

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 908 359**

(21) Número de solicitud: 202031080

(51) Int. Cl.:

C12N 5/0783 (2010.01)
A61N 5/00 (2006.01)

(12)

SOLICITUD DE PATENTE

A1

(22) Fecha de presentación:

28.10.2020

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

28.04.2022

(71) Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA (100.0%)
Patio de Escuelas, nº 1
37008 Salamanca (Salamanca) ES

(72) Inventor/es:

ÁLVAREZ PINZON, Andres Mauricio;
ALONSO PEÑA, José Ramón;
DÍAZ LÓPEZ, David;
WERUAGA PRIETO, Eduardo;
WOLF, Aizik;
VALERIO, Jose y
MICHELLE, Jack

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

(54) Título: **BIOMARCADOR DE LINFOMA PRIMARIO DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DERIVADO DE CÉLULAS T, SUS USOS Y MÉTODOS**

(57) Resumen:

Biomarcador de linfoma primario del sistema nervioso central derivado de células T, sus usos y métodos. La invención hace referencia a la identificación de un biomarcador para el linfoma primario del sistema nervioso central derivado de células T, una enfermedad oncológica, sus usos y su empleo para predecir la respuesta al tratamiento de dicha enfermedad en personas inmunosuprimidas por tratamiento para el virus de inmunodeficiencia humana (VIH).

DESCRIPCIÓN**Biomarcador de linfoma primario del sistema nervioso central derivado de células T, sus usos y métodos**

5

La invención hace referencia a la identificación de un biomarcador para el linfoma primario del sistema nervioso central derivado de células T, una enfermedad oncológica, sus usos y su empleo para predecir la respuesta al tratamiento de dicha enfermedad en personas inmunosuprimidas por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). La 10 invención pertenece al campo de la medicina y al desarrollo de instrumentos de medición, diagnóstico y pronóstico basados en el análisis de muestras biológicas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15 Los linfomas primarios del sistema nervioso central (LPSNC) son linfomas no Hodgkin excepcionalmente raros y altamente malignos. Se caracterizan por su gran malignidad y su desarrollo múltiple, aunque muestran predilección por la localización en ganglios basales, cuerpo calloso, tálamo, sustancia blanca periventricular y región subependimaria. Entre 1980 y 1989 la frecuencia de estas neoplasias se incrementó 9 veces, con una incidencia absoluta de 4,7 casos/1.000 personas/año en pacientes con 20 síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Estos enfermos tienen un riesgo 2.600 veces mayor de padecer esta complicación en comparación con la población general. Su incidencia oscila entre el 3 y el 4% y constituye la neoplasia que con mayor frecuencia compromete el sistema nervioso central (SNC) por lo que se la incluye entre las 25 patologías marcadoras del sida. Los tipos histológicos predominantes no difieren entre pacientes inmunocompetentes e inmunodeficientes, predominando los tumores de células grandes, inmunoblasticos y centroblasticos.

La mayoría de los LPSNC son derivados de células B. El LPSNC derivado de células T 30 (T-LPSNC) es excepcionalmente raro. Estos tumores aparecen característicamente con una lesión de masa focal. Como no hay hallazgos clínicos o radiográficos distintivos para T-LPSNC, se debe confirmar el inmunofenotipo de T-LPSNC mediante una biopsia tumoral cerebral, siguiéndose el análisis histopatológico y genotípico para detectar la monoclonalidad. Este protocolo de diagnóstico sigue siendo el estándar de oro. Además, 35 después de la confirmación de T-LPSNC y consecuente tratamiento por radioterapia, no

existe un método de pronóstico que permita predecir la respuesta al tratamiento, ya que la resonancia cerebral magnética no permite un diagnóstico presuntivo, ni puede ser usada como pronóstico, especialmente debido a la dispersión de las células tumorales y su apariencia no neoplásica tras el contraste con gadolinio. En el estado actual son 5 necesarios biomarcadores y métodos para uso de dichos biomarcadores que permitan predecir la respuesta de un sujeto al tratamiento, preferiblemente de modo no invasivo.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

10 Los inventores han determinado que el número de células de linfocitos T CD4 positivos (linfocitos T CD4+) en muestras aisladas de sujetos puede ser usado como un biomarcador del linfoma T primario del sistema nervioso cerebral (T-LPSNC). Dicho uso permite predecir la respuesta del sujeto al tratamiento con radioterapia, de un modo mínimamente invasivo, sin la necesidad de imágenes radiológicas, disminuyendo la 15 exposición del paciente a radiación y reduciendo notablemente el coste del tratamiento oncológico de este tipo de cáncer.

Así, un primer aspecto de la invención hace referencia al uso *in vitro* del nivel de un biomarcador en muestra aislada de un sujeto que padece linfoma T primario del sistema 20 nervioso cerebral (T-LPSNC), donde el biomarcador son linfocitos T CD4+, para predecir la respuesta del sujeto al tratamiento con radioterapia, de ahora en adelante el uso de la invención.

Los inventores han descubierto que el uso de la invención puede ser aún más robusto 25 cuando, en conjugación con el numero de linfocitos T CD4+, se usan además indicadores de inflamación. Así en una realización particular, el uso de la invención además comprende un biomarcador seleccionado de la lista que consiste en: proteína C reactiva, enzimas hepáticas, ferritina y cualquiera de sus combinaciones.

30 El número de linfocitos T CD4+ permite indicar si un sujeto con diagnóstico confirmado de T-LPSNC, y que se va a someter a un tratamiento de radioterapia, tendrá una evolución favorable a dicho tratamiento.

35 El término “biomarcador”, tal y como se usa en la presente descripción se refiere a una sustancia, cuya presencia se puede determinar y cuantificar objetivamente, que se

utiliza como indicador de la presencia/ausencia de la enfermedad o del pronóstico de la misma, y sirve particularmente para predecir la respuesta al tratamiento. Los biomarcadores de la invención se pueden identificar y/o cuantificar, es decir, se puede únicamente detectar su presencia o bien se pueden detectar y/o cuantificar cambios en 5 la cantidad o concentración de los mismos.

En la presente invención, el nivel de los “linfocitos T CD4+”, hace referencia al número de células linfocitos T CD4+ por mm^3 (cél./ mm^3) en una muestra aislada de un sujeto. Los linfocitos T CD4+ en una muestra aislada se pueden identificar y/o cuantificar por 10 variadas técnicas del estado del arte, siendo la más usada la citometría de flujo.

El término “linfocitos” tal como se usa en la presente invención hace referencia a un tipo de leucocito que proviene de la diferenciación linfoide de las células madre hematopoyéticas ubicadas en la médula que completa su desarrollo en los órganos 15 linfoides primarios y secundarios (médula ósea, timo, bazo, ganglios linfáticos y tejidos linfoideos asociados a las mucosas). El término “linfocitos T” hace referencia a linfocitos que maduran en el timo y cuyas funciones son parte importante del sistema inmunitario adaptativo. Los linfocitos así desarrollados circulan posteriormente por la sangre y el sistema linfático hasta que son activados al contactar con un antígeno específico, el cual 20 interactúa con el receptor de linfocitos T que hay en su superficie. Estos antígenos les deben ser presentados a los linfocitos T por células presentadoras de antígenos, tales como las células dendríticas o los macrófagos mediante moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad. De esta forma, los linfocitos T pueden responder de forma 25 específica contra patógenos y células tumorales.

25 Los linfocitos T pueden ser de dos tipos dependiendo de la proteína que presenten en su superficie. Así, el término “linfocitos T CD4+” en la presente invención hace referencia al tipo de linfocitos T que maduran en linfocitos T cooperadores y que se caracterizan por expresar en la superficie la glucoproteína cúmulo de diferenciación 4 (CD4 positivos 30 o CD4+). Dicha proteína, participa en la adhesión de los linfocitos T a las células diana en la llamada sinapsis inmunitaria. Los linfocitos T CD4+ modulan una respuesta inmunitaria específica de antígeno a través de su alta plasticidad y capacidad para producir citosinas y pueden inducir apoptosis celular selectiva a través de la interacción directa célula-célula y la liberación dirigida de moléculas efectoras, como la perforina y 35 las granzimas. La proteína CD4+, se puede identificar en linfocitos T además por la

coexpresión en la superficie de la proteína CD25 (también conocida por receptor interleukina-2 – IL-2R). Así, se puede identificar linfocitos T CD4+ por la doble tinción de tejidos o soluciones celulares con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD25. La especificidad de los linfocitos T se guía a través de la activación del receptor de células T (TCR) que 5 reconoce los antígenos en forma de péptidos, que son presentados por las moléculas de antígeno leucocitario humano (HLA) en la superficie celular.

Además del biomarcador linfocitos T CD4+, es posible usar el nivel de otros biomarcadores en conjugación con los linfocitos T CD4+, para predecir la respuesta del 10 sujeto al tratamiento de T-LPSNC. Dichos biomarcadores son: proteína C reactiva, enzimas hepáticas, ferritina y cualquiera de sus combinaciones.

El término “proteína C reactiva” (PCR o CRP por sus siglas en inglés), como se usa en la presente descripción se refiere a una proteína plasmática circulante, que aumenta 15 sus niveles en relación con valores de referencia en respuesta a la inflamación (proteína de fase aguda).

El término “enzimas hepáticas” tal como se usa en la presente descripción hace referencia a proteínas complejas que ayudan a que el hígado metabolice el azúcar de 20 los alimentos para convertirlo en la energía necesaria para todas las funciones del cuerpo y otras funciones realizadas por el hígado. Una elevación de enzimas hepáticas en relación con valores de referencia ocurre cuando estas no pueden ser utilizadas por las células enfermas o dañadas del hígado y son liberadas en mayor cantidad, indicando inflamación o daño del hígado. Dos ejemplos de enzimas hepáticas son la alanina 25 transaminasa (ALT) y el aspartato transaminasa (AST), las cuales son las más comunes para evaluar la función hepática.

El término “ferritina” tal como se usa en la presente descripción hace referencia a la principal proteína almacenadora, transportadora y liberadora de forma controlada de 30 hierro. En el suero sanguíneo la ferritina funciona como portador de hierro. Los niveles de ferritina se utilizan en medicina para el diagnóstico de las anemias ferropénicas. La ferritina suele ser una buena medida del estado general del hierro, pero en presencia de una inflamación, funciona como una respuesta inmune, no como un marcador del estado del hierro. Así, valores elevados de ferritina indican la presencia de un proceso 35 inflamatorio.

La determinación de los niveles de los biomarcadores descritos en el uso de la presente invención se hace sobre una muestra aislada de un sujeto, donde dicha muestra es obtenida por métodos y procedimientos bien establecidos y conocidos para el experto del arte. El término “muestra aislada” tal como se usa en la presente descripción se refiere a una parte o cantidad pequeña de una cosa que se considera representativa del total y que se toma o se separa de ella para someterla a estudio, análisis o experimentación. En la presente invención, dicho estudio, análisis o experimentación hace referencia al nivel de linfocitos T CD4+ y a los niveles de proteína C reactiva, enzimas hepáticas y ferritina en células o trozos de tejidos.

10

Dentro del término “muestra” también se incluyen muestras que han sido manipuladas de alguna manera después de su obtención, por ejemplo, mediante el tratamiento con reactivos, la solubilización o el enriquecimiento de ciertos componentes. En una realización preferida del uso de la invención la muestra es una muestra clínica.

15

En la presente invención se entiende por “muestra clínica” a una muestra aislada de un sujeto. El término “muestra clínica” abarca tanto muestras de sangre y otras muestras líquidas de origen biológico, muestras de tejidos sólidos, como una muestra de biopsia, los lisados celulares, el suero, el plasma, los fluidos biológicos y las muestras de tejidos.

20

Ejemplos de muestras clínicas adecuadas para el uso de la invención incluyen, sin limitaciones, a sangre, suero, líquido cefalorraquídeo, biopsia cerebral y soluciones celulares. En una realización preferida del uso de la invención, la muestra biológica se selecciona de una lista que consiste en: sangre, suero, líquido cerebroespinal, biopsia cerebral y soluciones cerebrales.

25

La expresión “linfoma T primario del sistema nervioso cerebral” o sus siglas “T- LPSNC” tal como se usa en la presente invención hace referencia al cáncer que se forma en el tejido linfático del encéfalo, la médula espinal, las meninges (cubierta exterior del encéfalo) o el ojo (linfoma ocular) y que deriva de las células T del sistema inmunitario.

30

Es un linfoma no Hodgkin excepcionalmente raro y altamente maligno. Los linfocitos infiltrantes de tumor (TIL) se componen principalmente de linfocitos T CD4+ convencionales y linfocitos T reguladores (Tregs), que se definen por la expresión de CD4, una glicoproteína, en su superficie. Aunque la infiltración de linfocitos T CD4+ es ampliamente superada en número por los macrófagos y microglia asociados a tumores, múltiples estudios han demostrado que el aumento de la infiltración tumoral con

linfocitos T se asocia como un posible marcador de supervivencia a largo plazo (Ingold *et al.*, *Breast care*, 2016, 11(2), 96–100).

El T-LPSNC tiene una incidencia miles de veces mayor en sujetos seropositivos para
5 VIH. Así, en una realización preferida del uso de la invención el sujeto es seropositivo
al virus de inmunodeficiencia (VIH). En otra realización preferida el sujeto es un ser
humano de cualquier sexo, edad o raza.

El término “virus de la inmunodeficiencia humana” o su sigla “VIH” tal como se usa en
10 la presente invención, hace referencia a un lentivirus, de la familia retrovirus, que
contiene información genética bajo la forma de ácido ribonucleico (ARN) protegido por
una envoltura de membrana lipídica. Un sujeto infectado por VIH presenta en la sangre
anticuerpos específicos contra el VIH, es decir, es “seropositivo” para VIH. La infección
15 por VIH puede causar con el tiempo el “síndrome de inmunodeficiencia adquirida” o su
sigla “SIDA”. La manifestación del SIDA se debe a que el VIH ataca el sistema
inmunitario y debilita los sistemas de defensa contra las infecciones y contra
determinados tipos de cáncer. A medida que el virus destruye las células inmunitarias e
impide su normal funcionamiento, la persona infectada va cayendo gradualmente en
20 una situación de inmunodeficiencia.

La expresión “predecir la respuesta del sujeto al tratamiento con radioterapia” tal como
se usa en la presente invención hace referencia al procedimiento por cual se determina
si un sujeto al cual se ha diagnosticado T-LPSNC tendrá una “respuesta favorable a
tratamiento con radioterapia”, es decir, si hay una posibilidad de 60 % o más de que
25 habrá una reducción del tamaño tumoral, en relación al tamaño tumoral antes del
tratamiento, preferiblemente transcurridos 6 meses del tratamiento. Como entenderán
los expertos en la materia, tal determinación, aunque se prefiere que sea, normalmente
puede no ser correcta para el 100% de los sujetos que se va a diagnosticar. La
expresión, sin embargo, requiere que una parte estadísticamente significativa de los
30 sujetos se pueda identificar como que tendrán una reducción del tamaño del tumor o
tumores. La cantidad que es estadísticamente significativa puede ser establecida por un
experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por
ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza,
determinación del valor significación *P*, test de *Student* o funciones discriminantes de
35 *Fisher*, medidas no paramétricas de *Mann Whitney*, correlación de *Spearman*, regresión

- logística, regresión lineal, área bajo la curva de ROC (AUC). Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite
- 5 detectar correctamente la reducción del tamaño del tumor de forma diferencial en al menos el 60%, más preferiblemente en al menos el 70%, mucho más preferiblemente en al menos el 80%, o aún mucho más preferiblemente en al menos el 90% de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.
- 10 El término "tratamiento", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a combatir los efectos causados por la enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto (preferentemente un mamífero y, más preferentemente, un humano), incluyendo:
- 15 i) Inhibir la enfermedad o condición patológica, es decir, detener su desarrollo;
ii) Aliviar la enfermedad o el estado patológico, es decir, provocar la regresión de la enfermedad o el estado patológico o su sintomatología;
iii) Estabilizar la enfermedad o el estado patológico.
- 20 El término "radioterapia" tal como se utiliza en la presente invención se refiere a múltiples tipos de radioterapia, incluida la radioterapia interna y externa, la radioinmunoterapia, la radiocirugía y el uso de diversos tipos de radiación, como los rayos X, los rayos gamma, las partículas alfa, las partículas beta, los fotones, los electrones, los neutrones, los radioisótopos y otras formas de radiación ionizante. Preferentemente, la radioterapia
- 25 implica el uso de rayos X o rayos gamma. En una realización preferida de la presente invención, la radioterapia es por radiocirugía.
- El término "radiocirugía" tal como se usa en la presente invención hace referencia a una técnica de radiocirugía, también denominada radiocirugía estereotáctica, donde se
- 30 utilizan múltiples rayos de radiación enfocados con precisión para tratar tumores en el cerebro. La radiocirugía utiliza imágenes tridimensionales para dirigir altas dosis de radiación al área afectada con un impacto mínimo en el tejido sano circundante, dañando el ADN de las células objetivo y dejando relativamente incólumes a las células de su alrededor. Las células afectadas pierden la capacidad de reproducirse, lo que
- 35 hace que los tumores se reduzcan.

De forma análoga a los usos descritos en párrafos anteriores, en la presente invención también se contemplan los métodos dirigidos tanto a predecir la respuesta de un sujeto que padece de T-LPSNC al tratamiento con radioterapia.

5

Otro aspecto de la invención hace referencia a un método *in vitro* para la predicción de la respuesta al tratamiento de T-PCNSL mediante radioterapia en un sujeto que padece T-LPSNC, de ahora en adelante el método de la invención, caracterizado por que comprende los siguientes pasos:

- 10 a) identificar y cuantificar el nivel de linfocitos T CD4+ en una muestra aislada del sujeto antes y/o durante el tratamiento,

donde un valor superior a 100 linfocitos T CD4+ cél./mm³ en la muestra es indicativo de una respuesta favorable a tratamiento con radioterapia. Por tanto, en consecuencia un valor inferior o igual a 100 linfocitos T CD4+ cél./mm³ en una muestra es indicativo de 15 una respuesta desfavorable a tratamiento con radioterapia.

Además, la respuesta la tratamiento puede ser confirmada con recuentos posteriores del número de linfocitos T CD4+ en sujetos que fueran sometidos al tratamiento y puede ser monitorizada su efectividad mediante su seguimiento antes y durante el tratamiento.

- 20 Así en una realización preferida del método de la invención comprende además identificar y cuantificar el nivel de linfocitos T CD4+ en una muestra aislada del sujeto al menos 30 días, preferiblemente al menos 60 días, después del tratamiento con radioterapia, donde un valor del número de linfocitos T CD4+ en la muestra aislada del sujeto al menos 30 días después del tratamiento inferior al valor obtenido antes del 25 tratamiento es indicativo de respuesta desfavorable al tratamiento con radioterapia.

En el caso del nivel de linfocitos T CD4+ ser inferior o igual a 100 cél./mm³ es recomendable la combinación de radioterapia con otras terapias coadyuvantes. Así, en una realización preferida del método de la invención, un valor inferior o igual a 100 30 cél./mm³ de linfocitos T CD4+ en la muestra es indicativo de una respuesta desfavorable a tratamiento con radioterapia y hace necesaria su combinación con una terapia coadyuvante, preferiblemente seleccionada de entre quimioterapia, inmunoterapia y/o terapia antiretroviral altamente activa (TARAA).

- 35 Todas las definiciones anteriormente descritas para los aspectos anteriores y sus

realizaciones preferidas son válidas para los aspectos referentes al método de la invención y sus realizaciones preferidas.

En la presente invención se intiende por “diagnóstico” al procedimiento por el cual se 5 determina que un sujeto sufre o padece de una determinada enfermedad, entidad nosológica, síndrome, o cualquier condición de salud-enfermedad, mediante el análisis de una serie de parámetros clínicos de dicha enfermedad, y que la distinguen de otras enfermedades con cuadros clínicos semejantes. En la presente invención la enfermedad a identificar es T-LPSNC usando técnicas conocidas por el experto.

10

El recuento normal de células linfocitos T CD4+ en un humano adulto se encuentra en un rango de 800 a 1050 cél./mm³, con un espectro de variación (2 desviaciones estándares) de 500 a 1400 cél./mm³; el recuento de células linfocito T CD4+ es producto de 3 variables: el conteo global de leucocitos (también denominados glóbulos blancos), 15 el porcentaje de linfocitos globales y el porcentaje de linfocitos T que poseen el antígeno CD4. La citometría de flujo reporta el porcentaje de linfocitos T CD4+; el recuento absoluto se calcula multiplicando el porcentaje de linfocitos T CD4+ por el recuento total de leucocitos. De manera habitual, el conteo absoluto de células linfocitos T CD4+ y el porcentaje son concordantes y sus valores correspondientes son:

20

⇒ Conteo absoluto de células linfocito T CD4+ > 500 cél./mm³ se corresponde a un porcentaje de linfocitos T CD4+ > 29 %.

25

⇒ Conteo absoluto de células linfocito T CD4+ entre 200 y 500 cél./mm³ se corresponde a un porcentaje de linfocitos T CD4+ entre 14 y 28 %.

⇒ Conteo absoluto de células linfocitos T CD4+ < 200 cél./mm³ se corresponde a un porcentaje de linfocitos T CD4+ < 14 %.

30

Pacientes infectados por el VIH y un conteo absoluto de células linfocito T CD4+ < 200 cél./mm³ son clasificados como sujetos que padecen SIDA por los Centros para el Control de Enfermedades de Estados Unidos de Norteamérica y por la Organización Mundial de la Salud.

35

La expresión “respuesta desfavorable a tratamiento con radioterapia” tal como se usa

en la presente invención indica que hay más de un 50% de posibilidad del tumor o tumores no presenten una reducción del tamaño, en comparación con el tamaño antes del tratamiento. Como entenderán los expertos en la materia, tal determinación, aunque se prefiere que sea, puede no ser correcta para el 100% de los sujetos que se va a diagnosticar. La expresión, sin embargo, requiere que una parte estadísticamente significativa de los sujetos se pueda identificar como que tendrán una reducción del tamaño del tumor o tumores. La cantidad que es estadísticamente significativa puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor significación P , test de *Student* o funciones discriminantes de *Fisher*, medidas no paramétricas de *Mann Whitney*, correlación de *Spearman*, regresión logística, regresión lineal, área bajo la curva de ROC (AUC). Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la no reducción del tamaño del tumor de forma diferencial en al menos el 50%, más preferiblemente en al menos el 60%, más preferiblemente en al menos el 70%, mucho más preferiblemente en al menos el 80%, o aún mucho más preferiblemente 90% de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.

El término "terapia coadyuvante" tal como se usa en la presente invención hace referencia a un tratamiento que se administra además del tratamiento primario. En la presente invención, el tratamiento primario es la radioterapia y los tratamientos coadyuvantes son quimioterapia e inmunoterapia. Tal como se usa en la presente descripción, el término "quimioterapia" se refiere al uso de medicamentos para destruir las células cancerosas (incluidas las leucemias y los linfomas). Existen más de 50 fármacos de quimioterapia diferentes y algunos se administran por separado, pero a menudo se pueden combinar varios fármacos (lo que se conoce como quimioterapia de combinación). El término "inmunoterapia" tal como se usa en la presente descripción hace referencia al tratamiento de una enfermedad mediante la activación o supresión del sistema inmunológico. Las inmunoterapias diseñadas para provocar o amplificar una respuesta inmunológica se clasifican como inmunoterapias de activación, mientras que las inmunoterapias que reducen o suprimen se clasifican como inmunoterapias de supresión. La expresión "terapia antirretroviral altamente activa" o su sigla "TARAA" tal

como se usa en la presente descripción hace referencia al uso combinado de antiretrovirales que impiden la propagación del virus VIH, reduciendo la carga viral o el número de virus activos en la sangre del sujeto.

- 5 En relación al método de la invención, se puede aumentar la robustez del método de invención al usar otros biomarcadores en conjugación con los niveles de linfocitos T CD4+.

Así, en una realización preferida del método de la invención que comprende además 10 identificar y cuantificar el nivel de al menos un biomarcador que se selecciona de una lista que consiste en: proteína C reactiva, enzimas hepáticas, ferritina y cualquiera de sus combinaciones, una muestra aislada del sujeto antes y al menos 3 meses, preferiblemente 6 meses después del tratamiento, donde un aumento del nivel de los 15 valores de proteína C reactiva, enzimas hepáticas y/o ferritina en la muestra posterior al tratamiento son indicativos de una respuesta desfavorable al tratamiento con radioterapia.

Las expresiones “identificar y cuantificar el nivel de linfocitos T CD4+ en una muestra aislada” y “identificar y cuantificar el nivel de al menos un biomarcador” se refieren a 20 cualquier procedimiento que posibilite la identificación de la presencia y/o la medida del nivel o el número de linfocitos T CD4+ y cualquier otro de los biomarcadores mencionados en la presente invención, respectivamente, en la muestra. Ejemplo de un método aplicable a la identificación y cuantificación de linfocitos T CD4+ es la citometría de flujo en muestras de sangre. El recuento absoluto de células linfocito T CD4+ difiere 25 cuando se utilizan técnicas diferentes, por tal motivo, estas variaciones deben ser consideradas al interpretar los resultados. Se considera un cambio significativo en el estado de los linfocitos T CD4+, que puede tener implicaciones clínicas, a una variación entre 2 test que iguale o supere el 30 % del recuento absoluto o un incremento o decrecimiento en el porcentaje de células linfocitos T CD4+ en 3 puntos porcentuales o 30 más.

Los métodos de la invención se realizan en muestras aisladas de sujetos. En una realización particular del método de la invención la muestra se selecciona de una lista 35 que consiste en: sangre, suero, líquido cerebroespinal, biopsia cerebral y soluciones

cerebrales. En otra realización preferida el sujeto es seropositivo al VIH. En otra realización preferida el sujeto es un humano, de cualquier sexo, edad o raza.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5

Fig. 1. Evaluación histopatológica de Biopsia cerebral. En todos los tejidos de biopsia cerebral se encontró presencia de angiocentricidad y angioinvasión característica del linfoma primario del Sistema nervioso central. Histológicamente, este tipo de tumor es irregular, mal demarcado y angiocéntrico. Como característica clave, 10 las células de los linfomas primarios del SNC no se adhieren la una a la otra.

Fig. 2. Porcentaje de progresión tumoral dependiente de niveles de linfocitos T CD4+. Representa el porcentaje de riesgo de progresión tumoral dependiente de los niveles serológicos de linfocitos T CD4+ por mm^3 (cél./ mm^3). En la ilustración se 15 identifica un riesgo mayor al 25% de progresión tumoral a las primeras 4 semanas de diagnóstico cuando los niveles sanguíneos son menores a 150 (cél./ mm^3). En especial se estima que un 100% de los pacientes presentan progresión tumoral a 6 meses de 20 diagnóstico si los niveles serológicos de CD4 son menores a 100. En pacientes con niveles de CD4 mayores a 150 (cél./ mm^3) el riesgo es menor a 2% si es tratado a tiempo con radiocirugía y se mantienen los niveles de CD4 mayores a 150 (cél./ mm^3) a lo largo del tratamiento médico.

Fig. 3. Evaluación de Susceptibilidad Tumoral ($\geq 75\%$) a Radiocirugia dependiente de biomarcador de Niveles de linfocitos T CD4+ en suero. La Susceptibilidad Tumoral a radiocirugia ($\geq 75\%$) a 6 meses de tratamiento se predice al encontrar 25 valores serológicos de linfocitos T CD4+ mayores a 150 (cél./ mm^3) al inicio de la terapia de radiocirugía y se mantienen a lo largo del tratamiento. Se denota una susceptibilidad menor a 50% a los 6 y 12 meses de tratamiento cuando los niveles de CD4 son menores a 100 (cél./ mm^3).

30

EJEMPLOS

Materiales y métodos

Se determinaron los recuentos absolutos de linfocitos T CD4+ antes, durante y después 35 de la radiocirugía en casos de linfoma de sistema nervioso central en pacientes positivos para VIH. Para determinar los recuentos absolutos de linfocitos T CD4+, se

midieron los recuentos absolutos de glóbulos blancos totales y el porcentaje de linfocitos T CD4+. Específicamente, medimos los recuentos de linfocitos T CD4+ y glóbulos blancos totales una vez durante la biopsia confirmatoria (Fig. 1.), 3 meses, 6 meses y 12 meses posteriores al tratamiento con radiocirugia. Los recuentos de linfocitos T CD4+ y glóbulos blancos totales se midieron en todos los pacientes confirmados con VIH. Se revisaron los recuentos trimestrales de linfocitos T CD4+ después de que se observó que varios pacientes tuvieron descensos acusados en los recuentos de linfocitos T CD4+ después del tratamiento con radiocirugia. Se inició terapia con antiretrovirales altamente activos (TARAA) si cualquier de los recuentos de linfocitos T CD4+ del paciente era menor de 200 cél./mm³ para evitar la necesidad de cerrar monitoreo a medida que los recuentos se acercaban al nivel crítico de 100 cél./mm³ de linfocitos T CD4+.

Todos los pacientes recibieron por lo menos una dosis de radiocirugia conforme a una dosis media de 11 Gy (rango, 10 - 21 Gy). La repetición media de la radiocirugia fue de 20 meses. El tiempo medio desde la biopsia hasta el inicio de la radiocirugia fue de 30 días. El tiempo medio desde la biopsia hasta el inicio de terapia TARAA, después de un recuento de linfocitos T CD4+ menor de 200 cél./mm³, fue de 18 días. El análisis estadístico de las variables categóricas utilizó el análisis de chi-cuadrado. Utilizamos el método de Kaplan-Meier para analizar los datos de supervivencia.

Muestras de tejido

Se obtuvieron muestras de linfoma de sistema nervioso central de 42 pacientes sometidos a una craneotomía para biopsia tumoral. Todas las muestras tumorales se clasificaron como Linfoma primario de sistema nervioso central derivado de linfocitos T (T-LPSNC) en pacientes VIH positivos. Se obtuvo sangre periférica durante el tiempo de la biopsia de cada uno de los pacientes. A todos los pacientes se les suministró una dosis idéntica de esteroides perioperatorios y se sometieron a anestesia similar. Este estudio de investigación fue aprobado por la Junta de Revisión Institucional de Larkin Community Hospital como un estudio prospectivo observacional y retrospectivo para revisión y confirmación de datos de patología cerebral tratados con radiocirugia.

Análisis de citometría de flujo multicolor

Los linfocitos en el tejido tumoral y de sangre periférica (1×10^6 en 50 µl) se tiñeron con 2 µl de anticuerpo y se incubaron durante 45 minutos a 4 °C en placas de microtitulación

de fondo redondo de 96 pocillos (BD Biosciences, San José, California) para determinar su inmunofenotipo. Los anticuerpos utilizados fueron anti-CD4-isotiocianato de fluoresceína (2 µg / ml), anti-CD3-PE (1 µg / ml), y anti-CTLA-4 (5 µg / ml) (BD Biosciences). La citometría de flujo se realizó en un FACSCalibur (Becton Dickinson, 5 BD Biosciences) y se analizó con el software FlowJo (Ashland, Oregón). Los linfocitos T CD4+ se purificaron directamente de la suspensión celular aislada. Después de tres lavados en medio completo, los linfocitos T positivos para CD4 se tiñeron con anticuerpo anti-CD25 (1 µg / ml). Las células Tr se clasificaron de acuerdo con la actividad funcional de las células T CD4+. La clasificación celular se realizó utilizando un instrumento MoFlo 10 (Cytomation, Fort Collins, Col.).

Resultados

Se evaluaron los cuarenta y dos casos de pacientes inmunocomprometidos por VIH. De estos 42, veintiséis (26) casos fueron tratados con terapia TARAA temprana y 15 corresponden al grupo de estudio principal. En todos los 42 casos se valoraron las historias clínicas, las resonancias magnéticas y los informes histopatológicos positivos para linfoma primario de sistema nervioso central (Tabla 1). Todos los datos de laboratorios sobre VIH fueron revisados y confirmados con el departamento de infectología y patología.

20

Frecuencia de linfocitos T CD4+ de pacientes con linfoma en sistema nervioso central y sangre de control

Los linfocitos T aislados se identificaron primero en linfocitos totales a través de sus propiedades de dispersión frontal y lateral. La frecuencia de los linfocitos T CD4+ se definió como la frecuencia de linfocitos T CD4+ que expresan un alto nivel de CD25. En el conjunto de pacientes con linfoma y VIH, la proporción media de linfocitos T CD4+ fue $94,7\% \pm 3,26\%$ (rango, 91,5% –99%). Es de destacar, que el conteo de los linfocitos T CD4+ (Fig. 2.) en la sangre de los pacientes con disminución positiva de tamaño de lesión tumoral o con recurrencia negativa de linfoma aumentó significativamente en 25 comparación con el conteo observado en la sangre de pacientes que no presentaron disminución tumoral después de 6 meses de tratamiento ($17,84\% \pm 1,37\%$ [rango, 15,4% –23,2%] frente a $0,37\% \pm 0,27\%$ [rango, 0,16% –0,6%]; $P <0,05$).

35

Tabla 1. Datos demográficos

Características básicas de los pacientes	
Pacientes (n)	42
Edad (y)	
Media	55,7
Rango	25–82
Sexo (n)	
Hombre	28
Mujer	14
Dosis (Gy)	
Media	11 Gy
Rango	10 – 21 Gy
Tiempo desde la cirugía hasta el inicio de la Radiocirugía (d)	
Media	30
Rango	18–49
Radiocirugía Sesiones	
Media	2
Rango	1-4
Tiempo desde la cirugía hasta última sesión de Radiocirugía	
Media	20 meses
Rango	18-36

Del grupo total estudiado, un total de 26 pacientes fueron hospitalizados después de la primera sesión de radiocirugía (Tabla 2). En general, se encontró un aumento significativo en el número de pacientes hospitalizados con un conteo de linfocitos T CD4+ (CD4) CD4 <100 cél./mm³ (22 de 27, 81,5%) que en el grupo CD4 > 100 cél./mm³ (4 de 15, 26,7%; p <0,01). Nuevos síntomas neurológicos como epilepsia o infección fue la razón más común de ingreso hospitalario. Significativamente más pacientes fueron hospitalizados por infección en el grupo CD4 < 100 cél./mm³ (12 de 27, 44,4%) que en el grupo CD4 >= 100 cél./mm³ (1 de 15, 6,7%; p <0,01). Los diagnósticos que requirieron ingreso incluyeron infección urinaria, neumonía, trombosis venosa profunda, cambios en el estado mental y cefalea.

Tabla 2. Datos categorizados por recuento absoluto de linfocitos T CD4+ (CD4) obtenidos en la biopsia de diagnóstico

	Total	CD4 <100 cél./mm ³	CD4 >=100 cél./mm ³	P
Total (n)	42	27	15	
Hospitalizados (n)	26	22	4	<0,01
Hospitalizados con infección (n)	13	12	1	<0,01
Leucocitos contaje				NS
Mínimo media	5091	4389	4932	0,73
Rango	2792 – 6013	2792 – 4328	3130 – 6013	
Desviación Standard	2122	2453	2045	

Del total de 42 pacientes tratados, 38 de los casos presentaron lesiones múltiples en la resonancia magnética cerebral de número mayor a 4; la mayoría eran lesiones definidas punteadas.

5

A lo largo del estudio se encontró un aumento de prevalencia de lesiones de sustancia blanca T2 en los 16 pacientes donde se inició terapia TARAA tardíamente (> 6 meses) y que presentaban en el momento de la hospitalización niveles de CD4 <=100 cél./mm³. (Fig. 3.)

10

En el grupo total de pacientes tratados con radiocirugía, 21 pacientes presentaron CD4 menor a 100 cél./mm³ a los 3 meses de seguimiento, de los cuales 16 fueron del grupo de radiocirugía que no inicio TARAA tempranamente (en los primeros 6 meses de diagnóstico) y 5 del grupo que inició TARAA en los primeros 30 días posteriores a 15 diagnóstico (p = 0,00291). Lo que sugiere mayor reincidencia de lesiones tumorales en pacientes con CD4 menor a 100 cél./mm³. Al analizar los reportes de resonancia magnética cerebral después de 6 meses de tratamiento con radiocirugía, se encontraron nuevas lesiones tumorales tras el tratamiento con radiocirugía en 13 pacientes que iniciaron terapia TARAA tarde y en 9 pacientes que iniciaron TARAA en los 20 primeros 30 días luego de confirmación de diagnóstico.

La mediana de supervivencia fue ligeramente más corta para el grupo CD4 <100 cél./mm³ (16,4 meses) que para el grupo CD4 > 100 cél./mm³ (17,2 meses), pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Un análisis de subgrupos que incluyó 25 solo a pacientes con CD4 <100 cél./mm³ tampoco logró mostrar una diferencia estadísticamente significativa en la mediana de supervivencia cuando fue tratado con

TARAA en los primeros 30 días de diagnóstico, lo que indica que la susceptibilidad tumoral es dependiente de los niveles de CD4+, y este puede ser usado como biomarcador único para medir la susceptibilidad tumoral de linfoma de sistema nervioso central a radiciocirugía, y al ser usado tempranamente con la terapia TARAA, permitirá 5 mantener una mediana de supervivencia similar o mayor a pacientes con CD4 ≥ 100 .

Juntamente con el nivel de linfocitos T CD4+, los inventores realizaron pruebas sericas antes, tres meses y/o seis meses después de realizada la radiocirugía donde se medió el nivel de ferritina, el nivel de enzimas hepaticas y la proteína C reactiva (PCR). Un 10 nivel alto de ferritina sérica en comparación con el nivel de antes de iniciarse el tratamiento se asoció significativamente con la progresión de la enfermedad y un tiempo de supervivencia corto en el grupo de CD4 ≤ 100 cél./mm³ en comparación con el grupo CD4 > 100 cél./mm³ (*Hazard Ration (HR) = 1,73, Intervalo Cofianza (IC) del 95%: 1,07–3,44; p = 0,032*). El nivel de enzimas hepaticas y PCR se midió antes y seis 15 meses después del tratamiento. Un aumento del nivel de las enzimas hepáticas y/o PCR séricas a los seis meses en relación al nivel antes del inicio del tratamiento se asoció significativamente con la progresión de la enfermedad y un tiempo de sobrevida corto en el grupo de CD4 ≤ 100 cél./mm³ en comparación con el grupo CD4 > 100 cél./mm³.

20

Conclusiones

Los pacientes con linfoma de sistema nervioso central secundario a VIH tratados con radiocirugía tienen un mayor riesgo de reincidencia y progresión tumorales 25 potencialmente mortales cuando los niveles de linfocitos T CD4+ serológico son menores o iguales a 100 cél./mm³. Los pacientes en la "zona de peligro" de <100 cél./mm³ recibieron profilaxis antibiótica, y ningún paciente desarrolló respuesta inflamatoria sistémica.

30 Es de destacar que la medición de linfocitos T CD4+ previa a radiocirugía es esencial para poder medir la tasa de éxito de la intervención. Aunque la inmunosupresión en pacientes con tumores cerebrales primarios se debe principalmente al uso prolongado de dosis altas de esteroides, la radioterapia también puede contribuir. Por lo que en pacientes inmunosuprimidos por VIH es esencial el control de niveles de linfocitos T 35 CD4+, ya que la disminución continua en los recuentos de linfocitos T CD4+ después

de la radiocirugía, reflejada en los datos de la presente descripción, respaldan una pobre susceptibilidad tumoral y posible crecimiento y reincidencia tumoral a 6 meses posteriores de tratamiento con radiocirugía.

REIVINDICACIONES

1. Uso *in vitro* del nivel de un biomarcador en una muestra aislada de un sujeto que padece linfoma T primario del sistema nervioso cerebral (T-LPSNC), donde el biomarcador son linfocitos T CD4+, para predecir la respuesta del sujeto al tratamiento con radioterapia.
5
2. Uso según la reivindicación 1, que además comprende un biomarcador seleccionado de la lista que consiste en: proteína C reactiva, enzimas hepáticas, ferritina y
10 cualquier de sus combinaciones.
3. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde el sujeto es seropositivo al virus de inmunodeficiencia humana (VIH).
- 15 4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde la muestra se selecciona de una lista que consiste en: sangre, suero, líquido cerebroespinal, biopsia cerebral y soluciones celulares.
5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde el sujeto es un humano.
20
6. Método *in vitro* para la predicción de la respuesta al tratamiento del linfoma T primario del sistema nervioso cerebral (T-LPSNC) mediante radioterapia en un sujeto que padece T-LPSNC, caracterizado por que comprende los siguientes pasos:
25 a) identificar y cuantificar el nivel de linfocitos T CD4+ en una muestra aislada del sujeto antes y/o durante el tratamiento, donde un valor superior a 100 cél/mm³ de linfocitos T CD4+ en la muestra es indicativo de una respuesta favorable al tratamiento con radioterapia.
- 30 7. Método según la reivindicación 6, donde un valor del número de linfocitos T CD4+ en una muestra aislada del sujeto al menos 30 días después del tratamiento inferior al valor obtenido antes del tratamiento es indicativo de respuesta desfavorable al tratamiento con radioterapia.

8. Método según la reivindicación 6 o 7, donde un valor inferior o igual a 100 cél./mm³ de linfocitos T CD4+ en la muestra es indicativo de una respuesta desfavorable a tratamiento con radioterapia y necesaria su combinación con una terapia coadyuvante, preferiblemente seleccionada de entre quimioterapia, inmunoterapia y/o terapia antirretroviral altamente activa (TARAA).
5
9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, que comprende además identificar y cuantificar el nivel de al menos un biomarcador que se selecciona de una lista que consiste en: proteína C reactiva, enzimas hepáticas, ferritina y
10 cualquiera de sus combinaciones, en una muestra aislada del sujeto antes y al menos 3 meses, preferiblemente 6 meses después del tratamiento, donde un aumento del nivel de los valores de proteína C reactiva, enzimas hepáticas y/o ferritina en la muestra posterior al tratamiento son indicativos de una respuesta desfavorable al tratamiento con radioterapia.
15
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, donde el sujeto es seropositivo al virus de inmunodeficiencia humana (VIH).
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10 donde la muestra se
20 selecciona de una lista que consiste en: sangre, suero, líquido cerebroespinal, biopsia cerebral y soluciones celulares.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11 donde el sujeto es un humano.



Fig. 1

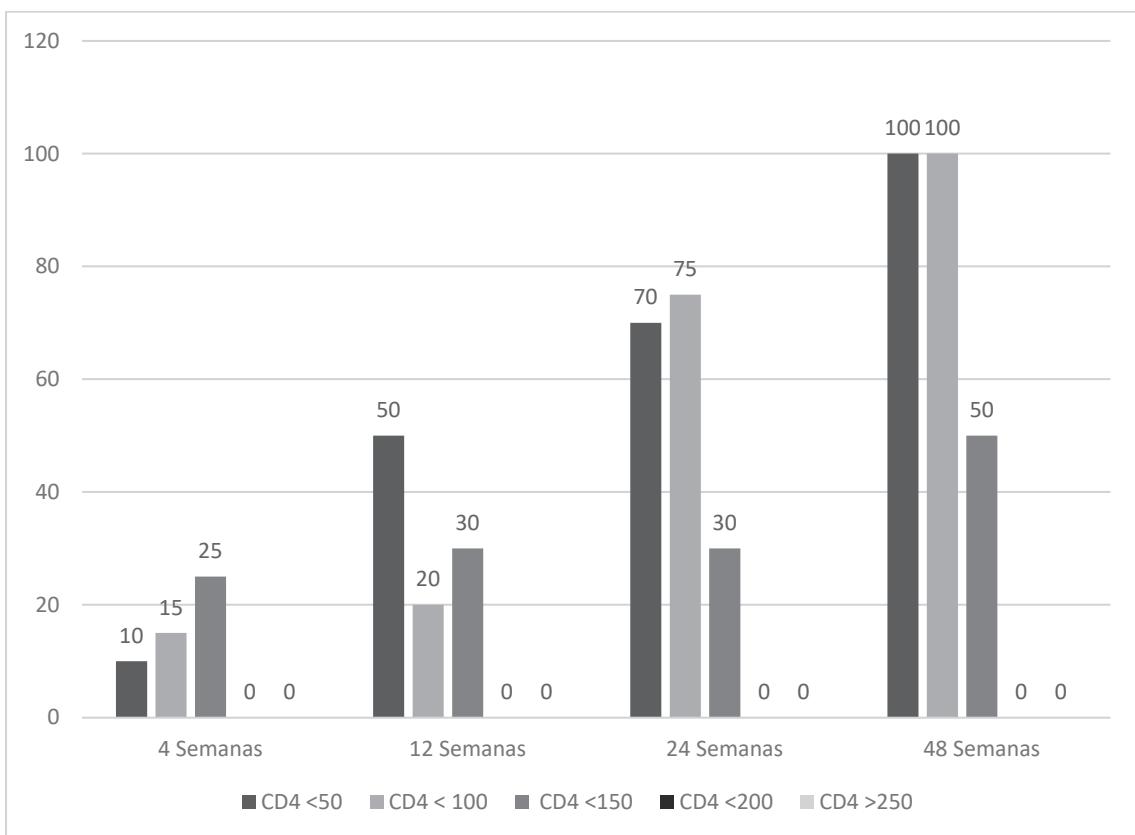


Fig. 2

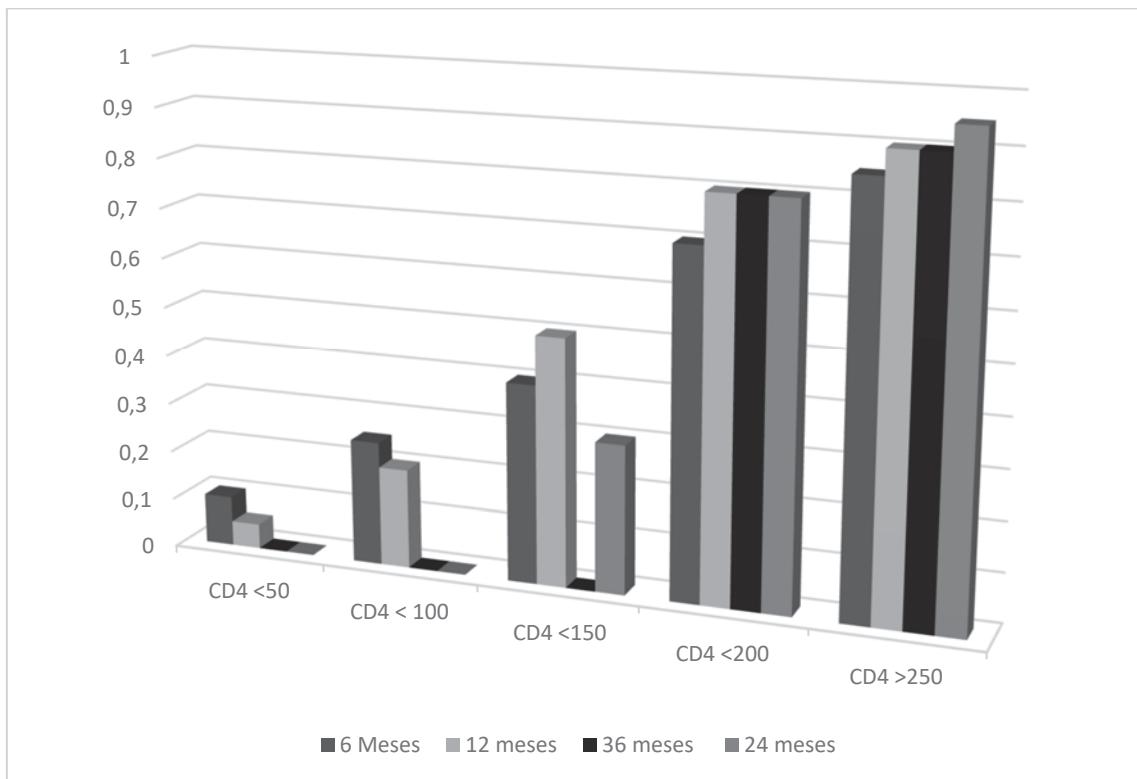


Fig. 3



②1 N.º solicitud: 202031080

②2 Fecha de presentación de la solicitud: 28.10.2020

③2 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤1 Int. Cl.: **C12N5/0783 (2010.01)**
A61N5/00 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	66	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X		HOFFMANN, C. et al. Survival of AIDS patients with primary central nervous system lymphoma is dramatically improved by HAART-induced immune recovery. AIDS. Noviembre 2001, Vol. 15, Nº 16, páginas 2119-2127. ISSN 0269-9370. Especialmente: página 2121, columna derecha; página 2124; página 2125, columna derecha; figura 1b.	1, 3-6, 8, 10-12
X		SKIEST D. J. et al. Survival is prolonged by highly active antiretroviral therapy in AIDS patients with primary central nervous system lymphoma. AIDS. Agosto 2003, Vol. 17, Nº 12, páginas 1787-1793. ISSN 0269-9370. Especialmente apartado "Discussion".	1, 3-6, 8, 10-12
X		NEWELL, M. E. et al. Human immunodeficiency virus-related primary central nervous system lymphoma - Factors influencing survival in 111 patients. Cancer. Junio 2004, Vol. 100, Nº 12, páginas 2627-2636. ISSN 0008-543X (impreso). Especialmente página 2631, columna izquierda, página 2635.	1, 3-6, 8, 10-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº: 1, 3-6, 8, 10-12

Fecha de realización del informe 08.07.2021	Examinador E. Relaño Reyes	Página 1/2
--	-------------------------------	---------------

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

C12N, A61N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, XPESP, INSPEC, COMPDX, NPL, XPOAC