2/neu (c-ErbB2) (Chang et al, 1997, Oncogene, 14: 1617-1622) y tanto Sox4 como Sox11 se expresan fuertemente en la mayoría de los meduloblastomas, oligodendrogliomas anaplásicos y glioblastomas.

En este estudio, los inventores muestran que Sox11 también se sobreexpresa específicamente en el LCM comparación, no solo con el tejido benigno, sino también con otros linfomas de células B, tanto a nivel de ARNm (Figura 3) como a nivel de proteínas (Figura 1 y Tablas 1- 3). El análisis del ARNm de los diferentes tumores malignos muestra, como se esperaba, una elevada sobreexpresión de ciclina D1 en el LCM y la LCP, pero más sorprendentemente también una sobreexpresión > 100x de Sox11 en el LCM en comparación con los otros tejidos (Figura 3). La sobreexpresión de Sox11 fue, en muchos casos, no solo cuantitativa, sino también cualitativa, dado que la mayoría de los casos no LCM no mostraron expresión del transcrito. Además, el uso de Sox11 no estaba limitado al LCM ganglionar primario, sino también las líneas de células LCM-L y LCM expresaron el transcrito a niveles altos (Figura 3).

A nivel de proteína, el LCM positivo para ciclina D1 mostró tinción nuclear de Sox11 en el 93 % (26/28) de los casos y, en la mayoría de los casos, era brillante, mientras que unos pocos casos (3/28) mostraron tinción nuclear más débil y menos frecuente, como se muestra en la Figura 1. No se observaron casos de tinción nuclear brillante para LDCBG, LF, LLC o material de amígdalas de referencia, aunque alguno de los casos mostró tinción citoplasmática, como se muestra en la Figura 1.

La localización citoplásmica de Sox11 detectada en algunos de los casos no se puede explicar. Las señales de localización nuclear se conservan entre todas las proteínas Sox (Poulat et al., 1995, J Cell Biol., 128:737–748; Sudbeck y Scherer, 1997, J Biol Chem., 272:27848–27852) y aunque se ha encontrado una señal de exportación nuclear dentro del grupo de las proteínas E sox (Sox8-10), (Gasca et al., 2002, Proc Natl Acad Sci USA, 99:11199–11204; Rehberg et al., 2002, Mol Cell Biol., 22:5826–5834) aún no se ha demostrado para Sox11. Curiosamente, las proteínas con secuencias nucleares tanto de importación como de exportación nuclear se desplazarán continuamente entre el citoplasma y el núcleo (Wegner, 2005, Cell Res., 18:74–85) y para Sox10 se ha demostrado que esto es esencial para la función de la proteína (Rehberg et al., 2002, Mol Cell Biol., 22:5826–5834).

Para probar también el potencial diagnóstico de Sox11 para los LCM que carecen de la expresión de la proteína ciclina D1 característica, se analizaron cuatro casos de LCM negativos para ciclina D1. Sox11 solo mostró tinción en el caso con un alto número de núcleos positivos para la translocación. Esto sugiere que Sox11 puede ser útil en la IHQ de rutina para identificar los LCM positivos y negativos para ciclina D1.

Los criterios actuales para el diagnóstico de LCM se basan en las directrices de la Organización Mundial de la Salud que indican que el diagnóstico de LCM se basa en el examen morfológico y el inmunofenotipo, con demostración de sobreexpresión de la proteína ciclina D1 y/o la translocación t(11;14) q13;q32 (Harris et al., 2000, Mod Pathol., 13:193–207). Esta definición se basa en el hecho de que el LCM negativo para ciclina D1, que se diagnosticó basándose en el examen morfológico y fenotípico, tiene una mejor supervivencia significativa que el LCM positivo para ciclina D1, de modo que define una entidad distinta (Yatabe et al., 2000, Blood., 95:2253–2261). Sin embargo, últimamente, otros han demostrado que hay casos que carecen tanto de la translocación t(11;14) como de la proteína ciclina D1, pero que todavía tienen un perfil de expresión génica similar a los LC clásicos positivos para ciclina D1 LCM y deberá considerarse que estos pertenecen a la entidad LCM (Fu K et al., 2005, Blood. 106:4315–4321).

Los resultados de los inventores apoyan la definición actual de que un diagnóstico válido de LCM debe incluir la proteína ciclina D1 o la translocación t(11;14). A partir de los resultados de los inventores, también está claro que no hay co-regulación general de la ciclina D1 y el ARNm de Sox11, ya que la LCP que expresa ciclina D1 carece de expresión de Sox11. Sin embargo, la LCP expresan ciclina D1 independiente de reordenamientos cromosómicos (de Boer et al. 1996, Ann Oncol. 7:251–256), lo que podría sugerir que la sobreexpresión de Sox11 en el LCM se correlaciona con la translocación t(11;14).

En resumen, en este estudio, los inventores presentan el hallazgo novedoso de que Sox11 se expresa específicamente en el núcleo de LCM, mientras que otros linfomas de células B no muestran tinción ni tinción citoplasmática. Por lo tanto, Sox11 no solo muestra un gran potencial para el uso como diagnóstico, como un fuerte

complemento a la ciclina D1, para el diagnóstico específico de los LCM negativos y positivos para ciclina D1, sino que también indica un papel funcional importante para este antígeno en la supervivencia y/o transformación de células tumorales de LCM.

**Ejemplo B: Linfoma difuso de células B grandes**

5 Este estudio demuestra que la tinción citoplasmática de Sox-11 se correlaciona con la supervivencia y el tiempo hasta la recaída en el linfoma difuso de células B grandes.

10 En el presente estudio, se seleccionaron 153 pacientes para el análisis de la correlación de la expresión de Sox-11 con la supervivencia global y el tiempo hasta la recaída. Todas las tinciones con anti-Sox-11 se llevaron a cabo por triplicado en los núcleos de cada paciente, montadas como micromatrices de tejidos. La tinción se evaluó tanto manualmente, como también mediante una evaluación automatizada de la zona de la sección que se tiñó positivamente para Sox-11. Todas las tinciones fueron tinciones citoplásmicas, mientras que casi no se observaron tinciones nucleares para el LDCBG (151/153 negativos para la tinción nuclear), que es todo lo contrario al LCM, como los inventores han descrito anteriormente (Ek et al., 2008, Blood 111, 800–805). El punto de corte para la tinción positiva se fijó a 5 % de la superficie total del tejido. 35 pacientes fueron designados como niveles elevados de Sox-11 y este grupo se comparó con el grupo de niveles bajos de Sox11 o negativos. El análisis mostró que tanto la supervivencia global (Figura 6) como el tiempo hasta la recaída (Figura 7) eran significativa mejores ( $p < 0,05$ ) para el grupo de niveles altos de Sox-11 en comparación con el grupo de niveles bajos de Sox11 o negativos.

20 En resumen, la tinción citoplasmática de Sox-11 se correlaciona positivamente con la supervivencia y el tiempo hasta la recaída en el LDCBG.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 25 <110> Carl Borrebaeck  
<120> Diagnóstico y formación de imágenes de enfermedades
- 30 <130> BORBA/P40742PC  
<150> GB 0709092.1  
<151> 11-05-2007
- 35 <160> 3  
<170> SeqWin99
- 40 <210> 1  
<211> 441  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*
- <400> 1

ES 2 604 763 T3

Met Val Gln Gln Ala Glu Ser Leu Glu Ala Glu Ser Asn Leu Pro Arg  
 1 5 10 15  
 Glu Ala Leu Asp Thr Glu Glu Gly Glu Phe Met Ala Cys Ser Pro Val  
 20 25 30  
 Ala Leu Asp Glu Ser Asp Pro Asp Trp Cys Lys Thr Ala Ser Gly His  
 35 40 45  
 Ile Lys Arg Pro Met Asn Ala Phe Met Val Trp Ser Lys Ile Glu Arg  
 50 55 60  
 Arg Lys Ile Met Glu Gln Ser Pro Asp Met His Asn Ala Glu Ile Ser  
 65 70 75 80  
 Lys Arg Leu Gly Lys Arg Trp Lys Met Leu Lys Asp Ser Glu Lys Ile  
 85 90 95  
 Pro Phe Ile Arg Glu Ala Glu Arg Leu Arg Leu Lys His Met Ala Asp  
 100 105 110  
 Tyr Pro Asp Tyr Lys Tyr Arg Pro Arg Lys Lys Pro Lys Met Asp Pro  
 115 120 125  
 Ser Ala Lys Pro Ser Ala Ser Gln Ser Pro Glu Lys Ser Ala Ala Gly  
 130 135 140  
 Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gly Gly Gly Ala Gly Gly Ala Lys Thr Ser  
 145 150 155 160  
 Lys Gly Ser Ser Lys Lys Cys Gly Lys Leu Lys Ala Pro Ala Ala Ala  
 165 170 175  
 Gly Ala Lys Ala Gly Ala Gly Lys Ala Ala Gln Ser Gly Asp Tyr Gly  
 180 185 190  
 Gly Ala Gly Asp Asp Tyr Val Leu Gly Ser Leu Arg Val Ser Gly Ser  
 195 200 205  
 Gly Gly Gly Gly Ala Gly Lys Thr Val Lys Cys Val Phe Leu Asp Glu  
 210 215 220  
 Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Asp Glu Leu Gln Leu Gln Ile Lys  
 225 230 235 240  
 Gln Glu Pro Asp Glu Glu Asp Glu Glu Pro Pro His Gln Gln Leu Leu  
 245 250 255

ES 2 604 763 T3

Gln Pro Pro Gly Gln Gln Pro Ser Gln Leu Leu Arg Arg Tyr Asn Val  
 260 265 270  
 Ala Lys Val Pro Ala Ser Pro Thr Leu Ser Ser Ser Ala Glu Ser Pro  
 275 280 285  
 Glu Gly Ala Ser Leu Tyr Asp Glu Val Arg Ala Gly Ala Thr Ser Gly  
 290 295 300  
 Ala Gly Gly Gly Ser Arg Leu Tyr Tyr Ser Phe Lys Asn Ile Thr Lys  
 305 310 315 320  
 Gln His Pro Pro Pro Leu Ala Gln Pro Ala Leu Ser Pro Ala Ser Ser  
 325 330 335  
 Arg Ser Val Ser Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ser Gly  
 340 345 350  
 Ser Ser Gly Glu Asp Ala Asp Asp Leu Met Phe Asp Leu Ser Leu Asn  
 355 360 365  
 Phe Ser Gln Ser Ala His Ser Ala Ser Glu Gln Gln Leu Gly Gly Gly  
 370 375 380  
 Ala Ala Ala Gly Asn Leu Ser Leu Ser Leu Val Asp Lys Asp Leu Asp  
 385 390 395 400  
 Ser Phe Ser Glu Gly Ser Leu Gly Ser His Phe Glu Phe Pro Asp Tyr  
 405 410 415  
 Cys Thr Pro Glu Leu Ser Glu Met Ile Ala Gly Asp Trp Leu Glu Ala  
 420 425 430  
 Asn Phe Ser Asp Leu Val Phe Thr Tyr  
 435 440

<210> 2  
 <211> 8737  
 5 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

```

acctccgcac gagaccagc ggccccgggt ggagcgtcca gccctgcagc ggatcatggt 60
gcagcagcgc gagagcttgg aagcggagag caacctgccc cgggagggcg tggacacgga 120
ggagggcgaa ttcattggctt gcagcccggg ggccctggac gagagcgacc cagactgggtg 180
caagacggcg tcgggccaca tcaagcggcc gatgaacgcg ttcattggat ggtccaagat 240
cgaacgcagg aagatcatgg agcagtctcc ggacatgcac aacgccgaga tctccaagag 300
gctgggcaag cgctggaaaa tgctgaagga cagcgagaag atcccgttca tccgggaggc 360
ggagcggctg cggctcaagc acatggcccga ctaccccagc tacaagtacc ggccccggaa 420
aaagcccaaa atggaccctt cggccaagcc cagcgccagc cagagcccag agaagagcgc 480
ggccggcggc ggccggcggg gcgccccggc aggcgcgggc ggtgccaaga cctccaaggg 540
ctccagcaag aaatgcggca agctcaaggc ccccgcggcc gcgggcgcca aggcgggcgc 600
gggcaaggcg gcccagtccg gggactacgg gggcgcgggc gacgactacg tgctgggcag 660
cctgcgcgtg agcggctcgg gcggcggcgg cgcgggcaag acggtcaagt gcgtgtttct 720
ggatgaggac gacgacgacg acgacgacga cgacgagctg cagctgcaga tcaaacagga 780
gccggacgag gaggacgagg aaccaccgca ccagcagctc ctgcagccgc cggggcagca 840
gccgtcgcag ctgctgagac gctacaacgt cgccaagtg cccgccagcc ctacgctgag 900
cagctcggcg gagtcccccg agggagcgag cctctacgac gaggtgcggg ccgpcgcgac 960
ctcgggcgcc gggggcggca gccgcctcta ctacagcttc aagaacatca ccaagcagca 1020
cccgcggccg ctgcgcgacg ccgcgctgtc gcccgcgtcc tcgcgctcgg tgtccacctc 1080
ctcgtccagc agcagcggca gcagcagcgg cagcagcggc gaggacgccg acgacctgat 1140
gttcgacctg agcttgaatt tctctcaaa gcgcacagc gccagcgagc agcagctggg 1200
ggcgggcgcg cggccgggga acctgtccct gtcgctggtg gataaggatt tggattcggt 1260
cagcaggggc agcctgggct cccacttcga gttccccgac tactgcacgc cggagctgag 1320
cgagatgatc gcgggggact ggctggaggc gaacttctcc gacctgggtg tcacatattg 1380
aaagggcgcc cgtgctcgtc cttctctcgc gagggtgcag agctgggttc cttgggagga 1440
agttgtagtg gtgatgatga tgatgataat gatgatgatg atggtggtgt tgatggtggc 1500
ggtggtaggg tggaggggag agaagaagat gctgatgata ttgataagat gtcgtgacgc 1560
    
```

10

aaagaaattg	gaaaacatga	tgaaaatttt	ggtggagtta	aagtgaaatg	agtagttttt	1620
aaacattttt	cctgtccttt	ttttgtcccc	cctcccctcc	tttatcgtgt	ctcaaggtag	1680
ttgcatacct	agtctggagt	tgtgattatt	ttcccaaaaa	atgtgttttt	gtaattacta	1740
tttctttttc	ctgaaattcg	tgattgcaac	aaaggcagag	ggggcggggc	gggggagggg	1800
aggtaggacc	cgctccggaa	ggcgtgtttt	gaagctgttc	ggctcttgaa	gtctggaaga	1860
cgctctgaga	ggaccctttt	ggcagcacia	ctgttactct	agggagttgg	tggagatatt	1920
ttttttcttt	aagagaactt	aaagaactgg	tgattttttt	ttacaacaaa	aagggaccat	1980
tgcaactttt	gttaatttaa	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	ttggagggag	2040
aaaactgatg	tcttctatgc	atccgattct	taacaaaact	gcagggagct	tgaaaaaatg	2100
cagactgtac	aaacgcttac	aaaaaaaaaa	actgtgaaat	gacttaagat	cagagtttac	2160
ttttcagatc	aaatgtttta	tggttttaca	aatgtgattt	ctacttgcca	actttttttt	2220
tgtaactttg	tcctttatac	ctccttgatt	gaataccaga	cagcctagac	ctcagtaaca	2280
aaggatttga	aacatttttg	atacataaca	gacctcagtc	tttttaaaaa	attaatatat	2340
tttcaggcgt	atttttgtac	agtgaaaagg	gaacattctt	gctgtgtttt	ttcagtaaga	2400
ctttcaggca	cttctccctt	tttgatttct	ttttttcctt	ctgtttttta	gcattgcaagt	2460
atgttggtag	ggttatgtcct	ggtttaaaaa	ggattaaaaat	tttaaaataa	tccttgcctc	2520
taaaggcctt	gtggtttaaa	aaaaaaaaagc	aaactttttt	ttgtacagct	atagtagaga	2580
tttgttcaat	atttgttaggt	aaagatttat	tgaaaatggt	gatataagacc	tcagagctgt	2640
tatcttagtt	taaagattgt	atatgtactg	actatagta	ggactttatg	tatctctatc	2700
gctgtgatgt	ggatggggcc	ccagatggaa	ggtttgaaac	tggattctcg	attttttagca	2760
aaaaagaaaa	aaaaaaggca	catagttaa	aaagtttctc	attttgtgca	atataatcta	2820
aataaagtac	agaccatctg	catattttgt	agcaaatggt	ggcaaagcag	actcaatgca	2880
ctgtcagcat	cattgcctgt	tttttttttt	ttttttttgt	gctggaagtc	tgtattttga	2940
caattttaat	aaatcagctg	gaactgatag	aaactcgcct	cgccaatagt	ctctatggaa	3000
gtcaaaactg	aggtcctgtt	gtcgcagagc	attcgggtgt	gaggctgttg	tgtgctcgga	3060
tgagggggag	tggcaggaga	gaattctaca	tttagggggg	taggctgaaa	agtgttcaat	3120
tagcaggctg	atttcttttt	cctcttccgc	tattgtgaa	agacagggga	aggggtttct	3180
ttctctctgc	cctccccttc	catctccagc	tccccatttc	ctttctcacc	tcctcctcca	3240
ctccctgcct	cttctcccca	cccacctctg	cgggcgggct	gcgctggagg	tcgggagctg	3300
gccgggggag	ggcggatgga	ggggcctggg	tgcacagctc	ccttggctcg	ggctctgtct	3360
gctggggcct	gtgtgttctc	tgcggcgggc	cgcgtccccc	ctgagcctcg	cggtgacagc	3420
cgcttttggc	agcgagcgtc	cggggcactt	ctatccccgc	ctctcaaagg	gtggggacag	3480
ccgtttccag	atttgaaatt	tttctgttct	ttatttttta	cgctgcatct	tcgctgtgtc	3540
tcagaggtgg	ttgttggcgg	agaacgcggc	cgagtggttt	gacctctagc	ggtgaagggg	3600
gaaggggaag	agaaaaggag	agaagtggtc	ggtgtctgtt	tccttctgtc	ccccggggcc	3660
gtggagctgt	cggagggaag	gaggacggtg	cggggcccga	gggggctggg	ggcgcggcgg	3720
gaccacggct	acgagcggga	gggagggggg	agtcggggga	agacgcggca	ggccggccga	3780
gggcaccccg	aggaacatgg	catggcctct	gtgcgatccc	agtcgcggtc	tccgggggtc	3840
ctgggagggg	gcaaccactg	gtgagggcgt	ggggagcagg	gggtggcaga	gggcacccgg	3900
gcggtagtcc	gggacgcgca	aggcagagcc	ctgacgctcc	gggtccccgt	gcctggctct	3960
tcttgcctcg	ccaccgctgt	ctcctggggc	cgccccggcg	cgggcccttg	aggcgcggcg	4020
agacaccagc	gctggcttcc	cgggcccgcg	ggcgggggag	ggaagcctcg	gggtctgccc	4080
gtgagaggaa	gaaaagcaaac	cgggggagca	ggcgctgccc	gcacccgcgc	accccgggcc	4140
ctcaccacgc	cctcccgcgc	cgccggctca	ggggctgccc	cggaatcagc	tccccggggc	4200
cgccgcaacg	aaggttggatc	cgcatcttga	tgtttctccg	ggagcctcct	gggggttccg	4260
gcggcggcgc	gggcgcgacc	catcccgcgc	cgctccccgc	ctcgtgaaac	cccgtttgcc	4320
tgtccacacc	ccctcgctcc	ccaccatttt	tcttgaccgg	cctgtgtccc	cgagccctcg	4380
cggcaggccc	gagcaggcga	tgcggccggg	gcacgcgcgc	cccgggctcc	cgcccccttt	4440
ccgagcatcc	gccgcctctt	ttctgtctgg	tctgggagga	gggaggctgg	gaggccgctc	4500
ggggcccagc	gtgccagccc	cggagttcag	cctcccagc	tgcggcggcc	gcagcggagg	4560
aggttttcag	tggctgattg	aaactcactg	caaaatcacc	acgactcttt	cacctactga	4620
gatgattgac	cgaggttttg	ccttccattt	ttactgagat	ttggcgagac	cgaatggaag	4680
cgctccgaca	gtaactgcag	ctgctaggcc	agagggggcc	cggcgccttt	cccgcctccc	4740
ctcccgcctg	cttttgcctt	actcgatctt	accaccacc	ctccccggc	ccccgcactg	4800
agaactcggg	cctctcacc	gccccccagc	ctcccgctct	gggcgagcct	cctccccagc	4860
ccccacccct	gggatgcgaa	gccagcaagc	ttttgctgca	gatggacagg	tttcttttct	4920
gtggcttttt	cttttcgata	aaccatcaga	tttcagtagt	acatttggga	aaagaagggg	4980
ctgatggcgt	taaccaggtt	ctcaatatag	aactggattt	ctggagttgt	ttaccttacc	5040
ccacaccccc	tcaacatgta	gactaatgca	gccattgggt	gtacatttat	tttagccacg	5100
gataattgaa	ccagcggttt	acaattgaca	cgtgctccgt	gctgggtgatt	ttatgtggca	5160
gccctctgct	gcagttccga	aaactgtttg	caactgtaac	ccattgatag	gctgactctat	5220
gtattttgaa	agcctgaaaa	cttggcatgt	cttttctgtt	ttaatcatag	atgaaatcttg	5280
gacattttct	gtggtagggt	ggaaacttta	agtaaattag	taaagtaata	atttggcttc	5340
agaatgggaa	gagatagtca	agattttttt	tttttaaagc	catgtggcct	aacttgatac	5400
aaaaataaaa	gtaattgttt	ggcaatctaa	atttaaaacc	tgttagaact	caggacaggc	5460
gcttcaatgc	gctttttaac	aatatttaag	gctgttttga	tgagtgcggt	gtgagaatca	5520
tcttaatgaa	ttctttattg	agtgtctaaa	acatagtaga	atacacatgg	tattcttgcc	5580
actggatagt	cttcaataaa	agtttaattg	attttttttt	gttggtctct	taagtagtgc	5640
ttatttttaa	ctaagcattg	acagaatatc	ttaaaatggt	aacctggggg	tggcgggtgg	5700

ES 2 604 763 T3

gtgctgtgtg	cacggcagcc	tagccagtg	ggatcctgct	gtttattata	agtagttcac	5760
agactctgat	ggcattttgg	taagctttcc	atctttaaga	aattgaacca	gcattctctt	5820
attaattctt	taaactgtgg	aagtaatttc	cagttcttac	actctgatac	gcattccctt	5880
tattttaaaa	aaaaaaaaat	gctaataaaa	ggcagtgtag	ttaaactgtg	ctttgcaaat	5940
attgtgtatg	ttatgaatga	ctacagacac	ggggcaaatt	attttagtaa	tgattatcct	6000
ttagctagag	aaagaaatca	ttacaactct	tttgggcaga	gatgtttctt	tttaatgtta	6060
atcaagggga	agtgatttaa	atatgcataa	atgtagcagt	caggggtgatt	tagttgcttt	6120
tttcatgaaa	gaaaaagact	caaaagacaa	gacttatttt	tctcttctgg	gacttgaaat	6180
cataatcatc	tgatattagt	acagtacaag	aaattttacat	ttgtttttta	cttcagaatt	6240
taagtactct	ttgccaagg	aatttgagaa	ataaggcaaa	taagttgctc	tattttaaag	6300
tagtcattca	atataaatat	attatatcaa	tcttaacttt	tttattctct	gatattgatta	6360
ataatagtta	tattcttact	tttcttctaa	tgggcatatg	tatccttgtg	gacactttga	6420
gagagggttt	cttggactct	cccattttata	gactttttat	actcttttac	tggtgggttc	6480
cctgctttta	acagatttct	gaggcaaata	tatttgtgct	tttttcttat	gtaggaagac	6540
cagcgaaaaat	agtttactga	gttgtcaatt	ttatcagtag	ataagaaact	ttctttatta	6600
cagttttcag	gaagattttt	tcaggatatt	tctcagttat	tctaagggcc	aaattttgta	6660
aaatttccat	taggaatgtc	agtttcaaat	accctttgta	tagcctaagc	ctgtgaggat	6720
acaagaatg	agccttacct	atcctaacac	agggattttac	aagttcccaa	agtaaccgtc	6780
tccatgtaac	tcttgacata	cttttctgag	atttggctta	tttttattat	tggttatttc	6840
tcactgttca	ttctatttga	tttattctac	aacatcccc	tttatttaat	gatctggaaa	6900
attctgctct	ttgataacaa	ctcaggattt	ttttgttcag	ttttggtttt	tgccccttcc	6960
tgtggagcct	acattttcaa	ccacaataaa	gatgaaacaa	aatattatgaa	actgagctct	7020
cttccatttt	acttactgct	ggcttttttt	tttttttttt	tccttgattc	ctaccatacc	7080
ttcgtttttt	tcattgtact	tttttaacac	tacatatac	cattagctgc	ctaattagtt	7140
ttactgtttc	catgtggatg	cagtgagttt	atacagaat	ttcacaaa	agtagttttt	7200
tagtgaactt	aaaataaaca	gaatttttaa	ggagacctat	ttttatactc	aataaaagca	7260
caaaagtgca	gaaagtataa	aacggcttac	aaagggagac	acaagctcat	aatgttccat	7320
gtataaaagt	aataacttta	ttgggtagag	atattcttac	aagatctagc	acctctgcca	7380
gtgcacagat	aggactgttt	taaagtattt	gggaactttt	ggttgcctgc	agttgtgaac	7440
agagaacttc	tctacagaga	aacaaaccac	taaaagcaat	atgaccgagt	tgagatgtgg	7500
tttccaatga	gcaattgggt	aatttaagca	acctggatgt	gcatatgtgg	aggctcccgt	7560
ctcactgttt	gatcaaactt	cttttatgta	gtcacgtaga	cttgattttt	tctgctgtga	7620
aaatgaaaaa	ataaagcaat	atgacaaaaa	gtttaaaaat	gcataaaaaa	taggattttc	7680
tctaggctcc	tcgaagagat	tttttaata	tgatgcttgt	cttactttct	tagacacggt	7740
acatttcccc	ttccaaaaaa	aaaaaaaaag	acaactggaa	gtaattttatc	atataaagaa	7800
ttttgatcaa	atagatattg	acaaagggcc	ctctgtcaca	tttttcttca	tccagctttt	7860
gttcacagat	agtatgcctc	ctcccctgaa	tcacataggg	agaaaagctta	tactccattc	7920
tcattaattt	cccattttgt	ctactttttac	tcttgtacat	atgttgtggg	tttaagagtc	7980
ttttgcattt	gttctgtgac	accttttttt	gaattgactg	ttttaaaacg	gaggcctatt	8040
ttttccgggt	tgggactcct	agtggttatg	gcatcccata	atgcttctgt	acggccacca	8100
ggacagaacc	acctgatgtt	ttagagcagt	tttcagcatg	acactgttaa	caagtgtgta	8160
ttttccaagg	ccacatgaaa	cttactttct	tagccactcc	aggtttggga	gcagaaaagc	8220
tgaaaaacc	ttttgtgtag	aagtctgagt	ggtttgtggg	ggggaccttt	tttagagttt	8280
gcatgccagc	gcacggccta	ttgctgtgaa	acagagagaa	ggtaaagcta	cctgaggcag	8340
tgcgctggag	gatgaagtgt	ttgatagcac	taggggggaa	agaaaaatgca	tggcaaatgt	8400
tcgtcttctc	gtagactatc	tagcatgcag	agtgtagtgt	gttgaaacgg	tgatgacat	8460
tgctgtatca	aagttgtaaa	attaagcatt	atattattgaa	aactatgtat	ttttttgtaa	8520
aaacctgatc	acatagagaa	tatcagtggc	ttgtgcttgt	gcttcgatct	aaccagcttc	8580
ttgaccacc	ccccctggg	atgcagtgtt	aatgctcagg	gttgaaaata	gtacactcca	8640
atgtctcttt	tgcaagagtt	tttcacagag	gattacattt	gttcaaaaga	ctctaataaa	8700
attgtgtgat	caatcttcaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaa			8737

<210> 3  
 <211> 111  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

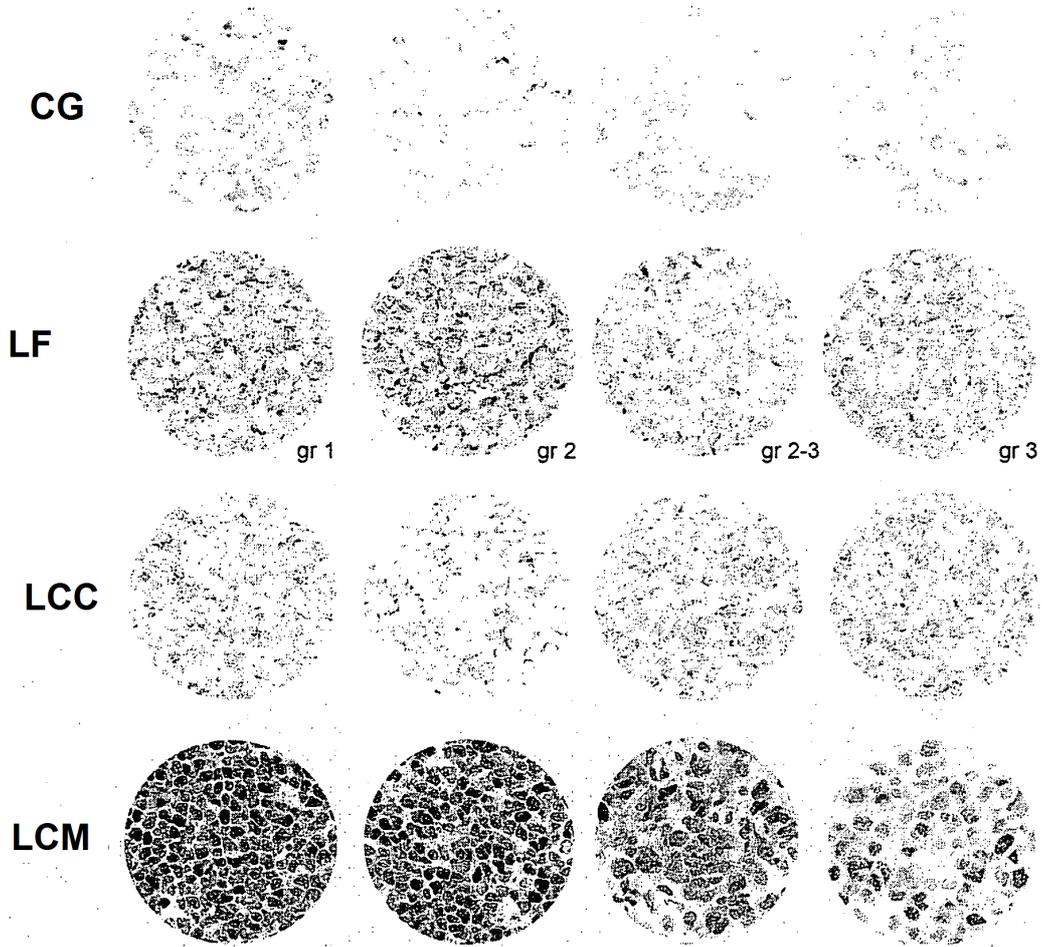
10

ES 2 604 763 T3

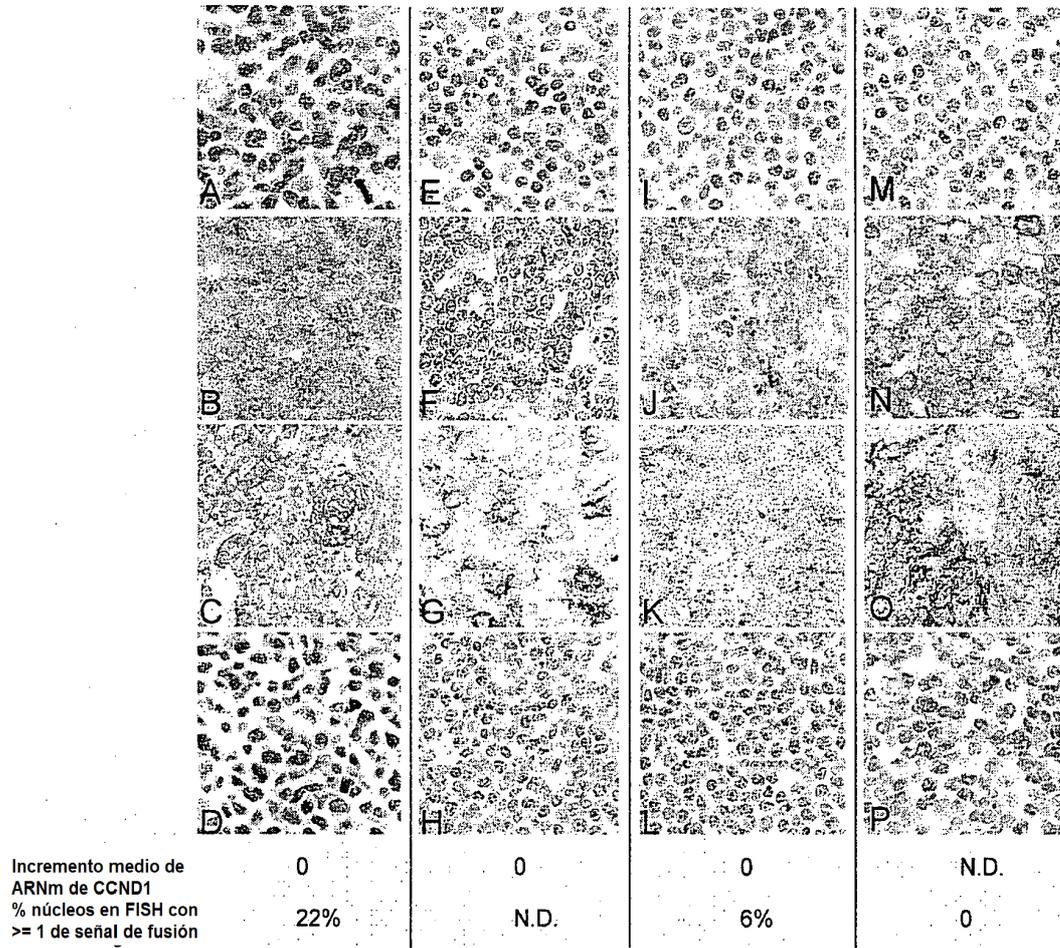
Phe Met Val Trp Ser Lys Ile Glu Arg Arg Lys Ile Met Glu Gln Ser  
1 5 10 15  
Pro Asp Met His Asn Ala Glu Ile Ser Lys Arg Leu Gly Lys Arg Trp  
20 25 30  
Lys Met Leu Lys Asp Ser Glu Lys Ile Pro Phe Ile Arg Glu Ala Glu  
35 40 45  
Arg Leu Arg Leu Lys His Met Ala Asp Tyr Pro Asp Tyr Lys Tyr Arg  
50 55 60  
Pro Arg Lys Lys Pro Lys Met Asp Pro Ser Ala Lys Pro Ser Ala Ser  
65 70 75 80  
Gln Ser Pro Glu Lys Ser Ala Ala Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala Gly  
85 90 95  
Gly Gly Ala Gly Gly Ala Lys Thr Ser Lys Gly Ser Ser Lys Lys  
100 105 110

**REIVINDICACIONES**

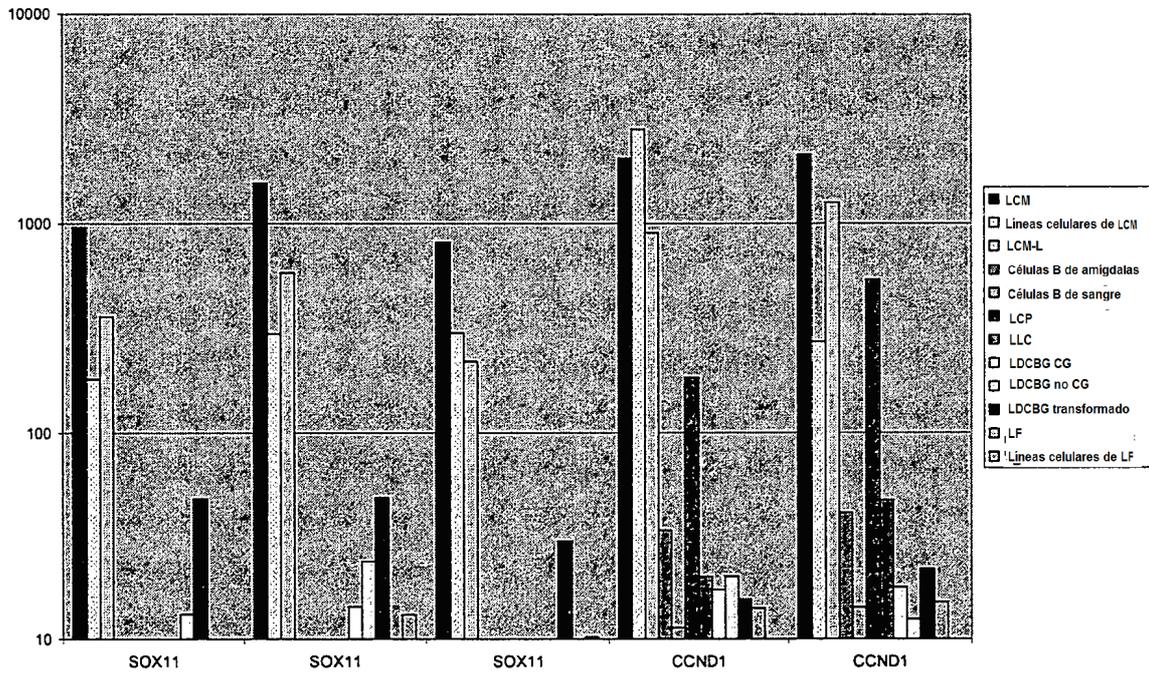
- 5 1. El uso *in vitro* de un resto de unión que es capaz de unirse selectivamente a la proteína Sox11, o a una molécula de ácido nucleico que codifica la misma, en el diagnóstico o el pronóstico de un linfoma, en el que el linfoma es un linfoma de células del manto (LCM) o un linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) y en donde el uso es para diagnosticar LCM, pronosticar LCM o diagnosticar LDCBG.
- 10 2. El uso *in vitro* de un resto de unión que es capaz de unirse selectivamente a la proteína Sox11, o a una molécula de ácido nucleico que codifica la misma, en la detección de células de linfoma, en el que el linfoma es un linfoma de células de manto (LCM) o un linfoma difuso de células B grandes (LDCBG).
- 15 3. Un uso *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para la detección de la expresión Sox11 como biomarcador único para linfoma.
- 20 4. Un uso *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el resto de unión que es capaz de unirse selectivamente a la proteína Sox11, o a una molécula de ácido nucleico que codifica la misma, se usa en combinación con uno o más restos de unión adicionales para detectar uno o más biomarcadores adicionales para linfoma.
- 25 5. Un uso *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende detectar la expresión nuclear de Sox11.
- 30 6. Un uso *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el resto de unión es capaz de unirse selectivamente a la proteína Sox11.
- 35 7. Un uso *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el resto de unión comprende o consiste en un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno.
- 40 8. Un uso *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el resto de unión es capaz de unirse selectivamente a una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína Sox11.
- 45 9. Un uso *in vitro* de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el resto de unión comprende o consiste en una molécula de ácido nucleico.
- 50 10. Un uso *in vitro* de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el resto de unión que es capaz de unirse selectivamente a la proteína Sox11 o a una molécula de ácido nucleico que codifica la misma, comprende un resto detectable.
11. Un método *in vitro* para detectar células de linfoma en un individuo, comprendiendo el método:
- (a) proporcionar una muestra de células del individuo; y
  - (b) determinar la cantidad de proteína Sox11 y/o de ARNm en la muestra de células, en donde los niveles de proteína Sox11 y/o de ARNm son indicativos de que el individuo tiene células de linfoma y en donde el linfoma es un linfoma de células del manto (LCM) o un linfoma difuso de células B grandes (LDCBG).
12. Uso de un resto de unión como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en la preparación de un medicamento para diagnosticar o pronosticar un linfoma *in vivo*, en el que el linfoma es un linfoma de células del manto (LCM) o un linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) y en donde el uso es para diagnosticar LCM, pronosticar LCM o diagnosticar LDCBG.



**Figura 1**



**Figura 2**



**Figura 3**

MVQQAESLEAESNLPREALDTEEGEFMACSPVALDESDPDWCKTASGHIKR  
PMNAFMVWSKIERRKIMEQSPDMHNAEISKRLGKRWKMLKDSEKIPFIREAE  
RLRLKHMADYPDYKYRPRKKPKMDPSAKPSASQSPEKSAAGGGGGSAGG  
GAGGAKTSKGSSKKCGKLGKAPAAAGAKAGAGKAAQSGDYGGAGDDYVLG  
SLRVSGSGGGGAGKTVKCVFLDEDDDDDDDDDELQLQIKQEPDEEDEEPP  
HQQLLQPPGQQPSQLLRRYNVAKVPASPTLSSSAESPEGASLYDEV RAGAT  
SGAGGGSRLYYSFKNITKQHPPPLAQPALSPASSRSVSTSSSSSSGSSSSGS  
SGEDADDLMFDLSLNFSQSAHSASEQQLGGGAAAGNLSLSLVDKDLDSFSE  
GSLGSHFEFPDYCTPELSEMIAGDWLEANFSDLVFTY

**SEQ ID NO:1**

***Figura 4***

acctccgcacgagaccagcggcccgggttgagcgtccagccctgcagcggatcat  
ggtgcagcagggcggagagcttggaaagcggagagcaacctgccccgggaggcgtgga  
cacggaggagggcgaattcatggcttgcagcccgggtggccctggacgagagcgaacc  
agactggtgcaagacggcgtcgggccacatcaagcggccgatgaacgcgttcatggt  
atggtccaagatcgaacgcaggaagatcatggagcagtctccggacatgcacaacgc  
cgagatctccaagaggctgggcaagcgtggaaaatgctgaaggacagcgagaagat  
cccgttcatccgggaggcggagcggctgcggctcaagcacatggccgactaccccga  
ctacaagtaccggccccggaaaaagccccaaaatggaccctcggccaagcccagcgc  
cagccagagcccagagaagagcgcggccggcggcggcggcgggagcgcggggcggagg  
cgcgggcgggtccaagacctccaagggtccagcaagaaatgcggaagctcaaggc  
ccccgcggccgcgggcccgaaggcgggcccagtcgggggacta  
cgggggcgcgggagcactacgtgctgggcagcctgcgcgtgagcggctcggggcg  
cggcggcgcgggcaagacggtcaagtgcgtgtttctggatgaggacgacgacgacga  
cgacgacgacgacgagctgcagctgcagatcaaacaggagccggacgaggaggacga  
ggaaccaccgcaccagcagctcctgcagccgcggggcagcagccgtcgcagctgct  
gagacgctacaacgtcgccaaagtgcggccagccctacgctgagcagctcggcgga  
gtccccgaggagcgcgacctctacgacgaggtgcgggcccggcgcgacctcggggcg  
cgggggcggcagccgcctctactacagcttcaagaacatcaccaagcagcaccgcc  
gccgctcgcgcagcccgcgtgtcggccgcgtcctcgcgctcgggtgtccacctcctc  
gtccagcagcagcggcagcagcagcggcagcagcggcgaggacgccgacgacctgat  
gttcgacctgagcttgaatttctctcaaagcgcgcacagcgcagcagcagcagct  
ggggggcggcgcggcggccgggaacctgtccctgtcgtggtggataaggatttga  
ttcgttcagcagggcagcctgggctcccacttcgagttccccgactactgcacgcc  
ggagctgagcagatgatcgcgggggactggctggaggcgaacttctccgacctggt  
gttcacatattgaaaggcggccgctgctcgtctcttctctcgagggtgcagagctg  
ggtccttgggaggaagttgtagtggtgatgatgatgataatgatgatgatgat  
ggtggtggtgatggtggcggtggttagggtggaggggagagaagaagatgctgatgat

**Figura 5**

attgataagatgctgacgcaaagaaattggaaaacatgatgaaaatTTTGGTgga  
 gTTaaagtGaaatgagtagTTTTTaaacattTTTtCctgtcctTTTTTgtccccct  
 cccttCctttatcgtgtctcaaggtagTTgcatacctagtctggagttgtgattatt  
 ttcccaaaaaatgtgTTTTTgtaattactatttCcttttCctgaaattcgtgattgc  
 aacaaggcagagggggcggggaggggagggtaggacccgctccggaaggcg  
 ctgTTTgaagcttgtcggTcTTTgaagtctggaagacgtctgcagaggaccTTTTg  
 gcagcacaactgTTactctagggagTTggtggagatTTTTTTTTTcttaagagaac  
 tTaaagaactggtgattTTTTTTTTTaaaaaaaaggaccattgcaactTTTgtTaa  
 tTTaattTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTggaggagaaaactgatgtc  
 ttctatgcatccgattctTaaaaaaactgcagggagctTgaaaaaatgcagactgta  
 caaacgctTacaaaaaaaaaaactgtgaactgacttaagatcagagttactTTTca  
 gatcaaattgTTtatggTTTTTaaatgtgatttctacttgccaactTTTTTTTgt  
 aactTgttccctTatacctcctTgattgaataccagacagccttagacctcagtaca  
 aaggTattgaaacattTTTgatacataacagacctcagtCctTTTTTaaaattaata  
 tTTTTcaggcgtatTTTTgtacagtGaaaagggaacattctTgctgtgTTTTTca  
 gtaagactTTcaggcacttcttCctTTTTgatttCctTTTTTtCctctgTTTTTtag  
 catgcaagTatgTTgttacgTTtatgtcctggTTTTTaaaaggattaaaTTTTTaaat  
 aatcctTgcatctaaaggcTTTgtgTTTTTaaaaaaaaaaggcaactTTTTTTTgta  
 cagctatagtagagattTgtTcaatattTgtaggTaaagatttattgaaaatggtga  
 tatagacctcagagctgTTatcttagTTTaaagattgtatatgtactgtactatagt  
 aggactTTatgtatctcatacgtgtgatgTggatggggcccagatggaaggTTTg  
 aaactggattctcgattTTTtagcaaaaaagaaaaaaaaaaggcacatagTTTaaaa  
 gTTtctcattTTTgtgcaatataatctaaataaagTcacagaccatctgcatatTTTgt  
 agcaaatggtggcaagcagactcaatgcactgtcgacatcattgcctgTTTTTTT  
 TTTTTTTTTTgtgctggaagtctgtatctTgacaattTTTaaataaatcagctggaac  
 tgatagaaactcgcatcgccaatagtctctatggaagtcaaacTggaggtcctgTTg  
 tCgcagagcattcggTggtgaggctgtTgtgtgcgcggatgaggggaggtggcagga  
 gagaattctacatttaggggTtaggctgaaaagtgtTcaattagcaggctgatttc

**Figura 5 (cont.)**

tttttcctcttccgctagttgtgaaagacaggggaaggggtgttctttctctctgcc  
tcctttccatctccagctccccatttcctttctcacctcctcctccactcctgcc  
tcttctccccaccatcctggcggggcgggctgcgcggaggctcgggagctggccggg  
gaggggcggatggaggggcctgggttgcagctcccttggtcggggctcctgctcgt  
ggggcttgtgtgttctctgcggcgggcccgcgtccccgctgagcctcgcggtgacagc  
cgctttggcagcgcgctcggggcacttctatccccgcctctcaaaggggtgggga  
cagccgtttccagatttgaattttttctgttctttattttaacgctgcactctcgc  
gtgtgctcagaggtggttgttggcggagaacgcgcgcagtggttgacctctagcg  
gtgaagggggaaggggaagaggaaaggagagaagtggtcgggtgtctgtttccttctg  
tccccggggccgtggagctgtcggaggggaaggaggacggtgcggggccgcagggg  
cgcggggcgcggcgggaccaggctacgagcgggaggaggcgggagtcgggggaag  
acgcggcaggccggccgagggcacccccgaggaacatggcatggcctctgtgcgatcc  
gagtcgcggtctccggggtgcctgggagggccgaaccactggtgagggcggtggggag  
cagggggtggcagagggcaccgggcggtagtccgggacgcgcaaggcagagccctg  
acgctccgggtccccgtgcctggctcttcttgcctcgccaccgcgtgctcctgggcg  
cgccccgcccgcgggccccttgaggcgcgcggagacaccagcgtggcttcccgggccc  
gcgggcccgggaggggaagcctcggggctgcggggtgagaggaagaaagcaaaccgg  
ggagcaggcggctgccgcacccgcgcacccccgggcccctcaccacgcctccccgcgc  
gccggctcaggggctgccccggaatcagctccccggggccgcgcaacgaaggtgga  
tccgcatcttgattgttctccgggagcctcctgggggctccggcggcggcgcgggcg  
cgacctccccgctggcgtccccgctcgtgaaccccgtttgcctgtccacacccc  
ctcgtccccaccatttttctgaccggcctgtgtccccgagccctcgcggcaggcc  
cgagcaggcgcgatcgcggccgggacgcgcgccccgggctcccgcccccttccgagc  
atccgccgctcttttctgctgggtctgggaggaggaggctgggaggccgctcggg  
gcccagcgtgccagccccggagttcagcctcccagctgcggcgcgccgcagcggagg  
aggttttcagtggtgattgaaactcactgcaaaatcaccacgactctttcacctac  
tgagatgattgaccgaggtttggccttccatttttactgagatttggcgagaccgaa  
tggaagcgtccgcacagtaactgcagctgctaggccagaggggccccggcgccttc

**Figura 5 (cont.)**

ccgcctcccctcccgcttgcttttgccttactcgatcttaccaccaccctccccg  
 gcccccgactgagaactcgggcctctcaccgccccccagcctcccgctctgggcg  
 agcctcctcccagccccaccctgggatgcgaagccagcaagcttttgctgcaga  
 tggacaggtttcttttctgtggcttttctttcgataaaccatcagatttcagtag  
 tacatttgggaaaagaaggggctgatggcgtaaccaggttctcaatatagaactgg  
 atttctggagttgtttaccttaccacacccccctcaacatgtagactaatgcagcc  
 attggtggtacatttatttttagccacggataattgaaccagcggtttacaattgaca  
 cgtgctccgtgctggtgattttatgtggcagccctctgctgcagttccgaaacttgt  
 tggcaacgtaaaccattgataggctgatctatgtattttgaaagcctgaaaacttg  
 gcatgtcttttctgttttaatcatagatgaatcttggacatttttctgtggtgaggtg  
 gaaactttaagtaaattagtaaagtaataatttggcttcagaatgggaagagatagt  
 caagatttttttttttaagccatgtggcctaacttgatacaaaaataaaaagtaat  
 tgtttggcaatctaaatttaaacctgtagaactcaggacaggcgcttcaatgcgc  
 tttttaacaatatttaaggctgttttgatgagtgcgttgtgagaatcatcttaatga  
 attctttattgagtgctctaaacatagataatacacatggtattcttgccactgga  
 tagtcttcaataaaagtttaattgatttttttttggttggtctcttaagtaagtctta  
 ttttaactaagcattgacagaatatcttaaaatggtaacctgggggtggcgggtgg  
 gtgctgtgtgcacggcagcctagccagtggggatcctgctgtttattataagtagtt  
 cacagactctgatggcattttggtaagctttccatctttaagaaattgaaccagcat  
 tctcttattaattctttaaactgtggaagtaatttccagttcttacactctgatacg  
 catcccttttatttaaaaaaaaaaaaaatgctaataaaaggcagtgacttaactg  
 tgctttgcaaatattgtgtatggtatgaatgactacagacactgggcaaattatttg  
 tagaatgattatccttttagctagagaaagaaatcattacaactcttttgggcagaga  
 tgtttctttttaatgttaatcaaggggaagtgatttaaatatgcataaatgtagcag  
 tcagggtgatttagttgcttttttcatgaaagaaaaagactcaaaagacaagactta  
 ttttctcttctgggacttgaaatcataatcatctgatattagtagtacaagaaa  
 ttacatttgttttttacttcagaatttaagtgacttttgcccaaggaatttgagaa

**Figura 5 (cont.)**

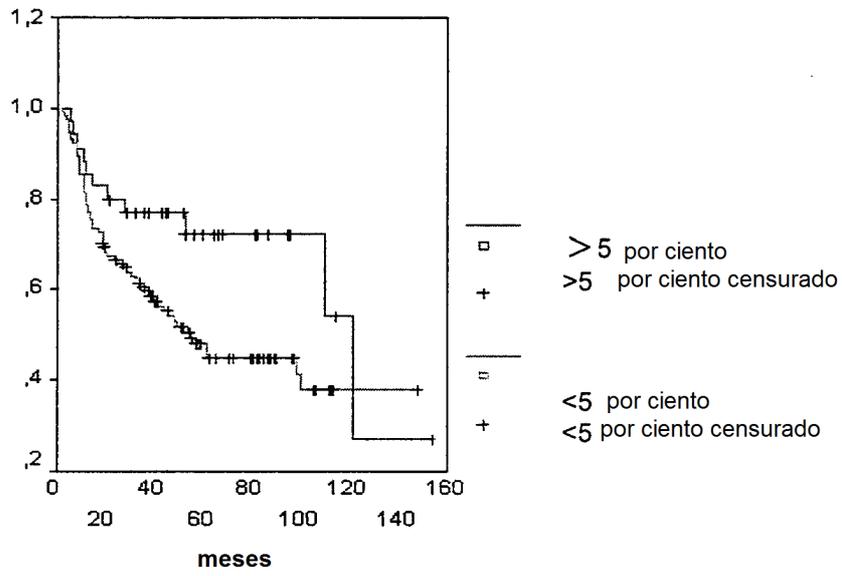
ataaggcaaataagttgctctatTTTTAAAGTAGTCATTCAATATAAATATATTATAT  
 CAATCTTAACTTTTTATTCTCTGATATGATTAATAATATGTATATTCTTACTTTTC  
 TTCTAATGGGCATATGTATCCTTGTGGACACTTTGAGAGAGGTTTTCTTGGACTCTC  
 CCATTTATAGAATCTTTATACTTTTTACTGTGTGGTTCCTGCTTTTAAACAGATTT  
 CTGAGGCAAATATATTTGTGCTTTTTCTTATGTAGGAAGACCAGCGAAAATAGTTT  
 ACTGAGTTGTCAATTTATCAGTAGATAAGAACTTTCTTTATTACAGTTTCAGGGA  
 AGATTTTTTCAGGATATTTCTCAGTTATTCTAAGGGCAAATTTGTAAAATTTCCA  
 TTAGGAATGTCAAGTTTCAAATACCCTTGTATAGCCTAAGCCTGTGAGGATAACAAG  
 AATGAGCCTTACCTATCCTAACACAGGGATTTACAAGTTCCCAAAGTAACCGTCTCC  
 ATGTAACCTCTTGACATACTTTTCTGAGATTTGGCTTATTTTTATTATTGGTTATTTCT  
 TCACTGTTCACTCTATTTGATTTATTCTACAACATCCCCTTTTATTTAATGATCTGG  
 AAAATCTGCTCTTTGATAACAACCTCAGGATTTTTTTGTTTCAGTTTTGGTTTTTGGC  
 CCTTCTGTGGAGCCTACATTTTCAACCACAATAAAGATGAAACAAAATTTATGAAA  
 CTGAGCTCTCTCCATTTTACTTACTGCTGGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTCTTGGAT  
 TCCTACCATACCTTCGTTTTTTTCACTGTACTTTTTTAACTACTATATCCATTA  
 GCTGCCTAATTAGTTTTATCTGTTCCATGTGGATGCAGTGAGTTTATAAGAGAATTT  
 CACAAACAAGTAGTTTTTGTGAACCTAAAATAAACAGAATTTTAAAGGAGACCTA  
 TTTTTATACTCAATAAAAGCACAAAAGTGCAGAAAGTATAAAACGGCTTACAAAGGG  
 AGACACAAGCTCATAATGTTCCATGTATAAAAGTAATAACTTTATTGGGTAGAGATA  
 TTCTTACAAGATCTAGCACCTCTGCCAGTGCACAGATAGGACTGTTTTAAATGATTT  
 GGGAACTTTTGGTTGCCTGCAGTTGTGAACAGAGAACTTCTCTACAGAGAAAACAAC  
 CACTAAAAGCAATATGACCGAGTTGAGATGTGGTTTCCAATGAGCAATTGGTGAATT  
 TAAGCAACCTGGATGTGCATATGTGGAGGCTCCCGTCTCACTGTTTGATCAAACCTC  
 TTTTATGTAGTCACGTAGACTTGATTTTTTCTGCTGTGAAAATGAAAAATAAAGCA  
 ATATGACAAAAAGTTTAAAAATGCATAAAAAATAGGATTTCTCTAGGCTCCTCGAA  
 GAGATTTTTTAAATATGATGCTTGTCTTACTTTCTTAGACACGTTACATTTCCCTT  
 CCAAAAAAAAAAAAAAGGACAACCTGGAAGTAATTTATCATATAAGAATTTTGATCA

**Figura 5 (cont.)**

aatagatattgacaaagggccctctgtcacatTTTTCTTCATCCAGCTTTTGTTCAA  
aacagtatgcctcctcccttgaatcacatagggagaaacgttatactccattctca  
ttaatttcccatTTTGTCTACTTTTACTCTGTACATATGTTGTGGGTTTAAGAGTC  
TTTTGCATTTGTTCTGTGACACCTTTTTTTGAATTGACTGTTTTAAAACGGAGGCCT  
ATTTTTTCGGTTTGGGACTCCTAGTGGTTATGGCATCCCATAATGCTTCGTGACGG  
CCACCAGGACAGAACCACCTGATGTTTTAGAGCAGTTTTCCAGCATGACACTGTAAAC  
AAGTGTGTATTTTTCCAAGGCCACATGAAACTTACTTTCTTAGCCACTCCAGGTTTGG  
GAGCAGAAAAGCTGAAAAACCTTTTGTGTAGAAGTCTGAGTGGTTTGTGGGGGGGA  
CCTTTTTTAGAGTTTGCATGCCAGCGCACGGCCTATTGCTGTGAAACAGAGAGAAGG  
TAAAGCTACCTGAGGCAGTGCCTGGAGGATGAAGTGTTGATAGCACTAGGGGGGA  
AAGAAAATGCATGGCAAAGTTTCGTCTTCTCGTAGACTATCTAGCATGCAGAGTGTA  
GTGTGTTGAAACGGTGTATGACATTGCTGTATCAAAGTTGTAATAAAGCATTATT  
TATTGAAAACCTATGTATTTTTTTGTAAAAACCTGATCACATAGAGAATATCAGTGGC  
TTGTGCTTGTGCTTCGATCTAACCCAGCTTCTTGACCCACCCCCCTTGGTATGCAGT  
GTTAATGCTCAGGGTTGAAAATAGTACACTCCAATGTCTCTTTTGCAAGAGTTTTTC  
ACAGAGGATTACATTTGTTCAAAGACTCTAATAAAAATTGTGTGATCAATCTTCAA  
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

**SEQ ID NO:2**

***Figura 5 (cont.)***



**Figura 6**

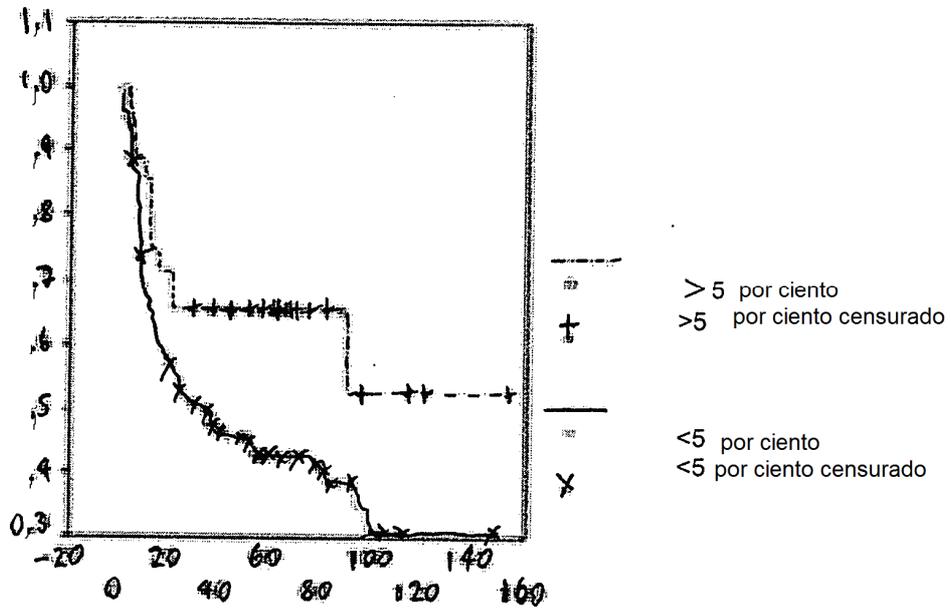


Figura 7