

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 564**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2005** **E 10184598 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017** **EP 2319865**

54 Título: **Mutantes de la proteína nucleofosmina (NPM), secuencias genéticas correspondientes y usos de los mismos**

30 Prioridad:

29.10.2004 IT RM20040534

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

14.02.2018

73 Titular/es:

FALINI, BRUNANGELO (50.0%)

Via San Giuseppe 3/F

06123 Perugia, IT y

MECUCCI, CRISTINA (50.0%)

72 Inventor/es:

FALINI, BRUNANGELO y

MECUCCI, CRISTINA

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 654 564 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

Mutantes de la proteína nucleofosmina (NPM), secuencias genéticas correspondientes y usos de los mismos

La presente invención hace referencia a la detección de nuevos mutantes de la proteína nucleofosmina o secuencias genéticas correspondientes para el pronóstico, la diagnosis o la monitorización de enfermedad mínima residual de la leucemia mieloide aguda (LMA).

Más particularmente, la invención hace referencia a la detección de nuevos mutantes de la proteína nucleofosmina citoplasmática (NPM) y secuencias genéticas correspondientes como marcadores para el diagnóstico o pronóstico de la leucemia mieloide aguda con cariotipo normal.

La leucemia mieloide aguda primaria, la forma de leucemia más común en adultos, es una enfermedad que se origina en la médula ósea, más frecuentemente en una célula madre pluripotente o multipotente, ya "dedicada" a la mielopoyesis. La transformación neoplásica modifica los mecanismos que regulan la proliferación y diferenciación de la célula madre evitando la maduración de su progenie. La consecuencia de este hecho es una acumulación, principalmente en la médula ósea y a continuación en la sangre periférica y en otros órganos y tejidos, de células leucémicas (o blásticas) que proliferan de forma autónoma.

Hasta la fecha, las LMA se dividen en diferentes grupos de pronóstico basados en análisis citogénicos y en la biología molecular, para programar el mejor tratamiento. Actualmente, la terapia para la LMA se basa principalmente en la administración secuencial de diferentes fármacos quimioterapéuticos contra las células leucémicas.

Existen diferentes etapas en el tratamiento de las LMA. La primera etapa, denominada terapia de inducción, está dirigida a destruir la mayor parte de células leucémicas con el objetivo de conducir a los pacientes a lograr lo que se conoce por remisión hematológica completa, es decir la desaparición de las células leucémicas con normalización de los datos hematológicos medulares y periféricos. La destrucción de las células leucémicas que permanecen después de esta primera etapa de terapia (denominada enfermedad mínima residual) puede lograrse mediante la continuación de la quimioterapia (mantenimiento o intensificación o reinducción), seguida o no de un trasplante autólogo o alogénico (según la presencia o ausencia de factores de pronóstico negativos y a la disponibilidad de un donante). Desafortunadamente, debido a la agresividad de estos tumores malignos, el tratamiento es decisivo únicamente para el 30% de los pacientes. Existen tres aproximaciones utilizables principales para mejorar el diagnóstico y la supervivencia de los pacientes afectados por LMA: i) proporcionar pruebas diagnósticas rápidas y específicas para lograr un diagnóstico más preciso y poder monitorizar lo que se denomina como "enfermedad mínima residual"; ii) identificación de los factores de pronóstico biológicos que permiten estratificar el tratamiento terapéutico de acuerdo a "categorías de riesgo" y iii) desarrollo de nuevas formas de terapia dirigida que permiten interferir con los mecanismos de transformación neoplásica inducida por algunas lesiones genéticas.

Se han perseguido algunos de estos objetivos en algunos subtipos de LMA, tales como en aquellos subtipos con traslocación t (8;21) o inv (16), que pueden ser identificados/monitorizados con extrema precisión utilizando técnicas citogenéticas/FISH o RT-PCR, y muestran un mejor pronóstico que otras formas de leucemia. Incluso en algunos subtipos como la leucemia promielocítica con traslocación (15; 17), su empleo en combinación con la quimioterapia y el ácido trans-retinoico o ATRA (un agente que directamente actúa sobre la lesión genética) ha conducido a una mejora evidente en la supervivencia de estos pacientes.

Sin embargo, estas mejoras diagnósticas/terapéuticas afectan únicamente a una minoría de las LMA. De hecho, en una parte importante de la LMA, un 40% de los casos, el análisis citogenético muestra un cariotipo normal (Grimwade et al., 1998) y representa clínica y biológicamente una categoría heterogénea (Grimwade et al., 1998; Schnittger et al., 2002; Byrd et al., 2002).

El análisis de la expresión génica de la LMA con cariotipo normal, ha sido propuesto como un medio para caracterizar los diferentes subgrupos de pronóstico (Bullinger et al., 2004; Valk et al., 2004), pero no ha permitido identificar lesiones genéticas específicamente asociadas con el cariotipo normal. Lesiones genéticas únicas hasta ahora asociadas con el cariograma normal a nivel de los genes FLT3 (Schnittger et al., 2002; Frohling et al., 2002), CEBP α (Pabst et al., 2001), y MLL (Steudel et al., 2003). No obstante no pueden considerarse específicas del cariotipo normal ya que están también presentes en casos de LMA con mayores traslocaciones cromosómicas (Carnicer et al., 2004), además de en la leucemia mieloide secundaria aguda (Christiansen et al., 2001).

Por lo tanto, hasta ahora, no existen ensayos diagnósticos/pronósticos o marcadores moleculares que permitan detectar y distinguir de manera específica las LMA de cariotipo normal primarias, cuya caracterización y clasificación todavía se basa en criterios morfológicos equivocados. Además, el desconocimiento sobre la lesión genética representa un impedimento para la monitorización de la enfermedad mínima residual (con dificultad relevante en las opciones terapéuticas) y para el desarrollo potencial de nuevas formas de terapia molecular para esta categoría de LMA.

A partir de lo anterior, queda clara la necesidad de proporcionar nuevos marcadores diagnósticos y pronósticos para la leucemia mieloide aguda primaria con cariotipo normal, y nuevas dianas moleculares para la terapia específica de este subtipo de leucemia.

Los autores de la presente invención han identificado actualmente mutantes del gen de la nucleofosmina (NPM) y proteína nucleofosmina codificada a partir del mismo, asociados específicamente a la LMA de cariotipo normal.

La nucleofosmina (NPM) es una proteína ampliamente restringida en el nucléolo (Cordell et al., 1999) que actúa como un transportador del núcleo al citoplasma (Borer et al., 1989). Es una molécula "chaperona" (Dumbar et al., 1989), probablemente implicada en la prevención de la agregación de las proteínas en el nucléolo y la regulación del ensamblaje y transporte de las estructuras pre-ribosómicas a través de la membrana nuclear. Es también una diana de la CDK2/ciclina E. en la duplicación del centrosoma (Okuda et al., 2000) y está implicada en la regulación del mecanismo de supresión tumoral mediado por Arf-p53 (Bertwistle et al., 2004; Colombo et al., 2002; Kurki et al., 2004). En el modelo murino (ratón genéticamente deficiente o "knock-out"), el gen de la NPM parece desempeñar un papel fundamental en la regulación de la hematopoyesis (Grisendi et al., 2005).

El gen de NPM está implicado en las traslocaciones cromosómicas de las leucemias y linfomas que dan como resultado la formación de proteínas de fusión, tales como, por ejemplo, NPM-ALK (Morris et al., 1994), NPM RAR α (Redner et al., 1996), y NPM-MLF1 (Yoneda-Kato et al., 1996), que conservan únicamente la región N-terminal de la molécula de NPM (Falini et al., 1999; Falini et al., 2002). Se supone que la nucleofosmina contribuye a la oncogénesis activando el potencial oncogénico del compañero de fusión (ALK, MLF1, RAR α) (Bischof et al., 1997).

Ya que se supone que la NPM cumple una función en la supresión tumoral mediada por Arf/p53, las alteraciones del tráfico fisiológico desde el núcleo al citoplasma podrían ser cruciales durante la transformación. Las alteraciones en la distribución sub-celular de la NPM y/o proteínas de fusión que contienen NPM pueden ser reveladas por estudios de inmuno-histoquímica. Por ejemplo, en los denominados linfomas ALK positivos con t(2;5) (Falini et al., 1999) y leucemia aguda con t(3;5) se observa una deslocalización citoplasmática de la proteína NPM (Falini et al., 1999; Falini et al., 2002) con respecto a la localización del nucléolo que se espera de la misma NPM (Cordell et al., 1999). Este hallazgo se debe a la reactividad del anticuerpo monoclonal anti-NPM con la proteína de fusión NPM-ALK [producto de la t(2;5)] o NPM-MLF1 [producto de la t(2;5)] o NPM-MLF1 [producto de la t(3;5)] y/o con la proteína NPM deslocalizada en el citoplasma, probablemente a través de la formación de heterodímeros con NPM-MLF1.

Los autores de la presente invención han mostrado en la actualidad que aproximadamente un tercio de las LMA en adultos en el examen inmunohistoquímico muestra una distribución citoplasmática aberrante de la proteína NPM (NPMc+) (normalmente restringida al núcleo), y que tal hallazgo inmunohistoquímico está correlacionado con la presencia, en las células leucémicas, de mutaciones específicas al nivel del exón 12 del gen de NPM (GenBank NM_002520), en la parte que codifica la estructura C-terminal de la proteína NPM (GenBank NP_002511).

La leucemia aguda que expresa los mutantes de la proteína NPM y las correspondientes secuencias genéticas, denominadas por los autores LMA NPMc+ (Falini et al., 2005), representa una entidad fácilmente distinguible que se caracteriza por un amplio espectro morfológico, cariotipo normal, elevada frecuencia de mutaciones del gen FLT3 ("duplicación interna en tándem") y una buena respuesta a la terapia de inducción. Las mutaciones del gen de la NPM y la consiguiente distribución de la proteína NPM mutada en el citoplasma de las células leucémicas representan los eventos más específicos y frecuentes observados hasta ahora en la LMA de cariotipo normal. Los autores de la presente invención también han mostrado que las mutaciones de la NPM representan un excelente marcador para el pronóstico (Schnittger et al., 2005) y la monitorización de las LMA de cariotipo normal con enfermedad mínima residual.

Por lo tanto los autores de la presente invención han identificado secuencias mutantes de la proteína nucleofosmina (NPM) y mutantes del gen de la NPM que los codifica, que pueden emplearse de manera ventajosa como: marcadores en la preparación de kits diagnósticos y marcadores de pronóstico y para la monitorización de la enfermedad mínima residual, en las LMA primarias de cariotipo normal.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un método específico para el diagnóstico, dentro de la categoría heterogénea de las LMA de cariotipo normal, de un nuevo subtipo, denominado LMA NPMc+, mediante estudios inmunohistoquímicos con anticuerpos anti-NPM (identificación de NPM citoplasmático) y/o el análisis de las mutaciones del gen de NPM. Esta observación tiene implicaciones diagnósticas importantes, porque, hasta ahora, la LMA de cariotipo normal se clasificaba en base a criterios morfológicos erróneos (Jaffe et al., 2001). En particular, los autores han utilizado anticuerpos monoclonales contra epítopos resistentes a los fijadores de la molécula de NPM (Cordell et al., 1999; Falini et al., 2002) que los hace aplicables al análisis de muestras de biopsia habituales fijadas e incluidas en parafina tales como, por ejemplo, biopsias osteomédulares o coágulos de médula ósea. Debido a que las mutaciones de la NPM son siempre heterocigotos, las células leucémicas contienen proteína NPM tanto mutada como de tipo silvestre. Estos dos tipos de proteínas no pueden distinguirse entre sí utilizando los anticuerpos monoclonales anti-NPM habituales.

Más específicamente, para estudiar la distribución sub-celular de los mutantes de NPM sin la interferencia de la proteína NPM de tipo silvestre, los autores han producido un anticuerpo policlonal (denominado Sil-C) que es capaz de reconocer mutantes de NPM específicos.

La localización citoplasmática de la NPM (y la mutación del gen de la NPM) se asocia específicamente al cariotipo normal. Por lo tanto, representa un marcador inmunohistoquímico excelente para el pronóstico, ya que permite su asignación a la categoría de LMA de "riesgo intermedio" (en la que se incluyen los pacientes con cariotipo normal) de los pacientes leucémicos que no pueden ser clasificados citogenéticamente de otro modo debido a material insuficiente, deterioro de la muestra biológica, ausencia de mitosis, y dificultad para interpretar con seguridad el cariotipo.

Además, la prueba inmunohistoquímica para la demostración de NPM citoplasmática (NPMc+) (predictiva en el 100% de las mutaciones del exón 12 del gen de la NPM), puede ser considerada como un factor predictivo para el pronóstico en las LMA de cariotipo normal, identificando las diferencias de supervivencia en los casos de LMA NPMc+ en comparación con NPMc-. Más específicamente, la presencia de mutaciones del exón 12 de la NPM en ausencia de mutaciones del gen FLT3, nos ha permitido identificar un nuevo grupo de leucemias mieloides de pronóstico bueno con cariotipo normal (Schnittger et al., 2005).

Además, la identificación inmunohistoquímica de la NPM (NPMc+) citoplasmática puede considerarse como un factor predictivo para una buena respuesta a la terapia de inducción en las LMA de cariotipo normal.

Los ensayos de NPM a nivel citoplasmático o para la mutación a nivel génico, proporcionados por los autores de la presente invención, son ensayos sumamente sensibles, específicos, sencillos, económicos y de diagnóstico rápido (48-72 horas para lograr el resultado), y son técnicas inmunohistoquímicas y biomoleculares bien conocidas para los expertos en el arte. Además, tales ensayos pueden emplearse de manera ventajosa para monitorizar la enfermedad mínima residual en una situación (cariotipo normal) para la que, hasta el día de hoy, no se encuentran disponibles marcadores moleculares o inmunofenotípicos. Además, los resultados del estudio realizado por los autores de la presente invención sugieren la provisión de nuevos tratamientos terapéuticos de LMA NPMc+ mediante el uso de oligonucleótidos anti-sentido o ARN pequeños, que, empaquetados en partículas lipídicas o virus (Downward J., 2004), son capaces de interferir en los procesos de traducción y transcripción de los genes que llevan a cabo las mutaciones que codifican las proteínas NPM mutadas de acuerdo a la invención.

Entre las posibles aplicaciones terapéuticas se encuentra el empleo de anticuerpos intracelulares ("intracuerpos") (Stocks MR, 2005) dirigidos específicamente contra la parte C-terminal de los mutantes de NPM, o el uso de moléculas pequeñas (péptidos o similares) capaces de inhibir la región C-terminal específica de los mutantes de NPM.

Entre las posibles aplicaciones terapéuticas deben incluirse aquellas que interfieren con los cambios post-traduccionales (acetilación, fosforilación, ubiquitinación, etc.) de la molécula de NPM (mutada y de tipo silvestre), y las moléculas que interactúan con ellos o alteraciones de las vías de señalización celular específicamente asociadas con la presencia de proteínas de NPM mutadas.

Además, la administración de la proteína NPM mutante o partes de la misma (por ejemplo, péptidos), o secuencias de nucleótidos que codifican la proteína o partes de la misma para la inducción de inmunidad anti-tumoral, puede ser empleada de manera ventajosa para un uso preventivo o terapéutico.

Por lo tanto, son objeto del presente método de la invención proteínas de nucleofosmina (NPM) mutadas caracterizadas porque tienen una localización citoplasmática y comprenden una secuencia de aminoácidos mutada en los residuos de triptófano 288 y 290, y un motivo de señalización de exportación nuclear (NES, por sus siglas en inglés), presente en la región C-terminal de la secuencia de la nucleofosmina humana de tipo silvestre (es decir, NP_002511), en donde dicho motivo de señalización de la exportación nuclear (NES) comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en LxxxVxxVxL (SEQ ID No 1) LxxxCxxVxL (SEQ ID No 2), LxxxFxxVxL (SEQ ID No 3), LxxxMxxVxL (SEQ ID No 4) y LxxxCxxVxL (SEQ ID No 5). Más preferiblemente, LxxxVxxVxL (SEQ ID No 1) (el motivo NES más común) se selecciona del grupo que consiste en LCLAVEEVSL (SEQ ID No 6); LCMAVEEVSL (SEQ ID No 7); LCVAVEEVSL (SEQ ID No 8); LSRAVEEVSL (SEQ ID No 9); LCTAVEEVSL (SEQ ID No 10); LSQAVEEVSL (SEQ ID No 11); LCHAVEEVSL (SEQ ID No 12); LCRAVEEVSL (SEQ ID No 13); LCRGVEEVSL (SEQ ID No 14); LCQAVEEVSL (SEQ ID No 15); LCAAVEEVSL (SEQ ID No 16); LCKAVEEVSL (SEQ ID No 17). Preferiblemente, LxxxLxxVxL (SEQ ID No 2) se selecciona del grupo que consiste en LWQSLAQVSL (SEQ ID No 18); LWQSLEKVSL (SEQ ID No 19); LWQSLSKVSL (SEQ ID No 20); LCTFLEEVSL (SEQ ID No 21). Aún más preferiblemente, LxxxFxxVxL (SEQ ID No 3) se selecciona del grupo que consiste en LWQCFAQVSL (SEQ ID No 22); LWQCFQVSL (SEQ ID No 23); LWQRFQEVSL (SEQ ID No 24); LWQDFLNL (SEQ ID No 25). En un modo de realización preferido de la presente invención LxxxMxxVxL (SEQ ID No 4) es LWQSMEEVSL (SEQ ID No 26) o LWQRMEEVSL (SEQ ID No 27). En otra realización preferida, LxxxCxxVxL (SEQ ID No 5) es LWQCCSQVSL (SEQ ID No 28).

Preferiblemente, la región C-terminal de las proteínas mutadas detectadas en el método de la invención puede incluir además el péptido VSLRK (SEQ ID No 29), en el que el L-aminoácido representa el último aminoácido de los motivos NES según se define anteriormente.

5 En un modo de realización preferido las secuencias de aminoácidos del motivo NES, según se define anteriormente, pueden comprender un D-aminoácido adicional aguas arriba (upstream) del L-aminoácido en el extremo N-terminal de dicho motivo NES (por ejemplo, DLCLAVEEVSLRK (SEQ ID No 30); DLCMAVEEVSLRK (SEQ ID No 31); DLCVAVEEVSLRK (SEQ ID No 32); DLCLAVEEVSLRK (SEQ ID No 33); DLWQSLAQVSLRK (SEQ ID No 34); DLWQSLEKVSLRK (SEQ ID No 35).

10 De acuerdo con un aspecto particular de la presente divulgación, las proteínas NPM mutadas, según se describe anteriormente, pueden fusionarse a una proteína indicadora que a su vez puede ser seleccionada del grupo que consiste en EGFP, β -galactosidasa, luciferasa, GFP. Las proteínas de fusión pueden ser preparadas fundiendo ADN que codifica las anteriores proteínas, disponibles comercialmente, con el péptido de la presente divulgación y a continuación expresando el producto de fusión preparado de este modo.

15 La presente divulgación hace referencia a una proteína NMP mutada o de fusión tal como se ha descrito anteriormente, conjugada con una nanopartícula (es decir, punto cuántico o Quantum dot).

Son objeto adicional del presente método de la invención las secuencias de oligonucleótidos que codifican las proteínas mutadas o fragmentos y variantes de las mismas, tal como se ha definido anteriormente. Las secuencias de oligonucleótidos de acuerdo a la invención pueden ser secuencias de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, o sus secuencias complementarias.

20 De acuerdo con una realización preferida, las secuencias de desoxirribonucleótidos se pueden detectar utilizando sondas o cebadores de oligonucleótidos, que incluyen las secuencias que tienen los siguientes números de depósito del GenBank: AY740634, AY740635, AY740636, AY740637, AY740638, AY740639.

25 En una realización en particular de la invención, las sondas o cebadores de oligonucleótidos pueden marcarse con un agente seleccionado del grupo que consiste en una sustancia fluorescente, biotina, radioisótopo, nanopartícula. El marcaje puede ser también de utilidad para la detección de las secuencias de oligonucleótidos mencionadas anteriormente como marcadores para el diagnóstico *in vitro* y/o la monitorización de la enfermedad mínima residual y/o el pronóstico de las LMA caracterizadas por un cariotipo normal. En particular, el marcador consiste en al menos una pareja de cebadores, que pueden marcarse o no en uno o en ambos cebadores con un agente seleccionado del grupo que consiste en una sustancia fluorescente, biotina, un radioisótopo, nanopartícula (punto cuántico). En otra
30 realización, el marcador consiste en al menos una sonda de oligonucleótidos que puede marcarse con un agente seleccionado del grupo que consiste en una sustancia fluorescente, biotina, radioisótopo, nanopartícula.

El método de la presente invención puede comprender el uso de los cebadores que tienen las siguientes secuencias:

- 35 i) NPM1_25F: 5'-GGTTGTTCTCTGGAGCAGCGTTC-3'(SEQ ID No 36);
- NPM1_1112R: 5'-CCTGGACAACATTTATCAAACACGGTA-3' (SEQ ID No 37);
- ii) NPM1_390F: 5'-GGTCTTAAGGTTGAAGTGTGGT-3'(SEQ ID No 38);
- NPM1_1043_R; 5'-TCAACTGTTACAGAAATGAAATAAGACG - 3'(SEQ ID No 39);
- iii) NPM_940F_mutA 5'-GAGGCTATTCAAGATCTCTGTCT-3'(SEQ ID No 40);
- NPM1_1112 R 5'-CCTGGACAACATTTATCAAACACGGTA-3'(SEQ ID No 41);
- 40 iv) NPM_940F_mutB 5'-GAGGCTATTCAAGATCTCTGCAT 3'(SEQ ID No 42);
- NPM1_1112 R 5'-CCTGGACAACATTTATCAAACACGGTA3'(SEQ ID No 43);
- v) NPM_940F_mutC 5'-GAGGCTATTCAAGATCTCTGCGT-3'(SEQ ID No 44);
- NPM1_1112 R 5'-CCTGGACAACATTTATCAAACACGGTA-3'(SEQ ID No 45);
- vi) NPM_940F_mutD 5'-GAGGCTATTCAAGATCTCTGCCT-3'(SEQ ID No 46);

NPM1_1112 R 5'-CCTGGACAACATTTATCAAACACGGTA-3'(SEQ ID No 47);

vii) NPM1-F: 5'-TTAACTCTCTGGTGGTAGAATGAA-3'(SEQ ID No 48);

NPM1-R: 5'-CCAGACTATTGCCATTCCTAAC-3'(SEQ ID No 49);

viii) NPM1_89F_BamHI: 5'-GCCACGGATCCGAAGATTCGATGGAC- 3'(SEQ ID No 50)

5 NPM1- 1044R- EcoRI: 5' - ATCAAGAATTCCAGAAATGAAATAAGA CG-3'(SEQ ID No 51);

ix) cNPM-F: 5'-GAAGAATTGCTTCCGGATGACT-3' (SEQ ID No 52) y

cNPM mut.A-R: 5'-CTTCCTCCACTGCCAGACAGA-3' (SEQ ID No 53) o

cNPM mut.B-R: 5'-TTCCTCCACTGCCATGCAG-3'(SEQ ID No 54).

10 En particular, los cebadores i) pueden ser empleados para la amplificación, preferiblemente mediante RT-PCR, de la región codificante del gen de la NPM (NM_002520). Los cebadores ii) pueden ser utilizados en solitario para la amplificación que produce un constructo con un vector pCRII-de ratón (Invitrogen). Los cebadores iii), iv), v), vi) mencionados anteriormente han sido designados respectivamente para la amplificación mediante RT-PCR de las secuencias de oligonucleótidos que codifican las proteínas mutadas:

A) DLCLAVEEVSLRK (SEQ ID No 30) - cebador iii);

15 B) DLCMAVEEVSLRK (SEQ ID No 31) - cebador iv);

C) DLCVAVEEVSLRK (SEQ ID No 32) - cebador v);

D) DLCLAVEEVSLRK (SEQ ID No 33) - cebador vi);

20 caracterizadas por tener como mutación una duplicación de un tetranucleótido. Finalmente, los cebadores vii) se emplean para la amplificación mediante ADN genómico del exón 12 de la región C-terminal de la proteína NPM; mientras que los cebadores viii) se utilizan para la introducción en un vector de expresión de las secuencias de acuerdo con el método de la invención.

Se divulga en el presente documento un plásmido que comprende una de las secuencias de oligonucleótidos descritas anteriormente. Preferiblemente, dicho plásmido puede ser seleccionado del grupo que consiste en pGEM-T y pGEM-T Easy (Promega).

25 Se divulga adicionalmente en el presente documento un vector de expresión (tal como, por ejemplo, un vector viral o pEGFP-c1) que comprende una de las secuencias de nucleótidos descritas anteriormente. En una realización preferida de la presente divulgación dicho vector es pEGFP-c1, que comprende la secuencia del gen indicador EGFP.

30 La presente divulgación también hace referencia a una célula hospedadora capaz de expresar al menos una de las proteínas mutadas descritas anteriormente, donde dicha célula comprende el plásmido con las características anteriormente definidas. Preferiblemente, la célula hospedadora es procariótica.

35 Además, se divulga en el presente documento una línea celular, preferiblemente de mamíferos (aunque aún más preferiblemente de murinos, tal como NIH 3T3 y BaF3), que comprende el vector de expresión a ser empleado como un modelo de estudio experimental de LMA NPMc+ o como un modelo de cribado para someter a ensayo las nuevas moléculas que van a ser utilizadas como fármacos potenciales para dicho tipo de leucemia.

También se divulga en el presente documento un método para la preparación de proteínas de nucleofosmina (NPM) mutadas que comprende las siguientes etapas:

a) amplificación de la secuencia de oligonucleótidos de acuerdo a la divulgación por RT-PCR mediante al menos una pareja de cebadores;

40 b) introducción de la secuencia de oligonucleótidos amplificada en la etapa a) en el vector pGEM-T Easy y transferencia en un vector de expresión mediante enzimas de restricción;

c) transfección del vector de expresión en una línea celular competente de mamíferos seleccionada de entre las líneas celulares de murinos NIH 3T3 y BaF3;

d) extracción y purificación de las proteínas mutadas.

En una forma preferida del método de acuerdo a la invención, dicha, al menos una, pareja de cebadores de la etapa a) es:

NPM1_89F_BamHI: 5'-GCCACGGATCCGAAGATTCGATGGAC-3' (SEQ ID No 50);

NPM1_1044R_EcoRI: 5'-ATCAAGAATTCCAGAAATGAAATAAGACG-3' (SEQ ID No 51).

De acuerdo con un aspecto adicional, los métodos de la presente invención hacen referencia a un anticuerpo monoclonal o policlonal, o a un fragmento del mismo (tal como, por ejemplo, un fragmento scFv), capaz de reconocer y unirse de manera selectiva a al menos un epítipo antigénico de la región C-terminal (que puede comprender VSLRK) de las proteínas NPM mutadas divulgadas en el presente documento.

De acuerdo con un particular aspecto de la presente invención los anticuerpos monoclonales y policlonales pueden ser conjugados con un agente seleccionado del grupo que consiste en una sustancia fluorescente, enzima, radioisótopo, nanopartícula, medicamento.

Los anticuerpos monoclonales y los anticuerpos policlonales utilizados en el método de la invención se dirigen específicamente contra los epítipos específicos de la leucemia de la región C-terminal de la NPM que puede comprender el péptido VSLRK, y la mutación de los residuos de triptófano 288 y 290 y el motivo NES según se ha definido anteriormente.

Como tal, los anticuerpos monoclonales o policlonales se utilizan como marcadores para el diagnóstico, el pronóstico o la monitorización *in vitro* de la enfermedad mínima residual.

Es un objeto de la presente invención un kit de diagnóstico para la detección de las LMA de cariotipo normal, comenzando a partir de una muestra biológica que comprende el anticuerpo o un fragmento del mismo. Dicho anticuerpo o fragmento está dirigido contra epítipos contra la parte C-terminal mutada de la NPM. Dicha detección puede lograrse mediante ensayos inmunohistoquímicos, inmunoenzimáticos, de inmunoprecipitación o una combinación de los mismos.

Un objeto adicional de la presente invención está representado por el uso de las secuencias de oligonucleótidos o de las proteínas de nucleofosmina codificadas por las mismas según la invención, para la preparación de medios para el diagnóstico o el pronóstico *in vitro* de las LMA de cariotipo normal y/o la monitorización de la enfermedad mínima residual. Tales medios para el diagnóstico se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en sondas de oligonucleótidos, cebadores, epítipos y anticuerpos.

Un objeto en particular del presente método de la presente invención está representado por el epítipo antigénico específico de la leucemia que se crea a nivel de la región C-terminal de las proteínas de nucleofosmina mutadas, caracterizado porque comprende el péptido VSLRK, la mutación de los residuos de triptófano 288 y 290 y el motivo NES según se ha definido anteriormente.

Un objeto adicional de la presente invención está constituido por un kit de diagnóstico para la detección de las LMA de cariotipo normal en una muestra biológica y/o para monitorizar la enfermedad mínima residual, que comprende al menos una de las secuencias de oligonucleótidos de acuerdo a la invención o una parte de la misma. Dicha detección puede ocurrir a través de PCR, RT-PCR, hibridación en tiempo real o *in situ*, Dot Blot reverso (RBO), técnicas de matrices de tejidos múltiples (My) o una combinación de las mismas.

En particular, la invención hace referencia a un kit de diagnóstico por PCR en tiempo real para la monitorización de la enfermedad mínima residual que comprende los siguientes componentes:

i) la pareja de cebadores

cNPM-F: 5'-GAAGAATTGCTTCCGGATGACT-3' (SEQ ID No 52) y cNPM mut.A-R: 5'-CTTCCTCCACTGCCAGACAGA-3' (SEQ ID No 53) o

cNPM mut.B-R: 5'-TTCCTCCACTGCCATGCAG-3' (SEQ ID No 54)

ii) y la sonda 5'-FAM-ACCAAGAGGCTATTCAA-MGB-3' (SEQ ID No 55).

Además, es objeto de la presente invención un soporte sólido, tal como por ejemplo una membrana, o una matriz, que comprende al menos una de las secuencias de oligonucleótidos de acuerdo a la invención.

De acuerdo a un aspecto adicional, se divulga en el presente documento un método *in vitro* para la detección de secuencias de oligonucleótidos que codifican las proteínas de nucleofosmina mutadas descritas anteriormente que comprenden las siguientes etapas de:

- a) extracción de ARN de la muestra biológica de ensayo;
- b) retro-transcripción y amplificación por RT-PCR o PCR en tiempo real mediante el uso de cebadores específicos de la secuencia de NPM (Gen Bank NM_002520), según se ha definido anteriormente;
- c) purificación y secuenciación de los productos de la PCR utilizando cebadores.

En una realización preferida del método mencionado anteriormente, los cebadores empleados en la etapa b) son las parejas de cebadores directos y cebadores inversos de i) a ix) detallados anteriormente. Preferiblemente, los cebadores de la etapa c) se seleccionan del grupo que consiste en:

NPM1_25F: 5'-GGTTGTTCTCTGGAGCAGCGTTC-3' (SEQ ID No 36);

NPM1_1112R: 5'-CCTGGACAACATTTATCAAACACGGTA-3' (SEQ ID No 37);

NPM1_390F: 5'-GGTCTTAAGGTTGAAGTGTGGT-3' (SEQ ID No 38);

NPM1_1043_R: 5'-TCAACTGTTACAGAAATGAAATAAGACG-3' (SEQ ID No 39).

Los mismos cebadores i) tomados por separado como también los cebadores ii), pueden ser utilizados en la etapa c) del método anterior (para la secuenciación).

En particular, en el caso en el que se emplea un método en tiempo real para la detección, el sistema de "sonda de hibridación" o "detección con verde SYBR" o "sonda de hidrólisis" puede emplearse de forma alternativa.

En una realización preferida, se divulga en el presente documento un método que en la etapa b) emplea un sistema de PCR en tiempo real específico a la mutación. Los cebadores utilizados son

cNPM-F: 5'-GAAGAATTGCTTCCGGATGACT-3' (SEQ ID No 52) y

cNPM mut.A-R: 5'-CTTCCTCCACTGCCAGACAGA-3' (SEQ ID No 53) o

cNPM mut.B-R: 5'-TTCCTCCACTGCCATGCAG-3' (SEQ ID No 54)

y la sonda es 5'-FAM-ACCAAGAGGCTATTCAA-MGB-3' (SEQ ID No 55) tal como se muestra en la Figura 13 (ver también el Ejemplo 5).

Además, se divulga en el presente documento una sonda de oligonucleótidos que tiene la siguiente secuencia de oligonucleótidos 5'-FAMACCAAGAGGCTATTCAA-MGB-3' (SEQ ID No 55).

Se divulga adicionalmente en el presente documento un método para la detección de secuencias de oligonucleótidos que codifican las proteínas de nucleofosmina mutadas descritas anteriormente que comprende las siguientes etapas de:

- a) extracción de ARN de la muestra biológica de ensayo;
- b) amplificación mediante el uso de cebadores específicos para la secuencia de la NPM de (Gen Bank NPM_002520);
- c) detección de los productos de la PCR.

Preferiblemente, la amplificación tiene lugar mediante PCR diagnóstica o PCR en tiempo real.

En particular, en el caso en el que se emplea tiempo real para la detección, el sistema de "sonda de hibridación" o "detección con verde SYBR" o "sonda de hidrólisis" puede emplearse de forma alternativa. En una realización

preferida del método mencionado anteriormente los cebadores empleados en la etapa b) se seleccionan del grupo que consiste en:

i) NPM_940F_mutA: 5'-GAGGCTATTCAAGATCTCTGTCT-3'(SEQ ID No 40);

NPM1_1112R:5'-CCTGGACAACATTTATCAAACACGGTA-3'(SEQ ID No41); o

5 NPM1_390F: 5'-GGTCTTAAGGTTGAAGTGTGGT-3'(SEQ ID No 38);

NPM1_1043_R; 5'-TCAACTGTTACAGAAATGAAATAAGACG- 3'(SEQ ID No 39);

ii) NPM_940F_mutB: 5'-GAGGCTATTCAAGATCTCTGCAT 3'(SEQ ID No 42); NPM1_1112R: 5'-CCTGGACAACATTTATCAAACACGGTA 3'(SEQ ID No 43);

10 iii) NPM_940F_mutC 5'-GAGGCTATTCAAGATCTCTGCGT-3'(SEQ ID No 44); NPM1_1112 R 5'-CCTGGACAACATTTATCAAACACGGTA- 3'(SEQ ID No 45);

iv) NPM_940F_mutD 5'-GAGGCTATTCAAGATCTCTGCCT-3'(SEQ ID No 46); NPM1_1112 R 5'-CCTGGACAACATTTATCAAACACGGTA-3'(SEQ ID No 47).

En particular, en el caso en el que para la detección se emplee un método en tiempo real, puede emplearse de forma alternativa el sistema de "sonda de hibridación" o "detección con verde SYBR" o "sonda de hidrólisis".

15 De acuerdo con un aspecto adicional, se divulga en el presente documento un método *in vitro* para la detección de la localización citoplasmática de la NPM en una muestra biológica que comprende las siguientes etapas de:

a) poner en contacto la muestra biológica con al menos un anticuerpo o un fragmento del mismo capaz de detectar la localización citoplasmática de la NPM;

20 b) detección del enlace anticuerpo- epítipo antigénico, mediante técnicas estándar de inmunofluorescencia o inmunoenzimáticas.

Dicha muestra biológica de la etapa a) del método anterior se selecciona del grupo que consiste en: secciones de tejido incluido en parafina, preferiblemente de médula ósea (biopsia osteomedular o coagulación hemática) o frotis medulares y muestras para citología sanguínea o líquida.

25 Preferiblemente, dicho anticuerpo de la etapa a) del método es un anticuerpo monoclonal. En particular, pueden utilizarse anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítipos resistentes a fijadores de la NPM (Cordell et al., 1999; Falini et al., 2002) que son capaces de detectar la localización citoplasmática de la proteína.

30 En un modo de realización preferido el método anterior puede incluir posteriormente otra etapa c) para la detección de proteínas de NPM mutadas en las muestras patológicas descritas anteriormente (secciones, frotis, muestras citológicas) mediante anticuerpos capaces de reconocer y unirse de forma selectiva a al menos un epítipo antigénico de proteínas de NPM mutadas de acuerdo con la invención, o c1) para la detección de secuencias de oligonucleótidos mutadas, por ejemplo, mediante métodos de amplificación con cebadores específicos. Los cebadores de la etapa c1) pueden ser:

NPM_940F_mutA 5'-GAGGCTATTCAAGATCTCTGTCT-3' (SEQ ID No 40);

NPM1_1112R 5'-CCTGGACAACATTTATCAAACACGGTA-3' (SEQ ID No 41);

35 NPM_940F_mutB 5'-GAGGCTATTCAAGATCTCTGCAT 3' (SEQ ID No 42);

NPM1_1112R 5'-CCTGGACAACATTTATCAAACACGGTA 3' (SEQ ID No 43);

NPM_940F_mutC 5'-GAGGCTATTCAAGATCTCTGCGT-3'(SEQ ID No 44);

NPM1_1112R 5'-CCTGGACAACATTTATCAAACACGGTA-3' (SEQ ID No 45);

NPM_940F_mutD 5'-GAGGCTATTCAAGATCTCTGCCT-3' (SEQ ID No 46);

40 NPM1_1112R 5'-CCTGGACAACATTTATCAAACACGGTA-3' (SEQ ID No 47);

para la identificación de las mutaciones A-D.

En una realización preferida del método, el epítipo antigénico de la etapa c) puede comprender el péptido VSLRK, y la mutación de al menos uno de los residuos de triptófano 288 y 290 (preferiblemente ambos residuos de triptófano al mismo tiempo o únicamente el residuo de triptófano 290), y el motivo NES según se ha definido anteriormente.

- 5 Se divulga en el presente documento oligonucleótidos anti-sentido capaces de hibridar con al menos una de las secuencias de oligonucleótidos que codifican las proteínas de nucleofosmina mutadas divulgadas en el presente documento, y de interferir con sus procesos de transcripción. En una realización preferida, los oligonucleótidos anti-sentido que se divulgan en la presente patente se utilizan para la preparación de un fármaco para el tratamiento de las LMA primarias.
- 10 También se divulga en la presente patente una secuencia de ribonucleótidos (ARNi) capaz de hibridar de forma selectiva con al menos una de las secuencias de oligonucleótidos que codifican las proteínas de nucleofosmina mutadas divulgadas en la presente patente, e interferir con su expresión. El ARNi es una molécula de ARN de doble cadena, que comprende una combinación de cadenas de oligonucleótidos sentido y anti-sentido, que evita la traducción de los ARNm diana.

- 15 De acuerdo a un aspecto en particular, el ARNi de la secuencia de ribonucleótidos además en la forma de microARN, se utiliza para la preparación de un fármaco para el tratamiento de LMA primarias.

- 20 Además, entre las posibles aplicaciones terapéuticas, se contemplan, las moléculas que interfieren con los procesos de cambios post-traduccionales (acetilación, fosforilación, ubiquitinación) de la molécula de NPM (mutada y de tipo silvestre), o con alteraciones de las vías de señalización celular específicamente asociadas con la presencia de una de las proteínas de NPM mutadas que se divulgan en la presente patente.

Además, la presente divulgación sugiere el uso de inhibidores específicos de la parte C-terminal de las proteínas de NPM mutantes mediante moléculas pequeñas (péptidos u otras), identificadas utilizando "SAR por RMN" (Shuker et al., 1996) u otros métodos.

- 25 Se divulga adicionalmente en la presente patente el uso de secuencias de oligonucleótidos o proteínas de nucleofosmina codificadas por ellas de acuerdo a la divulgación, o partes (péptidos) de las mismas, o una combinación de las mismas, para la preparación de una vacuna anti-tumoral. De hecho, las proteínas o péptidos de nucleofosmina se pueden utilizar como vacunas contra las leucemias LMA NPMc+.

- 30 Se divulga adicionalmente en la presente patente una composición farmacéutica que comprende al menos una de las secuencias de oligonucleótidos, o proteínas de nucleofosmina codificadas por ellas, de acuerdo a la divulgación, o partes (péptidos) de las mismas, junto con excipientes y adyuvantes farmacológicamente aceptables.

Se divulga adicionalmente en la presente patente una vacuna anti-tumoral que comprende al menos una de las secuencias de oligonucleótidos, o proteínas de nucleofosmina codificadas por ellas, de acuerdo con la divulgación, o fragmentos (péptidos) de las mismas, junto con excipientes y adyuvantes farmacológicamente aceptables. Dichas vacunas anti-tumorales son específicas para el tratamiento preventivo y terapéutico de LMA NPMc+.

- 35 Se divulga adicionalmente en la presente patente un animal transgénico no humano que comprende una secuencia de oligonucleótidos que codifica una proteína de nucleofosmina mutada según se ha descrito anteriormente. Dicho animal transgénico no humano puede ser empleado como un modelo de estudio experimental para el estudio de nuevos fármacos para el tratamiento de LMA NPMc+.

- 40 La presente invención será descrita a continuación, de forma ilustrativa y no limitativa, de acuerdo a su modo de realización preferido, con particular referencia a las figuras de los dibujos adjuntos, en los que:

- 45 La figura 1A muestra los histogramas que hacen referencia a la expresión de nucleofosmina sub-celular en la LMA, respectivamente, NPMc+ y NPMc- en el panel izquierdo y derecho, respectivamente; en el panel izquierdo las flechas indican células leucémicas mientras que la punta de flecha indica una célula hematopoyética residual con una positividad de NPM restringida al núcleo (x 1.000) esperada; las flechas en el panel derecho indican una célula mitótica con expresión citoplasmática de NPM (x 1.000) esperada;

La figura 1B muestra la expresión citoplasmática de NPM en 1706 tumores humanos, lo que es específico de las LMA primarias, no siendo detectable en otros tumores hematopoyéticos y extra-hematopoyéticos, tales como las LMA secundarias; leucemia linfóide aguda (LLA); leucemia mieloide crónica (LMC); síndromes mielodisplásicos (SMD); linfomas no Hodgkin (LNH) y tumores sólidos extra-hematopoyéticos (EXTRA-HEMOP);

La figura 1C muestra los histogramas que hacen referencia a la correlación entre la expresión y la morfología subcelular de NPM en 591 LMA primarias del estudio de GIMEMA/EORTC más 70 LMA del subtipo M3 con t(15;17); la LMA-NPMc+s puede pertenecer a todos los subgrupos FAB, pero son más a menudo el tipo M4-M5, la forma FAB-M5b casi siempre contiene mutaciones de NPM.

5 La figura 1D muestra la expresión citoplasmática de NPM en el linaje de células leucémicas mieloides y eritroides ("implicación multilínea"); en el panel izquierdo se muestra la médula infiltrada por blastos mieloides (punta de flecha) y eritroides (flecha); en el panel central se indican precursores eritroides anómalos (flecha) y grupos de blastos mieloides (flechas dobles), donde ambos expresan la NPM a nivel citoplasmático y nuclear; la punta de la flecha indica una célula hematopoyética residual con la prevista NPM restringida al núcleo; en el panel de la derecha se indican las células con la esperada expresión de nucleolina (C23) restringida al núcleo; las flechas en los paneles derecho y central indican células leucémicas coloreadas doblemente de marrón para glicoforina (superficie) y coloreadas de azul para la NPM (citoplasma más núcleo) o para C23 (restringida al núcleo); todas las cifras han sido obtenidas utilizando la técnica inmunoenzimática APAAP; x 1.000;

15 La figura 2 muestra los histogramas que hacen referencia a la asociación entre la expresión de la NPM citoplasmática y la presencia de CD34: las figuras 2A-C muestran que en la mayoría de los casos la expresión de NPM citoplasmático se asocia con negatividad en CD34, mientras que los casos de NPMc- LMA muestra un comportamiento opuesto; la figura 2D muestra una NPMc+ de LMA de cariotipo normal y ausencia de expresión de CD34 (biopsia osteomedular, técnica APAAP x 1.000); la figura 2E muestra una NPMc-LMA con cariotipo normal y positividad intensa de CD34 (biopsia osteomedular, técnica APAAP x 1,000); la figura F representa análisis FACS de una LMA NPMc+; panel izquierdo: control; panel central: CD34 (FITC) y CD133 (PE) que carece de células leucémicas; panel derecho: CD33(FITC) y CD13(PE) que co-expresan células leucémicas;

25 La figura 3A hace referencia al análisis de 493 pacientes con LMA del estudio GIMEMA/EORTC y muestra que los casos de NPMc+ se asocian exclusivamente al cariotipo normal (NK: cariotipo normal; AK: cariotipo anómalo); la figura 3B muestra el análisis del estudio GIMEMA/EORTC de 493 LMA, más 109 pacientes no incluidos en el estudio (70 leucemias promielocíticas agudas con t(15;17) y 39 LMA con reordenamientos cromosómicos importantes); 24 NPMc+ (columna "otros") no se asocian nunca con anomalías cromosómicas importantes y muestran únicamente anomalías de menor importancia; ninguna de las LMA NPMc+ se asocia con anomalías cromosómicas importantes; 24 casos de NPMc+ (columna "otros") muestran únicamente anomalías de menor importancia;

30 Las figuras 3C y 3D muestran la localización prevista de la NPM a nivel nuclear en la LMA NPMc+ de tipo M3 y M4eo (técnica APAAP; x 1.000);

La figura 3E muestra que, en el contexto de las LMA de cariotipo normal (NK), las mutaciones del FLT3-ITD (duplicación interna en tándem - ITD) ocurren más frecuentemente en las LMA NPMc+ en comparación con las LMA NPMc- (U = no mutada; M = mutada);

35 La figura 3F muestra que, en el contexto de las LMA de cariotipo normal (NK), tienen lugar formas NPMc+ más frecuentemente en rangos de edad más avanzada;

La figura 3G muestra un modelo de regresión logística multivariable que establece la asociación independientes entre la NPM citoplasmática y el FLT3-ITD; Indip Var: variable independiente; GL: grado de libertad; Sig: significancia; OR: medidas de riesgo; *: cariotipo normal vs anómalo (quedan excluidos eventos genéticos mayores); M: mutado; U: no mutado;

40 La figura 4A es una representación esquemática del gen de la NPM; los bloques oscuros indican secuencias de codificación; los bloques no coloreados indican 3'- y 5'-UTR; MB es el dominio de unión a metales; Ac: es el dominio ácido; NLS representa la señal de localización nuclear; NAB representa el dominio de unión a ácido nucleico; las flechas oscuras indican la posición en el mapa de los cebadores para el ADN genómico y las flechas no coloreadas indican los cebadores para la amplificación de ADNc;

45 La figura 4B muestra una secuencia de la NPM de tipo silvestre (nucleótidos 952-989) alineada con seis variantes de mutantes, denominados de A a F; las letras en mayúsculas indican las introducciones de nucleótidos; la secuencia de la proteína mutada con residuos de triptófano (W) subrayados en su extremo C-terminal, está representada a la derecha, mientras que la secuencia de aminoácidos nueva común a todas las proteínas mutadas se indica en el área delimitada con un recuadro; para cada variante, se proporciona el número total de casos afectados;

50 La figura 4C muestra la secuenciación de la NPM de un paciente que muestra una mutación A, según se obtiene mediante secuenciación directa (en la parte superior) y después de la clonación y la secuenciación de los dos alelos de la variante (centro, tipo salvaje, inferior, alelo mutado); las flechas indican la posición en donde el alelo diverge;

La figura 4D muestra la reconstrucción tridimensional de la microscopía confocal de células NIH 3T3 transfectadas con plásmidos que codifican alelos de NPM marcada con EGFP de tipo silvestre (parte superior) y mutante (parte inferior); la proteína de tipo silvestre se localiza en los nucléolos y membrana nuclear, mientras que la NPM mutada muestra una localización citoplasmática aberrante;

- 5 La figura 5A muestra análisis Western Blot (anticuerpos Sil-C vs 376) de la totalidad de las células lisadas de células leucémicas de NPMc+ o NPMc-; el anticuerpo Sil-C reconoce de manera específica la proteína NPM mutada únicamente en los casos de LMA con mutación de la NPM (NPMc+);

- 10 La figura 5B muestra el análisis Western Blot (anticuerpo Sil-C) de una fracción nuclear (N) y citoplasmática (C) de un paciente leucémico con la mutación A de la NPM: el Sil-C reconoce de manera específica la proteína NPM mutada en la fracción citoplasmática de células leucémicas primarias NPMc+; los resultados representan 3 experimentos independientes;

- 15 Las figuras 5C-5E muestran biopsias osteomédulares de células leucémicas NPMc+ con la mutación A: (5C) imagen típica de la leucemia mieloide aguda FAB-M5; la flecha indica una célula leucémica grande con un núcleo en forma de riñón; (5D) el anticuerpo Sil-C que reconoce de manera específica el mutante (NPMm), muestra una positividad restringida al citoplasma (flecha); T indica una trabécula ósea; (5E) el anticuerpo anti-NPM 376 monoclonal reconoce tanto la proteína NPM de tipo silvestre como la NPM mutada y colorea las células leucémicas en el citoplasma y en el núcleo (flecha);

- 20 Las figuras 5F-5G muestran biopsias osteomédulares de mutaciones de la NPM que carecen de leucemia promielocítica (NPMc-): (5F) morfología típica de una LMA-M3 (hematoxilina-eosina, x 400); (5G) el anticuerpo Sil-C no colorea las células leucémicas M3 y colorea únicamente la pared del vaso mediante reactividad cruzada; el asterisco indica el lumen del vaso (técnica APAAP; contra-tinción en hematoxilina; x 400);

La figura 6 muestra los cambios en el triptófano 288 y 290 y la creación de un motivo NES en 40 proteínas NPM mutantes identificadas en pacientes leucémicos; Cit: citoplasmático; nd: no disponible; IH: inmunohistoquímica; aminoácidos en los paneles: motivo NES; aminoácidos subrayados: residuos de triptófano;

- 25 La figura 7A-B muestra células HI299 transfectadas con ADNc que codifica los mutantes NPMwt y NPM de A a D, en ausencia (7A) y en presencia (7B) de leptomicina B (LMB). El eGFP-NPMwt se localiza en los nucléolos tanto en presencia como en ausencia de LMB. En ausencia de LMB, todos los mutantes asociados con las GFP (de A a D) muestran localización citoplasmática aberrante (7A), mientras que los mismos mutantes asociados con la eGFP se recolocan por completo en el núcleo en presencia de LMB (7B);

- 30 La figura 7C-E muestra el análisis en diversos intervalos de tiempo de los efectos de la LMB en el mutante A unido a la eGFP (eGFP-NPMmutA) en células NIH-3T3: (7C) imágenes de microscopio confocal de células NIH-3T3 en los tiempos indicados en los que los círculos blancos representan las regiones (regiones de interés, ROI) en las que la intensidad de fluorescencia de la eGFP-NPMmutA ha sido calculada; (7D) medición de fluorescencia en áreas seleccionadas (ROI) de células NIH-3T3; (7E) análisis Western Blot de la distribución sub-celular de la eGFP-NPMmutA en células NIH-3T3 utilizando el anticuerpo monoclonal anti-GFP;

- 35 Las figuras 8 A-B muestran experimentos con microscopio confocal para verificar la re-localización de los mutantes de la NPM en el nucleoplasma con Leptomicina B (LMB): (8A) imagen de microscopio confocal de células NIH-3T3 transfectadas con GFP-mutA o con GFP-NPMwt en presencia o en ausencia de LMB; bajo condiciones basales, el mutante se localiza únicamente en el citoplasma (parte superior izquierda), pero se reposiciona en el nucleoplasma (parte superior derecha) después de la incubación con LMB; el GFPNPMwt se localiza en los nucléolos tanto en presencia como en ausencia de LMB (panel central, izquierda y derecha); el panel inferior muestra células tratadas con LMB y transfectadas con GFP-mutA y coloreadas en los nucléolos con un anticuerpo monoclonal anti-nucleolina (C23) (flecha); el mutante de la proteína NPM (verde) se localiza en el nucleoplasma, mientras que la nucleolina/C23 (rojo) está restringida a los nucléolos, la membrana nuclear está coloreada en azul; (8B) imagen de microscopio confocal de la médula ósea de una leucemia NPMc+ con mutación A de la NPM (panel superior); las células leucémicas muestran diferenciación mieloide en el aspirado medular (parte superior izquierda, flecha) y biopsia ósea (parte superior central); las células leucémicas, en su mayoría cerca de una trabécula ósea (T), muestran expresión de la NPM citoplasmática (y nuclear) (parte superior derecha); en los paneles centrales e inferiores, se muestran células leucémicas purificadas coloreadas con anticuerpo monoclonal anti-NPM 376, y se observan en imagen de microscopio confocal en ausencia (panel central) y en presencia (panel inferior) de leptomicina B; las imágenes han sido reconstruidas en 3-D y se ha realizado un corte electrónico sobre la superficie nuclear para observar mejor la localización de la NPM. Bajo condiciones basales el anticuerpo monoclonal 376 que no distingue entre la NPM de tipo silvestre y el mutante A, marca tanto los nucléolos como el citoplasma (panel central); después del tratamiento con leptomicina B, la NPM se encuentra en el núcleo de nuevo (panel inferior);

La figura 9A muestra la re-localización nuclear de mutante de NPM mediante leptomicina B en células OCI/AML3: (9A) en ausencia de LMB, el anticuerpo anti-NPM 376 subraya tanto los nucléolos como el citoplasma (izquierda); la incubación con LMB determina una re-localización de la NPM en el nucleoplasma (derecha);

La figura 9B muestra la inmunoprecipitación (IP) de células lisadas de células OCI-AML3 y células U937 con IgG de control o anticuerpos anti-NPMm de conejo (Sil-C) y anticuerpo anti-NPM murino: análisis Western blot con anticuerpos anti-Crm1 se muestran en los paneles superiores, mientras que aquellos con anticuerpos anti-NPMm (Sil-C) y anti-NPM (Cl.376) se muestran en los paneles central e inferior; WCL indica células OCI-AML3 lisadas incluidas como control; la figura muestra la interacción física entre la proteína NPM mutada y Crm1:

La figura 10 muestra un análisis con microscopio confocal de células NIH-3T3 transfectadas con eGFP-NPM de tipo silvestre o eGFP-NPM mutante, y muestra que las mutaciones de NES y triptófano son ambas necesarias para exportar los mutantes de NPM; la destrucción de la estructuras de NES en el mutante A de NPM (NPM mut A no-NES) evita la exportación del núcleo, de manera que el mutante aparece localizado en el nucleoplasma tanto en presencia como en ausencia de LMB; el mutante E de la NPM que posee triptófano 288 pero carece del 290, se reposiciona parcialmente en los nucléolos después del tratamiento con LMB; la reintroducción del triptófano 290 (NPMmutA, A290W) produjo aproximadamente el mismo efecto; cuando ambos triptófanos (288 y 290) se han introducido nuevamente en el mutante A (C288W + A290W) la correspondiente proteína fusionada con la eGFP, a pesar de la presencia de NES, se localiza exclusivamente en los nucléolos, tanto en presencia como en ausencia de LMB;

La figura 11A muestra experimentos de co-transfección de células murinas con el mutante A de GFP-NPM y HA-NPM de tipo silvestre; el mutante de NPM actúa como un dominante negativo versus la NPM de tipo silvestre que determina su desplazamiento parcial en el citoplasma;

La figura 11B muestra un análisis Western blot con α -NPM o α -HA (panel izquierdo), e inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-Flag, y Western blot con α -NPM o α -HA (panel derecho); los datos bioquímicos confirman los del marcaje con proteínas fluorescentes;

La figura 11C muestra un esquema hipotético del mecanismo de la localización núcleo-citoplasma alterada del mutante A de la NPM y de la NPM de tipo salvaje, puntos blancos no coloreados: residuos de triptófano; puntos oscuros: triptófanos mutados; cuadrado: señal de exportación nuclear (NES);

La figura 12 muestra el esquema de una aproximación de inmunotinción de la NPM para estudiar la leucemia mieloide aguda en la que los casos se dividen, respectivamente, en dos grupos para la expresión citoplasmática (NPMc+) o nuclear (NPMc-) NPM;

La figura 13 ilustra la sonda y los cebadores utilizados en RQ-PCR; se muestran dos sistemas específicos para las mutaciones A y B; la estrategia de amplificación utiliza un cebador directo (cNPM1-F) y una sonda (c.Probe) común para ambos sistemas; el cebador directo se posiciona en el exón 11, mientras que la sonda se posiciona en la unión entre el exón 11 y el exón 12; los dos inversos son cNPM-mut.A-R y cNPM-mut.B-R específicos a la mutación y ambos se diseñan en el exón 12; la tabla indica secuencias de cebadores y de la sonda;

La figura 14 muestra el gráfico de amplificación en la RQ-PCR plasmídica en relación a 5 diluciones plasmídicas sometidas a ensayo por duplicado; el plásmido contiene la secuencia del gen de la NPM1 con la mutación A; la tabla muestra la reproducibilidad de los datos en 4 experimentos adicionales;

La figura 15 muestra el gráfico de amplificación del ADNc en RQ-PCR en relación a seis diluciones en serie en base a una potencia de factor 10 de una muestra de LMA NPMc+ con mutación A en el diagnóstico; la curva estándar subraya la "inclinación", el coeficiente de correlación y se intercepta con el eje Y; la tabla muestra los resultados de diagnóstico logrados en 4 muestras con la mutación A y en 1 con la mutación B; en todas las muestras se ha obtenido una "sensibilidad reproducible máxima" de 10⁻⁴;

La figura 16 muestra la monitorización del número de copias mutadas de NPM, en el diagnóstico y después del tratamiento de inducción en 13 pacientes con LMA NPMc+ con mutación A (número de copias expresada como número de copias de NPM con mutación A/10000 copias de ABL); (Abreviatura: CR= remisión completa, PR= remisión parcial, NR = No Responde);

La figura 17 muestra la monitorización del número de copias mutadas de NPM, en el diagnóstico después del tratamiento de inducción y durante el seguimiento en 3 pacientes con LMA NPMc+ con mutación A; la RQ-PCR muestra una cinética diferente en la disminución del número de copias; en los 50 días de terapia todos los pacientes mostraron remisión hematológica completa, pero mostraron un número diferente de copias mutadas de NPM1; el paciente I (cuadrado) muestra una remisión hematológica persistente; un número mínimo de copias mutadas se alcanza 90 días después de la terapia y permanece igual durante el seguimiento; en el paciente II (rombo) el número

de copias mutadas de NPM1 alcanza un mínimo aproximadamente 100 días después de la terapia; un aumento determinante del número de copias es evidente durante el seguimiento, junto con la recaída hematológica alrededor de 200 días después de la terapia; en el paciente III (triángulo) el número de copias mutadas de NPM1 alcanza un mínimo alrededor de 140 días después de la terapia; un aumento determinante del número de copias es evidente durante el seguimiento junto con la recaída hematológica (no representada en la figura) que tuvo lugar aproximadamente un mes después (no existe el dato molecular de la recaída); (abreviatura: CR = remisión completa).

Ejemplo 1: Estudio de la expresión génica de NPM y del valor diagnóstico y pronóstico de la misma en las LMA

Se ha realizado un estudio que permitió identificar un gran sub-grupo de leucemias mieloides agudas (alrededor de un tercio de las LMA en el adulto), caracterizado por la localización de la NPM citoplasmática en blastos leucémicos, mutaciones del gen de la NPM, elevada frecuencia de cariotipo normal, y buena respuesta a la quimioterapia de inducción.

Materiales y métodos

Muestras tumorales y pacientes

Los estudios inmunohistoquímicos han sido realizados en 1845 muestras de tumores incluidos en parafina. Las LMA incluyen: 591 LMA primarias (edad 15-60, queda excluida el sub-grupo M3) del estudio de GIMEMA/EORTC, 12 LMA y 70 leucemias promielocíticas agudas, 69 LMA primarias y 135 secundarias fuera de protocolo. Las muestras restantes representan tumores hematopoyéticos y extra hematopoyéticos distintos de la LMA.

Con consentimiento informado, la biopsia osteomedular de cada paciente con LMA se ha fijado en B5, transferida en alcohol al 70%, descalcificada e incluida en parafina.

Anticuerpos

Se han empleado anticuerpos monoclonales contra la NPM (Cordell et al., 1999; Falini et al., 2002), que permiten la identificación de la proteína en secciones incluidas en parafina habituales. Las muestras de biopsia también se han coloreado con anticuerpos monoclonales contra las siguientes moléculas: nucleolina (C23) (Saint Cruz Biotechnology Inc., CA, USA), glicoforina, CD34 (DakoCytomation, Glostrup, Denmark), CD133 (Miltenyi Biotech, Bologna, Italy), y ALK (Falini et al., 1999).

Tinción inmunohistoquímica

Se ha realizado inmunotinción utilizando la técnica APAAP (Cordell et al., 1984). La distribución sub-celular de la NPM (núcleo vs citoplasma) se ha evaluado sin conocer el subtipo FAB, la citogenética o la biología molecular. Los casos han sido clasificados como NPMc+ (positivos para citoplasma) o NPMc- (negativos para citoplasma). Todos los casos han sido coloreados en paralelo para nucleolina (C23) que, según era de esperar, en el caso de NPMc+, ha mostrado una expresión nuclear restringida.

Análisis molecular y citogenético

Se han realizado investigaciones citogenéticas después de cultivos a corto plazo. Los cariotipos se han analizado después de bandeado G y han sido descritos según la Nomenclatura citogenética humana del sistema internacional (Mitelman, 1995). Se han realizado investigaciones con FISH según se ha descrito previamente (Crescenzi et al., 2000).

Se han llevado a cabo RT-PCR para los principales transcritos (PML-RARa, AML1-ETO, CBFB-MYH11, BCR-ABL y DEKCAN), análisis Southern Blot, análisis FISH para reordenamientos de MLL y análisis para las mutaciones FLT3 (ITD y 0835) y MLL-ITD, tal como se ha descrito previamente (Van Dongen et al., 1999; Soekarman et al., 1992; Noguera et al., 2002; tip et al., 1995).

Análisis de mutaciones de la NPM

En el presente estudio, el análisis de la mutación del gen de la NPM se ha realizado en 161 casos de tumores malignos linfo-hematopoyéticos: 52 LMA NPMc+, 56 LMA NPMc-, 9 leucemias mieloides crónicas (LMC), 7 leucemias linfoblásticas agudas (LLA) y 37 neoplasias linfoides. Se han analizado cinco pacientes con LMA NPMc+ tanto en la etapa de diagnóstico como en la de remisión completa después de la quimioterapia.

Para el análisis de la región de codificación de la NPM, se retro-transcribió un ARN de un microgramo utilizando la RT-PCR, Thermoscript System (de Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), y se amplificaron secuencias de ADNc con los cebadores NPM1_25F, 5'-GGT TGT TCT CTG GAG GAG CGT TC-3' y NPM1_1112R, 5'-CCT GGA CAA CAT TTA TCA AAC ACG GTA-3', utilizando un sistema de PCR Expand High-Fidelity Plus (de Roche Applied Science, Mannheim, Alemania).

Para amplificar las secuencias del exón 12 del ADN genómico, se diseñaron dos oligonucleótidos que hibridan de manera específica con las regiones de la secuencia flanqueadora del intrón (NPM1-F: 5'-TTA ACT CTC TGG TGG TAG AAT GAA-3' y NPM1-R: 5'-CAA GAG TAT TTG CCA TTC CTA AC-3'). Los productos de la PCR fueron purificados de acuerdo con métodos estándar y secuenciados directamente desde ambos extremos. Todas las mutaciones fueron confirmadas en productos de PCR independientes y, en casos representativos, mediante clonación en pGEM-T Easy (de Promega, Madison, WI, USA) y secuenciación.

Relaciones entre mutaciones de la NPM y otras mutaciones

Los casos de LMA de cariotipo normal con mutaciones de NPM del protocolo AMLCG 99 se analizaron para la presencia de otras mutaciones, en particular de FLT3-ITD, FLT3-D835, MLL-PTD, CEBPA, NRAS, y KIT.

Vectores de expresión: construcción de plásmidos

Para seguir el destino sub-celular de la proteína NPM de tipo silvestre en experimentos de transfección, se generaron plásmidos que expresan alelos de NPM de tipo silvestre (pEGFPd-NPMwt) o mutante (pEGFPd-NPMmA) fusionados a la proteína proteína verde fluorescente mejorada (EGFP). Para este fin, se amplificaron las secuencias de ADNc de la NPM de un paciente de LMA NPMc+ (código 497A130) que porta una mutación heterocigótica en el exón 12 del gen con los cebadores NPM1_89F_BamHI, 5'GCC ACG GAT CCG AAG ATT CGA TGG AC3', y NPM1_1044R EcoRI, 5'ATC AAG AAT TCC AGA AAT GAA ATA AGA CG3', y se clonaron dentro del marco del vector pEGFP-C1 (de BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA, USA). El análisis de la secuenciación confirmó la ausencia de errores introducidos por Taq en ambos plásmidos.

Experimentos de transfección transitoria

Fueron transfectadas de forma transitoria células NIH 3T3 con pEGFPd-NPMwt, pEGFPd-NPMmA y un vector pEGFP-C1 vacío utilizando reactivos de Lipofectamina 2000 (Invitrogen). Se monitorizó la eficacia de la transfección mediante análisis Western blot. Se obtuvieron imágenes con un microscopio confocal BioRad MRC 1024 después de la contra-tinción de los núcleos con yoduro de propidio. Se obtuvieron cortes confocales con una estación de trabajo SCI Octane, y se realizó la reconstrucción de las imágenes partiendo de los cortes confocales, utilizando un módulo de "proyección de sombras" del software Imaris (de Bitplane, Zurich, Suiza).

Análisis estadístico

El análisis de chi-cuadrado en tablas de contingencia de dos vías, revela la asociación entre variables categóricas. Las diferencias estadísticas entre los medios se analizaron mediante prueba t. La relación entre la localización de la NPM y las mutaciones de FLT3-ITD/D835, ajustada por edad y citogenética, se investigó aplicando un modelo de regresión logística con estos factores como variables independientes y NPM como variable dependiente. Los casos con translocaciones importantes fueron excluidos porque su absoluta asociación con la expresión de NPM restringida al núcleo, no proporciona una estimación de parámetros válidos.

La asociación entre las características clínicas y biológicas (conteo de glóbulos blancos en la presentación, expresión sub-celular de NPM, mutaciones de FLT3), y la respuesta a la terapia de inducción se valoró en 126 LMA de cariotipo normal (79 NPMc+ y 47 NPMc-) tratadas de acuerdo al protocolo GIMEMA LAM99P. Se aplicó un modelo logístico multivariado. En todos los análisis estadísticos de dos vías, dos valores de $p < 0,05$ se consideraron de relevancia estadística.

Resultados

Localización citoplasmática de NPM

Se observó expresión de NPM citoplasmático, definida como NPMc+ (figura 1A), en 208/591 (35,2%) casos de LMA primaria del estudio GIMEMA/EORTC (figura 1B). Tal hallazgo parece específico para las LMA primarias, no siendo detectable en las LMA secundarias y en otros tumores humanos que muestran siempre una expresión de NPM nuclear exclusiva (figura 1B). En células leucémicas NPMc+, nucleolina (C23), otro antígeno nucleolar, mantiene su localización restringida al núcleo tal como se muestra en la figura 1A. En las LMA NPMc+, la expresión de NPM anómala se observa habitualmente en casi todas las células leucémicas; excepto en casos de M5b (leucemia monocítica), donde la NPM citoplasmática se expresa únicamente en un porcentaje variable de la población

neoplásica, a saber 30-60% de células leucémicas, preferencialmente las más inmaduras (monoblastos). En contraste, las LMA NPMc- raramente contienen células leucémicas NPMc+, en su mayoría elementos mitóticos según se muestra en la figura 1A en la derecha.

- 5 La expresión anómala de NPM citoplasmática de células leucémicas debe considerarse un evento a largo plazo, según se documenta por su comparación en 25 pacientes con LMA NPMc+ en una recaída de la enfermedad hasta 3 años después del diagnóstico inicial.

Morfología de la LMA NPMc+

- 10 La expresión de NPM citoplasmática anómala se observó en todas las categorías FAB, excepto M3 (leucemia promielocítica aguda), M4e (leucemia mielomonocítica aguda con eosinofilia), y M7 (leucemia megacariocítica aguda) según se muestra en la figura 1C. En particular, la figura muestra la correlación entre la morfología y expresión sub-celular de la NPM en 591 LMA primarias del estudio GIMEMA/EORTC más 70 leucemias promielocíticas agudas con t(15;17) (fuera de protocolo). La frecuencia de la expresión de NPM citoplasmática se encontró en un rango desde 13,6% en M0 (LMA mínimamente diferenciada) a un 93,7% en M5b (leucemia monocítica aguda). La mayoría de las LMA NPMc+ de tipo M5b y M6 (leucemia eritroide aguda) y alrededor de un 30% de casos de NPMc+ M1 (LMA sin maduración), M2 (LMA con maduración) y M4, se caracterizan por la presencia de NPM citoplasmática, no solamente en blastos mieloides sino también en precursores eritroides, en particular en los proeritroblastos (figura 1D) y, menos frecuentemente, en los megacariocitos (datos no mostrados).

- 15 La presencia de NPM citoplasmática en diferentes linajes hematopoyéticos condujo al análisis de la expresión de algunas moléculas, como los antígenos CD34 y CD133, que tienen lugar en las células madre hematopoyéticas. Se detectó positividad en CD34 (definida como un 20% de células positivas) en 12/159 (7,5%) LMA NPMc+ y en 227/317 (71,6%) LMA NPMc- ($p < 0,001$), según se muestra en las figuras 2A-2E. Por lo tanto, la NPMc+ aparece como exclusiva, para cada una, con la expresión de CD34 y CD133. Las LMA NPMc+ negativa en CD34 carecen de forma característica también de CD133, según se muestra en la figura 2F.

- 25 El amplio espectro morfológico y la implicación de diversos linajes hematopoyéticos de la LMA NPMc+ refleja un posible origen del mismo a partir de células madre hematopoyéticas raras de CD34-/CD38-, que fueron identificadas en diversas especies animales, incluyendo las especies murina y humana (Goodell et al., 1997; Engelhardt et al., 2002). De forma alternativa, la CD34 podría verse desregulada como un efecto de la transformación leucémica.

Cariotipo de LMA NPMc+

- 30 Los datos citogenéticos están disponibles en 493/591 casos de LMA (166 NPMc+ y 327 NPMc-). Sobre un 85% (142/166) de LMA NPMc+ presenta un cariotipo normal, según se muestra en la figura 3A. En contraste, únicamente el 26,9% (88/327 casos) de LMA NPMc- presenta cariotipo normal ($p < 0,001$). En general, el 61,7% de las LMA de cariotipo normal son NPMc+ (142/230 casos), según se muestra en la figura 3B. 24 casos de LMA NPMc+ muestran la presencia de translocaciones cromosómicas de poca importancia y, entre éstas, 12 (un 50%) casos tienen ambas metafases normal y anómala.
- 35 Ninguno de los casos de LMA que portan anomalías genéticas importantes es NPMc+, según se muestra en las figuras 3B, 3C y 3D.

FLT3-ITD y otras mutaciones génicas en LMA NPMc+

- 40 Las mutaciones FLT3, ITD o D835 se detectaron en 59/219 (26,9%) y 13/202 (6,4%) casos de LMA con cariotipo normal, respectivamente; un caso es portador de ambas mutaciones ITD y D835. La mutación FLT3-ITD fue 2,5 veces más frecuente en casos de NPMc+ que en casos NPMc- ($p < 0,003$), según se muestra en los histogramas de la figura 3E. Un modelo de regresión logística multivariada ajustado por edad y citogenética permite establecer una asociación independiente entre la NPM citoplasmática (variable dependiente) y el FLT3-ITD, según se muestra en la figura 3G. No se observa ninguna asociación estadística entre las mutaciones FLT3-D835 y la localización sub – celular de NPM ($p=0.5$), posiblemente por el bajo número de casos de la mutación D835.
- 45 En casos de estudio posteriores del protocolo AMLCG 99 (Schnittger et al., 2005), se confirmó un aumento en la frecuencia de la mutación FLT3-ITD en casos de LMA con mutación de NPM. En contraste, la mutación de la NPM raramente se asocia a las mutaciones MLL (MLLPTD) y CEPBA.

Respuesta a la terapia de inducción de la LMA NPMc+

- 50 Se evaluó la respuesta a la terapia en 126 casos de LMA con cariotipo normal (79 NPMc+ y 47 NPMc-) tratados según el protocolo GIMEMA LAM99P. En la tabla 1 se muestra el modelo de regresión logística de la respuesta a la terapia de inducción en 126 pacientes.

Tabla 1

Evaluación del análisis de máxima verosimilitud						Evaluación del Cociente de disparidad (Odds ratio)		
Parámetro	DF	valoración	Error Estándar	Chi cuadrado De Wald	Pr> Chi cuadrado	OR	Rango de Confianza OR 95	
Intercepción	1	0,9596	0,3761	6,5112	0,0107			
FLT3 (M vs U)*	1	-0,4020	0,4541	0,7836	0,3760	0,669	0,2	1,6
NPM (Cit vs Nucl)#	1	1,0946	0,4647	5,5486	0,0185	2,988	1,2	7,4
WBC (≤80 vs>80)	1	-1,3123	0,4748	7,6399	0,0057	0,269	0,1	0,6
Edad (≤48 vs>48)	1	-0,3405	0,4498	0,5732	0,4490	0,711	0,2	1,7
*M = mutado; U = no mutado; WBC: número de glóbulos blancos; #Cit. = positividad citoplasmática; Nucl. = positividad restringida al núcleo.								

El modelo multivariado para lograr una respuesta completa incluye el conteo de glóbulos blancos (categorizado en el percentil 75), edad (categorizado en el valor de la mediana), la expresión sub-celular de la NPM y mutaciones de FLT-3. El análisis se muestra en la tabla 1 y muestra que el conteo de glóbulos blancos y de NPM son factores de pronóstico independientes. En particular, un conteo de glóbulos blancos por encima de 80 x 10⁹/L ($p < 0,006$; OR=0,269; CI 95%: 0,1-0,6) incide como factor de pronóstico negativo y como factor de pronóstico positivo el hecho de que las células leucémicas tengan NPM citoplasmático ($p < 0,019$; OR=2,988; CI 95%: 1,2-7,4).

Mutaciones de NPM como factor de pronóstico en las LMA de cariotipo normal

De acuerdo a la presencia del gen de la NPM y de las mutaciones génicas FLT3-ITD, las LMA de cariotipo normal pueden dividirse en 4 sub-grupos: NPM mutada/FLT3 mutado, NPM mutada/FLT3 no mutado, NPM no mutada/FLT3 mutado y NPM no mutada/FLT3 no mutado. El análisis llevado a cabo por los autores en 401 casos de LMA con cariotipo normal (Schnittger et al, 2005), muestra que la presencia de una mutación de NPM en ausencia de mutación de FLT3 identifica un sub-grupo de leucemias con un pronóstico más favorable. Resultados similares se registraron posteriormente en otros dos estudios (Ohoner et al., 2005; Verhaak et al., 2005).

Análisis de mutaciones de NPM en las LMA y en otros tumores

La LMA NPMc+ no expresa las proteínas de fusión NPM-ALK, NPM-RAR α , NPM-MLF1, u otras proteínas de fusión que contengan NPM, según se muestra por la ausencia de respectivos genes de fusión tras análisis FISH, ausencia de transcritos de fusión respectivos tras RT-PCR, ausencia de dichas proteínas de fusión tras análisis inmunohistoquímica, presencia exclusiva de un polipéptido de NPM de 38 kDa tras análisis Western Blot, y demostración de NPM citoplasmática a través de cuatro anticuerpos monoclonales anti-NPM diferentes.

En el presente estudio, el análisis de la región de codificación de NPM, realizado mediante RT-PCR y secuenciación directa, reveló mutaciones que afectaban al exón 12 en todos los casos excepto en un caso NPMc+. La Figura 4A es una representación esquemática del gen de NPM, y las mutaciones se resumen en la figura 4B. En total, se observaron seis variantes de secuencias diferentes, donde todas ellas conducen al marco de lectura en la región de codificación del dominio carboxilo-terminal de la proteína NPM. La mutación más frecuente (tipo A: gatctctgTCTGgcagtgaggagga agtctctttaagaaaatag), es una duplicación de un tetranucleótido TCTG en las posiciones 956-959 de la secuencia de oligonucleótidos de referencia NM_002520 (GenBank), según se muestra en la figura 4C; se predice que el desplazamiento resultante en el marco de lectura altera la parte C-terminal de la proteína NPM sustituyendo los últimos siete aminoácidos (WQWRKSL) con 11 residuos diferentes (CLAVEEVSLRK). Tres mutaciones adicionales (tipo B: gatctctgCATGgcagtgaggaggaagtct cttaagaaaatag, tipo C: gatctctgCGTGgcagtgaggaggaagtct cttaagaaaatag, y tipo D: gatctctgCCTGgcagtgaggaggaagtct cttaagaaaatag) incluyen una introducción distinta de 4 pares de base en la posición 960, todo dando como resultado el mismo marco de lectura que la mutación A. En las últimas dos mutaciones (tipo E: gatctctggcagtcTCTTGCCCC aagtctctttaagaaaatag y tipo F: gatctctggcagtcCCCTGGAGAAagtctctttaagaaaatag), los nucleótidos 965-969 (GGAGG) se eliminan y en su

lugar, se introducen dos secuencias diferentes de 9 pares de bases, sin modificar el marco de lectura y creando un dominio nuevo del carboxilo-terminal de 9 aminoácidos. Independientemente del tipo específico de mutación, los mutantes se caracterizan por el reemplazo de al menos uno de los dos residuos de triptófano (W) que en la secuencia de tipo silvestre están en la posición 288 y 290. Los resultados obtenidos son de acuerdo a las evidencias previas en estudios realizados en ratones que muestran la importancia del aminoácido triptófano para la localización nucleolar (Nishimura et al., 2002). Además, todas las proteínas mutantes compartían los mismos últimos 5 residuos de aminoácidos VSLRK. Por tanto, a pesar de la heterogeneidad genética, todas las mutaciones génicas de NPM dan como resultado una secuencia novedosa en el lugar del C-terminal de la proteína NPM.

La presencia de mutaciones en el exón 12 de la NPM y su asociación específica con la LMA NPMc+ fue confirmada en 11 muestras también mediante el análisis de secuenciación del ADN genómico. Las mutaciones de NPM son heterocigóticas y ocurren únicamente en el clon maligno, ya que no están presentes en las muestras de médula ósea de pacientes en remisión completa (N=5) después de la quimioterapia. Las mutaciones se observan en la LMA NPMc+ de todas las categorías FAB, incluyendo los casos de NPMc+ con cariotipo anómalo o expresión de CD34. Al contrario, todos los 56 casos de malignidad de las LMA-NPMc-, además de los 53 casos de malignidad que no son LMA, y NPMc- presentan secuencias de NPM de tipo silvestre tal como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2

Tipo de tumor	N.	FAB	CD34 +	Mut. FLT3	Mut. NPM
LMA NPMc+	52				
Cariotipo normal	49	Todos*	2/49	25/46	48/49
Cariotipo anómalo	3	M1,M5b	1/3	1/3	3/3
LMA NPMc-	56				
Cariotipo normal	12	M1-M6	8/10	4/12	0/12
Cariotipo anómalo **	44	M1-M6	5/8	3/8	0/44***
LMC	9	n.a.	0/9	n.d.	0/9
Neoplasias linfoides	44 [#]	n.a.	n.d.	n.d.	0/44
* Excepto para M3, M4eo y M7. ** incluye 7 t(15;17s); 12 t(8;21s); 13 Inv(16); 1 reordenamiento de MLL; 1 inv(3; 1 t(6;9), un cariotipo complejo; *** Caso con Inv 16 que muestra una delección de tres nucleótidos en el exón 6 de NPM1 en las posiciones 583-585, sin implicar el extremo 3' terminal. # incluye: 7 leucemias linfoblásticas agudas; 7 leucemias linfáticas crónicas de linfocitos B; 5 linfomas de células del manto; 5 linfomas foliculares; 10 linfomas de linfocitos B grandes; 5 linfomas de Burkitt; 5 mielomas múltiples. Mut.: mutado; n.a.: no aplicable; n.d.: no realizado.					

En estudios posteriores, los autores confirmaron los resultados descritos anteriormente para 1009 casos de LMA sometidos a secuenciación del gen de la NPM. La figura 6 muestra 40 mutaciones de NPM hasta ahora individualizadas.

Transfección del gen de NPM mutado

Para confirmar si las mutaciones del exón 12 de la NPM responden a la deslocalización citoplasmática de la proteína NPM, se transfectaron de forma transitoria células NIH 3T3, con vectores de expresión que codifican el alelo de tipo silvestre y mutante fusionado con EGFP. La imagen de microscopio confocal mostró la localización prevista para la proteína de tipo silvestre EGFP-NPM, mientras que la isoforma del mutante de NPM se encuentra claramente deslocalizada en el citoplasma tal como se muestra en la figura 4D.

Estos resultados indican claramente una correlación causal entre el evento genético (mutaciones de NPM) y la localización citoplasmática de la proteína NPM. Además, el hecho de que la NPM mutada está estrechamente asociada con el cariotipo normal y no se observe en leucemias con anomalías citogenéticas importantes sugiere que la mutación de NPM es el evento leucemógeno primario. La mutación podría interferir con la función normal de la NPM, tal como, por ejemplo, la interacción con la proteína Art o p53, (Colombo et al., 2002; Kurki et al., 2004; Horn et al., 2004). Las mutaciones podrían además perturbar otras funciones de la NPM que han sido mapeadas dentro del dominio C-terminal, tal como la unión de ácidos nucleicos (Hingorani et al., 2000), ATP (Chang et al., 1998), actividad alfa-estimulante de la ADN-polimerasa, o unión con el gen supresor tumoral Arf (Bertwistle et al, 2004).

Ejemplo 2: Producción de anticuerpos específicos contra secuencias polipeptídicas del C-terminal de la NPM específica de la leucemia

Las secuencias polipeptídicas representan inmunógenos ideales para la producción de anticuerpos específicos que incluyen todos los tipos de anticuerpos monoclonales y policlonales, anticuerpos monoclonales humanos, y anticuerpos humanizados producidos mediante técnicas de recombinación genética.

Los péptidos correspondientes a las secuencias A., B, C, D, E y F de la figura 4B pueden ser sintetizados químicamente de acuerdo con procedimientos estándar. Pueden emplearse todas las especies animales para la preparación de anticuerpos. Los métodos para la producción de anticuerpos y procedimientos de inmunización de la especie animal (vías de inoculación del antígeno, uso del adyuvante de Freund para aumentar la inmunogenética de la mezcla inyectada, frecuencia de inmunizaciones, etc), se describen ampliamente en la literatura científica.

Monoclonales

Se pueden inocular ratones Balb/c por vía intraperitoneal con péptidos específicos enlazados a KLH (3 inmunizaciones de 150 microgramos de péptido cada 10 días). Dicho programa de inmunización se continúa con un refuerzo intravenoso (150 microgramos), tres días antes de la fusión, con el propósito de aumentar la respuesta inmune al máximo.

Los anticuerpos monoclonales pueden producirse con el "método del hibridoma" (Goding J., 1983), que consiste en la formación de células híbridas que son el resultado de células normales del bazo con células de mieloma. Los autores de la presente invención utilizan el linaje de mieloma P3-NS1-Ag-4-1 (abreviado como NS-1), proporcionadas por el laboratorio del Prof. David Y Mason, Oxford, y obteniéndolas a partir del linaje P3K, que sintetiza únicamente cadenas ligeras 1κ que no se secretan sino que se degradan internamente y carecen de la enzima HGPRT. A continuación de la fusión celular, la selección del híbrido se realiza con adición de hipoxantina, aminopterina y timidina (HAT) al medio. Las únicas células capaces de sobrevivir bajo esta condición poseen:

1. la característica neoplásica del mieloma de crecer *in vitro*;
2. la enzima hipoxantina guanidina fosforribosil transferasa (HGPRT) de células del bazo que les permiten utilizar hipoxantina y timidina para sintetizar nucleótidos y por lo tanto ADN.

Las células del mieloma fusionado mueren por la carencia de la enzima HGPRT y por lo tanto no pueden utilizar la hipoxantina para la biosíntesis de nucleótidos, mientras que las células del bazo mueren (incluso si son HGPRT+), porque no son capaces de crecer *in vitro*.

Para los propósitos del presente estudio, el sobrenadante del hibridoma puede ser sometido a ensayo directamente en muestra citológica o en secciones incluidas en parafina de muestras de LMA que contengan la forma mutada de NPM (LMA NPMc+) y forma normal (tipo silvestre) de NPM (LMA NPMc-). El criterio racional de cribado es la identificación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales específicos contra péptidos de la invención (correspondiente al C-terminal de la NPM), es decir, anticuerpos que reaccionan con LMA NPMc+ pero no con NPMc-. Tales anticuerpos presentan la ventaja de que pueden ser utilizados tanto en muestras citológicas (frotis y citocentrifugados) y en secciones de tejido incluidas en parafina y, además, tanto para propósitos de diagnóstico como para monitorizar la enfermedad mínima residual leucémica. Después de la identificación, los híbridos pueden clonarse de acuerdo con métodos bien conocidos ("dilución limitante") y cultivarse *in vitro* en grandes cantidades. Los clones pueden ser entonces criopreservados en nitrógeno líquido para tener disponible un "banco" de los anticuerpos anteriormente mencionados.

Anticuerpos policlonales

Los anticuerpos policlonales contra los péptidos de la presente divulgación (secuencias específicas del C-terminal de la NPM mutada) pueden ser producidos en diversas especies animales. Anticuerpos policlonales hacen referencia tanto al suero del animal completo que contiene tales anticuerpos como a fracciones del suero enriquecidas en anticuerpo.

En particular, las fracciones de IgG o IgM que contienen únicamente los anticuerpos específicos para los péptidos de la presente divulgación, pueden obtenerse eluyendo suero a través de una columna que contiene péptidos enlazados de la presente divulgación (cromatografía de afinidad), y posteriormente purificando esta fracción mediante una columna que contiene proteína A o proteína G. Estos anticuerpos tienen la ventaja de que también pueden ser utilizados en muestras citológicas (frotis y citocentrifugados), y no únicamente en secciones de tejido incluidas en parafina, y para monitorizar la enfermedad mínima residual leucémica además de un propósito diagnóstico.

Producción del anticuerpo policlonal Sil-C

Materiales y métodos

El anticuerpo Sil-C fue producido mediante inmunización de los conejos con un péptido sintético de 11 aminoácidos (NHCOCH₃-CLAVEEVSLRK-COOH) (Inbio Ltd, Tallin, Estonia), que comprende dos triptófanos mutados, una parte NES y el péptido VSLRK del mutante A. Los sueros de conejo fueron purificados mediante cromatografía de afinidad utilizando columnas que contienen el péptido utilizado como inmunógeno (elución con 0,23 M Tris, 0,2 M Na₂HPO₄, pH 0,8). La reactividad contra el péptido se mostró mediante la técnica ELISA. En particular, las placas de ELISA fueron adsorbidas durante la noche a 4°C con 50 µl del péptido a una concentración de 10 µg/ml in TBS. Después del bloqueo con PBS que contiene suero fetal bovino al 3%, se añadieron los sueros de conejo en diluciones en aumento a los pocillos (desde 1/100 hasta 1/72900). Después de lavar en PBS-Tween 20 (0,05%), se añadieron a cada pocillo 50 µl de un anticuerpo de cabra secundario conjugado con peroxidasa (dilución 1/5000 en PBS).

La reacción anticuerpo-antígeno fue observada añadiendo a cada pocillo 50 µl de diclorhidrato de O-fenilendiamina. La lectura se realizó a 492 nm. Se utilizaron sueros pre-inmunes como control negativo. La caracterización bioquímica de anticuerpos fue realizada con técnicas estándar de Western blot, inmunoprecipitación y co-precipitación.

Resultados

Se produjo un anticuerpo policlonal (denominado Sil-C), que reconoce específicamente un epítipo antigénico que comprende dos triptófanos mutados, una parte NES y el péptido VSLRK que pertenece a las proteínas de nucleofosmina mutadas (NPM) según se define en las reivindicaciones adjuntas 1-6.

En los experimentos de Western blot, el anticuerpo Sil-C reconoce una banda específica de 37 kDa únicamente en la totalidad de células lisadas de leucemias con mutaciones de la NPM (LMA NPMc+) (pacientes 1-3) pero no de los pacientes con LMA sin mutaciones de la NPM (NPMc-) (casos 4-6) (Figura 5A, en la parte superior a la izquierda). En contraste, el anticuerpo monoclonal anti-NPM 376 que reacciona tanto con la NPM de tipo silvestre como con la mutada, identifica una banda de 37 kDa en todos los pacientes leucémicos sometidos a ensayo, independientemente de la presencia o no de mutaciones del gen de la NPM (Figura 5A, parte inferior a la izquierda). En el paciente N° 2, portador de una mutación de tipo A de la NPM, el anticuerpo Sil-C reconoce una banda de 37 kDa únicamente en la fracción citoplasmática de las células leucémicas (Figura 5B, parte superior a la derecha). La imagen, tal como se esperaba, difiere de la del anticuerpo monoclonal 376, la cual identifica una banda con el mismo peso molecular tanto en la fracción citoplasmática lisada como en las de la fracción nuclear (Figura 5B, en la parte inferior a la derecha).

Estos datos bioquímicos también se confirmaron a nivel citológico mediante tinción inmunohistoquímica de biopsias medulares de 10 pacientes con LMA NPMc+. En estas muestras, los anticuerpos monoclonales anti-NPM, que reconocen tanto la NPM normal como la mutada, identifican la NPM tanto en el núcleo como en el citoplasma (Figura 5E). En contraste, el anticuerpo Sil-C identifica exclusivamente una proteína NPM a nivel citoplasmático (Figura 5D). La especificidad de esta reacción se muestra claramente por el hecho de que: i) es completamente suprimido de la pre-incubación del anticuerpo Sil-C con el péptido utilizado como inmunógeno; ii) el anticuerpo Sil-C no colorea las muestras de biopsias de pacientes con LMA NPMc-, es decir que carecen de mutaciones de la NPM (Figuras 5F y 5G).

Estos resultados muestran que el anticuerpo Sil-C reconoce específicamente los mutantes de NPM y que los mutantes están restringidos exclusivamente en el citoplasma de células leucémicas que contienen mutaciones de NPM. La disponibilidad de anticuerpos específicos contra mutantes de NPM leucémicos abre nuevas perspectivas desde un punto de vista diagnóstico y terapéutico.

Desde un punto de vista diagnóstico, estos reactivos podrían ser empleados para el diagnóstico al principio y además para monitorizar la enfermedad mínima residual con técnicas de PCR cuantitativa (ver más adelante).

Desde un punto de vista terapéutico, es de suponer el uso de anticuerpos intracelulares ("intracuerpos") capaces de inhibir las proteínas de NPM mutadas leucémicas sin dañar la función de la proteína NPM fisiológica.

Ejemplo 3: Preparación de vacunas

Las vacunas pueden ser administradas en formulaciones reconocidas por "el receptor de linfocitos T" (células mononucleares de sangre periférica) o presentadas por las células de presentación de antígeno (por ejemplo, células dendríticas, linfocitos B, macrófagos).

En este contexto, el término “vacuna” significa cualquier sustancia o compuesto que sirve para inducir inmunidad anti-tumoral. Inmunidad anti-tumoral significa respuestas citotóxicas (linfocitos T), inducción de anticuerpos que reconocen células tumorales y producción de citocinas con actividad anti-neoplásica. La actividad anti-tumoral puede ser medida *in vitro* (citotoxicidad) o *in vivo* en modelos animales experimentales.

- 5 Es conocido que la eficacia de las vacunas anti-tumorales se incrementa cuando se utilizan varios polipéptidos, en combinación, que tienen diferentes estructuras. Por lo tanto, para ese fin las vacunas anti-LMA NPMc+ pueden contener diferentes polipéptidos de síntesis con diferente especificidad y secuencias, a condición de que induzcan el reconocimiento de células tumorales que contienen mutaciones del gen de la NPM.

- 10 La vacuna de esta divulgación puede ser conjugada con moléculas inmunogénicas conocidas universalmente como soportes. Puede contener, en su formulación, soluciones adecuadas para inóculo (suero salino fisiológico, diversas soluciones salinas) y excipientes.

Además, la vacuna puede contener o ser administrada con adyuvantes, es decir cualquier molécula con actividad inmunoestimulante. La administración del adyuvante puede ser realizada en cualquier punto de tiempo precediendo o a continuación del inóculo de la vacuna anti-tumoral.

- 15 La vacuna de la presente divulgación puede ser administrada por vía sistémica o local en una dosis única o múltiple.

La evaluación de la respuesta inmune se llevará a cabo de acuerdo a los métodos bien conocidos y descritos en la literatura científica. En particular, después del inóculo de la vacuna, los epítopos anti-génicos se presentan a linfocitos B y T mediante células de presentación de antígeno.

- 20 Por lo tanto, la determinación de respuestas citotóxicas puede ser realizada en linfocitos T tanto CD4+ como CD8+, y todas las poblaciones celulares capaces de inducir la citolisis o apoptosis (por ejemplo, neutrófilos, células NK). Específicamente, puede medirse la activación, (inmunofenotipo), habilidad de proliferación, (mediante métodos de incorporación de marcadores radiactivos), habilidad citotóxica en dianas oportunamente preparadas, y la habilidad para secretar citocinas (métodos ELISA, ELISPOT) de las mismas.

- 25 En cuanto a las respuestas de los anticuerpos, éstas pueden medirse *in vitro* o *in vivo* con experimentos de transferencia de suero e inhibición del crecimiento tumoral.

La eficacia *in vivo* en modelos animales puede ser medida de acuerdo a criterios de significancia estadística que verifica la respuesta anti-tumoral en grupos de control diseñados de manera oportuna.

Objeto de la evaluación será la supervivencia, medición de biomarcadores tumorales, inhibición del crecimiento de células tumorales, regresión de masas tumorales, reducción de la habilidad de inducción tumoral.

- 30 Ejemplo 4: Estudio del mecanismo de la acumulación citoplasmática de mutantes de la NPM

Los presentes solicitantes elucidaron el mecanismo molecular que conduce a la acumulación aberrante citoplasmática de NPM en la leucemia mieloide aguda NPMc+.

Materiales y métodos

Células para la transfección, muestras de LMA y línea celular OCI/AML3

- 35 Para experimentos de transfección, se utilizaron células NIH-3T3 y H1299. Se aislaron células leucémicas de 5 pacientes leucémicos (3 de los cuales portaban la mutación A de la NPM y 2 que portaban el gen de NPM de tipo silvestre), mediante separación por Ficoll-Hypaque y se utilizaron para estudios bioquímicos y análisis con microscopio confocal. Biopsias de la médula ósea (n=373) y granulado de blastos de sangre periférica (n=20), desde 393 pacientes con LMA del protocolo GIMEMA AML 99P y GIMEMA AML12/EORTC, fueron fijadas en B5 y se incluyeron en parafina. La línea celular OCI/AML3, que identificamos como la única que contiene la mutación A en el exón 12 del gen de NPM (entre 79 líneas humanas mieloides sometidas a ensayo) (Quentmeier et al., 2005), se cultivó en alfa-MEM con FBS al 10% más glutamina y antibióticos en concentraciones estándar.

Análisis mutacional del gen de NPM

- 45 Se realizaron estudios en células leucémicas de 393 pacientes de LMA adultos del protocolo GIMEMA AML99P y G1MEMA AML12/EORTC. La selección de casos para el análisis mutacional se realizó en base a la disponibilidad de material para la identificación inmunohistoquímica de NPM. Las mutaciones del exón 12 del gen de NPM se

analizaron con RT-PCR y secuenciación, tal como se ha descrito previamente o utilizando DHPLC (Wave™ System, Transgenomic Inc., Omaha, Nebraska; USA).

Construcción del plásmido

Los mutantes A, B, C, y D de la NPM fueron producidos mediante PCR utilizando NPMwt como modelo; se utilizó el mismo cebador directo (5' CGC CAC GCT AGC GAA GAT TCG ATG GAC) y un cebador inverso diferente para cada mutante (mutante A-5': CTA TTT TCT TAA AGA GAC TTC CTC CAC TGC CAG ACA GAG ATC TTG AAT AGC CTC TTG G; mutante B-5': CTA TTT TCT TAA AGA GAC TTC CTC CAC TGC CAT GCA GAG ATC TTG AAT AGC CTC TTG G; mutante C-5': CTA TTT TCT TAA AGA GAC TTC CTC CAC TGC CAC GCA GAG ATC TTG AAT AGC CTC TTG G; mutante D-5': CTA TTT TCT TAA AGA GAC TTC CTC CAC TGC CAG GCA GAG ATC TTG AAT AGC CTC TTG G). Los productos de las respectivas PCR se clonaron en pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), y se comprobaron con secuenciación de inserción. Para producir la doble etiqueta flag-HA N-terminal en plásmidos con wt NPM y mutación A, se realizó una PCR utilizando como modelo la NPM de tipo silvestre o mutante A; como cebador directo e inverso se utilizaron respectivamente 5' CGC CAC GCT AGC GAA GAT TCG ATG GAC y 5' TCA AGA ATT CCA GAA ATG AAA TAA GAC. El producto de la PCR fue digerido utilizando NheI y EcoRI, y el fragmento fue sub-clonado en el vector PCIN4, que contiene la etiqueta Flag-HA en el extremo N-terminal del fragmento. La precisión de las secuencias de Flag-HA-NPM-wt y Flag-HA-NPM-mutante A se confirmó mediante secuenciación.

Los mutantes E, G y R de NPM fueron producidos mediante el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange Fine (de Stratagene, La Jolla, CA), utilizando como modelo pEGFP-C1-A/PMwt, y de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los cebadores fueron diseñados en las siguientes secuencias:

NPM_MUT_E: 5'-GATCTCTGGCAGTCTCTTGCCCAAGTCTCTTTAAG-3';

NPM_MUT_G: 5'-GATCTCTGGCAGTGCTTCGCCCAAGTCTCTTTAAG-3';

NPM_MUT_R: 5'-GATCTCTGGCAGAGGATGGAGGAAGTCTCTTTAAG-3'.

Los plásmidos NPM_MUT_AA290W, NPM_MUT_A C288W+A290W, y eNPM_MUT_A_NO_NES fueron producidos utilizando pEGFP-C1-NPMmA como modelo, explotando la localización de los sitios de mutagénesis entre los sitios de corte de las enzimas BglIII y EcoRI. Al utilizar una pareja de cebadores complementaria, que contiene la mutación deseada y extremos que sobresalen compatibles con extremos producidos por la digestión con BglIII-EcoR, fue posible ligar la doble cadena de ADN producida por hibridación de los cebadores con el vector pEGFP-C1-NPMmA previamente digerido utilizando las dos enzimas de restricción anteriores. Las secuencias de los cebadores utilizados son:

NPM_MUT_A A290W_FOR:

5'-GATCTCTGTCTGTGGGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAGG-3';

NPM_MUT_A A290W_REV:

5'-AATTCCTATTTTCTTAAAGAGACTTCCTCCACCCACAGACAGA-3';

NPM_MUT_A C288W+A290W_FOR:

5'-GATCTCTGGCTGTGGGTGGAGG AAGTCTCTTTAAGAAAATAGG-3';

NPM_MUT_A C288W+A290W_REV:

5'-AATTCCTATTTTCTTAAAGAGACTTCCTCCACCCACAGCCAGA-3'

NPM_MUT_A_NO_NES_FOR:

5'-GATCTCTGTGGAGCAGGGGAGGAAGGCTCTTTAAGAAAATAGG-3';

NPM_MUT_A_NO_NES_REV:

5'-AATTCCTATTTTCTTAAAGAGCCTTCCTCCCCTGCTCCACAGA-3'.

Cada constructo fue verificado mediante secuenciación.

Inhibición de la exportación nuclear dependiente de CRM1

Las células H1299 fueron sembradas en la superficie de seis placas de pocillos 24 horas antes de la transfección. Se transfectaron 5 mg del vector de expresión para HA-NPM de tipo silvestre, GFP-NPM-mutante A, o ambos, fueron transfectados utilizando el método de precipitación con fosfato de calcio. Después de 24 horas, las células fueron tratadas con 20 nM de leptomicina B, un inhibidor específico de Crm1 (Sigma, St. Louis, MO, USA) durante 8 horas o no tratados, respectivamente. Las células se fijaron a continuación en paraformaldehído al 4% para el estudio de inmunofluorescencia.

Se transfectaron células NIH-3T3 utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después de 24 horas, se incubaron células cultivadas en la sección con cicloeximida (Merck Biosciences Ltd, Nottingham, RU) 10 microgramos/ml (30 minutos) y leptomicina B (Merck Biosciences Ltd, Nottingham RU) 20 ng/ml (5 horas), u otros inhibidores de Crm1 tales como ratjadon A y C (Alexis Biochemicals, Carlsbad, CA, USA) 20 ng/ml (5 horas).

Las células fueron fijadas en paraformaldehído al 4% (10 minutos) para análisis de inmunofluorescencia y microscopio confocal.

Para experimentos de "evolución temporal", se transfirieron células transfectadas dentro de una cámara Attofluor (Sondas Moleculares, Eugene, OR, USA) y se observaron utilizando un aparato confocal MRC-1024 (Biorad Cambridge, RU) ensamblado en un microscopio Olympus IMT-2. Las imágenes de una sección única se registraron antes y después de la adición de leptomicina B, en intervalos de 60 segundos, utilizando la función series de tiempo del programa Laser-Sharp (BioRad). La longitud de onda de excitación fue de 488 nm y las imágenes fueron detectadas utilizando un filtro de 505 a 550 nm en la PMT2.

Las imágenes fueron procesadas y analizadas utilizando el programa bien conocido ImageJ (Rasband WS, Image J, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2005).

Para los análisis de western-blot de la distribución sub-celular de la proteína GFP-NPM mutante A, células NIH-3T3 transfectadas con el vector GFP o con GFP-NPM mutante A, según se describe anteriormente, fueron incubadas con leptomicina B 20 ng/ml (o con metanol como control) sin cicloeximida durante 3 o 6 horas. A continuación las células fueron cosechadas, se lavaron con PBS y se lisaron en tampón hipotónico, de acuerdo con el método de Schreiber et al. (1989). El sobrenadante se conservó como una fracción citoplasmática. El granulado, que contenía núcleos, se lavó nuevamente con el tampón hipotónico, a continuación se solubilizó en un tampón hipertónico y se llevó a ebullición en una solución con SDS antes de la carga.

Diluciones equivalentes (con el mismo número de células) de fracciones citoplasmáticas y nucleares se cargaron, se transfirieron en nitrocelulosa y se incubaron con un anticuerpo monoclonal anti-GFP (Roche, Indianapolis, IN, USA) para análisis Western-blot de la distribución de la GFP-NPM mutante A.

Las células que se obtienen a partir de dos pacientes con LMA NPMc+ (que portan la mutación A) y de la línea celular OCI/AML3 se cosecharon en un medio (10^6 células/ml en placas de 24 pocillos), y se incubaron a 37°C con CO₂ al 5% durante 5 horas. Después de la incubación durante toda la noche con leptomicina B (20 ng/ml), las células se lavaron con PBS y se centrifugaron. El granulado de células se fijó en B5 y parafina para la inmunotinción.

Procedimientos de inmunotinción

La tinción DAPI se utilizó para visualizar los núcleos de células H1299 transfectadas con GFP-NPM-mutante A y con GFP-NPM wt. Para los constructos Flag-HA, las células fijadas se volvieron permeables con 0,2% de Triton-X 100 (10 minutos) seguido del bloqueo con suero anti-cabra al 10% (30 minutos). A continuación, se añadió el anticuerpo anti-HA (1:1000, Roche Indianapolis, In, USA) durante 1 hora seguido de la incubación durante 30 minutos con el anticuerpo secundario Alexa-568 (1:1000, Molecular Probes, Oregon, USA). Las imágenes se tomaron utilizando una cámara digital con el programa Spot 4.09 (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI, USA).

Los núcleos de las células NIH 3T3 transfectadas con GFP-NPMwt y GFP-NPM mutante A se colorearon con yoduro de propidio. La tinción con nucleolina (C23) de las células NIH-3T3 se llevó a cabo con el anticuerpo anti-nucleolina adquirido de DakoCytomation (Glostrup, Denmark), seguido de un anticuerpo secundario conjugado con rojo Texas (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL); los núcleos fueron contra-coloreados con TO-PRO-3 (Molecular Probes, Oregon, USA).

La coloración de la NPM de las secciones incluidas en parafina de los casos de LMA que contienen la mutación A, se llevó a cabo con anticuerpos monoclonales anti-NPM, seguido por un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488 (Molecular Probes, Oregon, USA); los núcleos fueron contra-coloreados con yoduro de propidio. Las imágenes se tomaron con un microscopio confocal Zeiss LSM 510 (Carl Zeiss, Jena, DE), utilizando longitudes de onda de

excitación láser a 488 nm (para Alexa 488), 543 nm (para rojo Texas y yoduro de propidio) y 633 nm (para TO-PRO-3), respectivamente. El ajuste de la intensidad del láser, diámetro de los orificios de abertura, y la configuración de la detección de luz se ajustaron para lograr la mejor relación señal/ruido y evitar un entrecruzamiento de la fluorescencia. Las imágenes se transfirieron a continuación a una estación de trabajo SGI Octane (Silicon graphics, Mountain View, CA, USA) para su elaboración adicional; la reconstrucción en 3D se realizó con el método de sombras o iso-superficie, utilizando el programa Imaris (Bitplane, Zurich, CH).

El estudio de secciones de NPM incluidas en parafina utilizando el método de la fosfatasa alcalina se realizó para 393 pacientes, tal como se ha descrito previamente. Las muestras fueron clasificadas como NPM citoplasmático o nuclear, sin saber los resultados de los análisis mutacionales.

Extractos celulares, Western Blot, y co-inmunoprecipitación

Los extractos citoplasmáticos y nucleares se prepararon de acuerdo al método de Schreiber et al. (1989). Para los experimentos de co-inmunoprecipitación, las células fueron lisadas en 1 ml de tampón de lisis helado (1% NP-40, 150 mM NaCl, 25 mM Tris, pH 7,5, 1 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄ 1 µg/ml leupeptina, 1 µg/ml aprotinina y 1 mM de PMSF). Después de 20 minutos de incubación en hielo, los productos lisados se centrifugaron a 14.000 x g durante 10 minutos 4°C y se incubaron con 4 µg de un IgG de control no específico, o un anticuerpo anti-NPM de conejo policlonal específico, denominado Sil-C, o anti-NPM de ratón monoclonal (Clone 376), respectivamente, y 30 µl de la proteína A/G Plus-perlas de agarosa (Saint Cruz Biotechnology, Inc.) en incubación durante la noche a 4°C. Las perlas se lavaron a continuación al menos tres veces con el tampón de lavado (0,1% NP-40, 150 mM NaCl, 25 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA e inhibidores). Las proteínas se separaron sobre gel SDS-de poliácridamida (SDS-PAGE) y se transfirieron en una membrana PVDF (Millipore), en la que se incubaron con anticuerpos primarios, a saber anticuerpo policlonal de conejo anti-Crm1 (Saint Cruz Biotechnology, Inc.) o un anticuerpo monoclonal anti-Crm1 (BD Transduction Laboratories); respectivamente; después de la incubación con un anticuerpo secundario conjugado con HRP, los péptidos reconocidos en el análisis Western blot fueron detectados utilizando el método ECL de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Amersham Bioscience).

Resultados

El análisis de 40 mutaciones del gen de NPM hasta ahora identificadas en miles de pacientes leucémicos (Figura 6), muestra que, a pesar de su homogeneidad genética, todas las mutaciones determinan algunas alteraciones comunes a nivel de la parte carboxiterminal de las correspondientes proteínas mutadas.

La Figura 6 muestra los cambios en los triptófanos 288 y 290 y la creación de un motivo NES en 40 proteínas NPM mutantes identificadas en pacientes leucémicos; la frecuencia de mutación (%) está presente solamente en 393 casos de LMA estudiados aquí para los que estaban disponibles, además de los datos moleculares, también los resultados de la tinción inmunohistoquímica (IH). Las alteraciones son de dos tipos: i) la mutación de ambos triptófanos 288 y 290 (o únicamente 290) y ii) la creación de un nuevo motivo denominado NES ("motivo de señal de exportación nuclear). NES es una estructura proteica que es específicamente reconocida por Crm1 (o Exportina 1), la proteína fisiológicamente delegada al transporte de otras proteínas desde el núcleo al citoplasma. Desde un punto de vista molecular, el motivo NES se define como una secuencia de aproximadamente 10 aminoácidos del tipo YxxxYxxYxY donde Y indica un aminoácido hidrofóbico de leucina, isoleucina, metionina, valina o fenilalanina y x es equivalente a otros aminoácidos. En el NES, los aminoácidos hidrofóbicos Y están separados por intervalos precisos (variando de 1 a tres espacios), donde el espaciado está representado por otros aminoácidos que, en el esquema, están indicados con la letra x.

El tipo de NES puede variar entre cada mutante de NPM. El tipo y la frecuencia de NES en los diversos mutantes de NPM leucémicos se ilustran en la Figura 6. El motivo NES más frecuente, encontrado en aproximadamente un 65% de mutantes, se denomina LxxxVxxVxL (donde L=leucina, V=valina y x es equivalente a otros aminoácidos). El restante 35% de las proteínas NPM mutantes contiene variantes de NES menos frecuentes, en las que la valina en la segunda posición de NES es reemplazada con otro aminoácido hidrofóbico. Ejemplos de este tipo, ilustrados en la figura 6, son los NES de tipo LxxxLxxVxL, LxxxFxxVxL, LxxxMxxVxL, LxxxCxxVxL (donde L=Leucina; V=Valina; F=Fenilalanina; M=Metionina; C=Cisteína; y x es equivalente a otro aminoácido). *Relación entre el tipo de NES y las mutaciones de los triptófanos en la posición 288 y 290*

A partir de la Figura 6 puede deducirse que el triptófano en la posición 290 está mutado en todos los 40 mutantes de NPM leucémicos. Por el contrario, 13 de los 40 mutantes (32,5%) conservan el triptófano en la posición 288. Un análisis cuidadoso de las estructuras proteicas de los 40 mutantes indica claramente que existe una relación entre el tipo de NES y las mutaciones a nivel de triptófanos 288 y 290 (Figura 6 y tabla 3). En particular, se muestra cómo el motivo NES más frecuente, (es decir, el tipo LxxxVxxVxL) está siempre asociado a mutaciones en ambos triptófanos 288 y 290, mientras que el triptófano 288 está conservado únicamente en las proteínas mutantes de NPM que contienen una variante de NES del tipo indicado anteriormente, es decir aquellos en los que la valina en la segunda posición de NES es reemplazada con otro aminoácido hidrofóbico (Figura 6 y Tabla 3). La Tabla 3 muestra la

correlación entre el motivo NES y los triptófanos 288 y 290 en 40 proteínas mutantes de NPM de pacientes leucémicos.

Tabla 3

Variante NES	Motivo	Mutantes de NPM (n=)	MutW (288)	MutW (290)
1	L- XXX-V-XX-V-X-L	26/40	26/26	6/2
2	L- XXX-L-XX-V-X- L	6/40	1/6*	6/6
3	L- XXX-F-XX-V-X-L	3/40	0/3	3/3
4	L- XXX-M-XX-V-X-L	2/40	0/2	2/2
5	L- XXX-C-XX-V-X-L	2/40	0/2	2/2
6	L-XXX-F-XXX-L-FKKIV	1/40	0/1	1/1

* La mutación Q de la Figura 6 causa una mutación de ambos triptófanos 288 y 290 en presencia de la variante 2 de NES (L-xxx-l-xx-v-x-l); mutW: triptófano mutado.

- 5 El motivo NES más común es la variante 1; las otras variantes de NES (tipo 2-6) son menos frecuentes y se diferencian de la variante 1 por la presencia, en el lugar de la Valina (V) en la segunda posición de NES, de una Leucina (L), Fenilalanina (F), Metionina (M), o Cisteína (C).

La expresión citoplasmática de mutantes de NPM es un evento dependiente de NES

- 10 El hecho de que todos los mutantes de NPM contienen un nuevo motivo de NES en su parte carboxilo-terminal sugiere que la eliminación citoplasmática de la NPM puede ser el resultado de un transporte activo de mutantes de NPM por parte del Crm1, el receptor delegado para el transporte de proteínas del núcleo al citoplasma.

Los autores han realizado algunos experimentos para verificar si el transporte núcleo-citoplasma de los mutantes de NPM leucémicos se altera de alguna manera, en presencia de sustancias que, como ya es conocido, inhiben la actividad de Crm1/Exportina 1, además de la Leptomomicina B o los Ratjadon.

- 15 Los resultados de los experimentos son claros. La figura 7 muestra cómo la exportación nuclear de los mutantes de NPM es dependiente de NES. Bajo condiciones basales, las células HI299 o NIH3T3c transfectadas con ADNc que codifica las proteínas mutantes NPM marcadas muestran la prevista localización citoplasmática aberrante de los mutantes. En contraste, en presencia de Leptomomicina B (LMB), las proteínas mutantes NPM son re-localizadas del compartimento citoplasmático al nuclear (nucleoplasma) (paneles 7A y 7B). La Figura 7C-E muestra el análisis en diferentes puntos de tiempo de los efectos de la LMB en el mutante A asociado a eGFP (eGFP-NPMmutA) en células NIH-3T3: la adición de LMB da como resultado una reducción de la fluorescencia en el citoplasma y en el área de Golgi y un aumento concomitante de la fluorescencia en el nucleoplasma.

Aproximadamente un 50% del mutante tipo A (el más común) se re-localiza en el núcleo en 20 minutos y el proceso se completa en 1 hora (paneles C-D).

- 25 El análisis de Western-blot de la distribución sub-celular del mutante de NPM tipo A, enlazado a GFP en células N1 H-3T3 tratadas con Leptomomicina B, confirmó que, en el tiempo, el mutante A de la proteína GFP-NPM (peso molecular 64 kDa), al contrario que la proteína GFP (peso molecular 27 kDa), se acumula progresivamente en el granulado que contiene núcleos (Figura 7E). Por el contrario, en células NIH-3T3 sin tratar, ambas proteínas GFP-NPM y GFP se encuentran, tal como se esperaba, únicamente en la fracción citoplasmática. De hecho, el
- 30 tratamiento con LMB induce una acumulación dependiente del tiempo de eGFP-NPMmutA en las fracciones del granulado (P). La pureza de las fracciones sub-celulares se midió mediante eliminación del anticuerpo y transferencia con una anticuerpo anti- β -tubulina (panel inferior Figura 7E). Se midió una contaminación no significativa para las proteínas sobre-expresadas (como queda claro en la transferencia de GFP) (panel central). En células no tratadas, la eGFP-NPMmutA se encontró únicamente en las fracciones citoplasmáticas (C). El
- 35 experimento se realizó en ausencia de dicioeximida, de manera que la continua presencia de GFP-NPMmA en las fracciones citoplasmáticas durante el tratamiento con LMB se ha mostrado en el tiempo.

- 40 El análisis con microscopio confocal de células transfectadas con varios constructos de NPM-EFG muestra claramente que los mutantes de NPM, después del tratamiento con leptomomicina B, se re-localizan en el núcleo y, específicamente, en el nucleoplasma (Figura 8A, parte superior), más que en los nucléolos, que es el lugar en el que se localiza fisiológicamente la proteína NPM de tipo silvestre (Figura 8A, centro). La re-localización nucleoplasmática

de los mutantes mediante la Leptomycin B se muestra también a través de doble tinción en el microscopio confocal que destaca la presencia de una exclusividad mutua entre los lugares de localización del mutante de NPM, desplazado en el nucleoplasma, y la nucleolina (C23) que, tal como es de esperar, se expresa de manera selectiva a nivel nucleolar (Figura 8A, parte inferior).

- 5 La re-localización nucleoplasmática de la NPM después del tratamiento con inhibidores de Crm1 también se confirmó en células de pacientes con LMA NPMc+ (Figura 8B).

Un efecto idéntico de los inhibidores de Crm1 en el mutante también se observó en la línea mieloide OCI-AML3 humana que incluye la mutación de NPM de tipo A (Figura 9A). En estas células, mediante experimentos de co-precipitación se mostró también una interacción física directa entre la proteína NPM mutada y el Crm1 (Figura 9B).

- 10 El papel fundamental desempeñado por el motivo NES en el proceso de expulsión de los mutantes de NPM del núcleo, y su consecuente acumulación en el citoplasma, se muestra también mediante experimentos de mutagénesis dirigida al sitio. De hecho, la sustitución en el mutante de NPM de tipo A de dos valinas de NES por dos glicinas (NPM mutA no-NES), hace desaparecer la habilidad del mutante de ser exportado desde el núcleo al citoplasma (Figura 10).

- 15 *La acumulación citoplasmática de los mutantes depende de la acción coordinada de NES y las mutaciones de los triptófanos 288 y 290*

- El papel de los dos triptófanos 288 y 290 en la acumulación citoplasmática de NPM fue evaluada utilizando mutantes de NPM naturales (procedentes de pacientes leucémicos) y mutantes de NPM construidos mediante mutagénesis dirigida al sitio. Para evaluar el efecto en el enlace nucleolar de una única mutación a nivel del triptófano 290, utilizamos el mutante leucémico natural del tipo E que, como se ilustra en la figura 6, mantiene el triptófano 288. A continuación del tratamiento con Leptomycin B, el mutante de NPM de tipo E se relocaliza a nivel nuclear. Sin embargo, al contrario que lo observado con el mutante A, la relocalización ocurre no solamente en el nucleoplasma, sino también a nivel del nucléolo (Figura 10). Una distribución del compartimento nuclear muy similar a la del mutante E, se observa también con un constructo artificial del mutante de NPM de tipo A, en el que el triptófano mutado en la posición 290 fue re-introducido mediante mutagénesis dirigida al sitio (A290W). Cuando ambos triptófanos 288 y 290 son re-introducidos en el mutante A (C288W + A290W), la proteína mutante, a pesar de la presencia de NES, se localiza completamente en los nucléolos, independientemente de la presencia de Leptomycin B. Los resultados de estos experimentos se ilustran en la Figura 10.

- 30 Estas observaciones muestran claramente que los triptófanos 288 y 290 contribuyen de forma significativa a la expulsión nuclear de mutantes mediada por NES. En conclusión, para que la acumulación citoplasmática aberrante de NPM tenga lugar, es necesario que NES y las mutaciones de dos triptófanos (o únicamente del triptófano 290) actúen en combinación. En otras palabras, es imposible que se presente una acumulación citoplasmática de los mutantes de NPM cuando sólo está presente NES en ausencia de mutaciones de los dos triptófanos 288 y 290 (o únicamente del triptófano 290), o viceversa.

- 35 *Los mutantes de NPM deslocalizan la proteína NPM de tipo silvestre desde su lugar fisiológico (núcleolo) al citoplasma*

Debido a que todas las proteínas NPM mutadas leucémicas conservan el dominio de dimerización en la región N-terminal, se puede plantear la hipótesis de que pueden formar heterodímeros con la proteína NPM de tipo silvestre, como entre las proteínas de fusión (NPM-ALK y NPM-MLF1) y la misma proteína NPM de tipo silvestre.

- 40 La Figura 11A muestra que, mediante el mecanismo de heterodimerización, los mutantes son capaces de enlazar y deslocalizar la proteína NPM de tipo silvestre en el citoplasma. De hecho, mediante co-transfección de células H1299 con vectores que codifican (tipo silvestre)-HA NPM y (mutante A)-eGFP NPM, se observa que la proteína mutante y de tipo silvestre se co-localiza en el citoplasma. Aproximadamente un 30% de células fueron transfectadas y para aproximadamente un 70% de estas, el mutante de NPM causa un reclutamiento parcial de la forma de tipo silvestre de NPM de los nucléolos al nucleoplasma y citoplasma. Estos resultados se confirman también mediante experimentos de co-precipitación de la NPM de tipo silvestre (marcada con HA) y NPM mutante (marcada con Flag) (Figura 11B). Para transfectar células H1299, se utilizaron plásmidos que codifican FH-NPMwt y FH-NPM mutante A. En el panel de la izquierda de la Figura 11B, un 5% de la totalidad de las células lisadas obtenidas a partir de células transfectadas de manera estable con FH-NPMwt, FH-NPM mutante A o células de control H1299, fueron sometidas a análisis con Western blot con α -NPM o α -HA. En el panel de la derecha, el 95 % restante de las células lisadas fueron inmuno-precipitadas con un anticuerpo anti-Flag (M2), y utilizadas para un Western blot con α -NPM o α -HA.

El posible mecanismo alterado del transporte restringido núcleo-citoplasma de NPM mutantes y de tipo silvestre se encuentra esquematizado en la Figura 11C.

Inmunoquímica para predecir todas las mutaciones a nivel del exón 12 del gen de NPM

Tal como se ha ilustrado anteriormente, el mecanismo responsable de la acumulación de proteínas mutantes de NPM en el citoplasma de células leucémicas, depende de las mutaciones de los triptófanos 288 y 290 y la creación de NES. Debido a que estas alteraciones se encuentran presentes en todos los mutantes de NPM identificados hasta ahora, se plantea la hipótesis de que la tinción inmunohistoquímica con anticuerpos anti-NPM es capaz de predecir, demostrando la deslocalización citoplasmática de la NPM, todas las mutaciones que tienen lugar a nivel del exón 12 del gen de NPM.

Para verificar esta hipótesis, hemos comparado la expresión sub-celular de la proteína NPM (nuclear vs citoplasmática) con el estado mutacional del gen de NPM. El estudio se realizó en 393 pacientes con LMA del protocolo GIMEMA AML99P/AML 12 EORTCs. Los resultados obtenidos muestran claramente que la presencia de una positividad citoplasmática para NPM es predictiva con una especificidad absoluta de mutaciones a nivel del exón 12 de la NPM (Tabla 4).

Tabla 4

LMA (N=373)	Localización de la proteína NPM*	Mutaciones del gen de NPM (Exón 12)
191	Citoplasmática	191/191
202	Nuclear	0/202
*Determinada en secciones incluidas en parafina con anticuerpos anti-NPM monoclonales		

La prueba inmunohistoquímica puede ser utilizada para un propósito de diagnóstico, tal como se indica en la Figura 12. La prueba es rápida, económica, fácilmente interpretable, sumamente sensible y específica. Por todas estas razones, podría utilizarse como primera etapa en la caracterización molecular de las LMA. De hecho en las LMA NPMc+ no es necesario realizar análisis citogenético, FISH y análisis molecular, para las alteraciones cromosómicas de mayor importancia, tales como t(15;17), t(8;21), inv16, t(6;9) y 11 q23/MLL ya que son cada una exclusivas con la positividad citoplasmática para NPM. Por el contrario, en las LMA NPMc, estos análisis son obligatorios. La citogenética ayuda para la identificación de translocaciones poco frecuentes con un impacto pronóstico potencial en el 14% de LMA NPMc+ con anomalías cromosómicas menos importantes. Las mutaciones del gen FLT3 deberían buscarse en todos los pacientes de LMA (independientemente de la NPM), ya que su correlación con la expresión sub-celular de NPM puede ayudar a identificar nuevos sub-grupos de pronóstico en LMA de cariotipo normal (Schnittger et al., 2005; Dohner et al., 2005; Verhaak et al., 2005). El uso de la inmunohistoquímica para identificar las mutaciones de NPM tiene también una importancia clínica, porque la distribución citoplasmática de NPM y las mutaciones génicas son predictivas de una buena respuesta a la terapia de inducción, y un mejor pronóstico a largo plazo, en comparación con casos de leucemia aguda con cariotipo normal sin mutación del gen de NPM (LMA NPMc-) (Schnittger et al., 2005; Dohner et al., 2005; Verhaak et al., 2005).

Los datos ilustrados anteriormente explican el mecanismo a través del cual las mutaciones específicas del exón 12 del gen de NPM alteran el transporte núcleo-citoplasma de las proteínas NPM mutadas y de tipo silvestre. El mecanismo es idéntico tanto en células transfectadas como en células leucémicas de pacientes con LMA NPMc+ y en la línea leucémica OCI/AML3 humana. En particular, las mutaciones conducen a dos cambios fundamentales en la región carboxilo-terminal de los mutantes de NPM: 1) se produce un NES que potencia la expulsión de las proteínas mutantes por parte del Crm1; y 2) los dos triptófanos 288 y 290 (o únicamente el triptófano 290) se pierden, los cuales, bajo condiciones normales, son esenciales para el enlace de la proteína NPM a los nucléolos.

El análisis de secuencias primarias de la proteína NPM de tipo silvestre, permitió detectar un NES fisiológico hipotético de tipo LxxPxxLxL, que está localizado en la zona entre los residuos 94 y 102 de la NPM (Wang et al., 2005). A pesar de la presencia de este NES, la proteína NPM de tipo silvestre, bajo condiciones fisiológicas, se localiza principalmente en los nucléolos y esto sugiere que el fragmento de la proteína NPM que es normalmente expulsado del núcleo hacia el citoplasma, a través del NES fisiológico, es decididamente inferior al de la misma proteína que, mediante dos NLS ("señales de localización nuclear"), es capaz de regresar desde el citoplasma al núcleo. Debido a que los mutantes de NPM de tipo silvestre artificiales humanos y murinos sin los dos triptófanos 288 y 290 (diferentes con respecto al mutante de NPM de tipo A leucémico únicamente por la carencia del NES C-terminal), se localizan exclusivamente en el nucleoplasma (Nishimura et al., 2002), es muy probable que el NES adicional, creado por la mutación a nivel de la región C-terminal, confiera al mutante de NPM leucémico una mayor habilidad para ser exportado hacia el exterior del núcleo; esto podría deberse al efecto aditivo y/o aumentado de la afinidad con Crm1 del segundo NES.

Aunque ambos, 288 y 290, cumplen una función en la localización nucleolar de la NPM, el triptófano 290 podría ser más importante, ya que se encuentra constantemente alterado en todos los mutantes de NPM leucémicos

identificados hasta ahora. La mutación de los dos triptófanos permite la máxima inhibición del enlace nucleolar y la deslocalización nucleoplasmática de mutantes a ser lograda en células NPMc+ leucémicas. De gran importancia es la observación de que el motivo NES que se encuentra más comúnmente en los mutantes de NPM (LxxxVxxVxL) está siempre asociado a las mutaciones de ambos triptófanos. En contraste, el triptófano 288 parece ser mantenido únicamente en aquellos mutantes de NPM que incluyen variantes menos comunes de NES, a saber los caracterizados por la presencia de leucina, fenilalanina, cisteína o metionina en la segunda posición de NES, en lugar de valina (Tabla 3). Estas dos observaciones indican una probable diferencia funcional entre los NES de la región C-terminal de mutantes de NPM leucémicos.

Los resultados de nuestros estudios muestran también inequívocamente que la acumulación citoplasmática aberrante de mutantes puede ocurrir únicamente debido a la acción coordinada de NES y triptófanos mutados. Es posible que la acumulación anómala de mutantes de NPM tenga lugar de acuerdo con el siguiente mecanismo: i) las proteínas NPM leucémicas mutadas que conservan las señales de localización nuclear (NLS), se introducen en el núcleo; ii) su habilidad para unirse a los nucléolos es completamente inhibida cuando los triptófanos son mutados, o parcialmente inhibidos cuando únicamente el triptófano 290 es alterado, dando como resultado la acumulación de mutantes en el nucleoplasma; iii) los mutantes nucleoplasmáticos son capturados por el Crm1 que determina la rápida expulsión de los mismos al citoplasma, donde se acumulan progresivamente.

La explicación del mecanismo de transporte alterado de la NPM en la leucemia NPMc+ sugiere, como posible área de intervención terapéutica, la "relocalización" de mutantes de NPM leucémicos y proteína NPM de tipo silvestre en sus sitios fisiológicos, mediante el uso de inhibidores de Crm1 o moléculas sintéticas pequeñas que interfieren con el enlace NPM mutante-Crm1, o proteína NPM de tipo silvestre u otras moléculas capaces de interactuar con NPM (ARF, etc.).

Ejemplo 5: Desarrollo de un sistema de PCR cuantitativa para la evaluación y monitorización de la Enfermedad mínima residual

Diversas mutaciones de NPM 1 heterocigóticas sugieren la necesidad de un sistema específico a la mutación para la monitorización de la enfermedad. En el desarrollo del sistema merece la pena considerar que las dos mutaciones más frecuentes, denominadas mutación A y B, incluyen aproximadamente un 95% de todos los casos mutados.

Materiales y métodos

Un método de evaluación específica utiliza un cebador directo diseñado en el exón 11 (cNPM1-F:5'-5'-GAAGAATTGCTTCCGGATGACT-3'), una sonda en la unión exón 11/exón 12 (c.Sonda:5'-FAM-ACCAAGAGGCTATTCAA-MGB-3') y cebadores inversos específicos de la mutación (cNPM mut.A-R:5'-CTTCCTCCACTGCCAGACAGA-3' y cNPM mut.B-R:5'-TTCCTCCACTGCCATGCAG-3'). El cebador directo y la sonda son los mismos, independientemente de las diferentes mutaciones (Figura 13).

La etapa 1 = Reacción de retro-transcripción de acuerdo con el protocolo EAC (Gabert et al., Leukaemia 2003).

La etapa 2 = Reacción de amplificación utiliza una mezcla que contiene 12,5 µl of Taq Man universal PCR Master Mix (Applied Biosystem), 300 nM de cebadores, 200 nM de sonda y 5 µl de ADNc en un volumen total de 25 µl. Condiciones: 2 minutos a 50°C (activación enzimática UNG), 10 min a 95°C (inactivación enzimática UNG y activación AmpliTaq polimerasa) seguido de 50 ciclos a 95°C durante 15 segundos, a 62°C durante 1 minuto para la mutación A y a 59°C durante 1 minuto para la mutación B. Como control de ARN cuantitativo y cualitativo puede amplificarse el gen ABL. El ajuste para el análisis del instrumento (Sistema de detección de secuencias ABI PRISM 7700, de Applied Biosystem) incluye un "umbral" de 0,1 con una "línea de referencia" de 3 a 15 tanto para ABL como NPM. La sensibilidad y especificidad del sistema se analizan utilizan diluciones secuenciales, en un factor de 10, mezclando el ARN extraído de células leucémicas medulares con una mutación de la NPM de tipo A o B y ARN obtenido de un pool de células medulares de pacientes sin mutaciones de NPM (verificado mediante secuenciación).

El gráfico estándar de evaluación cuantitativa absoluta para la mutación A se construye utilizando un constructo plasmídico. Tal constructo consiste en un vector plasmídico pCRII-TOPO, (Invitrogen, Groningen, Netherlands) más una parte del gen de NPM1 que contiene la mutación A. La amplificación de la mutación A se obtiene mediante RT-PCR con los cebadores NPM1_390_F (5'-GTCTTAAGGTTGAAGTGTGGT-3') y NPM1_1043_R (5'-TCAACTGTTACAGAAATGAAATAAGACG-3').

El plásmido es preparado en cinco diluciones secuenciales: 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 copias. Los resultados de la RQ-PCR para la mutación A normalizados en los transcriptos ABL, se expresan como un número de copias de NPM con mutación A cada 104 copias de ABL.

La "sensibilidad máxima reproducible", de acuerdo con las directrices sobre la enfermedad mínima residual definidas por el Grupo de estudios Europeos (van der Velden VHJ et al, 2003), se define como la dilución más baja en la que

5 todas las réplicas son positivas dentro de un Ct (Umbral de ciclo) de 1,5, y el Ct de las réplicas es al menos 3,0 Ct menor que el valor de fondo más pequeño. La "máxima sensibilidad" se define como una dilución mínima en la que al menos una muestra es positiva y al menos 1,0 Ct menor que el Ct más pequeño de fondo. Con estas definiciones, un resultado se define como "positivo, no cuantificable" en presencia de amplificación en 1 de 2 réplicas por debajo del máximo de sensibilidad reproducible, pero aun así 1,0 Ct menor que el valor de fondo más pequeño.

Resultados

La sensibilidad y especificidad de la PCR "inversa cuantitativa" (RQ-PCR) se sometieron a prueba en la dilución en serie de 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 copias de plásmidos. Los valores del Ct (Umbral del ciclo) y el "gradiente" del gráfico para el plásmido se muestran en la siguiente figura.

10 Los gráficos de plásmidos estándar muestran un "gradiente medio" de -0,38 y una "intercepción" de $39,5 \pm 0,45$ Ct. El coeficiente de correlación es elevado ($>0,99$ en todos los experimentos) y demuestra la identificación precisa de la presencia de copias de la mutación A en muestras desconocidas. La sensibilidad máxima reproducible de la RQ-PCR corresponde a 10 moléculas de plásmidos (Figura 14).

15 Se realizaron diluciones secuenciales en base a un factor de 10 para simular la sensibilidad y reproducibilidad de la RQ-PCR en la monitorización de la enfermedad mínima residual en 5 pacientes diagnosticados como afectados por (leucemia mieloblástica aguda) LMA NPMc+ (4 pacientes con mutación A y 1 con mutación B).

El ARN extraído de las células leucémicas medulares con mutación de la NPM de tipo A o B se diluyó con ARN obtenido a partir de un pool de células medulares de pacientes sin mutaciones de NPM.

20 La sensibilidad máxima reproducible igual a 10^{-4} se observó en todos los 5 pacientes con mutaciones A o B, mientras que la sensibilidad máxima fue de 10^{-6} en la muestra con la mutación de tipo B y en 3 de 4 muestras con mutación de tipo A. La sensibilidad máxima igual a 10^{-5} se observó en una de las muestras con mutación A. La amplificación de fondo se observó en un caso y en valores de Ct muy altos ($Ct > 48$), lo que muestra la elevada especificidad del sistema (Figura 15).

25 Utilizando el gráfico de calibración plasmídica 13 pacientes afectados con LMA con mutación de NPM de tipo A se analizaron en el diagnóstico y después del tratamiento de inducción.

30 Los resultados fueron expresados como "número de copias de NPM1 Mut.A/10000 copias de ABL." En el diagnóstico, todas las muestras mostraron >30000 copias. Después del tratamiento de inducción el número de copias disminuye notablemente en 10 pacientes que evidenciaban remisión hematológica completa. En 5 pacientes el número de copias alcanzada fue de <70 , mientras que en los otros 5 pacientes se situó en un rango entre 580 y 5046. No se evidenció ninguna o sólo una pequeña disminución del número de copias en 3 casos: 2 remisiones completas y 1 remisión parcial (Figura 16).

En 3 pacientes afectados con LMA con mutaciones del gen NPM1 de tipo A, el sistema anteriormente mencionado fue utilizado para monitorizar la enfermedad mínima residual tanto durante la terapia como en el seguimiento.

35 La RQ-PCR específica del ADNc mostró un número de copias <10 después del primer o el segundo ciclo de la terapia de consolidación. Se observó una cinética diferente en la disminución del número de copias en las tres muestras tal como se muestra en la Figura 17. Un número pequeño pero persistente de copias mutadas está asociado con la remisión hematológica en un paciente (cuadrado). En uno de los casos restantes el número de copias mutadas disminuye notablemente después del tratamiento de consolidación (rombos); tal disminución es menos pronunciada en el segundo paciente (triángulos). En los últimos dos pacientes el número de copias aumenta nuevamente y en ambos casos tiene lugar una recaída hematológica (Figura 17).

En conclusión, el sistema tiene las mencionadas características de sensibilidad, especificidad y reproducibilidad como para ser utilizado en pruebas clínicas.

BIBLIOGRAFÍA

- Grimwade D, Walker H, Oliver F, et al. Blood 1998; 92:2322-33.
- 45 - Schnittger S, Schoch C, Dugas M, et al. Blood 2002; 100:59-66.
- Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, et al. Blood 2002; 100:4325-36.
- Bullinger L, Dohner K, Bair E, et al. N Engl J Med 2004; 350:1605-16.

- Valk PJ, Verhaak RG, Beijen MA, et al. N Engl J Med 2004; 350:1617-28.
- Frohling S, Schlenk RF, Breittruck J, et al. Blood 2002; 100:4372-80.
- Pabst T, Mueller BU, Zhang P, et al. Nat Genet 2001; 27:263-70.
- Steudel C, Wermke M, Schaich M, et al. Genes Chromosomes Cancer 2003; 37:237-51.
- 5 - Carnicer MJ, Nomdedeu JF, Lasa A, et al. Leuk Res 2004; 28:19-23.
- Christiansen DH, Pedersen-Bjergaard J. Leukaemia 2001;15:1848-51. Falini B., et al. N Engl J Med 2005; 352:254-66.
- Cordell JL, Pulford KA, Bigema B, et al. Blood 1999; 93:632-42.
- Borer RA, Lehner CF, Eppenberger HM, Nigg EA. Cell 1989; 56:379-90.
- 10 - Dumbar TS, Gentry GA, Olson MO. Biochemistry 1989; 28:9495-501.
- Okuda M, Horn HF, Tarapore P, et al. Cell 2000; 103:127-40.
- Gabert J, Beillard E, van der Velden VHJ, et al. Leukaemia 2003; 17:2318-2357.
- Bertwistle O, Sugimoto M, Sherr CJ. Mol Cell Biol 2004; 24:985-96.
- Colombo E, Marine JC, Danovi O, Falini B, Pelicci PG. Nat Cell Biol 2002; 4:529-33.
- 15 - Kurki S, Peltonen K, Latonen L, et al. Cancer Cell 2004; 5:465-75.
- Grisendi S., et al. Nature 2005; 437:147-53.
- Morris SW, Kirstein MN, Valentine MB, et al. Science 1994; 263:1281-4.
- Redner RL, Rush EA, Faas S, Rudert WA, Corey SJ. Blood 1996; 87:882-6.
- Yoneda-Kato N, Look AT, Kirstein MN, et al. Oncogene 1996; 12:265-75.
- 20 - Falini B, Pileri S, Zinzani PL, et al. Blood 1999; 93:2697-706.
- Falini B, Mason DY. Blood 2002;99:409-26.
- Bischof O, Pulford K, Mason DY, Morris SW. Mol Cell Biol 1997; 17:2312-25.
- Falini B, Pulford K, Pucciarini A, et al. Blood 1999;94:3509-15.
- Schnittger S, et al. Blood (online August 2, 2005).
- 25 - Jaffe E, Harris N, Stein H, et al. Lyon: IARC Press; 2001.
- Downward J. BMJ 2004; 328:1245-48.
- Stocks MR. Drug Discov Today 2004; 9:960-66.
- Shuker SB, et al. Science 1996 ; 274 :1531-34.
- Dohner K, et al. Blood (online July 28, 2005).
- 30 - Verhaak RG, et al. Blood (online August 18, 2005).
- Cordell JL, Falini B, Erber WN, et al. J Histochem Cytochem 1984; 32:219-29.

- Mitelman F. Basel: Karger; 1995.
- Crescenzi B, Fizzotti M, Piattoni S, et al. Cancer Genet Cytogenet 2000; 120:25-9.
- Van Oongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, et al. Leukaemia 1999; 13:1901-28.
- Soekarman O, von Lindern M, Daenen S, et al. Blood 1992; 79:2990-7.
- 5 - Van der Velden VHJ, Hochhaus A, Cazzaniga G, et al Leukaemia 2003; 17:1013-1034.
- Noguera NI, Breccia M, Oivona M, et al. Leukaemia 2002; 16:2185-9.
- Cimino G, Rapanotti MC, Elia L, et al. Cancer Res 1995; 55:1625-8. Goodell MA, Rosenzweig M, Kim H, et al. Nat Med 1997; 3:1337-45.
- Engelhardt M, Lubbert M, Guo Y. Leukaemia 2002; 16:1603-8.
- 10 - Nishimura Y, Okhubo T., Furuichi Y, Umekawa H. Biosci Biotechnol Biochem 2002; 66:2239-42.
- Horn HF, Vousden KH. Nature 2004; 427:110-1.
- Hingorani K, Szebeni A, Olson MO. J Biol Chem 2000; 275:24451-7.
- Chang JH, Lin JY, Wu MH, Yung BY. Biochem J 1998; 329(Pt 3):539-44.
- Goding J. Monoclonal Antibodies. Academic Press 1983.
- 15 - Quentmeier H., Leukaemia 2005; 19:1760-67.
- Schreiber E, et al. Nucleic Acids Res. 1989; 17:6419.
- Wang W, et al. Nat Cell Biol 2005; 7:823-30.
- Gabert J, et al. Leukaemia 2003; 17:1013-1034.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 20 <110> Falini, Brunangelo Mecucci, Cristina
- <120> Mutantes de la proteína nucleofosmina (NPM), secuencias genéticas correspondientes y usos de los mismos
- <130> 29480-508D01EP
- <140> EP 07021463.0
- 25 <141> 2005-10-28
- <150> RM2004A000534
- <151> 2004-10-29
- 30 <160> 55

<170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 10

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Motivo NES

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

15

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

25

<400> 1

Leu Xaa Xaa Xaa Val Xaa Xaa Val Xaa Leu
1 5 10

<210> 2

<211> 10

30 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Motivo NES

5

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

15

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> xaa puede ser cualquier aminoácido natural

20

<400> 2

Leu Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Val Xaa Leu
1 5 10

<210> 3

<211> 10

25

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Motivo NES

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

5

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

15

<400> 3

Leu Xaa Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Val Xaa Leu
1 5 10

<210> 4

<211> 10

20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Motivo NES

25

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

5

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

<223> xaa puede ser cualquier aminoácido natural

10

<400> 4

Leu Xaa Xaa Xaa Met Xaa Xaa Val Xaa Leu
1 5 10

<210> 5

<211> 10

15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Motivo NES

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

25

<220>

<221> misc_feature

<222> (6)..(7)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

30

<220>

<221> misc_feature

<212> (9) .. (9)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

5

<400> 5

Leu Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Val Xaa Leu
1 5 10

<210> 6

<211> 10

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Motivo NES

15

<400> 6

Leu Cys Leu Ala Val Glu Glu Val Ser Leu
1 5 10

<210> 7

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Motivo NES

25

<400> 7

Leu Cys Met Ala Val Glu Glu Val Ser Leu
1 5 10

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Motivo NES

<400> 8

Leu Cys Val Ala Val Glu Glu Val Ser Leu
1 5 10

10 <210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Motivo NES

<400> 9

Leu Ser Arg Ala Val Glu Glu Val Ser Leu
1 5 10

20 <210> 10

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> Motivo NES

<400> 10

ES 2 654 564 T3

Leu Cys Thr Ala Val Glu Glu Val Ser Leu
1 5 10

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Motivo NES

10 <400> 11

Leu Ser Gln Ala Val Glu Glu Val Ser Leu
1 5 10

<210> 12

<211> 10

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Motivo NES

20 <400> 12

Leu Cys His Ala Val Glu Glu Val Ser Leu
1 5 10

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

25 <213> Artificial

<220>

<223> Motivo NES

<400> 13

Leu Cys Arg Ala Val Glu Glu Val Ser Leu
1 5 10

<210> 14

5 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Motivo NES

<400> 14

Leu Cys Arg Gly Val Glu Glu Val Ser Leu
1 5 10

<210> 15

15 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> Motivo NES

<400> 15

Leu Cys Gln Ala Val Glu Glu Val Ser Leu
1 5 10

<210> 16

25 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

ES 2 654 564 T3

<220>

<223> Motivo NES

<400> 16

5 Leu Cys Ala Ala Val Glu Glu Val Ser Leu
1 5 10

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Motivo NES

<400> 17

15 Leu Cys Lys Ala Val Glu Glu Val Ser Leu
1 5 10

<210> 18

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Motivo NES

<400> 18

25 Leu Trp Gln Ser Leu Ala Gln Val Ser Leu
1 5 10

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Motivo NES

5

<400> 19

Leu Trp Gln Ser Leu Glu Lys Val Ser Leu
1 5 10

<210> 20

<211> 10

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Motivo NES

15

<400> 20

Leu Trp Gln Ser Leu Ser Lys Val Ser Leu
1 5 10

<210> 21

<211> 10

20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Motivo NES

25

<400> 21

Leu Cys Thr Phe Leu Glu Glu Val Ser Leu
1 5 10

<210> 22

ES 2 654 564 T3

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Motivo NES

<400> 22

Leu Trp Gln Cys Phe Ala Gln Val Ser Leu
1 5 10

10 <210> 23

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Motivo NES

<400> 23

Leu Trp Gln Cys Phe Ser Lys Val Ser Leu
1 5 10

20 <210> 24

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

25 <220>

<223> Motivo NES

<400> 24

ES 2 654 564 T3

Leu Trp Gln Arg Phe Gln Glu Val Ser Leu
1 5 10

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Motivo NES

10 <400> 25

Leu Trp Gln Asp Phe Leu Asn Arg Leu
1 5

<210> 26

<211> 10

<212> PRT

15 <213> Artificial

<220>

<223> Motivo NES

20 <400> 26

Leu Trp Gln Ser Met Glu Glu Val Ser Leu
1 5 10

<210> 27

<211> 10

<212> PRT

25 <213> Artificial

<220>

<223> Motivo NES

<400> 27

Leu Trp Gln Arg Met Glu Glu Val Ser Leu
1 5 10

<210> 28

5 <211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Motivo NES

<400> 28

Leu Trp Gln Cys Cys Ser Gln Val Ser Leu
1 5 10

<210> 29

15 <211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

20 <223> péptido C-terminal

<400> 29

Val Ser Leu Arg Lys
1 5

<210> 30

25 <211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de NPM C-terminal mutada

<400> 30

5 Asp Leu Cys Leu Ala Val Glu Glu Val Ser Leu Arg Lys
1 5 10

<210> 31

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Secuencia de NPM C-terminal mutada

<400> 31

15 Asp Leu Cys Met Ala Val Glu Glu Val Ser Leu Arg Lys
1 5 10

<210> 32

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Secuencia de NPM C-terminal mutada

<400> 32

25 Asp Leu Cys Val Ala Val Glu Glu Val Ser Leu Arg Lys
1 5 10

<210> 33

<211> 13

<212> PRT

ES 2 654 564 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de NPM C-terminal mutada

5

<400> 33

Asp Leu Cys Leu Ala Val Glu Glu Val Ser Leu Arg Lys
1 5 10

<210> 34

<211> 13

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de NPM C-terminal mutada

15

<400> 34

Asp Leu Trp Gln Ser Leu Ala Gln Val Ser Leu Arg Lys
1 5 10

<210> 35

<211> 13

20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de NPM C-terminal mutada

25

<400> 35

Asp Leu Trp Gln Ser Leu Glu Lys Val Ser Leu Arg Lys
1 5 10

<210> 36

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> Cebador de NPM directo

<400> 36

ggttgttctc tggagcagcg ttc 23

10

<210> 37

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> Cebador de NPM inverso

<400> 37

20 cctggacaac atttatcaaa cacggta 27

<210> 38

<211> 22

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador de NPM directo

30 <400> 38

ggtcttaagg ttgaagtgtg gt 22

<210> 39
 <211> 28
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador de NPM inverso

 10 <400> 39
 tcaactgtta cagaaatgaa ataagacg 28

 <210> 40
 <211> 23
 15 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador de NPM directo mutA
 20
 <400> 40
 gaggctattc aagatctctg tct 23
 <210> 41
 <211> 27
 25 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Cebador de NPM inverso mutA
 30
 <400> 41

cctggacaac atttatcaaa cacggta 27

<210> 42

<211> 23

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador de NPM directo mut B

10

<400> 42

gaggctattc aagatctctg cat 23

<210> 43

15 <211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> Cebador de NPM inverso mut B

<400> 43

cctggacaac atttatcaaa cacggta 27

25 <210> 44

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> Cebador de NPM directo mut c

<400> 44

gaggctattc aagatctgcg t 21

5 <210> 45

<211> 27

<212> ADN

<213> Artificial

10 <220>

<223> Cebador de NPM inverso mut C

<400> 45

cctggacaac atttatcaaa cacggta 27

15

<210> 46

<211> 23

<212> ADN

<213> Artificial

20

<220>

<223> Cebador de NPM directo mut D

<400> 46

25 gaggctattc aagatctctg cct 23

<210> 47

<211> 27

<212> ADN

30 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador de NPM inverso mut D

<400> 47

5 cctggacaac atttatcaaa cacggta 27

<210> 48

<211> 24

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Cebador de NPM1 directo

15 <400> 48

ttaactctct ggtgtagaa tgaa 24

<210> 49

<211> 23

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador de NPM1 inverso

25

<400> 49

ccagactatt tgccattcct aac 23

<210> 50

30 <211> 26

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Cebador de NPM directo

5

<400> 50

gccacggatc cgaagattcg atggac 26

<210> 51

10 <211> 29

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Cebador de NPM inverso

<400> 51

atcaagaatt ccagaaatga aataagacg 29

20 <210> 52

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

25 <220>

<223> Cebador de NPM directo

<400> 52

gaagaattgc ttccggatga ct 22

30

<210> 53

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> Cebador de NPM directo mut A

<400> 53

cttctccac tgccagacag a 21

10

<210> 54

<211> 19

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> Cebador de NPM inverso mut B

<400> 54

20 ttcctccact gccatgcag 19

<210> 55

<211> 17

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

<223> Sonda

30 <400> 55

accaagaggc tattcaa 17

REIVINDICACIONES

1. Método in vitro para

- realizar un pronóstico de la leucemia mieloide aguda (LMA),

- realizar un diagnóstico de la LMA, o

5 - monitorizar la enfermedad mínima residual de la LMA

detectando la proteína nucleofosmina (NPM) humana mutante o una secuencia de oligonucleótidos que codifica la proteína NPM humana mutante,

10 donde la proteína NPM humana mutante está caracterizada porque tiene una localización citoplasmática y difiere de la nucleofosmina humana de tipo silvestre en que comprende los residuos de triptófano 288 y 290 mutados y un motivo de señalización de exportación nuclear (NES) en la región C-terminal de la proteína que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en LxxxVxxVxL (SEQ ID No 1), LxxxLxxVxL (SEQ ID No 2), LxxxFxxVxL (SEQ ID No 3), LxxxMxxVxL (SEQ ID No 4), y LxxxCxxVxL (SEQ ID No 5).

2. Método según la reivindicación 1, en donde la secuencia de NES comprende:

15 a) LxxxVxxVxL (SEQ ID No 1) seleccionada del grupo que consiste en LCLAVEEVSL (SEQ ID No 6); LCMAVEEVSL (SEQ ID NO 7); LCVAVEEVSL (SEQ ID No 8); LSRAVEEVSL (SEQ ID No 9); LCTAVEEVSL (SEQ ID No 10); LSQAVEEVSL (SEQ ID No 11); LCHAVEEVSL (SEQ ID NO 12); LCRAVEEVSL (SEQ ID NO 13); LCRGVEEVSL (SEQ ID NO 14); LCQAVEEVSL (SEQ ID No 15); LCAAVEEVSL (SEQ ID NO 16); LCKAVEEVSL (SEQ ID No 17),

20 b) LxxxLxxVxL (SEQ ID No 2) seleccionada del grupo que consiste en LWQSLAQVSL (SEQ ID No 18); LWQSLEKVSL (SEQ ID NO 19); LWQSLSKVSL (SEQ ID No 20); LCTFLEEVSL (SEQ ID No 21),

c) LxxxFxxVxL (SEQ ID No 3) seleccionada del grupo que consiste en LWQCFAQVSL (SEQ ID No 22); LWQCFQSKVSL (SEQ ID NO 23); LWQRFQEVSL (SEQ ID No 24); LWQDFLNRL (SEQ ID No 25),

d) LxxxMxxVxL (SEQ ID No 4) es LWQSMEEVSL (SEQ ID NO 26) o LWQRMEEVSL (SEQ ID No 27), o

e) LxxxCxxVxL (SEQ ID No 5) es LWQCCSQVSL (SEQ ID NO 28).

25 3. Método según la reivindicación 1 o 2, en donde la región C-terminal incluye el péptido VSLRK (SEQ ID No 29).

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la secuencia de NES comprende un D-aminoácido aguas arriba de la Leucina en el extremo N-terminal.

30 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la detección implica detectar la proteína NPM humana mutante y comprende el uso de un anticuerpo monoclonal o policlonal o un fragmento del mismo capaz de reconocer y unirse de forma selectiva a al menos un epítipo antigénico de la región C-terminal de la proteína NPM humana mutante, en donde el epítipo incluye una mutación de los residuos de triptófano 288 y 290 y el motivo NES según se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

6. Método según la reivindicación 5, en donde el epítipo incluye el péptido VSLRK (SEQ ID NO: 29).

35 7. Método según la reivindicación 5 o 6, en donde el anticuerpo o fragmento se conjuga con un agente seleccionado del grupo que consiste en una sustancia fluorescente, enzima radioisótopo, nanopartícula y medicamento.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la detección implica detectar la localización citoplasmática de la proteína NPM humana mutante mediante examen inmunohistoquímico.

9. Método según la reivindicación 8, en donde el método comprende

40 a) poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo capaz de detectar la localización citoplasmática de la proteína NPM humana mutante, y

b) detección del enlace anticuerpo-NPM,

opcionalmente mediante técnicas inmunoenzimáticas o de inmunofluorescencia.

10. Un kit de diagnóstico para su uso en un método según la reivindicación 1, que comprende un anticuerpo monoclonal o policlonal o un fragmento del mismo, según se define en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7.

5 11. Un kit de diagnóstico para la detección de LMA que presenta una nucleofosmina mutada en una muestra biológica, que comprende un anticuerpo o fragmento del mismo, según se define en cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, opcionalmente en donde dicha detección tiene lugar mediante ensayos inmunohistoquímicos, inmunoenzimáticos, de inmunotransferencia, de inmunoprecipitación o una combinación de los mismos.

12. Método según la reivindicación 1, en donde la detección implica detectar la secuencia de oligonucleótidos que codifica la proteína NPM humana mutante.

10 13. Método según la reivindicación 12, en donde dichos medios para el diagnóstico in vitro se seleccionan de cebadores o sondas de oligonucleótidos.

14. Método según la reivindicación 13, en donde dicha detección tiene lugar mediante técnicas de PCR, RT-PCR, PCR en tiempo real, Dot Blot reverso (RBD), matrices de tejidos múltiples (My) o combinaciones de las mismas.

15 15. Método según la reivindicación 13 o 14, en donde los cebadores o sondas de oligonucleótidos se marcan con un agente seleccionado del grupo que consiste en una sustancia fluorescente, biotina, radioisótopo, nanopartícula.

16. Método según la reivindicación 13, en donde un cebador comprende una secuencia de oligonucleótidos seleccionado de:

i) NPM1_25F: 5'-GGTTGTTCTCTGGAGCAGCGTTC-3' (SEQ ID No 36);

NPM1_1112R: 5'-CCTGGACAACATTTATCAAACACGGTA-3' (SEQ ID No 37);

20 ii) NPM1_390F: 5'-GGTCTTAAGGTTGAAGTGTGGT-3' (SEQ ID No 38);

NPM1_1043_R: 5'-TCAACTGTTACAGAAATGAAATAAGACG-3' (SEQ ID No 39);

iii) NPM_940F_mutA 5'-GAGGCTATTCAAGATCTCTGTCT-3' (SEQ ID No 40);

NPM1_1112 R 5'-CCTGGACAACATTTATCAAACACGGTA-3' (SEQ ID No 41);

iv) NPM_940F mutB 5'-GAGGCTATTCAAGATCTCTGCAT-3' (SEQ ID No 42);

25 NPM 1112 R 5'-CCTGGACAACATTTATCAAACACGGTA-3' (SEQ ID No 43);

v) NPM_940F_mutC 5'-GAGGCTATTCAAGATCTCTGCGT-3' (SEQ ID No 44);

NPM1_1112 R 5'-CCTGGACAACATTTATCAAACACGGTA-3' (SEQ ID No 45);

vi) NPM_940F_mutD 5'-GAGGCTATTCAAGATCTCTGCCT-3' (SEQ ID No 46); NPM1_1112 R 5'-CCTGGACAACATTTATCAAACACGGTA-3' (SEQ ID No 47);

30 vii) NPM1_F: 5'-TTAACTCTCTGGTGGTAGAATGAA-3' (SEQ ID No 48);

NPM1-R: 5'-CCAGACTATTTGCCATTCCTAAC-3' (SEQ ID NO 49);

viii) NPM 1_89F_BamHI: 5'-GCCACGGATCCGAAGATTCGATGGAC-3' (SEQ ID No 50);

NPM1_1044R EcoRI: 5'-ATCAAGAATTCCAGAAATGAAATAAGACG-3' (SEQ ID NO 51);

ix) cNPM-F: 5'-GAAGAATTGCTTCCGGATGACT-3 (SEQ ID No 52); y

35 cNPM mut.A-R: 5'-CTTCCTCCACTGCCAGACAGA-3' (SEQ ID No 53) o

cNPM mut.B-R: 5'-TTCCTCCACTGCCATGCAG-3' (SEQ ID No 54).

17. Kit de diagnóstico para su uso en un método según la reivindicación 1, que comprende un oligonucleótido según la reivindicación 13.

5 18. Kit de diagnóstico para la detección de LMA que presenta una nucleofosmina mutada o para su uso en un método según la reivindicación 1, que comprende al menos una secuencia de oligonucleótidos que codifica la proteína nucleofosmina (NPM) humana mutante según se define en la reivindicación 1 o 2.

19. Método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde se obtiene la muestra biológica para la detección seleccionada del grupo que consiste en secciones de tejido y muestras citológicas.

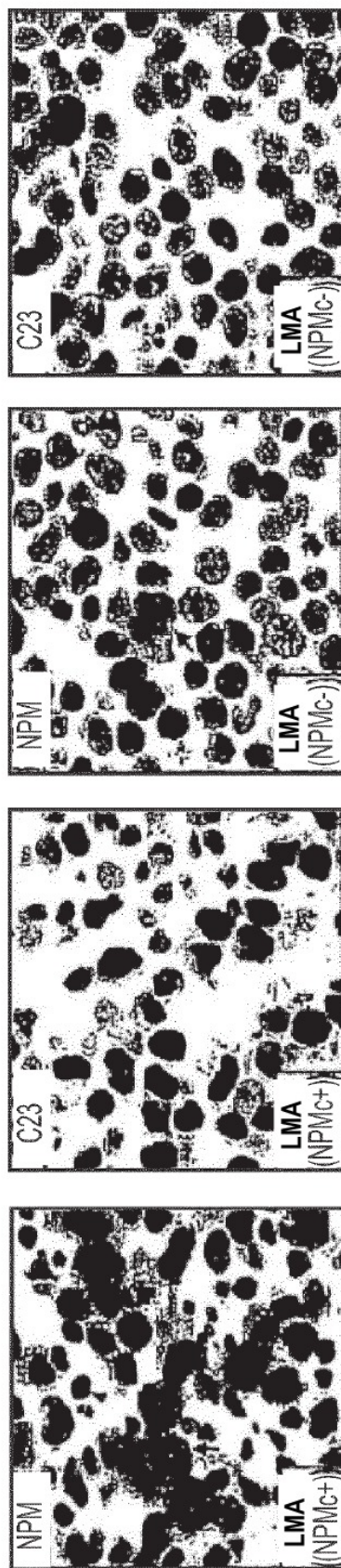


FIG. 1A

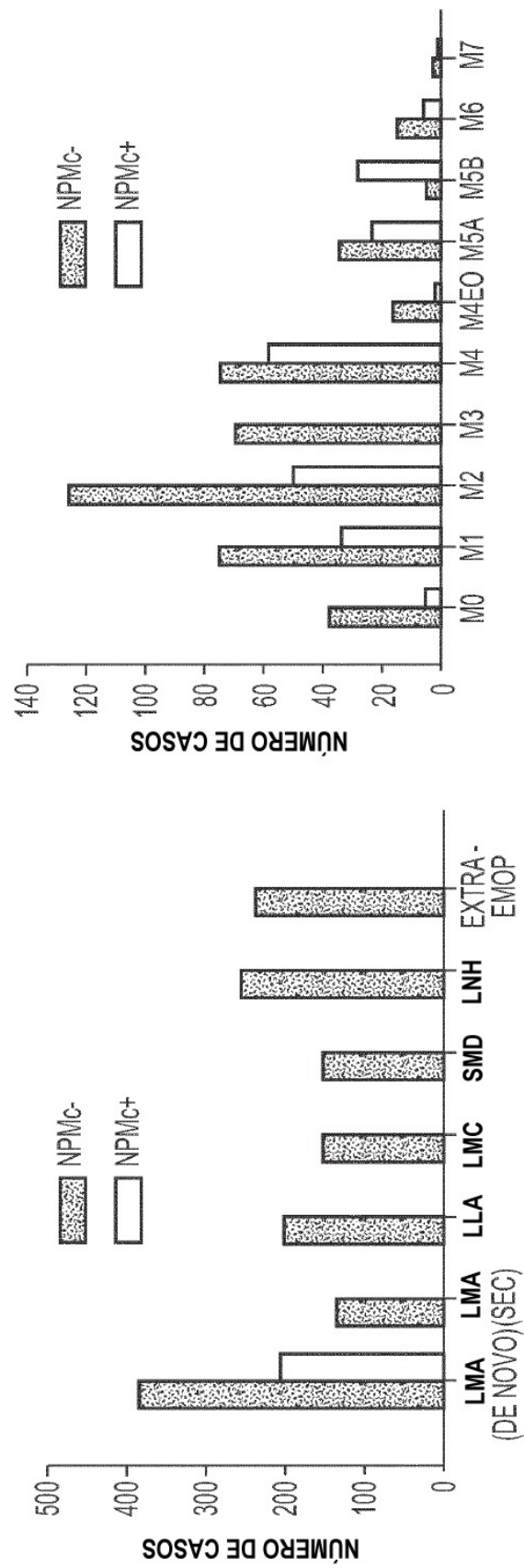


FIG. 1C

FIG. 1B

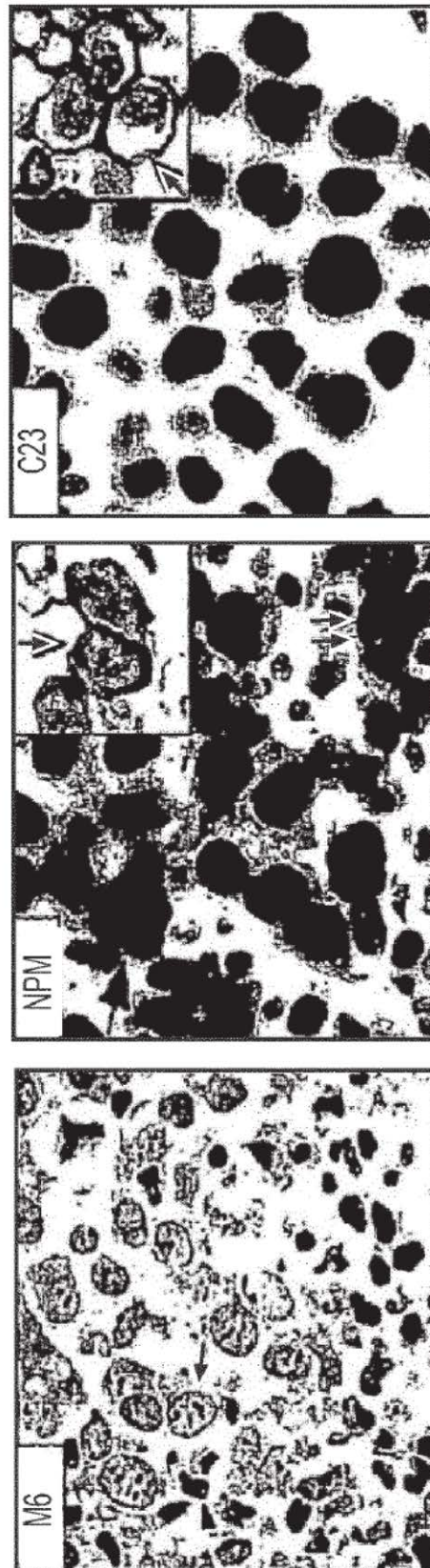


FIG. 1D

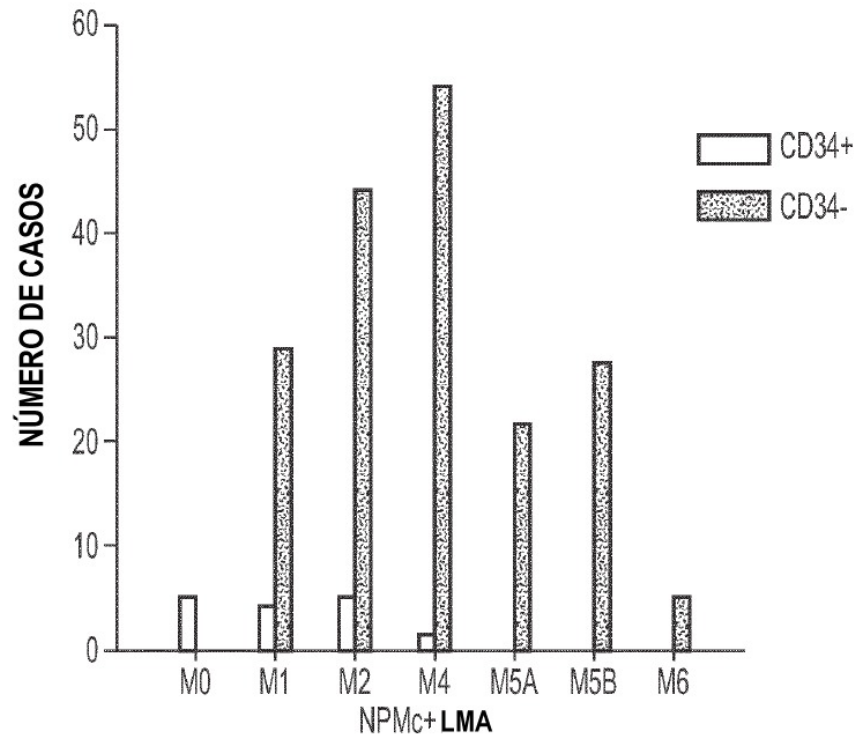


FIG. 2A

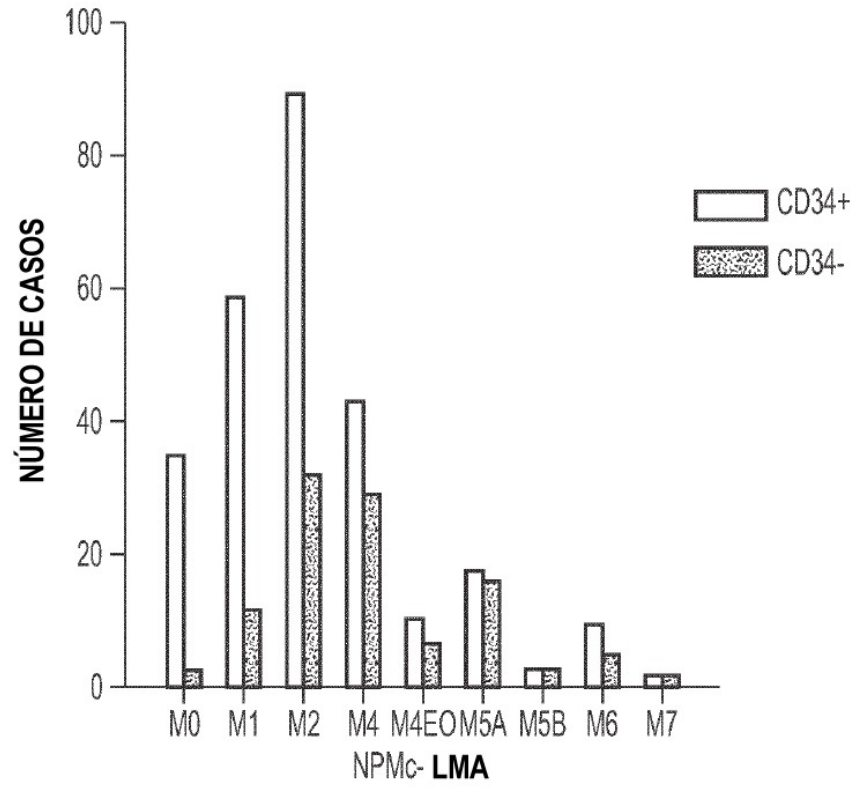
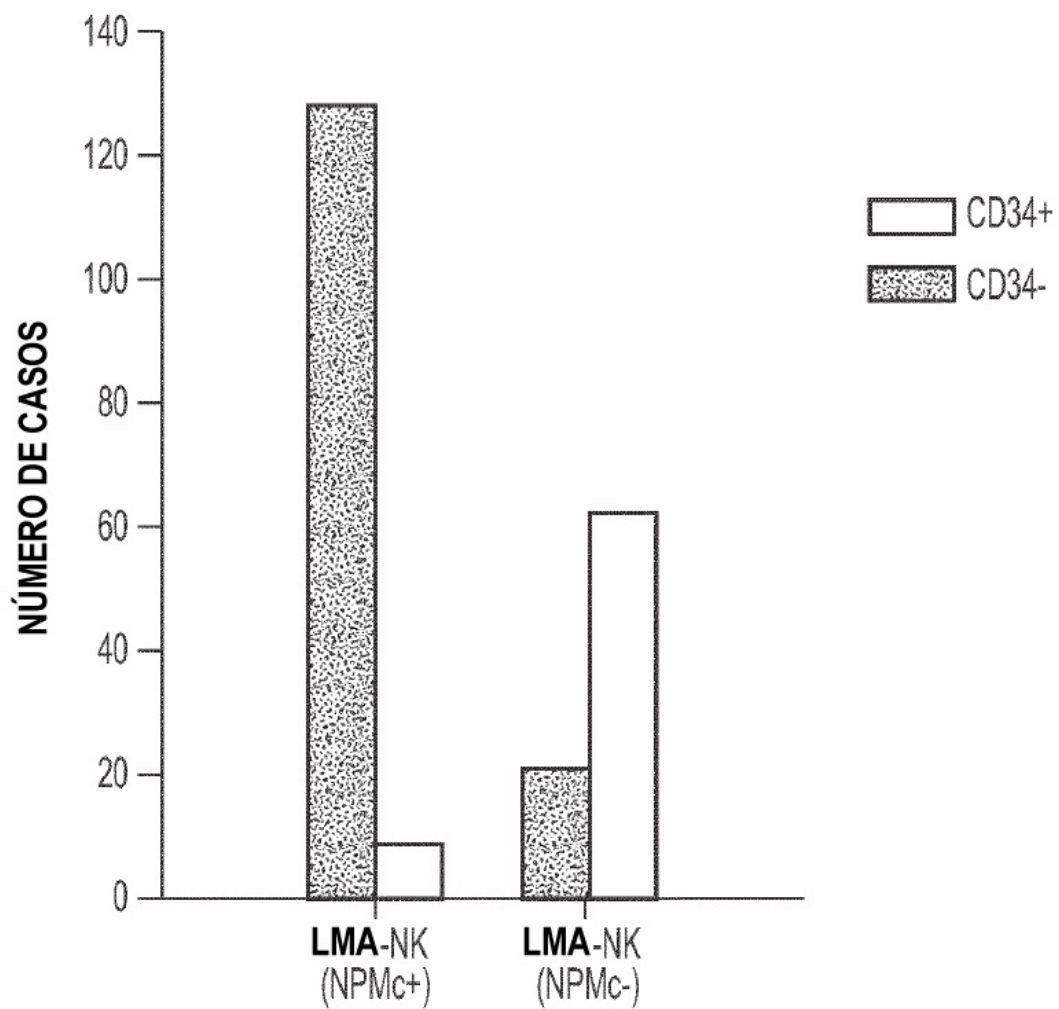
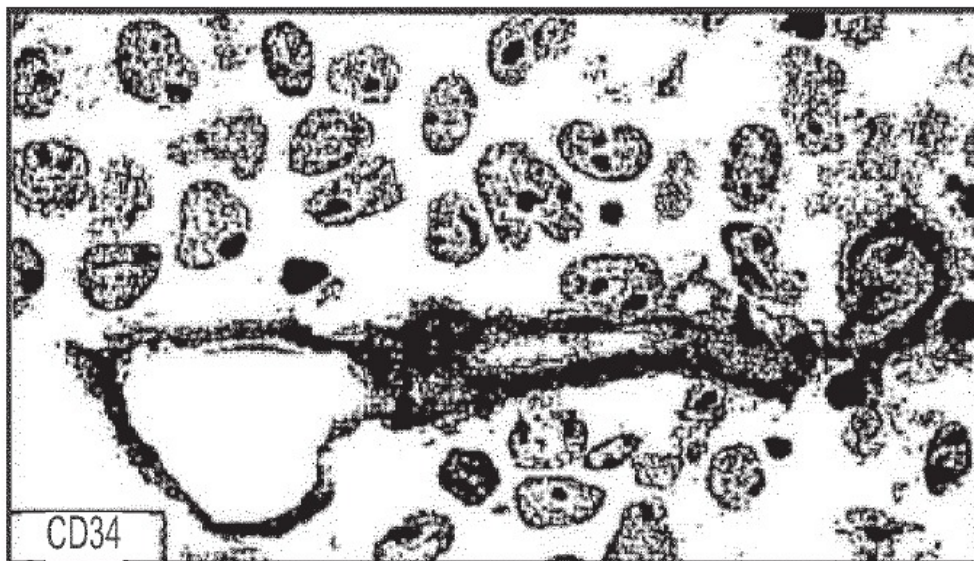


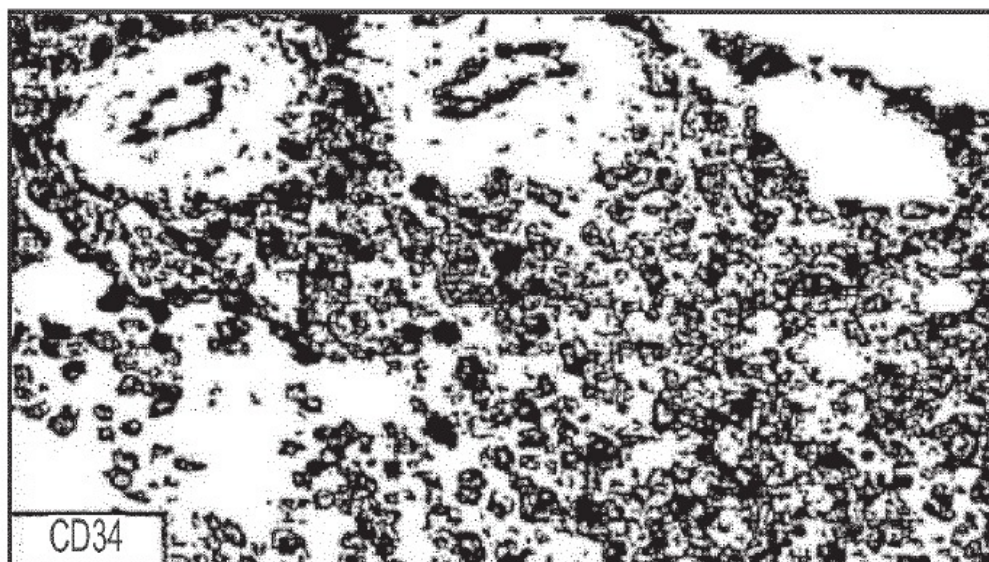
FIG. 2B

**FIG. 2C**



NPMc+LMA-NK

FIG. 2D



NPMc-LMA-NK

FIG. 2E

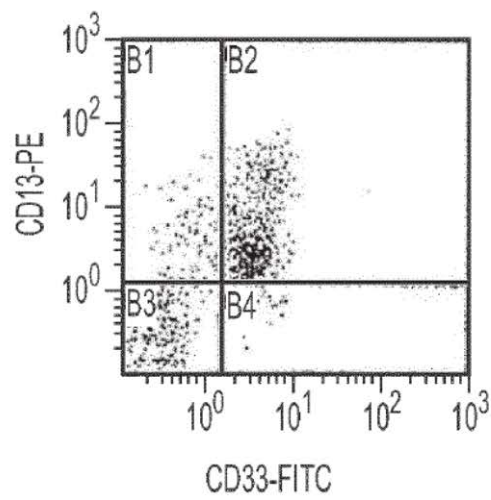
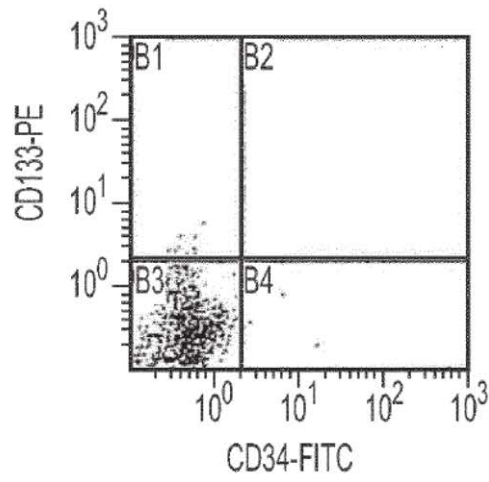
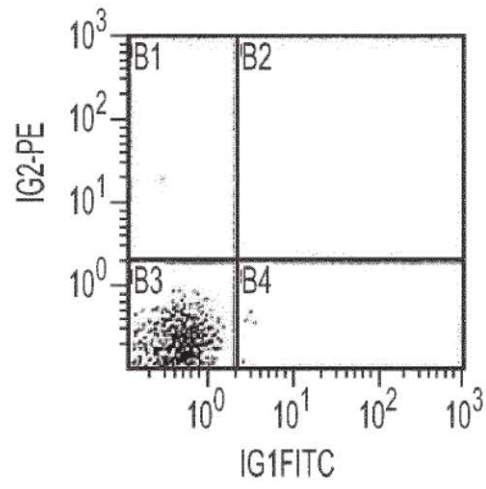


FIG. 2F

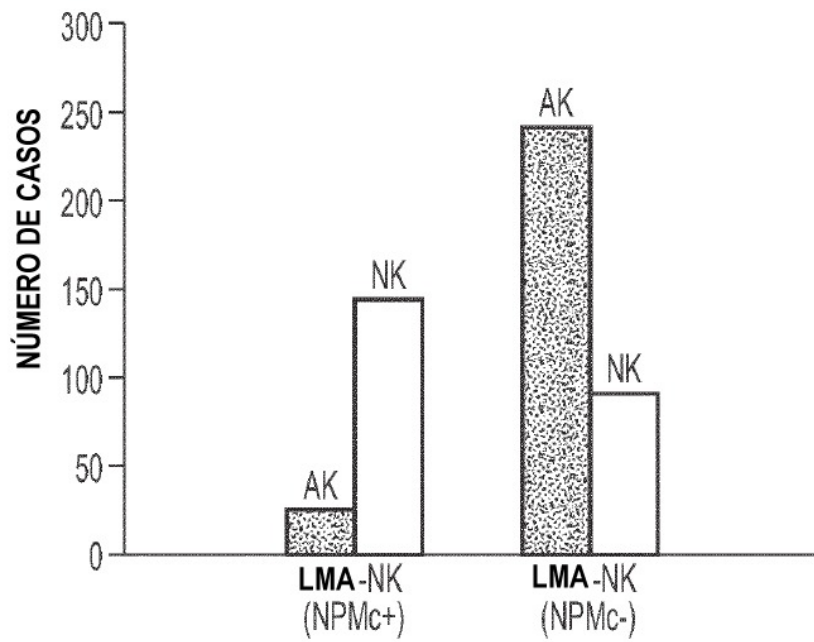


FIG. 3A

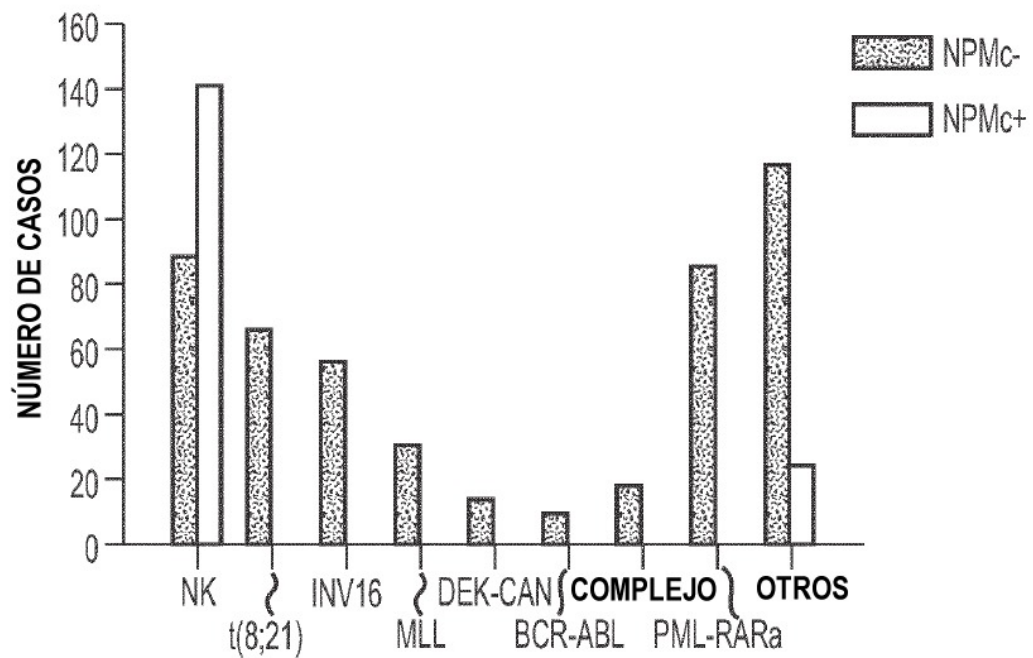
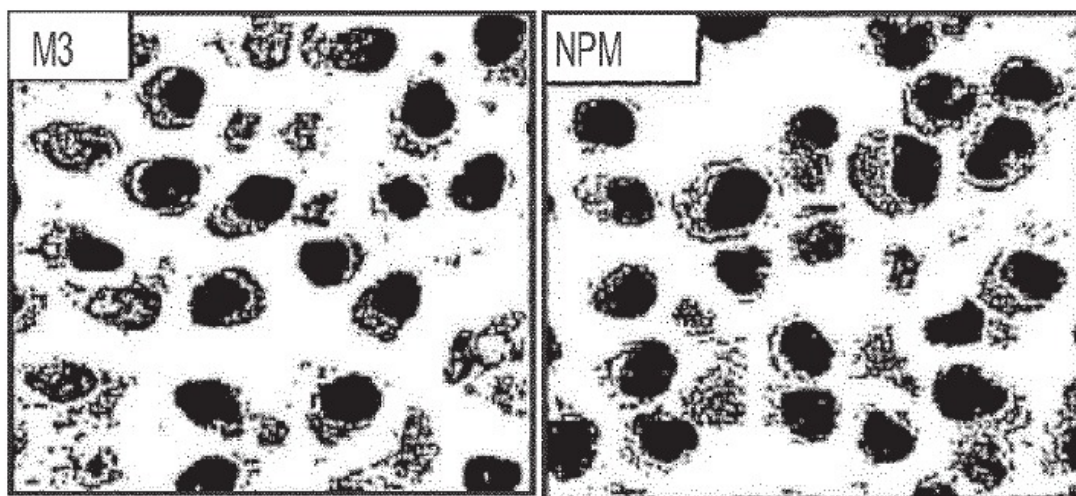
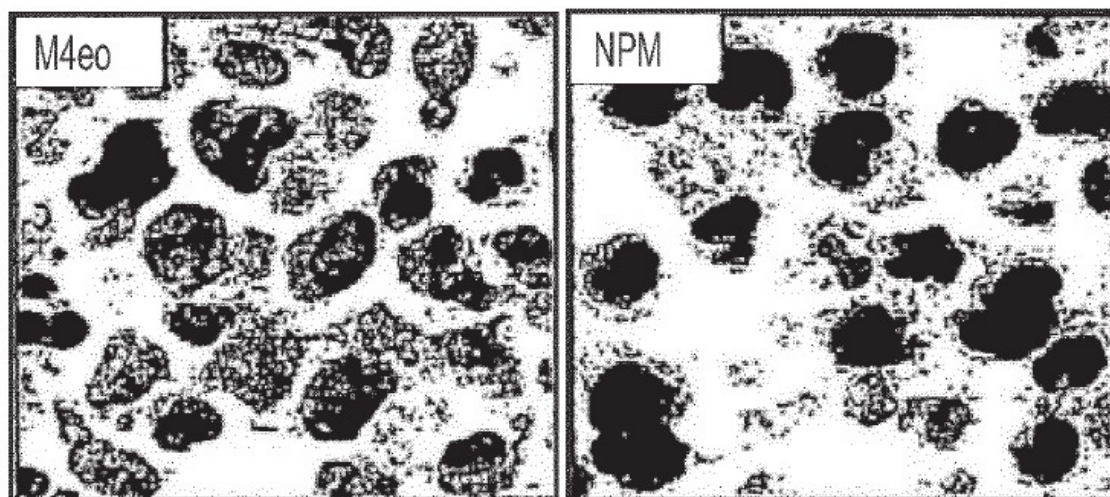


FIG. 3B



LPA t(15;17)

FIG. 3C



M4eo (inv16)

FIG. 3D

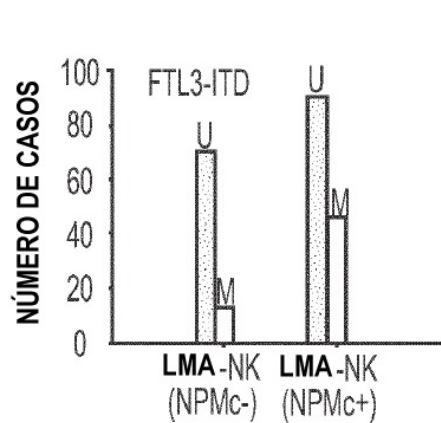


FIG. 3E

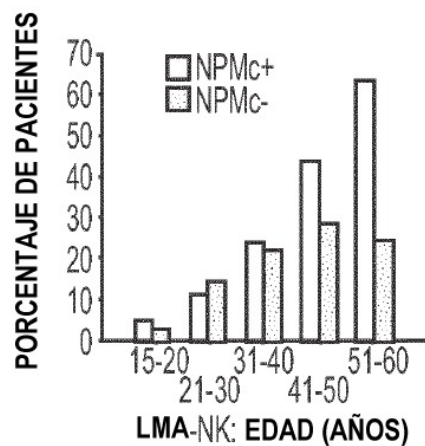


FIG. 3F

INDEP. VAR	Parámetro esta.	Error estándar	WALD	GL	SIG.	RO	RO 95,0% CI
EDAD	0.030	0.12	6.560		0.010	1.030	1.007-1.054
CARIOTIPO	1.781	0.306	33.840	1	0.000	5.936	3.257-10816
D835(M vs U)	0.417	0.485	0.739	1	0.390	1.518	10.586-3.929
ITD(M vs U)	1.201	0.332	13.057	1	0.000	3.322	1.732-6.371
CONSTANTE	-2.953	0.580	25.949	1	0.000	0.052	

FIG. 3G

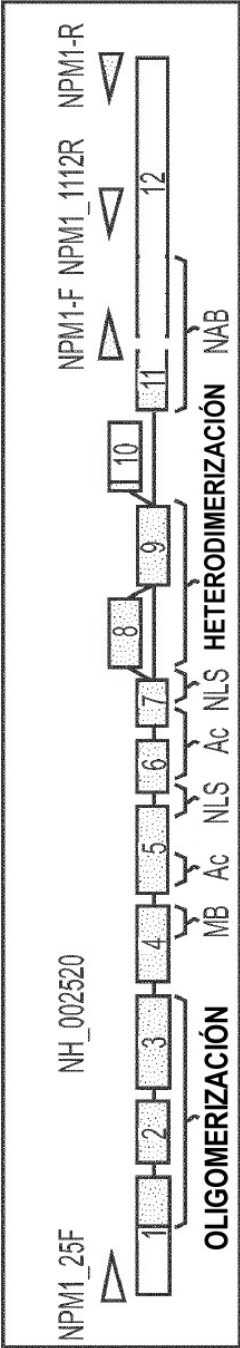


FIG. 4A

SEQ ID NO:	TIPO DE MUTACIÓN	Nº de Acceso GenBank	SECUENCIA	PROTEÍNA	Nº DE CASOS	SEQ ID NO:
84	TIPO SILVESTRE	NM_002520	952 gatctctg.....gcagt....ggaggaagtctctttaagaaaaatag	-DIOIAVEEVSIRKSL	40/52 (77%)	85
57	MUTACIÓN A	AY740634	gatctctgTCTGgcagt.....ggaggaagtctctttaagaaaaatag	-DIOIAVEEVSIRK	7/52 (13%)	30
60	MUTACIÓN B	AY740635	gatctctgCATGgcagt.....ggaggaagtctctttaagaaaaatag	-DIOIAVEEVSIRK	1/52 (2%)	31
61	MUTACIÓN C	AY740636	gatctctgCGTGgcagt.....ggaggaagtctctttaagaaaaatag	-DIOIAVEEVSIRK	1/52 (2%)	32
62	MUTACIÓN D	AY740637	gatctctgCCTGgcagt.....ggaggaagtctctttaagaaaaatag	-DIOIAVEEVSIRK	1/52 (2%)	30
63	MUTACIÓN E	AY740638	gatctctg.....gcagtCTCTTGCCCaagtctctttaagaaaaatag	-DIOIAVEEVSIRK	1/52 (2%)	34
64	MUTACIÓN F	AY740639	gatctctg.....gcagtCCCTGGGAGaagtctctttaagaaaaatag	-DIOIAVEEVSIRK	1/52 (2%)	35

FIG. 4B

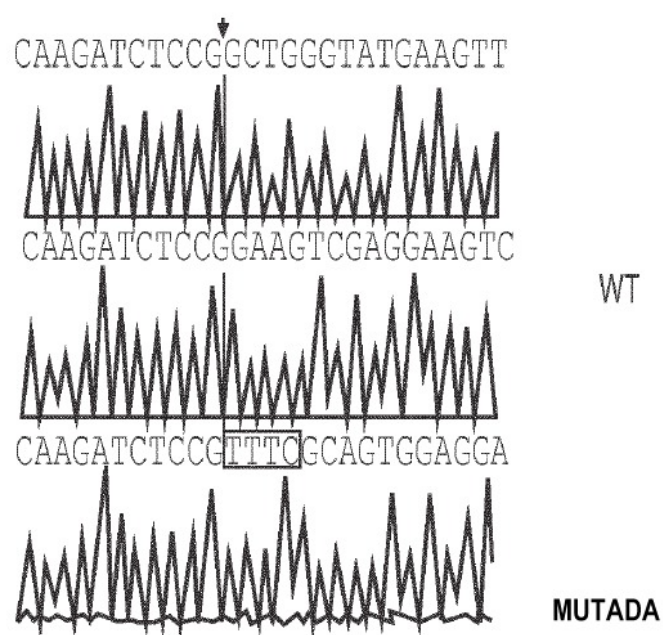


FIG. 4C

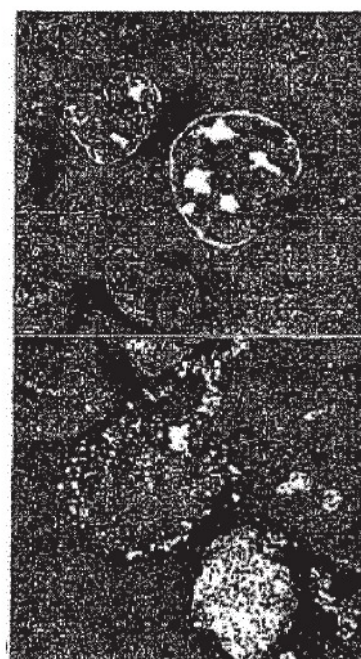


FIG. 4D

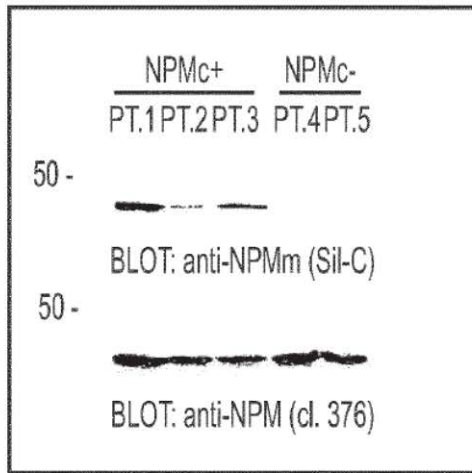


FIG. 5A

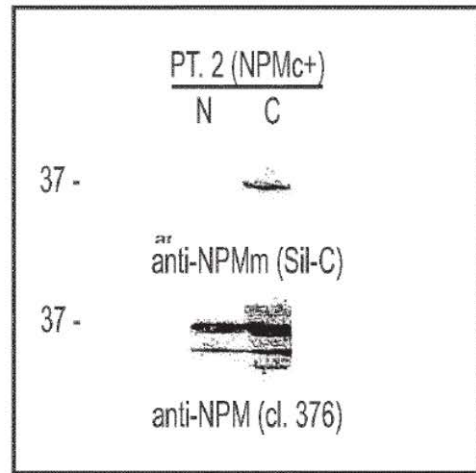


FIG. 5B

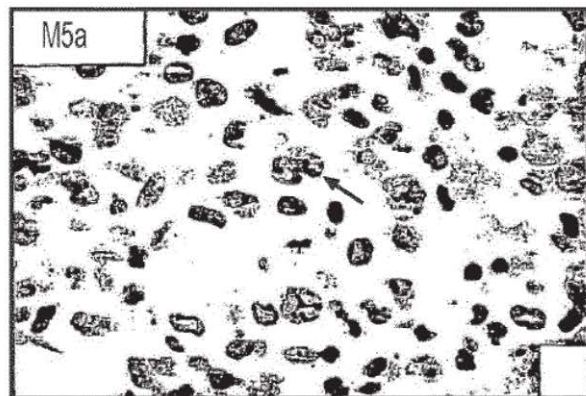


FIG. 5C

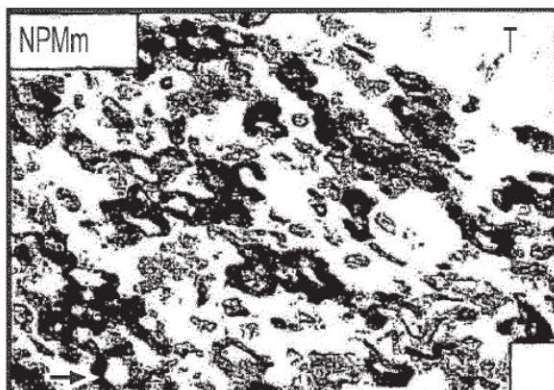


FIG. 5D

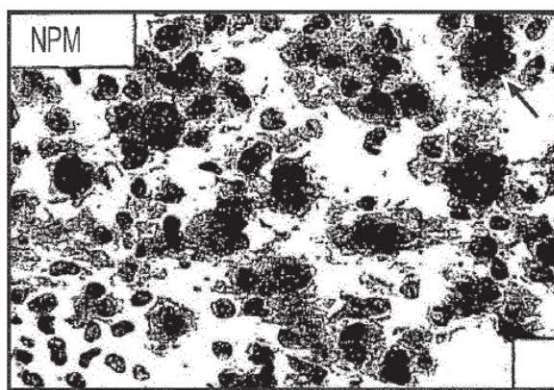


FIG. 5E

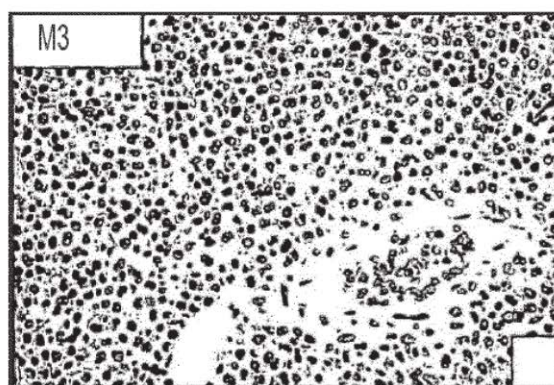


FIG. 5F

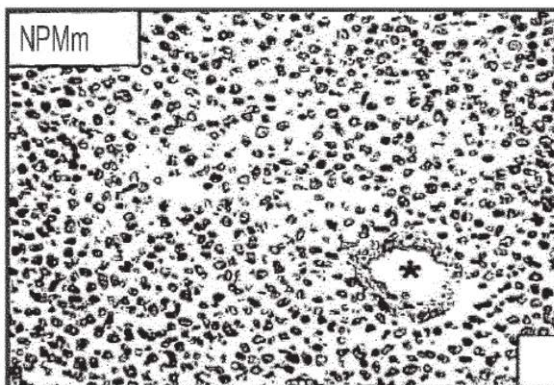


FIG. 5G

LISTA DE MUTACIONES DE EXÓN-12 NPM1 IDENTIFICADAS EN PACIENTES CON LMA				
TIPO SILVESTRE*				
	gaccaagagggtatttcaagatctct	g		gcag
MUTACIÓN A	gaccaagagggtatttcaagatctct	g	TCTG	gcag
MUTACIÓN B	gaccaagagggtatttcaagatctct	g	CATG	gcag
MUTACIÓN C	gaccaagagggtatttcaagatctct	g	CGTG	gcag
MUTACIÓN D	gaccaagagggtatttcaagatctct	g	CCTG	gcag
MUTACIÓN E	gaccaagagggtatttcaagatctct	g		gcag
MUTACIÓN F	gaccaagagggtatttcaagatctct	g		gcag
MUTACIÓN G	gaccaagagggtatttcaagatctct	g		gcag
MUTACIÓN H	gaccaagagggtatttcaagatctct	g		gcag
MUTACIÓN I	gaccaagagggtatttcaagatctct	g		gcag
MUTACIÓN J	gaccaagagggtatttcaagatctct	g		gcag
MUTACIÓN L	gaccaagagggtatttcaagatctct	CCCG		gcag
MUTACIÓN K	gaccaagagggtatttcaagatctct	g		gcag
MUTACIÓN M	gaccaagagggtatttcaagatctct	g	TAGC	gcag
MUTACIÓN N	gaccaagagggtatttcaagatctct	CCCA		gcag
MUTACIÓN O	gaccaagagggtatttcaagatctct	g	CCAC	gcag
MUTACIÓN P	gaccaagagggtatttcaagatctct	g		CGTTTCC
MUTACIÓN Q	gaccaagagggtatttcaagatctct	g	TACCTTCC	
MUTACIÓN R	gaccaagagggtatttcaagatctct	g	ACCA	
MUTACIÓN Gm	gaccaagagggtatttcaagatctct	g	CAGG	gcag
MUTACIÓN Km	gaccaagagggtatttcaagatctct	g	CCGG	gcag

FIG. 6

		PROTEÍNA PREDECIDA (C-TERMINAL)	(%)	IH
t	ggagg	aagtctctttaagaaaaatag		NUCLEAR
t	ggagg	aagtctctttaagaaaaatag	81	Cit
t	ggagg	aagtctctttaagaaaaatag	7	Cit
t	ggagg	aagtctctttaagaaaaatag	-	Cit
t	ggagg	aagtctctttaagaaaaatag		Cit
t	CTCTTGCCC	aagtctctttaagaaaaatag		Cit
t	CCCTGGAGA	aagtctctttaagaaaaatag		Cit
t	GCTTCGCCC	aagtctctttaagaaaaatag		nd
t	GTTTTTCAA	aagtctctttaagaaaaatag		nd
t	CCCTCGCCC	aagtctctttaagaaaaatag	<1	nd
t	CTCTTTCTA	aagtctctttaagaaaaatag	<1	Cit
t	CCCTTTCCA	aagtctctttaagaaaaatag	<1	Cit
t	ggagg	aagtctctttaagaaaaatag	<1	Cit
t	ggagg	aagtctctttaagaaaaatag	<1	nd
t	ggagg	aagtctctttaagaaaaatag	<1	Cit
t	ggagg	aagtctctttaagaaaaatag	<1	nd
t	ggagg	aagtctctttaagaaaaatag	<1	nd
t	ggagg	aagtctctttaagaaaaatag	<1	nd
t	ggagg	aagtctctttaagaaaaatag		nd

FIG. 6
CONTINUACIÓN

MUTACIÓN	Lm	gaccaagaggctattcaagatctct	-	-	-	gcag
MUTACIÓN	Nm	gaccaagaggctattcaagatctct	g	CCGCGG	ag	gcag
MUTACIÓN	Om	gaccaagaggctattcaagatctct	g	CCAG	gcag	gcag
MUTACIÓN	Qm	gaccaagaggctattcaagatctct	g	TTTG	gcag	gcag
		gaccaagaggctattcaagatctct	g	TCGG	gcag	gcag
MUTACIÓN	1	gaccaagaggctattcaagatctct	g		TCCA	gcag
MUTACIÓN	3	gaccaagaggctattcaagatctct	g	CTTG	gcag	gcag
MUTACIÓN	4	gaccaagaggctattcaagatctct	g	TCAT	gcag	gcag
MUTACIÓN	6	gaccaagaggctattcaagatctct	g		gca AGATTTCTTAAATC	gcag
MUTACIÓN	7	accaagaggctattcaagatctct	g	ATGC	gcag	gcag
MUTACIÓN	12	gaccaagaggctattcaagatctct	g	TAAG	gcag	gcag
MUTACIÓN	13	gaccaagaggctattcaagatctct	g	GCCC	gcag	gcag
MUTACIÓN	10	gaccaagaggctattcaagatctct	g		gcag	gcag
MUTACIÓN	14	gaccaagaggctattcaagatctct	g		gcag	gcag
MUTACIÓN	G'	gaccaagaggctattcaagatctct	g	TTTG	gcag	gcag
MUTACIÓN	H'	gaccaagaggctattcaagatctct	g	CTTG	gcag	gcag
MUTACIÓN	I'	gaccaagaggctattcaagatctct	g	TAAG	gcag	gcag
MUTACIÓN	J'	gaccaagaggctattcaagatctct	g	TATG	gcag	gcag
MUTACIÓN	I*	gaccaagaggctattcaagatctct	g	CAGA	gcag	gcag

NEGRITA: AMINOÁCIDOS PARTE DEL MOTIVO NES.

SUBRAYADO: RESIDUOS DE TRIPTÓFANO

FIG.6
CONTINUACIÓN - 2

t	ggagg	aagtcctctttaagaaaaatag	286-DLCRAVEEVSLRK	nd
t	ggagg	aagtcctctttaagaaaaatag	286-DLCRGVEEVSLRK	nd
t	ggagg	aagtcctctttaagaaaaatag	286-DLCQAVEEVSLRK	nd
t	ggagg	aagtcctctttaagaaaaatag	286-DLCLAVEEVSLRK	nd
t	ggagg	aagtcctctttaagaaaaatag	286-DLCRAVEEVSLRK	nd
t	ggagg	aagtcctctttaagaaaaatag	286-DLWQSMEEVSLRK	nd
t	ggagg	aagtcctctttaagaaaaatag	286-DLCHAVEEVSLRK	nd
t	ggagg	aagtcctctttaagaaaaatag	286-DLCLAVEEVSLRK	nd
t	ggagg	gtctctctttaagaaaaatag	286-DLWQDFLNRLFKKIV	nd
t	ggagg	aagtcctctttaagaaaaatag	286-DLCLAVEEVSLRK	nd
t	ggagg	aagtcctctttaagaaaaatag	286-DLCAAVEEVSLRK	nd
tg	CTGCTCCC	aagtcctctttaagaaaaatag	286-DLCKAVEEVSLRK	nd
t	TATTTTCCC	aagtcctctttaagaaaaatag	286-DLWQCCSQVSLRK	nd
t	ggagg	aagtcctctttaagaaaaatag	286-DLWQCCSQVSLRK	nd
t	ggagg	aagtcctctttaagaaaaatag	286-DLCLAVEEVSLRK	nd
t	ggagg	aagtcctctttaagaaaaatag	286-DLCLAVEEVSLRK	nd
t	ggagg	aagtcctctttaagaaaaatag	286-DLCKAVEEVSLRK	nd
t	ggagg	aagtcctctttaagaaaaatag	286-DLCMAVEEVSLRK	nd
t	ggagg	aagtcctctttaagaaaaatag	286-DLCRAVEEVSLRK	nd

FIG.6
CONTINUACIÓN - 3

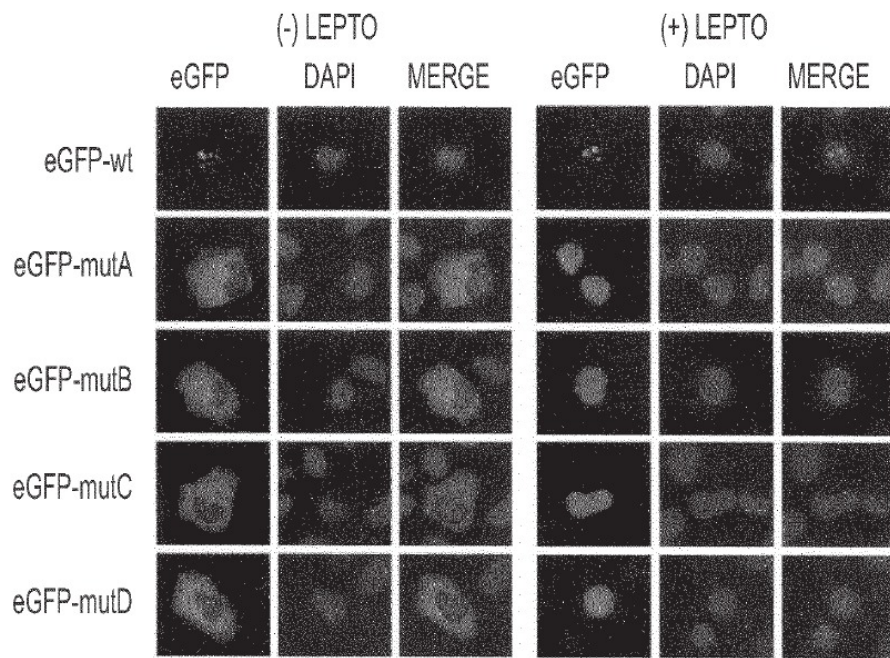


FIG. 7A

FIG. 7B

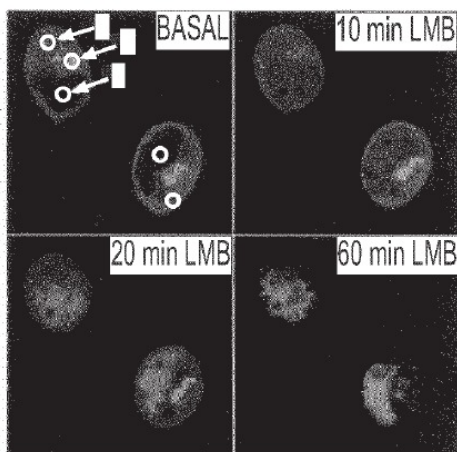


FIG. 7C

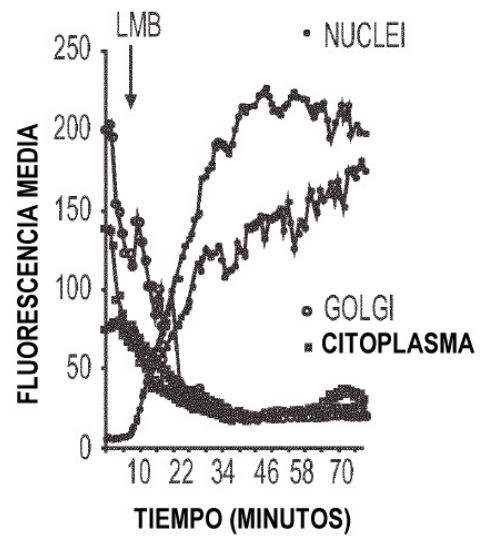


FIG. 7D

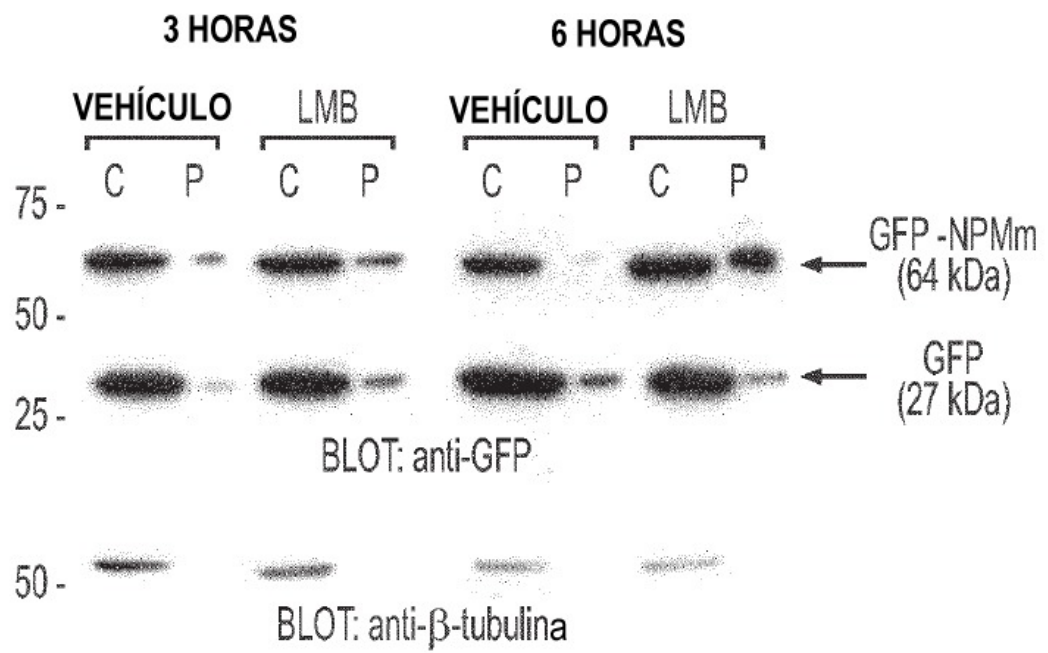


FIG. 7E

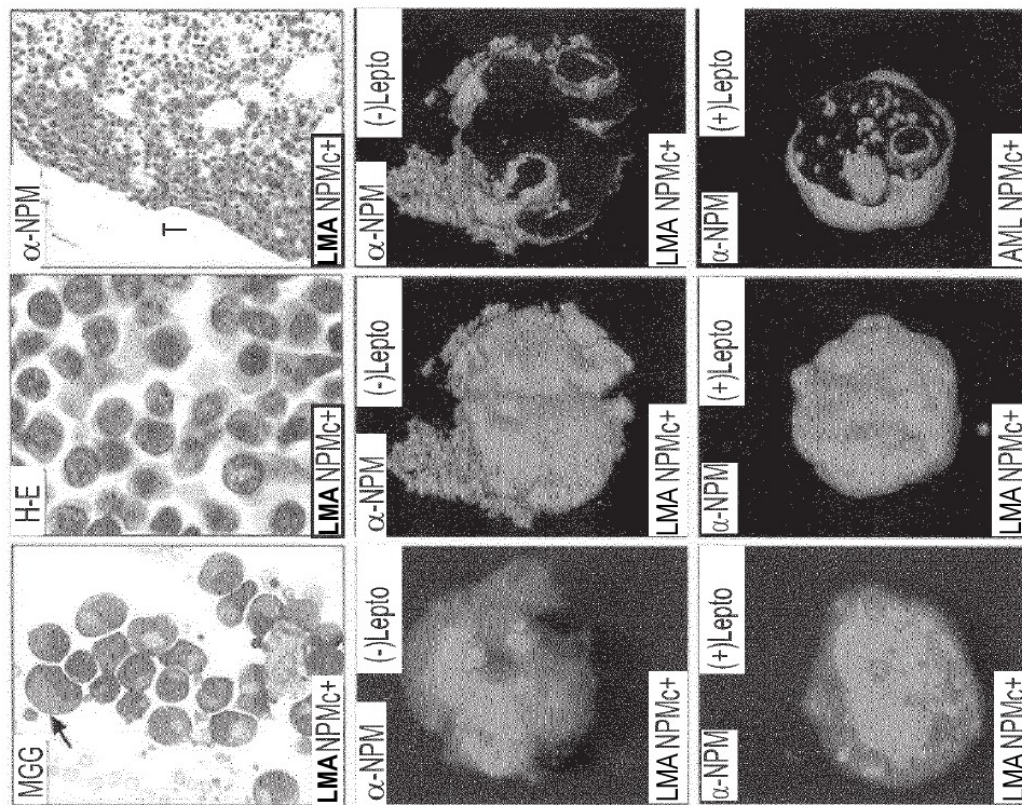


FIG. 8B

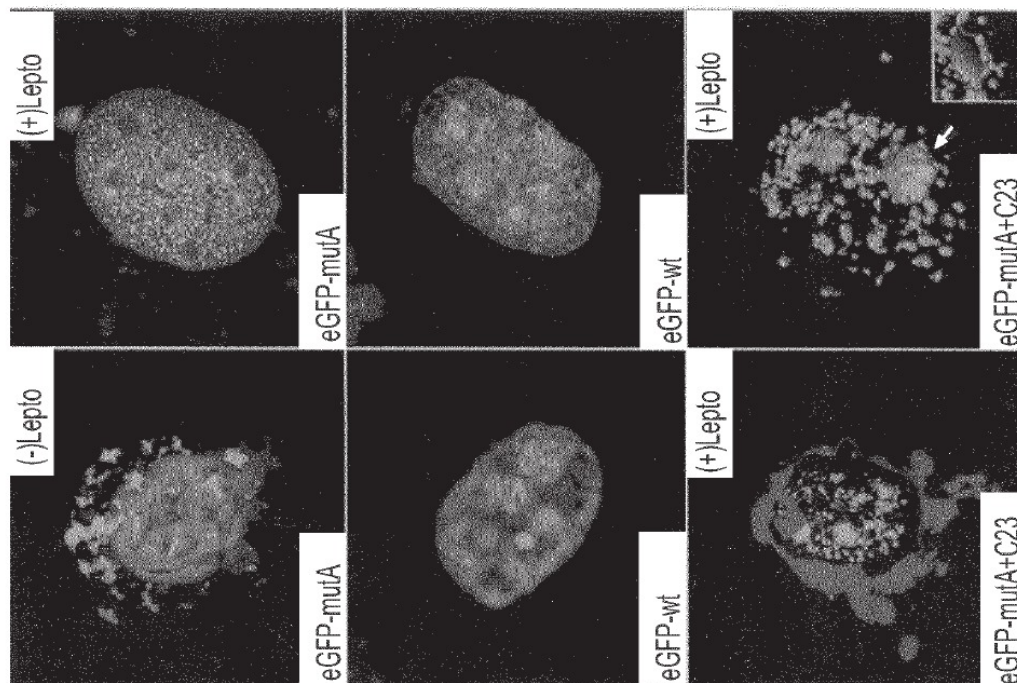


FIG. 8A

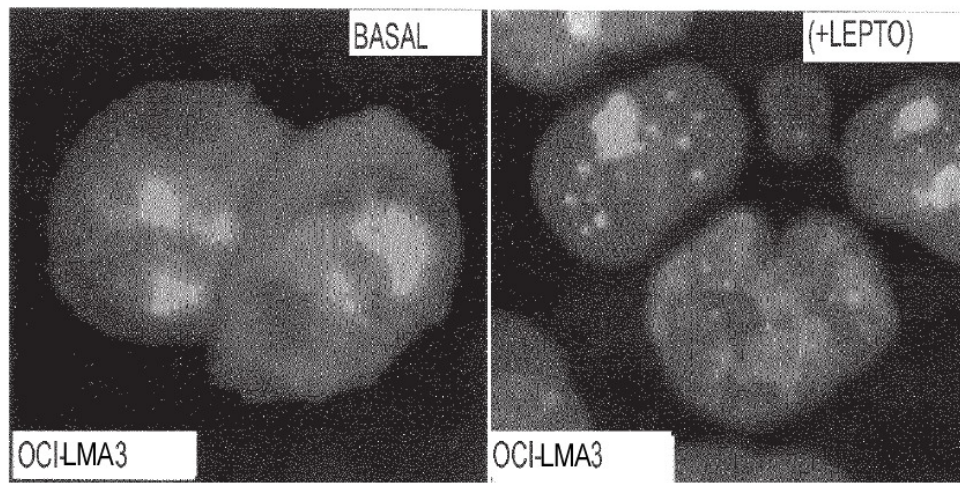


FIG. 9A

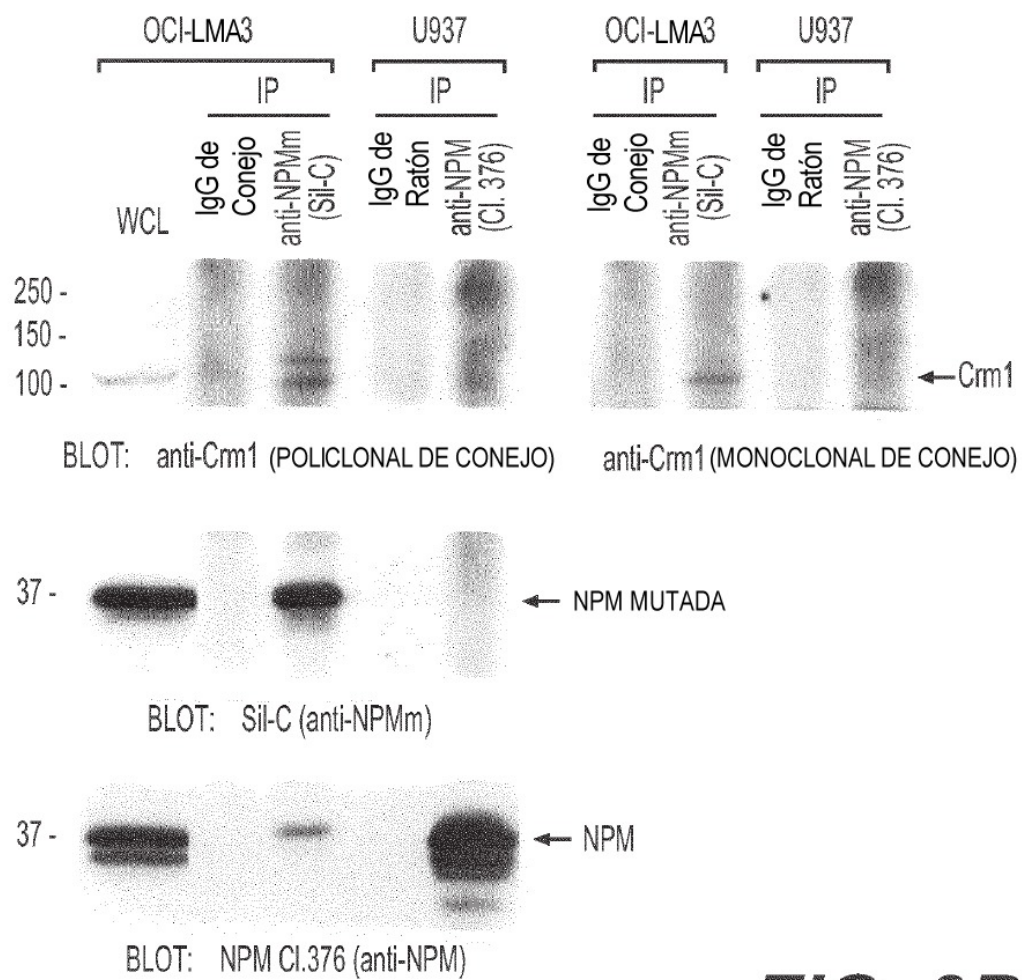


FIG. 9B

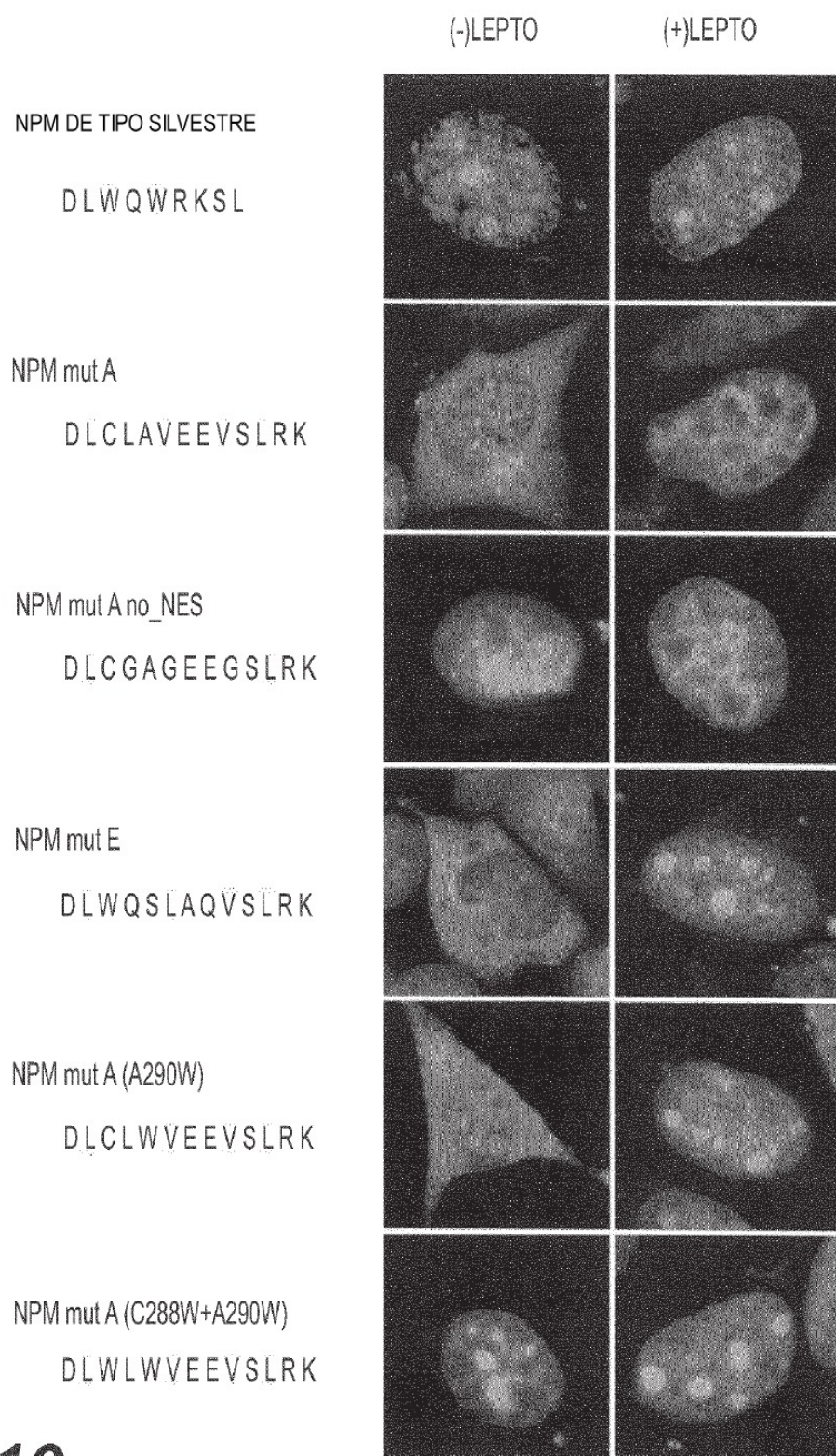


FIG. 10

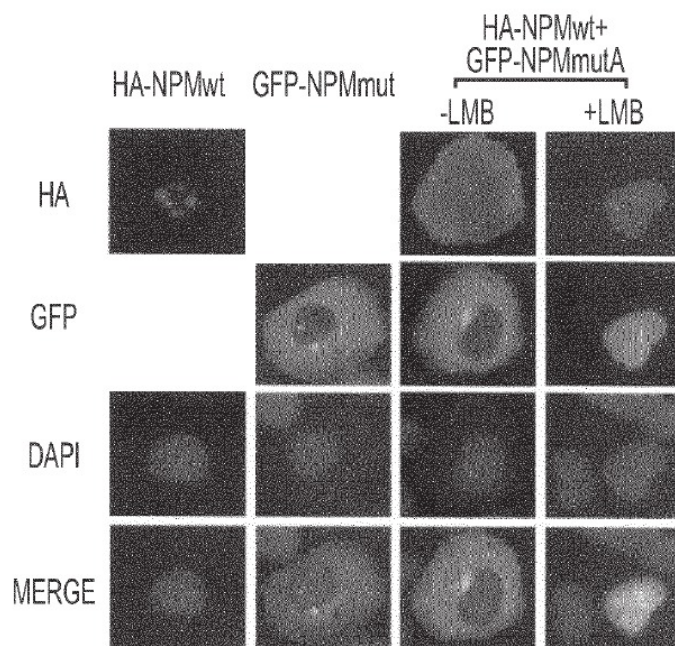


FIG. 11A

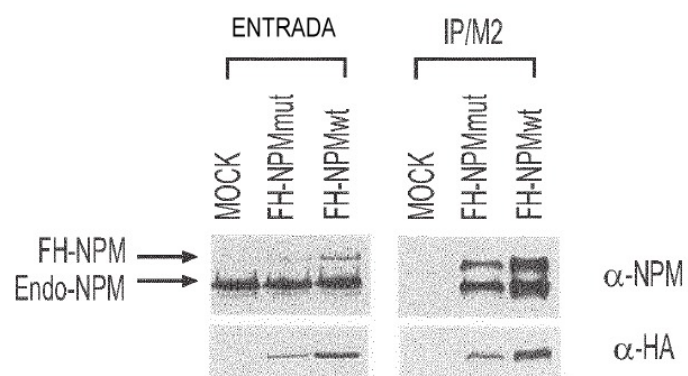


FIG. 11B

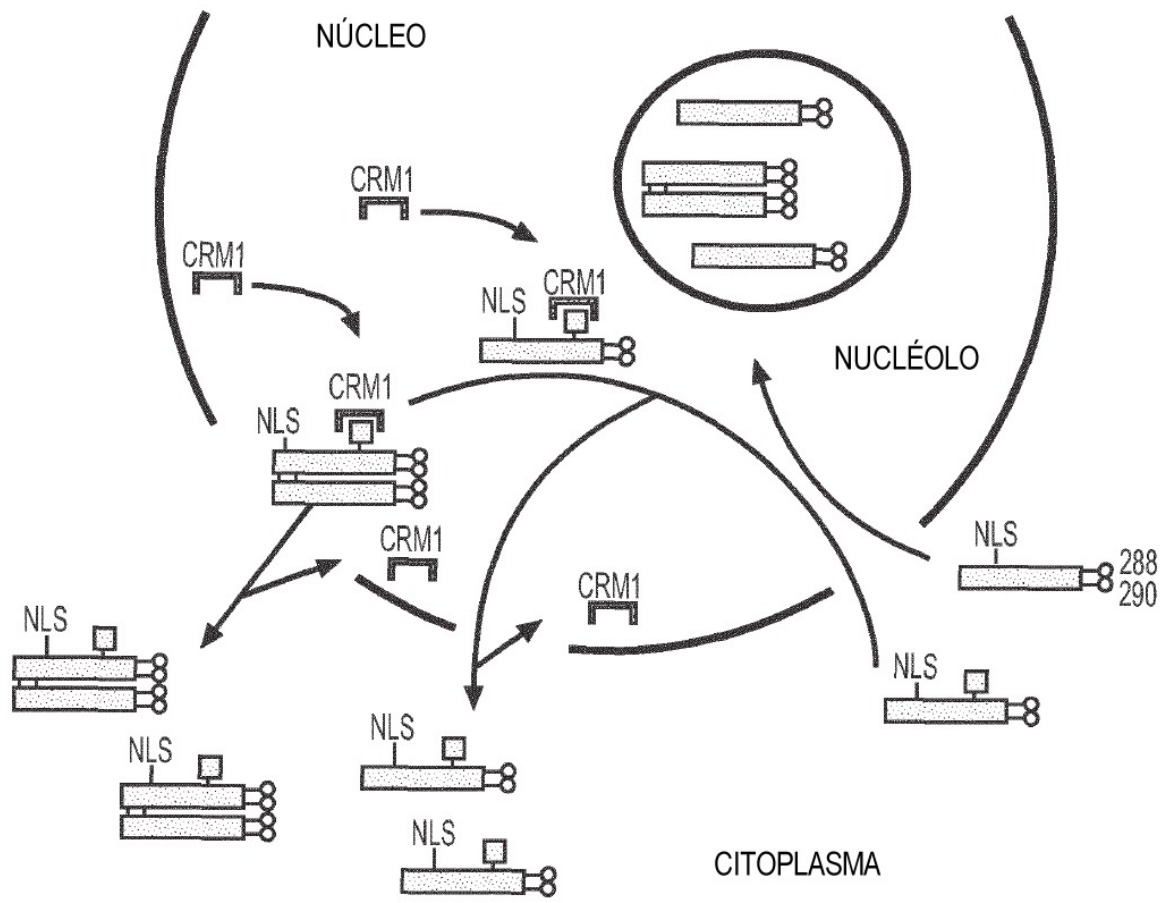


FIG. 11C

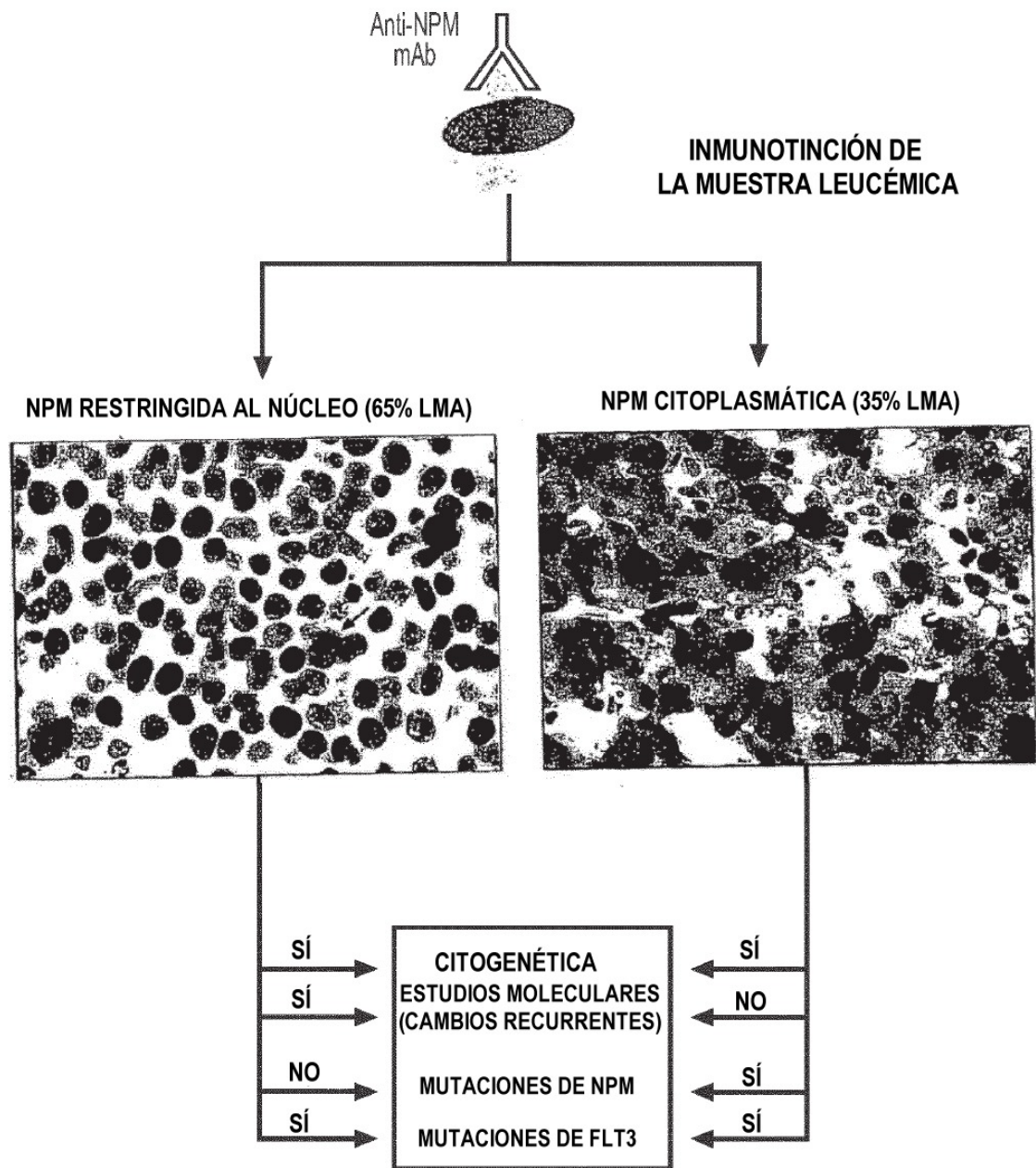
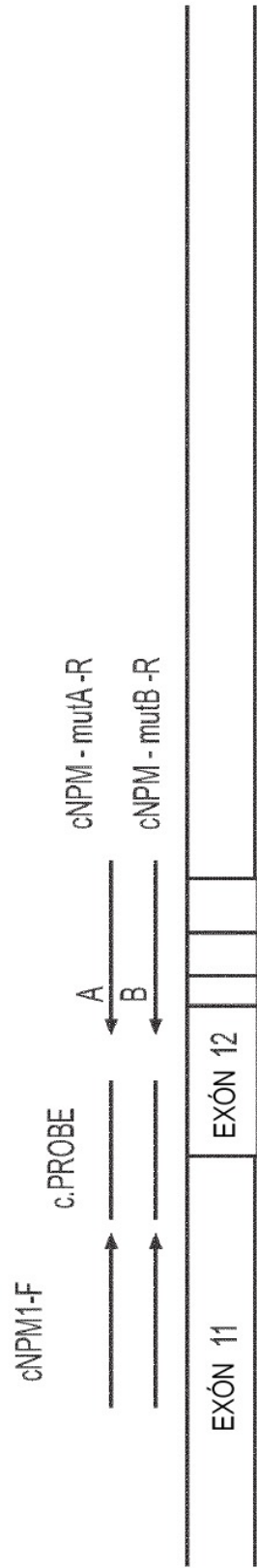
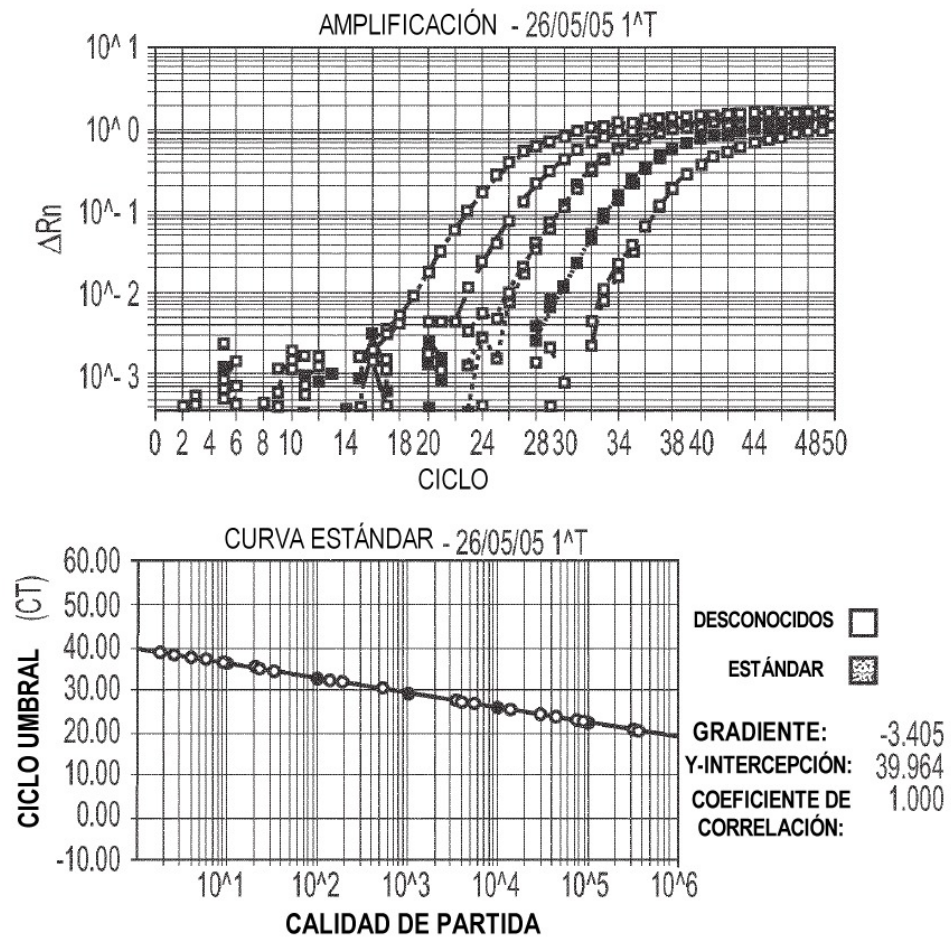


FIG. 12



SISTEMAS DE ADNc		
cNPM-F	5'-GAAGAATTGCTTCGGATGACT-3'	SEQ ID NO. 52
cPROBE	5'-FAM-ACCAAGAGGCTATTCAA-MGB-3'	SEQ ID NO. 55
cNPM mut.A-R	5'-CTTCCTCCACTGCCAGACAGA-3'	SEQ ID NO. 53
cNPM mut.B-R	5'-TTCCTCCACTGCCATGCAG-3'	SEQ ID NO. 54

FIG. 13



	RÉPLICAS	COPIAS DE PLÁSMIDOS					GRADIENTE	R ²
		100000	10000	1000	100	10		
CT (EXP. 1)	1	22.68	26.22	29.59	32.29	36.08	-3.29	0.998
	2	22.67	25.87	29.62	32.53	35.80		
CT (EXP. 2)	1	22.58	26.34	29.69	32.96	36.58	-3.43	0.999
	2	22.50	26.34	29.70	32.82	36.20		
CT (EXP. 3)	1	22.63	26.51	29.71	33.16	36.69	-3.51	0.999
	2	22.63	26.35	29.85	33.33	36.86		
CT (EXP. 4)	1	22.50	26.58	29.42	33.33	35.73	-3.31	0.999
	2	22.49	26.54	29.55	33.10	36.40		
CT MEDIA		22.59	26.34	29.64	32.94	36.29	-3.38	

FIG. 14

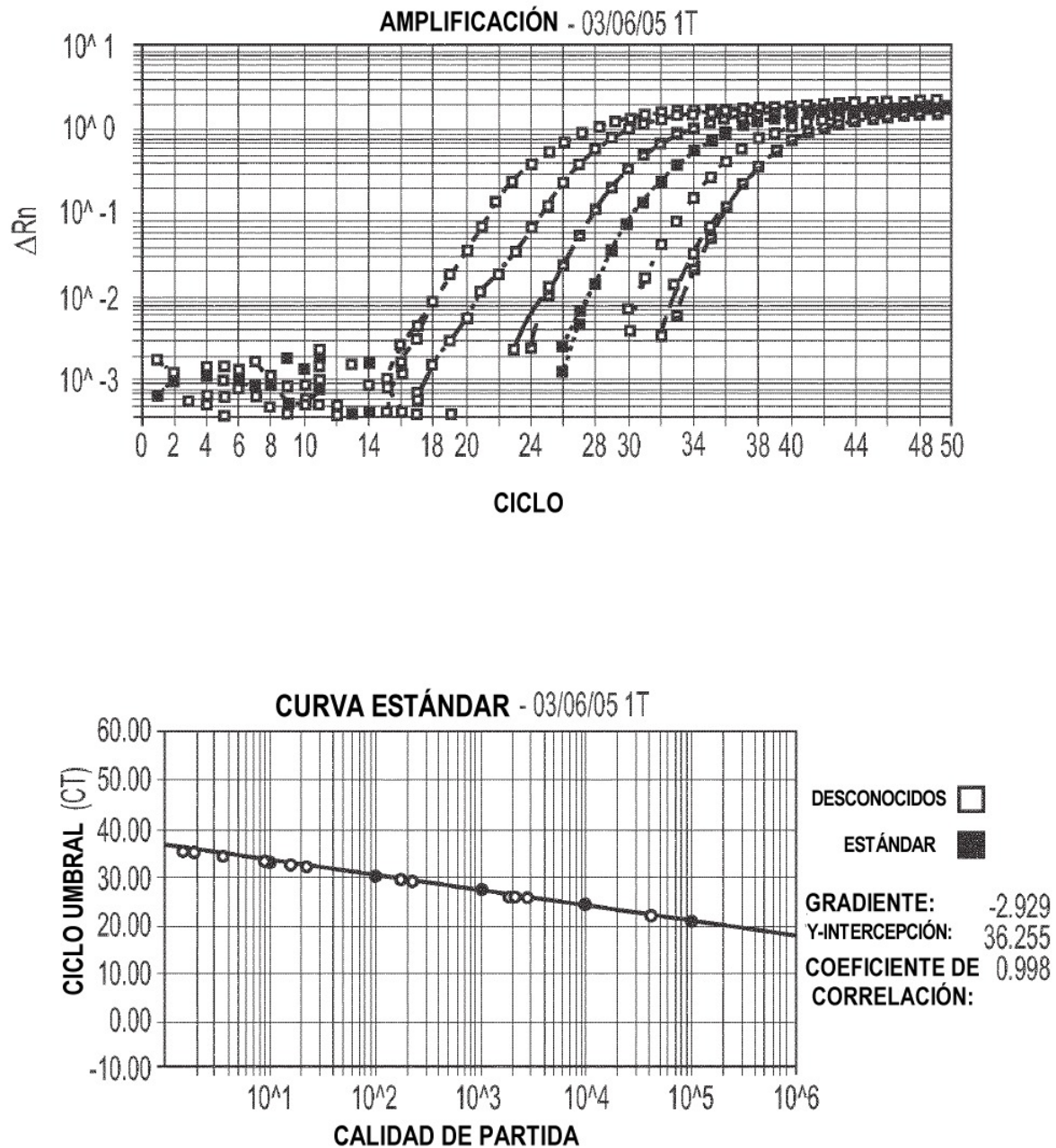


FIG. 15A

CARACTERÍSTICA DE LAS CURVAS DE AMPLIFICACIÓN PARA SERIES DE DILUCIÓN								
MUTACIÓN	MUESTRAS	SENSIBILIDAD MÁXIMA REPRODUCIBLE (MRS)	SENSIBILIDAD MÁXIMA	CT MEDIA DE LA MRS	MEDIA DE AMPLIFICACIÓN DE FONDO (PB-MNC)	Nº DE POCILLOS POSITIVOS DE FONDO	GRADIENTE DE LA CURVA DE DILUCIÓN	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN
A	Iº	-4	-6	35,37	NA	NA	-3,4	1
	IIº	-4	-6	35,77	NA	NA	-2,9	0,997
	IIIº	-4	-6	33,16	49,5	1/2	-3	0,998
	IVº	-4	-5	33,48	NA	NA	-2,9	0,997
B	Iº	-4	-6	31,71	NA	NA	-3,1	0,991

FIG. 15B

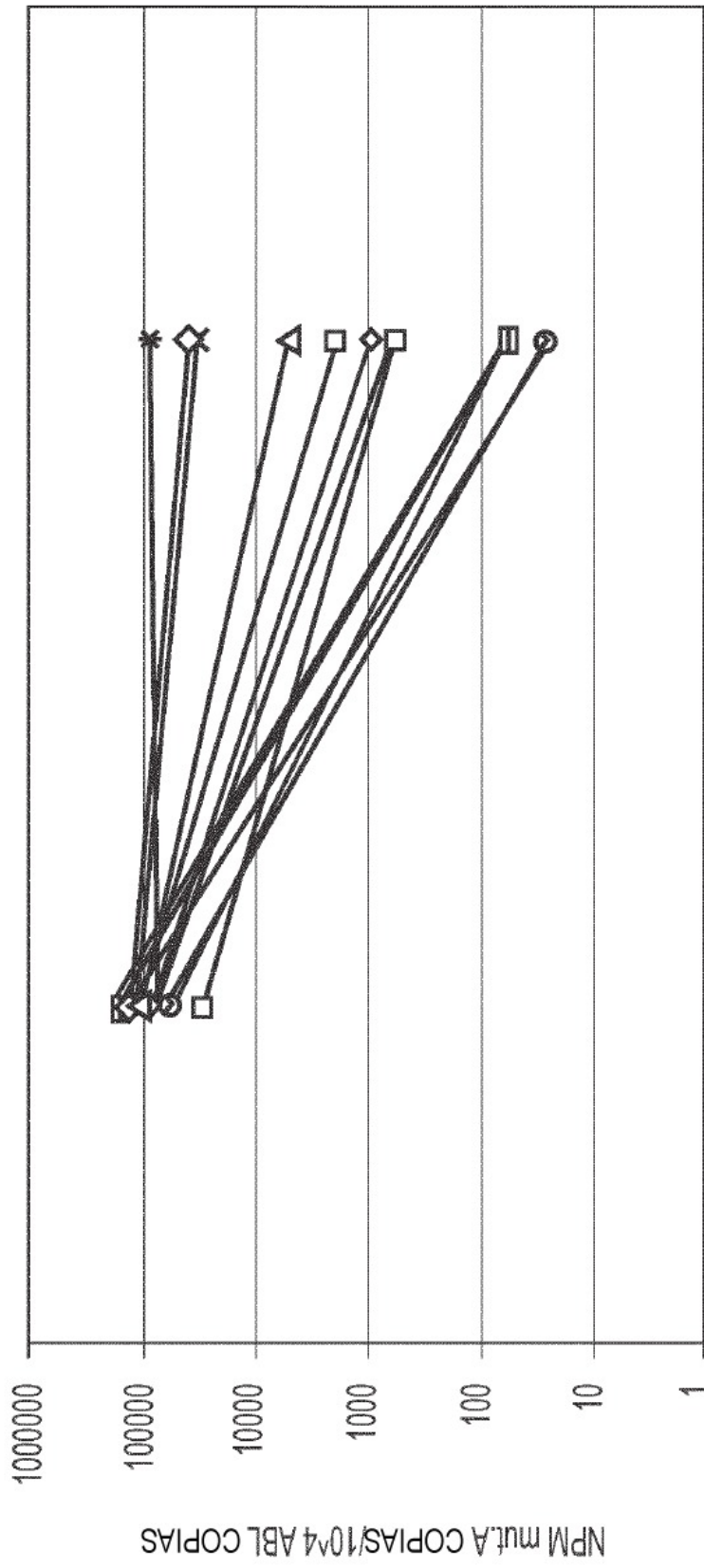


FIG. 16

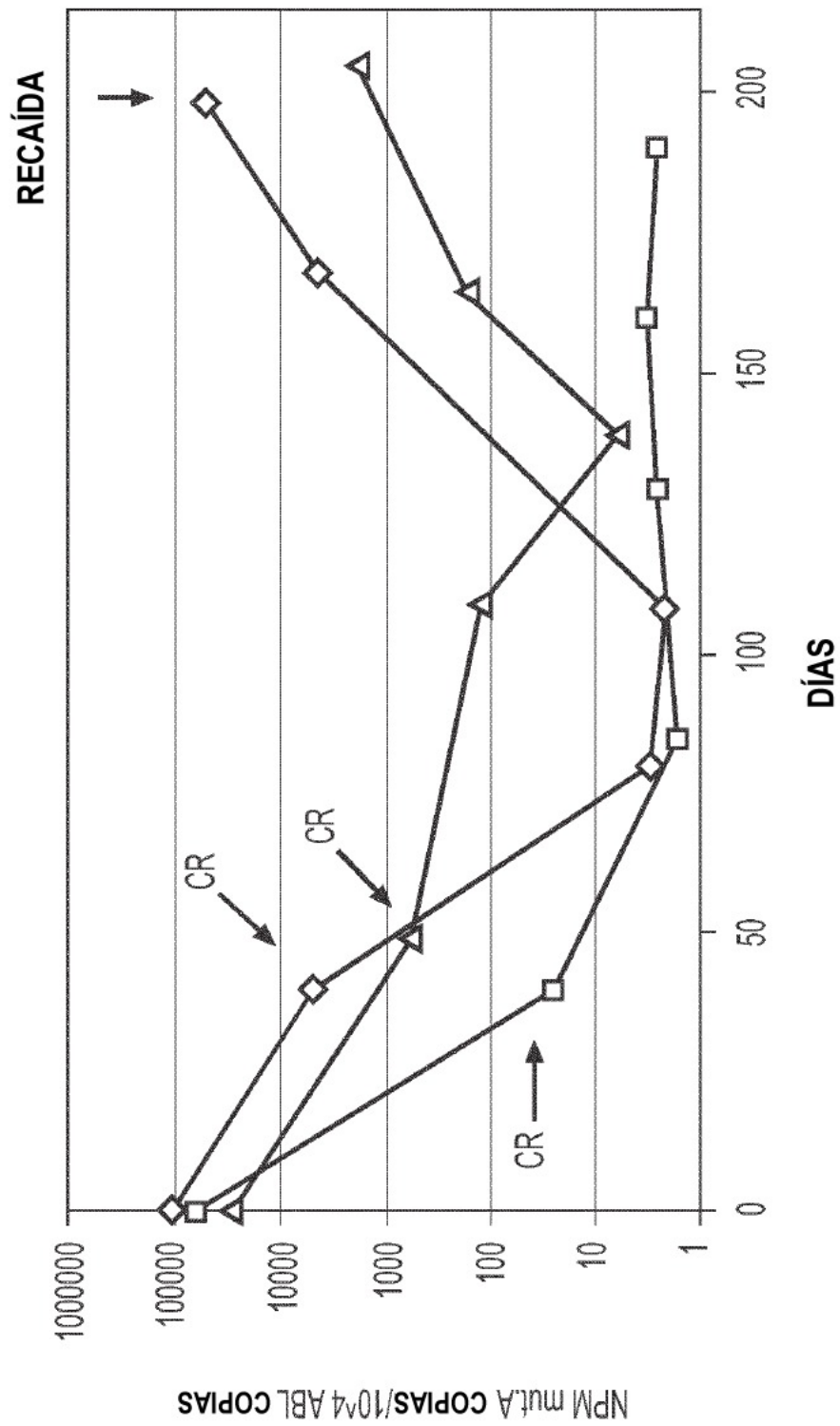


FIG. 17