

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 981**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.06.2012** **PCT/US2012/044956**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2013** **WO13006443**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2012** **E 12807230 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017** **EP 2726634**

54 Título: **Descubrimiento de una mutación somática en el gen MYD88 en linfoma linfoplasmocitario**

30 Prioridad:

01.07.2011 US 201161571657 P

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

18.07.2017

73 Titular/es:

**DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.
(100.0%)
450 Brookline Avenue
Boston, MA 02215, US**

72 Inventor/es:

TREON, STEVEN, P.

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 624 981 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

Descubrimiento de una mutación somática en el gen MYD88 en linfoma linfoplasmocitario

5 Solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio según 35 U.S.C. § 119(e) de la solicitud provisional de Estados Unidos n.º de serie 61/571.657, presentada el 1 de julio de 2011, cuyo contenido se incorpora por referencia en este documento en su totalidad.

10

Antecedentes de la invención

La macroglobulinemia de Waldenstrom (WM) es una entidad clinicopatológica definida resultante de la acumulación, predominantemente en la médula ósea, de células linfoplasmocitarias clonalmente relacionadas que secretan una proteína IgM monoclonal. Esta afección se considera que corresponde a linfoma linfoplasmocitario (LPL) como se define por el sistema de clasificación de la Organización Mundial de la Salud. Los factores genéticos desempeñan una función importante en la patogénesis de WM, con un 25% de los pacientes que muestran una historia familiar. La gammapatía monoclonal de IgM de importancia indeterminada (MGUS) a menudo precede al desarrollo de WM. Sigue sin definirse el evento oncogénico principal que provoca transformación maligna en WM. El conocimiento de dicha alteración o alteraciones genómicas puede permitir avances en el ensayo de diagnóstico y el desarrollo de terapias dirigidas.

20 Sumario de la invención

25 Se ha descubierto, sorprendentemente, que una mutación somática en el gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide (MYD88) está asociada con linfoma linfoplasmocitario. Por consiguiente, en algunos aspectos, la invención implica facilitar el diagnóstico de linfoma linfoplasmocitario en un sujeto seleccionando un sujeto sobre la base de que el sujeto presenta una o más de las siguientes características clínicas: anemia, hiperviscosidad, neuropatía, coagulopatías, esplenomegalia, hepatomegalia, adenopatía y una paraproteína sérica de IgM, obtener una muestra biológica del sujeto y determinar a partir de la muestra biológica si el sujeto tiene una mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2, donde la presencia de la mutación es indicativa de que el sujeto tiene linfoma linfoplasmocitario. En algunas realizaciones, el sujeto presenta dos o más de las características clínicas. En algunas realizaciones, el sujeto presenta tres o más de las características clínicas. En algunas realizaciones, dicha determinación comprende realizar un ensayo para examinar la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2. En algunas realizaciones, el ensayo comprende la reacción en cadena de la polimerasa específica de alelo realizada usando un cebador específico de alelo, donde el cebador específico de alelo hibrida en o cerca de su extremo 3' a la mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2. En algunas realizaciones, el cebador específico de alelo es la SEQ ID NO: 5.

40 De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método para distinguir el linfoma linfoplasmocitario de otras neoplasias de células B. El método comprende obtener una muestra biológica de un sujeto que presenta síntomas de un linfoma de células B, que es un síntoma que no excluye un diagnóstico de linfoma linfoplasmocitario. Síntomas de un linfoma de células B que no excluye un diagnóstico de LPL incluyen linfadenopatía localizada asintomática o periférica generalizada, diferencia plasmocitaria, afectación de la médula ósea, trombocitopenia autoinmunitaria, daño en el órgano final (insuficiencia renal), anemia, hiperviscosidad, neuropatía, coagulopatías, esplenomegalia, hepatomegalia, adenopatía y una paraproteína sérica de IgM. En algunas realizaciones, dicha determinación comprende realizar un ensayo para examinar la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2. En algunas realizaciones, el ensayo comprende la reacción en cadena de la polimerasa específica de alelo realizada usando un cebador específico de alelo, donde el cebador específico de alelo hibrida en o cerca de su extremo 3' a la mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2. En algunas realizaciones, el cebador específico de alelo es la SEQ ID NO: 5.

55 En algunas realizaciones, el método comprende obtener una muestra biológica de un sujeto que presenta síntomas tanto de LPL como de al menos una neoplasia de células B seleccionada del grupo que consiste en linfomas de la zona marginal nodal, linfoma de la zona marginal extranodal de tejido linfóide asociado con la mucosa (linfoma MALT), linfoma de la zona marginal de células B esplénicas, gammapatía monoclonal de importancia indeterminada y mieloma de células plasmáticas, determinar a partir de la muestra biológica si el sujeto tiene una mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2 y proporcionar un informe de si el sujeto tiene una mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2, donde la presencia de la mutación es indicativa de que el sujeto tiene linfoma linfoplasmocitario.

60 De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método para tratar el linfoma linfoplasmocitario en un sujeto. El método comprende seleccionar un sujeto sobre la base de que el sujeto tiene una mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2. En algunas realizaciones, el sujeto también presenta uno o más síntomas o características clínicas de LPL, tales como anemia, hiperviscosidad, neuropatía, coagulopatías, esplenomegalia, hepatomegalia, adenopatía y una paraproteína sérica de IgM. Al sujeto se le administra un inhibidor de la respuesta

primaria de diferenciación mieloide 88 (MYD88), un inhibidor de quinasa asociada a receptor de interleuquina 1/4 (IRAK-1/4) y/o un inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton (BTK) en una cantidad eficaz para tratar el linfoma linfoplasmocitario. En algunas realizaciones, el inhibidor de MYD88 es un compuesto peptidomimético ST2825. En algunas realizaciones, el inhibidor de IRAK-1/4 es N-(2-morfoliniletil)-2-(3-nitrobenzoilamido)-benzimidazol. En algunas realizaciones, el inhibidor de BTK es ibrutinib (PCI-32765).

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método para controlar la progresión o recidiva de linfoma linfoplasmocitario. El método comprende obtener múltiples muestras biológicas de un sujeto durante un periodo de tiempo, determinar a partir de las múltiples muestras biológicas el nivel de un transcrito que comprende una mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2, donde un cambio en el nivel del transcrito sobre el periodo de tiempo es indicativo de la progresión o recidiva de LPL en el sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto está experimentando quimioterapia para tratar LPL. En algunas realizaciones, el nivel del transcrito se mide usando reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real cuantitativa. En algunas realizaciones, la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real cuantitativa se realiza usando un cebador específico de alelo, donde el cebador específico de alelo hibrida en o cerca de su extremo 3' a la mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2. En algunas realizaciones, el cebador específico de alelo es la SEQ ID NO: 5.

También se describe en este documento un método para detectar una mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2 en un sujeto. El método comprende obtener una muestra biológica del sujeto que necesita dicha detección, determinar a partir de la muestra biológica si el sujeto tiene una mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2 por reacción en cadena de la polimerasa específica de alelo realizada usando un cebador específico de alelo donde el cebador específico de alelo hibrida en o cerca de su extremo 3' a la mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método para facilitar el diagnóstico de linfoma linfoplasmocitario. El método comprende seleccionar un sujeto sobre la base de que el sujeto presenta una o más de las siguientes características clínicas: anemia, hiperviscosidad, neuropatía, coagulopatías, esplenomegalia, hepatomegalia, adenopatía y una paraproteína sérica de IgM, obtener una muestra biológica del sujeto, determinar a partir de la muestra biológica si el sujeto tiene una mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2 y proporcionar un informe que resume los resultados estadísticamente significativos que indican que el sujeto tiene linfoma linfoplasmocitario si el sujeto tiene la mutación.

La muestra biológica incluye, aunque sin limitación, una muestra de médula ósea, ganglio linfático, bazo o sangre. En algunas realizaciones, la mutación provoca el cambio de un único nucleótido de T a C en el gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MYD88). En algunas realizaciones, la mutación provoca un cambio de aminoácido de leucina a prolina en la posición 265 en la proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88.

El sujeto (individuo) es un ser humano. En algunas realizaciones, el sujeto es sospechoso de LPL y presenta una o más de las características clínicas de LPL.

Sin pretender limitarse a la teoría de la invención, se cree que la presencia de la mutación en un sujeto en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2 es predictiva del riesgo de desarrollo de LPL. La presencia de la mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2 en un sujeto que tiene un nivel elevado (anómalo) de paraproteína sérica de IgM monoclonal es indicativa del riesgo de desarrollo de LPL. En algunas realizaciones, se proporciona un método para predecir el riesgo de desarrollo de LPL. El método comprende seleccionar un sujeto sobre la base de que el sujeto tiene un nivel elevado (anómalo) de paraproteína sérica de IgM monoclonal y determinar si el sujeto tiene una mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2, donde la presencia de la mutación es indicativa de que el sujeto está en riesgo aumentado de desarrollar LPL.

Incluso puede ser que los pocos casos en los que estaba presente la mutación en un sujeto que se diagnosticó con una neoplasia de células B (diferente a LPL y subtipo ABC de linfoma difuso de células B grandes) fuera un diagnóstico equivocado.

Estos y otros aspectos de la invención, así como diversas ventajas y utilidades serán evidentes con referencia a la descripción detallada. Cada aspecto de la invención puede abarcar diversas realizaciones como se entenderá.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la disomía uniparental adquirida (aUPD) en el cromosoma 3p que abarca MYD88 como se describe por WGS. Los datos de amplitud del cromosoma que demuestran la pérdida neutra del número de copias de heterocigosidad con el correspondiente desequilibrio de alelos para pacientes WM1 y WM3 que indican presencia de una aUPD en todo el clon tumoral (figura 1A). Para los pacientes WM2 y WM4, había una aUPD presente en una subpoblación de células tumorales como se demuestra por desequilibrio sostenido del alelo. La secuenciación de Sanger de confirmación de la mutación de MYD88 refleja los desequilibrios de alelo observados por WGS (figura 1B). Los datos de amplitud de cromosoma (figura 1C) y la secuenciación de Sanger de confirmación para L265 de

MYD88 (figura 1D) usando células mononucleares de PB con reducción en CD19 de comparaciones de tejido normal en pacientes los pacientes WM1 y WM2. Las fechas (1B, 1D) indican la posición del alelo variante.

La figura 2 muestra el ensayo de AS-PCR basado en gel de agarosa para la detección de L265P de MYD88. Los cebadores inversos con un desapareamiento interno en la tercera posición desde el extremo 3' y el cebador directo común se indicaron por las fechas (figura 2A). La secuenciación de Sanger confirmó que la línea celular de DLBCL OCI-LY3 portaba L265P de MYD88 homocigótico, mientras que OCI-LY19 era de tipo silvestre para L265P de MYD88. La posición de L265P se indicó por la flecha (figura 2B). La sensibilidad del ensayo de AS-PCR se evaluó por una dilución en serie del ADN mutante de L265P de MYD88 de OCI-LY3 con el ADN de tipo silvestre de OCI-LY19. Los productos de PCR (159 pb) se separaron en gel de agarosa al 2% y se indicaron por las flechas (figura 2C). El alelo de L265P de MYD88 mutante se detectó de forma constante a una dilución del 0,1%. Un ejemplo de pacientes con WM que portaban L265P de MYD88 homocigótico. Este paciente tenía una afectación de BM del 70% (figura 2D).

La figura 3 muestra la sensibilidad y especificidad del AS-PCR a tiempo real y el diagrama de dispersión de la comparación de pacientes positivos y negativos a L265P de MYD88 y donantes sanos. El ADN mutante de L265P de MYD88 (OCI-LY3) se diluyó con el ADN de tipo silvestre (OCI-LY19) a la concentración indicada en el diagrama de amplificación. El alelo de L265P de MYD88 mutante puede detectarse a una dilución del 0,08% (figura 3A). El coeficiente de correlación de la curva patrón fue 0,998 con un valor de pendiente de -3,48 (figura 3B). El análisis de curva de fusión reveló que el amplicón específico de mutante de L265P de MYD88 se fundía a 84°C. Solamente se encontró una amplificación mínima no específica en la dilución del 0,4% o inferior con un pico de fusión a 80°C (figura 3C). El diagrama de dispersión mostró dos grupos principales de pacientes con WM que estaban separados por 3,2 ciclos. El grupo con valores delta C_T que varían de 9,6 a 15,2 ciclos fue similar a los donantes sanos (valores delta C_T que varían de 10,7 a 16,9 ciclos). Este grupo se determinó como L265P de MYD88 negativo, mientras que otro grupo con valores delta C_T que varían de -0,2 a 6,4 ciclos se determinó como L265P de MYD88 positivo (figura 3D).

La figura 4 muestra fosforilación aumentada de BTK por transferencia de Western con anticuerpo fosfoespecífico en líneas celulares de macroglobulinemia de Waldenstrom (WM), BCWM.1 y MWCL-1, en comparación con líneas celular de mieloma múltiple, ANBL6 e INA6. Se usó el anticuerpo contra BTK total como control de carga. PCI-32765 bloqueaba significativamente la fosforilación de BTK en células de WM.

La figura 5 muestra que PCI-32765 bloqueaba la señalización de NF-κB, MAPK, Stat3 posterior, reduciendo significativamente la fosforilación de las proteínas IKBα, ERK1/2 y Stat3 en líneas celulares de WM, BCWM.1 y MWCL-1, en comparación con líneas celulares de mieloma múltiple, ANBL6 e INA6. Se usaron anticuerpos contra las correspondientes proteínas totales y GAPDH como controles de carga.

La figura 6 muestra que la atenuación de MYD88 por transducción con lentivirus y/o el uso de inhibidor de MYD88 conduce a fosforilación disminuida de BTK. Se usaron anticuerpos contra BTK total y/o GAPDH como control de carga.

La figura 7 demuestra que el inhibidor de BTK PCI-32765 induce la apoptosis de células de WM que expresan L265P de MYD88 en solitario y en combinación con el inhibidor de la ruta de MYD88 y el inhibidor de quinasa de IRAK 1/4. Se realizó análisis de apoptosis usando tinción de anexina V y PI después de tratamiento con PCI-32765 durante 24 horas (figura 7A). En la figura 7B, se realizó análisis de la apoptosis usando tinción de anexina V y PI después de tratamiento con el inhibidor PCI-32765 y de homodimerización de MYD88 durante 24 horas.

1: DMSO; 2: PCI-32765 (1,0 μM); 3: péptidos inhibidores de MYD88 (100 μM); 4: PCI-32765 + péptidos inhibidores de MYD88. PCI-32765 muestra eliminación sinérgica de células tumorales en combinación con un inhibidor de quinasa de IRAK 1/4 (figura 7C).

Descripción detallada de la invención

La presente invención, en un aspecto, se refiere al sorprendente descubrimiento de una mutación somática en el gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide (MYD88) en pacientes con linfoma linfoplasmocitario. En particular, la invención se basa en la identificación de una mutación somática en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2 que provoca un cambio de un único nucleótido de T→C en el gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide (MYD88) y un cambio no equivalente predicho en la posición del aminoácido 265 de leucina a prolina (L265P). Aunque un trabajo previo ha identificado la misma mutación en el subtipo ABC de linfoma difuso de células B grandes, este trabajo previo no hacía ninguna asociación entre la mutación y el linfoma linfoplasmocitario.

Como el mecanismo molecular de LPL era desconocido, el diagnóstico diferencial de muchas enfermedades que son morfológicamente similares a LPL estaba dificultado. El descubrimiento expuesto en la presente solicitud ayuda a discriminar LPL de otras entidades solapantes y permite dirigir un tratamiento específico de enfermedad.

De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona ensayos de diagnóstico para facilitar o ayudar al diagnóstico de linfoma linfoplasmocitario (LPL) en un sujeto. El LPL es una neoplasia de linfocitos B pequeños, linfocitos citoides plasmáticos y células plasmáticas, habitualmente implicando la médula ósea (BM) y a veces los ganglios linfáticos y el bazo. La macroglobulinemia de Waldenstrom (WM) se encuentra en un subconjunto significativo de pacientes con LPL y se define como LPL con afectación de BM y una gammapatía monoclonal de IgM de cualquier concentración.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se selecciona un sujeto para la evaluación de una mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2 basándose en que el sujeto sospechoso de tener LPL y se evalúa una muestra biológica del sujeto para la presencia de una mutación. La presencia de la mutación es indicativa de que el sujeto tiene LPL. Como se usa en este documento, "seleccionar un sujeto" significa identificar un sujeto que presenta una o más características clínicas de LPL para el análisis de diagnóstico adicional. La una o más características clínicas de LPL incluyen anemia, hiperviscosidad, neuropatía, coagulopatías, esplenomegalia, hepatomegalia, adenopatía y una paraproteína sérica de IgM. En algunas realizaciones, se selecciona un sujeto que presenta dos o más, tres o más, cuatro o más, cinco o más, seis o más o siete o más de estas características clínicas. El sujeto se selecciona por un facultativo médico (por ejemplo, un doctor, enfermera, facultativo de laboratorio clínico, asesor genético, etc.), una organización de asistencia sanitaria o un laboratorio clínico.

Ejemplos no limitantes de la muestra biológica incluyen médula ósea, ganglio linfático, bazo o sangre. La obtención de una muestra biológica de un sujeto significa tomar posesión de una muestra biológica del sujeto. Obtener una muestra biológica procedente de un sujeto significa retirar una muestra biológica del sujeto. Por lo tanto, la persona que obtiene una muestra biológica de un sujeto y determina la presencia de la mutación en la muestra no necesariamente obtiene la muestra biológica procedente del sujeto. En algunas realizaciones, la muestra biológica puede retirarse del sujeto por un facultativo médico (por ejemplo, un doctor, enfermera o un facultativo de laboratorio clínico) y después la proporciona a la persona que determina la presencia de la mutación. La muestra biológica la puede proporcionar, a la persona que determina la mutación, el sujeto o un facultativo médico (por ejemplo, un doctor, enfermera o un facultativo de laboratorio clínico). En algunas realizaciones, la persona que determina la mutación obtiene una muestra biológica del sujeto retirando la muestra del sujeto.

El término "mutación" significa cualquier cambio o diferencia en la secuencia de ácido nucleico o proteica de MYD88 en comparación con la secuencia de tipo silvestre que provoca la activación de MYD88 que conduce a la activación de NF- κ B. Las mutaciones incluyen, aunque sin limitación, mutaciones sin sentido, mutaciones de sentido alterado, mutaciones de desplazamiento de fase, mutaciones de reordenamiento, mutaciones de inserción y mutaciones de delección. En algunas realizaciones, la mutación es una mutación somática en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2 que provoca un cambio de un único nucleótido de T→C en el gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide (MYD88), y un cambio no equivalente predicho en la posición del aminoácido 265 de leucina a prolina (L265P).

Un experto en la materia apreciará que pueden usarse muchos métodos adecuados además de, e incluyendo los analizados en los ejemplos, para detectar mutaciones en el gen MYD88. Los métodos de detección que pueden usarse incluyen, aunque sin limitación, secuenciación directa, tecnologías de chip de ADN, espectroscopia de masas, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la polimerasa específica de alelo, reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real, PCR con transcriptasa inversa, movilidad electroforética, hibridación de ácidos nucleicos, hibridación *in situ* fluorescente y cromatografía líquida de alto rendimiento desnaturalizante.

En algunas realizaciones, las mutaciones en el gen MYD88 pueden detectarse por reacción en cadena de la polimerasa específica de alelo (AS-PCR). Para AS-PCR, se usan cebadores específicos de alelo que hibridan en o cerca de sus extremos 3' con una mutación particular en el gen MYD88. Si la mutación no está presente, el cebador desapareado 3' terminal no inicia la replicación y no se observa un producto de amplificación. En algunas realizaciones, solamente el cebador directo o el cebador inverso, hibrida en o cerca de sus extremos 3' con una mutación particular en el gen MYD88. En algunas realizaciones, tanto el cebador directo como el cebador inverso hibridan en o cerca de sus extremos 3' con una mutación particular en gen MYD88. En algunas realizaciones, el cebador específico de alelo es la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la mutación es una mutación somática en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2 que provoca un cambio de un único nucleótido de T→C en el gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide (MYD88), y un cambio no equivalente predicho en la posición del aminoácido 265 de leucina a prolina (L265P).

En algunas realizaciones, las mutaciones en el gen MYD88 pueden detectarse por la secuenciación directa de las moléculas de ácido nucleico. Las técnicas para la secuenciación directa del ADN son bien conocidas en la técnica. En una realización de la invención, las mutaciones pueden detectarse por secuenciación de Sanger, que puede incluir el uso de una enzima polimerasa termoestable, un cebador de secuenciación, dNTP y cantidades limitantes de ddNTP marcados de forma fluorescente o radiactiva de terminación de la cadena. La electroforesis en gel de poliacrilamida u otra técnica tal como electroforesis capilar pueden usarse para separar los productos de las reacciones de secuenciación seguido por la detección de los marcadores fluorescentes o radiactivos. En un ejemplo de esta realización de la invención, las mutaciones en MYD88 podrían determinarse usando secuenciación

automatizada en un analizador de ADN Applied Biosystems 3700 o 3730x1 DNA Analyzer™. Las mutaciones pueden identificarse comparando la secuencia de un sujeto con la de un individuo de tipo silvestre o con secuencias de referencia encontradas en las bases de datos públicas.

Otras realizaciones de la invención contemplan el uso de tecnologías de chip de ADN para la detección de mutaciones dentro del gen MYD88. Entre otras aplicaciones, las tecnologías de chip de ADN permiten la identificación de mutaciones dentro de las secuencias de la invención a través del análisis de los patrones de hibridación de una muestra de ácido nucleico sobre una microserie que se puede abordar de forma espacial de alta densidad de secuencias predeterminadas.

Otra técnica para la detección de mutaciones es análisis por HPLC desnaturalizante. Por consiguiente, una realización de la invención incluye el uso de una máquina Transgenomic Wave™ para el análisis por dHPLC de ácidos nucleicos para la identificación de mutaciones heterocigóticas o polimorfismos dentro las secuencias de la invención.

La invención también contempla el uso de espectroscopia de masas para el genotipado de las mutaciones. Las moléculas de ácido nucleico mutantes y de tipo silvestre pueden diferir en su masa debido a la diferente composición de las secuencias de tipo silvestre y mutantes, que permite la identificación de mutaciones basándose en la masa molecular de diferentes secuencias de nucleótidos. El uso de la espectroscopia de masas y, en particular, la espectroscopia de masas por ionización por desorción láser asistida por matriz con tiempo de vuelo (MALDI-TOF) para el genotipado de mutaciones, es bien conocida por los expertos en la materia relevante. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 6.043.031 describe un proceso basado en un espectrómetro de masas rápido y muy preciso para detectar una secuencia de ácido nucleico particular. La plataforma MassARRAY™ de SEQUENOM™ es un ejemplo de un sistema disponible en el mercado capaz de genotipar polimorfismos de un único nucleótido y detectar las mutaciones en los genes.

De acuerdo con un aspecto, la presente invención proporciona un método para distinguir linfoma linfoplasmocitario de otras neoplasias de células B seleccionadas del grupo que consiste en linfomas de la zona marginal nodal, linfoma de la zona marginal extranodal de tejido linfóide asociado a la mucosa (linfoma MALT), linfoma de la zona marginal de células B esplénicas, gammapatía monoclonal de importancia indeterminada y mieloma de células plasmáticas. El método comprende seleccionar o identificar un sujeto que presenta uno o más síntomas o características clínicas de LPL que solapan con uno o más síntomas de al menos una de las neoplasias de células B descritas anteriormente. Por tanto, el sujeto es un individuo que es sospechoso de tener LPL o una de las otras neoplasias de células B. El sujeto se selecciona para análisis de diagnóstico adicional por un facultativo médico (por ejemplo, un doctor, enfermera, facultativo de laboratorio clínico, asesor genético, etc.), una organización de asistencia sanitaria o un laboratorio clínico.

El uno o más síntomas o características clínicas de LPL incluyen anemia, hiperviscosidad, neuropatía, coagulopatías, esplenomegalia, hepatomegalia, adenopatía y una paraproteína sérica de IgM. Además, el sujeto también puede presentar una o más de las siguientes características clínicas o síntomas de otras neoplasias de células B: linfadenopatía periférica localizada o generalizada asintomática, diferencia plasmocitaria, afectación de la médula ósea, trombocitopenia autoinmunitaria, linfocitos vellosos en sangre periférica, daño en el órgano final (hipercalcemia, insuficiencia renal, lesiones óseas), infecciones recurrentes, creatina elevada, hiperuricemia e hipoalbuminemia. El sujeto sospechoso de tener LPL o una de las otras neoplasias de células B se evalúa para la presencia de una mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2, donde la presencia de la mutación es indicativa de que el sujeto tiene LPL.

Un informe que resume los resultados del análisis, es decir, la presencia o ausencia de la mutación y cualquier otra información respecto al análisis, podría generarse opcionalmente como parte del análisis (que puede mencionarse indistintamente en este documento como "proporcionar" un informe, "producir" un informe o "generar" un informe). Los ejemplos de informes pueden incluir, aunque sin limitación, informes en papel (tales como impresiones generadas por ordenador de los resultados de ensayo) o formatos equivalentes e informes almacenados en un medio legible por ordenador (tal como un CD, unidad de disco duro, o servidor de red informática, etc.) los informes, particularmente los almacenados en un medio legible por ordenador, pueden ser parte de una base de datos (tal como una base de datos de registros de pacientes, que puede ser una "base de datos segura" que tiene características de seguridad que limitan el acceso al informe, tal como para permitir que solamente el paciente y los facultativos médicos del paciente vean el informe, por ejemplo). Además de, o como alternativa a, generar un informe tangible, también puede presentarse informes en una pantalla de ordenador (o la pantalla de otro dispositivo electrónico o instrumento).

Un informe adicionalmente puede transmitirse, comunicarse o presentarse (estos términos pueden usarse en este documento indistintamente), tal como al individuo que se ha sometido a ensayo, un facultativo médico (por ejemplo, un doctor, enfermera, facultativo de laboratorio clínico, asesor genético, etc.), una organización de asistencia sanitaria, un laboratorio clínico y/o cualquier otro interesado que pretenda ver o poseer el informe. La acción de "transmitir" o "comunicar" un informe puede ser por cualquier medio conocido en la técnica, basado en la forma del informe e incluye transmisiones tanto orales como no orales. Además, la "transmisión" o "comunicación" de un

informe puede incluir entregar un informe ("promover") y/o recuperar ("extraer") un informe. Por ejemplo, los informes no orales pueden transmitirse/comunicarse por medios tales como los transferidos físicamente entre los interesados (tal como para informes en formato de papel), tal como los entregados físicamente de una parte a otra, o por transmisión electrónica o en forma de señal (por ejemplo, a través de un correo electrónico o por internet, por facsímil y/o por cualquier método de comunicación por cable o inalámbrica conocido en la técnica), tal como recuperándose de una base de datos almacenada en un servidor de red informática, etc.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método para tratar LPL. El método comprende seleccionar un sujeto basándose en que el sujeto tiene una mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2 y administrar al sujeto un inhibidor de la respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MYD88), un inhibidor de la quinasa 1/4 asociada al receptor de interleuquina (IRAK-1/4) y/o un inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton (BTK) en una cantidad eficaz para tratar el linfoma linfoplasmocitario. Un ejemplo no limitante de un inhibidor de MYD88 incluye el compuesto peptidomimético ST2825 (documento WO 2006/06709). Un ejemplo no limitante de un inhibidor de IRAK-1/4 es N-(2-morfoliniletil)-2-(3-nitrobenzoilamido)-benzimidazol. En algunas realizaciones, los inhibidores de BTK útiles en la presente invención bloquean la señalización de L265P de MYD88 y BTK. Un ejemplo no limitante de un inhibidor de BTK incluye ibrutinib (PCI-32765).

En algunas realizaciones, el método comprende seleccionar un sujeto basándose en que el sujeto tiene una mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2 y presenta uno o más síntomas de LPL. El sujeto seleccionado se trata usando una cantidad eficaz de bortezomib (Velcade®), bendamestina, alemtuzumab, y/o rituximab, pero no bisfosfonatos o fludarabina.

El inhibidor de MYD88, el inhibidor de IRAK-1/4 y/o el inhibidor de BTK se administran en una cantidad eficaz. Una cantidad eficaz es una dosis suficiente para proporcionar un resultado médicamente deseable y puede determinarse por un experto en la materia usando métodos rutinarios. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz es una cantidad que provoca cualquier mejora en la afección que se está tratando. En algunas realizaciones, una cantidad eficaz puede depender del tipo y grado de LPL que se está tratando y/o el uso de uno o más agentes terapéuticos adicionales. Sin embargo, un experto en la materia puede determinar las dosis e intervalos apropiados de los agentes terapéuticos a usar, por ejemplo, basándose en ensayo *in vitro* y/o *in vivo* y/u otros conocimientos de las dosificaciones del compuesto.

Cuando se administran a un sujeto, las cantidades eficaces del agente terapéutico dependerán, por supuesto, de la enfermedad particular que se esté tratando; la gravedad de la enfermedad; los parámetros individuales del paciente incluyendo la edad, estado físico, estatura y peso, el tratamiento concurrente, la frecuencia del tratamiento y el modo de administración. Estos factores son bien conocidos para los expertos en la materia y pueden abordarse con experimentación exclusivamente rutinaria. En algunas realizaciones, se usa una dosis máxima, es decir, la dosis segura más alta de acuerdo con el sensato criterio médico.

En el tratamiento de LPL, una cantidad eficaz es una cantidad que ralentiza la progresión de la enfermedad, detiene la progresión de la enfermedad o revierte la progresión de la enfermedad. Una cantidad eficaz incluye, aunque sin limitación, esa cantidad necesaria para ralentizar, reducir, inhibir, mejorar o revertir uno o más síntomas asociados con LPL. En algunas realizaciones, dichos términos se refieren a una reducción en los niveles de paraproteína sérica de IgM, anemia, hiperviscosidad, neuropatía, coagulopatías, esplenomegalia, hepatomegalia y adenopatía.

Una cantidad eficaz de un compuesto típicamente variará de aproximadamente 0,001 mg/kg a aproximadamente 1000 mg/kg en una o más administraciones de dosis, durante uno o varios días (dependiendo del curso del modo de administración y los factores analizados anteriormente).

Los niveles reales de dosificación del agente terapéutico pueden variarse para obtener una cantidad que es eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, las composiciones y el modo de administración. El nivel de dosificación seleccionado depende de la actividad del compuesto particular, la vía de administración, el tejido que se está tratando y la historia médica previa del paciente que se está tratando. Sin embargo, pertenece a las habilidades de la técnica iniciar las dosis del compuesto a niveles inferiores a los requeridos para conseguir el esfuerzo terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se consiga el efecto deseado.

Las preparaciones farmacéuticas y compuestos que comprenden el inhibidor de MYD88, el inhibidor de IRAK-1/4 y/o el inhibidor de BTK se administran a un sujeto por cualquier vía adecuada. Por ejemplo, las composiciones pueden administrarse por vía oral, incluyendo por vía sublingual, por vía rectal, por vía parenteral, por vía intracisternal, por vía intravaginal, por vía intraperitoneal, por vía tópica y por vía transdérmica (como por polvos, pomadas o gotas), por vía bucal o por vía nasal. Las preparaciones farmacéuticas de la presente invención pueden incluir o diluirse en un vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" como se usa en este documento significa una o más cargas compatibles, diluyentes u otras sustancias, que son adecuadas para administración a un ser humano u otro mamífero tal como un perro, un gato o un caballo. El término "vehículo" indica un ingrediente orgánico o inorgánico, natural o sintético, con el que se combina el ingrediente activo para facilitar la aplicación. Los vehículos son capaces de entremezclarse con las preparaciones de la presente invención, y entre sí,

de un modo que no se confiera sustancialmente interacción a la eficacia o a la estabilidad farmacéutica deseada. Los vehículos adecuados para formulaciones orales, subcutáneas, intravenosas, intramusculares, etc. pueden encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa.

De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un método para controlar la progresión o recidiva de linfoma linfoplasmocitario en un sujeto. El método comprende obtener múltiples muestras biológicas de un sujeto durante un periodo de tiempo, determinar a partir de las múltiples muestras biológicas el nivel de un transcrito que comprende una mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2, donde un aumento en el nivel de transcrito durante un periodo de tiempo es indicativo de la progresión o recidiva de LPL en el sujeto.

Como se usa en este documento, un transcrito que comprende una mutación significa un ácido nucleico o proteína MYD88 que tiene una mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2. El nivel de transcrito que comprende una mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2 puede determinarse por cualquier medio conocido para los expertos en la materia incluyen, aunque sin limitación, transferencia de Western, transferencia de Northern y reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real cuantitativa. En algunas realizaciones, la cuantificación de los niveles de transcrito se consigue por PCR a tiempo real cuantitativa usando el sistema de detección de secuencia ABI PRISM® 7600, 7700, o 7900 (PE-Applied Biosystems, Foster City, Calif.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los métodos de PCR a tiempo real cuantitativa son bien conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real cuantitativa se realiza usando un cebador específico de alelo, donde el cebador específico de alelo hibrida en o cerca de su extremo 3' a una mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2. En algunas realizaciones, el cebador específico de alelo es la SEQ ID NO: 5.

El nivel del transcrito que comprende la mutación es indicativo del estado de la enfermedad. En sujetos normales (sanos) la mutación está ausente. En sujetos enfermos, el transcrito que comprende la mutación se expresa a un nivel coherente con el estado (progresión) de la enfermedad. Aunque se cree que la mayor parte de la transcripción del gen MYD88 sucede en la médula ósea, habrá niveles de transcrito y proteína presentes en la circulación a causa del recambio normal y la presencia de células muertas en la sangre.

Como se usa en este documento, un cambio en el nivel del transcrito que comprende una mutación significa que la cantidad o concentración del transcrito cambia suficientemente en el tiempo. Un cambio en el nivel del transcrito durante el periodo de tiempo puede ser cualquier cambio estadísticamente significativo que sea detectable. Dicho cambio puede incluir, aunque sin limitación, aproximadamente un cambio de un 1%, aproximadamente un 10%, aproximadamente un 20%, aproximadamente un 40%, aproximadamente un 80%, aproximadamente un factor 2, aproximadamente un factor 4, aproximadamente un factor 8, aproximadamente un factor 20 o aproximadamente un factor 100 en el tiempo. Un aumento en el nivel del transcrito es indicativo de progresión desfavorable de la enfermedad, mientras que una disminución en el nivel del transcrito es indicativa de una progresión favorable de la enfermedad.

Como se usa en este documento, un "periodo de tiempo" pretende incluir un periodo de días, semanas, meses o incluso años. Las múltiples muestras biológicas del sujeto se obtienen durante un periodo de tiempo, es decir, se obtiene periódicamente una muestra biológica en el tiempo a diversos intervalos. Una muestra biológica puede obtenerse a cualquier intervalo. Por ejemplo, una muestra biológica puede recogerse cada día durante semanas, meses o años. Como alternativa, una muestra biológica puede obtenerse una vez a la semana o seis veces a la semana durante un periodo de semanas, meses o años. En una realización, una muestra biológica se obtiene una vez a la semana durante un periodo de tres meses. En una realización, una muestra biológica se obtiene una vez al mes durante un periodo de meses o años.

En algunas realizaciones, el sujeto está experimentando quimioterapia para tratar LPL. Un aumento en el nivel del transcrito en durante el periodo de tiempo en un sujeto que está experimentando quimioterapia para tratar LPL indicaría que hay progresión de la enfermedad y que el sujeto no está respondiendo a la terapia. Una disminución en el nivel del transcrito durante el periodo de tiempo en un sujeto que está experimentando quimioterapia para tratar LPL indicaría que el sujeto está respondiendo a la terapia.

Además, en este documento se describe un método para detectar una mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2 en un sujeto. El método comprende obtener una muestra biológica del sujeto que necesita dicha detección y determinar a partir de la muestra biológica si el sujeto tiene una mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2 por reacción en cadena de la polimerasa específica de alelo (AS-PCR). La AS-PCR se realiza usando un cebador específico de alelo donde el cebador específico de alelo hibrida en o cerca de su extremo 3' a la mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2. En algunas realizaciones, el cebador específico de alelo es la SEQ ID NO: 5. En algunas realizaciones, la mutación es una mutación somática en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2 que provoca el cambio de un único nucleótido de T→C en el gen de respuesta primaria de diferenciación mielóide (MYD88) y un cambio no equivalente predicho en la posición del aminoácido 265 de leucina a prolina (L265P).

Un sujeto que necesita detección puede ser un sujeto sospechoso de tener LPL. El sujeto puede presentar una o

más características clínicas de LPL incluyendo, aunque sin limitación, hiperviscosidad, neuropatía, coagulopatías, esplenomegalia, hepatomegalia, adenopatía y una paraproteína sérica de IgM. En algunas realizaciones, un sujeto que necesita detección puede ser un sujeto sospechoso de tener el subtipo ABC de linfoma difuso de células B grandes. El sujeto puede presentar una o más características clínicas del subtipo ABC de linfoma difuso de células B grandes incluyendo, aunque sin limitación, ganglio linfático dilatado en el cuello, la ingle o el abdomen, fiebre, pérdida de peso y sudores nocturnos abundantes. Un sujeto que necesita detección puede ser un sujeto sospechoso de tener linfoma del tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica (MALT). El sujeto puede presentar una o más características clínicas de MALT incluyendo, aunque sin limitación, inflamación crónica causada por infección por *Helicobacter pylori*, dolor estomacal, dispepsia, náuseas, estreñimiento y anemia.

La presente invención se ilustra adicionalmente por el siguiente ejemplo, que no debe interpretarse de ninguna manera como adicionalmente limitante.

Ejemplos

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Se estudiaron treinta pacientes que cumplen los criterios consenso para el diagnóstico de WM por secuenciación del genoma completo (WGS). Su participación se aprobó por el comité de revisión institucional en el Instituto del Cáncer Dana-Farber. Las características de estos pacientes se resumen en la tabla 1. Nueve de estos pacientes tenían una historia familiar de una neoplasia de células B. Se obtuvieron células mononucleares de médula ósea (BM) y de sangre periférica (PB) de estos individuos después de centrifugación en gradiente de densidad. Se usó clasificación con perlas magnéticas para el aislamiento de células tumorales (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). La pureza de las células B aisladas (CD19+) por esta técnica fue de más de un 90%, y la población media de células B clonales por restricción de cadena ligera fue de un 96% (tabla 1). El tiempo medio desde el diagnóstico de WM hasta la recogida de BM para los 30 pacientes fue 14,1 (intervalo 0-138,2 meses). Las células mononucleares de PB de CD19 reducidas se recogieron en tejido normal coincidente de 19 de los 30 pacientes y se realizó WGS de tejido tumoral/normal emparejado de 10 de estos pacientes. Las características basales para estos 10 pacientes no diferían significativamente de los pacientes no emparejados.

Después del aislamiento de las células, se aisló el ADN de alto peso molecular usando el mini kit de ADN/ARN Allprep (Qiagen, Valencia, CA). Para 10 pacientes, se realizó WGS de muestras tumorales y normales coincidentes, y para 20 pacientes adicionales se secuenciaron completamente las muestras tumorales en solitario. La construcción de la biblioteca y WGS de los clones finales emparejados se realizó por Complete Genomics Inc. (CGI; Mountain View, CA) como se describe previamente. Las secuencias leídas se alinearon con el genoma de referencia (NCBI Compilación 37) y las lecturas en las regiones potencialmente variantes (SNV, inserciones y deleciones) se identificaron y sometieron a ensamblaje local *de novo*. El ensamblador entonces valoró las identificaciones tanto variantes como homocigóticas consenso de referencia en cada muestra usando un marco bayesiano que consideraba la profundidad de la lectura, la calidad de la indentificación base individual y las probabilidades de ubicación. Se generó y presentó un ensayo de relación de probabilidades para cada variante (valor de variante) expresado en decibelios (dB). Se identificaron variantes somáticas de alta confianza usando CGAT versión 1.3 con un valor somático de 0,1 que da una tasa estimada de una falsa variante somática de un único nucleótido por 17,7 Mb de ADN. El número de copias se estimó por la profundidad de lectura normalizada al % de GC y se identificó la disomía uniparental adquirida (aUPD) como pérdida de heterocigosidad sin cambio en el número de copias. Además, se determinó el desequilibrio del alelo por el porcentaje de lecturas que se ubican en el alelo minoritario en SNP heterocigóticos que se promedió sobre 500 Kb.

Para validar los resultados de WGS, se diseñó un conjunto de cebadores de PCR para amplificar un fragmento de 726 pb que cubre la mutación L265P de MYD88 (directo: 5'-ggg ata tgc tga act aag ttg cca c-3' (SEQ ID NO: 1) e inverso: 5'-gac gtg tct gtg aag ttg gca tct c-3' (SEQ ID NO: 2)). Se usaron veinte nanogramos de ADN genómico para la amplificación por PCR. Después de la desnaturalización inicial a 95°C durante 2 minutos, se realizaron 40 ciclos de amplificación por PCR, consistiendo cada uno en una etapa de desnaturalización de 94°C durante 30 segundos, hibridación a 65°C durante 30 segundos y extensión a 68°C durante 1 minuto, seguido por una etapa final a 68°C durante 10 minutos. Los fragmentos amplificados se aislaron por el kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen, CA) y se secuenciaron usando el cebador directo 5'-gct gtt gtt aac cct ggg gtt gaa g-3' (SEQ ID NO: 3), y el cebador inverso 5'-gac gtg tct gtg aag ttg gca tct c-3' (SEQ ID NO: 4).

Se usó la secuenciación de Sanger para validar los resultados de WGS en muestras tumorales de los 30 pacientes con WM y también en tejido emparejado normal de 19 pacientes, incluyendo los 10 individuos con datos de WGS emparejados. También las células BM aisladas CD19+ y CD138+ de una cohorte no relacionada de otros 12 pacientes con WM; las células BM aisladas CD19+ de 8 pacientes con MGUS de IgM; las células BM aisladas CD138+ de 8 pacientes con mieloma múltiple (MM); las células mononucleares de PB aisladas CD19+ de 12 donantes sanos; así como las líneas celulares de WM BCWM.1, MWCL-1 y WM-WSU; la línea celular Ramos que secreta IgM y las líneas celulares de MM MM1.S, RPMI 8226 y U266 también se sometieron a secuenciación de

Sanger para MYD88. La clonación TA y la secuenciación de al menos 10 clones también se realizó usando los cebadores anteriores para células de BM aisladas CD19+ para 4 pacientes con MGUS de IgM (Genewiz, S. Plainfield, NJ).

5 Resultados

Los genomas tumorales y normales se secuenciaron ambos hasta un promedio de cobertura de 66X (intervalo 60-91X) de lecturas individuales ubicadas. El rendimiento bruto de ubicación promedio para estos genomas fue 186,89 (intervalo 171,56-262,03 Gb). En nuestro análisis inicial de los 10 genomas emparejados, se identificó una variante de secuencia recurrente con un valor de variante de 189 (intervalo 74-345) en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2 que provoca un cambio de un único nucleótido T→C en el gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide (MYD88) y un cambio no equivalente predicho en la posición del aminoácido 265 de leucina a prolina (L265P). Esta variante fue la más común de una media de 3.419 (intervalo 2.540-4.011) variantes somáticas identificadas por WGS en los 10 pacientes emparejados usando un valor somático de 0,1. Por WGS, la variante L265 de MYD88 se encontró como una mutación somática en células tumorales de los 10 pacientes emparejados, que también se encontró en sus tejidos normales coincidentes y también se observó en células tumorales de 16 de los 20 pacientes con WM no emparejados. La presencia frente a la ausencia de la mutación L265 de MYD88 en estos pacientes no se veía afectada por el tiempo desde el diagnóstico de WM (14,1 frente a 14,8 meses, respectivamente; $p=0,40$). Para 22 de los 26 pacientes, la variante L265P de MYD88 era heterocigótica, mientras que en 4 pacientes un evento UPD (media de 49,5 MB, intervalo 48,5-50,0 MB) en 3p22.2 producía la presencia homocigótica de la variante en al menos un subconjunto de células tumorales (figura 1A, B). Estos eventos UPD estaban ausentes en tejido normal para 2 de los 4 pacientes que tenían muestras emparejadas (figura 1C, D). No se observaron características clínicas y de laboratorio distintivas para pacientes con la mutación L265 de MYD88 homocigótica frente a heterocigótica, aunque los pacientes con L265 de MYD88 homocigótica tenían un intervalo considerablemente más largo desde el diagnóstico de WM (56,4 frente a 11,1 meses; $p=0,30$) y se requerirá, invariablemente, una serie mayor de pacientes para determinar la importancia de este hallazgo.

La secuenciación de Sanger confirmó la presencia de la variante L265P de MYD88 en las 26 muestras tumorales reveladas por WGS, así como en una muestra de tumor de un paciente adicional que tenía evidencias del nivel de lectura de la variante L265P de MYD88 pero no se identificaron con confianza adecuada. En este paciente, una subpoblación (aproximadamente un 10%) de las células tumorales mostraba la mutación L265P de MYD88. Por secuenciación de Sanger, la variante L265P de MYD88, por lo tanto, estaba presente en tumores de 27 de 30 (90%) pacientes con WM, que incluía pacientes con enfermedad esporádica, así como familiar, en los que la variante se observaba en la misma frecuencia. La secuencia de Sanger también confirmó la ausencia de la mutación L265P de MYD88 en tejido normal de los 10 pacientes emparejados que experimentaron WGS, así como en otros 9 pacientes no emparejados que tenían la mutación L265 de MYD88 por WGS y para los que estaba disponible tejido normal.

En una cohorte no relacionada de 12 pacientes con WM, se observó adicionalmente por secuenciación de Sanger una variante L265P de MYD88 heterocigótica en 11 (92%) pacientes. De forma importante, la variante L265P de MYD88 estaba presente en células seleccionadas tanto CD19+ como CD138+ en estos pacientes, coherente con la distribución conocida del clon WM maligno que se extiende de las células B maduras a las células plasmáticas. Por secuenciación de Sanger, también se detectó una variante L265P de MYD88 heterocigótica en células de WM BCWM.1 y MXCL-1. En contraste, la variante L265P de MYD88 no se encontró en las líneas celulares secretoras de IgM WM-WSU y Ramos, que portan ambas $t(8; 14)$ y en ninguna de las líneas celulares de mieloma. Además, no se detectó la variante L265P de MYD88 en células B seleccionadas CD19+ de 12 individuos sanos, ni en muestras tumorales de 8 de los 8 pacientes de mieloma. Por secuenciación directa de Sanger, la mutación L265 de MYD88 estaba ausente en 7 de 8 (87,5%) pacientes con MGUS de IgM cuyas características se describen en la tabla 2. En el único paciente con MGUS de IgM en que se detectó la mutación L265P de MYD88, se observó LPC aumentada en este aspirado de BM y una biopsia central mostró un nódulo aislado, pero sin infiltración definida por células de LPL necesario para el diagnóstico consenso de WM. El curso posterior se ha marcado por elevación progresiva de los niveles de IgM y un hematocrito descendente. También se emprendió la clonación TA y la secuenciación de al menos 10 clones para 4 pacientes con MGUS de IgM cuya secuenciación directa de Sanger no reveló la variante L265 de MYD88. La variante L265 de MYD88 estaba ausente en todos los clones para estos 4 pacientes con MGUS de IgM. Estos hallazgos pueden significar potencialmente que la adquisición de la variante L265 de MYD88 representa un evento transformante de MGUS de IgM a WM, o que la frecuencia de la variante L265 de MYD88 es demasiado baja para conseguirse en pacientes con MGUS de IgM por WGS o secuenciación de Sanger. Otra consideración es que MGUS de IgM podría ser en sí misma heterogénea, conduciendo la adquisición de L265P de MYD88 a WM, mientras que en otros casos con MYD88 de tipo silvestre, pudiera dar como resultado una trayectoria oncogénica diferente.

El descubrimiento de una mutación MYD88 es de importancia dada su función como molécula adaptadora en la señalización del receptor de tipo Toll (TLR) y el receptor de interleuquina-1 (IL-1R). Todos los TLR excepto TLR3 usan MYD88 para facilitar su señalización. Después de la estimulación de TLR o IL-1R, se recluta MYD88 en el complejo de receptor activado como un homodímero que después forma complejos con IRAK4, que conduce a su autofosforilación. El complejo MYD88/IRAK4 entonces recluta y activa IRAK1 e IRAK2. El factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TRAF-6) entonces se activa por IRAK1 que conduce a una activación

prematura de NF- κ B, mientras que IRAK2 facilita la activación tardía de NF- κ B. La mutación L265P en MYD88 se produce en un resto que está altamente conservado en la evolución y contribuye a una lámina- β en el núcleo hidrófobo del dominio. Staudt y colaboradores informaron recientemente de la presencia de la mutación L265P de MYD88 en un subconjunto de tumores recogidos de pacientes con el subtipo ABC de linfoma difuso de células B grandes (DLBCL) y en unos pacientes con linfomas del tejido linfoide asociado a mucosa gástrica (MALT). En contraste, la mutación L265P de MYD88 estaba ausente en muestras tumorales de pacientes con el subtipo GCB de DLBCL y linfoma de Burkitt. La frecuencia de un 90% observada para la variante L265 de MYD88 en nuestros estudios de 2 cortes independientes de pacientes con WM es mucho más extensa que la observada en linfomas DLBCL (29%) y MALT (6%).

Staudt y colaboradores también demostraron que la expresión ectópica de L265P de MYD88, pero no MYD88 de tipo silvestre, evitaba la apoptosis de líneas celulares DLBCL ABC que expresan L265P que experimentaban atenuación total de MYD88. Los experimentos de co-inmunoprecipitación en estas líneas celulares con la mutación L265P también demostraron unión potenciada a y fosforilación de IRAK1, que estaba ausente en células con MYD88 de tipo silvestre. Adicionalmente, los estudios de atenuación de MYD88 o IRAK1, o la inhibición de la función de IRAK1 con un inhibidor de la quinasa IRAK1/4 condujo a pérdida de la señalización de NF- κ B. Asimismo, se observó que la atenuación de MYD88 por transducción con lentivirus y/o tratamiento con un péptido 17 inhibidor de homodimerización de MYD88 o inhibidor 18 de IRAK1/4 de células de WM BCWM.1 y MWCL-1 que poseen la mutación L265P de MYD88 conduce a pérdida de la señalización de NF- κ B y apoptosis potenciada. Como la señalización de NF- κ B representa un determinante crítico del crecimiento y supervivencia de células de WM, abordar la señalización tónica de MYD88/IRAK es de importancia potencial para la terapia de WM.

En resumen, usando WGS, se ha identificado una novedosa variante somática ampliamente expresada (L265P de MYD88) en LPC maligna de pacientes con WM, que ayuda a discriminar WM de otras entidades solapantes y cuya función putativa en la señalización de NF- κ B es de importancia para la linfomagénesis de WM. Estos estudios ofrecen conocimientos novedosos de la patogénesis de WM y proporcionan un marco para el desarrollo de herramientas de diagnóstico y terapias dirigidas para pacientes con WM.

Ejemplo 2

Materiales y métodos

Paciente y muestras

Se incluyeron noventa y siete pacientes que cumplen los criterios de diagnóstico para WM y 40 donantes sanos (10 BM y 30 PBMC) en este estudio. Su participación se aprobó por el IRB en el Instituto del Cáncer Dana-Farber. Las células mononucleares de médula ósea (BMMC) se clasificaron usando perlas magnéticas. La pureza de las células B aisladas (CD19+) fue mayor de un 90%. El ADN se extrajo usando el mini kit de ADN/ARN Allprep (Qiagen, Valencia, CA). Las líneas celulares de DLBCL OCI-LY3 y OCI-LY19 las proporcionó amablemente el Dr. Mark Minden de la University Health Network de Canadá.

Reacción en cadena de la polimerasa específica de alelo (AS-PCR)

Se diseñaron dos cebadores inversos para diferenciar el alelo mutante y de tipo silvestre de L265P de MYD88. Para optimizar la especificidad, se introdujo un desapareamiento interno en la tercera posición desde el extremo 3'. El cebador inverso específico de mutante fue 5'-CCT TGT ACT TGA TGG GGA aCG-3' (SEQ ID NO: 5) y el cebador inverso específico de tipo silvestre fue 5'-GCC TTG TAC TTG ATG GGG AaC A-3' (SEQ ID NO: 6). El cebador directo común fue 5'-AAT GTG TGC CAG GGG TAC TTA G-3' (SEQ ID NO: 7). La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 μ l con 50 nM de cada cebador y 50 ng de ADN usando la PCR SuperMix High Fidelity (Life technology, CA). Las condiciones de termociclado fueron: 2 min a 94°C, seguido por 40 ciclos de 94°C durante 30 s, 57°C durante 30 s, y 68°C durante 30 s, con una extensión final de 68°C durante 5 min. Los productos de PCR amplificados (159-pb) se separaron en gel de agarosa a un 2%. Para confirmar la secuencia, los productos de PCR se purificaron por el kit de extracción de gel QIA quick (Qiagen, CA) y se secuenciaron usando cebadores de PCR tanto directo como inversos.

AS-PCR a tiempo real

La detección cuantitativa de la mutación L265P de MYD88 se desarrolló usando la mezcla maestra de PCR Power SYBR® Green descrita anteriormente de acuerdo con las instrucciones del fabricante en el sistema de detección de secuencia ABI Prism 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA). En resumen, se realizó la reacción de PCR en un volumen final de 25 μ l con 25 nM de cada cebador y 50 ng de ADN. Las condiciones de termociclado fueron: 10 min a 95°C, seguido por 40 ciclos de 95°C durante 15 s y 60°C durante 60 s. Cada muestra se ensayó por triplicado. La curva patrón para L265P de MYD88 se generó por una dilución en serie del ADN mutante con el ADN de tipo silvestre (50%, 10%, 2%, 0,4%, 0,08% y tipo silvestre). Para la PCR de referencia correspondiente, el cebador directo es el mismo que el usado para la AS-PCR (5'-AAT GTG TGC CAG GGG TAC TTA G-3'; (SEQ ID NO: 7)) y el cebador inverso está localizado 53 pb cadena abajo del cebador de AS-PCR (5'-TGG TGT AGT CGC AGA CAG

TGA-3'; (SEQ ID NO: 8)). Los niveles del mutante L265P de MYD88 en las muestras del paciente se calcularon basándose en el valor de delta CT y la curva patrón.

Secuenciación de Sanger

Se diseñaron el cebador de PCR directo 5'-GGG ATA TGC TGA ACT AAG TTG CCA C-3' (SEQ ID NO: 1) y el cebador de PCR inverso 5'-GAC GTG TCT GTG AAG TTG GCA TCT C-3' (SEQ ID NO: 4) para amplificar un fragmento de 726 pb que cubre el sitio L265P de MYD88. Se asilaron los productos de PCR amplificados por el kit de extracción de gel QIA quick (Qiagen, CA) y se secuenciaron usando el cebador de PCR inverso y un cebador de secuenciación 5'-GCT GTT GTT AAC CCT GGG GTT GAA G-3' (SEQ ID NO: 3).

Análisis estadístico

La correlación entre el estado de L265P de MYD88 y los parámetros clínicos se evaluó por ANOVA no paramétrico. La correlación entre los cambios de afectación de BM y los niveles de mutante L265P de MYD88 se evaluó por regresión lineal. Todos los análisis se realizaron con R (R Foundation for Statistical Computing, Viena, Austria).

Resultados

Diseño de AS-PCR convencional

La mutación somática L265P en el gen MYD88 se encontró en aproximadamente el 90% de los pacientes con WM. Para determinar de forma eficaz y rápida el estado de L265P de MYD88, se desarrolló un ensayo de AS-PCR asequible que puede implementarse fácilmente en cualquier laboratorio con tecnología de PCR convencional. Como se muestra en la figura 2A, los cebadores AS están localizados en el exón 5 mientras que el cebador directo común está localizado en el intrón 4. Para potenciar la especificidad en la reacción de AS-PCR, se introdujo un desapareamiento adicional (T>A) en la tercera posición desde extremo 3' de los cebadores AS. Se evaluó la sensibilidad del ensayo de AS-PCR por una dilución en serie del ADN aislado de la línea celular de DLBCL OCI-LY3 (L265P de MYD88 homocigótico) con el ADN de la línea celular de DLBCL OCI-LY19 (L265P de MYD88 de tipo silvestre). El estado de L265P de MYD88 de las líneas celulares se confirmó por secuenciación de Sanger (figura 2B). Las evaluaciones de la sensibilidad demostraron que el alelo mutante de L265P de MYD88 puede detectarse de forma constante a una dilución del 0,1% en el ensayo de AS-PCR basado en gel (figura 2C).

Este ensayo entonces se aplicó a 97 pacientes con WM que no habían recibido intervenciones farmacológicas en el momento de las biopsias de BM. Se encontraron 87/97 (89,7%) positivos para la mutación L265P de MYD88. Para verificar adicionalmente el ensayo de AS-PCR, se secuenció la cohorte completa para la posición L265P de MYD88. Entre los 87 pacientes positivos para L265P de MYD88 por AS-PCR, 82 fueron positivos mientras que 5 fueron negativos por secuenciación de Sanger. Los 5 pacientes negativos para L265P de MYD88 por secuenciación de Sanger mostraron señales débiles en el ensayo de AS-PCR basado en gel. Por el contrario, todos los pacientes negativos para L265P de MYD88 por AS-PCR permanecieron negativos por secuenciación de Sanger. Además, se analizó el ADN de 40 donantes sanos (10 BM y 30 PBMC) y no se detectó ninguna mutación L265P de MYD88 por ninguno de los métodos. Los resultados globales sugieren que este ensayo de AS-PCR es simple, fiable y sensible. Además, el análisis de secuenciación de Sanger sugirió que cinco pacientes portaban L265P de MYD88 homocigótico porque el pico del alelo mutante era significativamente mayor que el pico del alelo de tipo silvestre. La figura 2D muestra un ejemplo de los portadores homocigóticos. Este paciente tenía un 70% de afectación de la BM, de modo que el alelo de tipo silvestre aún puede detectarse por secuenciación de Sanger. El L265P de MYD88 homocigótico podía estar causado por un evento de disomía uniparental adquirida (UPD) en 3p22.2.

Detección cuantitativa de la mutación L265P de MYD88

A continuación, se desarrolló una PCR a tiempo real basada en SYBR Green para permitir la cuantificación de L265P de MYD88. Dada la alta frecuencia de la mutación L265P de MYD88 en WM, la evaluación cuantitativa de L265P de MYD88 tiene el potencial de desarrollarse como un biomarcador robusto para controlar la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento. La sensibilidad y la especificidad de la AS-PCR a tiempo real se determinaron por una dilución en serie del ADN mutante con el ADN de tipo silvestre. Se registraron los valores C_T para la PCR específica de mutante y de referencia y se calcularon los correspondientes valores delta C_T . Como se muestra en la figura 3A, esta AS-PCR a tiempo real puede detectar la mutación L265P de MYD88 a una dilución de un 0,08% con más de 2 ciclos de diferencia del fondo de ADN de tipo silvestre. El coeficiente de corrección de la curva patrón fue 0,998 con un valor de pendiente de -3,5 (figura 3B). El análisis de la curva de fusión reveló que el amplicón específico del mutante L265P de MYD88 se fundía a 84°C (figura 3C). Una amplificación no específica mínima se encontró solamente en la dilución de un 0,4% o inferior con un pico de fusión a 80°C.

Para obtener más información sobre el funcionamiento de los ensayos, se volvieron a analizar todas las muestras que se habían analizado por el AS-PCR basado en gel y la secuenciación de Sanger por la AS-PCR a tiempo real. Como se muestra en el diagrama de dispersión (figura 3D), los donantes sanos (n=40) tenían valores delta CT que variaban de 10,7 a 16,9 ciclos (media, 13,9 ciclos; mediana, 14,1 ciclos), mientras que los pacientes con WM tenían

valores delta CT que varían de -0,2 a 15,2 ciclos (media, 3,3 ciclos; mediana, 1,9 ciclos). Había dos grupos principales de pacientes con WM separados por 3,2 ciclos. El grupo con valores delta CT que varían de 9,6 a 15,2 ciclos (n=10) parecían similares a los donantes sanos. Por tanto, este grupo se determinó como L265P de MYD88 negativo. Por el contrario, otro grupo tenía valores delta CT que varían de -0,2 a 6,4 ciclos (n=87). Este grupo se determinó como L265P de MYD88 positivo. Además, la AS-PCR basada en gel y la AS-PCR a tiempo real mostraron un resultado exactamente igual para la determinación del estado de L265P de MYD88 en esta cohorte. Los resultados globales sugieren que un pequeño subconjunto de pacientes con WM puede no estar portando la mutación L265P de MYD88. Además, la región codificante completa del gen MYD88 se secuenció para los 10 pacientes que eran negativos para L265P de MYD88 determinado por AS-PCR. No se encontró ninguna mutación de MYD88.

Correlación entre el estado de mutación de L265P de MYD88 y las características clínicas

L265P de MYD88 se informó inicialmente en DLBCL como una mutación de ganancia de función que promueve la señalización de NF- κ B y JAK-STAT3 a través de la activación de la familia IRAK de serina-treonina quinasas. De forma interesante, L265P de MYD88 estaba frecuentemente mutado en el subtipo ABC de DLBCL (29%) pero raramente en el subtipo GCB. Se intenta evaluar las diferencias de las características clínicas entre los dos grupos de pacientes con WM determinados por AS-PCR. El análisis ANOVA no paramétrico reveló que los pacientes L265P de MYD88 positivos tienden a tener mayor afectación de la BM ($p=0,001$), nivel inferior de IgG en suero ($p=0,011$) y nivel mayor de IgM en suero ($p=0,007$) en comparación con los pacientes L265P de MYD88 negativos (tabla 3). Debido a la pequeña cantidad de pacientes L265P de MYD88 negativos, las observaciones tienen que confirmarse en un estudio independiente con un tamaño de muestra grande.

Determinación del efecto terapéutico por evaluaciones cuantitativas de L265P de MYD88

Para explorar el potencial de usar el método de AS-PCR a tiempo real para determinar el efecto terapéutico y controlar la enfermedad residual en WM, se examinó la concordancia entre las lecturas de afectación de la BM y los niveles de L265P de MYD88 mutante para siete pacientes que recibieron intervención farmacológica y proporcionaron biopsias de BM antes y después del tratamiento. Los resultados se resumen en la tabla 4. El paciente A era un portador homocigótico de L265P de MYD88 y tenía una afectación de un 70% de la BM y un alto nivel de L265P de MYD88 mutante antes del tratamiento. Este paciente mostró una remisión clínica completa después del tratamiento. Por consiguiente, la afectación de la BM y los niveles de L265P de MYD88 mutante quedan indetectables. Los pacientes B y C mostraron aproximadamente un 90% de disminución en la afectación de la BM con los tratamientos. Asimismo, también se observó una disminución pronunciada en los niveles de L265P de MYD88 mutante de los dos pacientes (96% y 74%, respectivamente). El paciente D mostró una disminución de un 47% en la afectación de la BM frente a una disminución de un 45% en los niveles de L265P de MYD88 mutante. Sin embargo, los niveles de L265P de MYD88 mutante estaban poco cambiados en los pacientes E y F, que mostraron disminuciones de un 17% y un 37% en la afectación de la BM, respectivamente. El último paciente (G) no parecía responder al tratamiento y mostró un ligero aumento tanto en la afectación de la BM como en los niveles de L265P de MYD88 mutante. El análisis de regresión lineal reveló una alta correlación entre los cambios porcentuales de la afectación de la BM y los niveles de L265P de MYD88 mutante ($R^2=0,90$, $p=0,001$). Aunque el tamaño de muestra del estudio era muy pequeño, los resultados apoyan la hipótesis de usar la evaluación cuantitativa de L265P de MYD88 para determinar el efecto terapéutico y controlar la enfermedad residual en WM.

El examen de la BM es esencial en la estadificación clínica de linfomas no hodgkinianos (NHL)

Merli et al., informaron de una comparación entre la histología y la citometría de flujo (FC) sobre las evaluaciones de la afectación de la BM en linfomas no Hodgkin (NHL) incluyendo LPL (Assessment of bone marrow involvement in non-Hodgkin's lymphomas: comparison between histology and flow cytometry, Eur J Haematol, 85(5):405-15, 2010.). Se observó una alta concordancia entre los dos métodos para la mayoría de NHL. Sin embargo, se informó de una discordancia significativa en LPL. Se especuló que la FC puede sobreestimar el grado de infiltración con respecto a la histología. La evaluación cuantitativa de L265P de MYD88 en biopsia de BM representa una herramienta novedosa que contribuye a la estadificación clínica en el diagnóstico de WM.

En conclusión, se ha desarrollado un método de AS-PCR a tiempo real sensible y asequible que permite evaluaciones fiables y cuantitativas de L265P de MYD88. Este es el primer ensayo cuantitativo para L265P de MYD88 y facilitará el ensayo del potencial de L265P de MYD88 como biomarcador para mejorar el diagnóstico y la estadificación clínica y para controlar la progresión de la enfermedad y la respuesta al tratamiento en WM.

Ejemplo 3

La tirosina quinasa de Bruton (BTK) promueve la señalización del receptor de células B junto con la expansión de células B y la supervivencia a través de NF- κ B y MAPK. L265P de MYD88 es una mutación somática ampliamente expresada en células tumorales de pacientes con WM. L265P de MYD88 promueve la supervivencia potenciada de células tumorales a través de la señalización de NF- κ B y MAPK mediada por IRAK 1/4. Por lo tanto, se busca aclarar la función de la señalización de BTK en células de WM que expresan L265P de MYD88, y el impacto de la inhibición

de BTK y MYD88/IRAK sobre la señalización y supervivencia de células de WM.

Materiales y métodos

Se realizó análisis de transferencia de Western usando anticuerpos totales y fosfoespecíficos en células de WM que expresan L265P de MYD88, BCWM.1 y MCWL-1 después de atenuación de MYD88 por transducción con lentivirus y/o el uso de inhibidores de la señal de MYD88 o IRAK. Las células también se trataron con el inhibidor de BTK PCI-32765, en presencia o en ausencia de inhibidores de la homodimerización de MYD88 o IRAK1/4. Se usó tinción de Anexina V / PI para evaluar la supervivencia de las células y la sinergia se evaluó con el software CalcuSyn.

Resultados

BTK estaba altamente expresada y fosforilada en células de WM que expresan MYD88-L265P y PCI-32765 bloqueaba significativamente la activación de BTK (figura 4). La fosforilación aumentada de BTK se confirmó por transferencia de Western con anticuerpo fosfoespecífico en líneas celulares de macroglobulinemia de Waldenström (WM), BCWM.1 y MWCL-1, en comparación con líneas celulares de mieloma múltiple, ANBL6 e INA6. El anticuerpo contra BTK total se usó como control de carga. PCI-32765 bloqueaba significativamente la fosforilación de BTK en células de WM.

PCI32765 reducía significativamente la señalización posterior de NF- κ B, MAPK y STAT3 en células de WM (figura 5). Además de bloquear significativamente la activación de BTK, PCI-32765 también bloqueaba la señalización posterior de NF- κ B, MAPK, Stat3 reduciendo significativamente la fosforilación de las proteínas I κ B α , ERK1/2 y Stat3 en líneas celulares de WM, BCWM.1 y MWCL-1, en comparación con líneas celulares de mieloma múltiple, ANBL6 e INA6. Se usaron anticuerpos contra las correspondientes proteínas totales GAPDH como controles de carga.

La atenuación de MYD88 por transducción con lentivirus y/o el uso de un inhibidor de MYD88 conducen a una fosforilación disminuida de BTK (figura 6). La atenuación de MYD88 se confirmó por transferencia de Western en células BCWM.1 y MWCL-1. La atenuación de MYD88 redujo la fosforilación de BTK en comparación con los controles. Los péptidos inhibidores de la homodimerización de MYD88 redujeron significativamente la fosforilación de BTK en comparación con los péptidos de control. Se usaron anticuerpos contra BTK total y/o GAPDH como control de carga.

El tratamiento con PCI-32765 induce la apoptosis de células de WM que expresan L265P de MYD88 (figura 7A). PCI-32765 muestra una robusta eliminación de las células tumorales en combinación con un inhibidor de la ruta de MYD88 en células tumorales de médula ósea de pacientes con WM primaria (figura 7B). PCI-32765 muestra eliminación sinérgica de células tumorales en combinación con un inhibidor de la quinasa IRAK 1/4 (figura 7C).

La activación de BTK está facilitada por la señalización de la ruta de MYD88 en células de WM que expresan L265P de MYD88, y participa en la señalización posterior de MYD88. La inhibición de BTK por PCI-32765 conduce a una robusta eliminación del tumor de las células de WM que expresan L265P de MYD88, que se potencia por inhibidores de la ruta de MYD88.

Referencias

- Owen RG, Treon SP, Al-Katib A, et al., Clinicopathological definition of Waldenström's macroglobulinemia: Consensus panel recommendations from the Second International Workshop on Waldenström's Macroglobulinemia. *Semin Oncol.* 2003; 30(2):110-115.
- Swerdlow, SH, Campo, E, Harris, NL, et al., (ed.) World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues (4.^a edición). Lyon, Francia. IARC Press, 2008:194-5.
- Treon SP, Hunter ZR, Aggarwal A, et al., Characterization of familial Waldenström's macroglobulinemia. *Ann Oncol.* 2006; 17(3):488-494.
- McMaster ML, Csako G, Giambarresi TR, et al., Long-term evaluation of three multiple-case Waldenström macroglobulinemia families. *Clin Cancer Res.* 2007; 13(17):5063-9.
- Kyle RA, Benson J, Larson DR, Therneau TM, Dispenzieri A, Melton LJ, Rajkumar SV. IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance and smoldering Waldenström's Macroglobulinemia. *Clin Lymphoma Myeloma.* 2009; 9(1):17-18.
- Roach JC, Glusman G, Smit AFA, et al., Analysis of genetic inheritance in a family quartet by whole-genome sequencing. *Science.* 2010; 328(5978): 636-9.
- Lee W, Jiang Z, Liu J, et al., The mutation spectrum revealed by paired genome sequences from a lung cancer patient. *Nature.* 2010; 465(7297): 473-77.
- Drmanac R, Sparks AB, Callow MJ, et al., Human genome sequencing using unchained base reads on self-assembly DNA nanoarrays. *Science.* 2010; 327(5961): 78-81.
- CGATools Methods. <http://cgatools.sourceforge.net/docs/1.3.0/cgatools-methods.pdf>, páginas 12-16.
- Carnevali P, Baccash J, Halpern AL, et al., Techniques for Human Genome Resequencing Using Mated Gapped Reads. Manuscript submitted.

11. Watters T, Kenny EF, O'Neill LAJ. Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins. *Immunol Cell Biol.* 2007; 85(6): 411-419.
12. Loiarro M, Gallo G, Fanto N, et al., Identification of critical residues of the MYD88 death domain involved in the recruitment of downstream kinases. *J Biol Chem.* 2009; 284(41): 28093-281023.
- 5 13. Lin SC, Lo YC, Wu H. Helical assembly in the MYD88-IRAK4-IRAK2 complex in TLR/IL-1R signaling. *Nature.* 2010; 465(7300): 885-891.
14. Kawagoe T, Sato S, Matsushita K, et al., Sequential control of Toll-like receptor dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nature Immunol.* 2008; 9(6):684-691.
15. Brikos C, Wait R, Begum S, et al., Mass spectrometric analysis of the endogenous type 1 interleukin-1 (IL-1) receptor signaling complex formed after IL-1 binding identifies IL-1RAcP, MYD88, and IRAK-1 as the stable components. *Mol Cell Proteomics.* 2007; 6(9): 1551-1559.
16. Ngo VN, Young RM, Schmitz R, et al., Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. *Nature.* 2011; 470(7332): 115-121.
17. Loiarro M, Sette C, Gallo C, et al., Peptide mediated interference of TIR domain dimerization in MYD88 inhibits IL-1 dependent activation of NF-kB. *J Biol Chem* 1994; 269:10444-50.
18. Powers JP, Li S, Jaen JC, Liu J, Walker NP, Wang Z, Wesche H. Discovery and initial SAR of inhibitors of interleukin-1 receptor-associated kinase-4. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006;16(11):2842-5.
19. Leleu X, Eeckhoutte J, Jia X, et al., Targeting NF-kappaB in Waldenstrom macroglobulinemia. *Blood.* 2008; 111(10): 5068-77.

Tabla 1. Características clínicas y de laboratorio para los 30 pacientes con WM cuyas células linfoplasmaocitarias se usaron en estudios de secuenciación del genoma completo.

	Media	Intervalo
Edad	62	41-87
WM familiar	9 (30%)	NA
Sin tratar	26 (87%)	NA
Afectación de la médula ósea (%)	65%	5-95%
Células B clonales (%) ¹	96.3	55.5-100
IgM (mg/dl)	3.970	590-6.580
Proteína monoclonal IgMκ/IgMλ	24/6	NA
IgA (mg/dl)	41	11-516
IgG (mg/dl)	519	215-3.120
B ₂ M en suero (mg/l)	3,55	1,50-12,1
Hematocrito (%)	31,4	24,0-41,5

¹Determinado por restricción de la cadena ligera usando citometría de flujo.

Tabla 2. Características clínicas y de laboratorio para los 8 pacientes con MGUS de IgM sometidos a secuenciación de Sanger para la variante L265P de MYD88.

	Media	Intervalo
Edad	62	52-71
WM familiar	2 (25%)	NA
Sin tratar	8 (100%)	NA
Afectación de la médula ósea (%)	0%	0-2%
Células B clonales (%) ¹	0%	0-1
IgM (mg/dl)	682	142-1.190
Proteína monoclonal IgMκ/IgMλ	5/3	NA
IgA (mg/dl)	142	53-244
IgG (mg/dl)	772	523-1.040
B ₂ M en suero (mg/l)	1,70	1,30-2,10
Hematocrito (%)	41,4	36,7-44,8

¹Determinado por restricción de la cadena ligera usando citometría de flujo.

Tabla 3. Correlación entre el estado de mutación de L265P de MYD88 y las características clínicas

Tabla 5. Correlación entre el estado de mutación de L265P de MYD88 y las características clínicas					
Parámetro clínico	Estado de la mutación de L265P de MYD88				Valor-p*
	Positivo		Negativo		
Edad en diagnóstico	n=87	60,26 (9,97)	n=10	66,50 (8,33)	0,064
Género, % femenino	n=86	40,91%	n=10	50,00%	0,738**
Afectación de la médula ósea, %	n=85	52,92 (30,49)	n=10	18,00 (18,74)	0,001
IgA, mg/dl	n=85	622,79 (552,45)	n=10	970,10 (711,69)	0,106
IgG, mg/dl	n=85	216,85 (322,36)	n=10	332,10 (284,60)	0,011
IgM, mg/dl	n=85	3093,62 (1943,89)	n=10	1536,20 (2039,79)	0,007

Los valores son la media (DT)

*ANOVA no paramétrico

**Ensayo exacto de Fisher

Tabla 4. Concordancia entre las evaluaciones de la afectación de BM y los niveles de mutación de L265P de MYD88

Paciente	Edad al diagnóstico	Género	Estado de tratamiento	Afectación de BM (%)	Niveles de mutante L265P de MYD88 (%)*	% de cambio en la afectación de la BM	% de cambio en los niveles de L265P de MYD88
A**	61	Masculino	Sin tratar Bendamustina rituxan	70 Negativo	156,90 Negativo	100	100
B	44	Masculino	Sin tratar R-CD	90 10	60,73 2,23	89	96,33
C	52	Masculino	Sin tratar R-CD	50 5	72,12 19,03	90	73,61
D	59	Masculino	Sin tratar Everolimus	95 50	99,15 54,15	47	45,39
E	63	Masculino	Sin tratar Everolimus	90 75	96,07 94,97	17	1,14
F	70	Masculino	Sin tratar Everolimus	95 60	95,93 87,67	37	8,61
G	63	Masculino	Sin tratar Everolimus	20 25	67,93 76,67	-25	-12,87

R-CD: combinación de rituximab, ciclofosfamida y dexametasona.

*La biopsia de la BM se recogió antes y después del tratamiento. El % de mutación se calculó basándose en la curva patrón.

**Portador homocigótico de la mutación L265P de MYD88.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para facilitar el diagnóstico de linfoma linfoplasmocitario en un sujeto, comprendiendo el método:

determinar si hay una mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2 basándose en el genoma de referencia NCBI Compilación 37, en una muestra biológica de un sujeto que tiene una o más de las siguientes características clínicas: anemia, hiperviscosidad, neuropatía, coagulopatías, explenomegalia, hepatomegalia, adenopatía y una paraproteína sérica de IgM, en el que la presencia de la mutación es indicativa de que el sujeto tiene linfoma linfoplasmocitario.

2. El método de la reivindicación 1, en el que el sujeto presenta

- (i) dos o más de las características clínicas, o
- (ii) tres o más de las características clínicas.

3. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente

proporcionar un informe que resume los resultados estadísticamente significativos que indican que el sujeto tiene linfoma linfoplasmocitario si el sujeto tiene la mutación.

4. Un método *in vitro* para distinguir el linfoma linfoplasmocitario de otras neoplasias de células B, comprendiendo el método:

determinar si hay una mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2 basándose en el genoma de referencia NCBI Compilación 37, en una muestra biológica de un sujeto que tiene síntomas de linfoma linfoplasmocitario y al menos una neoplasia de células B seleccionada del grupo que consiste en linfomas de la zona marginal nodal, linfoma de la zona marginal extranodal de tejido linfoide asociado a la mucosa (linfoma MALT), linfoma de la zona marginal de células B esplénicas, gammapatía monoclonal de importancia indeterminada y mieloma de células plasmáticas, y proporcionar un informe de si el sujeto tiene una mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2, en el que la presencia de la mutación es indicativa de que el sujeto tiene linfoma linfoplasmocitario.

5. Un método *in vitro* para controlar la progresión o recidiva de linfoma linfoplasmocitario (LPL) en un sujeto, que comprende

determinar el nivel de un transcrito que comprende una mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2 basándose en el genoma de referencia NCBI Compilación 37, en múltiples muestras biológicas de un sujeto obtenidas durante un periodo de tiempo, en el que un cambio en el nivel del transcrito durante el periodo de tiempo es indicativo de la progresión o recidiva de LPL en el sujeto.

6. El método de la reivindicación 5, en el que el sujeto está experimentando quimioterapia.

7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5-6, en el que el nivel del transcrito se mide usando reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real cuantitativa, opcionalmente, en el que, la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real cuantitativa se realiza usando un cebador específico de alelo y en el que el cebador específico de alelo hibrida en o cerca de su extremo 3' con la mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2.

8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la muestra biológica es una muestra de médula ósea, ganglio linfático, bazo o sangre.

9. Una composición que comprende

un inhibidor de la respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MYD88), un inhibidor de la quinasa 1/4 asociada al receptor de interleuquina (IRAK-1/4) y/o un inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton (BTK) para su uso en el tratamiento de linfoma linfoplasmocitario en un sujeto que tiene una mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2 basándose en el genoma de referencia NCBI Compilación 37.

10. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el inhibidor de MYD88 es un compuesto peptidomimético ST2825.

11. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el inhibidor de IRAK-1/4 es N-(2-morfoliniletil)-2-(3-nitrobenzoilamido)-bencimidazol.

12. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el inhibidor de BTK es Ibrutinib.

13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o una composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 9-12, en el que la mutación produce

- (i) un cambio de un único nucleótido de T a C en el gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MYD88), o
- (ii) un cambio de aminoácido de leucina a prolina en la posición 265 en la proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88.

14. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que dicha determinación comprende realizar un ensayo para examinar la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2, opcionalmente, en el que el ensayo comprende reacción en cadena de la polimerasa específica de alelo realizada usando un cebador específico de alelo, en el que el cebador específico de alelo hibrida en o cerca de extremo 3' con la mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2.

15. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 5-7 o 14, en el que el cebador específico de alelo es la SEQ ID NO: 5.

16. Un inhibidor de la respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MYD88), un inhibidor de la quinasa 1/4 asociada al receptor de interleuquina (IRAK1/4) y/o un inhibidor de la tirosina quinasa de Bruton (BTK) para su uso en el tratamiento de linfoma linfoplasmocitario en un sujeto, en el que el sujeto tiene una o más características clínicas de anemia, hiperviscosidad, neuropatía, coagulopatías, esplenomegalia, hepatomegalia, adenopatía y una paraproteína sérica de IgM; y se ha determinado que una muestra biológica del sujeto tiene una mutación en la posición 38182641 en el cromosoma 3p22.2 basándose en el genoma de referencia NCBI Compilación 37.

FIG. 1

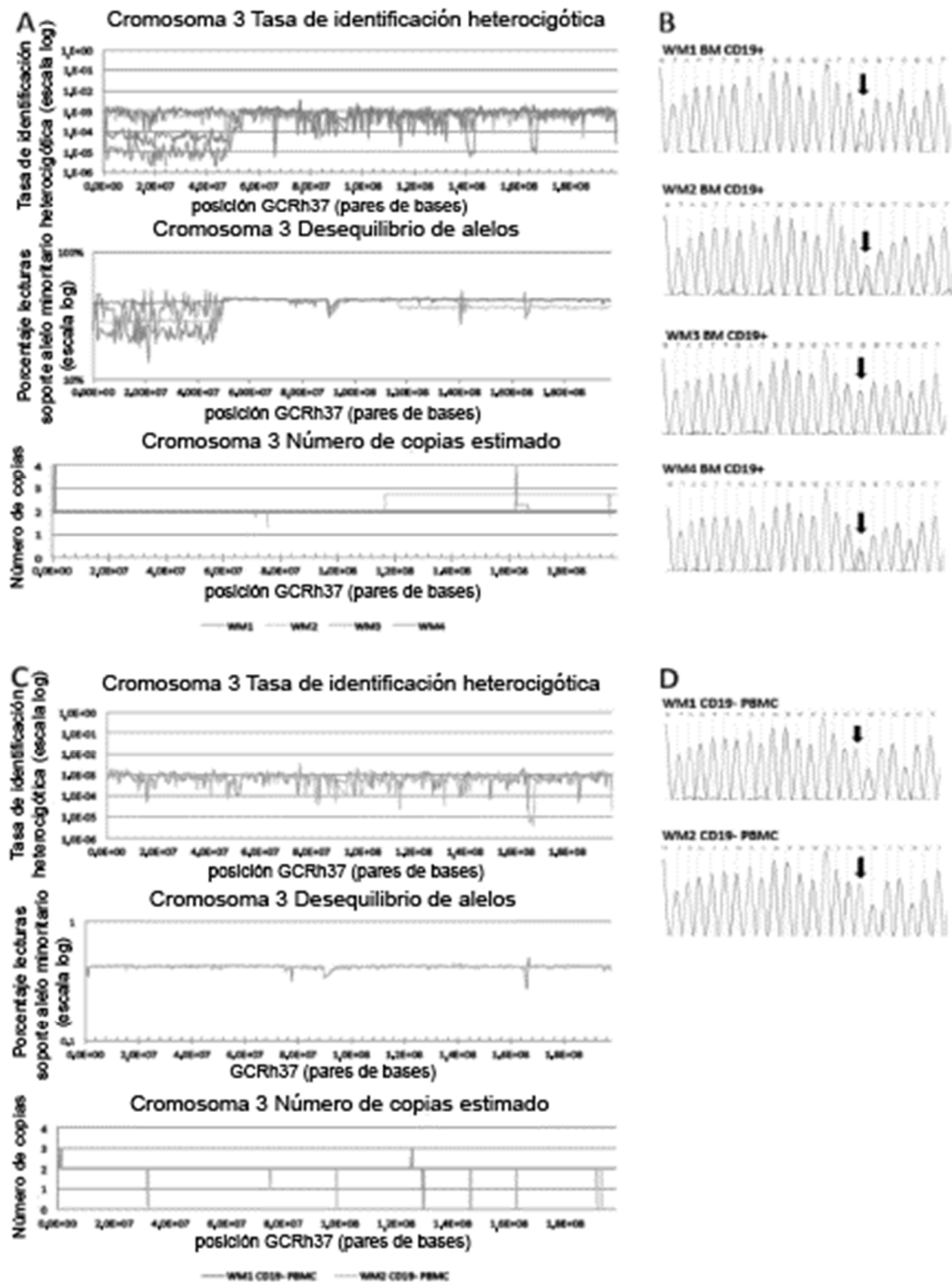


FIG. 2

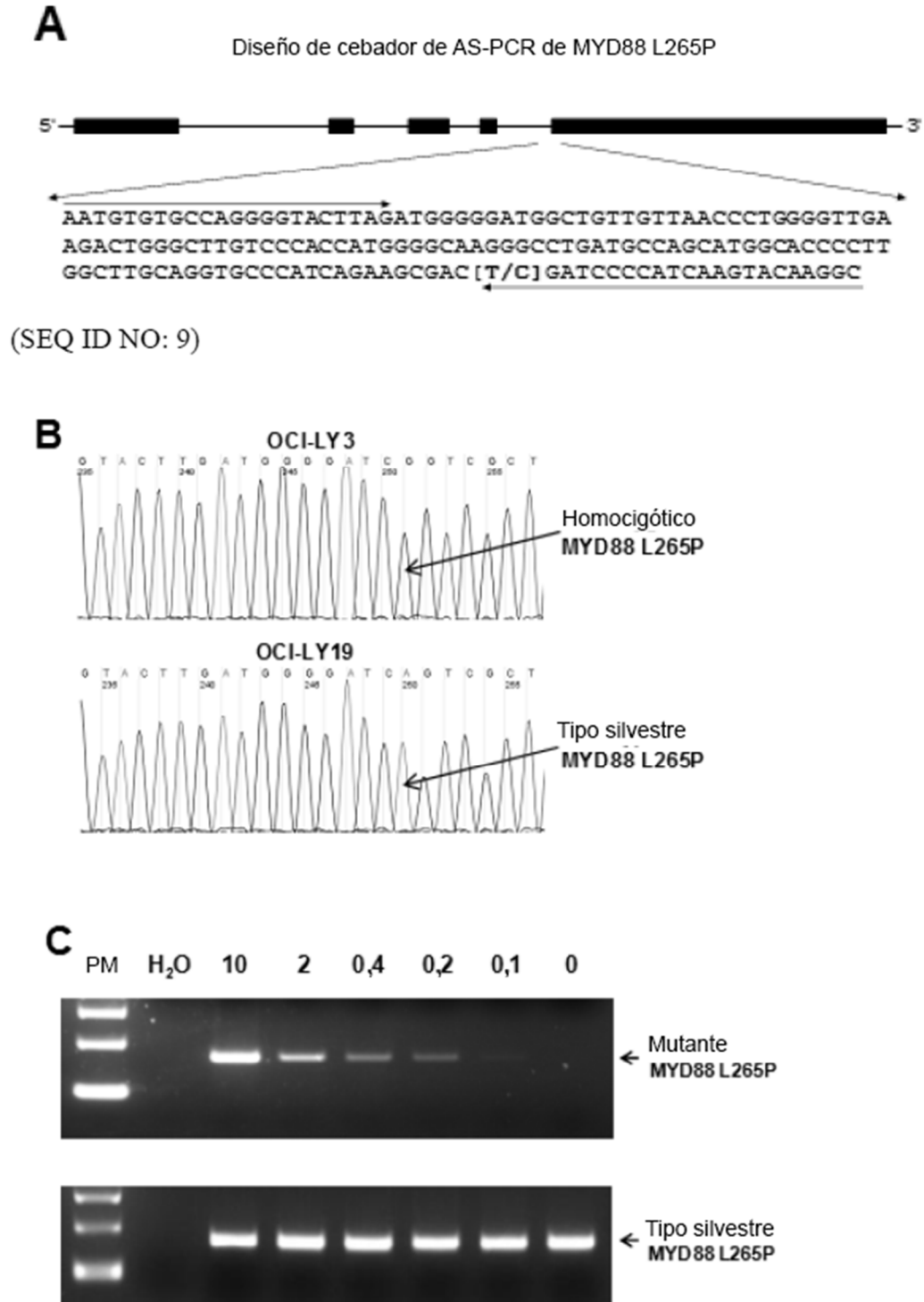


FIG. 2 (continuación)

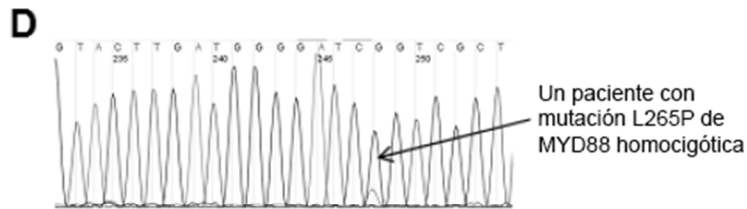


FIG. 3

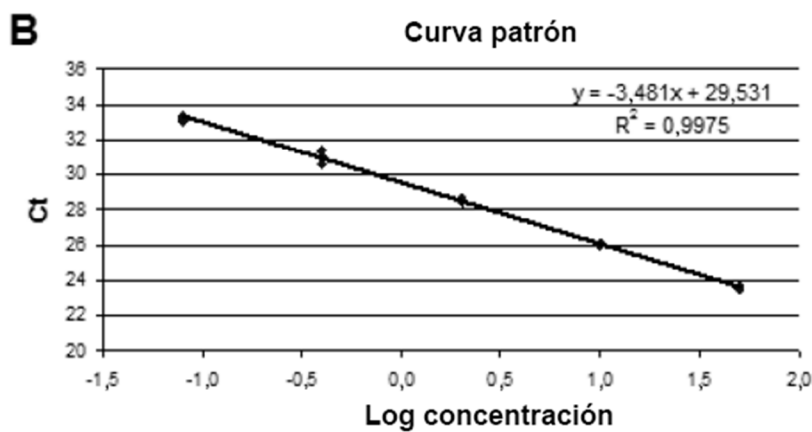
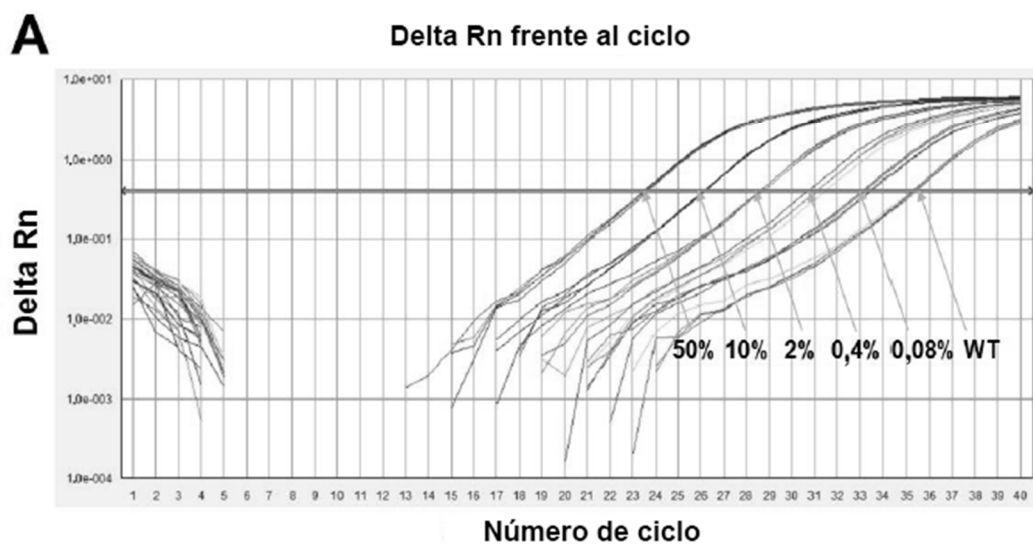
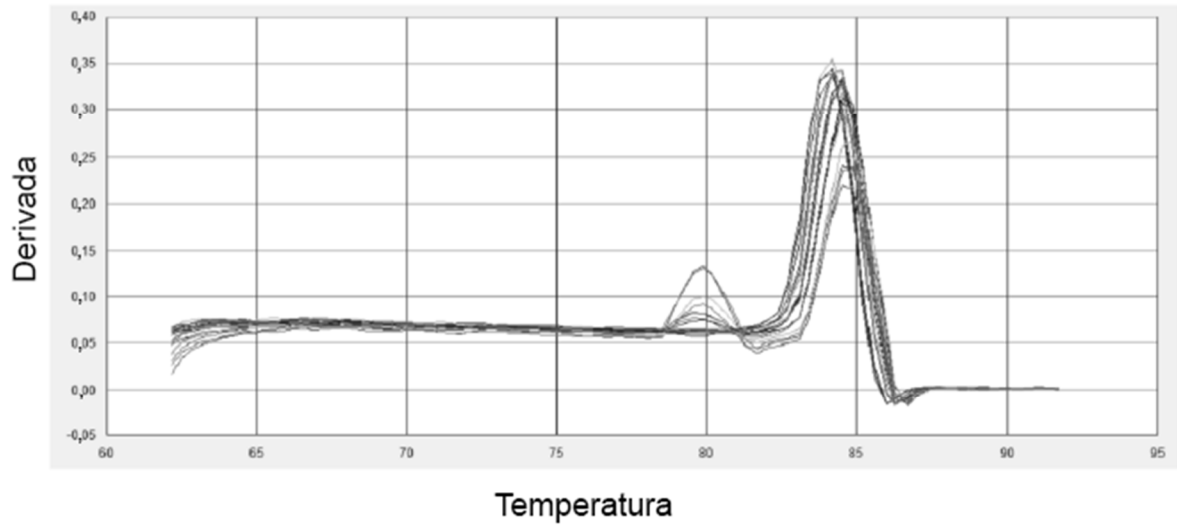


FIG. 3 (continuación)

C

Curva de disociación



D

Determinación del estado de L265P de MYD88 por AS-PCR a tiempo real

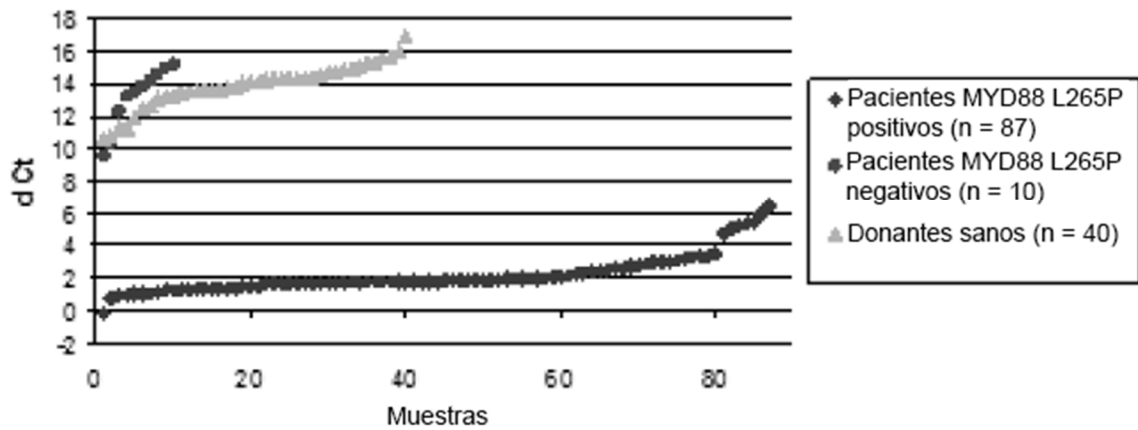


FIG. 4

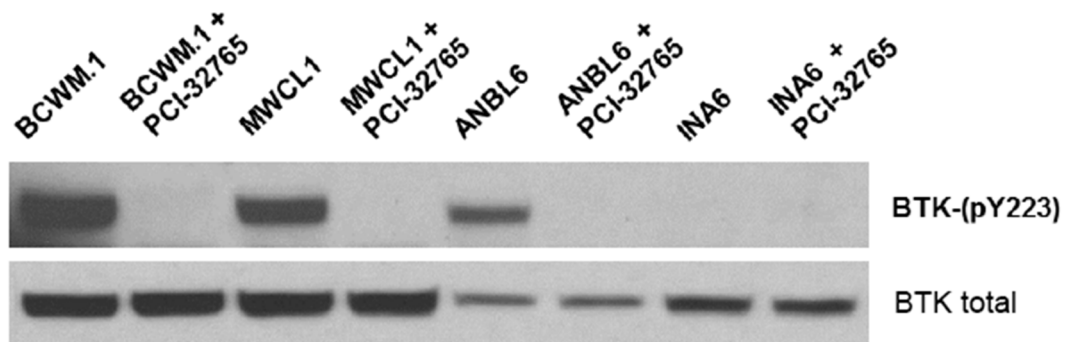


FIG. 5

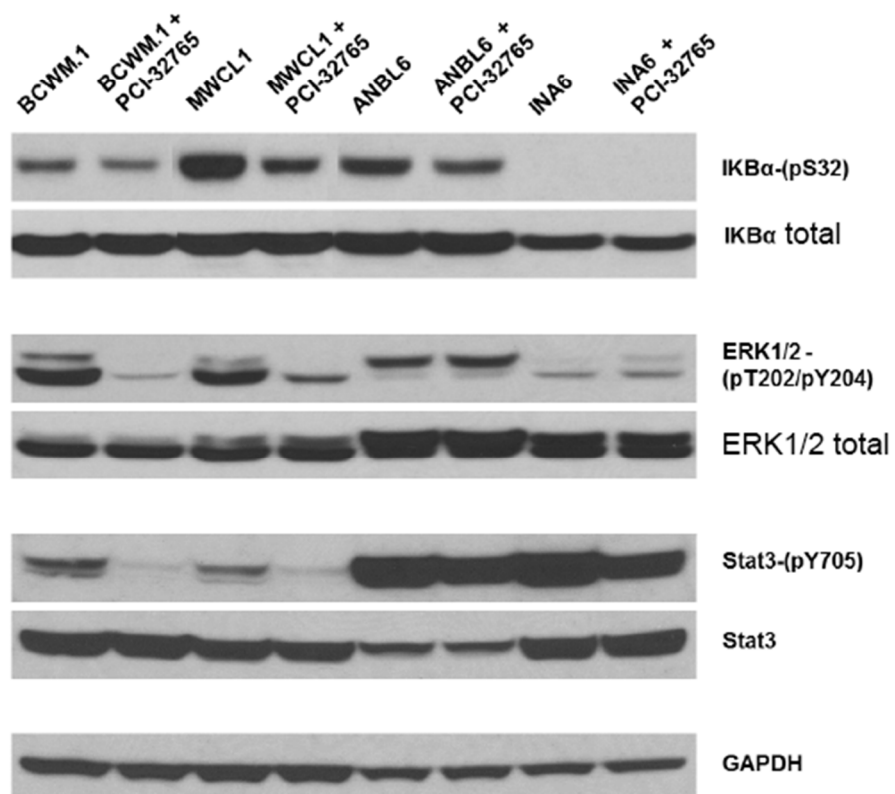


FIG. 6

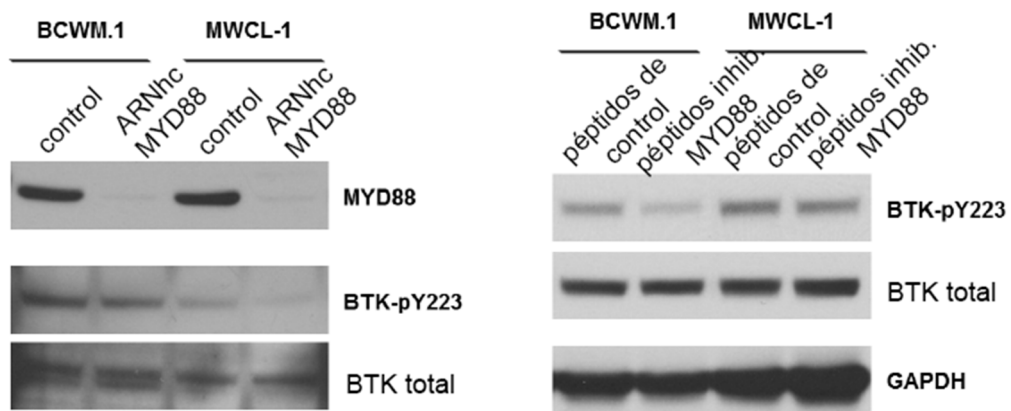


FIG. 7

A.

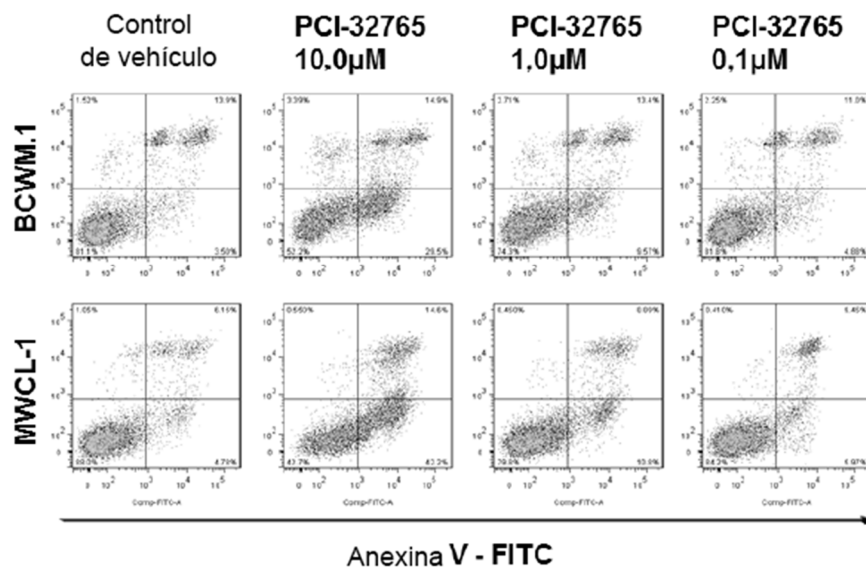
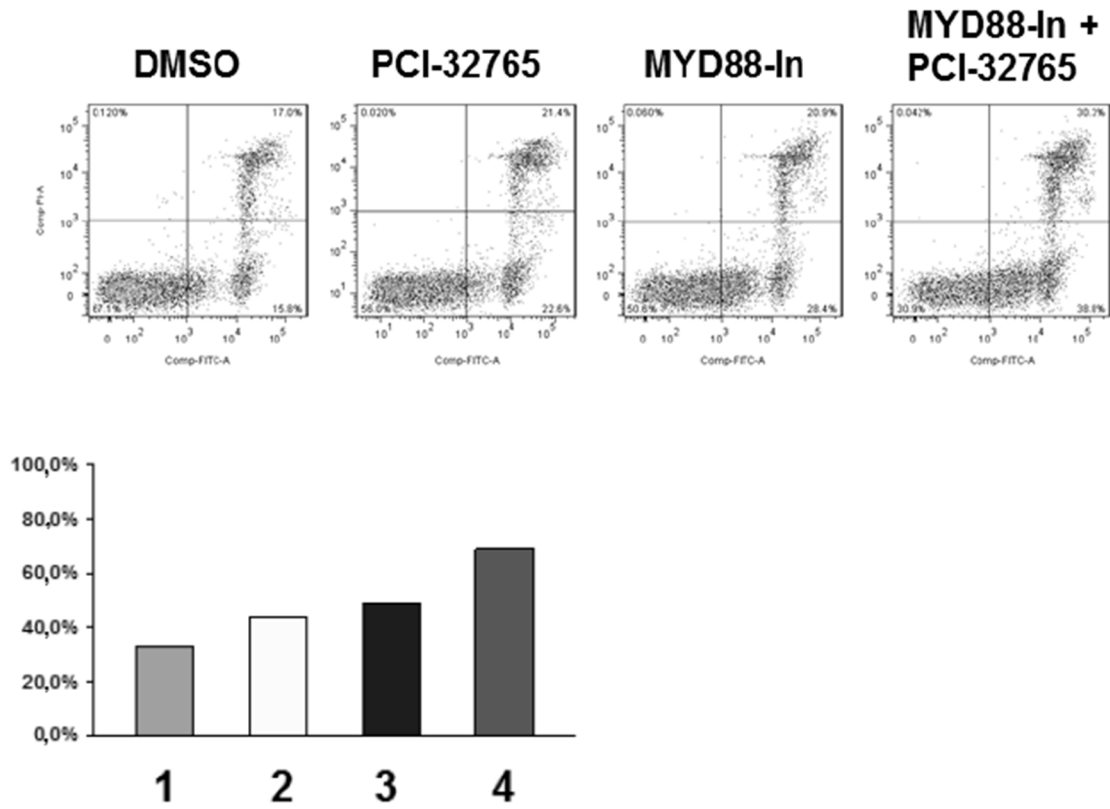


FIG. 7 (continuación)

B.



1: DMSO; 2: PCI-32765 (1,0 μ M); 3: péptidos inhibidores de MYD88 (100 μ M);
4: PCI-32765 + péptidos inhibidores de MYD88.

FIG. 7 (continuación)

C.

