

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 796**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2008.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

**G01N 33/573** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.02.2015 PCT/EP2015/054209**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.09.2015 WO15132163**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.02.2015 E 15706833 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018 EP 3114233**

54 Título: **Un método de predicción de la capacidad de respuesta de un paciente a un tratamiento con un anticuerpo anti-CD20**

30 Prioridad:

**03.03.2014 EP 14305297**

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

**04.07.2018**

73 Titular/es:

**ASSISTANCE PUBLIQUE HÔPITAUX DE PARIS (25.0%)**

**3 Avenue Victoria**

**75004 Paris, FR;**

**UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT (PARIS 7) (25.0%);**

**UNIVERSITÉ DE NICE SOPHIA ANTIPOLIS**

**(25.0%) y**

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA**

**RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (25.0%)**

72 Inventor/es:

**CHICHE, JOHANNA;**

**THIEBLEMONT, CATHERINE y**

**RICCI, JEAN-EHRLAND**

74 Agente/Representante:

**VEIGA SERRANO, Mikel**

ES 2 674 796 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

Un método de predicción de la capacidad de respuesta de un paciente a un tratamiento con un anticuerpo anti-CD20

### 5 Sector de la técnica

La presente invención se refiere a un método de predicción de la capacidad de respuesta de un paciente a un tratamiento con un anticuerpo anti-CD20.

### 10 Estado de la técnica

Los anticuerpos contra CD20 han confirmado la hipótesis de que los reactivos monoclonales se pueden administrar *in vivo* para aliviar enfermedades humanas. La orientación selectiva del CD20 en linfocitos B normales, malignos y autoinmunes por rituximab ha demostrado beneficios sustanciales para pacientes con una variedad de linfomas de células B, así como algunos con trastornos autoinmunes. Ha habido un aumento notable en los índices de supervivencia del linfoma de células B en la década desde que se introdujo la terapia anti-CD20.

La terapia con anticuerpos monoclonales (AM) con el AM anti-CD20 rituximab representa uno de los avances más importantes en el tratamiento de los trastornos linfoproliferativos en los últimos 30 años. Antes de su introducción, solo había habido una mejora modesta en el resultado del tratamiento de enfermedades tales como linfoma folicular (LF) y linfoma difuso de células B grandes (LDCBG). Sin embargo, el uso de rituximab, particularmente en combinación con diversos regímenes de quimioterapia/radioterapia, ha mejorado significativamente todos los aspectos de las estadísticas de supervivencia para estos pacientes. Además, el rituximab está aprobado o se está investigando para el tratamiento de muchos otros trastornos hematológicos que van desde otros tumores malignos, tales como leucemia linfocítica crónica (LLC), hasta trastornos autoinmunes, tales como púrpura trombocitopénica inmunológica y trombótica y artritis reumatoide (Lim *et al. Haematologica*. 2010; 95(1): 135-143).

A pesar del éxito de la terapia anti-CD20, la resistencia se produce en aproximadamente la mitad de los pacientes, lo que resulta en la falta de respuesta al tratamiento o la recaída temprana de la enfermedad original.

Se ha demostrado claramente que el número de células que expresan CD20 además de la densidad de la superficie celular CD20 determina la sensibilidad del AM anti-CD20 en una etapa temprana (Tsai *et al.*, 2012). Por lo tanto, investigar la regulación de la expresión de CD20 es de especial interés.

La discriminación molecular de los respondedores frente a los no respondedores al anticuerpo anti-CD20 llega a ser de interés clínico principal, y existe una necesidad permanente en la técnica de biomarcadores pronósticos que podrían ayudar a los médicos a proporcionar a los pacientes una gestión optimizada de la atención con anticuerpos anti-CD20. El documento WO 2013/020690 enseña un método de predicción de la respuesta de un paciente con LDCBG a un tratamiento con rituximab basado en el patrón de expresión génica.

40

### Objeto de la invención

La presente invención se refiere a un método de predicción de la capacidad de respuesta de un paciente a un tratamiento con un anticuerpo anti-CD20, comprendiendo dicho método la medición del nivel de expresión de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en las células B obtenidas a partir de dicho paciente.

Un nivel elevado de la expresión de GAPDH es predictivo de una respuesta a un tratamiento con un anticuerpo anti-CD20.

Los pacientes con una expresión elevada de GAPDH tienen una expresión de CD20 más alta y una mejor respuesta a la terapia basada en CD20.

### Descripción detallada de la invención

La expresión "predicción de la capacidad de respuesta de un paciente a un tratamiento con un anticuerpo anti-CD20", debe entenderse ampliamente, abarca una predicción realizada antes de iniciar cualquier tratamiento con un anticuerpo anti-CD20 y una predicción realizada durante un tratamiento con un anticuerpo anti-CD20.

El método de la presente invención permite la detección de una resistencia a una terapia anti-CD20.

60

Por consiguiente, la presente invención también se refiere a un método de detección de la resistencia a un anticuerpo anti-CD20 de un paciente sometido a un tratamiento con un anticuerpo anti-CD20, comprendiendo dicho método la medición del nivel de expresión de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en las células B obtenidas a partir de dicho paciente.

65

Un nivel bajo de la expresión de GAPDH es predictivo de una falta de respuesta a un tratamiento con un anticuerpo

anti-CD20.

La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) cataliza la reacción de la gliceraldehído-3-fosfato (G3P) + NAD<sup>+</sup> + Pi en 1,3 difosfoglicerato + NADH + H<sup>+</sup>. GAPDH es una enzima clave de la vía glucolítica.

5 De acuerdo con la presente invención, "anticuerpo" o "inmunoglobulina" tienen el mismo significado, y se utilizarán por igual en la presente invención. El término "anticuerpo", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se unen inmuno específicamente a un antígeno. Como tal, el término anticuerpo abarca no solo moléculas de anticuerpo completas, sino también fragmentos o derivados de anticuerpos. Los fragmentos de anticuerpo incluyen, entre otros, Fv, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fab', dsFv, scFv, sc(Fv)<sub>2</sub> y diacuerpos.

Preferentemente, dicho anticuerpo anti-CD20 es un anticuerpo monoclonal.

15 La terapia dirigida a CD20 es bien conocida, véase, por ejemplo, el estudio de van Meerten *et al. Neth J Med.* 2009 julio-agosto; 67(7):251-9, Lim *et al. Haematologica.* 2010; 95(1): 135-143) y Cang *et al. Journal of Hematology & Oncology* 2012, 5:64.

20 La expresión "anticuerpo anti-CD20" se refiere a un anticuerpo dirigido contra el antígeno CD20. El antígeno CD20 se expresa en linfocitos B.

Los ejemplos de anticuerpos anti-CD20 incluyen, entre otros, rituximab, ibritumomab, ofatumumab, ocrelizumab, PRO131921, veltuzumab, AME-133v, tositumomab, GA-101.

25 Preferentemente, dicho anticuerpo anti-CD20 es rituximab.

El término "paciente" se refiere a cualquier sujeto (preferentemente ser humano) aquejado de una enfermedad que probablemente se beneficiará de un tratamiento con un anticuerpo anti-CD20.

30 Dicha enfermedad se selecciona preferentemente entre las enfermedades que están asociadas con una proliferación o con una activación excesiva de células B. Las enfermedades se pueden seleccionar entre el grupo que consiste en linfoma de células B no Hodgkin, tales como por ejemplo linfoma folicular (LF), linfoma de Burkitt y linfoma difuso de células B grandes (LDCBG), macroglobulinemia de Waldenström, leucemia, tal como leucemia linfocítica crónica (LLC); y enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoide, anemia hemolítica autoinmune idiopática, aplasia pura de glóbulos rojos, púrpura trombocitopénica idiopática, síndrome de Evans, vasculitis, esclerosis múltiple, trastornos cutáneos ampollosos (por ejemplo, pénfigo, penfigoide), diabetes mellitus tipo 1, síndrome de Sjögren, enfermedad de Devic, granulomatosis de Wegener, poliangeitis microscópica y lupus eritematoso sistémico.

40 Preferentemente, el paciente es un paciente con linfoma de células B, más preferentemente un paciente con linfoma difuso de células B grandes.

45 El linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) es el tipo más común de linfomas no Hodgkin (NH) en adultos (Alizadeh *et al.*, 2000). A pesar de un beneficio de supervivencia evidente cuando LDCBG son tratados con el anticuerpo monoclonal anti-CD20 rituximab (R) además de las antraciclinas multiagentes convencionales que contienen quimioterapias con ciclofosfamida, hidroxidaunorrubicina, oncovina, prednisona (CHOP), una proporción significativa de pacientes (0,40 %) todavía demuestran un resultado clínico pobre ya que experimentan un fracaso del tratamiento definido como la falta de respuesta a la quimioterapia combinada con rituximab en el contexto de la terapia de primera línea o la respuesta parcial o la recaída después de la quimioterapia inicial (Thieblemont y Gisselbrecht, 2009). Se ha demostrado claramente que el número de células que expresan CD20 además de la densidad de la superficie celular CD20 determina la sensibilidad a rituximab en una fase temprana (Tsai *et al.*, 2012).

El nivel de expresión de GAPDH en células B obtenidas a partir del paciente puede determinarse utilizando cualquier técnica adecuada para detectar niveles de GAPDH en células.

55 Normalmente, el nivel de expresión de GAPDH puede determinarse mediante PCR cuantitativa (qPCR) o inmunohistoquímica o midiendo la actividad enzimática de GAPDH.

Normalmente, las células B se obtienen de una biopsia, preferentemente una biopsia de ganglio linfático o de una muestra de sangre.

60 La citometría de flujo también se puede utilizar para obtener células B.

65 Un ejemplo del método de medición del nivel de la expresión de GAPDH en células B es: las células se permeabilizan y se fijan utilizando la solución BD Cytotfix/cytoperm (BD Biosciences) y se incuban a 4 °C durante 20 min. Las células se lavan después en un tampón que contiene saponina (BD Perm/Wash) y se vuelven a suspender en el mismo tampón que contiene un anticuerpo anti-GAPDH (Abcam ab9485, dilución 1/100) y se incuban durante 30 min a 4 °C. Las células se lavan dos veces con el tampón que contiene saponina y se incuban con un anticuerpo

anti-conejo acoplado a alofocianina (APC) (dilución 1/100) durante 30 min a 4 °C en el mismo tampón. Después de lavarse dos veces en el tampón que contiene saponina, las células se vuelven a suspender en TFS/SBF al 2 % y se analizan por medio de citometría de flujo.

5 El método de la invención puede comprender además una etapa de comparación del nivel de la expresión de GAPDH con los valores de referencia obtenidos del grupo de pacientes respondedores y no respondedores, en el que la detección diferencial en el nivel de expresión de GAPDH con los valores de referencia es indicativo de si el paciente será respondedor o no al tratamiento con un anticuerpo anti-CD20.

10 Un paciente "respondedor" se refiere a un paciente que muestra un alivio clínicamente significativo en la enfermedad cuando se trata con un anticuerpo anti-CD20.

Después de someterse a un ensayo de la capacidad de respuesta a un tratamiento con un anticuerpo anti-CD20, los pacientes pueden prescribirse con dicho anticuerpo anti-CD20 o si el tratamiento con anticuerpos anti-CD20 ya se ha iniciado, el tratamiento anti-CD20 puede continuarse.

15 Una realización de la invención se refiere a un método de tratamiento con un anticuerpo anti-CD20 de un paciente en necesidad del mismo, en el que dicho método comprende las siguientes etapas:

20 a) identificación de la capacidad de respuesta de un paciente al tratamiento con un anticuerpo anti-CD20 con el método de predicción de la capacidad de respuesta de acuerdo con la invención; y  
b) tratamiento con un anticuerpo anti-CD20 del paciente respondedor identificado.

La invención también se refiere a un anticuerpo anti-CD20 para su uso en un método de tratamiento de un paciente en necesidad del mismo, en el que dicho método comprende las siguientes etapas:

25 a) identificación de la capacidad de respuesta de un paciente al tratamiento con un anticuerpo anti-CD20 con el método de predicción de la capacidad de respuesta de acuerdo con la invención; y  
b) tratamiento con un anticuerpo anti-CD20 del paciente respondedor identificado.

30 Por consiguiente, la invención se refiere a un anticuerpo anti-CD20 para su uso en un método de tratamiento de un paciente en necesidad del mismo, en el que dicho paciente se ha identificado como receptivo con el método de predicción de la capacidad de respuesta de acuerdo con la invención.

35 El método se puede realizar en pacientes antes de comenzar cualquier tratamiento con un anticuerpo anti-CD20, el método permite la identificación de pacientes que responderán al tratamiento con anticuerpos anti-CD20.

Alternativamente, el método se puede realizar en pacientes que ya se someten a un tratamiento con anticuerpos anti-CD20, el método permite la identificación de pacientes que aún responden al tratamiento con anticuerpos anti-CD20.

40 En caso de que los pacientes se identifiquen como resistentes, es decir, que ya no responden al tratamiento con anticuerpos anti-CD20, el tratamiento con anticuerpos anti-CD20 se interrumpe o se adapta con el fin de aumentar la expresión de CD20 en las células B.

#### 45 Descripción de las figuras

La invención se ilustrará adicionalmente mediante el siguiente ejemplo y figura. Sin embargo, este ejemplo y figura no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance de la presente invención.

50 **Figura 1: la expresión de GAPDH aumenta la expresión de CD20 y es un factor de pronóstico favorable para pacientes con LDCBG tratados con una terapia basada en anti-CD20.**

A. Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier para la supervivencia general de pacientes con LDCBG clasificados de acuerdo con los niveles de expresión de ARNm de *gapdh*.

55 **Figura 2. A.** Expresión de GAPDH en una estirpe celular de linfoma de Burkitt (células Raji) incubada en condiciones de normoxia (21 % de O<sub>2</sub>) o en condiciones de hipoxia (1 % de O<sub>2</sub>) durante 24 horas. **B. Izquierda:** Superposiciones representativas del histograma del efecto obtenido sobre la expresión de la superficie celular CD20 después de 48 horas de incubación normóxica (N) o hipóxica al 1 % de O<sub>2</sub> (Hx) de las células Raji del linfoma de Burkitt vivas. **Derecha:** Cuantificación de la intensidad media de fluorescencia (CD20) en células Raji vivas tratadas (AK) o no (-; DMSO) con un inhibidor de GAPDH AK (0,1 µg/ml) y expuestas a condiciones de normoxia o hipoxia durante 48 h.

60 **Figura 3.** Expresión de la superficie celular CD20 y expresión intracelular de GAPDH determinada por CCAP (intensidad media de fluorescencia) en la estirpe celular RL del linfoma folicular humano.

65

**Figura 4: A. B.** Curvas de Kaplan-Meier de supervivencia general (SG) de acuerdo con el tratamiento y el nivel de ARNm de *gapdh*. (n=117 para pacientes con *gapdh*<sup>bajo</sup> y n=116 para pacientes con *gapdh*<sup>alto</sup> en el grupo R-CHOP (A.); n=91 para pacientes con *gapdh*<sup>bajo</sup> y n=90 para pacientes con *gapdh*<sup>alto</sup> en el grupo CHOP (B.)).

5 **Ejemplos**

**EJEMPLO 1**

**Resumen**

10 A pesar de sus funciones en el metabolismo, el papel de las enzimas glucolíticas en el cáncer sigue siendo difícil de alcanzar. En este caso se muestra que la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), pero no otra enzima glucolítica sometida a ensayo, aumentó la agresividad y vascularización del linfoma. Mecánicamente, GAPDH activa NF-κB mediante su unión al factor-2 asociado al receptor de TNF (TRAF2), lo que resulta en un aumento en la transcripción de hif-1α y en una regulación positiva de la expresión de CD20. Entre los pacientes con linfoma difuso de células B grandes (LDCBG) sometidos a ensayos, aquel que tuviera niveles más elevados de GAPDH presentó más expresión de CD20 y tuvo un mejor resultado con el tratamiento con rituximab. Por lo tanto, GAPDH participa en un bucle de retroalimentación positiva que promueve la activación de NF-κB/HIF-1 que favorece la expresión de CD20 y, por lo tanto, puede representar un factor de pronóstico favorable para pacientes con LDCBG tratados con una terapia anti-CD20.

**INTRODUCCIÓN**

25 El presente estudio se llevó a cabo para investigar si las enzimas glucolíticas específicas podrían desempeñar un papel en el desarrollo del cáncer y la respuesta a la quimioterapia. Se realizó principalmente utilizando el modelo de ratón transgénico Eμ-Myc, en el cual todos los animales desarrollan espontáneamente un linfoma en estadio pre-B o B clonal que se asemeja a linfomas B NH humanos (Harris *et al.*, 1988), tipos de tumores altamente glucolíticos y agresivos. Se determinó que la GAPDH, pero no otra enzima glucolítica sometida a ensayo, contribuye a un aumento en el crecimiento y la vascularización del linfoma. Las investigaciones mecánicas revelaron que la regulación de HIF-1α con GAPDH está mediada por la activación de NF-κB, un proceso estimulado por la interacción de GAPDH con TRAF2. Es importante destacar que, el control mediado por GAPDH del eje NF-κB/HIF-1α en condiciones de hipoxia conduce a un aumento en la expresión de CD20, permitiendo que los pacientes con LDCBG que expresan un nivel elevado de GAPDH presenten una mejor supervivencia con el tratamiento basado en Rituximab.

**RESULTADOS**

**El aumento de la expresión de GAPDH acelera la linfomagénesis estimulada por cMyc.**

40 Los ratones Eμ-Myc desarrollan un linfoma muy agresivo y mueren pocos meses después del nacimiento. Al monitorear la esperanza de vida de los ratones Eμ-Myc, se observó que la mayoría de ellos se podían reagrupar en dos grupos: aquel que desarrolla linfomas altamente agresivos ("alto", supervivencia media inferior a 11 semanas, n=15) en comparación con aquel que desarrolla un linfoma menos agresivo ("bajo", supervivencia media de 20 semanas, n=10). De conformidad con el efecto de Warburg, se observó que los linfomas altamente agresivos son más glucolíticos que los de menor agresividad, ya que producen más lactato *in vivo*. Sorprendentemente, cuando se monitorizó la expresión de varias enzimas glucolíticas, se observó que solo una, la GAPDH, se sobreexpresaba significativamente (dos veces) en el grupo "altamente" agresivo en comparación con el grupo "bajo". Este aumento en los niveles de la proteína GAPDH se correlacionó estrechamente con el aumento de la actividad específica de GAPDH en los ganglios linfáticos del grupo "alto".

50 Para evaluar el papel de GAPDH en la agresividad del linfoma, las células del linfoma primario B aisladas de los ratones Eμ-Myc se silenciaron de forma estable (*shgapdh*) o no (*shctl*) para GAPDH endógena (véase el procedimiento experimental). Si bien la reducción parcial en la expresión de GAPDH no tuvo impacto en la proliferación *in vitro* de células Eμ-Myc, los ratones inyectados con células Eμ-Myc-*shgapdh* sobrevivieron más tiempo que los controles y presentaron una disminución en el peso total de los ganglios linfáticos axilares. Se validó tras el sacrificio que los tumores de ganglios linfáticos obtenidos a partir de células Eμ-Myc-*shgapdh* presentaban realmente una reducción en la expresión de GAPDH y una actividad específica de GAPDH en comparación con los controles. También se verificó que las células recogidas de los tumores de ganglios linfáticos tenían la misma extensión de células CD19+/GFP+ en cada grupo.

60 Para confirmar aún más el papel específico de la expresión de GAPDH en la progresión del linfoma, ésta se sobreexpresó en células de linfoma primario Eμ-Myc. La sobreexpresión de GAPDH aceleró significativamente el crecimiento del linfoma y, por lo tanto, disminuyó la esperanza de vida de los ratones en comparación con el grupo de control (pMIG). A diferencia de GAPDH-V5, la sobreexpresión de enolasa-1 marcada con V5 (ENOL-V5, otra enzima glucolítica no limitante) o la piruvato-quinasa M2 (PKM2-V5, la última enzima limitante de la glucólisis) no modificó la esperanza de vida de los ratones en comparación con la que se obtuvo con las células de control. La

reducción de la supervivencia tras la sobreexpresión de GAPDH se correlacionó estrechamente con el aumento en el tamaño de los ganglios linfáticos en comparación con otros grupos a pesar de la misma tasa de proliferación *in vitro* en la condición basal (normóxica). Tras el sacrificio, se aislaron las células de linfoma de cada grupo y se verificó que las células que expresan GAPDH-V5 estaban, de hecho, presentando un aumento en la actividad específica de GAPDH en comparación con los otros grupos. Digno de mención es que se obtuvieron resultados similares utilizando clones Eμ-Myc independientes.

Tras el análisis, no solo se observó que los ratones inyectados con células de linfoma que expresan GAPDH-V5 tienen ganglios linfáticos más grandes, sino que además estaban más vascularizados que los controles, como se demuestra por un aumento i) en el contenido de hemoglobina ii) en estructuras vascularizadas teñidas para el marcador CD31 endotelial en los ganglios linfáticos y iii) en el ARNm del factor angiogénico *vegf-α*. Curiosamente, los niveles de ARNm de la subunidad  $\alpha$  del factor de transcripción inducible por hipoxia *hif-1α* fueron más altos en GAPDH, pero no en las células de linfoma que sobreexpresan ENO o PKM2. Para generalizar más nuestras observaciones, se analizó la expresión de esos genes en pacientes con LDCBG mediante qPCR en tiempo real. De las 13 muestras de pacientes con LDCBG analizadas, 6 eran expresores "bajos" y 7 eran "altos" de ARNm de *gapdh* (véase los procedimientos experimentales). Como se observó *in vivo* utilizando el modelo Eμ-Myc, los pacientes que expresan el nivel más elevado de GAPDH presentan niveles elevados de ARNm de *hif-1α* y *vegf-α* pero no de *hif-2α* en comparación con los expresores de *gapdh* "bajos".

Tomados en conjunto, nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de GAPDH, pero no otra enzima glucolítica sometida a ensayo, participa en el aumento de la agresividad del linfoma.

#### **GAPDH regula la activación de NF-κB a través de su unión a TRAF2 y conduce a la inducción de HIF-1α.**

Como se pudo observar i) un aumento en el crecimiento tumoral y la vascularización de los linfomas que sobreexpresan GAPDH, ii) un aumento dependiente de GAPDH en los niveles de ARNm de *vegf-α* inducido por *hif-1α* e *HIF-1*, se investigó las consecuencias de la expresión de GAPDH en la expresión de HIF-1α y la actividad de HIF-1 en condiciones de hipoxia. Se observó en células primarias de Eμ-Myc y HeLa que la sobreexpresión de GAPDH fue capaz de aumentar la expresión de HIF-1α y la actividad transcripcional de HIF-1 después de 24 horas de condiciones de hipoxia. Vale la pena señalar que el nivel de expresión/actividad de GAPDH obtenido tras la sobreexpresión es acorde con una sobreexpresión fisiológica de GAPDH observada después de 24 horas de condiciones de hipoxia. La regulación positiva transcripcional de *hif-1α* observada en células Eμ-Myc *in vivo* se confirmó en células HeLa que sobreexpresaban GAPDH.

Además, el aumento en la expresión de HIF-1α observado en la expresión de GAPDH no pudo obtenerse con la expresión de PKM2 o ENO1, lo que indica una especificidad del efecto. Como se demostró recientemente (Luo *et al.*, 2011), se confirmó que la sobreexpresión de PKM2, si bien es incapaz de estabilizar la expresión de HIF-1α, aumenta su actividad en las células HeLa. Se estableció *in vitro* que la sobreexpresión de GAPDH no podía afectar a la proliferación celular en condiciones de normoxia, pero permitía que las células aumentaran la tasa de glucólisis y proliferación en un 0,30 % en condiciones de hipoxia. Estos resultados son acordes con la capacidad de GAPDH para activar HIF-1 en condiciones de hipoxia.

Acto seguido se verificó en células Eμ-Myc y HeLa que una disminución en los niveles de GAPDH utilizando ARNips conducía a una disminución en los niveles de ARNm de *hif-1α*, en la expresión de la proteína HIF-1α y en la expresión de genes dirigidos a HIF-1 en condiciones de hipoxia. Como resultado, la glucólisis y la proliferación se redujeron significativamente en condiciones de hipoxia. Curiosamente, el uso de dosis no tóxicas de un inhibidor específico de GAPDH, el ácido koningico (AK), reduce la actividad de GAPDH en un 50-60 % y fue capaz de simular la disminución en la actividad de HIF-1 y la expresión de HIF-1α observada con ARNip dirigido a GAPDH.

Puesto que NF-κB, un regulador clave de la transcripción de *hif-1α*, está controlado en parte por Akt, y como se ha establecido recientemente que GAPDH podría estabilizar la forma activa de Akt (Jacquin *et al.*, 2013), se investigó la activación de NF-κB en la expresión de GAPDH. De hecho, las células Eμ-Myc o HeLa que expresan establemente GAPDH (GAPDH-V5) o no (pMIG) se cultivaron en condiciones de normoxia o hipoxia durante 24 horas. No solo se confirmó que en condiciones de hipoxia GAPDH también fue capaz de aumentar la fosforilación de Akt, sino también fue capaz de aumentar la fosforilación de Ser32-36 de IκBα en condiciones de normoxia e hipoxia. Como resultado, la actividad transcripcional de NF-κB se incrementó cuando GAPDH se sobreexpresó o disminuyó cuando se silenció GAPDH. Si bien la expresión de GAPDH estabiliza fosfo-Akt, la inhibición de la activación de Akt utilizando un inhibidor específico de Akt no previno la fosforilación de IκBα. Por lo tanto, GAPDH puede inducir una activación de la vía NF-κB de una manera independiente de Akt.

Para investigar más a fondo la contribución de NF-κB en la regulación de HIF-1α por GAPDH, se utilizó una forma negativa dominante de IκBα (IκBαS32-36A). La expresión de IκBαS32-36A colapsó la actividad de NF-κB y la expresión de la proteína HIF-1α, lo que indica que se requiere la activación dependiente de NF-κB dependiente de GAPDH para la regulación mediada por GAPDH de HIF-1α. Curiosamente, esta observación se confirmó en muestras de pacientes con LDCBG ya que los expresores *gapdh* "altos" presentan una expresión aumentada de ARNm de *nfkbia*, una diana específica de NF-κB, que refleja la activación de NFκB (Bottero *et al.*, 2003).

Para demostrar que la vía clásica de NF- $\kappa$ B fue activada por GAPDH, las células HeLa silenciadas por *gapdh* se estimularon con TNF $\alpha$  en condiciones de hipoxia. Como resultado, las células silenciadas por *gapdh* no pudieron potenciar completamente la actividad de NF- $\kappa$ B, en comparación con las células de control estimuladas con TNF $\alpha$ .  
 5 Se confirmó además el papel de GAPDH en la activación de NF- $\kappa$ B utilizando la estirpe celular de Burkitt RAJI utilizando el ensayo del análisis de cambio en la corrida electroforética (EMSA). Si bien la estimulación con TNF $\alpha$  o la incubación hipóxica aumentan la unión de NF- $\kappa$ B a su secuencia consenso, la inhibición de GAPDH utilizando AK redujo su unión en condiciones de hipoxia y evitó la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B en células HeLa hipóxicas.

10 Recientemente se demostró que tras la infección bacteriana, se suprime la respuesta inflamatoria de la célula huésped, un proceso que implica la interrupción de la interacción GAPDH-TRAF2 (Gao *et al.*, 2013). Por consiguiente, se investigó la unión de GAPDH-TRAF2 a células E $\mu$ -Myc y HeLa y se demostró que GAPDH podría co-inmunoprecipitarse con TRAF2 cuando las células se cultivan en condiciones de hipoxia. La inhibición específica y parcial de GAPDH con AK en condiciones de hipoxia disminuye la actividad de NF- $\kappa$ B como resultado de una  
 15 pérdida de la interacción GAPDH-TRAF2. Además se sometió a ensayo esta interacción *in vivo*. Por ende, los ratones portadores de E $\mu$ -Myc se trataron una vez con TFS o con el inhibidor covalente del ácido koníngico (i.p) y se investigó la interacción de GAPDH/TRAF2 por co-inmunoprecipitación en tejidos, 24 horas después del tratamiento. Igualmente interesante, se puede confirmar que GAPDH puede unirse a TRAF2 *in vivo* y que una dosis eficaz de AK (5 mg/kg), pero no una dosis inactiva de AK (0,5 mg/kg), redujo la interacción observada entre esas proteínas  
 20 endógenas. Acto seguido, se confirmó *in vivo* que la inhibición de GAPDH (utilizando 5 mg/kg de AK) redujo el ARNm de hif-1 $\alpha$  *in vivo* que subyace en el enlace entre la expresión de GAPDH, NF- $\kappa$ B e HIF-1 $\alpha$ .

Para comprender mejor el vínculo subyacente entre GAPDH-NF- $\kappa$ B y la agresividad del linfoma, se utilizó un doble mutante de GAPDH (DM, GAPDH C152S y H179F) que es incapaz de mantener la función glucolítica de la enzima  
 25 (Colell *et al.*, 2007). Se verificó que DM no pudo unirse a TRAF2 para activar NF- $\kappa$ B y elevar la expresión de HIF-1 $\alpha$  en E $\mu$ -Myc hipóxica en comparación con GAPDH TS, lo que sugiere que el sitio catalítico de la enzima está desempeñando un papel en el efecto.

En consecuencia, las células E $\mu$ -Myc que sobreexpresan DM no podrían aumentar la progresión del linfoma *in vivo*  
 30 en contraposición a la sobreexpresión de GAPDH. Cabe destacar que no se pudo observar diferencia significativa alguna entre células E $\mu$ -Myc que expresan GAPDH y Bcl-xL (Bcl-xL se considera como un inductor de un linfoma muy agresivo). Finalmente, GAPDH pero no la expresión de DM ni Bcl-xL estaba conduciendo a un aumento en la secreción total de VEGF, como consecuencia de la activación de NF- $\kappa$ B e HIF-1. Se verificó en el sacrificio de los ratones que solo las células E $\mu$ -Myc que expresaban GAPDH estaban presentando más actividad de GAPDH y que  
 35 la expresión de la proteína indicada podía observarse en los ganglios linfáticos de los ratones inyectados.

Nuestro hallazgo indica que GAPDH, a diferencia de otras enzimas glucolíticas ensayadas, puede aumentar el crecimiento y la vascularización del linfoma *in vivo* y que este efecto fue mediado, al menos en parte, por la  
 40 capacidad de GAPDH para unirse a TRAF2, que a su vez contribuye a la activación de NF- $\kappa$ B y posterior activación de HIF-1.

**Activación dependiente de GAPDH de NF- $\kappa$ B/HIF-1 $\alpha$  conduce a la sobreexpresión de CD20 en células de linfoma.**

45 De manera intuitiva, recientemente se sugirió que un aumento en la expresión de HIF-1 $\alpha$  es un factor de pronóstico favorable en pacientes con LDCBG tratados con R-CHOP (Evens *et al.*, 2010). Como se observó que GAPDH aumenta la expresión de HIF-1 $\alpha$  en condiciones de hipoxia, se investigó la supervivencia general de pacientes con LDCBG para los que se analizaron previamente niveles de ARNm de *gapdh* por qPCR y que fueron tratados con  
 50 quimioterapia basada en Rituximab en el momento del diagnóstico. Sorprendentemente, si bien el 100 % de los pacientes que presentaban LDCBG con niveles "altos" de ARNm de *gapdh* seguían con vida 350 días después del diagnóstico, solo eran el 33 % del grupo *gapdh* "bajo". Sabiendo que este pronóstico favorable dependiente de HIF-1 $\alpha$  se observó en R-CHOP pero no en pacientes tratados con CHOP (Evens *et al.*, 2010), se investigó la expresión de *ms4a1* (gen codificante de CD20) y reveló que las muestras de LDCBG con *gapdh* "alto" presentan más expresión *ms4a1* que el grupo *gapdh* "bajo". El análisis inmunohistoquímico de la expresión de GAPDH y CD20  
 55 confirmó que una expresión débil de GAPDH (mostrada como un bajo porcentaje de células positivas) en las biopsias de LDCBG (pacientes n.º 1 y 2) se correlaciona con una nula/baja expresión de CD20. Por el contrario, una expresión alta de GAPDH (pacientes n.º 3 y 4) va acompañada de una fuerte expresión de CD20, lo que subyace más en la correlación entre la expresión de GAPDH y CD20 en muestras de pacientes.

60 Para profundizar en el mecanismo de expresión de CD20, se observó que a las 24 horas de condiciones de hipoxia, las células E $\mu$ -Myc primarias muestran un aumento de 2 veces en el nivel de ARNm de *ms4a1* en comparación con las condiciones de normoxia. También se estableció que la inhibición *in vivo* de GAPDH utilizando AK, que condujo a la incapacidad de GAPDH para unirse a TRAF2 y a una disminución en la expresión de hif-1 $\alpha$ , dio como resultado una reducción en la expresión de *ms4a1* en ratones con linfoma. Acto seguido, se confirmó los efectos de las  
 65 condiciones de hipoxia en la expresión de la superficie celular CD20 utilizando la estirpe celular de linfoma de Burkitt humano Raji.

## Resultados adicionales

5 Para ampliar esta observación, se utilizó un extenso conjunto de datos de perfil de expresión primaria de 414  
 10 pacientes con LDCBG (Lenz *et al.*, *N Engl J Med* 2008; 359: 2313-2323). Como se ha indicado anteriormente, se  
 dividió los pacientes tratados con R-CHOP como expresadores "altos" y "bajos" de cada gen glucolítico. Similar a las  
 observaciones iniciales, entre 9 enzimas glucolíticas (*gapdh*, *hekoquinasa-2 (hk2)*, *fosfoglucoasa isomerasa (pgi)*,  
*fosfofructoquinasa muscular (pfkm)*, *fosfoglicerato quinasa-1 (pgk-1)*, *fosfoglicerato mutasa-1 (pgam1)*, *enolasa-1*  
*(eno1)*, *piruvato quinasa (pk)* y *lactato deshidrogenasa-a (ldh-a)*, solo el nivel de expresión de *gapdh*, cuando se  
 eleva, define un resultado favorable con el tratamiento con R-CHOP (Figura 4A, p=0,03). Curiosamente, la expresión  
 de *gapdh* no mostró ninguna diferencia en la SG para los pacientes tratados con CHOP (Figura 4B).

## DISCUSIÓN

15 Las diferencias en el metabolismo se encontraban entre las primeras variaciones identificadas entre las células  
 normales y cancerosas. De hecho, las células cancerosas tienen que desarrollar diversas formas para adaptar el  
 metabolismo para apoyar la proliferación celular inapropiada y sostener la supervivencia en un contexto de tejido  
 anormal. Si bien la mayoría, si no todas, las enzimas glucolíticas se encuentran sobreexpresadas en la gran mayoría  
 de los cánceres (Altenberg y Greulich, 2004), su papel en la oncogénesis está lejos de ser comprendido. Durante  
 20 mucho tiempo se consideró que la sobreexpresión de las enzimas glucolíticas solo era necesaria para satisfacer la  
 demanda de energía de las células cancerosas. Sin embargo, recientemente, las funciones no glucolíticas de esas  
 enzimas están comenzando a aparecer en varios entornos, pero raramente en el contexto de los cánceres (Chang *et al.*,  
 2013; Colell *et al.*, 2007; Jacquin *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 2011; Majewski *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2011).

25 En este caso se proporcionan evidencias de que GAPDH, pero no otras enzimas glucolíticas ensayadas, es un  
 regulador clave de la linfomagénesis dependiente de c-myc. Se estableció que en condiciones hipóxicas, GAPDH se  
 une a TRAF2, lo que lleva a la fosforilación de I $\kappa$ B y a la activación de NF- $\kappa$ B. Varias líneas de evidencias sugirieron  
 que GAPDH podría estar involucrada en la modulación de la señalización de NF- $\kappa$ B (Bouwmeester *et al.*, 2004; Gao  
*et al.*, 2013; Mookherjee *et al.*, 2009) pero nunca en condiciones hipóxicas y/o en el contexto del cáncer. Se  
 30 estableció por vez primera que la activación dependiente de GAPDH de NF- $\kappa$ B conducía a un aumento en la  
 transcripción de *hif-1 $\alpha$*  tanto en condiciones de normoxia como en hipoxia, y de la expresión de la proteína HIF-1 $\alpha$  en  
 condiciones de hipoxia. De hecho, HIF es un dímero compuesto por una subunidad  $\alpha$  (HIF $\alpha$ ) y  $\beta$  (también conocida  
 como ARNT). En condiciones hipóxicas, se inhibe su degradación, lo que permite que se acumule HIF $\alpha$ , dimerice  
 con HIF $\beta$ , y se transloque en el núcleo y active la transcripción de los genes diana de HIF-1 $\alpha$ . Se demostró que en  
 35 condiciones de hipoxia, GAPDH conduce a la inducción de HIF-1 $\alpha$  y a la regulación positiva de su actividad  
 transcripcional. Sabiendo que GAPDH es uno de los genes diana de HIF-1 $\alpha$ , recalca el bucle de retroalimentación  
 positiva existente entre esas proteínas.

40 La unión de GAPDH a TRAF2 se interrumpe después de la mutación del aminoácido clave implicado en la actividad  
 de GAPDH (C152) o mediante el uso de un inhibidor de GAPDH covalente, ácido koníngico. En estas condiciones, la  
 incapacidad de GAPDH para unirse a TRAF2 disminuyó la actividad de NF- $\kappa$ B, redujo la expresión de HIF-1 $\alpha$  y se  
 correlacionó estrechamente con la incapacidad de esta forma mutada para aumentar la linfomagénesis *in vivo*, en  
 oposición a la forma TS de GAPDH. Como ya se sugirió después de la estimulación de TNF $\alpha$  (Gao *et al.*, 2013), se  
 45 confirmó que C152, una cisteína requerida para la función glucolítica de la enzima, es esencial para la unión de  
 GAPDH a TRAF2 y para la inducción de NF- $\kappa$ B/HIF. Todavía se desconoce si la función glucolítica *per se* es  
 necesaria ya que la mutación C152 también afectará a las funciones no glucolíticas de GAPDH (Colell *et al.*, 2007;  
 Gao *et al.*, 2013; Hara *et al.*, 2005).

50 Está claramente establecido que GAPDH puede interactuar con ácidos nucleicos, para su revisión (Colell *et al.*,  
 2009). GAPDH se caracterizó además como una proteína de unión a ARN, con preferencia a los elementos ricos en  
 AU, y localizó la actividad de unión al pliegue Rossmann de la enzima (Nagy *et al.*, 2000). GAPDH regula la  
 estabilidad del ARNm y controla a raíz de esto la expresión de proteínas, tales como endotelina-1 (Rodríguez-  
 Pascual *et al.*, 2008), factor estimulante de colonias-1 (CSF-1) (Zhou *et al.*, 2008) o interferón- $\gamma$  (Chang *et al.*, 2013).  
 Por lo tanto, no se puede excluir que además de la capacidad de GAPDH para activar la ruta NF- $\kappa$ B/HIF en  
 55 condiciones de hipoxia, la capacidad de unión a ARN de GAPDH también podría contribuir en parte a estabilizar el  
 ARNm de *hif-1 $\alpha$*  y/o *vegf- $\alpha$* .

60 La expresión de GAPDH en condiciones de hipoxia estimula aún más la expresión de *vegf- $\alpha$*  y la secreción total de  
 VEGF *in vivo*, sugiriendo que por su capacidad para inducir la vía NF- $\kappa$ B/HIF, GAPDH puede desempeñar un papel  
 más amplio en la progresión del cáncer de lo que se había apreciado anteriormente. Es interesante especular que  
 algunos tumores pueden adoptar el metabolismo glucolítico no solo para proliferar sino para facilitar su  
 supervivencia.

65 Recientemente se sugirió que un aumento en la expresión de HIF-1 $\alpha$  podría potenciar la expresión de CD20 y  
 representar un marcador favorable para pacientes con LDCBG tratados con R-CHOP pero no con CHOP (Evens *et al.*,  
 2010). Aunque la mayoría de los informes describen que el aumento de la expresión de HIF-1 $\alpha$  se asocia con un



mayor riesgo de metástasis y/o supervivencia inferior, la correlación de HIF-1 $\alpha$  con un mejor resultado no es algo sin precedentes (Beasley *et al.*, 2002; Lidgren *et al.*, 2005). Estos hallazgos insinúan la intrigante idea de que la expresión de GAPDH controlando la señalización de NF- $\kappa$ B/HIF es un regulador central de la expresión de CD20. De hecho, se estableció que la expresión aumentada de GAPDH se correlaciona con una expresión de CD20  
 5 aumentada en las biopsias de los pacientes y que la inhibición de GAPDH impide su unión a TRAF2 y reduce la expresión de *ms4a1* (gen CD20) y la expresión superficial celular de CD20 en condiciones de hipoxia. Es más, se descubrió que los pacientes con LDCBG tratados con R-CHOP tuvieron un resultado superior si GAPDH estaba altamente expresada. Finalmente, se estableció que CD20 se sobreexpresó en condiciones de hipoxia en una manera dependiente de GAPDH e HIF-1 $\alpha$ . Curiosamente, entre los factores reguladores identificados implicados en  
 10 una regulación positiva de CD20 se encuentra IRF4/PU.1 (Himmelmann *et al.*, 1997), dos dianas caracterizadas de NF- $\kappa$ B (Bonadies *et al.*, 2010; Grumont y Gerondakis, 2000). En consecuencia, las evidencias combinadas de la literatura sugieren que la activación de NF- $\kappa$ B a través de GAPDH podría participar en el control transcripcional de CD20.

15 Se ha observado una regulación negativa de CD20 en varios informes de casos de pacientes con linfoma de células B recidivantes/refractarios que no respondieron a terapias basadas en rituximab y se ha postulado que es una de las etiologías más importantes que contribuyen a la resistencia al rituximab (Haidar *et al.*, 2003; Jilani *et al.*, 2003). Se podría especular que la modificación de la expresión de GAPDH asociada con una modificación del metabolismo celular tumoral sobre el tratamiento podría participar en la regulación negativa de la expresión de CD20.

20 Utilizando modelos preclínicos y muestras clínicas de linfomas NH, se estableció que la GAPDH tiene un doble papel en la linfomagénesis inducida por myc, mientras que aumenta la agresividad y la vascularización tumoral, potencia la expresión de CD20 y aumenta la respuesta del paciente al tratamiento basado en anti-CD20. Puesto que *c-Myc* se encuentra regulado positivamente en aproximadamente <70 % de todos los tumores humanos y puesto que GAPDH  
 25 está ampliamente sobreexpresada en la mayoría de los tipos de tumores, nuestra observación es más ampliamente relevante para otros tipos de cáncer.

## PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

### 30 Células transgénicas estables

Las células HeLa que sobreexpresan GAPDH se infectaron como se ha descrito previamente (Colell *et al.*, 2007). La transducción de células E $\mu$ -Myc primarias se realizó como se ha descrito previamente (Beneteau *et al.*, 2012). Una semana después de la transducción, las poblaciones celulares infectadas se clasificaron mediante citómetro de flujo  
 35 BD Aria para células positivas a GFP y se evaluó la expresión de proteína de interés mediante inmunoelectrotransferencia.

### Co-inmunoprecipitación

40 Las perlas de proteína G sefarosa 4B (Invitrogen, CA, EUA) se incubaron primero con un anticuerpo anti-TRAF2 de conejo o anticuerpo anti-GAPDH de ratón o control de IgG (Santacruz, CA, EE.UU.) durante 4 horas a 4 °C. Las perlas se incubaron durante la noche con 1 mg de proteína preaclorada lisada en Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 137 mM, EGTA 1 mM, 10 % de glicerol, 1 % de Triton X-100, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, 1  $\mu$ g/ $\mu$ l de PMSF, cóctel inhibidor de proteasa y fosfatasa (Thermo Scientific). Las muestras se lavaron cinco veces, se hirvieron en tampón Laemmli y se  
 45 analizaron mediante inmunoelectrotransferencia con los anticuerpos indicados.

### Tinción para la expresión de CD20

50 Las células (0,5.10<sup>6</sup>) células (por triplicado) se lavaron 1x TFS y se incubaron a 4 °C con el anti-CD20 monoclonal (Affymetrix eBioscience) a una concentración de 2,5  $\mu$ g/ml durante 45 minutos. Se incluyeron controles isotípicos de IgG. Después, las células se lavaron 2x TFS y se incubaron a 4 °C durante 30 minutos en la oscuridad con un Alexa 488 anti-ratón (1  $\mu$ g/ml). A continuación, las células se lavaron dos veces en TFS y se volvieron a suspender en 100  $\mu$ l de TFS que contenía 0,5  $\mu$ g/ml de DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Diez mil eventos se analizaron inmediatamente mediante citometría de flujo utilizando un analizador MACSQuant (Miltenyi Biotec). Se notificó la  
 55 intensidad media de fluorescencia (IMF) obtenida para células positivas a CD20 (negativas para DAPI) vivas. Los histogramas representan el promedio de tres experimentos independientes.

### Ratones transgénicos, trasplante de linfomas y análisis de ganglios linfáticos.

60 Todos los ratones se mantuvieron en condiciones específicas libres de patógenos y los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso Animal y por el comité de ética regional (NCE/2011-35 del Comité Institucional de Ética Para Animales de Laboratorio-AZUR). Los ratones transgénicos C57BL/6E $\mu$ -Myc se adquirieron en Jackson Laborator. Los animales portadores de linfoma fueron  
 65 asenados por dislocación cervical tan pronto como presentaron signos de sufrimiento. Las células E $\mu$ -Myc se obtuvieron y utilizaron como se ha descrito previamente (Beneteau *et al.*, 2012). Los primeros signos de patología se determinaron mediante la palpación de los ganglios linfáticos inguinales y análisis de muestras de sangre con

Hemavet 950FS (Drew Scientific, INC, Francia). Tras el sacrificio, todos los ganglios linfáticos se recogen inmediatamente y se pesan antes de congelarlos o analizarlos mediante CCAP para células positivas a CD19 y GFP vivas. Los tumores de ganglios linfáticos congelados embebidos en OCT (Thermolectron Corp) se sometieron a inmunofluorescencia para la expresión de CD31. Los tejidos tumorales congelados se lisaron en tampón de extracción celular (Promega). El contenido de hemoglobina intratumoral se midió utilizando el kit de reactivos Drabkin 525 (Sigma). Se midió el VEGF total de ratón o ser humano utilizando kits de ELISA PeproTech de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

#### **Pacientes y preparación de muestras tisulares**

Se seleccionaron trece pacientes que se sometieron a biopsia para LDCBG entre mayo de 2007 y mayo de 2011 en el Hospital de Saint-Louis (Departamento de Oncohematología, Hospital de Saint-Louis, París, Francia). Los pacientes recibieron la información necesaria sobre el estudio y se obtuvo el consentimiento. La clasificación morfológica de los tumores se asignó de acuerdo con los criterios de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Campo *et al.*, 2011). Las extensiones de los tumores se clasificaron de acuerdo con la fase de Ann Arbor, y todos los pacientes fueron calificados por IPIaa (proyecto, 1993). Los datos de seguimiento de todos los pacientes se recogieron regularmente. Entre estos pacientes, 8 recayeron (61,5 %) y 6 (46 %) fallecieron.

#### **Inmunohistoquímica**

La sección (3  $\mu\text{m}$ ) de biopsias de LDCBG fijadas con formol y embebidas en parafina se trataron utilizando procedimientos convencionales y se inmunotñeron automáticamente (Ventana) para expresiones de GAPDH (Prestige, Sigma, 1/400), CD20 (1/800 clon L26 DAKO) y CD79A (1/100 clon JCB117 Dako).

#### **Análisis estadístico**

Los datos se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (DE). Las diferencias en la media calculada entre cada grupo se analizaron utilizando el ensayo de Fisher (variable cuantitativa). Las funciones de supervivencia se estimaron mediante el método de Kaplan-Meier y se compararon mediante la prueba del rango logarítmico. Se consideró que un valor P de 0,05 o menos indicaba un significado estadístico. Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y las representaciones del diagrama de caja se realizaron utilizando el software "R".

La supervivencia libre de progresión (SLP) se midió desde la fecha del diagnóstico hasta la muerte por cualquier causa o hasta la fecha de finalización. Cuando no se alcanzó la última fecha, los datos fueron censurados en la fecha de la última evaluación de seguimiento. Las variables biológicas continuas se dicotomizaron aplicando el enfoque convencional de muestras duplicadas. Los umbrales resultantes se comprobaron mediante la inclusión de splines de suavizado cúbicos en la función de riesgo del modelo de Cox. La curva de spline se utilizó para determinar el mejor punto de corte para discriminar los expresadores de *gapdh* "bajos" y "altos" de LDCBG.

#### **Cultivo celular y exposición hipóxica**

Las células HeLa y Raji se obtuvieron de ATCC y se cultivaron de acuerdo con lo recomendado. El linfoma E $\mu$ -Myc primario de ratón (células de linfoma B) se aisló como se ha descrito previamente (Lindemann *et al.*, 2007) y se mantuvo en DMEM suplementado con SBF al 10 %, 2-mercaptoetanol (50  $\mu\text{M}$ ), L-asparagina (0,37 mM) y HEPES (pH 7,4, 10 mM). La incubación en condiciones de hipoxia al 1 % de O<sub>2</sub> se llevó a cabo a 37 °C con 95 % de humedad y 5 % de CO<sub>2</sub>/94 % de N<sub>2</sub> en una estación de trabajo anaeróbica sellada (Whitley hypoxystation H35).

#### **Reactivos y anticuerpos**

El anti-VS de ratón se adquirió en Invitrogen (Carlsbad, CA, EE.UU.), se adquirió anti-GAPDH de conejo de (Abcam), se adquirió anti-Erk2 de ratón de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EE.UU.). El anti-GAPDH de conejo utilizado para inmunohistoquímica fue un "anticuerpo Prestige" adquirido en Sigma. El anti-GAPDH de ratón utilizado para la inmunoprecipitación se adquirió en Santa Cruz Biotechnology. El anti-HIF-1 $\alpha$  de conejo fue preparado y validado en el laboratorio del Dr. J. Pouyssegur. El anti-CD19-PE se adquirió en BD Bioscience. El anti-CD20 monoclonal se adquirió en Affymetrix eBioscience. El anti-CD31 se adquirió en BD Pharmigen. Se adquirieron otros anticuerpos en Cell Signaling Technology (Beverly, MA, EE.UU.). El inhibidor específico de GAPDH, el ácido koníngico (AK) se adquirió en Euromedex.

#### **Medición de la actividad de GAPDH**

Las células se lisaron en un tampón que contenía 10 mmol/l de HEPES (pH 7,4), 150 mmol/l de NaCl, 5 mmol/l de EDTA, 1 % de NP40, 10  $\mu\text{g/ml}$  de aprotinina, 1 mmol/l de fluoruro de fenilmetilsulfonilo y 10 mmol/l de leupeptina (tampón A). Los lisados se estandarizaron para el contenido de proteína y se incubaron con 0,25 mmol/l de NAD, 3,3 mmol/l de DTT, 13 mmol/l de Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (pH 8,5), 26 mmol/l de arseniato de sodio y 25 mmol/l de D-gliceraldehído-3-fosfato en una placa negra de 96 pocillos (Cellstar). La actividad de GAPDH se midió en un fluoroscan a 445 nm ya que el aumento de la fluorescencia se relaciona con la acumulación de NADH. La actividad se expresa como el

cambio en la absorbancia por miligramo de proteína.

#### Plásmidos

Se obtuvieron ADNc de *gapdh* humano de longitud completa (GAPDH-V5) y doble mutante de *gapdh* GADDHC152S/H179F-V5 (DM-V5) y se insertaron en el plásmido de expresión pcDNA™ 3.1/V5-His TOPO® TA (Invitrogen) como se ha descrito anteriormente (Colell *et al.*, 2007). Utilizando una biblioteca de ADNc y siguiendo los métodos clásicos, se clonaron la enolasa 1 (NP\_001419), PKM2 (NP\_872270) mediante PCR en el plásmido de expresión pcDNA™ 3.1/V5-His TOPO® TA (Invitrogen) y se clonó Bcl-xL (NP\_001182) en pcDNA3. GAPDH, DM, ENOL, PKM2, Bcl-xL se subclonaron a continuación en un vector viral pMIG-GFP para infección retroviral.

Los oligonucleótidos sentido y antisentido complementarios fueron hibridados y en el vector pSUPER retro.Neo+GFP cortado con BglIII/HindIII (oligoengine). Se usó la luciferasa dirigida a ARNip como control de ARNip (shctl) (Beneteau *et al.*, 2012), excepto para el ensayo de luciferasa (se utilizó el vector pSUPER retro.Neo+GFP vacío).

#### 15 Extracción de ARN y PCR cuantitativa en tiempo real

El ARN total se extrajo de las células utilizando el kit de extracción de ARN (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se añadió ARN total (2 µg) a 20 µl de PCR de transcripción inversa utilizando el kit Omniscript (Qiagen). El nivel relativo de expresión de ARNm de *gapdh*, *hif-1α*, *ca9*, *vegf-α*, *ldh-a* (ratón y ser humano) se obtuvo mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), utilizando TaqMan PCR Master Mix (Eurogentec) y el ensayo del conjunto de cebadores TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) en el 7500 Fast y el Step One (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (secuencias proporcionadas bajo pedido). Para el experimento *in vitro*, todas las muestras se normalizaron en rplp0. Todas las muestras de ARNm de tejidos tumorales humanos se normalizaron mediante *ppia* (ciclofilina-a).

#### 25 Análisis de membrana Western

Brevemente, después de la exposición a condiciones de normoxia o hipoxia, las células se lavaron y se lisaron en tampón laemmli. Las células expuestas a condiciones de hipoxia se lisaron en la cámara hipóxica. Las proteínas (40 µg) se separaron en geles de poliacrilamida SDS del 8 % al 12 % y se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (Millipore). Las membranas fueron luego manchadas con un anticuerpo correspondiente a las proteínas indicadas. Se detectaron bandas inmunorreactivas con un anti-ratón peroxidasa de rábano picante (PRP) (Dako) o anti-conejo (Cell Signaling) mediante quimioluminiscencia potenciada (Pierce). Cuando se indicó, la cuantificación por membrana Western se realizó utilizando el software ImageJ.

#### 35 Determinación de la tasa de glucólisis.

**In vitro.** El lactato exportado en el sobrenadante de células incubadas en condiciones de normoxia (N) o en hipoxia de 1 % de O<sub>2</sub> (Hx) durante 1, 3, 6, 9 horas en un DMEM libre de piruvato se determinó mediante un ensayo enzimático utilizando 900 µM de β-NAD (BioChemika), 175 µg/ml de L-lactato deshidrogenasa (BioChemika) y 100 µg/ml de glutamato-piruvato transaminasa (Roche) diluida en un tampón de carbonato de sodio (620 mM)-L-gultamato (79 mM) ajustado a pH 10. El lactato de litio se utilizó como estándar.

**In vivo.** Los ganglios linfáticos intactos se disociaron en un tampón de lisis A. La concentración de lactato se determinó como se describe y se normalizó por la cantidad total de proteína.

#### Ensayos de proliferación

Se sembraron células HeLa (1x10<sup>5</sup>) en una placa de 100 mm. Las células se separaron y se contaron 24 horas después de la siembra y cada 24 horas durante 3 días. Se sembraron células Eµ-Myc (4x10<sup>5</sup> células/ml) en un matraz T-25 cm<sup>2</sup> y se contaron todos los días durante 3 días. El índice de proliferación se calculó dividiendo el número de células obtenido cada día por el obtenido 24 horas después de la siembra.

#### 55 Ensayos de luciferasa

Actividad HIF-1. Las células HeLa que expresan establemente el vector p3HRE-Dptk-LUC, que contiene tres copias del elemento sensible a hipoxia (ESH) del gen de la eritropoyetina (Dayan *et al.*, 2006), se transfectaron transitoriamente (fosfato cálcico) con el vector o vectores de control (pMIG o vector pSUPER vacío) (2 µg) para sobreexpresar o silenciar GAPDH. Al día siguiente, las células transfectadas se expusieron en condiciones de normoxia o hipoxia al 1 % de O<sub>2</sub> durante 24 horas antes de la lisis celular en un tampón de lisis indicador (Promega). Vale la pena señalar que para la determinación de la actividad de HIF-1 en condiciones de hipoxia, las células se lisaron directamente en la cámara hipóxica. El ensayo de luciferasa se realizó como se ha descrito previamente (Jacquin *et al.*, 2013).

#### 65 Actividad de NF-κB.

Las células HeLa que expresan establemente GAPDH-V5 o control doble mutante GAPDH (DM-V5) (pMIG) se co-transfectaron transitoriamente mediante el método clásico de fosfato cálcico con 0,5 µg de un vector que codifica cFP y 2 µg de un gen indicador de luciferasa controlado por un promotor tk mínimo y sitios κB reiterados dependiendo del sexo (icBx6 tk luc). Cuarenta y ocho horas después de la transfección, las células se expusieron a condiciones de normoxia o hipoxia al 1 % de O<sub>2</sub> durante 24 horas antes de la recogida y análisis como se ha descrito previamente (Bottero *et al.*, 2003).

#### Ensayo del cambio en la corrida electroforética (EMSA)

Los extractos celulares totales de células Raji tratados o no con 0,2 µg/ml de AK y expuestos a condiciones de normoxia o hipoxia al 1 % de O<sub>2</sub> durante 24 horas se prepararon como se ha descrito previamente (Bottero *et al.*, 2003). Para el ensayo de cambio en la corrida, se utilizó una sonda de NF-κB que consiste en un oligonucleótido bicatenario sintético que contiene el sitio de unión de κB del promotor de Igκ. La sonda marcada en el extremo (quinasa T4) se incubó con muestras de extractos durante 20 minutos a 30 °C. Los complejos se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida no desnaturalizante al 5 % en 0,5 x TBE. Los geles secos se sometieron a autorradiografía.

#### Inmunofluorescencia de CD31

Los tumores de ganglios linfáticos congelados embebidos en OCT (Thermolectron Corp) se sometieron a inmunofluorescencia para la expresión de CD31 (véase el material suplementario) cortados a -20 °C (Cryostat, Leica) y portaobjetos de 5 µm se fijaron en acetona durante 20 minutos a -20 °C, se lavaron, se saturaron y se tiñeron con anti-CD31 de rata (2,5 µg/ml) durante la noche a 4 °C en una cámara humidificada. Después de la incubación, los cubreobjetos se lavaron y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con DAPI (1 µg/ml) y un Alexa 488 anti-rata (2 µg/ml) en la oscuridad. Los portaobjetos tumorales se montaron con fluoromount G y se analizaron con un microscopio confocal (LSM 510 Meta Zeiss).

### EJEMPLO 2

#### 30 Métodos y material

##### **Reactivos**

Para la tinción por CCAP: se utilizaron anti-GAPDH (Abcam), -CD20-FITC (clon L26, eBioscience). El ácido koníngico (AK) se adquirió en Euromedex.

##### **Cultivo celular y exposición hipóxica**

Las células Raji (estirpe celular de linfoma B NH tipo Burkitt humano) se obtuvieron de ATCC y se cultivaron como se recomienda. Se obtuvieron células RL (estirpe celular de linfoma B NH folicular humano) de Pr. Charles Dumontet y se cultivaron como se describe (Dalle S *et al.*, *Clin Cancer Res*, 2009, 15(3):851-7). La incubación en condiciones de hipoxia se llevó a cabo a 1 % de O<sub>2</sub> (en oposición a las condiciones normoxicas, 21 % de incubación de O<sub>2</sub>), 37 °C en 95 % de humedad y 5 % de CO<sub>2</sub>/94 % de N<sub>2</sub> en una estación de trabajo anaeróbica sellada (Whitley hypoxystation H35).

##### **Tinción para CD20 y expresión de GAPDH**

Se lavaron un total de 1x10<sup>6</sup> células en TFS y se incubaron durante 45 minutos a 4 °C con el anticuerpo monoclonal anti-CD20 (2,5 µg/ml) (Affymetrix eBioscience). Las células se lavaron a continuación en TFS y se incubaron a 4 °C durante 30 minutos con un Alexa Fluor 488 anti-ratón (1 µg/ml). Las células se permeabilizan y se fijan utilizando la solución BD Cytotfix/cytoperm (BD Biosciences) y se incuban a 4 °C durante 20 min. Las células se lavan luego en tampón que contiene saponina (BD Perm/Wash) y se vuelven a suspender en el mismo tampón que contiene anticuerpo anti-GAPDH (Abcam ab9485, dilución 1/100) y se incuban durante 30 min a 4 °C. Las células se lavan dos veces con el tampón que contiene saponina e incuban con un anticuerpo anti-conejo acoplado a APC (dilución 1/100) durante 30 min a 4 °C en el mismo tampón. Después de lavarlas dos veces en el tampón que contiene saponina, las células se vuelven a suspender en TFS/SBF al 2 % y se analizan por citometría de flujo. Inmediatamente después, se analizaron 10.000 eventos mediante citometría de flujo utilizando un analizador MACSQuant (Miltenyi Biotec). Se notificó la intensidad media de fluorescencia (IMF) obtenida para células con un nivel bajo de CD20, nivel alto de CD20, nivel bajo de GAPDH, nivel alto de GAPDH.

##### **Análisis de datos por micromatrices**

Los datos brutos (GSE10846) se normalizaron y el log<sub>2</sub> se transformó utilizando la función justRMA (paquete affy). Cuando un gen estaba representado por varios conjuntos de sondas, se utilizó la intensidad media. Las curvas de supervivencia se representaron gráficamente siguiendo el método de Kaplan-Meier utilizando el valor medio como punto de corte y los cocientes de riesgo se obtuvieron utilizando la regresión de Cox.

## Resultados

También se demostró la relación entre la expresión de CD20 y GAPDH en otros dos linfomas B NH, tales como linfomas de Burkitt y folicular (Figura 2 y 3). Para el linfoma NH de Burkitt humano, la estirpe celular Raji se incubó en condiciones de hipoxia para aumentar fisiológicamente la expresión de GAPDH (Figura 2A). La expresión de la superficie celular de CD20 aumentó en las células Raji expuestas a condiciones de hipoxia (Figura 3B), un proceso mediado por la actividad GAPDH, ya que la inhibición específica de GAPDH utilizando dosis no tóxicas de ácido koníngico previno este aumento hipóxico dependiente en la expresión de CD20. Para el linfoma folicular humano, los bajos niveles de expresión de CD20 en la superficie celular se correlacionan con una baja expresión de GAPDH intracelular en la estirpe celular RL. Por el contrario, el alto nivel de CD20 está asociado con un alto nivel de expresión de GAPDH en este modelo (Figura 3).

## Referencias

A lo largo de la presente solicitud, varias referencias describen el estado de la técnica a la que pertenece la presente invención.

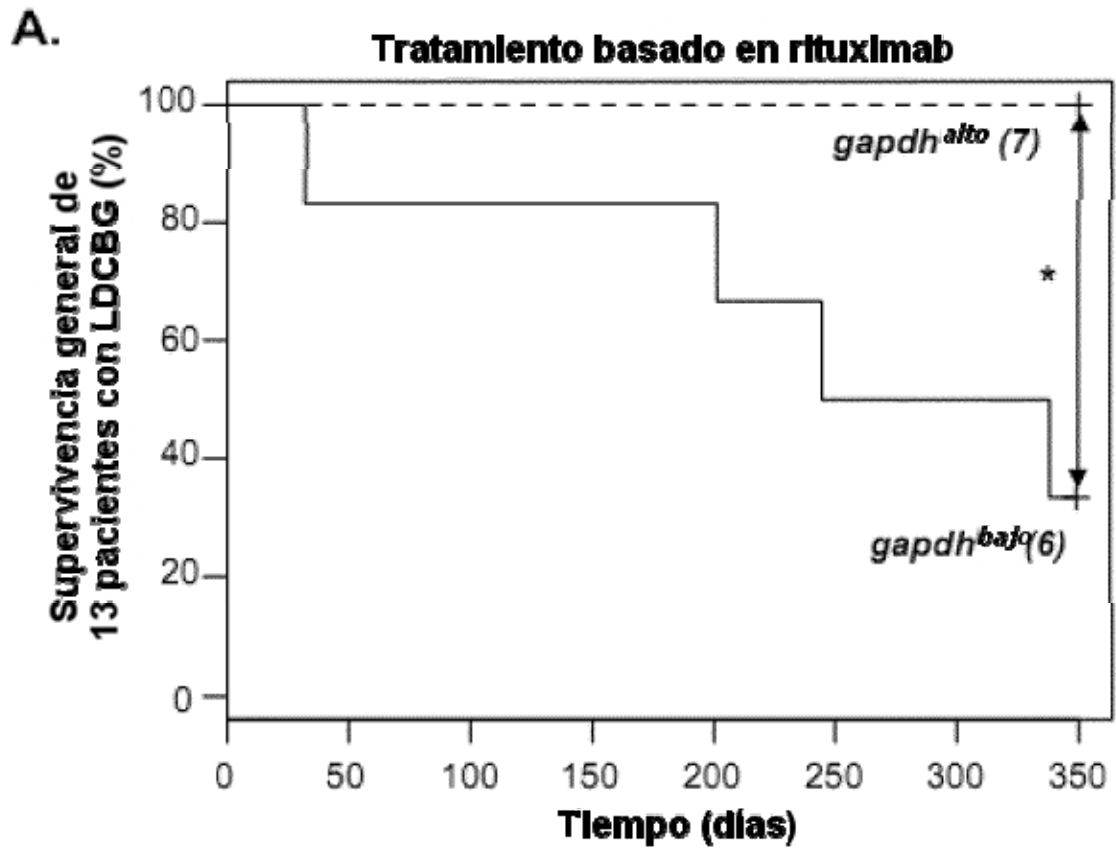
- Alizadeh, A. A., Eisen, M. B., Davis, R. E., Ma, C., Lossos, I. S., Rosenwald, A., Boldrick, J. C., Sabet, H., Tran, T., Yu, X., et al. (2000). *Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. Nature* 403, 503-511.
- Altenberg, B., and Greulich, K. O. (2004). *Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. Genomics* 84, 1014-1020.
- Beasley, N. J., Leek, R., Alam, M., Turley, H., Cox, G. J., Gatter, K., Millard, P., Fuggle, S., and Harris, A. L. (2002). *Hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in head and neck cancer: relationship to tumor biology and treatment outcome in surgically resected patients. Cancer Res* 62, 2493-2497.
- Beneteau, M., Zunino, B., Jacquin, M. A., Meynet, O., Chiche, J., Pradelli, L. A., Marchetti, S., Cornille, A., Carles, M., and Ricci, J. E. (2012). *Combination of glycolysis inhibition with chemotherapy results in an antitumor immune response. Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 20071-20076.
- Bonadies, N., Neururer, C., Steege, A., Vallabhapurapu, S., Pabst, T., and Mueller, B. U. (2010). *PU.1 is regulated by NF-kappaB through a novel binding site in a 17 kb upstream enhancer element. Oncogene* 29, 1062-1072.
- Bottero, V., Imbert, V., Frelin, C., Formento, J. L., and Peyron, J. F. (2003). *Monitoring NF-kappa B transactivation potential via real-time PCR quantification of I kappa B-alpha gene expression. Molecular diagnosis: a journal devoted to the understanding of human disease through the clinical application of molecular biology* 7, 187-194.
- Bouwmeester, T., Bauch, A., Ruffner, H., Angrand, P. O., Bergamini, G., Croughton, K., Cruciat, C., Eberhard, D., Gagneur, J., Ghidelli, S., et al. (2004). *A physical and functional map of the human TNFalpha/NF-kappa B signal transduction pathway. Nature cell biology* 6, 97-105.
- Campo, E., Swerdlow, S. H., Harris, N. L., Pileri, S., Stein, H., and Jaffe, E. S. (2011). *The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. Blood* 117, 5019-5032.
- Chang, C. H., Curtis, J. D., Maggi, L. B., Jr., Faubert, B., Villarino, A. V., O'Sullivan, D., Huang, S. C., van der Windt, G. J., Blagih, J., Qiu, J., et al. (2013). *Posttranscriptional control of T cell effector function by aerobic glycolysis. Cell* 153, 1239-1251.
- Colell, A., Green, D. R., and Ricci, J. E. (2009). *Novel roles for GAPDH in cell death and carcinogenesis. Cell Death Differ* 16, 1573-1581.
- Colell, A., Ricci, J. E., Tait, S., Milasta, S., Maurer, U., Bouchier-Hayes, L., Fitzgerald, P., Guio-Carrion, A., Waterhouse, N. J., Li, C. W., et al. (2007). *GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation. Cell* 129, 983-997.
- Dayan, F., Roux, D., Brahim-Horn, M. C., Pouyssegur, J., and Mazure, N. M. (2006). *The oxygen sensor factor-inhibiting hypoxia-inducible factor-1 controls expression of distinct genes through the bifunctional transcriptional character of hypoxia-inducible factor-1alpha. Cancer Res* 66, 3688-3698.
- Evens, A. M., Sehn, L. H., Farinha, P., Nelson, B. P., Raji, A., Lu, Y., Brakman, A., Parimi, V., Winter, J. N., Schumacker, P. T., et al. (2010). *Hypoxia-inducible factor-1 {alpha} expression predicts superior survival in patients with diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. J Clin Oncol* 28, 1017-1024.
- Gao, X., Wang, X., Pham, T. H., Feuerbacher, L. A., Lubos, M. L., Huang, M., Olsen, R., Mushegian, A., Slawson, C., and Hardwidge, P. R. (2013). *NleB, a bacterial effector with glycosyltransferase activity, targets GAPDH function to inhibit NF-kappaB activation. Cell host & microbe* 13, 87-99.
- Grumont, R. J., and Gerondakis, S. (2000). *Rel induces interferon regulatory factor 4 (IRF-4) expression in lymphocytes: modulation of interferon-regulated gene expression by rel/nuclear factor kappaB. The Journal of experimental medicine* 191, 1281-1292.
- Haidar, J. H., Shamseddine, A., Salem, Z., Mrad, Y. A., Nasr, M. R., Zaatari, G., and Bazarbachi, A. (2003). *Loss of CD20 expression in relapsed lymphomas after rituximab therapy. European journal of haematology* 70, 330-332.
- Hara, M. R., Agrawal, N., Kim, S. F., Cascio, M. B., Fujimuro, M., Ozeki, Y., Takahashi, M., Cheah, J. H., Tankou,

- S. K., Hester, L. D., et al. (2005). *Snitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding*. *Nature cell biology* 7, 665-674.
- Harris, A. W., Pinkert, C. A., Crawford, M., Langdon, W. Y., Brinster, R. L., and Adams, J. M. (1988). *The E mu-myc transgenic mouse. A model for high-incidence spontaneous lymphoma and leukemia of early B cells*. *The Journal of experimental medicine* 167, 353-371.
- 5 Himmelman, A., Riva, A., Wilson, G. L., Lucas, B. P., Thevenin, C., and Kehrl, J. H. (1997). *PU.1/Pip and basic helix loop helix zipper transcription factors interact with binding sites in the CD20 promoter to help confer lineage- and stage-specific expression of CD20 in B lymphocytes*. *Blood* 90, 3984-3995.
- 10 Jacquin, M. A., Chiche, J., Zunino, B., Beneteau, M., Meynet, O., Pradelli, L. A., Marchetti, S., Cornille, A., Carles, M., and Ricci, J. E. (2013). *GAPDH binds to active Akt, leading to Bcl-xL increase and escape from caspase-independent cell death*. *Cell Death Differ* 20, 1043-1054.
- Jilani, I., O'Brien, S., Manshuri, T., Thomas, D. A., Thomazy, V. A., Imam, M., Naeem, S., Verstovsek, S., Kantarjian, H., Giles, F., et al. (2003). *Transient down-modulation of CD20 by rituximab in patients with chronic lymphocytic leukemia*. *Blood* 102, 3514-3520.
- 15 Lidgren, A., Hedberg, Y., Grankvist, K., Rasmuson, T., Vasko, J., and Ljungberg, B. (2005). *The expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha is a favorable independent prognostic factor in renal cell carcinoma*. *Clin Cancer Res* 11, 1129-1135.
- Lindemann, R. K., Newbold, A., Whitecross, K. F., Cluse, L. A., Frew, A. J., Ellis, L., Williams, S., Wiegmanns, A. P., Dear, A. E., Scott, C. L., et al. (2007). *Analysis of the apoptotic and therapeutic activities of histone deacetylase inhibitors by using a mouse model of B cell lymphoma*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 8071-8076.
- 20 Luo, W., Hu, H., Chang, R., Zhong, J., Knabel, M., O'meally, R., Cole, Robert N., Pandey, A., and Semenza, Gregg L. (2011). *Pyruvate Kinase M2 Is a PHD3-Stimulated Coactivator for Hypoxia-Inducible Factor 1*. In *Cell*, págs. 732-744.
- Majewski, N., Nogueira, V., Bhaskar, P., Coy, P. E., Skeen, J. E., Gottlob, K., Chandel, N. S., Thompson, C. B., Robey, R. B., and Hay, N. (2004). *Hexokinase mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak*. *Mol Cell* 16, 819-830.
- 25 Mookherjee, N., Lippert, D. N., Hamill, P., Falsafi, R., Nijnik, A., Kindrachuk, J., Pistolic, J., Gardy, J., Miri, P., Naseer, M., et al. (2009). *Intracellular receptor for human host defense peptide LL-37 in monocytes*. *J Immunol* 183, 2688-2696.
- 30 Nagy, E., Henics, T., Eckert, M., Miseta, A., Lightowlers, R. N., and Kellermayer, M. (2000). *Identification of the NAD(+)-binding fold of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a novel RNA-binding domain*. *Biochemical and biophysical research communications* 275, 253-260.
- project, T. I. N.-H. s. l. p. f. (1993). *A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma*. *N Engl J Med* 329, 987-994.
- 35 Rodriguez-Pascual, F., Redondo-Horcajo, M., Magan-Marchal, N., Lagares, D., Martinez-Ruiz, A., Kleinert, H., and Lamas, S. (2008). *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase regulates endothelin-1 expression by a novel, redox-sensitive mechanism involving mRNA stability*. *Mol Cell Biol* 28, 7139-7155.
- Thieblemont, C., and Gisselbrecht, C. (2009). *Second-line treatment paradigms for diffuse large B-cell lymphomas*. *Current oncology reports* 11, 386-393.
- 40 Tsai, P. C., Hernandez-Ilizaliturri, F. J., Bangia, N., Olejniczak, S. H., and Czuczman, M. S. (2012). *Regulation of CD20 in rituximab-resistant cell lines and B-cell non-Hodgkin lymphoma*. *Clin Cancer Res* 18, 1039-1050.
- Yang, W., Xia, Y., Ji, H., Zheng, Y., Liang, J., Huang, W., Gao, X., Aldape, K., and Lu, Z. (2011). *Nuclear PKM2 regulates beta-catenin transactivation upon EGFR activation*. *Nature* 480, 118-122.
- 45 Zhou, Y., Yi, X., Stoffer, J. B., Bonafe, N., Gilmore-Hebert, M., McAlpine, J., and Chambers, S. K. (2008). *The multifunctional protein glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is both regulated and controls colony-stimulating factor-1 messenger RNA stability in ovarian cancer*. *Mol Cancer Res* 6, 1375-1384.

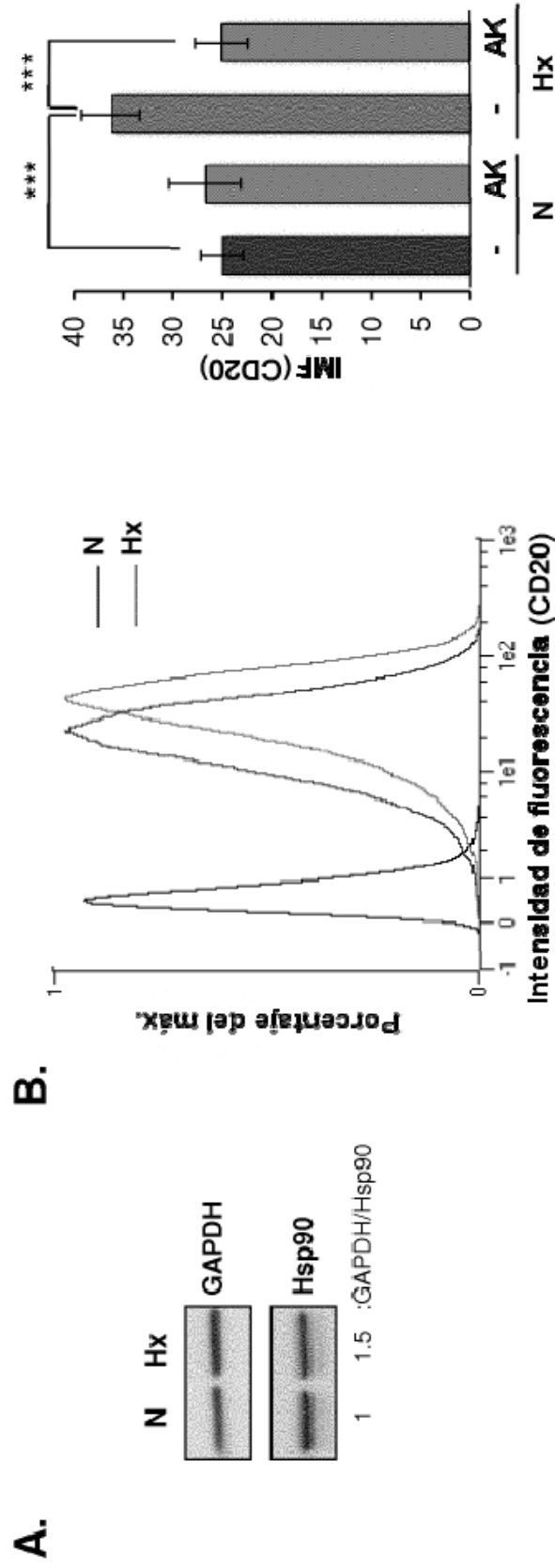
**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un método de predicción de la capacidad de respuesta de un paciente a un tratamiento con un anticuerpo anti-CD20, comprendiendo dicho método la medición del nivel de expresión de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en las células B obtenidas a partir de dicho paciente, en el que un nivel elevado de expresión de GAPDH es predictivo de una respuesta a un tratamiento con un anticuerpo anti-CD20.
- 10 2. Un método de detección de la resistencia al anticuerpo anti-CD20 de un paciente sometido a un tratamiento con un anticuerpo anti-CD20, comprendiendo dicho método la medición del nivel de expresión de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en las células B obtenidas a partir de dicho paciente, en el que un nivel bajo de expresión de GAPDH es predictivo de una falta de respuesta a un tratamiento con un anticuerpo anti-CD20.
- 15 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo anti-CD20 se selecciona entre el grupo que consiste en rituximab, ibritumomab, ofatumumab, ocrelizumab, PRO131921, veltuzumab, AME-133v, tositumomab y GA-101.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el anticuerpo anti-CD20 es rituximab.
- 20 5. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el paciente está aquejado de una enfermedad asociada con una proliferación o con una activación excesiva de células B.
- 25 6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la enfermedad se selecciona entre el grupo que consiste en linfoma de células B no Hodgkin, tal como, por ejemplo, linfoma folicular (LF), linfoma de Burkitt y linfoma difuso de células B grandes (LDCBG), macroglobulinemia de Waldenström, leucemia, tal como leucemia linfocítica crónica (LLC); y enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoide, anemia hemolítica autoinmune idiopática, aplasia pura de glóbulos rojos, púrpura trombocitopénica idiopática, síndrome de Evans, vasculitis, esclerosis múltiple, trastornos cutáneos ampollosos (por ejemplo, pénfigo, penfigoide), diabetes mellitus tipo 1, síndrome de Sjögren, enfermedad de Devic, granulomatosis de Wegener, poliangitis microscópica y lupus eritematoso sistémico.
- 30 7. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la enfermedad es un linfoma de células B no Hodgkin o una leucemia.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que la enfermedad es el linfoma difuso de células B grandes.
- 35 9. Un anticuerpo anti-CD20 para su uso en un método de tratamiento de un paciente en necesidad del mismo, en el que dicho método comprende las siguientes etapas:
- 40 a) identificación de la capacidad de respuesta de un paciente al tratamiento con un anticuerpo anti-CD20 con el método de predicción de la capacidad de respuesta como se define en la reivindicación 1; y  
b) tratamiento con un anticuerpo anti-CD20 del paciente respondedor identificado.
- 45 10. Un anticuerpo anti-CD20 para su uso en un método de tratamiento de un paciente en necesidad del mismo, en el que dicho paciente ha sido identificado como receptivo con el método de predicción de la capacidad de respuesta como se define en la reivindicación 1.

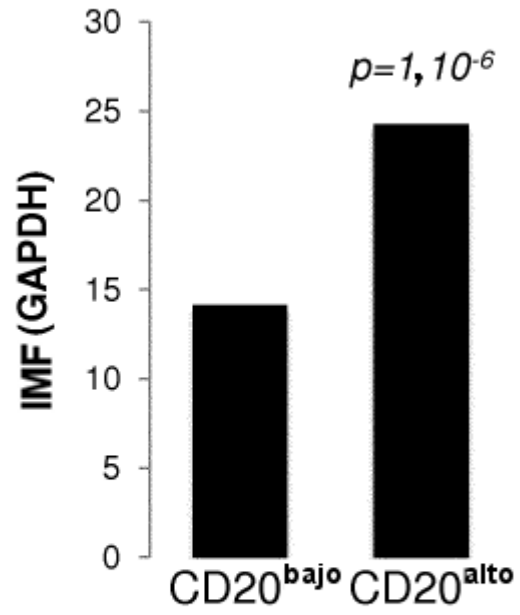
**Figura 1**







**Figura 2**



**Figura 3**

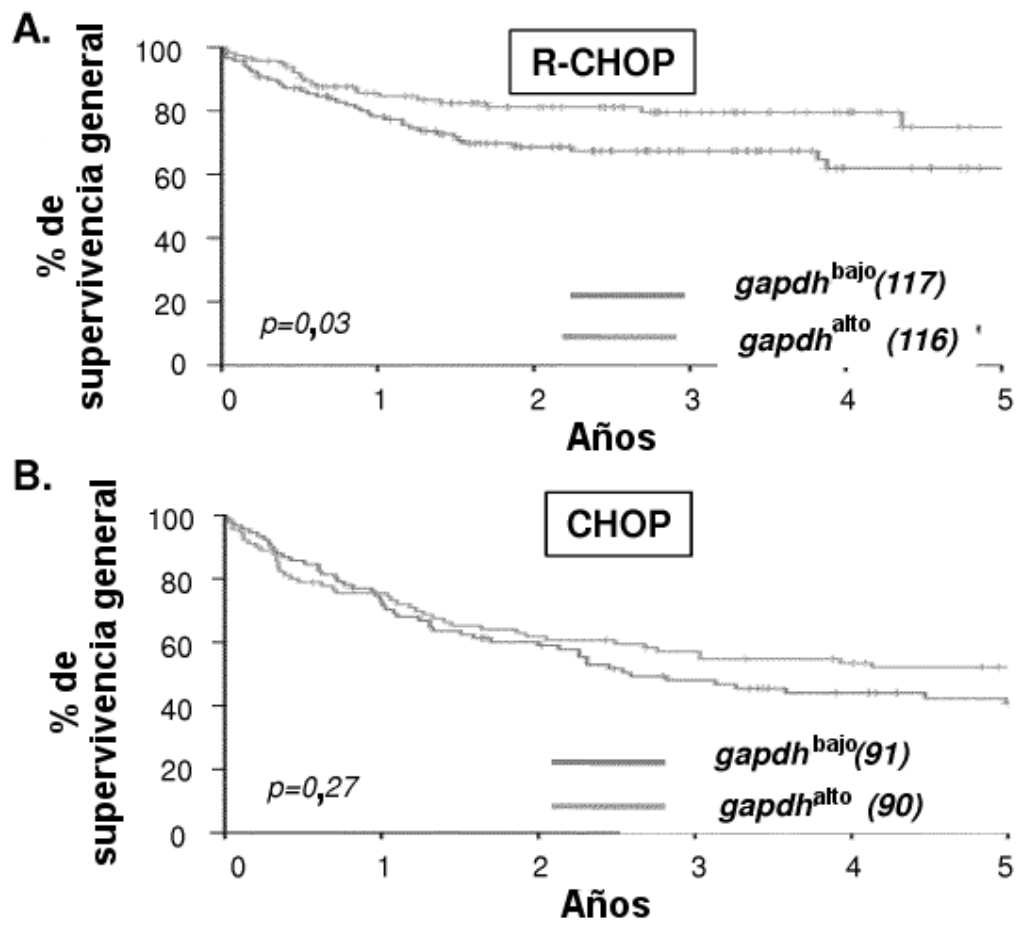


Figura 4