

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 914 452**

(21) Número de solicitud: 202031229

(51) Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

(12)

SOLICITUD DE PATENTE

A1

(22) Fecha de presentación:

10.12.2020

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

10.06.2022

(71) Solicitantes:

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

(72) Inventor/es:

ALVAREZ PINZÓN, Andrés;
ALONSO PEÑA, José Ramón;
DÍAZ LÓPEZ, David;
WERUAGA PRIETO, Eduardo;
MICHELLE, Jack y
VALERIO, José

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

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

(57) Resumen:

Biomarcador de linfoma primario del sistema nervioso central, sus usos y métodos.

La invención hace referencia a biomarcadores para una enfermedad relacionada con el sistema nervioso central, en particular el Linfoma Primario del Sistema Nervioso Central, sus usos y métodos de uso para diagnóstico y/o predicción de respuesta al tratamiento. Así, la invención pertenece al campo de la medicina y de instrumentos de medición de muestras biológicas.

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

5

La invención se refiere a biomarcadores relacionados con una enfermedad relacionada con el sistema nervioso central, sus usos y métodos para su diagnóstico y/o pronóstico. Así, la invención pertenece al campo de la medicina y de instrumentos de medición de muestras biológicas.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Los linfomas primarios del sistema nervioso central (LPSNC) son tumores agresivos tanto en pacientes con sida como en personas no infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). Entre 1980 y 1989 la frecuencia de estas neoplasias se incrementó en 9 veces, con una incidencia absoluta de 4,7 casos/1.000 personas/año en los pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Esta población tiene 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 patologías marcadoras del SIDA. Se trata de tumores de gran malignidad y multicéntricos, que muestran predilección por la localización en ganglios basales, cuerpo calloso, tálamo, sustancia blanca periventricular y región subependimaria. Los tipos histológicos predominantes no difieren de los observados en los pacientes inmunocompetentes, predominando los tumores de células grandes, inmunoblásticos y centroblásticos.

La mayoría de los LPSNC en pacientes seropositivos son derivados de células B. El LPSNC derivado de células T es excepcionalmente raro y altamente maligno. Estos tumores aparecen característicamente con una lesión de masa focal. Como no hay hallazgos clínicos o radiográficos distintivos para LPSNC, en pacientes serológicamente positivos a VIH se debe confirmar el inmunofenotipo de LPSNC en la biopsia tumoral cerebral, en la que se aísla el VIH, siguiéndose el análisis histopatológico y genotípico para detectar la monoclonalidad. Este protocolo de diagnóstico sigue siendo el estándar de oro, el procedimiento más adecuado según el estado actual del conocimiento sobre

estos tumores. Además, después de la confirmación de LPSNC y consecuente tratamiento por radioterapia, no existe un método para 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 5 de las células tumorales y su apariencia no neoplásica en el gadolinio. Así son necesarios biomarcadores y métodos para uso de dichos biomarcadores que permitan el diagnóstico de LPSNC y que permitan evaluar la respuesta al tratamiento, preferiblemente de modo no invasivo.

10 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Los inventores han determinado que la carga viral del virus de inmunodeficiencia adquirida (VIH) y opcionalmente el virus Epstein-Barr (VEB), puede ser usada como un biomarcador del diagnóstico y/o del pronóstico del linfoma primario del sistema nervioso 15 central (LPSNC). Dicho uso permite el diagnóstico de LPSNC y, además, permite la predicción de la respuesta del sujeto al tratamiento con radioterapia, sin la necesidad de obtención de imágenes radiológicas consecutivas, disminuyendo la exposición del paciente a radiación y el coste del tratamiento de este tipo de cáncer.

20 Así, un primer aspecto de la invención hace referencia al uso *in vitro* del nivel de un biomarcador en una muestra aislada de líquido cefalorraquídeo (LCR) de un sujeto, donde el biomarcador es la carga viral del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), para el diagnóstico de linfoma primario del sistema nervioso central (LPSNC), de ahora en adelante el uso diagnóstico de la invención. En una realización preferida del uso 25 diagnóstico de la invención además comprende el uso como biomarcador de la presencia o ausencia del virus Epstein Barr (VEB) en la muestra aislada del LCR del sujeto.

Adicionalmente, el nivel de la carga viral del VIH en un muestra aislada de líquido 30 cefalorraquídeo de un sujeto permite indicar cómo reaccionará el sujeto al tratamiento por radioterapia y es predictivo de una posible recaída.

Así, otro aspecto de la presente invención hace referencia al uso *in vitro* del nivel de un biomarcador en una muestra aislada de líquido cefalorraquídeo de un sujeto que padece 35 de LPSNC, donde el biomarcador es la carga viral del virus de la inmunodeficiencia

humana (VIH), para predecir la respuesta del sujeto al tratamiento con radioterapia, de ahora en adelante el uso predictivo de la invención.

El término “biomarcador”, tal y como se usa en la presente descripción se refiere a una 5 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, particularmente de la susceptibilidad al tratamiento. El biomarcador de la invención se puede detectar y/o cuantificar, es decir, se puede únicamente detectar su presencia o bien se pueden detectar y/o cuantificar cambios en la cantidad o 10 concentración del mismo.

En la presente invención el biomarcador es la carga viral del “virus de la inmunodeficiencia humana” o “VIH” y la presencia/ausencia del “virus Epstein-Barr” o “VEB”. Así la expresión “el nivel de un biomarcador” en la presente descripción hace 15 referencia a la carga viral de VIH presente en una muestra aislada de líquido cefalorraquídeo de un sujeto. La expresión “presencia/ausencia” en la presente descripción hace referencia a la identificación o detección de las partículas virales, ácidos nucleicos y/o anticuerpos que indican la presencia de VEB. El VIH y el VEB en una muestra aislada se pueden identificar o identificar y cuantificar por variadas técnicas 20 que detectan el material genético de los virus o antígenos virales. Dichas técnicas se describen más abajo en esta descripción siendo dichas descripciones igualmente aplicables a los usos de la invención.

Así, la carga viral de VIH se puede determinar al medir los niveles de los ácidos 25 ribonucleicos (ARN) del virus o los niveles de los ácidos desoxirribonucleicos complementarios (ADNc) que están presentes en una muestra o se obtienen de una muestra y que se pueden cuantificar por unidades molares por volumen (i.e., milimoles/mililitro), por unidades de masa por volumen (i.e., miligramos/mililitro) o por números absolutos de unidades por volumen (copias/mililitro). De modo similar, la 30 presencia de VEB se puede determinar al detectar la presencia/ausencia de ácidos desoxirribonucleicos (ADN) de genoma del virus que están presentes en una muestra o se obtienen de una muestra. Además, se puede detectar la presencia/ausencia de antígenos de las moléculas o proteínas o estructuras moleculares o proteicas virales de VEB a través del uso de anticuerpos específicos para dichos antígenos. Métodos para 35 cuantificar la carga viral de VIH y/o la presencia/ausencia de VEB son descritos más

abajo en esta descripción en relación a los métodos de la invención, siendo igualmente válidos en relación a los usos de la invención.

Así, en una realización preferida del uso diagnóstico de la invención o del uso predictivo 5 de la invención, la determinación de la carga viral del VIH comprende medir el nivel de ADNc, o un fragmento del mismo, o el nivel de ARN, o un fragmento del mismo, del genoma de VIH (números de acceso NCBI: NC_001722.1 y NC_001802.1, versión del 13/08/2018). En otra realización preferida del uso diagnóstico de la invención, la determinación de la presencia/ausencia de VEB comprende detectar la existencia de 10 antigenos de las proteínas de VEB o detectar la presencia de ADN, o un fragmento de ADN, del genoma de VEB (número de acceso NCBI: NC_009334.1, versión del 13/08/2018).

En la presente invención se entiende por “fragmento de ARN”, “fragmento de ADN” o 15 “fragmento de ADNc” a la secuencia de nucleótidos del genoma del VIH o VEB que comprenden uno o más nucleótidos ausentes de los extremos 3’ y/o 5’ con respecto a la secuencia de nucleótidos completa de los genomas.

En la presente invención se entiende por “antígeno” a una molécula, proteína, estructura 20 molecular o proteíca en la superficie o el exterior del virus y que permite la unión de un anticuerpo específico para dicho antígeno, permitiendo así la indentificación de la presencia de la entidad a la cual pertenece el antígeno. En la presente invención el antígeno permite determinar la presencia o ausencia del virus VEB.

25 El término “anticuerpo” en la presente invención se refiere a una glicoproteína del tipo gammaglobulina que forma parte del sistema inmunitario humorral que se une de forma específica a un antígeno. El término “anticuerpo”, tal como aquí se utiliza, incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos recombinantes de anticuerpos, combibodies, fragmentos Fab y scFv de anticuerpos, así como los dominios 30 de unión a ligando.

El término “virus de la inmunodeficiencia humana” o su sigla “VIH” tal como se usa en 35 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. El VIH causa la infección por VIH, la cual con el

tiempo provoca el “síndrome de inmunodeficiencia adquirida” conocido también por sus siglas “SIDA”. La aparición 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 5 funcionamiento, la persona infectada va cayendo gradualmente en una situación de inmunodeficiencia.

El término “virus Epstein-Barr” o su sigla “VEB”, tal como se usa en la presente invención, hace referencia a un virus de la familia herpesvirus, que contiene información 10 genética bajo la forma de doble hélice de ácido desoxirribonucleico (ADN) protegido por una envoltura de membrana lipídica. La infección por VEB es una de las infecciones más comunes en humanos, y afecta a los linfocitos B. La infección por VEB está asociada a varias enfermedades y trastornos, como la mononucleosis infecciosa, linfomas de Hodgkin, linfoma de Burkitt, y en casos de asociación con el VIH, 15 enfermedades como leucoplasia vellosa oral.

Tanto el uso diagnóstico de la invención como el uso predictivo de la invención se hacen sobre una muestra aislada de líquido cefalorraquídeo de un sujeto, donde dicha muestra es obtenida por métodos y procedimientos bien establecidos y conocidos para el experto 20 en la materia. 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 a la carga viral de VIH y VEB en una muestra de líquido cefalorraquídeo.

25 El término “líquido cefalorraquídeo” tal como se usa en la presente descripción se refiere a un líquido de color transparente, que baña el encéfalo y la médula espinal. Existen diferentes formas de obtener una muestra de líquido cefalorraquídeo. La punción cisternal o suboccipital implica colocar una aguja debajo del hueso occipital (parte 30 posterior del cráneo). Para la obtención de LCR lumbar, una punción lumbar, comúnmente llamada punción raquídea, es el método más común. Para la obtención de LCR ventricular, se puede emplear la punción ventricular en la que se perfora un orificio en el cráneo y se introduce una aguja directamente en uno de los ventrículos del cerebro, o bien se puede recoger el LCR ventricular desde una sonda, como una derivación o un 35 drenaje ventricular.

Como hemos señalado anteriormente, los usos de la presente invención se hacen en muestras aisladas de un sujeto. En una realización preferida del uso diagnóstico de la invención o del uso predictivo de la invención, el sujeto es un ser humano de cualquier 5 sexo, edad o raza.

En la presente invención se intiende por "diagnóstico" al procedimiento por el cual se determina que un sujeto sufre o padece de una determinada enfermedad, entidad nosológica, síndrome, o cualquier condición de salud-enfermedad, mediante el análisis 10 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 LPSNC, y el parámetro clínico es la carga viral de VIH y/o VEB en una muestra de líquido cefalorraquídeo aislada de un sujeto.

15 La expresión "linfoma primario del sistema nervioso cerebral" o sus siglas "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). LPSNC deriva normalmente de células B, y en casos más raros deriva de células T, del sistema inmunitario. Es un linfoma no Hodgkin excepcionalmente 20 raro y altamente maligno.

La expresión "predecir la respuesta del sujeto al tratamiento con radioterapia" tal como se usa en la presente invención hace referencia al procedimiento por el cual se determina si un sujeto al que se le ha diagnosticado LPSNC tendrá una respuesta 25 positiva o negativa al tratamiento por radioterapia. Esta determinación, en el caso de respuesta negativa al tratamiento, permite recomendar tratamientos alternativos o concomitantes a la radioterapia como, por ejemplo, terapia antiviral de alta actividad (TARAA).

30 El término "tratamiento", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a combatir los efectos causados como consecuencia de la enfermedad o condición patológica de interés en un sujeto (preferentemente un mamífero y, más preferentemente, un humano), incluyendo:

- 35 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.

El término "radioterapia" tal como se utiliza en la presente invención se refiere a múltiples 5 tipos de radioterapia, incluida la radioterapia interna y externa, la radioinmunoterapia 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 implica el uso de rayos X o rayos gamma. En una realización preferida del uso de la invención el 10 tratamiento es por radiocirugía.

En la presente invención el término "tratamiento por radiocirugía" hace referencia a una técnica radioquirúrgica, también denominada radiocirugía estereotáctica, donde se utilizan múltiples rayos de radiación enfocados con precisión para tratar tumores y otros 15 problemas en el cerebro, el cuello, los pulmones, el hígado, la columna vertebral y otras partes del cuerpo. 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. Las células afectadas pierden la capacidad de reproducirse, lo que hace que los tumores se reduzcan o desaparezcan.

20 De forma análoga a los usos descritos en párrafos anteriores, en la presente invención también se contemplan los métodos dirigidos tanto a diagnosticar LPSNC, como los dirigidos a predecir la respuesta de un sujeto al tratamiento de LPSNC por radioterapia.

25 Todas las definiciones anteriormente descritas para los aspectos anteriores y sus realizaciones preferidas son válidas para los aspectos referentes a métodos de la invención y sus realizaciones preferidas.

30 Otro aspecto de la invención hace referencia a un método *in vitro* para el diagnóstico de LPSNC en un sujeto, de ahora en adelante el método de diagnóstico de la invención, caracterizado por que comprende los siguientes pasos:

35 i) Identificar y cuantificar el nivel de un biomarcador, donde el biomarcador es la carga viral del VIH, en una muestra aislada de líquido cefalorraquídeo del sujeto, donde valores de más de 50 copias/ml del biomarcador son indicativos de padecer LPSNC.

En una realización preferida el método de diagnóstico de la invención además comprende:

- 5 ii) identificar la presencia o ausencia del virus VEB, donde la presencia de VEB en LCR es indicativo de LPSNC.

Otro aspecto de la invención hace referencia a un método *in vitro* para la predicción de la respuesta al tratamiento del LPSNC mediante radioterapia en un sujeto, de ahora en adelante el método de predicción de la invención, caracterizado por que comprende los 10 siguientes pasos:

- 15 i) determinar el nivel de un biomarcador, donde el biomarcador es la carga viral del VIH, en una muestra aislada de líquido cefalorraquídeo del sujeto al menos 30 días, preferiblemente 60 días, después del tratamiento con radioterapia, donde valores de más de 1000 copias/ml del biomarcador son indicativos de una respuesta desfavorable al tratamiento mediante radioterapia.

En una realización preferida del método de predicción de la invención si la respuesta es desfavorable es necesaria la combinación de radioterapia con una terapia adyuvante, preferiblemente la terapia adyuvante es la terapia antiviral de alta actividad (TARAA).

- 20 El tratamiento del LPSNC mediante radioterapia implica la presencia de lesiones cerebrales en el sujeto. Así, en una realización preferida el método de predicción se realiza en muestras aisladas de sujetos que presentan lesiones cerebrales.

- 25 La expresión "sujeto que presenta lesiones cerebrales" tal como se usa en la presente invención hace referencia a una persona que presenta anomalías, como lesiones tumorales, en su masa cerebral, las cuales son indicativas de padecer LPSNC. Estas lesiones se pueden identificar mediante imágenes de resonancia magnética.

- 30 La expresión "identificar y cuantificar el nivel de un biomarcador" de la etapa (i) del método de diagnóstico o método de predicción de la invención se refiere a cualquier procedimiento que posibilite la identificación de la presencia y la medida del biomarcador mencionado en la presente invención, es decir de la carga viral de VIH, en la muestra por la detección y/o determinación de la cantidad del ARN, o un fragmento del ARN, 35 ADNc o un fragmento del ADNc, del genoma de VIH (números de acceso NCBI:

NC_001722.1 y NC_001802.1, versión del 13/08/2018). Así, en una realización preferida del método de diagnóstico la invención o del método de predicción de la invención la etapa (a) se lleva a cabo mediante cuantificación de los niveles de ARN o del ADNc

- 5 La expresión “identificar la presencia o ausencia de VEB” en la presente descripción hace referencia a la identificación o detección de las partículas virales, ácidos nucleicos virales y/o anticuerpos que indican la presencia de VEB, por cualquier procedimiento que permita dicha identificación del biomarcador VEB en la muestra.
- 10 Los términos “fragmento de ARN”, “fragmento de ADNc”, “antígeno” y “anticuerpos” se han definido anteriormente en relación al uso de diagnóstico de la invención y al uso de respuesta de la invención y dichas definiciones son válidas para el presente aspecto.

15 Si la identificación y cuantificación o la identificación de los biomarcadores de la presente invención va a realizarse a partir del ARN, ADN o ADNc, primero es necesaria la extracción del ácido nucleico de la muestra aislada del sujeto. Para este fin, 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 aislar y preparar los ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos se extraen mediante 20 procedimientos conocidos para el experto en la materia y disponibles comercialmente.

25 Una vez extraído los ácidos nucleicos se procede a realizar la cuantificación o identificación de los biomarcadores. Prácticamente cualquier método convencional puede ser utilizado dentro del marco de la invención para identificar o indentificar y cuantificar los niveles de ARN, ADN o ADNc de los biomarcadores. En una realización preferida del método de diagnóstico de la invención o del método de predicción de la invención la cuantificación de los niveles de ARN se lleva a cabo por reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR).

30 Análogamente, los niveles del ADNc correspondiente al ARN del biomarcador también pueden ser identificados y cuantificados mediante el empleo de técnicas convencionales; en este caso, el método de la invención incluye una etapa de síntesis del correspondiente ADNc mediante transcripción inversa (RT) del ARN correspondiente, seguida de amplificación y cuantificación del producto de la 35 amplificación de dicho ADNc. Métodos convencionales de cuantificar los niveles del

biomarcador pueden encontrarse, por ejemplo, en Sambrook *et al.* citado *ad supra*. En una realización preferida, la identificación y cuantificación de los niveles del biomarcador se realiza mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa, un array de ADN o ARN, o RNA-Seq o Secuenciación Masiva aplicada al estudio de ARN o ADN.

Los métodos referidos anteriormente para la identificación y cuantificación son igualmente válidos para la identificación de la presencia del biomarcador VEB. Así, en una realización preferida del método de diagnóstico, la identificación del biomarcador VEB se hace por PCR, secuenciación o secuenciación masiva.

Si la identificación del biomarcador VEB va a realizarse a partir de los antígenos asociados al biomarcador, entonces la muestra aislada del sujeto podrá tener que ser tratada para extraer los antígenos. Métodos para extraer o aislar antígenos son conocidos para el experto en la materia y están disponibles comercialmente.

Los antígenos pueden ser identificados mediante cualquier método convencional que permita detectar dicha molécula/proteína o estructura molecular/proteíca en una muestra de un sujeto. A modo ilustrativo, no limitativo, los antígenos pueden identificarse, por ejemplo, mediante el empleo de anticuerpos con capacidad de unirse al antígeno diana y la posterior identificación de los complejos formados.

Los anticuerpos que se emplean en estos ensayos pueden estar marcados o no. Los términos "marca" o "marcado" se refieren a una composición capaz de producir una señal detectable indicativa de la presencia de la molécula marcada. Ejemplos ilustrativos de marcadores adecuados incluyen, sin limitación, radioisótopos, cromóforos de nucleótidos, enzimas, sustratos, moléculas fluorescentes, restos quimioluminiscentes, partículas magnéticas, restos bioluminiscentes, y similares. Como tal, una marca es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos. Existe una amplia variedad de ensayos conocidos que se pueden utilizar en la presente invención, que utilizan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); entre estas técnicas se incluyen el Western-blot o transferencia Western, ELISA (enzimoinmunoensayo RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (enzimoinmunoensayo competitivo), DAS-ELISA (ELISA tipo sándwich con doble

anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el empleo de biochips o microarrays de proteínas que incluyan anticuerpos específicos o ensayos basados en precipitación coloidal en formatos tales como dipsticks. Otras maneras para detectar y cuantificar proteínas, incluyen técnicas de cromatografía de 5 afinidad, ensayos de unión a ligando, espectrometría de masas, etc. Cuando se usa un método inmunológico, se puede usar cualquier anticuerpo o reactivo que se sabe se une a la proteína diana con alta afinidad para detectar la cantidad de la misma. Ejemplos de anticuerpos o reactivos con capacidad de unirse a dicha la proteína diana incluyen, sin limitarse a ninguno concreto, sueros policlónicos, sobrenadantes de hibridomas o 10 anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, Fv, Fab, Fab' y F(ab')2, scFv, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y anticuerpos humanizados.

La expresión “respuesta desfavorable al tratamiento mediante radioterapia” tal como se usa en la presente invención hace referencia al hecho de que los sujetos que sigan el 15 tratamiento tienen un 70% de probabilidad de tener una recaída de la enfermedad, y de que las lesiones tumorales reaparezcan. Esta determinación, en el caso de respuesta negativa al tratamiento, permite indicar tratamientos anteriores o concomitantes con la radioterapia, por ejemplo, terapia antiviral de alta actividad (TARAA). Como entenderán los expertos en la materia, tal determinación, aunque se prefiere que sea, normalmente 20 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 tienen predisposición a recaer de la enfermedad. 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 25 sin limitarse, a la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor de 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 30 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 respuesta desfavorable al tratamiento mediante radioterapia 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 35 90% de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.

La expresión “respuesta favorable a tratamiento mediante radioterapia” hace referencia a que los sujetos que cumplen los criterios tienen una alta probabilidad de no recaer en la enfermedad y de que no aparezcan nuevas lesiones en el cerebro. Como entenderán 5 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 sujetos se puedan identificar como que tienen predisposición a recaer de la enfermedad. La cantidad que es estadísticamente significativa puede ser establecida por un experto 10 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 15 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 20 correctamente la respuesta favorable al tratamiento con radioterapia de forma diferencial 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.

En otra realización preferida el sujeto es un ser humano, de cualquier sexo, edad o raza.

25 Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

EJEMPLOS

30 Materiales y Métodos

El LCR y la sangre de cada paciente se extrajeron siempre el mismo día. Se obtuvo un total de 3 a 15 ml de LCR (mediana = 12 ml) mediante punción lumbar con una aguja atraumática. Dentro de los 30 minutos posteriores a la punción lumbar, las muestras de 35 LCR se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente para separar el componente celular del sobrenadante libre de células; los sedimentos

- celulares se almacenaron a -80 °C o se extrajo inmediatamente el ARN. Se extrajo sangre (10 ml) en tubos con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC – sigla de la expresión en inglés) usando Lymphoprep®, se conservaron sus ARN y se congelaron a -80°C. Las muestras de LCR
- 5 se analizaron de forma rutinaria para establecer los posibles recuentos celulares. El análisis cuantitativo (índice de IgG) y cualitativo (bandas oligoclonales) de la síntesis de IgG intratecal después de la punción lumbar se realizó utilizando métodos estándar (Gluxon and Thompson, Ann Clin Biochem 1990;27:436- 443).
- 10 El ARN total se extrajo de las células del LCR y PBMC utilizando el micro kit AMBION RNAqueous® (Life Technologies), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, incluida la del ADN genómico. El ARN total de PBMC se cuantificó y se sometieron a transcripción inversa 200 ng para cada muestra. Debido al rendimiento de ARN variable de las células del LCR, se transcribió de forma inversa todo el volumen (15 µl) de ARN
- 15 extraído de cada muestra de LCR. La transcripción inversa (RT) se realizó utilizando el kit de transcripción inversa de alta capacidad con inhibidor de RNasa (Life Technologies). El ADNc resultante se diluyó hasta un volumen final de 50 µl y se dividió en cuatro alícuotas de 12,5 µl.
- 20 Los niveles de ARN del VIH se midieron en LCR y plasma libre de células utilizando Cobas TaqMan RealTime HIV-1 (versión 1 o 2; Hoffmann-La Roche), o Abbott RealTime HIV-1 (Abbot Laboratories) en hospitales locales. Para establecer una uniformidad y garantizar la sensibilidad y especificidad en el análisis de las muestras, se utilizó 50 copias/mL como límite inferior de detección cuantitativa en este análisis. Las mediciones
- 25 de sangre y LCR emparejadas utilizaron el mismo ensayo. Las mediciones de neopterina (marcador de infección viral o bacteriana) en sangre y LCR emplearon inmunoensayos disponibles comercialmente (BRAHMS Aktiengesellschaft, Hennigsdorf, Alemania) y se realizaron en una clínica.
- 30 Pacientes
Recopilamos de forma prospectiva casos de pacientes infectados por el VIH que presentaban signos neurológicos de linfoma y/o síntomas en el contexto de la supresión del ARN del VIH en plasma y se sometieron a evaluación, incluidos estudios de LCR. La infección por VIH se confirmó por análisis de ARN viral en las células PBMC (células mononucleares de sangre periférica).
- 35

Las muestras de LCR y de plasma concurrentes fueron obtenidas por el equipo clínico primario con fines de diagnóstico o en el contexto de estudios de investigación. Se obtuvieron resonancias magnéticas cerebrales clínicas antes de la punción lumbar en 5 escáneres locales variados de 1,5 Tesla.

Resultados

Los estudios realizados han demostrado que la mayoría de los sujetos con linfoma asociado al VIH se encuentran en las etapas inmunosupresoras terminales de la 10 enfermedad, lo que sugiere que las respuestas inmunitarias intactas pueden proteger el Sistema Nervioso Central (SNC) del linfoma.

Una forma más directa de medir la eficacia de las respuestas inmunitarias del SNC para controlar la replicación del VIH en el cerebro es medir la carga viral en el LCR.

15 Entre junio de 2016 y diciembre de 2019, 42 pacientes con infección por VIH crónica pero bien controlada y estado inmunológico conservado presentaron nuevos síntomas neurológicos y se reconoció que cumplían con los criterios de linfoma primario del SNC (LPSNC). Los pacientes experimentaron una variedad de síntomas neurológicos que 20 incluyen deterioro cognitivo, sensorial y motor. El inicio fue más a menudo subagudo, el deterioro varió en gravedad y las anomalías progresaron con el tiempo. En general, los síntomas neurológicos reflejan un nivel de debilitamiento que fue significativo e involucró una variedad de dominios funcionales. La mediana de tiempo desde el diagnóstico de VIH fue de 19,2 años (rango, 11,1-23,2 años). En el momento del episodio neurológico, 25 los pacientes habían estado en un régimen estable durante una mediana de 26 meses (rango, 12-65 meses).

30 Se encontraron células en el LCR en un número superior al normal (pleocitosis) y anomalías bioquímicas en todos los pacientes. El nivel medio de proteína en el LCR fue 136 (rango, 54-178). Se observó pleocitosis en LCR en todos los pacientes, con una mediana de 19,4 células/mm³ (rango 0-200 células/mm³). Todas las muestras fueron negativas para los estudios de ADN de bacterias, hongos y virus John Cunningham (JC) para leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP). El LCR de 36 pacientes fue positivo para Epstein-Barr (EBV). Aunque el virus de Epstein-Barr (EBV) estuvo 35 presente en el líquido cefalorraquídeo de una proporción de casos de linfoma primario

de sistema nervioso central, la forma en que el virus contribuye a la patogénesis de esta enfermedad sigue estando poco definida. De los estudios de otros cánceres asociados con el VEB se desprende claramente que el virus no suele ser suficiente para el desarrollo del tumor y que se requieren otros cofactores oncogénicos. En este estudio

5 por medio de la invención, la forma replicativa del VEB se correlacionó con un aumento significativo de la mortalidad y contribuyó a la inflamación crónica como un cofactor oncogénico potencial en esta neoplasia, al igual que en la aparición de nuevas lesiones tumorales. El linfoma primario de sistema nervioso central asociado al EBV de los pacientes inmunocomprometidos comparte patrones de latencia del VEB similares (tipo

10 II o III). Utilizando el método de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa, se encontró que muchos pacientes eran EBV positivos y que el linfoma de sistema nervioso central se asemejó a características compartidas de la latencia de EBV tipo III (Brink *et al.*, Ann Clin Biochem 1990;27:436- 443).

15 Al igual que en otros estados de inmunodeficiencia, la inmunosupresión relacionada con la enfermedad e inducida por la terapia en el linfoma de células T puede conducir a una linfoproliferación prominente de células B y T asociada a EBV y a neoplasias de células B y T EBV +.

20 ARN del VIH en LCR y plasma

Todos los pacientes tenían replicación del VIH en el LCR en la evaluación inicial, con una mediana de 5800 copias/ml (rango, 4200-21090 copias/ml). La mediana de la carga viral plasmática fue de 19000 copias/ml (rango, <50-19802 copias / ml). El ARN del VIH en LCR fue al menos 1 log más alto que el ARN del VIH en plasma.

25 Cambios después del tratamiento

26 de 42 pacientes demostraron una mejoría clínica después del régimen de Radiocirugía por *Gamma Knife* (GKRS, por sus siglas en inglés) y terapia antirretroviral (TAR). Diecisésis pacientes, todos con carga viral por encima de 1000 copias/ml, no

30 mejoraron. De estos diecisésis pacientes, se dispuso de LCR de seguimiento y se demostró un aumento de los niveles de ARN del VIH en el LCR en una mediana de 62 días después de la GKRS. En 8 casos, la discordancia entre el LCR y el plasma se resolvió a los seis meses de seguimiento; en 2 casos persistió la discordancia a menor nivel (1300 copias / mL en LCR); las anomalías de estos pacientes no mejoraron

35 después de 294 días de tratamiento y comenzaron una terapia retroviral altamente

activa (TARAA).

- A los 90 días, la resonancia magnética de los 26 pacientes que mejoraron mostró resolución de la mayoría de las lesiones focales. De manera similar, un paciente con 5 carga viral superior a 1000 copias/ml tenía hiperintensidades persistentes de la sustancia blanca difusa en la resonancia magnética a los 180 días, con una disminución significativa posterior de estas anomalías a los 360 y 540 días de seguimiento después de la terapia TARAA.
- 10 Los hallazgos de la resonancia magnética fueron consistentes entre los pacientes. Las hiperintensidades de la sustancia blanca en las imágenes ponderadas en T2 y FLAIR sugieren un proceso inflamatorio generalizado compatible con el crecimiento tumoral y la incidencia de lesiones tumorales, característica de aquellos con mayor carga viral del VIH.
- 15
- #### Conclusión
- Se detectaron 42 casos de ARN del VIH en LCR elevado en el contexto de supresión plasmática en pacientes con infección por VIH, con control plasmático a largo plazo y recuentos de células T CD4+ que indican un estado inmunológico no conservado en el 20 momento en que se observaron los síntomas neurológicos del LPSNC. Estos casos demuestran un fenómeno único pero clínicamente importante de la carga viral del VIH en el LCR utilizado como biomarcador de la susceptibilidad tumoral a la radiocirugía con signos y síntomas neurológicos incidentes en pacientes con infección por VIH y LPSNC.
- 25 La comparación de los resultados de la resonancia magnética en el momento de la presentación y el seguimiento a corto y largo plazo sugiere que una carga viral de más de 1000 copias/ml se asocia con el crecimiento tumoral y una menor susceptibilidad del tumor a la radiocirugía. Estos hallazgos en las imágenes pueden persistir después de la resolución de los síntomas, pueden crecer y/o pueden no resolverse por completo. Aún 30 así, la naturaleza de los nuevos hallazgos de imágenes de tumores en sujetos con una carga viral mayor a 1000 demuestra el uso del LCR como un biomarcador útil para el pronóstico y la incidencia de nuevas lesiones tumorales.

REIVINDICACIONES

1. Uso *in vitro* del nivel de un biomarcador en una muestra aislada de líquido cefalorraquídeo (LCR) de un sujeto, donde el biomarcador es la carga viral del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), para el diagnóstico de linfoma primario del sistema nervioso central (LPSNC).
5
2. Uso según la reivindicación 1, donde además comprende la presencia o ausencia del virus Epstein-Barr (VEB) en la muestra aislada de LCR del sujeto como biomarcador.
10
3. Uso *in vitro* del nivel de un biomarcador en una muestra aislada de líquido cefalorraquídeo de un sujeto que padece de linfoma primario del sistema nervioso central (LPSNC), donde el biomarcador es la carga viral del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), para predecir la respuesta del sujeto al tratamiento con radioterapia.
15
4. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde el sujeto es un humano.
20
5. Método *in vitro* para el diagnóstico de LPSNC en un sujeto, caracterizado por que comprende los siguientes pasos:
 - i) identificar y cuantificar el nivel de un biomarcador, donde el biomarcador es la carga viral del VIH, en una muestra aislada de líquido cefalorraquídeo del sujeto, donde valores de más de 50 copias/ml del biomarcador son indicativos de padecer LPSNC.
25
6. Método según la reivindicación 5 donde además comprende:
 - ii) identificar la presencia o ausencia del virus VEB, donde la presencia de VEB en LCR es indicativo de padecer LPSNC.
30
7. Método *in vitro* para la predicción de la respuesta al tratamiento del linfoma primario del sistema nervioso central (LPSNC) mediante radioterapia en un sujeto, caracterizado por que comprende los siguientes pasos:

- i) determinar el nivel de un biomarcador, donde el biomarcador es la carga viral del VIH, en una muestra aislada de líquido cefalorraquídeo de un sujeto al menos 30 días, preferiblemente 60 días, después del tratamiento con radioterapia, donde valores de más de 1000 copias/ml de VIH activo en LCR es indicativo de una respuesta desfavorable al tratamiento mediante radioterapia.
- 5
8. Método según la reivindicación 7, donde si la respuesta es desfavorable es necesaria la combinación con una terapia adyuvante, preferiblemente la terapia adyuvante a seguir es la terapia antiviral de alta actividad (TARAA).
- 10
9. Método según cualquier de las reivindicaciones 7 o 8 donde el sujeto presenta lesiones cerebrales.
- 15
10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9 donde el sujeto es un humano.



②1 N.º solicitud: 202031229

②2 Fecha de presentación de la solicitud: 10.12.2020

③2 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤1 Int. Cl.: **C12Q1/6886 (2018.01)**

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	56	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X		ANTINORI A et al. "Value of combined approach with thallium-201 single-photon emission computed tomography and Epstein-Barr virus DNA polymerase chain reaction in CSF for the diagnosis of AIDS-related primary CNS lymphoma". Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology,(1999), 31/01/1999, Vol. 17, Páginas 554 - 560, ISSN 0732-183X (Print), <DOI: pubmed:10080599>. Todo el documento	1-2, 4-6 y 10
X		ANTINORI A et al. "Epstein-Barr virus in monitoring the response to therapy of acquired immunodeficiency syndrome-related primary central nervous system lymphoma." Annals of neurology (1999), 31/01/1999, Vol. 45, Páginas 259 - 261, ISSN 0364-5134 (Print), <DOI: pubmed:9989631>. Todo el documento.	3, 7-9
A		DE ALMEIDA S M "Cerebrospinal fluid analysis in the HIV infection and compartmentalization of HIV in the central nervous system." Arquivos de Neuro-Psiquiatria (2015), 01/01/2015, Vol. 73, Páginas 624 - 629, ISSN 0004-282X (print) ISSN 1678-4227 (electronic), <DOI: doi:10.1590/0004-282X20150071 pubmed:26200059>. Todo el documento.	1-10
A		BREW B J et al. "Levels of human immunodeficiency virus type 1 RNA in cerebrospinal fluid correlate with AIDS dementia stage.. The Journal of infectious diseases (1997), 31/03/1997, Vol. 175, Páginas 963 - 966, ISSN 0022-1899 (Print), <DOI: pubmed:9086160>. Todo el documento	1-10
A		GUTIERREZ CATALINA et al. "Clinical utility of HIV viral load assessment in cerebral spinal fluid, a case report". Revista chilena de infectología, 30/11/2017, Vol. 35, Páginas 601 - 605, ISSN 0717-6341 (Electronic), <DOI: doi:10.4067/s0716-10182018000500601 pubmed:30725010>. todo el documento.	1-10

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:

Fecha de realización del informe 27.10.2021	Examinador M. Hernandez Cuellar	Página 1/1
--	------------------------------------	---------------