

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 469 265**

21 Número de solicitud: 201231760

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

14.11.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

17.06.2014

Fecha de la concesión:

27.02.2015

45 Fecha de publicación de la concesión:

06.03.2015

56 Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2013/070795

73 Titular/es:

**FUNDACIÓN DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE
HIERRO DE MAJADAHONDA (20.0%)**

**Joaquín Rodrigo, 2, Edificio Laboratorios, planta
baja**

28222 Majadahonda (Madrid) ES;

**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA DEL HOSPITAL 12 DE OCTUBRE
(20.0%);**

**FUNDACIÓN CIENTÍFICA DE LA ASOCIACIÓN
ESPAÑOLA CONTRA EL CÁNCER (20.0%);**

SERVICIO CÁNTABRO DE SALUD (20.0%) y

**FUNDACION INSTITUTO DE INVESTIGACION
MARQUES DE VALDECILLA (20.0%)**

72 Inventor/es:

PIRIS PINILLA, Miguel Ángel;

VAQUÉ DÍEZ, José Pedro;

MARTÍNEZ MAGUNACELAYA, Nerea;

ORTIZ ROMERO, Pablo Luis y

SÁNCHEZ-BEATO GÓMEZ, Margarita

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **MÉTODOS DE SELECCIÓN DE TERAPIA DE LINFOMA CUTÁNEO DE CÉLULAS T**

57 Resumen:

Métodos de selección de terapia de linfoma cutáneo de células T.

El método para seleccionar una terapia para el tratamiento de un paciente con linfoma cutáneo de células T (LCCT) comprende determinar en una muestra de dicho paciente la presencia de una mutación en al menos un gen seleccionado del grupo formado por los genes PLCG1, CCR4, IL-6ST, JAK1, JAK3 y cualquier combinación de los mismos, y seleccionar la terapia en función del perfil mutacional del paciente.

ES 2 469 265 B1

DESCRIPCIÓN

Métodos de selección de terapia de linfoma cutáneo de células T.

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se encuadra dentro del campo de la terapia personalizada, y en particular se relaciona con métodos para seleccionar una terapia para un paciente de linfoma cutáneo de células T mediante la determinación de la presencia de marcadores moleculares en una muestra de dicho paciente.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los linfomas cutáneos de células T (LCCT) son un grupo heterogéneo de entidades de entre los cuales la micosis fungoide (MF) y el síndrome de Sézary (SS) suponen el 65% del total de casos. Los casos de LCCT en estadio tumoral (IIb o mayor) tiene una supervivencia de alrededor del 40% a diez años, aunque en algunos casos (como es el caso de SS) es especialmente agresivo, de forma que la mediana de supervivencia se sitúa en torno a los dos años. Actualmente su diagnóstico se realiza en base a la correlación clínico patológica y ocasionalmente se apoya en la determinación del reordenamiento genético del gen del receptor de linfocitos T (TCR).

15

20

El conocimiento de la patología molecular del LCCT es bastante pobre y aún no se entienden los mecanismos moleculares a través de los cuales esta enfermedad se inicia y progresa. Actualmente es imposible predecir los pacientes con estadios tempranos de LCCT que progresarán y los que mantendrán un estado indolente. Hasta el momento sólo se ha descrito la presencia de mutaciones en TP53 y RAS, y actualmente se acepta que la actividad desregulada de TCR es un motor de la enfermedad y que las células T neoplásicas pueden adquirir un fenotipo de célula T reguladora (Treg) o de Th17.

25

El diagnóstico de esta patología no es sencillo, especialmente en los casos de eritrodermia. El diagnóstico diferencial entre SS, MF eritrodérmica y otras causas de eritrodermia (psoriasis, eczemas, reacciones a drogas, pitiriasis rubra pilaris, etc.) es complicado.

30

Diversos estudios han abordado el problema de la mejora del diagnóstico y pronóstico del LCCT mediante métodos basados en las características moleculares de las muestras tumorales. Así, por ejemplo, se ha relacionado la expresión diferencial de un grupo de genes implicados en la ruta de señalización del factor de necrosis tumoral (TNF) con el diagnóstico diferencial de MF frente a dermatosis inflamatoria. Del mismo modo, la determinación mediante PCR en muestras de sangre periférica de los niveles de expresión de 5 genes (STAT4, GATA-3, PLS3, CD1D y TRAIL) se ha relacionado con el diagnóstico de SS. También se ha propuesto la expresión diferencial de microARN como marcador de LCCT frente a piel normal. En cuanto a marcadores de pronóstico, hay estudios que asocian la presencia de determinadas alteraciones genéticas identificadas mediante hibridación genómica comparada o "CGH" (del inglés "Comparative Genomic Hybridization") con un peor curso clínico en pacientes con MF (9p21, 8q24, y 1q21-1q22). También se ha asociado un perfil genético con diferencias en cuanto a supervivencia y respuesta al tratamiento en pacientes con LCCT.

35

40

45

El tratamiento actual de los pacientes con LCCT es muy variable; aún así, se siguen probando nuevas terapias para el tratamiento de dichos pacientes. Aunque hay guías publicadas, el tratamiento depende de la experiencia del centro y del médico y de las preferencias y posibilidades del paciente. La ausencia casi total de ensayos clínicos aleatorizados hace que los tratamientos no estén estandarizados en el momento actual y que la calidad de la evidencia científica sea escasa. En estadios tempranos se suele utilizar terapia dirigida a la piel (corticoides tópicos, mostaza nitrogenada, BCNU (carmustina), fotoquimioterapia, radioterapia, etc.). Cuando estas terapias fallan es necesario un tratamiento sistémico solo o asociado a terapias dirigidas a la piel. Dado el papel de la inmunidad en la patogénesis de la enfermedad, se aplican de modo preferente tratamientos que activan o mantienen la respuesta inmune, tales como interferón sólo o en combinación con retinoides (etretinato) o rexinoides (bexaroteno). La mono- o poli-quimioterapia se reservan para casos que no respondan a tratamientos previos. Se están utilizando también terapias basadas en anticuerpos monoclonales frente a CD25, CD4, CD30, CD3 o CCR4, así como agentes dirigidos contra dianas epigenéticas (inhibidores de histona deacetilasas (HDAC)), así como inhibidores del proteasoma, tales como el bortezomib.

50

55

Algunos estudios han abordado el problema de seleccionar pacientes con LCCT para determinados tratamientos mediante métodos basados en las características moleculares de las muestras tumorales. En concreto, en el caso de la selección de pacientes para el empleo de terapias dirigidas, se ha propuesto la identificación de mutaciones en KRAS o NRAS, como indicación para la selección de inhibidores de la ruta de activación de MAPK (RAS/RAF/MEK/ERK), aunque la presencia de estas mutaciones es bastante infrecuente en estadios avanzados de LCCT. Un ejemplo es la propuesta de una terapia basada en la inhibición de la ruta de MAPK al nivel de la activación de MEK en estos pacientes.

60

Se ha descrito el empleo de la detección de mutaciones en genes concretos para la selección de terapia o apoyo al

65

diagnóstico en múltiples tipos de cáncer humano. A modo ilustrativo, entre las mutaciones más ampliamente usadas en la clínica están las mutaciones del gen *EGFR* que pueden indicar el tratamiento con Erlotinib en cáncer de pulmón, mutaciones en el gen *KRAS* para determinar posibles resistencias a tratamientos anti-EGFR, como por ejemplo en cáncer de colon, mutaciones en *JAK2* como marcador de neoplasia mieloproliferativa, mutaciones en *FLT3* como marcador de mal pronóstico en LMA o mutaciones en *B-RAF* como indicadores del uso de Vemurafenib en melanoma. Sin embargo, en el caso de LCCT, el diagnóstico y asignación de terapia se sigue realizando atendiendo a criterios clínicos, sin tener en cuenta datos moleculares del tumor ya que, hasta la fecha, no se ha validado ninguna mutación en un gen o conjunto de genes capaz de predecir el curso clínico de la enfermedad y cuya presencia puede indicar tratamiento con una terapia concreta.

Por tanto, existe la necesidad de proporcionar nuevos métodos para seleccionar una terapia personalizada para pacientes con LCCT en función del perfil mutacional de dichos pacientes.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

En un aspecto la invención se relaciona con un método para seleccionar una terapia para el tratamiento de un paciente con linfoma cutáneo de células T (LCCT) que comprende determinar en una muestra de dicho paciente la presencia de una mutación en al menos un gen seleccionado del grupo formado por los genes *PLCG1*, *CCR4*, *IL-6ST*, *JAK1*, *JAK3* y cualquier combinación de los mismos, en donde

- (i) si se detecta la presencia de una mutación en el gen *PLCG1*, se selecciona para dicho paciente una terapia seleccionada del grupo formado por un inhibidor de fosfolipasa C, un antagonista de calmodulina, un inhibidor de calcineurina y cualquier combinación de las mismas,
- (ii) si se detecta la presencia de una mutación en el gen *CCR4*, se selecciona para dicho paciente una terapia seleccionada del grupo formado por un anticuerpo anti-CCR4, un inhibidor de MEK1, un inhibidor de MEK2 y cualquier combinación de las mismas, y/o
- (iii) si se detecta la presencia de una mutación en cualquiera de los genes seleccionados del grupo formado por *IL-6ST*, *JAK1* y *JAK3*, se selecciona para dicho paciente una terapia seleccionada del grupo formado por un inhibidor de JAK, un inhibidor de RORγt y sus combinaciones.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para seleccionar un paciente con LCCT para una terapia seleccionada del grupo formado por un inhibidor de fosfolipasa C, un antagonista de calmodulina, un inhibidor de calcineurina y cualquier combinación de las mismas, que comprende determinar en una muestra de dicho paciente la presencia de una mutación en el gen *PLCG1*, en donde dicho paciente es seleccionado para dicha terapia si presenta dicha mutación.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para seleccionar un paciente con LCCT para una terapia seleccionada del grupo formado por un anticuerpo anti-CCR4, un inhibidor de MEK1, un inhibidor de MEK2 y cualquier combinación de las mismas, que comprende determinar en una muestra de dicho paciente la presencia de una mutación en el gen *CCR4*, en donde dicho paciente es seleccionado para dicha terapia si presenta dicha mutación.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para seleccionar un paciente con LCCT para una terapia seleccionada del grupo formado por un inhibidor de JAK, un inhibidor de RORγt y una combinación de las mismas, que comprende determinar en una muestra de dicho paciente la presencia de una mutación en cualquiera de los genes seleccionados del grupo formado por *IL-6ST*, *JAK1*, *JAK3* y cualquier combinación de los mismos, en donde dicho paciente es seleccionado para dicha terapia si presenta dicha mutación.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit que comprende uno o más reactivos adecuados para llevar a cabo cualquiera de los métodos previamente mencionados, en donde dichos reactivos comprenden una o más parejas de oligonucleótidos que hibridan específicamente con una región de al menos un gen, en donde dicha región comprende la mutación a detectar y en donde dicho gen se selecciona del grupo formado por *PLCG1*, *CCR4*, *IL-6ST*, *JAK1*, *JAK3* y combinaciones de los mismos. El empleo de dicho kit para seleccionar una terapia para el tratamiento de un paciente con LCCT o para seleccionar un paciente con LCCT para una terapia seleccionada, tal como una terapia seleccionada del grupo de terapias basadas en la administración de un inhibidor de fosfolipasa C, un antagonista de calmodulina, un inhibidor de calcineurina, un anticuerpo anti-CCR4, un inhibidor de MEK1, un inhibidor de MEK2, un inhibidor de JAK, un inhibidor de RORγt y cualquier combinación de las mismas, constituye un aspecto adicional de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 es un esquema en el que se muestran varios de los genes identificados como mutados en LCCT que participan en las rutas de señalización Treg/Th17; en concreto, los genes identificados como mutados son los genes *CCR4*, *PLCG1*, *MAPK35*, *TRAF6*, *CARD11*, *RELB*, *IL-6ST*, *JAK1* y *JAK3*.

La Figura 2 muestra que los mutantes encontrados en LCCT humano producen un aumento de la actividad de la ruta de señalización de PLCG1. (A) Secuencias correspondientes a *PLCG1*-wt (arriba) y a los mutantes *PLCG1*-S345F y *PLCG1*-S520F (abajo). (B) Arriba: Esquema de la localización de las mutaciones en *PLCG1*. Abajo: Western-blot que muestra la expresión proteica de las construcciones (1 µg cada una) *PLCG1*-Myc-WT (WT), *PLCG1*-Myc-S345F (S345F) y *PLCG1*-Myc-S520F (S520F) en células HEK293T crecidas en placas T6 (la figura muestra un experimento representativo). (C) Ensayo de luciferasa sobre NFAT-Luc (0,1 µg)/pRL-Null (0,05 µg) utilizando la cantidad indicada de ADN de cada construcción de *PLCG1* co-trasfectado en células HEK293T crecidas en pocillos T24. N=3. Las barras de error indican el error estándar de la media (SEM). (D) Células HEK293T se co-transfectaron como en (C) de forma que se utilizaron las mejores condiciones para cada construcción de *PLCG1*. Las células privadas de suero se incubaron con la cantidad indicada de los inhibidores FK-506 y PLCi durante 6 horas. N=3. Las barras de error indican el SEM.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han descubierto que, sorprendentemente, pacientes con linfoma cutáneo de células T (LCCT) presentan mutaciones somáticas en genes que codifican proteínas implicadas en la regulación de rutas de señalización que conducen a la adquisición de un fenotipo Treg o Th17 por parte de los linfocitos T, lo cual se ha relacionado con la patogénesis y evolución de la enfermedad. Dichas mutaciones conducen a una actividad incrementada de las proteínas en cuestión, lo que permitiría seleccionar para dichos pacientes una terapia con fármacos inhibidores de dichas proteínas o de las rutas de señalización en las que dichas proteínas están implicadas. En concreto, los autores de la presente invención han comprobado que un porcentaje relativamente significativo (23% aproximadamente) de los pacientes con LCCT presentan mutaciones en el gen *PLCG1*. Dichas mutaciones producen un aumento de la actividad de señalización mediada por la proteína *PLCG1* y dicho aumento es sensible a la administración de un fármaco inhibidor de la ruta de *PLCG1*, tal como tacrolimus, un inhibidor de calcineurina. De esta forma, la administración de este fármaco revierte la sobreactivación causada por la mutación de *PLCG1* y es, por tanto, beneficiosa para aquellos pacientes de LCCT que presenten dicha mutación.

En base a este descubrimiento se han desarrollado los aspectos inventivos que se describen a continuación.

Método para seleccionar una terapia para un paciente con linfoma cutáneo de células T

En un aspecto, la invención se relaciona con un método, en adelante “primer método de la invención”, para seleccionar una terapia para el tratamiento de un paciente con LCCT que comprende determinar en una muestra de dicho paciente la presencia de una mutación en al menos un gen seleccionado del grupo formado por los genes *PLCG1*, *CCR4*, *IL-6ST*, *JAK1*, *JAK3* y cualquier combinación de los mismos, en donde

- (i) si se detecta la presencia de una mutación en el gen *PLCG1*, se selecciona para dicho paciente una terapia seleccionada del grupo formado por un inhibidor de fosfolipasa C, un antagonista de calmodulina, un inhibidor de calcineurina y cualquier combinación de las mismas,
- (ii) si se detecta la presencia de una mutación en el gen *CCR4*, se selecciona para dicho paciente una terapia seleccionada del grupo formado por un anticuerpo anti-CCR4, un inhibidor de MEK1, un inhibidor de MEK2 y cualquier combinación de las mismas, y/o
- (iii) si se detecta la presencia de una mutación en cualquiera de los genes seleccionados del grupo formado por *IL-6ST*, *JAK1* y *JAK3*, se selecciona para dicho paciente una terapia seleccionada del grupo formado por un inhibidor de JAK, un inhibidor de RORγt y sus combinaciones.

(iv)

El término “linfoma cutáneo de células T” o “LCCT”, tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a un grupo clínicamente heterogéneo de enfermedades linfoproliferativas de tipo no-Hodgkin caracterizadas por la acumulación clonal de linfocitos T de memoria maduros y residentes en la piel. Los linfocitos T malignos migran a la piel, donde originan una serie de lesiones cuya forma varía a medida que progresa la enfermedad, inicialmente en forma de erupción que puede formar placas y tumores antes de metastatizar a otras partes del organismo. Dentro del término LCCT se incluyen los siguientes subtipos: micosis fungoide (MF), reticulosis pagetoide, síndrome de Sézary (SS), piel laxa granulomatosa, papulosis linfomatoide, pitiriasis liquenoide crónica, pitiriasis liquenoide y varioliforme aguda, linfoma cutáneo de células T CD30+, linfoma de células grandes CD30+ cutáneo secundario, linfoma de células T grandes CD30- cutáneo no-micosis fungoide, linfoma de células T pleomórfico, linfoma de Lennert, linfoma de células T subcutáneo, linfoma angiocéntrico, linfoma de células blásticas NK. En una forma preferida de realización, el LCCT es micosis fungoide (MF) o síndrome de Sézary (SS).

El término “micosis fungoide” o “MF” o “síndrome de Alibert-Bazin” o “granuloma fungoide”, tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a un tipo de linfoma no-Hodgkin caracterizado por una proliferación de linfocitos T a nivel cutáneo con una expresión anormal de CD4. Es la expresión más frecuente de LCCT y se manifiesta inicialmente como una afectación cutánea en la que aparecen lesiones eritematosas y pruríticas, tumores con

ulceraciones. La micosis fungoide, si bien es frecuentemente indolente, puede evolucionar a una forma leucémica de la enfermedad denominada síndrome de Sézary.

El término “síndrome de Sézary” o “SS”, tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a un tipo de linfoma cutáneo que normalmente se considera un estadio tardío de micosis fungoide. El síndrome de Sézary se diferencia de la micosis fungoide por la presencia de linfocitos malignos en la sangre y se caracteriza por la presencia de enrojecimientos y erupciones con picor en la piel cubriendo más del 80% del cuerpo. En algunos casos pueden aparecer placas gruesas y enrojecidas e incluso tumores. Estos síntomas pueden ir acompañados de cambios en las uñas, pelo y párpados o la presencia de nódulos linfáticos agrandados.

Tanto la micosis fungoide como el síndrome de Sézary pueden presentar varios estadios dependiendo de las manifestaciones clínicas:

- Estadio IA: menos del 10% de la piel cubierta por parches y/o placas.
- Estadio IB: 10% o más de la superficie de la piel cubierta por parches y/o placas.
- Estadio IIA: cualquier proporción de la superficie de la piel cubierta por parches y/o placas; nódulos linfáticos agrandados, pero el cáncer no se ha extendido a los mismos.
- Estadio IIB: uno o más tumores en la piel; los nódulos linfáticos pueden estar agrandados, pero el cáncer no se ha extendido a los mismos.
- Estadio III: aproximadamente toda la piel está enrojecida y puede tener parches, placas o tumores; los nódulos linfáticos pueden estar agrandados, pero el cáncer no se ha extendido a los mismos.
- Estadio IVA: la mayor parte del área de la piel está enrojecida y hay células malignas en la sangre o cualquier proporción de la superficie de la piel está cubierta con parches, placas o tumores; el cáncer se ha extendido a los nódulos linfáticos que pueden estar agrandados.
- Estadio IVB: la mayor parte del área de la piel está enrojecida o cualquier proporción de la superficie de la piel está cubierta con parches, placas o tumores; los ganglios linfáticos pueden estar agrandados si el cáncer se ha extendido a los mismos o no.

Todos los estadios anteriores se consideran incluidos dentro de los términos micosis fungoides y síndrome de Sézary.

El término “paciente”, tal y como se usa en la presente descripción, abarca todos los animales clasificados como mamíferos e incluye, pero no se limita a, los animales domésticos y de granja, los primates y los seres humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores. Preferiblemente, el paciente es un ser humano hombre o mujer de cualquier edad o raza. En algunas realizaciones particulares, el paciente padece la enfermedad LCCT.

La expresión “terapia para el tratamiento”, tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a una intervención clínica en un intento de prevenir, curar, retrasar, reducir la gravedad de, o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno o enfermedad recurrente o trastorno, o con el fin de prolongar la supervivencia de un paciente más allá de lo esperado en ausencia de dicho tratamiento. Preferiblemente, la terapia seleccionada comprende la administración de uno o más fármacos.

El primer método de la invención comprende determinar en una muestra de un paciente la presencia de una mutación en al menos un gen. El término “muestra”, tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a un material biológico aislado de un sujeto. La muestra según el método del primer aspecto puede contener cualquier material biológico adecuado para detectar el biomarcador que se desee y puede comprender células y / o material no-celular del sujeto. En una realización particular, la muestra contiene células o tejido tumoral de LCCT del paciente. En una realización concreta, la muestra contiene ADN genómico procedente de tejido o células tumorales de LCCT del paciente. La muestra puede ser aislada de cualquier tejido o fluido biológico adecuado que comprenda células tumorales de LCCT. En una realización particular, la muestra se aísla mediante biopsia de tejido cutáneo que presenta las lesiones típicas de la enfermedad. En otra realización particular, la muestra se aísla a partir de sangre periférica del paciente. La muestra a analizar puede ser fresca, o, alternativamente, puede haber sido congelada o incluida en parafina (parafinada).

Una vez que se ha obtenido la muestra del paciente, ésta debe ser procesada para obtener la muestra de ADN. La muestra se puede tratar para disgregar de forma física o mecánica la estructura del tejido o la célula, liberando los componentes intracelulares en una solución acuosa u orgánica para preparar el ADN. La fracción de ADN adecuada para la puesta en práctica de la invención es el ADN nuclear o ADN genómico. La extracción del ADN puede ser llevada a cabo usando cualquier método conocido por los expertos en la materia (Sambrook *et al.*, 2001. “Molecular Cloning: a Laboratory Manual”, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3) que incluyen sin limitación, centrifugaciones en gradientes de densidad, extracción en dos fases usando fenol acuoso o cloroformo con etanol, cromatografía en columna, métodos basados en la capacidad del ADN para unirse a superficies de cristal y/o silicatos, como preparaciones de tierra diatomeas o lechos de cristal, empleando kits comerciales, por ejemplo, los kits “Q-Biogene fast DNA kit” o el “QIAamp(R) DNA Blood Mini Kit” (Qiagen, Hilden, Alemania) el “G-

Spin IIp" (Intron Biotechnology, Corea) o el "Fast Prep System Bio 101" (Qbiogene, Madrid, España) o los métodos descritos en las patentes norteamericanas US5.057.426 y US4.923.978 y en la solicitud de patente europea EP0512767A1.

El término "mutación" tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a un cambio en una secuencia de ácido nucleico. Las mutaciones útiles según el método diagnóstico de la invención son mutaciones somáticas, es decir, que afectan a las células somáticas o no germinales del individuo. Dicha mutación puede incluir, entre otras, sustituciones, es decir intercambio de uno o más nucleótidos por otros; inversiones, es decir, un segmento de ADN del interior de un gen se invierte, para ello es necesario que se produzcan dos giros de 180°, uno para invertir la secuencia y otro para mantener la polaridad del ADN; translocaciones, es decir, un segmento de un gen cambia de posición para estar en otro lugar distinto del mismo gen o en otro lugar del genoma; inserciones o deleciones de nucleótidos, es decir, se trata de ganancias de uno o más nucleótidos (inserciones o adiciones) o de pérdidas de uno o más nucleótidos (deleciones) que tienen como consecuencia cambios en el cuadro de lectura produciéndose un error de lectura durante la traducción que conlleva desde la formación de proteínas no funcionales hasta la ausencia de dicha proteína. Preferiblemente, las mutaciones son sustituciones en las que uno o más nucleótidos de un gen se intercambian por otros. Estas sustituciones dan lugar a proteínas en las que uno o varios aminoácidos son sustituidos por otros o bien a formas truncadas de las proteínas.

La presencia de mutaciones en una muestra de un paciente según el primer método de la invención puede realizarse por cualquier técnica adecuada para la determinación de mutaciones a partir de una muestra de un paciente conocida por el experto en la materia. La detección de mutaciones puede basarse en la detección de dichas mutaciones en el ADN genómico así como en los transcritos del mismo y las proteínas codificadas por el mismo. Preferiblemente, las mutaciones se detectan en ADN genómico.

El término "ADN genómico", tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a una población de ADN que comprende el conjunto de genes completo de un individuo.

Las mutaciones en el ADN genómico se detectan de manera ventajosa mediante técnicas basadas en el cambio de movilidad en fragmentos de ácido nucleico amplificados. Por ejemplo, Chen *et al.* (Anal. Biochem., 1996, 239:61-9), describe la detección de mutaciones de base única mediante un ensayo de cambio de movilidad competitivo. Además, los ensayos basados en la técnica de Marcelino *et al.*, (BioTechniques 26: 1134-1148, junio de 1999) están disponibles comercialmente. En una realización particular, pueden usarse análisis de heterodúplex por capilaridad para detectar la presencia de mutaciones basándose en el cambio de movilidad de ácidos nucleicos dúplex en sistemas capilares como resultado de la presencia de apareamientos erróneos.

La generación de ácidos nucleicos para el análisis de muestras requiere generalmente la amplificación de ácido nucleico. Muchos métodos de amplificación se basan en una reacción enzimática en cadena (tal como una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una reacción en cadena de la ligasa (LCR), o una replicación de secuencia autosostenida) o a partir de la replicación de todo o parte del vector en el que se ha clonado. Preferiblemente, la amplificación según la invención es una amplificación exponencial, tal como se muestra mediante por ejemplo la PCR. En una realización particular, la amplificación del ADN se lleva a cabo mediante PCR. Los principios y condiciones generales para la amplificación y detección de ácidos nucleicos, tal como usando PCR, se conocen bien por el experto en la técnica. En particular, la PCR llevada a cabo por el método de la presente invención usa cebadores de oligonucleótido específicos y apropiados u oligonucleótidos de amplificación para amplificar específicamente las secuencias diana de los genes de interés, tales como aquellas regiones que contienen las mutaciones identificadas y asociadas con la selección de terapia a aplicar a un paciente con LCCT o con la selección del paciente para la administración de una determinada terapia. Los términos "oligonucleótidos" o "cebadores" se usan en el presente documento de manera indistinguible y se refieren a un ácido nucleico polimérico que tiene generalmente menos de 1.000 residuos, incluyendo aquellos en un intervalo de tamaño que tiene un límite inferior de aproximadamente 2 a 5 residuos y un límite superior de aproximadamente 500 a 900 residuos. En realizaciones preferidas, los oligonucleótidos están en un intervalo de tamaño que tiene un límite inferior de aproximadamente 5 a aproximadamente 15 residuos y un límite superior de aproximadamente 100 a 200 residuos. Más preferiblemente, los oligonucleótidos de la presente invención están en un intervalo de tamaño que tiene un límite inferior de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 residuos y un límite superior de aproximadamente 17 a 100 residuos. Aunque los oligonucleótidos pueden purificarse a partir de ácidos nucleicos que se producen de manera natural, generalmente se sintetizan usando cualquiera de una variedad de métodos químicos o enzimáticos bien conocidos. En una realización particular de la invención, tales oligonucleótidos permiten la amplificación específica de los fragmentos de ADN que comprenden las mutaciones que se pretende detectar en los genes de interés.

Se han descrito muchos métodos de amplificación de señal y diana en la bibliografía, por ejemplo, revisiones generales de estos métodos en Landegren, U., *et al.*, Science, 1988, 242:229- 237 y Lewis, R., Genetic Engineering News 10:1, 54-55 (1990). Estos métodos de amplificación pueden usarse en los métodos de esta invención, e incluyen PCR, PCR *in situ*, reacción de amplificación de la ligasa (LAR), hibridación de la ligasa, replicasa del bacteriófago Qbeta, sistema de amplificación basado en transcripción (TAS), amplificación genómica con

secuenciación del transcrito (GAWTS), amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA) e hibridación *in situ*. Los cebadores adecuados para su uso en diversas técnicas de amplificación pueden prepararse según métodos conocidos en la técnica.

Una vez que se ha amplificado el ácido nucleico, están disponibles varias técnicas para la detección de mutaciones de pares de bases individuales. Una técnica de este tipo es el polimorfismo conformacional monocatenario (SSCP). La detección mediante SSCP se basa en la migración aberrante de ADN mutado monocatenario en comparación con ADN de referencia durante la electroforesis. La mutación produce el cambio conformacional en el ADN monocatenario, dando como resultado el cambio de movilidad. El SSCP fluorescente usa cebadores marcados de manera fluorescente para ayudar la detección. Por tanto, se amplifican los ADN mutante y de referencia usando cebadores marcados de manera fluorescente. El ADN amplificado se desnaturaliza y se enfría de manera instantánea para producir moléculas de ADN monocatenario, que se examinan mediante electroforesis en gel no desnaturalizante.

La escisión de apareamiento erróneo químico (CMC) se basa en el reconocimiento y la escisión de pares de bases apareados de manera errónea del ADN mediante una combinación de hidroxilamina, tetróxido de osmio y piperidina. Por tanto, se amplifican tanto el ADN de referencia como el ADN mutante con cebadores marcados de manera fluorescente. Se hibridan los amplicones y entonces se someten a escisión usando tetróxido de osmio, que se une a una base de T apareada de manera errónea, o hidroxilamina, que se une a una base de C apareada de manera errónea, seguido por piperidina que se escinde en el sitio de una base modificada. Entonces se detectan los fragmentos escindidos mediante electroforesis.

También pueden usarse técnicas basadas en polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP). Aunque muchos polimorfismos de nucleótidos individuales (SNP) no permiten el análisis de RFLP convencional, puede usarse PCR de análisis de restricción inducido por cebador (PIRA-PCR) para introducir sitios de restricción usando cebadores de PCR de una manera dependiente de SNP. Los cebadores para PIRA-PCR que introducen sitios de restricción adecuados pueden diseñarse mediante análisis computacional, por ejemplo tal como se describe en Xiaiyi *et al.* (2001) *Bioinformatics* 17:838-839.

Además, pueden usarse técnicas basadas en el análisis de WAVE (Methods Mol. Med. 2004; 108: 173-88). Este sistema de análisis de fragmentos de ADN puede usarse para detectar polimorfismos de nucleótidos individuales y se basa en cromatografía de líquidos modulada por temperatura y una matriz de alta resolución (Genet Test. 1997-98; 1 (3):201-6.)

La PCR en tiempo real (también conocida como PCR cuantitativa, PCR cuantitativa en tiempo real, o RTQ-PCR) es un método de amplificación y cuantificación de ADN simultáneas (Expert Rev. Mol. Diagn. 2005(2):209-19). El ADN se amplifica específicamente mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Tras cada ronda de amplificación, se cuantifica el ADN. Los métodos comunes de cuantificación incluyen el uso de colorantes fluorescentes que se intercalan con oligonucleótidos de ADN bicatenario y ADN modificado (denominados sondas) que fluorescen cuando se hibridan con un ADN complementario.

En una realización particular de la invención, la etapa de detección del método de la invención se lleva a cabo por medio de PCR cuantitativa seguida de secuenciación de ácido nucleico. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de métodos de secuenciación de ácidos nucleicos son secuenciación de ciclo (Sarkar *et al.*, 1995, *Nucleic Acids Res.* 23: 1269-70) o secuenciación directa de didesoxinucleótidos, en la que se usa parte o el ADN entero de interés que se ha recogido de la muestra como un molde para las reacciones de secuenciación. Se usa un cebador de oligonucleótido o conjunto de cebadores específicos para el gene o ADN de interés en reacciones de secuenciación convencionales. Pueden usarse otros métodos de secuenciación de ADN, tales como secuenciación mediante hibridación, secuenciación usando un "chip" que contiene muchos oligonucleótidos para la hibridación (como, por ejemplo, los producidos por Affymetrix Corp.; Ramsay *et al.*, 1998, *Nature Biotechnology* 16: 40-44; Marshall *et al.*, 1998, *Nature Biotechnology* 16: 27-31), secuenciación por HPLC (DeDionisio *et al.*, 1996, *J Chromatogr A* 735: 191-208), y modificaciones de estrategias de secuenciación de ADN tal como el ensayo de diagnóstico específico de alelos múltiples (MASDA; Shuber *et al.*, 1997, *Hum. Molec. Genet.* 6: 337-47), huella dactilar didesoxi (Sarkar *et al.*, 1992, *Genomics* 13: 441-3; Martincic *et al.*, 1996, *Oncogene* 13: 2039-44), y métodos de PCR basados en sonda fluorogénica (tal como Taqman; Perkin-Elmer Corp.; Heid *et al.*, 1996, *Genome Res.* 6: 986-94) y métodos basados en escisión.

Alternativamente, la amplificación puede llevarse a cabo usando cebadores que están marcados apropiadamente, y pueden detectarse los productos de extensión del cebador amplificado usando procedimientos y equipo para la detección del marcador. Preferiblemente, las sondas de esta invención se marcan con al menos un resto detectable, seleccionándose el resto o restos detectable(s) del grupo que consiste en: un conjugado, un sistema de detección ramificado, un cromóforo, un fluoróforo, un marcador de espín, un radioisótopo, una enzima, a hapteno, un éster de acridinio y un compuesto luminiscente. Como ejemplo ilustrativo, no limitativo, en el método de la presente invención los cebadores usados pueden marcarse con un fluoróforo. Más particularmente, el cebador inverso del método de la presente invención se marca con el fluoróforo 6-FAM en su extremo 5'. Este fluoróforo emite fluorescencia con una

longitud de onda máxima de 522 nm. La PCR puede llevarse a cabo usando uno de los cebadores marcados, por ejemplo, con cualquiera de los colorantes FAM, HEX, VIC o NED.

En una realización preferida del primer método de la invención, la detección de mutaciones se lleva a cabo mediante genotipado por PCR cuantitativa.

De acuerdo con el primer método de la invención se analiza la muestra del paciente con LCCT para detectar, al menos, una mutación en un gen seleccionado del grupo formado por los genes *PLCG1*, *CCR4*, *IL-6ST*, *JAK1*, *JAK3* y combinaciones de los mismos.

El término “*fosfolipasa C gamma 1*” o “*PLCG1*”, tal y como se usa aquí, se refiere a un gen que codifica la proteína PLCG1 responsable de catalizar la formación de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG) a partir de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2). PLCG1 es una proteína de gran relevancia en la ruta de señalización de TCR. La activación de TCR moviliza a PLCG1, que hidroliza PIP2 para generar los segundos mensajeros DAG e IP3, que a su vez activan múltiples cascadas de señalización. IP3 se une a su receptor en el retículo endoplásmico, liberando Ca^{2+} al citoplasma y activando sus efectores. De entre estos, el Ca^{2+} activa proteínas clave de la actividad celular como es el caso de la calmodulina y calcineurina. Esta última es una fosfatasa con capacidad de desfosforilar NFAT y activarlo. NFAT activado se transloca al núcleo induciendo la transcripción de genes implicados en la activación de células T. Por su parte, el DAG activa múltiples moléculas efectoras, entre otras PKC que finalmente pueden conducir a la activación de NFkB. El gen *PLCG1* puede ser de cualquier origen, incluyendo humano, bovino, murino, equino, etc. Preferiblemente, el gen *PLCG1* es de origen humano.

El término “*CCR4*”, tal y como se usa aquí, se refiere al gen que codifica la proteína CCR4 (C-C chemokine receptor type 4) que funciona como receptor para las quimioquinas CCL2, CCL4, CCL5, CCL17 y CCL22. El gen *CCR4* puede ser de cualquier origen, incluyendo humano, bovino, murino, equino, etc. Preferiblemente, el gen *CCR4* es de origen humano.

El término “*IL6ST*”, tal y como se usa aquí, se refiere a un gen que codifica la proteína gp130 o IL6ST o IL6beta o CD130, una glicoproteína transmembrana que forma una subunidad de los receptores de citoquinas de tipo I dentro de la familia de receptores de IL-6. Todos los miembros de la familia de receptores de IL-6 forman un complejo con gp130 para llevar a cabo la transducción de señal. El gen *IL6ST* puede ser de cualquier origen, incluyendo humano, bovino, murino, equino, etc. Preferiblemente, el gen *IL6ST* es de origen humano.

El término “*JAK1*”, tal y como se usa aquí, se refiere a un gen que codifica la proteína JAK1, una tirosina quinasa esencial para la señalización de ciertos citoquinas de tipo I y II. JAK1 interacciona con la cadena gamma de los receptores de citoquinas de tipo I, desencadenando la señalización de las familias de receptores IL-2R, IL-4R, gp130-R, CNTF-R, NNT-1R y leptina-R. El gen *JAK1* puede ser de cualquier origen, incluyendo humano, bovino, murino, equino, etc. Preferiblemente, el gen *JAK1* es de origen humano.

El término “*JAK3*”, tal y como se usa aquí, se refiere a un gen que codifica la proteína JAK3, una tirosina quinasa perteneciente a la familia JAK que se expresa mayoritariamente en células hematopoyéticas. JAK3 interacciona con los miembros de la familia STAT, implicados en transducción de señales y activación de la transcripción. JAK3 está implicado en la transducción de señales de los receptores de citoquinas de tipo I con cadenas gamma, como los receptores de las familias IL-2R, IL-4R, IL-7, IL-9R, IL-15R e IL-21R. El gen *JAK3* puede ser de cualquier origen, incluyendo humano, bovino, murino, equino, etc. Preferiblemente, el gen *JAK3* es de origen humano.

En una realización particular, el primer método de la invención comprende determinar la presencia de al menos una mutación en el gen *PLCG1*. Preferiblemente, el primer método de la invención pretende determinar la presencia de al menos una mutación en los genes *PLCG1*, *CCR4*, *IL-6ST*, *JAK1* y *JAK3*. La presencia de mutaciones en los genes *PLCG1*, *CCR4*, *IL-6ST*, *JAK1* y *JAK3* también podría analizarse determinando la presencia de mutaciones en las proteínas codificadas por dichos genes.

En una realización particular, el primer método de la invención comprende determinar la presencia de una mutación en uno de los genes *PLCG1*, *CCR4*, *IL-6ST*, *JAK1* o *JAK3*, preferiblemente en el gen *PLCG1*.

En otra realización particular, el primer método de la invención comprende determinar la presencia de:

- una mutación en el gen *PLCG1* y
- una mutación en uno de los genes *CCR4*, *IL-6ST*, *JAK1* y *JAK3*.

A modo ilustrativo, según esta realización particular, el primer método de la invención comprende determinar la presencia de una mutación en el gen *PLCG1* y una mutación en el gen *CCR4*, o en el gen *IL-6ST*, o en el gen *JAK1* o en el gen *JAK3*.

En otra realización particular, el primer método de la invención comprende determinar la presencia de:

- una mutación en el gen *PLCG1*,

- una mutación en el gen *CCR4* y
- una mutación en uno de los genes *IL-6ST*, *JAK1* y *JAK3*.

A modo ilustrativo, según esta realización particular, el primer método de la invención comprende determinar la presencia de una mutación en el gen *PLCG1*, una mutación en el gen *CCR4*, y una mutación en el gen *IL-6ST*, o en el gen *JAK1* o en el gen *JAK3*.

En otra realización particular, el primer método de la invención comprende determinar la presencia de:

- una mutación en el gen *PLCG1*,
- una mutación en el gen *IL-6ST* y
- una mutación en uno de los genes *CCR4*, *JAK1* y *JAK3*.

A modo ilustrativo, según esta realización particular, el primer método de la invención comprende determinar la presencia de una mutación en el gen *PLCG1*, una mutación en el gen *IL-6ST*, y una mutación en el gen *CCR4*, o en el gen *JAK1* o en el gen *JAK3*.

En otra realización particular, el primer método de la invención comprende determinar la presencia de:

- una mutación en el gen *PLCG1*,
- una mutación en el gen *JAK1* y
- una mutación en uno de los genes *CCR4*, *IL-6ST* y *JAK3*.

A modo ilustrativo, según esta realización particular, el primer método de la invención comprende determinar la presencia de una mutación en el gen *PLCG1*, una mutación en el gen *JAK1*, y una mutación en el gen *CCR4*, o en el gen *IL-6ST* o en el gen *JAK3*.

En otra realización particular, el primer método de la invención comprende determinar la presencia de:

- una mutación en el gen *PLCG1*,
- una mutación en el gen *JAK3* y
- una mutación en uno de los genes *CCR4*, *IL-6ST* y *JAK1*.

A modo ilustrativo, según esta realización particular, el primer método de la invención comprende determinar la presencia de una mutación en el gen *PLCG1*, una mutación en el gen *JAK3*, y una mutación en el gen *CCR4*, o en el gen *IL-6ST* o en el gen *JAK1*.

En otra realización particular, el primer método de la invención comprende determinar la presencia de:

- una mutación en el gen *PLCG1*,
- una mutación en el gen *CCR4*,
- una mutación en el gen *IL-6ST*, y
- una mutación en uno de los genes *JAK1* y *JAK3*.

A modo ilustrativo, según esta realización particular, el primer método de la invención comprende determinar la presencia de una mutación en el gen *PLCG1*, una mutación en el gen *CCR4*, una mutación en el gen *IL-6ST* y una mutación o en el gen *JAK1* o en el gen *JAK3*.

En otra realización particular, el primer método de la invención comprende determinar la presencia de:

- una mutación en el gen *PLCG1*,
- una mutación en el gen *IL-6ST*,
- una mutación en el gen *JAK1*, y
- una mutación en el gen *JAK3*.

A modo ilustrativo, según esta realización particular, el primer método de la invención comprende determinar la presencia de una mutación en el gen *PLCG1*, una mutación en el gen *IL-6ST*, una mutación en el gen *JAK1* y una mutación en el gen *JAK3*.

En otra realización particular, el primer método de la invención comprende determinar la presencia de:

- una mutación en el gen *PLCG1*,
- una mutación en el gen *CCR4*,
- una mutación en el gen *IL-6ST*,
- una mutación en el gen *JAK1* y
- una mutación en el gen *JAK3*.

Preferiblemente, las mutaciones detectadas en cada uno de los genes analizados se seleccionan de las que figuran en la Tabla 1. Dichas mutaciones pueden dar lugar a cambios de aminoácido en la proteína codificada por el gen en cuestión, o bien pueden dar lugar a la formación de un codón de STOP aberrante como consecuencia del cual se genera una forma truncada de la proteína. Preferiblemente, la mutación da lugar a un cambio en un aminoácido de

la secuencia de la proteína. En el caso del gen *PLCG1*, preferiblemente la mutación da lugar a un cambio de Ser por Phe en el residuo 345 de la secuencia de aminoácidos de la proteína (S345F) o bien da lugar a un cambio de Ser por Phe en el residuo 520 de la secuencia de aminoácidos de la proteína (S520F).

5 **Tabla 1**
Mutaciones preferidas en los genes *PLCG1*, *CCR4*, *IL-6ST*, *JAK1* y *JAK3*
[Se indica la posición de la mutación en la secuencia codificante del ADN (SCA) y el correspondiente cambio de aminoácido en la secuencia de la proteína]

Localización	Cambio	Consecuencia	Posición en la SCA	Posición en la proteína	Cambio de aminoácido	Gen
3:32995957	C/A	Variante con cambio de sentido	1043	348	T/K	<i>CCR4</i>
5:55256271	C/G	Variante con cambio de sentido	932	311	S/T	<i>IL6ST</i>
1:65312344	G/A	Variante con cambio de sentido	1975	659	R/C	<i>JAK1</i>
19:17949108	C/T	Variante con cambio de sentido	1533	511	M/I	<i>JAK3</i>
20:39794139	C/T	Variante con cambio de sentido	1559	520	S/F	<i>PLCG1</i>
20:39792584	C/T	Variante con cambio de sentido	1034	345	S/F	<i>PLCG1</i>
11:36511782	C/T	Variante con cambio de sentido	1175	392	R/H	<i>TRAF6</i>

10 Según el primer método de la invención, cuando se detecta una mutación en el gen *PLG1* se selecciona para el paciente una terapia seleccionada del grupo formado por un inhibidor de fosfolipasa C, un antagonista de calmodulina, un inhibidor de calcineurina y cualquier combinación de las mismas.

15 El término “inhibidor de fosfolipasa C”, tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a un compuesto capaz de provocar una disminución en la actividad de la proteína fosfolipasa C así como a un compuesto capaz de provocar una disminución de la expresión de dicha proteína o del gen que codifica dicha proteína. El término “fosfolipasa C” o “fosfoinositida fosfolipasa C” o “PLC” se refiere a una familia de enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces diéster fosfóricos en el PIP₂. El término fosfolipasa C incluye las isozimas PLCB1, PLCB2, PLCB3, PLCB4, PLCD1, PLCD3, PLCD4, PLCE1, PLCG1, PLCG2, PLCH1, PLCH2 y PLCZ1.

20 Ejemplos ilustrativos no limitativos de inhibidores de fosfolipasa C incluyen:

- péptidos inhibidores de fosfolipasa C tales como los que se divulgan en ES2114220T3;
- U-73122 (1-[6-[[[(17β)-3-metoxiestra-1,3,5(10)-trien-17-il]amino]hexil]-1H-pirrol-2,5-diona; número CAS 112648-68-7);
- D609 (O-(octahidro-4,7-metano-1H-inden-5-il) carbonopotasio ditioata; número CAS 83373-60-8);
- edelfosine ((7R)-4-hidroxi-7-metoxi-N,N,N-trimetil-3,5,9-trioxa-4-fosfaheptacosan-1-amino-4-óxido; número CAS 77286-66-9);
- O-triciclo[5.2.1.0^{2,6}]dec-9-il ditiocarbonato potásico (número CAS 83373-60-8); y
- los compuestos divulgados en la patente estadounidense US7262197B2; en las solicitudes de patente estadounidenses US2004235855AA, US2004242639AA, US4474806A y US4515722A; en la solicitud de patente internacional WO9510286A1; y en las solicitudes de patentes europeas EP0497234 y EP0187989.

En una realización preferida del primer método de la invención, el inhibidor de fosfolipasa C es U-73122.

35 El término “antagonista de calmodulina”, tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a un compuesto capaz de unirse a la calmodulina impidiendo su función. La calmodulina (CaM) es una proteína ácida intracelular de bajo peso molecular que funciona como regulador de la transducción de señal mediada por calcio en la célula. Presenta cuatro sitios de unión a Ca²⁺, al que se une con gran afinidad de forma reversible. La calmodulina unida a Ca²⁺ es capaz de asociarse a multitud de proteínas modulando su actividad. El término calmodulina incluye a todos los miembros de la familia: calmodulina 1, 2 y 3 (CALM1, CALM2 y CALM3) y calmodulin-like 1, 3, 4, 5 y 6 (CALML1, CALML3, CALML4, CALML5 y CALML6). Ejemplos ilustrativos no limitativos de antagonistas de calmodulina incluyen:

- W-5 (N-(6-aminohexil)-1-naftalensulfonamida hidrocloreto; número CAS 61714-25-8);
- W-7 (N-(6-aminohexil)-5-cloro-1-naphthalensulfonamida hidrocloreto; número CAS 61714-27-0);
- W-12 (N-(4-aminobutil)-2-naftalensulfonamida; número CAS 89108-46-3);
- W-13 (N-(4-aminobutil)-5-cloro-2-naftaleneulfonamida; número CAS 88519-57-7);
- Calmidazolium (R 24571);

- el péptido "Calmodulin Binding Domain", que comprende la secuencia de aminoácidos Leu-Lys-Lys-Phe-Asn-Ala-Arg-Arg-Lys-Leu-Lys-Gly-Ala-Ile-Leu-Thr-Thr-Met-Leu-Ala;
- el péptido "Calmodulin Inhibitory Peptide", que comprende la secuencia de aminoácidos Arg-Arg-Lys-Trp-Gln-Lys-Thr-Gly-His-Ala-Val-Arg-Ala-Ile-Gly-Arg-Leu, opcionalmente acetilado en su extremo amino terminal;
- una fenotiazina, tal como por ejemplo, Clorpromazine (2-cloro-10-[3'-(dimetilamino)propil]fenotiazina);
- CGS 9343B (1,3-dihidro-1-[1-[(4-metil-4*H*,6*H*-pirrolo[1,2-*a*][4,1]benzoxazepin-4-il)metil]-4-piperidinil]-2*H*-benzimidazol-2-ona maleato; número CAS 109826-27-9); y
- Vinpocetine (éster etílico del ácido (3 α ,16 α)-eburnamenine-14-carboxílico; número CAS 42971-09-5).

En una realización preferida, el antagonista de calmodulina es W-5.

El término "inhibidor de calcineurina", tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a un compuesto capaz de provocar una disminución en la actividad de la proteína calcineurina, así como a un compuesto capaz de provocar una disminución de la expresión de dicha proteína o del gen que codifica dicha proteína. El término "calcineurina" o "serina-treonina proteína fosfatasa 2B" o "PPP3C", se refiere a una enzima que cataliza reacciones de defosforilación de grupos fosfato unidos a residuos de serina o de treonina de un amplio rango de proteínas. Pertenece a la clase PP2B de las fosfoproteínas fosfatasa y es dependiente de calcio, de forma que su actividad se estimula por calmodulina. Es responsable de la activación de la transcripción de interleuquina-2, que a su vez estimula el crecimiento y diferenciación de linfocitos T. La calcineurina defosforila el componente citoplasmático de NFAT, que va al núcleo donde activa los genes implicados en la síntesis de IL-2. Ejemplos ilustrativos no limitativos de inhibidores de calcineurina incluyen:

- Ciclosporina;
- Pimecrolimus;
- Tacrolimus, también conocido como "FK-506" o "Fujimicina";
- Calcipresina; y
- CN585 (6-(3,4-diclorofenil)-4-(N,N-dimetilaminoetil)-2-fenil-pirimidina; número CAS 1213234-31-1).

Preferiblemente, el inhibidor de calcineurina es tacrolimus o ciclosporina; más preferiblemente, tacrolimus.

En una realización preferida del primer método de la invención, cuando se detecta la presencia de una mutación en el gen *PLCG1* en una muestra de un paciente con LCCT, se selecciona para dicho paciente una terapia con un inhibidor de calcineurina, preferiblemente tacrolimus o ciclosporina, más preferiblemente tacrolimus.

Según el primer método de la invención, cuando se detecta una mutación en el gen *CCR4* se selecciona para el paciente una terapia seleccionada del grupo formado por un anticuerpo anti-CCR4, un inhibidor de MEK1, un inhibidor de MEK2 y cualquier combinación de las mismas.

El término "anticuerpo anti-CCR4", tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a un anticuerpo que reconoce la proteína CCR4, producto del gen *CCR4* anteriormente descrito. El término "anticuerpo" se refiere a una glucoproteína que exhibe una actividad de unión específica por una proteína particular, a la que se denomina "antígeno". El término "anticuerpo" comprende anticuerpos monoclonales, o anticuerpos policlonales, intactos, o fragmentos de ellos; e incluye anticuerpos humanos, humanizados y de origen no humano. Los "anticuerpos monoclonales" son poblaciones homogéneas de anticuerpos, altamente específicos, que están dirigidos contra un único sitio o "determinante" antigénico. Ejemplos ilustrativos no limitativos de anticuerpos anti-CCR4 incluyen mogamulizumab o KW-0761, KM-2760, KM2160, mAb1567 o los anticuerpos descritos en las solicitudes de patente estadounidenses US2012164161AA y US2011171210AA, en las solicitudes de patente europeas EP2440579 A2 y EP1144453 A1 o en la patentes europeas EP1449850B1 y EP1270595B1. En una forma preferida de realización, el anticuerpo anti-CCR4 es un anticuerpo monoclonal, como por ejemplo KW-0761.

Los términos "inhibidor de MEK1" e "inhibidor de MEK2", tal y como se usan en la presente descripción, se refieren a un compuesto capaz de provocar una disminución en la actividad de la proteína MEK1, de la proteína MEK2 o de ambas, así como a un compuesto capaz de provocar una disminución de la expresión de dichas proteínas o de los genes que codifican dichas proteínas. Los términos "MEK1" o "MAP2K1" y "MEK2" o "MAP2K2" se refieren a proteínas que en humanos están codificadas por los genes *MAPK2K1* y *MAP2K2* respectivamente y que forman parte de la familia de quinasas quinasas activadas por mitógenos (MAP quinasas quinasas) o quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK quinasas). MEK1 y MEK2 fosforilan a las MAP quinasas estimulando su actividad enzimática, y regulando de esta forma procesos celulares como proliferación, diferenciación, regulación de la transcripción y desarrollo. Ejemplos ilustrativos no limitativos de inhibidores de MEK1 y/o MEK2 incluyen selumetinib o AZD6244, XL518, CI-1040, PD035901, GSK1120212 y los compuestos descritos en las solicitudes de patente US2012238599AA, WO00/41994; WO00/42022; WO00/42029; WO00/68201; WO01/68619; WO02/06213, WO03/077914, WO 05/023251, WO05/121142, WO07/014011, WO07/071951, WO07/123939, WO08/021389, WO08/078086, WO08/120004, WO08/124085, WO08/125180, WO09/018,233, WO07/044084, WO07/121481,

WO09/018238 y WO10108852. En una forma preferida de realización, el inhibidor de MEK1 y el inhibidor de MEK2 es selumetinib o AZD6244.

Según el primer método de la invención, cuando se detecta una mutación en cualquiera de los genes *IL-6ST*, *JAK1* y *JAK3* se selecciona para el paciente una terapia seleccionada del grupo formado por un inhibidor de JAK, un inhibidor de RORyt y sus combinaciones.

El término “inhibidor de JAK”, tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a un compuesto capaz de provocar una disminución en la actividad de la proteína JAK, así como a un compuesto capaz de provocar una disminución de la expresión de dicha proteína o del gen que codifica dicha proteína. El término “JAK” o “quinasa Janus” se refiere a una familia de proteínas tirosina quinasas no receptoras que transducen señales mediadas por citoquinas a través de la ruta de señalización JAK-STAT. El término JAK incluye a los cuatro miembros de la familia: JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2. Ejemplos ilustrativos no limitativos de inhibidores de JAK incluyen:

- Ruxolitinib, inhibidor de JAK1 y JAK2;
- Lestaurtinib, inhibidor de JAK2;
- Tofacitinib, inhibidor de JAK3;
- Pacritinib, inhibidor de JAK2;
- CYT387, inhibidor de JAK2;
- Baricitinib, inhibidor de JAK1 y JAK2;
- TG101348, inhibidor de JAK2; y
- los compuestos descritos en las solicitudes de patente WO12143320A1, WO12125886A1, WO12125887A1, WO12125893A1, WO12125603A1, EP2463289A1, WO12068440A1, WO12068450A1, WO12054364A2, WO12046793A1, EP2441755A1, WO12037132A1, EP2397482A1, WO11144584A1, WO11134831A1, WO11112662A1, EP2360158A1, WO11103423A1, WO11101806A1, WO11097087A1, EP2338888A1, EP2513114A1, EP2491039 A1, EP2475648A1, EP2473510A1, EP2448941A2, EP2445911A1, EP2440558A1, EP2432472A1, EP2432555A1, EP2420502A1, EP2419423A1, EP2376491A1, EP2380877A1, EP2348860A1.

En una forma preferida de realización, el inhibidor de JAK es ruxolitinib.

El término “inhibidor de RORyt”, tal y como se usa en la presente descripción, se refiere a un compuesto capaz de provocar una disminución en la actividad de la proteína de RORyt, así como a un compuesto capaz de provocar una disminución de la expresión de dicha proteína o del gen que codifica dicha proteína. El término “RORyt” (*retinoic acid-related orphan receptor*) se refiere a un receptor nuclear que se expresa en el timo en linfocitos inmaduros CD4⁺/CD8⁺. RORyt juega un papel clave en la diferenciación de los timocitos a células T helper 17. Ejemplos ilustrativos no limitativos de inhibidores de RORyt incluyen ácido ursólico, digoxina, SR1001, SR2211, ML 209 y los compuestos descritos en la solicitud de patente EP2487159A1. En una realización preferida del método del primer aspecto, el inhibidor de RORyt es ácido ursólico.

Los inventores han detectado que la presencia de mutaciones en el gen *PLCG1* se correlaciona con un aumento de la localización en el núcleo de NFAT y de las proteínas p50 y p52 que forman parte del complejo NFκβ, lo que implica un incremento en la actividad de los factores transcripcionales NFAT y NFκβ debido a un aumento en la actividad de PLCG1. Por tanto, el aumento en una muestra de un paciente con LCCT de la localización de las proteínas NFAT, p50 y p52 en el núcleo puede ser empleado como un indicador de la conveniencia de administrar a ese paciente un tratamiento que tenga como diana terapéutica la proteína PLCG1 o la ruta de señalización en la que está implicada dicha proteína. Así, si detecta un nivel de NFAT en el núcleo superior a un valor de referencia, entonces se podría seleccionar para dicho paciente una terapia seleccionada del grupo formado por un inhibidor de fosfolipasa C, un antagonista de calmodulina, un inhibidor de calcineurina y cualquier combinación de las mismas; asimismo, si se detecta un nivel de p50 y/o p52 en el núcleo superior a un valor de referencia, entonces se podría seleccionar para dicho paciente una terapia con un inhibidor de PLCG1. De igual forma, un aumento en una muestra de un paciente con LCCT en los niveles de fosforilación de STAT3 puede ser indicativo de una mayor actividad de cualquiera de las proteínas IL-6ST, JAK1 o JAK3, lo que indicaría la conveniencia de administrar a dicho paciente un tratamiento que tenga como diana terapéutica esas proteínas o la ruta de señalización en la que intervienen dichas proteínas. Por tanto, si en una muestra del paciente con LCCT se detecta un nivel de fosforilación de STAT3 superior a un valor de referencia, entonces se podría seleccionar para dicho paciente una terapia seleccionada del grupo formado por un inhibidor de JAK, un inhibidor de RORyt y sus combinaciones.

Método para seleccionar un paciente con LCCT para una terapia

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método, en adelante “segundo método de la invención”, para seleccionar un paciente con linfoma cutáneo de células T (LCCT) para una terapia seleccionada del grupo formado por un inhibidor de fosfolipasa C, un antagonista de calmodulina, un inhibidor de calcineurina y cualquier combinación de las mismas, que comprende determinar en una muestra de dicho paciente la presencia de una mutación en el gen *PLCG1*, en donde dicho paciente es seleccionado para dicha terapia si presenta dicha mutación.

Las características del LCCT, terapia, *PLCG1*, inhibidor de fosfolipasa C, antagonista de calmodulina, inhibidor de calcineurina y muestra del paciente con LCCT, así como los métodos para detectar la presencia de mutaciones en genes, y, en particular, la presencia de una mutación en el gen *PLCG1*, ya han sido mencionadas previamente en relación con el primer método de la invención y se incorporan aquí por referencia.

En una realización preferida, la mutación en el gen *PLCG1* se selecciona de las que figuran en la Tabla 1.

En otra realización preferida, el inhibidor de fosfolipasa C es U73122, el antagonista de calmodulina es W-5 y el inhibidor de calcineurina se selecciona del grupo formado por FK-506 y ciclosporina.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método, en adelante “tercer método de la invención”, para seleccionar un paciente con linfoma cutáneo de células T (LCCT) para una terapia seleccionada del grupo formado por un anticuerpo anti-CCR4, un inhibidor de MEK1, un inhibidor de MEK2 y cualquier combinación de las mismas, que comprende determinar en una muestra de dicho paciente la presencia de una mutación en el gen *CCR4*, en donde dicho paciente es seleccionado para dicha terapia si presenta dicha mutación.

Las características del LCCT, terapia, *CCR4*, anticuerpo anti-CCR4, inhibidor de MEK1, inhibidor de MEK2 y la muestra del paciente con LCCT, así como los métodos para detectar la presencia de mutaciones en genes, y, en particular, la presencia de una mutación en el gen *CCR4*, ya han sido mencionadas previamente en relación con el primer método de la invención y se incorporan aquí por referencia.

En una forma preferida de realización del tercer método de la invención, la mutación en el gen *CCR4* es la que figura en la Tabla 1.

En otra forma preferida de realización del tercer método de la invención, el anticuerpo anti-CCR4 es el anticuerpo monoclonal KW-0761, el inhibidor de MEK1 es AZD6244 y el inhibidor de MEK2 es AZD6244.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método, en adelante “cuarto método de la invención”, para seleccionar un paciente con linfoma cutáneo de células T (LCCT) para una terapia seleccionada del grupo formado por un inhibidor de JAK, un inhibidor de ROR γ t y una combinación de las mismas, que comprende determinar en una muestra de dicho paciente la presencia de una mutación en cualquiera de los genes seleccionados del grupo formado por *IL-6ST*, *JAK1*, *JAK3* y cualquier combinación de los mismos, en donde dicho paciente es seleccionado para dicha terapia si presenta dicha mutación.

Las características del LCCT, terapia, *IL-6ST*, *JAK1*, *JAK3*, inhibidor de JAK, inhibidor de ROR γ t y la muestra del paciente con LCCT, así como los métodos para detectar la presencia de mutaciones en genes, y, en particular, la presencia de una mutación en los genes *IL-6ST*, *JAK1* y/o *JAK3*, ya han sido mencionadas previamente en relación con el primer método de la invención y se incorporan aquí por referencia.

En una forma preferida de realización del cuarto método de la invención, las mutaciones en cualquiera de los genes seleccionados del grupo formado por *IL-6ST*, *JAK1* y *JAK3* se seleccionan de entre las que figuran en la Tabla 1.

En otra forma preferida de realización del cuarto método de la invención, el inhibidor de JAK es ruxolitinib y el inhibidor de ROR γ t es ácido ursólico.

Formas preferidas de realización de los métodos segundo, tercero y cuarto de la invención incluyen que la muestra comprende de tejido o células tumorales, que la presencia de la mutación se detecta mediante PCR cuantitativa y que el LCCT se selecciona del grupo formado por micosis fungoide (MF) y síndrome de Sézary (SS).

Kits de la invención

En otro aspecto, la invención se relaciona con un kit, en adelante “kit de la invención”, que comprende uno o más reactivos adecuados para llevar a cabo un método según los aspectos primero a cuarto, en donde dichos reactivos comprenden una o más parejas de oligonucleótidos que hibridan específicamente con una región de al menos un gen, en donde dicha región comprende la mutación que se quiere detectar y en donde dicho gen se selecciona del grupo formado por los genes *PLCG1*, *CCR4*, *IL-6ST*, *JAK1*, *JAK3*, y cualquier combinación de los mismos.

En una realización particular, la mutación a detectar se selecciona de las mutaciones mostradas en la Tabla 1.

En una realización particular, el kit de la invención comprende uno o más reactivos seleccionados del grupo formado por

- una o más parejas de oligonucleótidos que hibridan específicamente con una región del gen *PLCG1*, en donde dicha región comprende la mutación a detectar, preferiblemente dicha mutación se selecciona de las que figuran en la Tabla 1,

- una o más parejas de oligonucleótidos que hibridan específicamente con una región del gen *CCR4*, en donde dicha región comprende la mutación a detectar, preferiblemente la mutación es la que figura en la Tabla 1,
- una o más parejas de oligonucleótidos que hibridan específicamente con una región del gen *IL-6ST*, en donde dicha región comprende la mutación a detectar, preferiblemente la mutación es la que figura en la Tabla 1,
- una o más parejas de oligonucleótidos que hibridan específicamente con una región del gen *JAK1*, en donde dicha región comprende la mutación a detectar, preferiblemente la mutación es la que figura en la Tabla 1; y
- una o más parejas de oligonucleótidos que hibridan específicamente con una región del gen *JAK3*, en donde dicha región comprende la mutación a detectar, preferiblemente la mutación es la que figura en la Tabla 1.

En otra realización particular, el kit de la invención comprende una o más parejas de oligonucleótidos que hibridan específicamente con una región del gen *PLCG1*, en donde dicha región comprende la mutación a detectar, preferiblemente dicha mutación se selecciona de las que figuran en la Tabla 1.

En otra realización particular, el kit de la invención comprende

- una o más parejas de oligonucleótidos que hibridan específicamente con una región del gen *PLCG1*, en donde dicha región comprende la mutación a detectar, preferiblemente dicha mutación se selecciona de las que figuran en la Tabla 1,
- una o más parejas de oligonucleótidos que hibridan específicamente con una región del gen *CCR4*, en donde dicha región comprende la mutación a detectar, preferiblemente la mutación es la que figura en la Tabla 1,
- una o más parejas de oligonucleótidos que hibridan específicamente con una región del gen *IL-6ST*, en donde dicha región comprende la mutación a detectar, preferiblemente la mutación es la que figura en la Tabla 1,
- una o más parejas de oligonucleótidos que hibridan específicamente con una región del gen *JAK1*, en donde dicha región comprende la mutación a detectar, preferiblemente la mutación es la que figura en la Tabla 1, y
- una o más parejas de oligonucleótidos que hibridan específicamente con una región del gen *JAK3*, en donde dicha región comprende la mutación a detectar, preferiblemente la mutación es la que figura en la Tabla 1.

Como entiende el experto en la materia, el kit de la invención además de comprender una o más parejas de oligonucleótidos, puede incluir, opcionalmente, los reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción de PCR cuantitativa, entre los que se incluyen, sin limitar a, desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs), iones divalentes y/o monovalentes, una solución tampón (buffer) que mantiene el pH adecuado para el funcionamiento de la ADN polimerasa, ADN polimerasa o mezcla de distintas polimerasas, etc. No obstante, si el kit de la invención no comprende los reactivos necesarios para poner en práctica el método de la invención, éstos están disponibles comercialmente y pueden encontrarse formando parte de un kit. Cualquier kit de los disponibles comercialmente que contenga los reactivos necesarios para llevar a cabo una reacción de amplificación, puede emplearse con éxito en la puesta en práctica del método de la invención.

Por otro lado, como entiende el experto en la materia, el kit de la invención puede comprender parejas de cebadores ya marcados, o los reactivos necesarios para llevar a cabo el marcaje de los mismos. Los distintos métodos que existen en el estado de la técnica para realizar el marcaje de los cebadores, así como los tipos de compuestos que se pueden emplear en dicho marcaje han sido explicados previamente en la presente memoria.

Así, en una realización particular, el kit de la invención comprende parejas de cebadores en donde uno de los oligonucleótidos de cada pareja está marcado en uno de sus extremos, o los reactivos necesarios para marcar las parejas de cebadores.

En una realización todavía más particular del kit de la invención, los compuestos empleados en el marcaje de los oligonucleótidos seleccionan del grupo que consiste en un radioisótopo, un material fluorescente, digoxigenina y biotina, que en otra realización aún más particular, el material fluorescente se selecciona del grupo que consiste en 5-carboxifluoresceína (5-FAM), 6-FAM, análogo tetraclorinado de t-FAM (TET), análogo hexaclorinado de 6-FAM (HEX), 6-carboxitetrametilrodamina (TAMRA), 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxi-4', 5'-dicloro-2', 7'-dimetoxifluoresceína (JOE), NED (ABI), Cy-3, Cy-5, Cy-5.5, fluorescein-6-isotiocinato (FITC) y tetrametilrodamina-5-isotiocinato (TRITC).

En una realización preferida, los reactivos adecuados para llevar a cabo un método según los aspectos inventivos primero a cuarto comprenden al menos un 10%, al menos un 20%, al menos un 30%, al menos un 40%, al menos

un 50%, menos un 60% , al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90% o al menos un 100% del total de los oligonucleótidos y/o de los anticuerpos que forman el kit.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de un kit de la invención para seleccionar una terapia para el tratamiento de un paciente con linfoma cutáneo de células T (LCCT) o para seleccionar un paciente con LCCT para una terapia seleccionada, tal como una terapia seleccionada del grupo de terapias basadas en la administración de un inhibidor de fosfolipasa C, un antagonista de calmodulina, un inhibidor de calcineurina, un anticuerpo anti-CCR4, un inhibidor de MEK1, un inhibidor de MEK2, un inhibidor de JAK, un inhibidor de ROR γ t y cualquier combinación de las mismas.

EJEMPLO 1

Identificación de mutaciones en muestras de pacientes con LCCT

Materiales y Métodos

Materiales

Para los estudios mutacionales se utilizó ADN genómico extraído de muestra congelada, fresca o parafinada de 11 pacientes con linfoma cutáneo de células T (LCCT), en concreto 2 con micosis fungoide (MF) tumoral, 3 con MF eritrodérmica y 6 con síndrome de Sézary (SS), diagnosticados de acuerdo a la clasificación WHO-EORTC (Willemze, R. et al. Blood, 2005, Vol. 105 (10): 3768-3785).

El ADN plasmídico utilizado en los estudios funcionales de las mutaciones de *PLCG1* fueron los vectores pCMV-Entry-PLCG1(human)-DKK-Myc (Origene), pGL4.30-luc2P/NFAT-RE/Hygro (Promega) y pRLNull (Promega). Las células utilizadas en estos estudios fueron HEK293T (ATCC) crecidas en placas de cultivo celular con DMEM (Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal (Lonza) y 1% de la mezcla de antibióticos Penicilina/Estreptomina (Lonza).

Ultrasecuenciación con enriquecimiento previo en los genes/secuencias de interés.

La selección de los genes se realizó a partir de las bases de datos KEGG y BioCarta y datos publicados en la literatura científica sobre linfomas y/o genes que participan en las rutas de señalización de TCR y otras relacionadas como NF κ B o JAK/STAT. El "genome browser" USCS (<http://genome.ucsc.edu/>) se usó para seleccionar la regions exónicas y reguladoras de los genes de interés. Las coordenadas de las secuencias genómicas están basadas en NCBI Build 37 (UCSC hg19). La herramienta eArray (Agilent Technologies) se usó para el diseño de los oligos del SureSelect Target Enrichment System kit.

Para el enriquecimiento y construcción de las librerías se siguieron los protocolos para "SureSelect Target Enrichment System" kit (Agilent Technologies) combinado con la guía "Genomic DNA Sample Prep for single-end sequencing" (Illumina, San Diego, CA, USA). Se generaron los "cluster" correspondientes a partir de las librerías de ADN así generadas y se secuenciaron en el Genome Analyzer IIx de flow cell for cluster generation and sequenced using the Illumina (42-bp, paired end (PE-42) de acuerdo al protocolo de Illumina.

La calidad de los datos de secuenciación obtenidos se chequeó con FastQC (<http://www.bioinformatics.bbsrc.ac.uk/projects/fastqc/>) y fueron posteriormente alineados al genoma humano de referencia (GRCh37) usando el alineamiento Burrows-Wheeler (BWA) y BFAST. Las variantes somáticas se identificaron usando "Unified Genotyper" v2 disponible en GATK. Posteriormente se filtraron los SNPs con las bases de datos dbSNP 132 (hg19) y 1000 Genomes Project. Sólo aquellas variantes con una profundidad mínima de 30x en el ADN tumoral, no presentes en el ADN normal y no sinónimas se consideraron para validación posterior (amplificación por PCR de la región de interés, seguido por secuenciación Sanger en secuenciador capilar).

En el caso de la mutación c.1034T>C, S345F en *PLCG1*, se analizó su presencia en la serie de validación en ADN obtenido tanto de muestra fresco o congelado como parafinada mediante qPCR.

Resultados

En este ensayo se procedió a identificar mutaciones en pacientes de LCCT en 524 genes relacionados con rutas de señalización/supervivencia críticas en linfomas T, como son *TCR*, *JAK/STAT* y *NF κ B* (Figura 1).

El ADN tumoral y germinal de 11 pacientes con LCCT fue sujeto a un proceso de enriquecimiento previo con el sistema SureSelect de Agilent. Se secuenció en el secuenciador de Illumina GE2 (pair end-42bp). Las variantes detectadas fueron ordenadas de acuerdo a los criterios de calidad VCF QUAL, revisadas manualmente en el browser IGV y las variantes candidatas seleccionadas (mutaciones en regiones codificantes que conllevan cambio de aminoácidos o mutación stop) validadas mediante amplificación por PCR y secuenciación directa en un secuenciador capilar, de los ADNs normal y tumoral del paciente donde se identifica la mutación. Se identificaron un total de 26 mutaciones en 23 genes. El número de mutaciones detectadas por caso fue variable, desde 0, en uno de los casos, hasta 7 en otro.

Como se muestra en la Tabla 2, tres de las mutaciones dan lugar a un codon stop temprano (en los genes *TP53*, *PDCD1* y *NLRP2*), el resto, excepto la encontrada en el gen *RB1*, son mutaciones sin sentido que tienen como consecuencia cambio de aminoácidos en los genes *PLCG1*, *TP53*, *IL6ST*, *CCR4*, *SOCS5*, *JAK1*, *RC3H1*, *ITGAM*, *TRAF6*, *LPL*, *CD79*, *GLI3*, *SPI1*, *RELB*, *JAK3*, *PASK*, *PAK7*, *CARD11*, *BCOR* y *MAP3K5*. Dos genes están mutados de forma recurrente: *TP53* (en 2 casos pero en posiciones diferentes) y *PLCG1*. Este gen se detectó mutado en 3 de 11 casos; dos de ellos comparten la misma mutación en c.1034T>C, S345F.

Tabla 2

10 **Mutaciones detectadas mediante el análisis por ultrasecuenciación con enriquecimiento previo en los genes de interés**

Localización	Cambio	Consecuencia	Pos.CDS	Posición en la proteína	Cambio de aminoácido	Gen
X:39921444	T/C	Variante con cambio de sentido	4274	1425	N/S	<i>BCOR</i>
7:2976811	C/T	Variante con cambio de sentido	1201	401	D/N	<i>CARD11</i>
3:32995957	C/A	Variante con cambio de sentido	1043	348	T/K	<i>CCR4</i>
19:42383212-42383213	CC/TT	Variante con cambio de sentido	232-233	78	P/F	<i>CD79A</i>
7:42005556	C/T	Variante con cambio de sentido	3115	1039	A/T	<i>GLI3</i>
5:55256271	C/G	Variante con cambio de sentido	932	311	S/T	<i>IL6ST</i>
16:31332895	A/T	Variante con cambio de sentido	1952	651	E/V	<i>ITGAM</i>
1:65312344	G/A	Variante con cambio de sentido	1975	659	R/C	<i>JAK1</i>
19:17949108	C/T	Variante con cambio de sentido	1533	511	M/I	<i>JAK3</i>
8:19805850	C/T	Variante con cambio de sentido	248	83	T/M	<i>LPL</i>
6:137112905	G/C	Variante con cambio de sentido	391	131	H/D	<i>MAP3K5</i>
19:55512230	G/A	Ganancia de codón de terminación	3153	1051	W/*	<i>NLRP2</i>
20:9561459	G/A	Variante con cambio de sentido	323	108	P/L	<i>PAK7</i>
2:242076565	G/A	Variante con cambio de sentido	991	331	P/S	<i>PASK</i>
2:242793386	G/A	Ganancia de codón de terminación	691	231	R/*	<i>PDCD1</i>
20:39794139	C/T	Variante con cambio de sentido	1559	520	S/F	<i>PLCG1</i>
20:39792584	C/T	Variante con cambio de sentido	1034	345	S/F	<i>PLCG1</i>
13:48951114	T/C	Variante con cambio de sentido	1276	426	F/L	<i>RB1</i>
1:173930910	A/T	Variante con cambio de sentido	2155	719	Y/N	<i>RC3H1</i>
19:45537775	A/C	Variante con cambio de sentido	1343	448	N/T	<i>RELB</i>
2:46985980	C/G	Variante con cambio de sentido	311	104	P/R	<i>SOCS5</i>
11:47376813	C/T	Variante con cambio de sentido	778	260	G/R	<i>SPI1</i>
17:7579391	G/A	Variante con cambio de sentido	296	99	S/F	<i>TP53</i>
17:7574003	G/A	Ganancia de codón de terminación	1024	342	R/*	<i>TP53</i>
11:36511782	C/T	Variante con cambio de sentido	1175	392	R/H	<i>TRAF6</i>

Dado que la mutación c.1034T>C se detectó de forma recurrente, se diseñaron primers y sondas para detectar la mutación por qPCR. Esta técnica se puede aplicar a ADN extraído de muestra fresca, congelada o parafinada. Se analizó una nueva cohorte de 45 nuevos pacientes detectándose la misma en 10 muestras, lo que hace un total de 13 mutaciones encontradas de 56 pacientes analizados (23,4% de los casos de LCCT con mutaciones en *PLCG1*, 12 de ellos en c.1034T>C y uno más en c. 1559C>T, S520F).

PLCG1 es una proteína de gran relevancia en la ruta de señalización de TCR. La activación de TCR moviliza a *PLCG1*, que hidroliza PIP2 para generar los segundos mensajeros DAG e IP3, que a su vez activan múltiples cascadas de señalización. IP3 se une a su receptor en el retículo endoplásmico, liberando Ca^{2+} al citoplasma y activando sus efectores. De entre estos, el Ca^{2+} activa proteínas clave de la actividad celular como es el caso de la calmodulina (CaM) y calcineurina. Esta última es una fosfatasa con capacidad de desfosforilar NFAT y activarlo. NFAT activado se transloca al núcleo induciendo la transcripción de genes implicados en la activación de células T. Por su parte, DAG activa múltiples moléculas efectoras, entre otras PKC que finalmente pueden conducir a la activación de NFkB.

Por esto, en los mismos casos en que se ha analizado la presencia de mutaciones en *PLCG1*, se ha analizado por técnicas inmunohistoquímicas convencionales la expresión y localización celular (activa) de NFAT y de las proteínas p52 y p50 que forman parte del complejo NFkB. Los resultados obtenidos sugieren que aquellos casos con mutación en *PLCG1* muestran expresión nuclear aumentada de NFAT y/o p50/p52.

EJEMPLO 2

Efecto de las mutaciones identificadas en muestras de pacientes con LCCT

Se procedió a realizar este ensayo con el fin de comprobar el efecto que las mutaciones encontradas en las muestras humanas de LCCT. En concreto, para analizar la actividad resultante de las mutaciones encontradas en *PLCG1* se utilizaron las siguientes técnicas:

Mutagénesis dirigida.

Se realizó por procedimientos estándar utilizando el QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los oligonucleótidos utilizados para generar los mutantes de *PLCG1* humana (h*PLCG1*) fueron:

S345F: 5'-CCGGGGACCACTTCTTCAGTGAGTCCTCCTTG (SEQ ID NO: 1)
 S345 R: 3'-CAAGGAGGACTCACTGAAGAACTGGTCCCCGG (SEQ ID NO: 2)
 S520F: 5'-CAGCAAGATCTACTACTTTGAGGAGACCAGCAGTG (SEQ ID NO: 3)
 S520R: 3'-CACTGCTGGTCTCCTCAAAGTAGTAGATCTTGCTG (SEQ ID NO: 4).

Las mutaciones generadas se confirmaron por secuenciación Sanger.

Western-blot.

Las células se transfectaron utilizando el reactivo Lipofectamine™ LTX & Plus Reagent (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente se lisaron y procesaron sobre hielo utilizando métodos estándar y se fraccionaron por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida-SDS para después transferirse a soportes de nitrocelulosa (Immobilon, Millipore). A continuación se blotearon utilizando metodología estándar y se revelaron utilizando un equipo Odyssey (Infrared imaging system, Li-Cor). Los anticuerpos utilizados en los experimentos de expresión fueron anti- α -tubulin (sc-23948, Santa-Cruz), epitopo anti-Myc (Covance), Goat-anti-mouse IgG, Dylight™800 and Goat-anti-rabbit IgG, Dylight™800 (Thermo).

Ensayos de Luciferasa.

Las células transfectadas con los ADNs apropiados se procesaron de forma estándar mediante el uso de un kit de Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) y la actividad luciferasa/renilla se midieron en un luminómetro de tubo único (Turner). Las células una vez transfectadas se privaron de suero y fueron incubadas con la cantidad apropiada de FK-506 (Tacrolimus, Selleck Chemicals) y el inhibidor de fosfolipasa C U73211 (Sigma-Aldrich).

Resultados

Con el fin de comprobar el efecto que las mutaciones encontradas en las muestras humanas de LCCT se procedió a realizar estudios de mutación dirigida en un vector de expresión para *PLCG1* humano marcado con un epitopo de Myc (ver MM). De esta forma se generaron los vectores de expresión pCMV-Entry-*PLCG1*-Myc-WT, pCMV-Entry-*PLCG1*-Myc-S345F y CMV-Entry-*PLCG1*-Myc-S520F humanos (Fig 2A). La transfección transitoria de estas construcciones en células humanas HEK293T tuvo como resultado la expresión de la proteína normal y las proteínas mutadas a niveles comparables (Fig 2B abajo). Una vez comprobado que la presencia de estas mutaciones no afectaba la expresión de la proteína, se realizaron estudios de activación de la vía de señalización dependiente de *PLCG1*, mediante el uso de genes reporteros de la actividad de NFAT. El resultado (Fig 2C) muestra que las proteínas mutantes fueron significativamente más activas que la variante normal. Comparando la actividad entre los mutantes, los datos obtenidos muestran cómo la mutación S345F (la variante más frecuente en LCCT) es más activa que la mutación S520F, lo cual se correlaciona con la localización de la primera en uno de los dos dominios PLC que

5 se pueden observar en la estructura de la proteína (Fig 2B arriba). Por último, se incubaron las células con FK-506 (Tacrolimus), un inhibidor de calcineurina utilizado en clínica (Silverberg, N. B. *et al.*, J. Am. Acad. Dermatol. 2004, Vol. 51 (5): 760-766), en los ensayos de activación de NFAT. El resultado muestra que las mutaciones activadoras de *PLCG1* son sensibles al uso de este inhibidor en este sistema (Fig 2D). Estos resultados indican que las mutaciones de *PLCG1* encontradas en muestras de pacientes diagnosticados con LCCT pueden tener un efecto de sobreactivación de la ruta de PLCG1 en cáncer humano. Además la actividad resultante de la presencia de estas mutaciones, como es el caso de la sobreactivación de los factores de transcripción NFAT, puede ser inhibida por el uso de inhibidores específicos de esta ruta de señalización y de uso probado en clínica (por ejemplo, Tacrolimus). Por tanto, la detección de mutaciones en el gen de *PLCG1* en muestras de cáncer humano puede ser un indicador del uso terapéutico de estos inhibidores.

TRADUCCIÓN AL CASTELLANO DE TÉRMINOS EN INGLÉS QUE APARECEN EN LA LISTA DE SECUENCIAS

15 El término "sequence listing" significa "lista de secuencias". El término "artificial sequence" significa "secuencia artificial".

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para seleccionar una terapia para el tratamiento de un paciente con linfoma cutáneo de células T (LCCT) que comprende determinar en una muestra de dicho paciente la presencia de una mutación en el gen *PLCG1*, en donde si se detecta la presencia de una mutación en dicho gen *PLCG1*, se selecciona para dicho paciente una terapia seleccionada del grupo formado por un inhibidor de fosfolipasa C, un antagonista de calmodulina, un inhibidor de calcineurina y cualquier combinación de las mismas.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en el que dicha mutación en el gen *PLCG1* se selecciona de las mutaciones en el gen *PLCG1* que figuran en la Tabla 1.
- 15 3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el inhibidor de fosfolipasa C es U73122, el antagonista de calmodulina es W-5 y el inhibidor de calcineurina se selecciona del grupo formado por FK-506, ciclosporina y sus combinaciones.
- 20 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha muestra comprende células o tejido tumoral de LCCT.
- 25 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la presencia de la mutación se detecta mediante PCR cuantitativa.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el LCCT se selecciona del grupo formado por micosis fungoide y síndrome de Sézary.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende, además, determinar en dicha muestra la presencia de una mutación en un gen seleccionado del grupo formado por los genes *CCR4*, *IL-6ST*, *JAK1*, *JAK3* y cualquier combinación de los mismos.
- 30 8. Método según la reivindicación 7, en el que las mutaciones en los genes *CCR4*, *IL-6ST*, *JAK1* y *JAK3* son las que figuran en la Tabla 1.
- 35 9. Un método para seleccionar un paciente con linfoma cutáneo de células T (LCCT) para una terapia seleccionada del grupo formado por un inhibidor de fosfolipasa C, un antagonista de calmodulina, un inhibidor de calcineurina y cualquier combinación de las mismas, que comprende determinar en una muestra de dicho paciente la presencia de una mutación en el gen *PLCG1*, en donde dicho paciente es seleccionado para dicha terapia si presenta dicha mutación.
- 40 10. Método según la reivindicación 9, en el que la mutación en el gen *PLCG1* se selecciona de las que figuran en la Tabla 1.
- 45 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 ó 10, en el que el inhibidor de fosfolipasa C es U73122, el antagonista de calmodulina es W-5 y el inhibidor de calcineurina se selecciona del grupo formado por FK-506 y ciclosporina.
- 50 12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que dicha muestra comprende células o tejido tumoral de LCCT.
- 55 13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que la presencia de la mutación se detecta mediante PCR cuantitativa.
- 60 14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, en el que el LCCT se selecciona del grupo formado por micosis fungoide y síndrome de Sézary.
- 65 15. Un kit que comprende uno o más reactivos adecuados para llevar a cabo un método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde dichos reactivos comprenden una o más parejas de oligonucleótidos que hibridan específicamente con una región de un gen, en donde dicha región comprende la mutación a detectar y en donde dicho gen es el gen *PLCG1*.
16. Kit según la reivindicación 15, en el que dicha mutación en el gen *PLCG1* a detectar se selecciona de las mutaciones en el gen *PLCG1* mostradas en la Tabla 1.
17. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 15 ó 16, que comprende, además, una o más parejas de oligonucleótidos que hibridan específicamente con una región de un gen, en donde dicha región comprende

una mutación a detectar y en donde dicho gen se selecciona del grupo formado por los genes *CCR4*, *IL-6ST*, *JAK1*, *JAK3* y cualquier combinación de los mismos.

- 5 18. Kit según la reivindicación 17, en el que las mutaciones en los genes *CCR4*, *IL-6ST*, *JAK1* y *JAK3* son las que figuran en la Tabla 1.
- 10 19. Empleo de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, para seleccionar una terapia para el tratamiento de un paciente con linfoma cutáneo de células T (LCCT) o para seleccionar un paciente con LCCT para una terapia seleccionada del grupo de terapias basadas en la administración de un inhibidor de fosfolipasa C, un antagonista de calmodulina, un inhibidor de calcineurina, y cualquier combinación de las mismas.

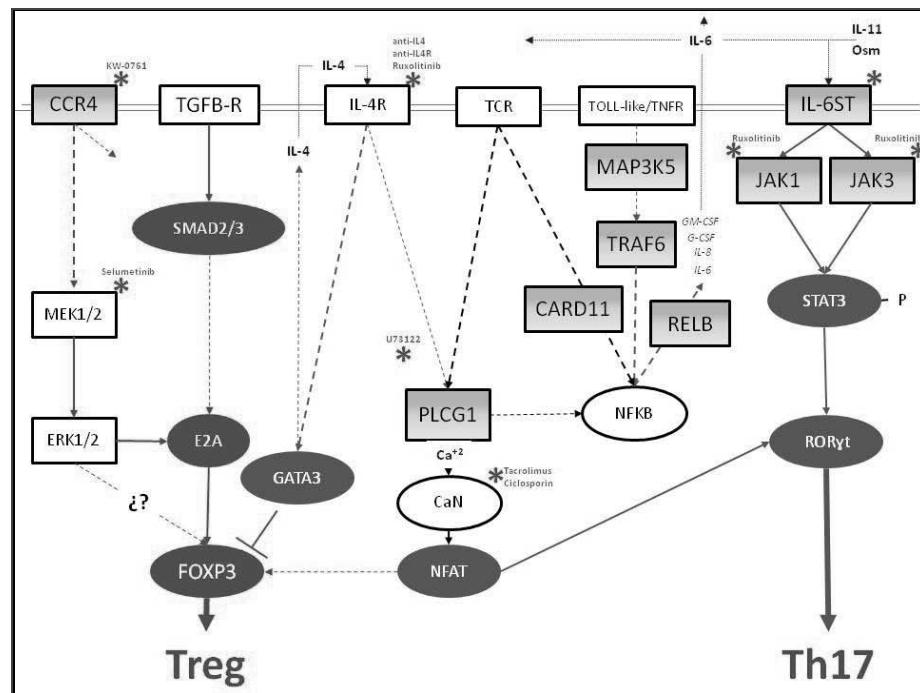


FIG. 1

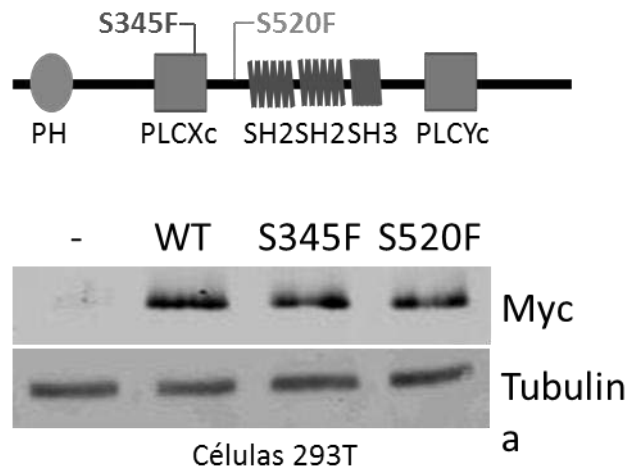
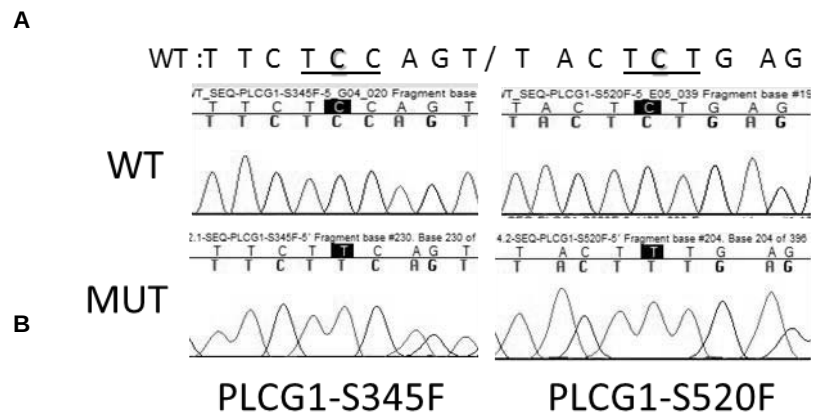


FIG. 2

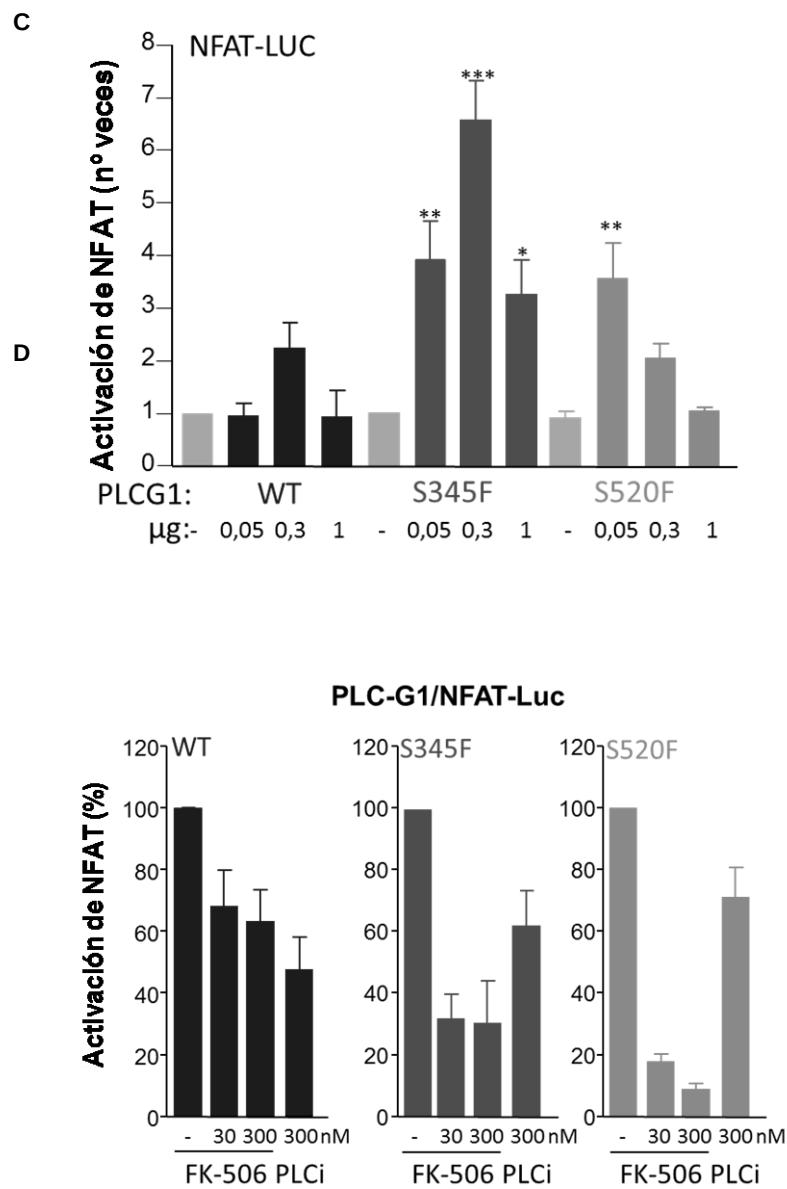


FIG. 2 (CONT.)

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> FUNDACIÓN MARQUÉS DE VALDECILLA
FUNDACIÓN DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA HOSPITAL UNIVERSITARIO
PUERTA DE HIERRO MAJADAHONDA
FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL 12
DE OCTUBRE
FUNDACIÓN CIENTÍFICA DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA CONTRA EL
CÁNCER
SERVICIO CÁNTABRO DE SALUD
- <120> Métodos de selección de terapia de linfoma cutáneo de células T
- <130> P8728ES00
- <160> 4
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
- <220>
<223> Oligonucleótido sentido para generar el mutante S345F de PLCG1 de humano
- <400> 1
ccgggggacca gttcttcagt gagtcctcct tg 32
- <210> 2
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
- <220>
<223> Oligonucleótido antisentido para generar el mutante S345F de PLCG1 de humano
- <400> 2
ggcccctggt caagaagtca ctcaggagga ac 32
- <210> 3
<211> 35
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
- <220>
<223> Oligonucleótido sentido para generar el mutante S520F de PLCG1 de humano
- <400> 3
cagcaagatc tactactttg aggagaccag cagtg 35
- <210> 4
<211> 35
<212> DNA

ES 2 469 265 B1

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleótido antisentido para generar el mutante S520F de PLCG1 de humano

<400> 4

gtcgttctag atgatgaaac tcctctgggc gtcac

35