

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 315 040**

21 Número de solicitud: 200402864

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **22.11.2004**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.03.2009**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:  
**16.03.2009**

71 Solicitante/s: **Universidad de Cantabria  
Pabellón de Gobierno  
Av. de los Castros, s/n  
39005 Santander, Cantabria, ES**

72 Inventor/es: **León Serrano, Javier;  
Delgado Villar, María Dolores;  
Gutiérrez Cianca, Pilar;  
Albajar Molera, Marta;  
Richard Espiga, Carlos y  
Gómez Casares, Maite**

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Procedimiento para determinar la eficacia del tratamiento y el grado de progresión de la leucemia mieloide crónica mediante el uso de SPI-1/PU.1.**

57 Resumen:

Procedimiento para determinar la eficacia del tratamiento y el grado de progresión de la leucemia mieloide crónica mediante el uso de SPI-1/PU.1 que consiste en la determinación de mRNA o de proteína del gen SPI-1/PU.1, en muestras de células de sangre o médula ósea de pacientes de LMC y su comparación con muestras de sujetos sanos o del mismo paciente tras el tratamiento antileucémico. Niveles de mRNA o proteína de SPI-1/PU.1 altos o comparables a los de sujetos sanos son indicadores de respuesta al tratamiento. La presencia de SPI-1/PU.1 es indicador de respuesta al tratamiento y recuperación de hematopoyesis normal. Por el contrario, una expresión reducida es indicador de persistencia de la leucemia y mal pronóstico.

ES 2 315 040 A1

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para determinar la eficacia del tratamiento y el grado de progresión de la leucemia mieloide crónica mediante el uso de *SPI-1/PU.1*.

## Sector de la técnica

Sector de la invención: Biomedicina. Marcadores de pronóstico de la enfermedad y como guía de los profesionales médicos para seleccionar o evaluar los tratamientos de leucemia mieloide crónica.

## Antecedentes

El factor de transcripción *SPI-1/PU.1* es una proteína de la familia ETS, que juega un papel clave en la hematopoyesis. *SPI-1/PU.1* regula la expresión de genes importantes para la diferenciación mieloide y linfoide tales como los receptores de los factores de crecimiento de macrófagos, de granulocitos, la integrina CD11b y mieloperoxidasa, así como su propia expresión. También regula la expresión de genes de inmunoglobulinas (Friedman, 2002).

Diversos estudios indican un papel fundamental de Spi-1 en el compromiso de las células pluripotentes hacia distintos linajes hematopoyéticos. Los datos con ratones deficientes en *SPI-1/PU.1* indican que esta proteína se requiere para el desarrollo tanto de la serie mieloide (granulocitos y monocitos) como linfoide (Lloberas *et al.*, 1999). En progenitores eritroides la expresión normal de Spi-1 es baja y su sobreexpresión desregulada da lugar a eritroleucemia.

La leucemia mieloide crónica (LMC) es una de las leucemias más frecuentes. La LMC es una enfermedad bifásica. Primero cursa con una *fase crónica*, que suele durar 2-4 años. En esta fase la enfermedad es relativamente benigna, pero desemboca en todos los casos en una *crisis blástica*, que conduce a la muerte normalmente en menos de un año, a no ser que se someta al paciente a un trasplante de médula ósea en su fase crónica. Esta fase es frecuentemente precedida de una fase acelerada, con características hematológicas intermedias entre la crónica y la blástica. Desde el punto de vista celular la fase crónica se caracteriza por un número elevado de granulocitos maduros, mientras que en la fase blástica se acumulan formas blásticas, normalmente de serie mieloide, y con menor frecuencia, linfoide. Junto con la linfocítica crónica es la leucemia más frecuente en gente mayor de 50 años, aunque de mucho peor pronóstico. EL marcador molecular de la LMC es la proteína Bcr-Abl. Es una proteína de fusión con actividad proteína-tirosina quinasa desregulada, debido a una traslocación que yuxtapone los cromosomas 19 y 22 y da a lugar al cromosoma Filadelfia, marcador citogenética de la LMC (Deininger *et al.*, 2000; Faderi *et al.*, 1999; Goldman and Melo, 2003). El Bcr-Abl está ya presente en la fase crónica, y los mecanismos que gobiernan la transición de la fase crónica a la crisis blástica son desconocidos. Hasta ahora no se ha identificado un cambio molecular común o mayoritario en las crisis blásticas respecto a la fase crónica.

Históricamente, la LMC se ha tratado con busulfán e hidroxiurea, desde los años 80, con interferón  $\alpha$ , que suelen inducir remisión hematológica (Silver *et al.*, 1999). Más recientemente se ha introducido el imatinib, un inhibidor de la quinasa Bcr-Abl. Los excelentes resultados obtenidos le están convirtiendo en el fármaco de primera línea en el tratamiento de la LMC (Kantarjian *et al.*, 2002).

Sin embargo, aunque estos fármacos, y especialmente el interferón y el imatinib pueden inducir remisiones hematológicas, citogenéticas y moleculares en la fase crónica, y el imatinib incluso en fase acelerada (Talpez *et al.*, 2002) y blástica (Druker *et al.*, 2001; Sawyers *et al.*, 2002), el único tratamiento curativo de la LMC hoy conocido es el trasplante alogénico de médula ósea en su fase crónica (Goldman and Melo, 2003). Se ha demostrado también que la eficacia curativa del trasplante es menor cuanto más tiempo lleva el paciente en fase crónica, pero es difícil evaluar el tiempo que lleva un paciente en fase crónica cuando se le hace el diagnóstico por primera vez (Goldman and Druker, 2001).

Hasta el momento, el único marcador molecular informativo sobre la evolución de la enfermedad en ausencia de datos hematológicos y citogenéticas es la determinación de la presencia del mRNA de Bcr-Abl. Esta determinación se hace por RT-PCR, usando cebadores que mapean en los genes *BCR* y *ABL*. Aunque la detección de mRNA de Bcr-Abl es útil en la detección de enfermedad mínima residual, hasta el momento no hay marcadores moleculares de la respuesta al tratamiento en LMC.

Los inventores habían demostrado y publicado anteriormente que la expresión de *SPI-1/PU.1* aumentaba al tratar células de una línea celular derivada de LMC (K562) con con interferón- $\alpha$ , (Gutierrez *et al.*, 1997). Posteriormente, los inventores han demostrado que la expresión de *SPI-1/PU.1* se correlaciona con una recuperación hematológica de pacientes de LMC tratados con interferón- $\alpha$  e imatinib (resultados no publicados). Medida por RT-PCR, la expresión de *SPI-1/PU.1* es baja al diagnóstico y aumenta durante al tratamiento con interferón o con imatinib, concomitante con la normalización hematológica. En la figura 1 se presenta una muestra representativa de la expresión de *SPI-1/PU.1* en varios pacientes de LMC a lo largo de su tratamiento con interferón. Se obtuvieron resultados similares en 13 de 16 casos analizados. En los cuatro casos de la figura, el tratamiento indujo la recuperación de la hematopoyesis normal. En estos ensayos se usó el gen de la proteína ribosomal S14 como gen "housekeeping" como control de la cantidad de RNA y cDNA de las muestras. Este resultado es consistente con lo descrito previamente por los inventores sobre que la sobreexpresión de *SPI-1/PU.1* en células humanas K562, provoca parada proliferativa, inducción de la diferenciación monocítica y bloqueo de la diferenciación eritroide (Gutierrez *et al.*, 1997).

Cuando se comparan los niveles de *SPI-1/PU.1* (medidos por RT-PCR cuantitativa) en médula ósea de sujetos sanos, de pacientes de LMC al diagnóstico, y pacientes en fase crónica tratados con interferón y con imatinib se encontró que los niveles de mRNA de *SPI-1/PU.1* eran mayores en los pacientes tratados. En la Figura 2 se resumen estas observaciones en 10 muestras de sujetos sanos, 31 de pacientes de LMC al diagnóstico, 32 tratados con interferón- $\alpha$  y 17 tratados con imatinib (varios de ellos con tratamiento previo con interferón- $\alpha$ ).

## Referencias

- 10 **Deininger, M. W., Goldman, J. M., and Melo, J. V. (2000).** The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood* 96, 3343-3356.
- 15 **Druker, B. J., Sawyers, C. L., Kantarjian, H., Resta, D. J., Reese, S. F., Ford, J. M., Capdeville, R., and Talpaz, M. (2001).** Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 344, 1038-1042.
- Faders, S., Talpaz, M., Estrov, Z., and Kantarjian, H. M. (1999).** Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy. *Ann Intern Med* 131, 207-219.
- 20 **Friedman, A. D. (2002).** Transcriptional regulation of granulocyte and monocyte development. *Oncogene* 21, 3377-3390.
- Goldman, J. M., and Druker, B. J. (2001).** Chronic myeloid leukemia: current treatment options. *Blood* 98, 2039-2042.
- 25 **Goldman, J. M., and Melo, J. V. (2003).** Chronic myeloid leukemia—advances in biology and new approaches to treatment. *N Engl J Med* 349, 1451-1464.
- Gutierrez, P., Delgado, M. D., Richard, C., Moreau-Gachelin, F., and Leon, J. (1997).** Interferon induces up-regulation of Spi-1/PU.1 in human leukemia K562 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 240, 862-868.
- 30 **Kantarjian, H., Sawyers, C., Hochhaus, A., Guilhot, F., Schiffer, C., Gambacorti-Passerini, C., Niederwieser, D., Resta, D., Capdeville, R., Zoeliner, U., et al. (2002).** Hematologic and cytogenetic responses to imatinib mesylate in chronic myelogenous leukemia. *N Engl J Med* 346, 645-652.
- 35 **Lloberas, J., Soler, C., and Celada, A. (1999).** The key role of PU.1/SPI-1 in B cells, myeloid cells and macrophages. *Immunol Today* 20, 184-189.
- Sawyers, C. L., Hochhaus, A., Feldman, E., Goldman, J. M., Miller, C. B., Ottmann, O. G., Schiffer, C. A., Talpaz, M., Guilhot, F., Deininger, M. W., et al. (2002).** Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: results of a phase II study. *Blood* 99, 3530-3539.
- 40 **Silver, R. T., Woolf, S. H., Hehlmann, R., Appelbaum, F. R., Anderson, J., Bennett, C., Goldman, J. M., Guilhot, F., Kantarjian, H. M., Lichtin, A. E., et al. (1999).** An evidence-based analysis of the effect of busulfan, hydroxyurea, interferon, and allogeneic bone marrow transplantation in treating the chronic phase of chronic myeloid leukemia: developed for the American Society of Hematology. *Blood* 94, 1517-1536.
- 45 **Talpaz, M., Silver, R. T., Druker, B. J., Goldman, J. M., Gambacorti-Passerini, C., Guilhot, F., Schiffer, C. A., Fischer, T., Deininger, M. W., Lennard, A. L., et al. (2002).** Imatinib induces durable hematologic and cytogenetic responses in patients with accelerated phase chronic myeloid leukemia: results of a phase 2 study. *Blood* 99, 1928-1937.

## Explicación

55 Los inventores han observado que la expresión del gen humano *SPI-1/PU.1* es alta en células de médula ósea de sujetos sanos pero es significativamente más baja en muestras de pacientes de LMC al diagnóstico en fase crónica. Sin embargo, en pacientes de LMC que están en remisión hematológica, la expresión de *SPI-1/PU.1* se recupera hasta alcanzar valores normales. Esta regulación positiva de *SPI-1/PU.1* se ha observado tanto en pacientes de LMC tratados con interferón- $\alpha$  y con imatinib (los dos tratamientos hoy en uso para esta leucemia). El procedimiento que se presenta  
60 consiste en medir la expresión de *SPI-1/PU.1* en muestras de médula ósea de pacientes y referirla a una muestra de referencia que exprese dicho gen. Esta referencia puede ser médula ósea de sujetos sanos o de una línea celular que exprese dicho gen, como K562 tratadas con interferón. Una expresión alta o recuperada de *SPI-1/PU.1* es indicador de restablecimiento de hematopoyesis normal y/o una baja proporción de células leucémicas en la muestra considerada,  
65 y por tanto, una indicación de éxito del tratamiento.

**Descripción de las figuras**

5      Figura 1. Expresión de SPI-1/PU.1 durante la evolución de LMC. Las muestras 1.1., 2.1, 3.1 y 4.1 corresponden al diagnóstico. Las siguientes son muestras de los pacientes 1, 2, 3 y 4 tomadas con durante el tratamiento con interferón- $\alpha$ . En todos los casos los pacientes entraron en remisión hematológica. Se observa como la expresión de *SPI-1/PU.1* aumenta según se va consiguiendo (mediante el tratamiento) la normalización hematopoyética. A la derecha se indica entre paréntesis el tamaño de los amplicones de *SPI-1/PU.1* y de S14. A la izquierda los tamaños de marcadores de tamaño de DNA.

10     Figura 2. Expresión de SPI-1/PU.1 (analizada por RT-PCR cuantitativa y normalizada respecto a la de S14) en muestras de sujetos sanos (control), y pacientes de LMC al diagnóstico y tratados in interferón-a e imatinib. En cada caso se indica el número de muestras analizadas. Las barras de error indican el Error Estándar de la Media.

**Modo de realización**

15     Se extraerá RNA de células mononucleares separadas de médula ósea o de sangre periférica. El RNA se copia a cDNA usando transcriptasa inversa y cebadores al azar (“random hexamers”) o bien oligonucleótidos específicos de regiones exónicas del gen *SPI-1/PU.1* humano. El cDNA es amplificado usando como cebadores (“primers”) dos oligonucleótidos que mapean en secuencias exónicas del gen *SPI-1/PU.1* humano. El resultado del PCR se puede  
20     evaluar analizando los productos de la reacción de PCR por electroforesis en gel de agarosa o bien por PCR cuantitativa o a tiempo real.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para determinar la eficacia del tratamiento y determinar el grado de progresión de la leucemia mieloide crónica mediante el uso de *SPI-1/PU.1*, **caracterizado** por las siguientes etapas: a) determinación de la presencia de mRNA o proteína *SPI-1/PU.1* en células de médula ósea o sangre periférica de pacientes de LMC. b) Comparación de los niveles de mRNA o proteína de *SPI-1/PU.1* de las células del paciente con los de células que expresen *SPI-1/PU.1* (muestra de referencia) o bien con muestra de mRNA del mismo paciente tras recibir el tratamiento a evaluar.

10 2. Procedimiento para evaluar el pronóstico, determinar la eficacia del tratamiento y determinar el grado de progresión en la fase crónica de la LMC, según la reivindicación primera, **caracterizado** porque la determinación específica de la presencia de dicho marcador pronóstico *SPI-1/PU.1* se realiza mediante un ensayo de RT-PCR usando oligonucleótidos cebadores (“primers”) específicos del cDNA del gen *SPI-1/PU.1* humano, y usando RNA de células de sangre periférica o de médula ósea de pacientes de LMC.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIGURAS

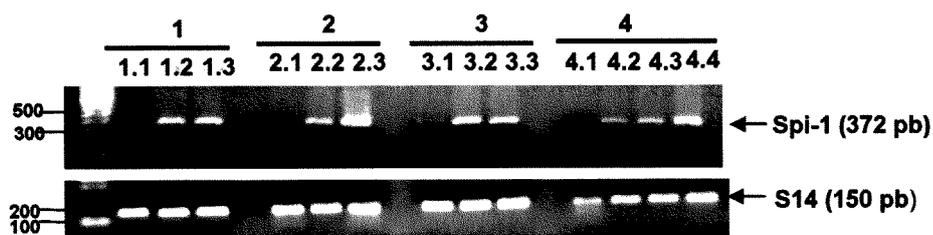


Figura 1

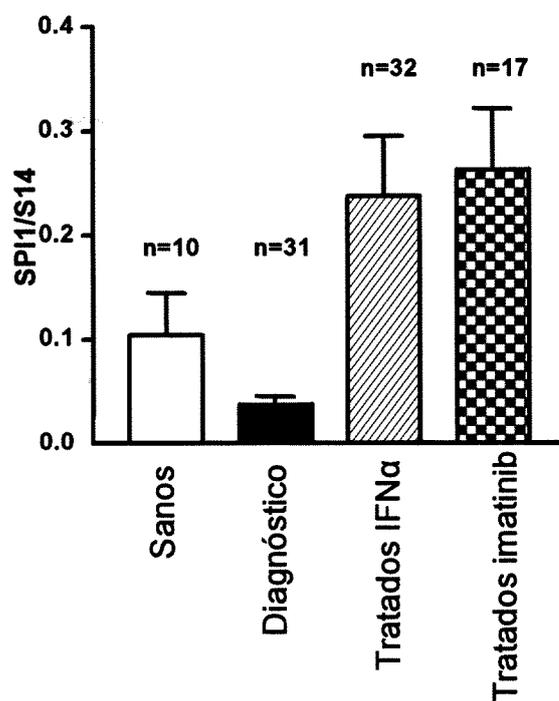


Figura 2



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 315 040

② Nº de solicitud: 200402864

③ Fecha de presentación de la solicitud: **22.11.2004**

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **C12Q 1/68** (2006.01)  
**G01N 33/574** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	GUTIERREZ P., et al., "Interferon induces up-regulation of Spi-1/ PU.1 in human leukemia K562 cells" Biochememical and Biophysical Research Communications (1997), 240, páginas 862-868. Citado en la solicitud.	1-2
A	LLOBERAS J., et al., "The key role of PU.1/Spi-1 in B cells, myeloid cells and macrophages" Immunology Today (1999), 20(4), páginas 184-189. Citado en la solicitud.	1-2
A	DELGADO MD., et al., "Spi-1/PU.1 proto-oncogene induces opposite effects on monocytic and erythroid differentiation of K562 cells" Biochememical and Biophysical Research Communications (1998), 252, páginas 383-391.	1-2
A	US 20030119043 A1 (TANNER et al.) 26.06.2003	1-2
A	WO 2004031409 A2 (ONCOTHERAPY SCIENCE INC.) 15.04.2004	1-2
A	US 20040161760 A1 (MANO) 19.08.2004	1-2
A	WO 9221032 A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA) 26.11.1992	1-2

**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**  
20.02.2009

**Examinador**  
M. Hernández Cuéllar

**Página**  
1/1