

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la  
Propiedad Intelectual  
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional  
22 de mayo de 2014 (22.05.2014)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicación Internacional  
WO 2014/076344 A1

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:  
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2013/070795
- (22) Fecha de presentación internacional:  
13 de noviembre de 2013 (13.11.2013)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:  
P201231760  
14 de noviembre de 2012 (14.11.2012) ES
- (71) Solicitantes: FUNDACIÓN MARQUÉS DE VALDECILLA [ES/ES]; Avenida de Valdecilla s/n, Escuela, Universitaria de Enfermería, 5ª Planta, E-39008 Santander - Cantabria (ES). FUNDACIÓN DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE HIERRO DE MAJADAHONDA [ES/ES]; Joaquín Rodrigo, 2, Edificio, Laboratorios, planta baja, E-28222 Majadahonda - Madrid (ES). FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL HOSPITAL 12 DE OCTUBRE [ES/ES]; Hospital Universitario 12 de Octubre, Avda de Córdoba s/n, Centro de, Actividades Ambulatorias, 6ª Planta -, Bloque D, E-28041 Madrid (ES). FUNDACIÓN CIENTÍFICA DE LA ASOCIACIÓN ESPAÑOLA CONTRA EL CÁNCER [ES/ES]; Amador de los Ríos, 5, E-28010 Madrid (ES). SERVICIO CÁNTABRO DE SALUD [ES/ES]; Avenida de Cardenal Herrera Oria s/n, Edificio IFIMAV, 3ª Planta, E-39011 Santander - Cantabria (ES).
- (72) Inventores: PIRIS PINILLA, Miguel Ángel; Avenida del Cardenal Herrera Oria, s/n, Edificio IFIMAV 3ªplanta, E-39011 Santander - Cantabria (ES). VAQUÉ DÍEZ, José Pedro; Avenida Cardenal Herrera Oria, s/n, Edificio IFIMAV 3ªplanta, E-39011 Santander - Cantabria (ES). MARTÍNEZ MAGUNACELAYA, Nerea; Avenida

Cardenal Herrera Oria, s/n, Edificio IFIMAV 3ªplanta, E-39011 Santander - Cantabria (ES). ORTIZ ROMERO, Pablo Luis; Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital 12 de Octubre, Avenida de Córdoba, s/n. CCA, 6ªplanta, E-28041 Madrid (ES). SÁNCHEZ-BEATO GÓMEZ, Margarita; Fundación de Investigación Biomédica del, Hospital Universitario Puerta de Hierro De Majadahonda, Calle Joaquín Rodrigo, 2 - Edificio, Laboratorios, Planta baja., E-28222 Majadahonda - Madrid (ES).

(74) Mandatario: ARIAS SANZ, Juan; ABG Patentes, S.L., Avda. de Burgos, 16D, Edificio EUROMOR, E-28036 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: METHODS FOR SELECTING THERAPY FOR CUTANEOUS T-CELL LYMPHOMA

(54) Título : MÉTODOS DE SELECCIÓN DE TERAPIA DE LINFOMA CUTÁNEO DE CÉLULAS T

(57) Abstract: The invention relates to a method for selecting a therapy for the treatment of a patient with cutaneous T-cell lymphoma (LCCT), said method comprising determining the presence of a mutation in the *PLCG1* gene in a sample from said patient, and selecting the therapy according to the mutational profile of the patient.

(57) Resumen: 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 el gen *PLCG1* y seleccionar la terapia en función del perfil mutacional del paciente.



WO 2014/076344 A1

## MÉTODOS DE SELECCIÓN DE TERAPIA DE LINFOMA CUTÁNEO DE CÉLULAS T

### CAMPO DE LA INVENCIÓN

5

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 INVENCIÓN

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 un 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).

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

30

eritrodermia (psoriasis, eczemas, reacciones a drogas, pitiriasis rubra pilaris, etc.) es complicado.

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.

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.

5 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  
10 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.

15 Se ha descrito el empleo de la detección de mutaciones en genes concretos para la selección de terapia o apoyo al 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  
20 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 Vemurafenuib 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  
25 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  
30 terapia personalizada para pacientes con LCCT en función del perfil mutacional de dichos pacientes.

**COMPENDIO DE LA INVENCION**

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

5 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
- 10 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
- 15 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
- 20 formado por un inhibidor de JAK, un inhibidor de ROR $\gamma$ t y sus combinaciones.

En una realización particular, dicho método para seleccionar una terapia para el tratamiento de un paciente con LCCT comprende determinar en una muestra de dicho

25 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.

30

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.

5

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  
10 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,  
15 un inhibidor de ROR $\gamma$ 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.

20

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  
25 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. En una realización particular, dicho kit comprende 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*.

30

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 ROR $\gamma$ t y cualquier combinación de las mismas, constituye un aspecto adicional de la invención. En una realización particular, dicho kit se utiliza 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, y cualquier combinación de las mismas, constituye un aspecto adicional de la invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dicho kit para identificar una mutación en el gen *PLCG1*.

## 15 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  $\mu$ g 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  $\mu$ g)/pRL-Null (0,05  $\mu$ g) 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.

## 5 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

- 5 (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,
- 10 (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
- 15 (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 ROR $\gamma$ ty sus combinaciones.

En una realización particular y preferida, el primer método de la invención se relaciona con un método para seleccionar una terapia para el tratamiento de un paciente con  
20 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  
25 mismas.

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  
30 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 “granoloma 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.

- 20 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
- 25 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
- 30 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 (Sambrock *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.*,  
5 (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.

10

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  
15 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  
25 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  
30 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 desnatura 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  
5 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  
10 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  
15 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.

20

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-  
25 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  
30 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  
5 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  
10 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  
15 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  
20 (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  
25 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  
30 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

5 NED.

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

10 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

15 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

20 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

25 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.

30 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  
5 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*  
10 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 ciertas citoquinas de tipo I y II. *JAK1* interacciona con la cadena gamma de los receptores de citoquinas de tipo I,  
15 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.

20 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  
25 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  
30 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  
5 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:

- 10
- 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  
15 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:

- 20
- 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  
25 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:

- 30
- 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*.

5 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*.

10

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*.

15 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*.

20

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*.

25 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

30

- 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*.

5

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*,
- 10 - 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*.

15

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

- una mutación en el gen *PLCG1*,
- 20 - 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*.

25 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 codon de STOP aberrante como consecuencia del cual se genera una forma truncada de la proteína. Preferiblemente, la mutación da lugar a un  
30 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).

**Tabla 1**

- 5 **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
- 20 enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces diéster fosfóricos en el PIP<sub>2</sub>. El término

fosfolipasa C incluye las isozimas PLCB1, PLCB2, PLCB3, PLCB4, PLCD1, PLCD3, PLCD4, PLCE1, PLCG1, PLCG2, PLCH1, PLCH2 y PLCZ1.

Ejemplos ilustrativos no limitativos de inhibidores de fosfolipasa C incluyen:

- 5 - péptidos inhibidores de fosfolipasa C tales como los que se divulgan en ES2114220T3;
- U-73122 (1-[6-[[[(17 $\beta$ )-3-metoxiestra-1,3,5(10)-trien-17-il]amino]hexil]-1*H*-pirrol-2,5-diona; número CAS 112648-68-7);
- D609 (*O*-(octahidro-4,7-metano-1*H*-inden-5-il) carbonopotasio ditioata; número CAS 83373-60-8);
- 10 - edelfosine ((7*R*)-4-hidroxi-7-metoxi-*N,N,N*-trimetil-3,5,9-trioxa-4-fosfaheptacosan-1-aminio-4-óxido; número CAS 77286-66-9);
- *O*-tríciclo[5.2.1.0<sup>2,6</sup>]dec-9-il ditiocarbonato potásico (número CAS 83373-60-8);
- y
- los compuestos divulgados en la patente estadounidense US7262197B2; en las
- 15 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.

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

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

25 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 Ca<sup>2+</sup>, al que se une con gran afinidad de forma reversible. La calmodulina unida a Ca<sup>2+</sup> es capaz de asociarse a multitud de proteínas modulando su actividad. El término calmodulina incluye a todos los miembros de la

30 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 $\alpha$ ,16 $\alpha$ )-eburnamenine-14-carboxílico; número CAS 42971-09-5).

20

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 fosfatasas 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;
- 5 - 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).

10

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  
5 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  
10 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  
15 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  
20 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,  
25 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  
30 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 ROR $\gamma$ t 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:

- 10 - Ruxolitinib, inhibidor de JAK1 y JAK2;
- Lestaurtinib, inhibidor de JAK2;
- Tofacitinib, inhibidor de JAK3;
- Pacritinib, inhibidor de JAK2;
- CYT387, inhibidor de JAK2;
- 15 - 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, 20 WO12046793A1, EP2441755A1, WO12037132A1, EP2397482A1, WO11144584A1, WO11134831A1, WO11112662A1, EP2360158A1, WO11103423A1, WO11101806A1, WO11097087A1, EP2338888A1, EP2513114A1, EP2491039 A1, EP2475648A1, EP2473510A1, EP2448941A2, EP2445911A1, EP2440558A1, EP2432472A1, EP2432555A1, EP2420502A1, 25 EP2419423A1, EP2376491A1, EP2380877A1, EP2348860A1.

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

El término “inhibidor de ROR $\gamma$ t”, 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 ROR $\gamma$ t, 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 “ROR $\gamma$ t” (*retinoic*

*acid-related orphan receptor*) se refiere a un receptor nuclear que se expresa en el timo en linfocitos inmaduros CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. ROR $\gamma$ t juega un papel clave en la diferenciación de los timocitos a células T helper 17. Ejemplos ilustrativos no limitativos de inhibidores de ROR $\gamma$ t incluyen ácido ursólico, digoxina, SR1001, SR2211, ML 209 y  
5 los compuestos descritos en la solicitud de patente EP2487159A1. En una realización preferida del método del primer aspecto, el inhibidor de ROR $\gamma$ t 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  
10 p50 y p52 que forman parte del complejo NF $\kappa$ B, lo que implica un incremento en la actividad de los factores transcripcionales NFAT y NF $\kappa$ B 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  
15 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;  
20 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  
25 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  
30 JAK, un inhibidor de ROR $\gamma$ t 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.

10 Las características del LCCT, terapia, gen *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  
15 referencia.

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

20 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  
30 dicha mutación.

Las características del LCCT, terapia, gen *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 $\gamma$ 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, gen *IL-6ST*, gen *JAK1*, gen *JAK3*, inhibidor de JAK, inhibidor de ROR $\gamma$ 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 $\gamma$ t es ácido ursólico.

5 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*

10

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.

20 En una realización particular y preferida, el kit de la invención comprende uno o más reactivos adecuados para llevar a cabo un método según cualquiera de dichos primer método de la invención o segundo método de la invención, 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*.

25

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

30 En una 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 mutaciones en el gen *PLCG1* que figuran en la Tabla 1.

En una realización particular, el kit de la invención comprende, además de 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  
5 *PLCG1*, 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.

10 En una realización particular, las mutaciones en los genes *PLCG1*, *CCR4*, *IL-6ST*, *JAK1* y *JAK3* son las que figuran en la Tabla 1.

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

- 15 - 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,  
20 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  
25 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.

30

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 y, además
- 5 - 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,
- 10 - 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/o
- una o más parejas de oligonucleótidos que hibridan específicamente con una
- 15 - 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

20 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

25 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.

30 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.

- 5 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  
10 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  
15 (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 particular, los reactivos adecuados para llevar a cabo un método  
20 según cualquiera de dichos primer método de la invención, segundo método de la  
invención, tercer método de la invención o cuarto método de la invención, 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.

25

En una realización particular, los reactivos adecuados para llevar a cabo un método  
según cualquiera de dichos primer método de la invención o segundo método de la  
invención, 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%,  
30 al menos un 90% o al menos un 100% del total de los oligonucleótidos que forman el  
kit.

En una realización particular, el kit de la invención comprende, además de 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*, instrucciones para el uso de dichos componentes y/o de dicho kit.

5

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  
10 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 $\gamma$ t y cualquier combinación de las mismas.

15 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  
20 inhibidor de calcineurina, y cualquier combinación de las mismas.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de un kit de la invención para identificar una mutación en el gen *PLCG1*. En una realización particular, dicha mutación en el gen *PLCG1* es una de las mutaciones en el gen *PLCG1* que figuran en la  
25 Tabla 1.

Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar la invención y no deben ser considerados en sentido limitativo, sino ilustrativo, de la misma.

30

### 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  
5 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).

10 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 com  
DMEM (Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal (Lonza) y 1% de la mezcla  
15 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 participaen en  
20 las rutas de señalización de TCR y otras relacionadas como NFkB 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 basdas en NCBI Build 37 (UCSC hg19). La herramienta eArray  
(Agilent Technologies) se usó para el diseño de los oligos del SureSelect Target  
25 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,  
30 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  
5 (<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  
10 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  
15 serie de validación en ADN obtenido tanto de muestra fresco o congelado como  
parafinada mediante qPCR.

## Resultados

20 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 *NFkB* (Figura 1).

El ADN tumoral y germinal de 11 pacientes con LCCT fue sujeto a un proceso de  
25 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  
30 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 *RBI*, 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 10 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**

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

15

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<sup>2+</sup> al citoplasma y activando sus efectores. De entre estos, el Ca<sup>2+</sup> 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  
5 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  
10 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

15

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:

20 *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 (hPLCG1) fueron:

25 S345F: 5'-CCGGGGACCAGTTCTTCAGTGAGTCCTCCTTG (SEQ ID NO: 1)

S345 R: 3'CAAGGAGGACTCACTGAAGAACTGGTCCCCGG(SAQ 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.

30

*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 Oddisey (Infrared imagin system, Li-Cor). Los anticuerpos utilizados en los experimentos de expresión fueron anti- $\alpha$ -tubulin (sc-23948, Santa-Cruz), epitopo anti-Myc (Covance), Goat-anti-mouse IgG, Dylight™800 and Goat-anti-rabbit IgG, Dylight™800 (Thermo).

10

#### *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 epítopo 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 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**

20

El término “sequence listing” significa “lista de secuencias”. El término “artificial sequence” significa “secuencia artificial”.

**REIVINDICACIONES**

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.
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.
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.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicha muestra comprende células o tejido tumoral de LCCT.
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.

8. Método según la reivindicación 7, en el que las mutaciones en los genes *CCR4*, *IL-6ST*, *JAK1* y *JAK3* son las mutaciones en dicho genes *CCR4*, *IL-6ST*, *JAK1* y *JAK3* que figuran en la Tabla 1.
- 5 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  
10 seleccionado para dicha terapia si presenta dicha mutación.
10. Método según la reivindicación 9, en el que la mutación en el gen *PLCG1* se selecciona de las mutaciones en el gen *PLCG1* que figuran en la Tabla 1.
- 15 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.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que dicha muestra  
20 comprende células o tejido tumoral de LCCT.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que la presencia de la mutación se detecta mediante PCR cuantitativa.
- 25 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.
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  
30 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.
- 5 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.
- 10 18. Kit según la reivindicación 17, en el que las mutaciones en los genes *CCR4*, *IL-6ST*, *JAK1* y *JAK3* son las mutaciones en dicho genes *CCR4*, *IL-6ST*, *JAK1* y *JAK3* que figuran en la Tabla 1.
- 15 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
- 20 de las mismas.
20. Empleo de un kit según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, para identificar una mutación en el gen *PLCG1*.
- 25 21. Empleo según la reivindicación 20, en el que dicha mutación en el gen *PLCG1* es una de las mutaciones en el gen *PLCG1* que figuran en la Tabla 1.

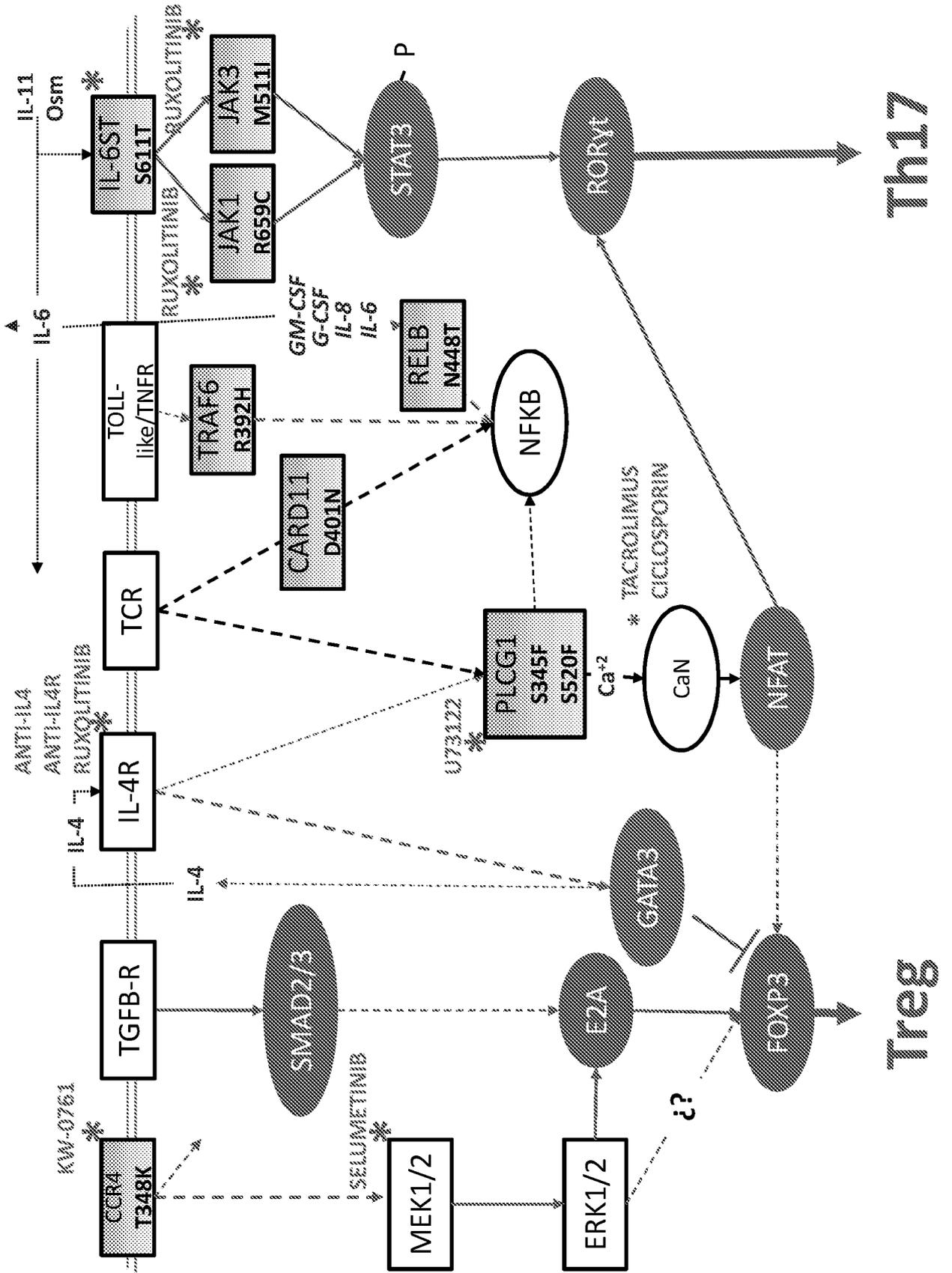


FIG. 1

A

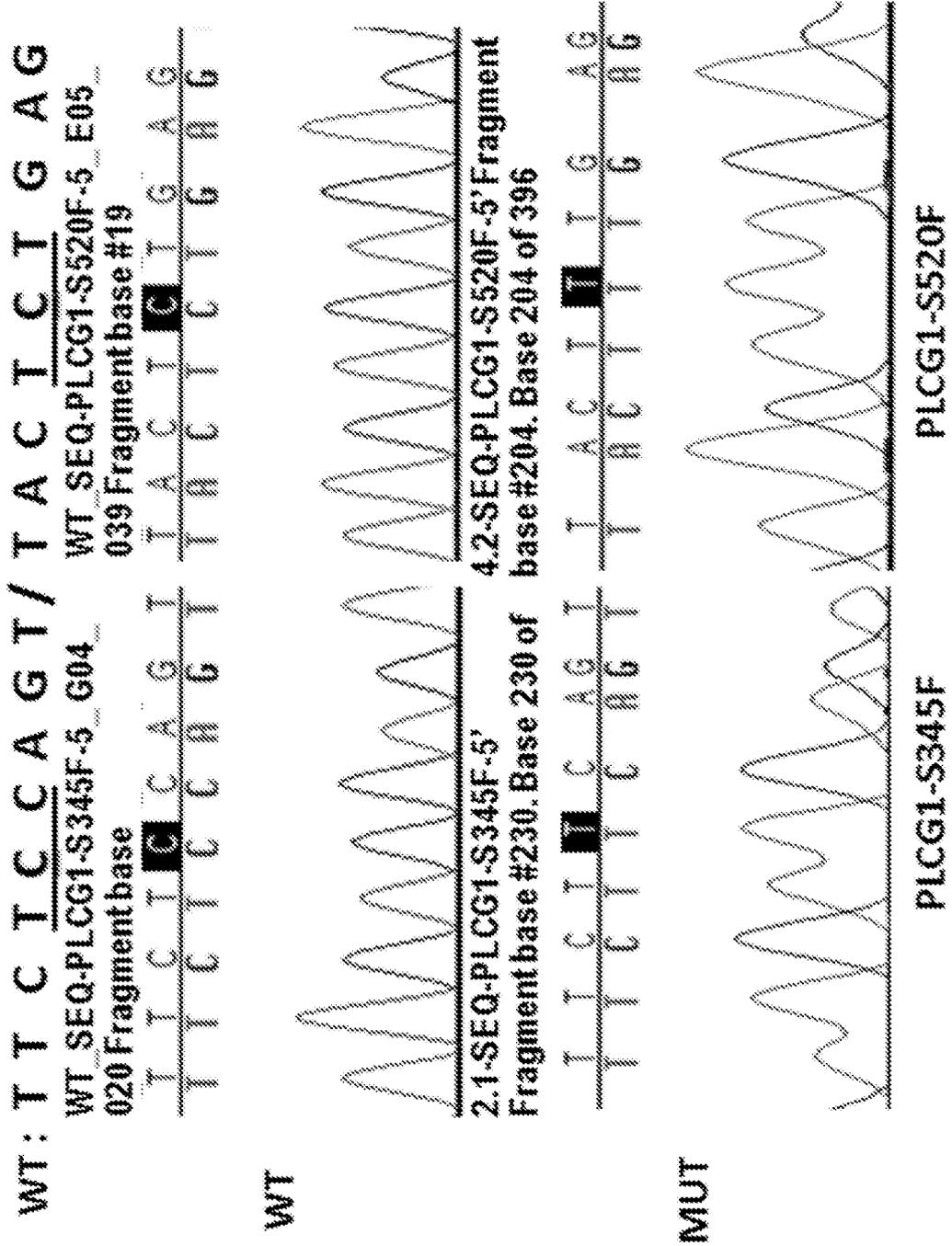


FIG. 2

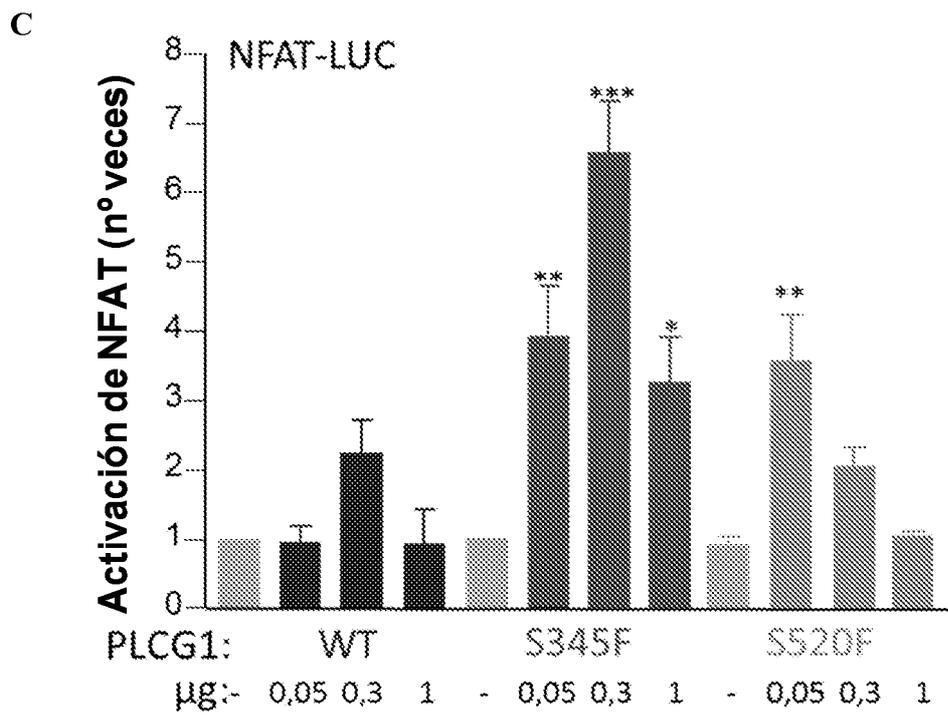
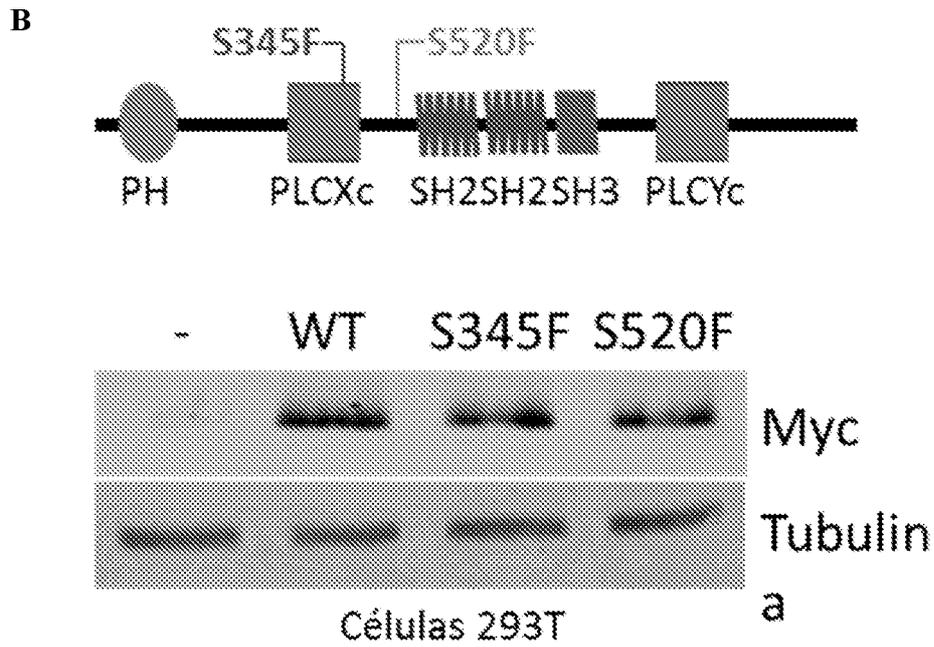
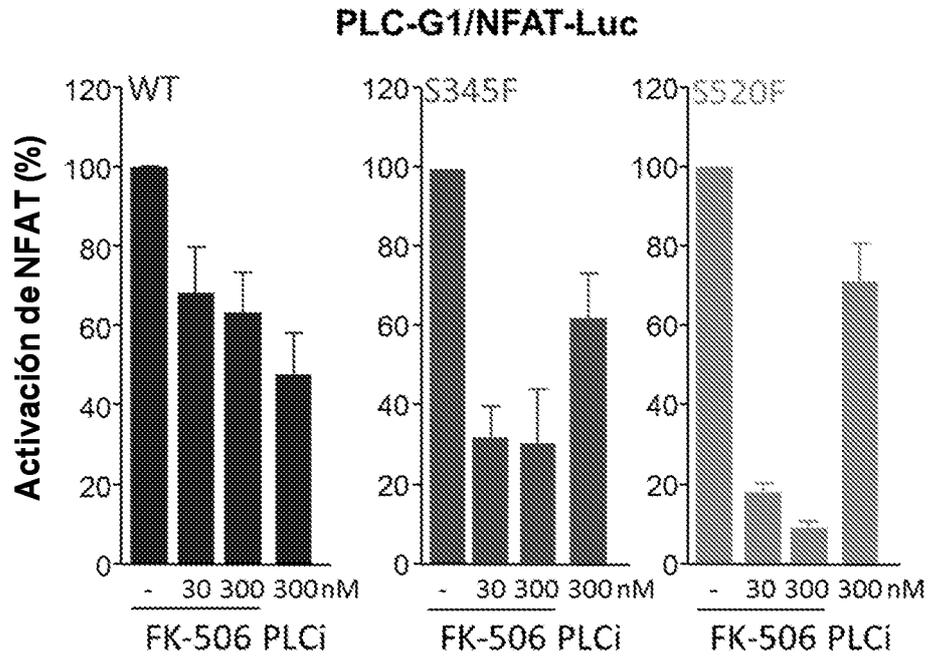


FIG. 2 (CONT.)

D



**FIG. 2 (CONT.)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ES2013/070795

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**C12Q1/68** (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

**C12Q**

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, XPESP/ELSEVIER, BIOSIS, EMBASE/Elsevier, MEDLINE/NLM, bases de datos de texto completo TXT.

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	ORTIZ-ROMERO PABLO L et al." Mutations in PLCG1 Is a Frequent Event in Cutaneous T-Cell Lymphomas" Blood NOV 16 2012 00/11/2012 VOL: 120 No: 21 Pags: 300 ISSN 0006-4971(print) ISSN 1528-0020(electronic); the whole document.	1-21
P,A	PEREZ CRISTINA et al. "Novel approaches for targeted therapy in cutaneous T-cell lymphomas" BLOOD (21 October 2013); Vol. 122, N°. 21, page 3834; the whole document.	1-21
A	US 2008112889 A1 (BUGGY J. ET AL.) 15/05/2008, the whole document.	1-21
A	US 2010285516 A1 (BALASUBRAMANIAN SRIRAM ET AL.) 11/11/2010, the whole document.	1-21

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Date of the actual completion of the international search  
**23/01/2014**

Date of mailing of the international search report  
**(27/01/2014)**

Name and mailing address of the ISA/

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Facsimile No.: 91 349 53 04

Authorized officer  
M. García Coca

Telephone No. 91 3493411

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/ES2013/070795

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WU XUE-SONG et al. "Cutaneous T-Cell Lymphoma: Roles for Chemokines and Chemokine Receptors" Journal of Investigative Dermatology MAY 2009 00/05/2009 VOL: 129 No: 5 Pags: 1115-1119 ISSN 0022-202X(print) ISSN 1523-1747(electronic) Doi: doi:10.1038/jid.2009.45; the whole document.	1-21
A	CORNEJO M G et al. "JAK3: A two-faced player in hematological disorders." INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY, 20091201 Pergamon, GB 01/12/2009 VOL: 41 No: 12 Pags: 2376 - 2379 ISSN 1357-2725 Doi: doi:10.1016/j.biocel.2009.09.004; the whole document.	1-21

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

Information on patent family members

PCT/ES2013/070795

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US2008112889 A1	15.05.2008	US2013078215 A1 WO2008128093 A1 US2010285516 A1 KR20100016524 A JP2010526280 A EP2144622 A1 EP2144622 A4 EA200901397 A1 CN101678081 A CA2683822 A1 AU2008240209 A1 WO2008061160 A1 US2011150825 A1 WO2008060721 A1 US7820711 B2	28.03.2013 23.10.2008 11.11.2010 12.02.2010 29.07.2010 20.01.2010 09.06.2010 30.04.2010 24.03.2010 23.10.2008 23.10.2008 22.05.2008 23.06.2011 22.05.2008 26.10.2010
----- US2010285516 A1	----- 11.11.2010	US2013078215 A1 WO2008128093 A1 KR20100016524 A JP2010526280 A EP2144622 A1 EP2144622 A4 EA200901397 A1 CN101678081 A CA2683822 A1 AU2008240209 A1 WO2008061160 A1 US2011150825 A1 WO2008060721 A1 US2008112889 A1 US7820711 B2	28.03.2013 23.10.2008 12.02.2010 29.07.2010 20.01.2010 09.06.2010 30.04.2010 24.03.2010 23.10.2008 23.10.2008 22.05.2008 23.06.2011 22.05.2008 15.05.2008 26.10.2010
-----	-----	-----	-----

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº  
PCT/ES2013/070795

**A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD**  
**C12Q1/68** (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

**B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA**

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)  
C12Q

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)  
EPODOC, INVENES, WPI, XPESP/ELSEVIER, BIOSIS, EMBASE/Elsevier, MEDLINE/NLM, bases de datos de texto completo TXT.

**C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES**

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
P,A	ORTIZ-ROMERO PABLO L et al." Mutations in PLCG1 Is a Frequent Event in Cutaneous T-Cell Lymphomas" Blood NOV 16 2012 00/11/2012 VOL: 120 No: 21 Pags: 300 ISSN 0006-4971(print) ISSN 1528-0020(electronic); todo el documento.	1-21
P,A	PEREZ CRISTINA et al. "Novel approaches for targeted therapy in cutaneous T-cell lymphomas" BLOOD (21 octubre 2013); Vol. 122, N°. 21, página 3834; todo el documento.	1-21
A	US 2008112889 A1 (BUGGY J. ET AL.) 15/05/2008, todo el documento.	1-21
A	US 2010285516 A1 (BALASUBRAMANIAN SRIRAM ET AL.) 11/11/2010, todo el documento.	1-21

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos  Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.  
23/01/2014

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.  
**27 DE ENERO DE 2014 (27/01/2014)**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional  
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado  
M. García Coca  
Nº de teléfono 91 3493411

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2013/070795

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	<p>WU XUE-SONG et al. "Cutaneous T-Cell Lymphoma: Roles for Chemokines and Chemokine Receptors" <i>Journal of Investigative Dermatology</i> MAY 2009 00/05/2009 VOL: 129 No: 5 Pags: 1115-1119 ISSN 0022-202X(print) ISSN 1523-1747(electronic) Doi: doi:10.1038/jid.2009.45; todo el documento.</p>	1-21
A	<p>CORNEJO M G et al. "JAK3: A two-faced player in hematological disorders." <i>INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY</i>, 20091201 Pergamon, GB 01/12/2009 VOL: 41 No: 12 Pags: 2376 - 2379 ISSN 1357-2725 Doi: doi:10.1016/j.biocel.2009.09.004; todo el documento.</p>	1-21

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2013/070795

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US2008112889 A1	15.05.2008	US2013078215 A1	28.03.2013
		WO2008128093 A1	23.10.2008
		US2010285516 A1	11.11.2010
		KR20100016524 A	12.02.2010
		JP2010526280 A	29.07.2010
		EP2144622 A1	20.01.2010
		EP2144622 A4	09.06.2010
		EA200901397 A1	30.04.2010
		CN101678081 A	24.03.2010
		CA2683822 A1	23.10.2008
		AU2008240209 A1	23.10.2008
		WO2008061160 A1	22.05.2008
		US2011150825 A1	23.06.2011
		WO2008060721 A1	22.05.2008
		US7820711 B2	26.10.2010
-----			
US2010285516 A1	11.11.2010	US2013078215 A1	28.03.2013
		WO2008128093 A1	23.10.2008
		KR20100016524 A	12.02.2010
		JP2010526280 A	29.07.2010
		EP2144622 A1	20.01.2010
		EP2144622 A4	09.06.2010
		EA200901397 A1	30.04.2010
		CN101678081 A	24.03.2010
		CA2683822 A1	23.10.2008
		AU2008240209 A1	23.10.2008
		WO2008061160 A1	22.05.2008
		US2011150825 A1	23.06.2011
		WO2008060721 A1	22.05.2008
		US2008112889 A1	15.05.2008
		US7820711 B2	26.10.2010
-----			