

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 254**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2011** E 11382290 (2)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.02.2017** EP 2568290

54 Título: **Métodos para el pronóstico del linfoma difuso de linfocitos B grandes**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.09.2017**

73 Titular/es:

**ATRY'S HEALTH, SA (50.0%)**  
**C/ Velázquez No. 24, 4º Dcha.**  
**28001 Madrid, ES y**  
**FUNDACIÓ CLÍNIC PER A LA RECERCA**  
**BIOMÈDICA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**DONOVAN, MICHAEL J.;**  
**ERILL SAGALÉS, NADINA;**  
**PUIG, PERE;**  
**COLOMER VALERO, M ANNA;**  
**CAMPO, ELÍAS y**  
**COLOMO, LUIS**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

**ES 2 634 254 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

Métodos para el pronóstico del linfoma difuso de linfocitos B grandes

5 **Campo de la invención**

La invención pertenece al campo de los métodos para el pronóstico de un paciente que padece linfoma difuso de linfocitos B grandes en respuesta a una terapia. La invención también divulga la predicción de la respuesta clínica de un paciente que padece linfoma difuso de linfocitos B grandes en respuesta a una terapia.

10

**Antecedentes de la invención**

El linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBGB) es uno de los subtipos de linfoma no Hodgkin más común (aproximadamente el 40 %) y agresivo (mediana de supervivencia de 1 - 2 años si no se trata), caracterizado por un marcado grado de heterogeneidad morfológica y clínica. La patogenia del DLBGB es tanto compleja como heterogénea, y los mecanismos patogénicos siguen siendo en gran parte desconocidos. Aunque muchos pacientes con DLBGB responden a la quimioterapia basada en antraciclina e incluso al anticuerpo monoclonal rituximab (aproximadamente el 80 %), aproximadamente la mitad de todos los pacientes finalmente muere debido a su enfermedad. Varios factores clínicos tienen importancia pronóstica incluyendo la edad, fase, síntomas generales, estado general, masa tumoral y niveles de lactato deshidrogenasa (LDH) sérica. Estas características constituyen el índice pronóstico internacional (IPI), que es el "criterio de referencia" para predecir la respuesta a la terapia y la supervivencia global. Esta variación observada en la respuesta a la quimioterapia a través de múltiples grupos de pacientes, incluso con la inclusión del IPI, ha sugerido que el DLBGB puede representar realmente múltiples formas de la enfermedad, con desenlaces diferentes basados en la respuesta al tratamiento.

25

Las observaciones originales a partir de la tecnología de micromatrices de ADN (Alizadeh *et al.*, 2000, Nature 403:503-11; Shipp *et al.*, Nat Med 8:68-74) han identificado dos formas clínica y molecularmente distintas de DLBGB, con patrones de expresión génica indicativos de distintas fases de diferenciación de linfocitos B y desenlaces de supervivencia. Rosenwald *et al.* (N Engl J Med, 2002, 346:1937-47) elucidó adicionalmente la hipótesis de heterogeneidad de la enfermedad con la identificación de dos subgrupos distintos con perfiles de expresión que representan bien el tipo de linfocitos B de centro germinal bien linfocitos B activados. Con una micromatriz de ADN 'linfochip', se identificaron cuatro subgrupos característicos de genes en una cohorte de pacientes diagnosticados de DLBGB y tratados con quimioterapia basada en antraciclina. Estas clases de expresión amplias (por ejemplo, tipo de linfocitos B de centro germinal, MHC de clase II, ganglio linfático y proliferación) segregaron grupos de pacientes con respecto a la supervivencia global, y reflejaron estados biológicos asociados con el crecimiento celular y la respuesta inmunitaria. Posteriormente, Rimsza *et al.* (Blood, 2008, 112:3425-33), observaron que niveles bajos de expresión de ARN del HLA-DR y niveles altos de MYC estaban asociados con un tiempo de supervivencia reducido, también de acuerdo con mecanismos propuestos previos de proliferación de células tumorales, y la respuesta del hospedador.

40

Los resultados de varios ensayos clínicos y estudios de laboratorio completados de forma reciente han implicado a varias rutas de transducción de señales en el crecimiento maligno del DLBGB, incluyendo PI3K, BCR y PKC. Ha sido notable la asociación de la expresión aumentada de PKC beta, ya sea por ARN o por proteína, y el pronóstico adverso en pacientes con DLBGB. Estos estudios se han confirmado de forma reciente usando un grupo de pacientes tratados con R-CHOP, donde los niveles de ARNm de PKC-beta II tienen una importancia pronóstica independiente en pacientes con DLBGB tratados con inmunoterapia (Riihijarvi S. *et al.*, Mod. Pathol., 2010, 23:686-93). En resumen, el tratamiento eficaz de pacientes con DLBGB ya sea *de novo* o que no responde al tratamiento, requiere una comprensión más completa de los variados mecanismos y rutas que dirigen el proceso de la enfermedad.

50

La incorporación de rituximab combinado con CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona), conocido como R-CHOP o CHOP-R, como tratamiento de primera línea (para pacientes de edad avanzada) para el DLBGB, ha alterado la evolución natural de la enfermedad, aunque un número significativo (30 %) de pacientes aun no responde a la terapia inicial o evolucionan poco después de la finalización del tratamiento inicial. Recientes desarrollos del perfil de expresión de ARN en muestras de tumor de DLBGB fijadas en formalina e incluidas en parafina (Rimsza *et al.*, 2008, Blood, 112:3425-33; Mallumbres *et al.*, 2008, Blood, 111:5509-14) de pacientes tratados con CHOP o R-CHOP (rituximab y CHOP), han confirmado que las anteriores características génicas predictivas identificadas eran de interés con respecto a los tratamientos actuales. Estos estudios también establecieron que las técnicas moleculares tales como los ensayos de protección frente a nucleasa cuantitativos y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) en muestras de tumor primario fijadas en formalina e incluidas en parafina (FFIP) eran capaces de proporcionar información genómica pronóstica significativa.

60

Existen distintos enfoques en el estado de la técnica. El documento WO 2010/121231 describe un método basado en la determinación de los niveles de expresión de al menos un gen marcador seleccionado de los siguientes, BCL6, IFITM1, CD40, RGS13, VNN2, LMO2, CD79B, CD22, BTG2, IGF1R, CD44, CTSC, EPDR1, UAP1 y PUS7, para

65

predecir o evaluar el grado de respuesta de un paciente que tiene linfoma de linfocitos B (incluyendo LDLBG) al tratamiento con anticuerpos anti-CD40.

5 El documento WO 2009/149297 divulga un método para determinar los niveles de expresión de GCET1, HLA-DQA1, HLA-DRB, HLA-DRA, ACTN1, COL3A1, PLAU, MYC, BCL6, LMO2, PD4 y SOD2, para pronosticar el desenlace del tratamiento en pacientes con LDLBG, diagnosticar el LDLBG y controlar la eficacia de un tratamiento con CHOP o R-CHOP.

10 Gratzinger *et al.*, (Br. J. Haematol. Enero de 2010; 148(2):235-244) proporcionaron datos de expresión de inmunohistoquímica (IHQ) de CD34, VEGF, VEGFR1 y VEGFR2 en una serie de muestras de ensayo tumorales de LDLBG de pacientes tratados con CHOP. En este estudio, la expresión de VEGF en células de linfoma no era predictiva de la supervivencia global (SG) en un análisis univariante o multivariante con VEGFR1, VEGFR2 e IPI. Además, tampoco se observó que fuera predictiva la densidad de microvasos con CD34. Por el contrario, se descubrió que VEGFR1 y VEGFR2, junto con la forma fosforilada de VEGFR2, eran altamente predictivas de buena y mala SG, respectivamente. Estudios previos han vinculado a la proteína VEGF alta y el VEGFR1 alto en células de linfoma con una buena supervivencia global en pacientes que han recibido terapia basada en antraciclina. La hipótesis es que el bucle autocrino representa una ruta de supervivencia o proliferación que es bastante susceptible a las antraciclinas.

20 Lossos *et al.*, (2006, J. Clin. Oncol. 24: 995-1007) divulgan una visión de conjunto sobre los biomarcadores pronósticos en el LDLBG. Se divulgan BCL6 y VEGF como biomarcadores pronósticos.

25 Winter *et al.*, (2006, Blood 107: 4207-13) divulgan que la expresión de la proteína BCL6, según se mide por inmunotinción, es un factor pronóstico muy eficaz del desenlace en pacientes tratados con quimioterapia de CHOP. Por el contrario, BCL6 no fue un marcador pronóstico entre pacientes tratados con R-CHOP. También se divulga un reactivo comercial para la detección de BCL6.

30 Lossos *et al.*, (2001, Blood 98: 945-51) divulgan que la expresión de ARNm o la expresión proteica de BCL6 elevada por inmunohistoquímica es un nuevo factor pronóstico favorable en LDLBG, y debería utilizarse en la estratificación y el diseño de terapias ajustadas según el riesgo para pacientes con LDLBG.

Hans *et al.*, (2003, Blood 103: 275-82) divulgan que la expresión de BCL6 se asoció con una supervivencia global y una supervivencia sin acontecimientos mejores.

35 Sigue habiendo una necesidad clínica del uso de marcadores biológicos para predecir el desenlace y definir terapias para pacientes recientemente diagnosticados de LDLBG. Además, hay todavía una necesidad significativa de desarrollo de métodos más normalizados que incorporen ensayos cuantitativos para comprender la expresión de marcadores.

#### 40 **Breve descripción de la invención**

45 En un primer aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para el pronóstico de un paciente que padece linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG), que comprende determinar en una muestra de dicho paciente el nivel de la proteína BCL6 por inmunofluorescencia cuantitativa, en el que dicho paciente está en terapia con CHOP-R, y en el que un nivel alto de expresión de BCL6 en dicha muestra es indicativo de un mal pronóstico, y un nivel bajo de expresión de BCL6 en dicha muestra es indicativo de un buen pronóstico. También se divulga que:

- un nivel alto de expresión de VEGF en dicha muestra es indicativo de un mal pronóstico y un nivel bajo de expresión de VEGF en dicha muestra es indicativo de un buen pronóstico,
- 50 - un nivel alto de expresión de CD68 o de células CD68<sup>+</sup> en dicha muestra es indicativo de un mal pronóstico y un nivel bajo de expresión de CD68 o de células CD68<sup>+</sup> en dicha muestra es indicativo de un buen pronóstico, y/o
- un nivel alto de expresión de CD20 o de linfocitos CD20<sup>+</sup> en dicha muestra es indicativo de un buen pronóstico y un nivel bajo de expresión de CD20 o linfocitos CD20<sup>+</sup> en dicha muestra es indicativo de un mal pronóstico.

55 En un segundo aspecto, el documento también divulga un método para seleccionar un paciente que padece LDLBG para una terapia individual, que comprende el método del primer aspecto, en el que dicho paciente con una terapia para LDLBG o no, y en el que un buen pronóstico selecciona a dicho paciente para dicha terapia individual y/o un mal pronóstico desestima a dicho paciente para dicha terapia individual.

60 En un tercer aspecto, el documento también divulga un kit que comprende reactivos para analizar una muestra de un sujeto para determinar los niveles de uno o más biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en VEGF, BCL6, CD68 y CD20, de acuerdo con el método del primer y/o el segundo aspecto.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1: Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para CD68 y CD20, que predicen la SG (A, C, E) y la supervivencia a 1 año (B, D, F) como factores pronósticos independientes y combinados. Como se ilustra, ni CD20 ni CD68 son estadísticamente significativos como factores pronósticos independientes (B); sin embargo, cuando se combinan con CD20, en especial para predecir la SG, existe una tendencia hacia la significación.

Figura 2: A. La supervivencia global se redujo de forma significativa con los niveles crecientes de VEGF, basándose en un punto de corte de VEGF de 0,18 ( $p=0,005$ ). B. Imagen combinada de inmunofluorescencia de alta expresión de VEGF [amarillo (puntos claros), flechas blancas] en linfocitos malignos y células endoteliales. C. Imagen segmentada, procesada posteriormente, de VEGF normalizado (0,69, amarillo), con respecto al área tumoral total (DAPI, azul).

Figura 3: A. La supervivencia global (SG) se reduce de forma significativa con BCL6 creciente basándose en un punto de corte de BCL6 ( $\leq 3,84$ , riesgo bajo;  $> 3,84$ , riesgo alto) para la SG ( $p=0,003$ ). B. Imagen de inmunofluorescencia de núcleos teñidos con DAPI (azul) y de expresión de BCL6 (magenta, flechas blancas) en linfocitos malignos. C. Imagen segmentada, procesada posteriormente, que representa BCL6 normalizado (21,18) colocalizado con DAPI con respecto al área tumoral total (amarillo, BCL6+DAPI; magenta, BCL6; azul, DAPI).

Figura 4: A. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier que representa un modelo multivariante que incluye edad, estado de IPI y niveles de VEGF. La estratificación de los pacientes se realizó usando la mediana del riesgo calculado a partir del modelo de Cox para definir dos grupos de riesgo (la línea negra representa el grupo con menos riesgo estimado mientras que la línea roja es el grupo de riesgo más alto). B. Curva de Kaplan-Meier en el mismo grupo de pacientes que en la Figura 4A, estratificados sólo por edad y estado de IPI. Esto ilustra la importancia de incluir el biomarcador cuantitativo VEGF en la estratificación de pacientes con respecto a la SG.

### Descripción detallada de la invención

En el presente documento se proporcionan métodos para el pronóstico de un paciente aquejado de DLBCL, que comprende determinar los niveles de expresión de biomarcadores específicos, ya sea solos o en combinaciones de los mismos, y/o en combinaciones con variables clínicas. Además, también se divulgan métodos para predecir la respuesta de pacientes con DLBCL a la terapia del DLBCL, en particular la terapia de CHOP-R.

Los métodos de la invención son útiles en el pronóstico de pacientes con linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLBCL). La presente invención puede llevarse a cabo de distintos modos, los cuales se describen a continuación.

#### Definiciones

Las siguientes definiciones se exponen para ilustrar y definir el significado y alcance de diversos términos y expresiones usados para describir la invención que los contiene.

El término “edad”, como se usa en el presente documento, se refiere al periodo de tiempo que se ha existido o la duración de vida.

El término “biomarcador” se refiere a cualquier entidad biológica, preferentemente ARNm, proteína o células, cuya aparición o cantidad es característica de una situación específica, por ejemplo una enfermedad tal como el DLBCL.

El término “BCL6”, como se usa en el presente documento, se refiere a la proteína 6 del linfoma de linfocitos B humano como se muestra en la base de datos UniProt, con número de referencia P41182, a fecha de 4 de agosto de 2011. En una realización preferente, el valor de punto de corte óptimo para BCL6 es 3,84, aunque en general es preferente un intervalo de 0,10 a 16,3 (0,08 a 3,84, intervalo de confianza del 90 % - se usó el intervalo de confianza del 90 % debido a la distribución asimétrica del punto de corte de BCL6), como alternativa, un intervalo de 1 a 10 o de 2,4 a 7 usando el método estadístico descrito en los ejemplos (preferentemente de Kaplan-Meier), preferentemente variando  $p$  de 0,01 a 0,25, más preferentemente de 0,03 a 0,1 y muy preferentemente siendo de 0,05.

El término “CD20”, como se usa en el presente documento, se refiere al antígeno de linfocito B grupo de diferenciación 20 como se muestra en la base de datos UniProt, con número de referencia P11836. En una divulgación preferente, el punto de corte óptimo para CD20 es 34,9, aunque en general es preferente un intervalo de 7,7 a 56,4 (intervalo de confianza del 95 %), como alternativa, un intervalo de 18 a 42 o de 30 a 40 usando el método estadístico descrito en los ejemplos (preferentemente de Kaplan-Meier), preferentemente variando  $p$  de 0,01 a 0,25, más preferentemente de 0,03 a 0,1 y muy preferentemente siendo de 0,05.

La expresión “linfocitos CD20+”, como se usa en el presente documento, se refiere a linfocitos B que expresan CD20 en su superficie. Los “linfocitos B” son linfocitos que desempeñan un importante papel en la respuesta inmunitaria humoral (a diferencia de la respuesta inmunitaria mediada por células, que está regida por los linfocitos T). Las

funciones principales de los linfocitos B son producir anticuerpos frente a antígenos, desempeñar el papel de células presentadoras de antígeno (las CPA) y finalmente convertirse en linfocitos B de memoria tras su activación por la interacción con el antígeno. Los linfocitos B son un componente imprescindible del sistema inmunitario adaptativo. CD20 se expresa en todas las fases del desarrollo de los linfocitos B excepto en la primera y la última; está presente desde las células pro-B tardías hasta los linfocitos de memoria, pero no en las células pro-B tempranas ni en plasmoblastos, ni células plasmáticas.

El término “CD68”, como se usa en el presente documento, se refiere a la proteína grupo de diferenciación 68 como se muestra en la base de datos UniProt, con número de referencia P34810, a fecha de 4 de agosto de 2011. En una divulgación preferente, el punto de corte óptimo para CD68 es 3,66, aunque en general es preferente un intervalo de 0,18 a 3,66 (intervalo de confianza del 95 %), como alternativa, un intervalo de 1 a 10 o de 2,4 a 7 usando el método estadístico descrito en los ejemplos (preferentemente de Kaplan-Meier), preferentemente variando p de 0,01 a 0,25, más preferentemente de 0,03 a 0,1 y muy preferentemente siendo de 0,05.

La expresión “células CD68+”, como se usa en el presente documento, se refiere a macrófagos infiltrantes de tumor o macrófagos asociados a tumor. Los “macrófagos” son glóbulos blancos producidos por la diferenciación de los monocitos en los tejidos. Los monocitos y los macrófagos son fagocitos. Los macrófagos actúan en la defensa no específica (inmunidad innata), así como ayudan a iniciar mecanismos de defensa específicos (inmunidad adaptativa), de los animales vertebrados. Su papel es fagocitar (engullir y después digerir) residuos celulares y patógenos, ya sea como células estacionarias o móviles. También estimulan a los linfocitos y a otras células inmunitarias para que respondan a los patógenos. Son células fagocíticas especializadas que atacan sustancias extrañas, microbios infecciosos y células cancerosas, a través de la destrucción y la ingestión. Los macrófagos pueden identificarse por la expresión específica de varias proteínas que incluyen CD14, CD11b, F4/80 (ratón)/EMR1 (ser humano), lisozima M, MAC-1/MAC-3 y CD68 mediante métodos convencionales conocidos por el experto en la materia.

La expresión “parámetro clínico” como se usa en el presente documento, se refiere a las características demográficas (los ejemplos ilustrativos, no limitativos, incluyen la edad y el sexo) y clínico-patológicas (los ejemplos ilustrativos, no limitativos, incluyen la fase clínica, LDH sérica y masa tumoral) que definen al paciente, generan la puntuación de IPI y/o se reflejan en la manifestación de su enfermedad. Preferentemente, dicho parámetro (o parámetros) clínico se selecciona del grupo que consiste en IPI, edad, respuesta completa/parcial a la terapia, tratamiento con rituximab, género, ausencia de recidiva en 1 año, enfermedad restringida a los ganglios, fase clínica (por ejemplo, estado de ECOG), masa tumoral y LDH sérica. Más preferentemente, dicho parámetro (o parámetros) clínico es/son el IPI y/o la edad.

La expresión “fase clínica”, como se usa en el presente documento, se refiere a la grado de propagación de la enfermedad. La fase a menudo tiene en cuenta el tamaño de un tumor, lo profundo que ha penetrado, si ha invadido órganos adyacentes, en cuántos ganglios linfáticos ha metastatizado (si los hubiere) y si se ha propagado a órganos distantes. La estadificación del cáncer es el factor pronóstico de supervivencia más importante y el tratamiento del cáncer se determina principalmente mediante la estadificación. Por lo tanto, la estadificación no cambia con la evolución de la enfermedad ya que se utiliza para evaluar el pronóstico. Sin embargo, puede volverse a determinar la fase del cáncer del paciente tras el tratamiento, pero la estadificación establecida en el momento del diagnóstico rara vez se cambia. La fase clínica está basada en toda la información disponible obtenida antes de una cirugía para extirpar el tumor. Por lo tanto, puede incluir información sobre el tumor obtenida mediante exploración física, examen radiológico y endoscopia. Puede incluir información adicional obtenida mediante el examen microscópico del tumor por un anatomopatólogo.

El término “cohorte”, como se usa en el presente documento, se refiere a un grupo de pacientes que comparten una característica o experiencia común dentro de un periodo definido, es decir, padecen de LDLBG. La cohorte comprende al menos 20, al menos 30, al menos 50, al menos 75, al menos 100 o al menos 150 de tales pacientes.

El término “correlacionar” o “correlación”, como se usa en el presente documento, se refiere a la combinación de un biomarcador con otro biomarcador o un parámetro clínico para realizar un pronóstico. De ese modo, se reduce la rigurosidad para el valor del punto de corte de cada biomarcador/parámetro clínico.

La expresión “determinar el nivel de un biomarcador” se refiere a determinar el nivel de expresión de un biomarcador y/o la cantidad de células que portan un biomarcador en su superficie (es decir, un marcador de superficie celular). En este sentido, el nivel de expresión se refiere al nivel de ARNm y/o el nivel de proteína, y/o el número de células que portan un biomarcador en su superficie.

La expresión “linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG)”, como se usa en el presente documento, se refiere a un tipo de linfoma no Hodgkin agresivo, que representa aproximadamente el 40 % de linfomas entre adultos. Se diagnostica normalmente entre los 25 y 40 años. Como con la mayoría de linfomas no Hodgkin, existe una predominancia masculina. De todos los cánceres que afectan a la misma clase de célula sanguínea, el 31 % de casos son LDLBG. Se han identificado tres subtipos principales de LDLBG basándose en su actividad genética:

- activado (LDLBG-ABC), con un patrón de expresión genética que es similar al de los linfocitos B activados sanos,
- de centro germinal (LDLBG-GCB), con un patrón de expresión genética que es similar a la de los linfocitos B de centro germinal y una translocación cromosómica que implica el gen BCL-2; este tipo tiene un pronóstico relativamente favorable, y
- linfoma primario mediastínico de linfocitos B (LPMB), en donde el cáncer se encuentra en el timo y los ganglios linfáticos detrás del esternón (mediastino), la zona entre los pulmones, en medio del tórax.

La fase de linfoma no Hodgkin describe cuántos grupos de ganglios linfáticos están afectados, dónde se encuentran en el cuerpo y si están implicados otros órganos tales como la médula ósea o el hígado:

- Fase 1: El linfoma está sólo en un grupo de ganglios linfáticos, en una zona particular del cuerpo.
- Fase 2: Está afectado más de un grupo de ganglios linfáticos, pero todos los ganglios afectados están contenidos dentro de ya sea la mitad superior o la mitad inferior del cuerpo. La mitad superior del cuerpo está por encima del diafragma (la lámina muscular por debajo de los pulmones) y la mitad inferior está por debajo de él.
- Fase 3: El linfoma está en los ganglios linfáticos encima y debajo del diafragma. El bazo se considera un ganglio linfático en este sistema de estadificación.
- Fase 4: El linfoma se ha propagado más allá de los ganglios linfáticos a otros órganos tales como los huesos, hígado o pulmones.

Además de proporcionar a cada fase un número, puede usarse ya sea la letra A o la B para mostrar si están presentes o no síntomas específicos. Si hay pérdida de peso, fiebres o sudores nocturnos, se añadirá la letra B junto a la fase; en caso contrario, se añade la letra A. En ocasiones el linfoma puede iniciarse en zonas fuera de los ganglios linfáticos. Esto se denomina linfoma extraganglionar y la fase incluirá la letra E (por extraganglionar).

La expresión “supervivencia sin enfermedad” la conoce bien el experto en la materia y significa vivir sin la enfermedad que se está controlando; por ejemplo, si se usa la expresión de biomarcadores para diagnosticar o controlar el LDLBG, la supervivencia sin enfermedad significaría sin LDLBG detectable.

La expresión “supervivencia sin episodios” la conoce bien el experto en la materia y significa vivir sin la aparición de un grupo particular de episodios definidos (por ejemplo, progresión del cáncer) tras una acción particular (por ejemplo, tratamiento).

El término “género”, como se usa en el presente documento, se refiere a la identidad sexual o la condición de ser mujer u hombre. Preferentemente, se determina por medios genéticos y no por el aspecto físico.

La expresión “puntuación del Índice Pronóstico Internacional (IPI)”, como se usa en el presente documento, se refiere a la herramienta clínica desarrollada por oncólogos para ayudar en la predicción del pronóstico de pacientes con linfoma no Hodgkin agresivo. La puntuación del IPI se desarrolló a través de un análisis retrospectivo realizado en 2031 pacientes con linfoma no Hodgkin agresivo, de todas las edades, tratados con un régimen de quimioterapia basado en doxorubicina, tal como CHOP, entre 1982 y 1987. Se analizaron varias características de los pacientes para determinar si estaban asociadas con diferencias en la supervivencia, y los factores que aparecieron como importantes fueron la edad, la lactato deshidrogenasa (LDH) sérica elevada, el estado general y la cantidad de sitios extraganglionares de la enfermedad. La expresión también puede incluir puntuaciones derivadas tales como FLIPI (sigla del inglés *Follicular Lymphoma International Prognostic Index*: índice pronóstico internacional de linfoma folicular), MIPI (sigla del inglés *Mcl International Prognostic Index*: índice pronóstico de linfoma del manto) e IPI ajustado según la edad.

La expresión “supervivencia global” o “SG” la conoce bien el experto en la materia y se refiere al destino del paciente tras el diagnóstico, pese a la posibilidad de que la causa de la muerte en un paciente no se deba de forma directa a los efectos de la enfermedad (cáncer). En otras palabras, se refiere al pronóstico de que el paciente no morirá debido al LDLBG, preferentemente dentro de al menos 2 años, al menos 3 años, al menos 4 años, al menos 5 años, al menos 10 años, al menos 15 años o al menos 20 años. Muy preferentemente, el paciente morirá de otra causa que no sea el LDLBG.

El término “paciente”, como se usa en el presente documento, se refiere a un sujeto que padece LDLBG, aunque puede que todavía no se haya diagnosticado al sujeto. También puede referirse a un sujeto que no padece LDLBG, que no obstante se someterá al método de la invención, por ejemplo, para diagnosticar el LDLBG o para servir como control.

La expresión “estado general”, como se usa en el presente documento, se refiere al intento de cuantificar el bienestar general y las actividades de la vida cotidiana de los pacientes con cáncer. Esta medida se usa para determinar si pueden recibir quimioterapia, si es necesario un ajuste de la dosis y como medida de la intensidad de cuidado paliativo necesaria. También se usa en ensayos oncológicos controlados aleatorizados como medida de calidad de vida. Existen diversos sistemas de puntuación. Los usos de forma más generalmente son la puntuación

de Karnofsky y la puntuación de Zubrod, usándose esta última en publicaciones de la OMS. Para los niños, se usa la puntuación de Lansky.

El término “pronóstico”, como se usa en el presente documento, significa la probabilidad de restablecimiento de una enfermedad o a la predicción del probable desarrollo o desenlace de una enfermedad, que incluye, pero sin limitación predecir la duración de la supervivencia global (SG), supervivencia a 1 año (S1A), respuesta a la terapia (RT), supervivencia sin enfermedad, supervivencia sin progresión y supervivencia sin episodios. Como entenderán los expertos en la materia, aunque se prefiere no es necesario que la predicción sea correcta para el 100 % de los sujetos que van a diagnosticarse o evaluarse. Sin embargo, el término, requiere que una parte estadísticamente significativa de sujetos pueda identificarse como que tiene una probabilidad aumentada de tener un desenlace dado. El experto en la técnica puede determinar sin más preámbulos si un sujeto es estadísticamente significativo usando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, determinación de intervalos de confianza, determinación del valor de p, prueba de la t de Student, la prueba de Mann-Whitney, etc. Se encuentran detalles en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferentes son al menos del 50 %, al menos del 60 %, al menos del 70 %, al menos del 80 %, al menos del 90 %, al menos del 95 %. Los valores p son, preferentemente, 0,05, 0,02, 0,01 o inferiores. Preferentemente, el pronóstico se caracteriza por predecir la SG, la supervivencia a 1 año (S1A) y/o la respuesta a la terapia (RT). La expresión “mal pronóstico”, como se usa en el presente documento, significa un desenlace que se consideraría negativo para el paciente y que depende del tipo de pronóstico; por ejemplo, un mal pronóstico de supervivencia a 1 año (S1A) significaría que el paciente no sobrevivirá durante al menos 1 año. La expresión “buen pronóstico”, como se usa en el presente documento, se refiere a un desenlace que se consideraría positivo para el paciente y que depende del tipo de pronóstico; por ejemplo, un buen pronóstico de supervivencia a 1 año (S1A) significaría que el paciente sobrevivirá durante al menos 1 año. La expresión “supervivencia a 1 año (S1A)” se refiere al pronóstico de que el paciente sobrevivirá durante al menos 1 año.

La expresión “supervivencia sin progresión” la conoce bien el experto en la materia y se refiere a la duración de tiempo durante y tras el tratamiento en el que un paciente vive con una enfermedad que no empeora, y puede usarse en un estudio o ensayo clínico para ayudar a averiguar lo bien que está funcionando un tratamiento.

En la presente invención, la expresión “respuesta a la terapia” o “RT” se refiere a la respuesta del paciente que padece LDLBG a una terapia para tratar dicha enfermedad. Pueden usarse criterios convencionales (Miller, *et al.*, *Cancer*, 1981; 47(1): 207-14) incluidos en la presente para evaluar la respuesta a la terapia, incluyendo la respuesta, la estabilización y la progresión. El término “respuesta”, como se usa en el presente documento, puede ser una respuesta completa (o remisión completa), que es la desaparición de toda enfermedad maligna detectable o una respuesta parcial, que se define como la disminución de aproximadamente > 50 % en la suma de los productos de los diámetros perpendiculares más grandes de una o más lesiones (lesiones tumorales), ninguna lesión nueva y ninguna progresión de cualquier lesión. Se consideraron “respondedores” a los sujetos que lograron una respuesta completa o parcial, y se consideraron “no respondedores” a todos los otros sujetos. Como entenderán los expertos en la materia, habitualmente no se pretende que tal evaluación sea correcta para todos (es decir, el 100 por cien) los sujetos a identificar. El término, sin embargo, requiere que pueda identificarse una parte estadísticamente significativa de sujetos (por ejemplo, una cohorte en un estudio de cohorte). El experto en la materia puede determinar sin más preámbulos si una parte es estadísticamente significativa usando diversas herramientas de evaluación estadística bien conocidas, por ejemplo, la determinación de intervalos de confianza, la determinación del valor de p, la prueba de la t de Student, la prueba de Mann-Whitney, etc. Se encuentran detalles en Dowdy y Wearden, *Statistics for Research*, John Wiley & Sons, Nueva York 1983. Los intervalos de confianza preferentes son al menos del 90 %, al menos del 95 %, al menos del 97 %, al menos del 98 % o al menos del 99 %. Los valores p son, preferentemente, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005 o 0,0001. Más preferentemente, pueden identificarse de forma adecuada mediante el método de la presente invención al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 % de los sujetos de una población. El término “estabilización”, como se usa en el presente documento, se define como una disminución inferior al 50 % (< 50 %) o un aumento inferior al 25 % (< 25 %) del tamaño tumoral. El término “progresión”, como se usa en el presente documento, se define como un aumento del tamaño de las lesiones tumorales (más del 25 %) > 25 % o la aparición de nuevas lesiones.

El término “muestra”, como se usa en el presente documento, abarca una diversidad de tipos de muestra obtenidas de un sujeto y útiles en el procedimiento de la invención. Las muestras biológicas pueden incluir, pero sin limitación, muestras de tejidos sólidos, muestras de tejidos líquidos, fluidos biológicos, punciones, células y fragmentos celulares. Los ejemplos específicos de muestras biológicas incluyen, pero sin limitación, muestras de tejidos sólidos obtenidas mediante extirpación quirúrgica, una muestra de ensayo de patología, una muestra archivada o una muestra de ensayo de biopsia, cultivos de tejidos o células obtenidas de los mismos, y la progenie de los mismos, y cortes o frotis preparados a partir de cualquiera de estas fuentes. Los ejemplos ilustrativos, no limitativos, incluyen muestras obtenidas de ganglios linfáticos y otras muestras de ensayo patológicas, en las que dichas muestras de ensayo patológicas se caracterizan preferentemente porque contienen material tumoral de LDLBG (por ejemplo células, proteínas, etc.), preferentemente los biomarcadores de la invención obtenidos de tejido tumoral. Una de tales muestras preferentes es la sangre. Las muestras biológicas también incluyen cualquier material obtenido del cuerpo de un mamífero, que incluye, pero sin limitación, sangre, líquido cefalorraquídeo, suero, plasma, orina, punciones de pezón, punción con aguja fina, lavado tisular tal como lavado ductal, saliva, esputo, líquido ascítico,

hígado, riñón, mama, hueso, médula ósea, testículos, cerebro, ovario, piel, pulmón, próstata, tiroides, páncreas, cuello uterino, estómago, intestino, zona colorrectal, cerebro, vejiga, colon, zona uterina, semen, linfa, secreciones vaginales, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, de cabeza y cuello, tumores nasofaríngeos, líquido amniótico, leche materna, esputo o tensoactivo pulmonar, orina, materia fecal y otras muestras líquidas de origen biológico, y pueden referirse ya sea a las células o a fragmentos celulares suspendidos en las mismas, o al medio líquido y sus solutos. Toda o una parte de la muestra biológica puede tener un nivel de expresión de biomarcador característico de una o más patologías. Los métodos para obtener la muestra de la biopsia incluyen la división macroscópica de una masa, o microdissección, biopsia Tru-Cut u otros métodos de separación celular conocidos en la técnica. La muestra celular o tisular se toma normalmente del sujeto en estudio, concretamente, del paciente con LDLBG diagnosticado previamente (o aún no diagnosticado) de LDLBG, o de un paciente con LDLBG sometido a tratamiento, etc. Los métodos de aislamiento de muestras celulares y tisulares son conocidos para los expertos en la materia e incluyen, pero sin limitación, punciones, cortes de tejido, biopsias con aguja y similares. Con frecuencia la muestra será una “muestra clínica”, que es una muestra obtenida de un paciente con LDLBG, que incluye cortes de tejidos tales como cortes congelados o cortes de parafina tomados con fines histológicos. La muestra también puede obtenerse de sobrenadantes (de células) o puede ser las propias células tomadas de los pacientes con LDLBG o de cultivos celulares, células de cultivo de tejidos y punciones con aguja fina.

La expresión “LDH sérica”, como se usa en el presente documento, se refiere al nivel de LDH presente en el suero de un sujeto. La lactato deshidrogenasa (LDH) es una enzima (EC 1.1.1.27) presente en una amplia diversidad de organismos, incluyendo plantas y animales. La LDH cataliza la interconversión de piruvato y lactato con la concomitante interconversión de NADH y NAD<sup>+</sup>. Convierte el piruvato, el producto final de la glucólisis, en lactato cuando está ausente el oxígeno, o es escaso, y realiza la reacción inversa durante el ciclo de Cori en el hígado. A altas concentraciones de lactato, la enzima presenta inhibición por retroinhibición y disminuye la tasa de conversión de piruvato en lactato. También cataliza la deshidrogenación del 2-hidroxiacetato, pero es un sustrato mucho más escaso que el lactato. La degradación tisular eleva los niveles de LDH y, por lo tanto, una medida de ella indica, por ejemplo, hemólisis. Otros trastornos señalados por una LDH elevada incluyen cáncer, meningitis, encefalitis, pancreatitis aguda y VIH. Se usa para el seguimiento de pacientes de cáncer (en especial con linfoma), dado que las células cancerosas tienen una tasa alta de renovación con células destruidas, lo que conduce a una actividad de LDH elevada.

La expresión “asociado de forma significativa con el pronóstico del LDLBG”, como se usa en el presente documento, se refiere a la improbabilidad de que un resultado o acontecimiento esté asociado con el pronóstico de LDLBG al azar. La cantidad de evidencia necesaria para aceptar que es improbable que un acontecimiento se presente al azar se conoce como el nivel de significación o valor p crítico. Los niveles de significación más utilizados son del 10 % (0,1), 5 % (0,05), 1 % (0,01), 0,5 % (0,005) y 0,1 % (0,001). Tales resultados se denominan de manera informal como ‘estadísticamente significativos’. La elección del nivel de significación es una tarea arbitraria, pero para muchas aplicaciones se elige un nivel del 5 %, por la sencilla razón de que es convencional. En estadística, una asociación es cualquier relación entre dos cantidades medidas que las hace estadísticamente dependientes.

El término “sujeto”, como se usa en el presente documento, incluye cualquier animal clasificado como un mamífero e incluye, pero sin limitación, animales domésticos y de granja, primates y seres humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores. Preferentemente, el sujeto es un ser humano, hombre o mujer, de cualquier edad o raza. En una realización, el paciente tiene un núcleo tumoral de al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 %. La expresión “núcleo tumoral” tiene el significado como se conoce en general en la técnica. Preferentemente, se refiere al porcentaje del tumor que es el núcleo, siendo el resto la periferia del tumor.

La expresión “masa tumoral”, como se usa en el presente documento, se refiere a la masa total de tejido tumoral que porta un individuo con cáncer.

El término “VEGF”, como se usa en el presente documento, se refiere al factor de crecimiento endotelial vascular humano A, como se muestra en la base de datos UniProt con número de referencia P15692, a fecha de 4 de agosto de 2011. En una divulgación preferente, el valor del punto de corte óptimo para VEGF es 0,18, aunque en general es preferente un intervalo de 0,01-1,15 (de 0,0050 a 1,54, intervalo de confianza del 95 %) o, como alternativa, un intervalo de 0,05 a 0,8 o de 0,10 o 0,4, usando el método estadístico descrito en los ejemplos (preferentemente el de Kaplan-Meier), preferentemente variando p de 0,01 a 0,25, más preferentemente de 0,03 hasta 0,1 y siendo muy preferentemente 0,05.

#### 60 Método para el pronóstico de un paciente que padece LDLBG

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método *in vitro* para el pronóstico de un paciente que padece LDLBG, que comprende determinar en una muestra de dicho paciente el nivel de proteína BCL6 mediante inmunofluorescencia cuantitativa, en el que dicho paciente está en terapia con CHOP-R, y en el que un nivel alto de expresión de BCL6 en dicha muestra es indicativo de un mal pronóstico y un nivel bajo de expresión de BCL6 en dicha muestra es indicativo de un buen pronóstico.



En una realización particular, el método *in vitro* para el pronóstico de un paciente que padece LDLBG comprende adicionalmente determinar una muestra de dicho paciente el nivel de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en VEGF, CD68 y CD20.

5 En un aspecto, el documento divulga un método *in vitro* para el pronóstico de un paciente que padece linfoma difuso de linfocitos B grandes (DLDBG), que comprende determinar en una muestra de dicho paciente el nivel de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en VEGF, BCL6, CD68, CD20, y combinaciones de los mismos.

10 Preferentemente,

- un nivel alto de expresión de VEGF en dicha muestra es indicativo de un mal pronóstico y un nivel bajo de expresión de VEGF en dicha muestra es indicativo de un buen pronóstico,

15 - un nivel alto de expresión de BCL6 en dicha muestra es indicativo de un mal pronóstico y un nivel bajo de BCL6 en dicha muestra es indicativo de un buen pronóstico,

- un nivel alto de expresión de CD68 o de células CD68<sup>+</sup> en dicha muestra es indicativo de un mal pronóstico y un nivel bajo de expresión de CD68 o de células CD68<sup>+</sup> en dicha muestra es indicativo de un buen pronóstico, y/o

20 - un nivel alto de expresión de CD20 o de linfocitos CD20<sup>+</sup> en dicha muestra es indicativo de un buen pronóstico y un nivel bajo de expresión de CD20 o de linfocitos CD20<sup>+</sup> en dicha muestra es indicativo de un mal pronóstico.

Por lo tanto, el documento divulga un método *in vitro* para el pronóstico de un paciente que padece LDLBG, que comprende determinar en una muestra de dicho paciente el nivel de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en VEGF, BCL6, CD68, CD20 y combinaciones de los mismos, en el que

25 - un nivel alto de expresión de VEGF en dicha muestra es indicativo de un mal pronóstico y un nivel bajo de expresión de VEGF en dicha muestra es indicativo de un buen pronóstico,

- un nivel alto de expresión de BCL6 en dicha muestra es indicativo de un mal pronóstico y un nivel bajo de expresión de BCL6 en dicha muestra es indicativo de un buen pronóstico,

30 - un nivel alto de expresión de CD68 o de células CD68<sup>+</sup> en dicha muestra es indicativo de un mal pronóstico y un nivel bajo de expresión de CD68 o de células CD68<sup>+</sup> en dicha muestra es indicativo de un buen pronóstico, y/o

- un nivel alto de expresión de CD20 o de linfocitos CD20<sup>+</sup> en dicha muestra es indicativo de un buen pronóstico y un nivel bajo de expresión de CD20 o de linfocitos CD20<sup>+</sup> en dicha muestra es indicativo de un mal pronóstico.

35 De acuerdo con la invención, la expresión "determinar el nivel de un biomarcador" se refiere a determinar el nivel de expresión de un biomarcador y/o la cantidad de células que portan un biomarcador en su superficie (es decir, un marcador de superficie celular). En este sentido, el nivel de expresión se refiere al nivel de ARNm y/o el nivel de proteína, y/o la cantidad de células que portan un biomarcador en su superficie.

40 Los métodos para determinar la expresión pueden basarse en la determinación de los niveles de ARNm o los niveles de proteína en una muestra en su conjunto, en células de una muestra y/o en la fracción no celular de una muestra. Los métodos para determinar los niveles de ARNm son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, PCR en tiempo real (rtPCR, sigla del inglés *real-time PCR*), transferencia de tipo Northern, nanostring y las tecnologías de micromatriz.

45 Dentro del marco del documento puede usarse prácticamente cualquier método convencional para detectar y cuantificar los niveles de proteínas. A modo de ejemplo no limitativo, los niveles de expresión se determinan por medio de anticuerpos con la capacidad de unirse de forma específica a la proteína a determinar (o a fragmentos de la misma que contienen los determinantes antigénicos) y la cuantificación posterior de los complejos antígeno-anticuerpo resultantes. Los anticuerpos que van a usarse en este tipo de ensayo pueden ser, por ejemplo, sueros policlonales, sobrenadantes de hibridoma o anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpo, Fv, Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub>, scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y anticuerpos humanizados. Al mismo tiempo, los anticuerpos pueden o no estar marcados. Los ejemplos ilustrativos, pero no exclusivos, de marcadores que pueden usarse incluyen isótopos radioactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos quimioluminiscentes, cofactores o sustratos enzimáticos, inhibidores de enzimas, partículas, colorantes, etc. Existe una amplia diversidad de ensayos bien conocidos que pueden usarse en el presente documento, usando anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpos secundarios); estas técnicas incluyen transferencia de tipo Western o inmunotransferencia, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (ensayo inmunoenzimático), DAS-ELISA (ELISA tipo sándwich de doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, inmunofluorescencia, técnicas basadas en el uso de biochips o micromatrices de proteína que incluyen anticuerpos o ensayos específicos basados en la precipitación coloidal en formatos tales como tiras reactivas. Otras formas de detección y cuantificación de proteína incluyen técnicas de cromatografía de afinidad, ensayos de unión a ligando, etc.

65

- En la invención, la determinación de los niveles de biomarcadores se realiza mediante inmunofluorescencia cuantitativa. La inmunofluorescencia (IF) es una técnica usada para microscopía óptica con un microscopio de fluorescencia y se usa principalmente en muestras biológicas. Esta técnica usa la especificidad de los anticuerpos por su antígeno para dirigir colorantes fluorescentes a dianas biomoleculares específicas dentro de una célula y, por lo tanto, permite la visualización de la distribución de la molécula diana a través de la muestra. La IF es un ejemplo de inmunotinción ampliamente usado y es un ejemplo específico de inmunohistoquímica (IHQ) que hace uso de fluoróforos para visualizar el emplazamiento de los anticuerpos. La IF puede usarse en cortes de tejido, líneas celulares cultivadas o células individuales, y puede usarse para analizar la distribución de proteínas, glucanos y moléculas no biológicas y biológicas pequeñas. La IF puede usarse en combinación con otros métodos sin anticuerpos de tinción fluorescente, por ejemplo, uso de DAPI para marcar ADN. Pueden usarse varios diseños de microscopio para el análisis de muestras de IF; el más simple es el microscopio de epifluorescencia, y también se usa ampliamente el microscopio confocal. También pueden usarse diversos diseños de microscopio de súper resolución que tienen capacidad de una resolución mucho más alta.
- 15 En una realización, dicho método comprende adicionalmente determinar y/o correlacionar al menos un parámetro clínico conocido por ser indicativo para el pronóstico del LDLBG.
- En una divulgación preferente, dicho biomarcador es VEGF, dicho pronóstico se caracteriza de forma opcional por la SG y dicho parámetro clínico de forma opcional es el IPI y/o la edad.
- 20 En otra divulgación preferente, dicho biomarcador es VEGF, dicho pronóstico se caracteriza de forma opcional por la S1A y dicho parámetro clínico de forma opcional es el IPI y/o la edad.
- En otra divulgación preferente, dicho biomarcador es VEGF, dicho pronóstico se caracteriza de forma opcional por la RT y dicho parámetro clínico de forma opcional es el IPI y/o la edad.
- 25 En otra realización preferente, dicho biomarcador es BCL6, dicho pronóstico se caracteriza de forma opcional por la SG y dicho parámetro clínico de forma opcional es el IPI y/o la edad.
- 30 En otra realización preferente, dicho biomarcador es BCL6, dicho pronóstico se caracteriza de forma opcional por la S1A y dicho parámetro clínico de forma opcional es el IPI y/o la edad.
- En otra realización preferente, dicho biomarcador es BCL6, dicho pronóstico se caracteriza de forma opcional por la RT y dicho parámetro clínico de forma opcional es el IPI y/o la edad.
- 35 En otra divulgación preferente, dicho biomarcador es CD68, dicho pronóstico se caracteriza de forma opcional por la SG y dicho parámetro clínico de forma opcional es el IPI y/o la edad.
- En otra divulgación preferente, dicho biomarcador es CD68, dicho pronóstico se caracteriza de forma opcional por la S1A y dicho parámetro clínico de forma opcional es el IPI y/o la edad.
- 40 En otra divulgación preferente, dicho biomarcador es CD68, dicho pronóstico se caracteriza de forma opcional por la RT y dicho parámetro clínico de forma opcional es el IPI y/o la edad.
- 45 En otra divulgación preferente, dicho biomarcador es CD20, dicho pronóstico se caracteriza de forma opcional por la SG y dicho parámetro clínico de forma opcional es el IPI y/o la edad.
- En otra divulgación preferente, dicho biomarcador es CD20, dicho pronóstico se caracteriza de forma opcional por la S1A y dicho parámetro clínico de forma opcional es el IPI y/o la edad.
- 50 En otra divulgación preferente, dicho biomarcador es CD20, dicho pronóstico se caracteriza de forma opcional por la RT y dicho parámetro clínico de forma opcional es el IPI y/o la edad.
- Dado que la determinación de más de un biomarcador puede aumentar la probabilidad de un pronóstico correcto o incluso posibilitar el uso de un biomarcador que puede no ser suficiente por sí solo para proporcionar un pronóstico altamente fiable, se prevé adicionalmente que el método comprenda la determinación de los niveles de BCL6 y un (o incluso más) biomarcador seleccionado del grupo que consiste en VEGF, CD68 y CD20, y de forma opcional uno o más biomarcadores adicionales seleccionados de ese grupo.
- 55 Por consiguiente, en una realización preferente, dichos biomarcadores son VEGF y BCL6, y de forma opcional uno o más de los biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en CD68 y CD20, dicho pronóstico se caracteriza de forma opcional por la SG y dicho parámetro clínico de forma opcional es el IPI y/o la edad.
- 60 En otra realización preferente, dichos biomarcadores son VEGF y BCL6, y de forma opcional uno o más de los biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en CD68 y CD20, dicho pronóstico se caracteriza de forma opcional por la S1A y dicho parámetro clínico de forma opcional es el IPI y/o la edad.
- 65

- En otra realización preferente, dichos biomarcadores son VEGF y BCL6, y de forma opcional uno o más de los biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en CD68 y CD20, dicho pronóstico se caracteriza de forma opcional por la RT y dicho parámetro clínico de forma opcional es el IPI y/o la edad.
- 5 En otra divulgación preferente, dichos biomarcadores son VEGF y CD68, y de forma opcional uno o más de los biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en BCL6 y CD20, dicho pronóstico se caracteriza de forma opcional por la SG y dicho parámetro clínico de forma opcional es el IPI y/o la edad.
- 10 En otra divulgación preferente, dichos biomarcadores son VEGF y CD68, y de forma opcional uno o más de los biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en BCL6 y CD20, dicho pronóstico se caracteriza de forma opcional por la S1A y dicho parámetro clínico de forma opcional es el IPI y/o la edad.
- 15 En otra divulgación preferente, dichos biomarcadores son VEGF y CD68, y de forma opcional uno o más de los biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en BCL6 y CD20, dicho pronóstico se caracteriza de forma opcional por la RT y dicho parámetro clínico de forma opcional es el IPI y/o la edad.
- 20 En otra divulgación preferente, dichos biomarcadores son VEGF y CD20, y de forma opcional uno o más de los biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en BCL6 y CD68, dicho pronóstico se caracteriza de forma opcional por la SG y dicho parámetro clínico de forma opcional es el IPI y/o la edad.
- 25 En otra divulgación preferente, dichos biomarcadores son VEGF y CD20, y de forma opcional uno o más de los biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en BCL6 y CD68, dicho pronóstico se caracteriza de forma opcional por la RT y dicho parámetro clínico de forma opcional es el IPI y/o la edad.
- 30 En otra realización preferente, dichos biomarcadores son BCL6 y CD68, y de forma opcional uno o más de los biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en VEGF y CD20, dicho pronóstico se caracteriza de forma opcional por la SG y dicho parámetro clínico de forma opcional es el IPI y/o la edad.
- 35 En otra realización preferente, dichos biomarcadores son BCL6 y CD68, y de forma opcional uno o más de los biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en VEGF y CD20, dicho pronóstico se caracteriza de forma opcional por la S1A y dicho parámetro clínico de forma opcional es el IPI y/o la edad.
- 40 En otra realización preferente, dichos biomarcadores son BCL6 y CD68, y de forma opcional uno o más de los biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en VEGF y CD20, dicho pronóstico se caracteriza de forma opcional por la RT y dicho parámetro clínico de forma opcional es el IPI y/o la edad.
- 45 En otra realización preferente, dichos biomarcadores son BCL6 y CD20, y de forma opcional uno o más de los biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en VEGF y CD68, dicho pronóstico se caracteriza de forma opcional por la SG y dicho parámetro clínico de forma opcional es el IPI y/o la edad.
- 50 En otra realización preferente, dichos biomarcadores son BCL6 y CD20, y de forma opcional uno o más de los biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en VEGF y CD68, dicho pronóstico se caracteriza de forma opcional por la RT y dicho parámetro clínico de forma opcional es el IPI y/o la edad.
- 55 En otra divulgación preferente, dichos biomarcadores son CD68 y CD20, y de forma opcional uno o más de los biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en VEGF, y BCL6, dicho pronóstico se caracteriza de forma opcional por la SG y dicho parámetro clínico de forma opcional es el IPI y/o la edad.
- 60 En otra divulgación preferente, dichos biomarcadores son CD68 y CD20, y de forma opcional uno o más de los biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en VEGF y BCL6, dicho pronóstico se caracteriza de forma opcional por la S1A y dicho parámetro clínico de forma opcional es el IPI y/o la edad.
- 65 En otra divulgación preferente, dichos biomarcadores son CD68 y CD20, y de forma opcional uno o más de los biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en VEGF y BCL6, dicho pronóstico se caracteriza de forma opcional por la RT y dicho parámetro clínico de forma opcional es el IPI y/o la edad.
- 65 En todas las realizaciones y divulgaciones preferentes anteriores, en las que dicho parámetro clínico de forma opcional es el IPI y/o la edad, puede seleccionarse en cambio o adicionalmente del grupo que consiste en respuesta

completa/parcial a la terapia, tratamiento con rituximab, género, ausencia de recidiva en 1 año, enfermedad restringida a los ganglios, fase clínica (por ejemplo, estado de ECOG), masa tumoral y LDH sérica.

En el método del primer aspecto, dicho paciente está en terapia para DLBCL con ciclofosfamida (Cytosan), doxorubicina (hidroxidaunorrubicina), vincristina (Oncovin) y prednisona (CHOP), en combinación con rituximab (CHOP-R), en el que dicho pronóstico puede estar afectado por dicha terapia. La expresión “puede estar afectado” en este sentido significa que el pronóstico de dicho paciente está afectado por una respuesta a la terapia a la que se somete el paciente o no está afectado por una respuesta a la terapia a la que se somete el paciente, debiéndose lo último ya sea a que no hay respuesta a la terapia o a que la respuesta no es suficiente para cambiar el pronóstico.

Preferentemente, dicha terapia para DLBCL está basada en la administración de un fármaco, o una combinación de fármacos, en la que dicho fármaco se selecciona del grupo que consiste en un agente alquilante, una antraciclina, un antimetabólico alcaloide de la vinca, un corticoesteroide, un anticuerpo anti-CD20 y cualquier combinación de los mismos. Más preferentemente, el agente alquilante es ciclofosfamida, la antraciclina es doxorubicina, el antimetabólico alcaloide de la vinca es vincristina, el corticoesteroide es prednisona y el anticuerpo anti-CD20 es rituximab.

Un “agente alquilante”, como se usa en el presente documento, es un agente que une un grupo alquilo ( $C_nH_{2n+1}$ ) al ADN; los ejemplos ilustrativos, no limitativos de agentes alquilantes incluyen ciclofosfamida, ifosfamida, tiotepa, busulfán, melfalán, cloroetilnitrosourea, mecloretamina, clorambucilo y similares. En una realización particular, el agente alquilante es ciclofosfamida.

El término “antraciclina” o “antibiótico antraciclina”, como se usa en el presente documento, se refiere a una clase de fármacos usados en la quimioterapia del cáncer, obtenidos de bacterias *Streptomyces*; dicha clase de fármacos tiene tres mecanismos de acción:

- inhibe la síntesis de ADN y ARN intercalándose entre pares de bases de la cadena de ADN/ARN, impidiendo así la replicación de las células cancerosas que crecen rápidamente;
- inhibe la enzima topoisomerasa II, impidiendo la relajación del ADN superenrollado y bloqueando así la transcripción y replicación del ADN;
- crea radicales de oxígeno libres mediados por hierro que dañan el ADN y las membranas celulares.

En una realización particular, la antraciclina es doxorubicina.

Un “antimetabólico alcaloide de la vinca” es un compuesto que inhibe la proliferación celular uniéndose a microtúbulos, lo que conduce a un bloqueo mitótico y a la apoptosis. Los ejemplos ilustrativos, no limitativos de antimetabólicos alcaloides de la vinca incluyen vinblastina, vincristina, vindesina y navelbina. En una realización particular, el antimetabólico alcaloide de la vinca es vincristina.

El término “corticoesteroide” o corticoide, como se usa en el presente documento, se refiere a una clase de hormonas esteroideas que se producen en la corteza suprarrenal y sus derivados, que están implicadas en una amplia variedad de sistemas fisiológicos tales como la respuesta al estrés, la respuesta inmunitaria y la regulación de la inflamación, el metabolismo de los hidratos de carbono, el catabolismo de proteínas, niveles de electrolitos en sangre y el comportamiento. Los ejemplos ilustrativos, no limitativos de corticoesteroides incluyen la hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, acetato de cortisona, pivalato de tixocortol, prednisolona, metilprednisolona, prednisona, acetónido de triamcinolona, alcohol de triamcinolona, mometasona, amcinonida, budesonida, desonida, fluciclonida, acetónido de fluciclonida, halcinonida, betametasona, fosfato sódico de betametasona, dexametasona, fosfato sódico de dexametasona, parametasona, fludrocortisona y flucortolona. En una realización particular, el corticoesteroide es prednisona.

El término “anticuerpo anti-CD20”, como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos monoclonales o fragmentos de unión a antígeno de los mismos, que se dirigen de forma específica a CD20. Los ejemplos ilustrativos, no limitativos de anticuerpos anti-CD20 incluyen rituximab, ibritumomab tiuxetán y tositumomab. En una realización particular, el anticuerpo anti-CD20 es rituximab.

En una realización preferente, el agente alquilante es ciclofosfamida, la antraciclina es doxorubicina, el antimetabólico alcaloide de la vinca es vincristina, el corticoesteroide es prednisona y el anticuerpo anti-CD20 es rituximab. En una realización más preferente, el tratamiento para DLBCL consiste en ciclofosfamida (Cytosan), doxorubicina (hidroxidaunorrubicina), vincristina (Oncovin) y prednisona (CHOP), en combinación con rituximab (CHOP-R).

En una realización adicional del método del primer aspecto, el nivel de dicho biomarcador se compara con un valor de punto de corte que se asocia de forma significativa con el pronóstico de DLBCL con o sin correlación con uno o más parámetros clínicos y/o biomarcadores adicionales. Como se define anteriormente, la expresión “asociado de forma significativa con el pronóstico de DLBCL”, se refiere a la improbabilidad de que un resultado o acontecimiento esté asociado con el pronóstico de DLBCL al azar. La cantidad de evidencia necesaria para aceptar que es improbable que un acontecimiento se haya presentado al azar se conoce como el nivel de significación o valor de p crítico. Los niveles de significación más utilizados son del 10 % (0,1), 5 % (0,05), 1 % (0,01), 0,5 % (0,005) y 0,1 %

(0,001). Tales resultados se denominan de manera informal 'estadísticamente significativos'. La elección del nivel de significación es una tarea arbitraria, pero para muchas aplicaciones se elige un nivel del 5 %, por la sencilla razón de que es convencional. En estadística, una asociación es cualquier relación entre dos cantidades medidas que las hace estadísticamente dependientes.

5 Se prevé que puede usarse cualquier biomarcador o parámetro clínico útil para el pronóstico del LDLBG, preferentemente los mencionados en el presente documento, junto con el biomarcador BCL6. Se espera que cuantos más biomarcadores/marcadores clínicos se usen juntos, más exacta sea la predicción y, además, menor sea la demanda sobre cada uno de estos biomarcadores/marcadores clínicos (es decir el valor (o valores) de punto de corte puede ser menos riguroso), en particular sobre el biomarcador BCL6.

15 Preferentemente, dicho valor de punto de corte se ha predeterminado o se determina a partir de una cohorte de pacientes con desenlace del LDLBG conocido. Más preferentemente, dicho valor de punto de corte se ha predeterminado o se determina de manera que la probabilidad de un pronóstico incorrecto sea inferior al 5 %, incluso más preferentemente inferior al 4 %, inferior al 3 %, inferior al 2 %, inferior al 1 % o inferior al 0,5 %. La expresión "desenlace del LDLBG conocido", como se usa en el presente documento, se refiere a los parámetros usados para evaluar el desarrollo o desenlace de una enfermedad que se ha registrado para un paciente. Los ejemplos de parámetros incluyen, pero sin limitación, la duración de la SG, la SG a 1 año, la supervivencia sin enfermedad, la supervivencia sin progresión, la supervivencia sin episodios, la edad, el género, ISI y, de hecho, todos los parámetros clínicos o tipos de pronóstico mencionados en el presente documento.

25 Como se dispuso anteriormente, la probabilidad de un pronóstico incorrecto no depende sólo de un valor de punto de corte si se usa conjuntamente más de un biomarcador/marcador clínico. En general, se prevé que la probabilidad de un pronóstico incorrecto sea inferior al 5 % teniendo en cuenta todos los biomarcadores/marcadores clínicos y sus respectivos valores de punto de corte. Por lo tanto, si se usa conjuntamente más de un biomarcador/marcador clínico, cada valor de punto de corte puede predeterminarse o determinarse de manera que la probabilidad de un pronóstico incorrecto sea de más del 5 % para cada punto de corte individual, por ejemplo, inferior al 40 %, inferior al 30 %, inferior al 20 %, inferior al 10 %, pero también inferior al 5 %, inferior al 4 %, inferior al 3 %, inferior al 2 %, inferior al 1 % o inferior al 0,5 %.

30 Por consiguiente, el valor del punto de corte es un valor estadístico, que representa un valor correlacionado con el nivel del biomarcador en el cual la probabilidad de un pronóstico incorrecto tiene un determinado valor representado por el valor de p, por ejemplo, un valor de p de 0,5 para una probabilidad de un pronóstico incorrecto inferior al 5 %. Dicho valor de punto de corte depende del método estadístico usado y, por lo tanto, el alcance de la invención estaría limitado de forma indebida por la especificación de valores de punto de corte. Además, el valor del punto de corte depende del tipo de pronóstico, por ejemplo, puede ser distinto para la SG o la S1A. Por lo tanto, todos estos valores proporcionados en el presente documento son simplemente ejemplares para el método estadístico y el fin para los que se adquirieron.

40 En última instancia, el valor del punto de corte representa un nivel del biomarcador que es suficientemente alto o bajo como para proporcionar un pronóstico con una probabilidad particular de ser incorrecto. Por supuesto, este nivel del biomarcador también depende del tipo de pronóstico y de variables adicionales tales como la cohorte de pacientes que se usa para obtener el valor del punto de corte y, por lo tanto, también han de considerarse ejemplares los niveles específicos indicados en el presente documento. En general, se prevé que el valor del punto de corte pueda significar un nivel de biomarcador (expresión o recuento celular) aumentado en al menos el 5 %, en al menos el 10 %, en al menos el 15 %, en al menos el 20 %, en al menos el 25 %, en al menos el 30 %, en al menos el 35 %, en al menos el 40 %, en al menos el 45 %, en al menos el 50 %, en al menos el 55 %, en al menos el 60 %, en al menos el 65 %, en al menos el 70 %, en al menos el 75 %, en al menos el 80 %, en al menos el 85 %, en al menos el 90 %, en al menos el 95 %, en al menos el 100 %, en al menos el 110 %, en al menos el 120 %, en al menos el 130 %, en al menos el 140 %, en al menos el 150 %, o más (es decir, "nivel alto" en el sentido de la presente invención). De manera similar, puede significar a un nivel disminuido en al menos el 5 %, en al menos el 10 %, en al menos el 15 %, en al menos el 20 %, en al menos el 25 %, en al menos el 30 %, en al menos el 35 %, en al menos el 40 %, en al menos el 45 %, en al menos el 50 %, en al menos el 55 %, en al menos el 60 %, en al menos el 65 %, en al menos el 70 %, en al menos el 75 %, en al menos el 80 %, en al menos el 85 %, en al menos el 90 %, en al menos el 95 %, en al menos el 100 %, es decir, ausente (es decir, "nivel bajo" en el sentido de la presente invención).

60 En otras palabras, la expresión "punto de corte", como se usa en el presente documento, se refiere a un nivel de biomarcador definido de forma matemática que optimiza la sensibilidad y especificidad para estratificar pacientes como de riesgo alto o bajo para un desenlace particular, es decir, la SG. El punto de corte se obtiene tras la identificación de un umbral de biomarcador que asigna un valor de señal positivo o negativo para cualquier biomarcador en estudio. Un experto en la materia puede establecer el umbral de biomarcador usando un algoritmo de programa informático de análisis para identificar un área de píxel de señal positiva asociada con un compartimento celular a partir del fondo, de la autofluorescencia y de la unión no específica de ya sea el anticuerpo o el fluorocromo.

65

El experto en la materia conoce los métodos estadísticos adecuados para llevar a cabo el método del primer aspecto y puede realizarlos sin excesiva carga. Tales pruebas incluyen, pero sin limitación, el análisis de regresión de Cox, las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, el área bajo la curva (AUC), índice de concordancia y la razón de riesgos instantáneos.

5

#### Selección de pacientes con LDLBG para terapia

En un segundo aspecto, el presente documento divulga un método para seleccionar un paciente que padece LDLBG para terapia individual, que comprende el método del primer aspecto potencialmente relacionado con una cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, en el que dicho paciente está en terapia para LDLBG o no, y en el que un buen pronóstico selecciona a dicho paciente para dicha terapia individual y/o un mal pronóstico desestima a dicho paciente para dicha terapia individual.

El término “terapia”, como se usa en el presente documento, se refiere a un tratamiento terapéutico, así como a un método profiláctico o de prevención, en el que el objetivo es prevenir o reducir un cambio fisiológico o enfermedad no deseados, tal como cáncer. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación, alivio de los síntomas, reducción de la duración de la enfermedad, estado patológico estabilizado (específicamente no deteriorado), retardo en la progresión de la enfermedad, mejora del estado patológico y remisión (tanto parcial como total), tanto detectables como no detectables. Los términos “tratar” y “tratamiento” son sinónimos del término “terapia” y pueden usarse sin distinción a lo largo de la presente descripción. “Tratamiento” también puede significar prolongar la supervivencia, en comparación con la supervivencia esperada si el tratamiento no se aplica. En el sentido del presente documento, el término “terapia” significa una terapia que pretende ser beneficiosa, sin embargo, no significa que sea necesariamente beneficiosa para un individuo. Como tal, se cree que es un tratamiento que es beneficioso para al menos algunos pacientes con LDLBG. La expresión “terapia individual”, como se usa en el presente documento, se refiere a la terapia para la que se predice que un paciente individual, pero necesariamente otro o incluso todos los pacientes, tenga un buen pronóstico.

El término “seleccionar”, como se usa en el presente documento, se refiere a la acción de elegir un paciente que padece LDLBG para una terapia individual, y está basada en la evaluación del pronóstico de dicho paciente. Sin embargo, no se refiere simplemente a probar una terapia en un paciente para averiguar, por ejemplo, usando el método de la invención, si la terapia es adecuada para ese paciente particular.

Por tanto, el método de un segundo aspecto permite determinar si una terapia para LDLBG particular es útil para tratar a un paciente individual. Esto es particularmente importante dado que no todas las terapias para LDLBG conocidas son adecuadas para tratar a todos los pacientes.

En una divulgación del método del segundo aspecto, dicho método se repite con dicho paciente en (i) una terapia para LDLBG si aún no está en terapia para LDLBG o (ii) un LDLBG distinto si ya está en terapia para LDLBG, preferentemente hasta que dicho paciente se seleccione para dicha terapia individual.

Por consiguiente, el método del segundo aspecto puede llevarse a cabo hasta que se encuentre una terapia para LDLBG que sea adecuada para tratar a un paciente particular. En este sentido, el paciente puede someterse a varios tratamientos, sucesivos o en combinación, para averiguar qué terapia es útil para él.

#### Kits

En un tercer aspecto, el presente documento divulga un kit que comprende reactivos para analizar una muestra de un sujeto, para determinar los niveles de uno o más biomarcadores seleccionados del grupo que consiste en VEGF, BCL6, CD68 y CD20, de acuerdo con los métodos del primer y/o el segundo aspecto, potencialmente relacionados con una cualquiera de las realizaciones y divulgaciones descritas anteriormente.

Como se usa en el presente documento, el término “kit” se usa en referencia a una combinación de artículos que facilitan los métodos de la presente invención. Estos kits proporcionan los materiales necesarios para llevar a cabo la aplicación descrita en el presente documento.

El kit puede comprender, además, un envase que permita mantener los reactivos dentro de límites determinados. Los materiales adecuados para preparar tales envases incluyen vidrio, plástico (polietileno, polipropileno, policarbonato y similares), frascos, viales, papel, sobrecitos y similares. El kit del documento puede contener, de forma adicional, instrucciones para usar los componentes contenidos en el mismo. Dichas instrucciones pueden encontrarse en la forma de material impreso o en la forma de un soporte electrónico que puede almacenar instrucciones de manera que puedan leerse por un sujeto, tales como medios de almacenamiento electrónicos (discos magnéticos, cintas y similares), medios ópticos (CD-ROM, DVD) y similares. Los medios pueden contener de forma adicional o de forma alternativa sitios web en Internet que proporcionan dichas instrucciones.

El uso de dicho kit para el pronóstico de un paciente que padece linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG) o para seleccionar un paciente que padece LDLBG para una terapia individual, constituye divulgaciones adicionales del presente documento.

- 5 La invención se describe a través del siguiente ejemplo que debe interpretarse simplemente como ilustrativo y no limitativo del alcance de la invención.

### EJEMPLO 1

#### 10 **Identificación de marcadores asociados al pronóstico y la respuesta a la terapia en pacientes con LDLBG**

#### I. MATERIALES Y MÉTODOS

##### Pacientes/muestras

15 Los inventores recibieron los datos clínicos y portaobjetos de micromatriz tisular (MMT) sin teñir de 149 pacientes con linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG) de la unidad de hematopatología del Hospital Clinic, Universidad de Barcelona (Dr. Elías Campo). Todos los pacientes tenían datos clínicos completos y tumor disponible para la incorporación en los 8 bloques de MMT.

20 El comité institucional de revisión ético del Hospital Clinic aprobó el presente estudio. La mayoría de los pacientes tenían archivos de historias clínicas completos que incluían: edad, género, emplazamiento, fase del índice pronóstico internacional (IPI), tratamiento, respuesta y desenlace.

25 Se supuso que todos los pacientes se trataron ya sea con rituximab y/o con ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona (CHOP) o con terapias similares a CHOP, aunque los archivos de datos clínicos sólo reflejan el tratamiento con rituximab.

##### Inmunofluorescencia multiplex cuantitativa (IFMC)

30 Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia y un anatomopatólogo titulado las analizó en un laboratorio clínico comercial (Althia, Barcelona). Brevemente, se tiñeron portaobjetos de MMT individuales con hematoxilina y eosina (HyE) y dos anatomopatólogos evaluaron el contenido tumoral total y la calidad. Tras la finalización de la evaluación de calidad inicial, se realizaron 3 ensayos de inmunofluorescencia multiplex que incluyeron los siguientes anticuerpos agrupados de acuerdo con la priorización y el formato multiplex (tablas 1, 2 y 3): MUM1, Ki67, CD20, CD34, BCL2, BCL6, CD68, VEGF, HLA-DR, CMYC y NfKB. Todas las muestras se procesaron utilizando ensayos de inmunofluorescencia desarrollados previamente (Cordon-Cardo *et al.*, J Clin Invest. 2007;117:1876-83) y se evaluaron con el programa informático de formación de imágenes CRI Nuance. Se emplearon umbrales de fluorescencia individuales y estrategias de colocación para desarrollar características específicas para la evaluación con respecto al desenlace. Algunas de estas características incluyen la media, la mediana, los niveles máximos de CD20, Ki67 y CD34, basándose en los valores de área y expresión de intensidad, y la evaluación de poblaciones celulares seleccionadas, junto con otros marcadores, es decir cantidad, presencia, intensidad y área de células que expresaban CD20 que también eran positivas para Ki67.

45 **Tabla 1**  
**Multiplex I para linfoma**

Anticuerpo	Proveedor	n.º de catálogo	Dilución	Isotipo	Marcadores
MUM-1	DAKO		1:25	IgG1 de R	2X M 488
Ki67	DAKO		1:100	IgG1 de R	2X M 555
CD20	DAKO		1:300	IgG2A de R	2X M2A 568
CD34	DAKO		1:50	IgG1 de R	2X M 594

**Tabla 2**  
**Multiplex II para linfoma**

Anticuerpo	Proveedor	n.º de catálogo	Dilución	Isotipo	Marcadores
BCL2	DAKO	M0997	1:20	IgG1 de R	2X M 488
BCL6	DAKO	IS625	LPU	IgG1 de R	2X M 568
CD68	DAKO	M0814	1:100	IgG1 de R	¼ XM 594
VEGF	ABCAM	AB1316	1:400	IgG1 de R	2X M 555

50

**Tabla 3**  
**Multiplex III para linfoma**

Anticuerpo	Proveedor	n.º de catálogo	Dilución	Isotipo	Marcadores
C-myc	ABCAM	Ab39688	1:25	IgG de C	2X R 488
HLA-DR	DAKO	M0746	1:20	IgG1 de R	2X M 555
NFkB	SANTACRUZ	SC-372	1:50	IgG1 de C	2X R 594

5 Se combinó con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) una serie de 3-5 anticuerpos por multiplex (tablas 1-3) para  
 producir una serie de ensayos multiplex. Brevemente, el análisis incluyó utilizar los anticuerpos apropiados en el  
 orden en que se enumeran en las tablas anteriores, de acuerdo con las diluciones especificadas y colorantes  
 fluorescentes Alexa. Se aplicó la mezcla de anticuerpos a la muestra de tejido y se permitió que los anticuerpos se  
 unieran en una cámara húmeda, a temperatura ambiente durante una hora. La incubación estuvo seguida de dos  
 10 aclarados de seis minutos cada uno en PBT (PBS + Tween), un aclarado de seis minutos en PBS (solución salina  
 tamponada de fosfato) y un aclarado de tres minutos en PBS.

15 Para las etapas de marcaje individual, se preparó un cóctel de fragmento Fab de IgG anti-conejo Zenon Alexa Fluor  
 488, fragmento Fab de IgG1 anti-ratón Zenon Alexa Fluor 555, fragmento Fab de IgG1 anti-ratón Zenon Alexa Fluor  
 568 y fragmento Fab de IgG2a anti-ratón Zenon Alexa Fluor 594, en Reactivo de Bloqueo al 1 % al doble de las  
 concentraciones recomendadas por el fabricante (dilución 1:50 para cada fragmento Fab). Se aplicaron  
 aproximadamente 100 µl de este cóctel de marcaje a las muestras de tejido y se incubaron las muestras de tejido en  
 una cámara húmeda a temperatura ambiente durante 30 minutos. La reacción de marcaje estuvo seguida de dos  
 aclarados de seis minutos cada uno en PBT, un aclarado de seis minutos en PBS y un aclarado de tres minutos en  
 20 PBS.

25 Se obtuvieron imágenes con un sistema de formación de imágenes espectrales CRI Nuance (CRI, Inc., modelo 420-  
 720 nm) montado en un microscopio Nikon 90i equipado con una fuente de luz de mercurio (Nikon). Se registró la  
 contratinción nuclear con DAPI a una longitud de onda de 480 nm usando un filtro de paso de banda de DAPI  
 (Chroma). Se capturó Alexa 488 entre 520 y 560 nm en intervalos de 10 nm usando un filtro FITC (Chroma). Se  
 registraron Alexa 555, 568 y 594 entre 570 y 670 nm en intervalos de 10 nm usando un filtro de paso largo hecho a  
 medida (Chroma). Se registraron los espectros de los colorantes puros antes del experimento diluyendo cada  
 colorante Alexa por separado en montante de fluorescencia SlowFade (Molecular Probes). Después, el colorante  
 diluido se extendió sobre un portaobjetos de vidrio, se cubrió con un cubreobjetos y se examinó con el mismo rango  
 e intervalo del colorante respectivo en el experimento de tejidos. Se asignaron regiones representativas de  
 30 fluorescencia de fondo para completar las bibliotecas espectrales para el procedimiento de separación espectral. Las  
 imágenes se separaron usando el programa informático Nuance versión 1.4.2. Se guardaron las imágenes  
 resultantes como imágenes tiff en escala de grises cuantitativa y se presentaron para su análisis.

35 Se evaluaron los resultados de los ensayos de inmunofluorescencia por la asociación con ya sea la respuesta al  
 tratamiento y/o la supervivencia usando curvas de función de supervivencia de Kaplan-Meier, razón de riesgos  
 instantáneos y, cuando fuera apropiado, el índice de concordancia (ICo).

#### Modelos multivariantes

40 Se construyó una diversidad de modelos clínicos y de inmunofluorescencia (IF) multivariantes para evaluar factores  
 pronósticos asociativos y rutas potencialmente solapantes que puedan ser sinérgicos con respecto al desenlace. Los  
 modelos se basaron en 58 pacientes con conjuntos de datos completos y perfiles de IF de proteína incorporados que  
 eran significativos de forma univariante o tenían tendencia a la asociación con la SG. Los marcadores que se  
 seleccionaron incluyeron BCL6, CD68, CD20, VEGF (punto de corte óptimo), junto con las variables clínicas  
 45 completas que incluían edad, género, fase y puntuación del IPI. Los resultados de la selección de característica  
 individual se basaron en el enfoque de criterio de información bayesiano.

## **II. RESULTADOS**

### Perfil del paciente

50 La cohorte consistió en 149 pacientes, mediana de edad de 61 años, el 43 % mujeres, el 57 % hombres y el  
 desglose por IPI fue como sigue: fase I (30 %), II (23 %), III (25 %) y fase IV (22 %). Los factores clínicos asociados  
 de forma significativa con una supervivencia global (SG) mejorada incluyeron: respuesta completa/parcial a la  
 55 terapia, tratamiento con rituximab, género femenino, edad < 60 años, ausencia de recidiva en el año 1, enfermedad  
 restringida a los ganglios, fase más baja, buen estado de ECOG, cáncer con gran masa tumoral y puntuación del IPI  
 baja (1/II).



Inmunofluorescencia multiplex cuantitativa (IFMC)

Los inventores compararon entonces los marcadores individuales con variables clínicas específicas. Sólo CD20 mediante IFMC se asoció con la fase ( $p = 0,024$ ) y niveles de LDH ( $p = 0,016$ ); y CD68 se asoció con la edad ( $p = 0,026$ ). Ninguno de los marcadores se asoció con la distribución extraganglionar o con el estado de ECOG. Resulta significativo que cuando se evaluó el conjunto de biomarcadores completo (MUM1, Ki67, CD20, CD34, BCL2, BCL6, CD68, VEGF, HLA-DR, CMYC y NfKB) con la respuesta (por ejemplo, completa/parcial frente a ninguna),  $n = 67$  pacientes, sólo el porcentaje de células CD68+ intratumorales fue significativo con respecto al área tumoral, es decir, cuanto mayor era el número de células CD68+ peor era el desenlace ( $p = 0,019$ ), es decir, el aumento de las células CD68+ tumorales estaba asociado con una mala respuesta al tratamiento (completa/parcial frente a ninguna;  $p = 0,019$ ). En el presente estudio debe apreciarse que los macrófagos CD68+ no se asociaron con la SG ( $p = 0,9$ ) ni con la supervivencia a 1 año ( $p = 0,88$ ) (Fig. 1A y 1B).

Aunque el 87 % de los pacientes habían recibido rituximab, la expresión de CD20+ no se asoció con la SG ( $p = 0,32$ ) ni con la supervivencia a 1 año ( $p = 0,27$ ) (Fig. 1C y 1D). Esto no fue sorprendente dado que aproximadamente el 30 % de los pacientes que eran CD20+ por citometría de flujo eran resistentes o parecían no tener una respuesta favorable a rituximab por diversas razones. Cuando se combinaron los macrófagos CD68+ con los linfocitos CD20+ usando sus respectivos puntos de corte, se encontró que los pacientes con aumento de linfocitos CD20+ combinado con números bajos de macrófagos CD68+ parecían tener una SG mejorada ( $p = 0,13$ ), aunque no era estadísticamente significativo (Fig. 1D), pero no una supervivencia a 1 año mejorada ( $p = 0,28$ ) (Fig. 1E). Esto no se observó cuando estos marcadores se evaluaron de forma independiente.

El único marcador, medido en una escala continua, que fue predictivo de forma univariante para SG fue VEGF [RR (razón de riesgos instantáneos) 1,23, IC (intervalo de confianza) del 95 % [0,98-1,54],  $p = 0,010$ , ICo (índice de concordancia) 0,34]. Resulta importante que, cuando se aplicó el punto de corte de VEGF óptimo (0,18), la asociación de VEGF con la SG presentó una significación mejorada (Figura 2A) (comparable con el AUC).

El único marcador adicional medido como una variable continua que se asoció de forma dudosa con la supervivencia a sólo 1 año fue BCL6 [RR 0,55, IC del 95 % [0,20-1,56],  $p = 0,087$ , ICo 0,43]. Sin embargo, se encontró que un punto de corte de BCL6 de 3,84 estaba asociado de forma significativa con la SG (Figura 3A).

Modelos multivariantes

Se generaron dos modelos con buenos resultados para la predicción de la SG:

- Modelo 1: Edad (RR 1,04,  $p = 0,065$ ), IPI (RR 1,72,  $p = 0,035$ ) y VEGF (2,63,  $p = 0,063$ ) (mejor modelo).
- Modelo 2: Edad (RR 1,04,  $p = 0,64$ ), IPI (RR 1,89,  $p = 0,017$ ), BCL6 (RR 1,08,  $p = 0,11$ ) y VEGF (RR 3,04,  $p = 0,038$ ).

El modelo de mejor desempeño sugiere que la edad, el IPI y VEGF son potencialmente las variables más importantes útiles para predecir la SG. El ICo para el Modelo 1 fue de 0,78. Resulta interesante que cuando los inventores sustituyeron BCL6 por IFMC por los datos obtenidos de BCL6 por inmunohistoquímica (IHQ) proporcionados con los datos clínicos, BCL6 por IHQ no se seleccionó, proporcionando así un respaldo adicional al uso de métodos cuantitativos para evaluar biomarcadores en muestras de tejido humano.

Conclusiones

A la vista de los resultados obtenidos, puede concluirse que:

- a) se han identificado varios perfiles interesantes que incluyen la asociación de macrófagos CD68+ para predecir la respuesta a la terapia y los niveles de expresión de VEGF y/o BCL6 como importantes factores pronóstico de la SG en pacientes con DLBCL tratados con CHOP-rituximab y seguido de una mediana de 4 años; y
- b) la combinación de altos niveles de células tumorales que expresan CD20 (linfocitos CD20+) y bajos macrófagos CD68+, puede ser importante para identificar un fenotipo de buena respuesta a la terapia.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método *in vitro* para el pronóstico de un paciente que padece linfoma difuso de linfocitos B grandes (LDLBG), que comprende determinar en una muestra de dicho paciente el nivel de proteína BCL6 por inmunofluorescencia cuantitativa, en el que dicho paciente está en terapia con CHOP-R, y en el que un nivel alto de expresión de BCL6 en dicha muestra es indicativo de un mal pronóstico y un nivel bajo de expresión de BCL6 en dicha muestra es indicativo de un buen pronóstico.
- 10 2. El método de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente determinar en una muestra de dicho paciente el nivel de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en VEGF, CD68 y CD20.
- 15 3. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que dicho método comprende adicionalmente determinar y/o correlacionar al menos un parámetro clínico conocido como indicativo para el pronóstico del LDLBG.
- 20 4. Método de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho parámetro clínico se selecciona del grupo que consiste en índice pronóstico internacional (IPI), edad, respuesta completa/parcial a la terapia, tratamiento con rituximab, género, ausencia de recidiva en 1 año, enfermedad restringida los ganglios, fase clínica, masa tumoral y lactato deshidrogenasa (LDH) sérica.
5. Método de acuerdo con la reivindicación 4, en el que dicho parámetro clínico es el IPI y/o la edad.
- 25 6. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que dicho pronóstico se caracteriza por predecir la supervivencia global (SG), predecir la supervivencia a 1 año y/o la respuesta a la terapia.
7. Método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el nivel de dicho biomarcador se compara con un valor de punto de corte que está asociado de forma significativa con el pronóstico de LDLBG con y sin correlación con uno o más parámetros clínicos y/o biomarcadores adicionales.
- 30 8. Método de acuerdo con la reivindicación 7, en el que dicho valor de punto de corte se ha predeterminado o se determina a partir de una cohorte de pacientes con un desenlace conocido del LDLBG.
- 35 9. Método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho valor de punto de corte se ha predeterminado o se determina de manera que la probabilidad de un pronóstico incorrecto sea inferior al 5 %.

Figura 1

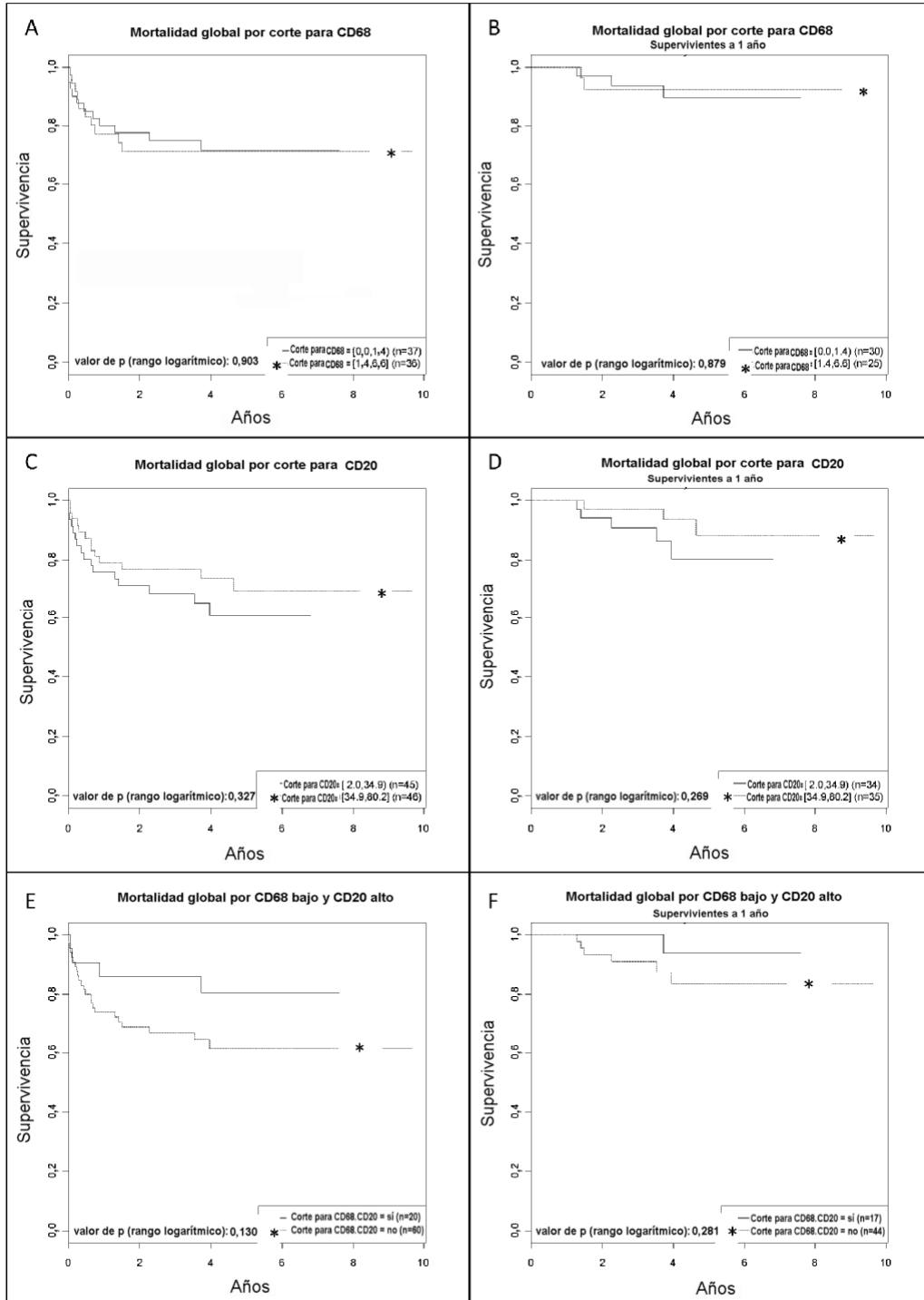


Figura 2

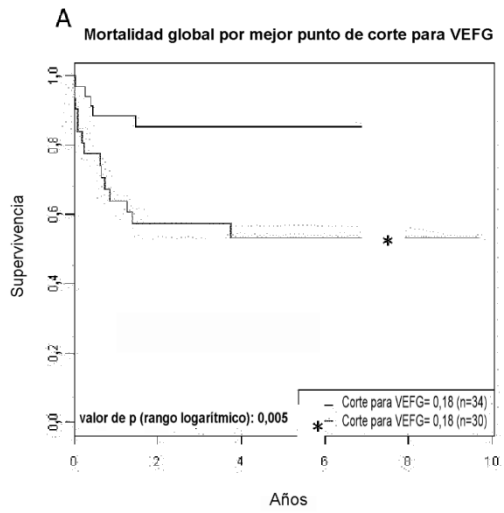
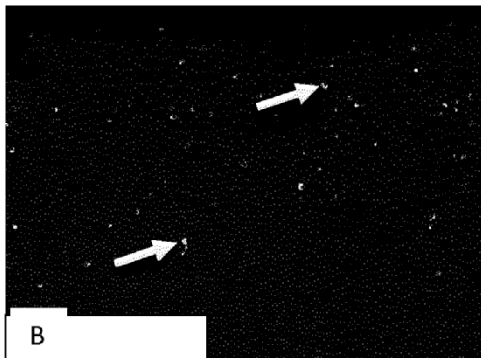


Imagen de IF combinada de VEGF



Análisis de imagen segmentada,  
procesada posteriormente de VEGF

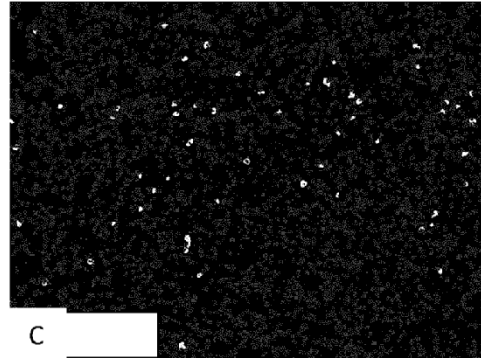
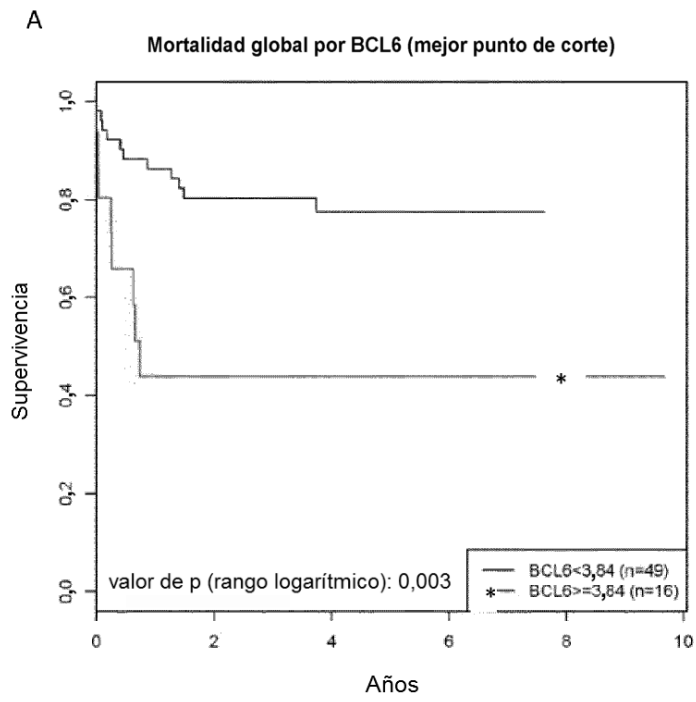
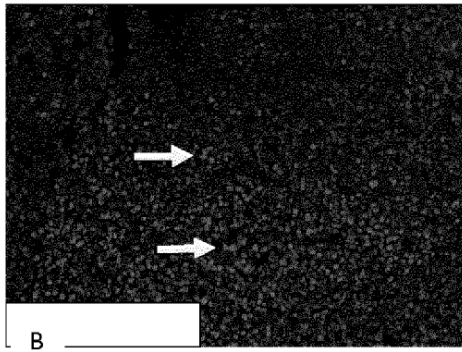


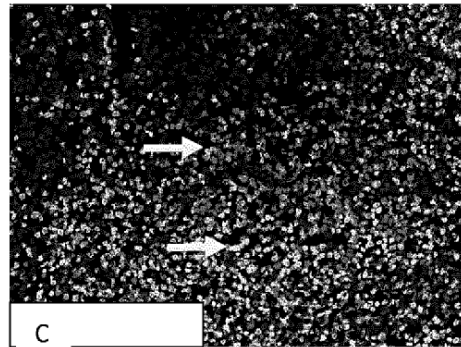
Figura 3



IF combinada de BCL6



Análisis de imagen segmentada, procesada posteriormente de BCL6



**Figura 4**

**A**

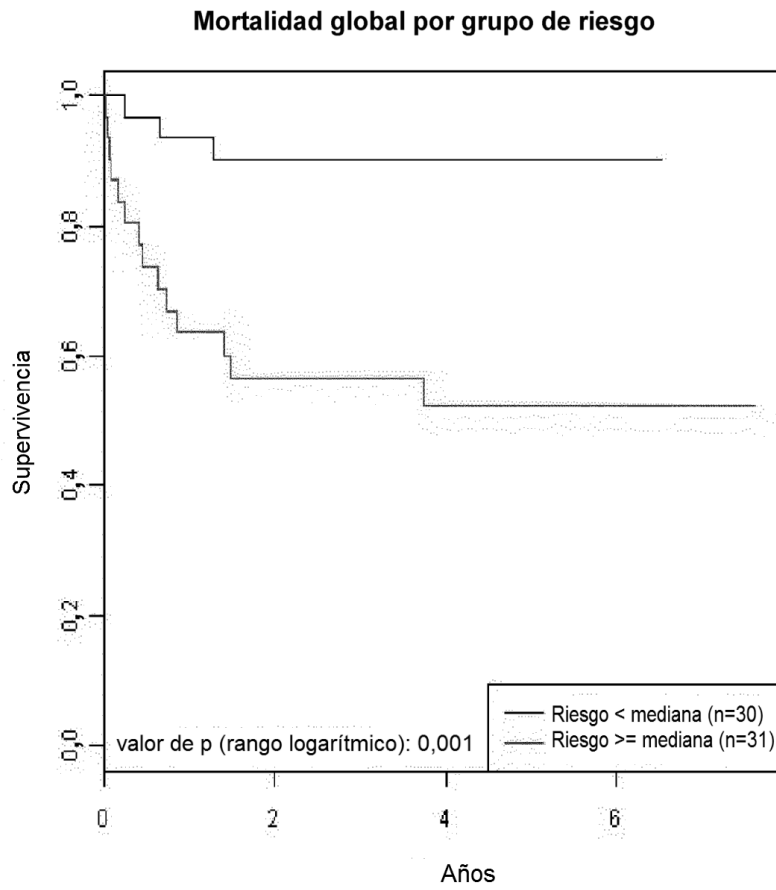


Figura 4 (cont.)

B

