



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 341 213**

② Número de solicitud: 200803543

⑤ Int. Cl.:
A01K 67/027 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **15.12.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2010**

Fecha de la concesión: **31.05.2011**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **10.06.2011**

⑯ Fecha de publicación del folleto de la patente:
10.06.2011

⑰ Titular/es: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)** (Titular al 80 %)
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES
Universidad de Salamanca (Titular al 20 %)

⑱ Inventor/es: **García Bustelo, Xose Ramón;**
Ruiz Macías, Sergio y
Santos de Dios, Eugenio

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Modelos animales y células derivadas para su uso en la determinación de compuestos útiles en el tratamiento de linfomas de células T.**

㉑ Resumen:

Modelos animales y células derivadas para su uso en la determinación de compuestos útiles en el tratamiento de linfomas de células T.

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología. Se refiere a un método para evaluar si un compuesto es efectivo en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad asociada a linfomas de células T.

ES 2 341 213 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Modelos animales y células derivadas para su uso en la determinación de compuestos útiles en el tratamiento de linfomas de células T.

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biotecnología. Se refiere a un método para evaluar si un compuesto es efectivo en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad asociada a linfomas de células T.

Estado de la técnica anterior

La activación del receptor de la célula T (abreviado a partir de ahora como RCT) induce la activación de múltiples vías de señalización necesarias para la correcta diferenciación y función de las células T (Kane *et al.* (2000) *Curr. Opin. Immunol.* 12:242-249). Vav1 es un factor de intercambio de nucleótidos de guanosina (abreviado a partir de ahora como FING) que se expresa específicamente en células hematopoyéticas y que se activa de una manera dependiente de fosforilación tras la estimulación del RCT (Kane *et al.* (2000) *Curr. Opin. Immunol.* 12:242-249). De hecho, la fosforilación específica en residuos de tirosina en Vav1 es un requisito necesario para la transducción de señales que conllevan al incremento en flujos de calcio, para la activación de los factores de transcripción NFAT (del inglés, nuclear factor of activated T-cells) o a la activación de la vía de Ras/Erk (del inglés, extracellular signal-regulated kinase) (Bustelo (2001) *Oncogene.* 20:6372-6381). Los animales deficientes en Vav1 tienen defectos en la diferenciación de timocitos CD44+CD25+ a CD44-CD25+ así como defectos en selección positiva y negativa (Tybulewicz *et al.* 2003). Como resultado de estos defectos, los animales deficientes en el gen *Vav1* se caracterizan por una fuerte linfopenia de células T así como defectos en la proliferación, síntesis de citoquinas y activación de ERK tras la estimulación del RCT.

La familia de proteínas RasGRF está compuesta por dos miembros, RasGRF1 and RasGRF2 que trabajan como FINGs para GTPasas de la superfamilia Ras (Quilliam *et al.* (2002) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 71:391-444). Estas proteínas contienen varios dominios funcionales, entre los que se encuentran un dominio ilimaquinona capaz de unirse a iones Ca²⁺ y a la proteína calmodulina, un dominio homólogo a regiones Dbl presentes en FINGs para proteínas Rho/Rac y un dominio Cdc25 típico de FINGs para proteínas Ras. Estos dos últimos dominios están encargados de catalizar el intercambio de moléculas GDP por moléculas GTP en las GTPasas Rac1 y Ras, respectivamente (Quilliam *et al.* (2002) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 71:391-444). RasGRF2 se ha identificado recientemente como un nuevo componente de la señalización del RCT en linfocitos T (Ruiz *et al.* (2007) *Mol Cell Biol.* 27:8127-8142). Animales deficientes en RasGRF2 presentan defectos en la activación transcripcional dependiente de NFAT de ciertas citoquinas, tales como el factor de necrosis tumoral alfa o la interleukina 2, tras la estimulación del RCT (Ruiz *et al.* (2007) *Mol Cell Biol.* 27:8127-8142). La comparación de la función de células T obtenidas de ratones silvestres, ratones deficientes en el gen *Vav1*, ratones deficientes en el gen *Rasgrf2* y ratones deficientes conjuntamente en los genes *Vav1* y *Rasgrf2* ha permitido demostrar también que la vía de RasGRF2 coopera funcionalmente con la de Vav1 para asegurar valores óptimos de transformación blástica y proliferación tras la estimulación de dichos linfocitos a través de su RCT. Debido a ello, la ausencia del gen *Rasgrf2* agrava los defectos en transformación blástica y proliferativos que poseen los linfocitos T procedentes de ratones deficientes en el gen *Vav1* estimulados a través del RCT (Ruiz *et al.* (2007) *Mol Cell Biol.* 27:8127-8142).

Reciben el nombre de linfoma un grupo de tipos de cáncer que comienzan en el sistema linfático. Se calcula que por cada 100.000 habitantes un 7,7 por ciento de hombres y un 5,2 por ciento de mujeres sufren linfoma, y se estima que la incidencia del linfoma aumenta entre un 3 y un 4% cada año. Los linfomas son una enfermedad clínicamente heterogénea, existiendo más de 35 tipos de linfomas que se dividen en dos categorías principales: linfoma de Hodgkin y todos los demás linfomas, denominados linfomas no Hodgkin.

Está ampliamente reconocido el potencial que tienen los modelos experimentales de animales de laboratorio para el análisis de la función *in vivo* de un determinado gen, así como para el estudio de compuestos que potencialmente podrían ser útiles en el tratamiento o prevención de patologías relacionadas con la expresión nula o inadecuada de dicho gen. Algunos ejemplos de animales transgénicos empleados con estos fines para diferentes enfermedades son los descritos en las patentes con número de publicación: ES2303454, EP1586653, EP1619248, EP1839485, EP1907566, US2008060088, US2007186299, WO2008084566, WO2005098008 y WO03081996. Concretamente, se han descrito animales transgénicos para el estudio de los linfomas en las patentes con número de publicación: US5907079, US2006294611, US2008167457 y US2008070256.

A pesar de la incidencia del linfoma en los países industrializados, la etiología de la mayoría de los linfomas es desconocida, pudiendo existir diferentes rutas moleculares afectadas. Por otra parte, en la actualidad la mayoría de los tratamientos empleados son aproximaciones no específicas a cada tipo de linfoma o alteración molecular, sino tratamientos generales basados en la quimioterapia o la radioterapia. Por tanto, existe una necesidad de desarrollar nuevos modelos animales de linfoma que permitan entender los mecanismos moleculares subyacentes a la iniciación y progresión de los linfomas, así como identificar nuevos compuestos que permitan una terapia más específica y eficaz.

Explicación de la invención

La presente invención se refiere al empleo de un animal no humano o de la línea celular derivada del mismo, deficientes en la expresión y/o actividad de las proteínas Vav1 y/o RasGRF2 endógenas para la determinación del efecto de un compuesto o combinación de compuestos útiles para la prevención y/o el tratamiento de linfomas de células T.

La solución proporcionada por esta invención se basa en el hecho de que los ratones deficientes en el gen *Vav1* desarrollan linfomas de células T en el animal adulto y, adicionalmente, a que la deficiencia simultánea en el gen de *Rasgrf2* aumenta la susceptibilidad, cinética de aparición, progresión y agresividad de dichos linfomas.

Los autores de la presente invención demuestran que la baja sensibilidad de la cepa murina B10.BR al desarrollo de linfomas metastáticos de tipo T aumenta en ausencia del gen *Rasgrf2* (*Rasgrf2*^{-/-}) y es aún mucho más evidente en ratones con deficiencia en el gen *Vav1* (ratones *Vav1*^{-/-}). Además, han observado que la pérdida simultánea de los genes *Rasgrf2* y *Vav1* (ratones *Vav1*^{-/-};*Rasgrf2*^{-/-}) incrementa la susceptibilidad a la formación de linfomas, reduce el tiempo de latencia para la aparición de dichos linfomas y, además, aumenta la agresividad y malignidad de los mismos. Los linfomas T tienen un origen en el timo, demostrado por el hecho de que en estadios tempranos se observaron células pretumorales y/o tumorales exclusivamente en el timo que no están diseminadas en otros tejidos. Por último, una disminución en los niveles de expresión del gen *Rasgrf2* es algo común en linfomas, tal y como han observado lo inventores al analizar la expresión en un panel de diferentes tipos de linfomas humanos.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método para evaluar si un compuesto es efectivo en la prevención y/o tratamiento de neoplasias linfoides que comprende:

- a) La obtención o generación de un modelo experimental animal de mamífero no humano con deficiencia de la actividad de las proteínas Vav1 y/o RasGRF2 o las células derivadas del mismo;
- b) La administración del compuesto al modelo animal y/o células de a); y
- c) La determinación de su efecto sobre al menos un parámetro indicativo de la enfermedad.

El modelo experimental de mamífero no humano con deficiencia de la actividad de las proteínas Vav1 y/o RasGRF2 generado en el paso a) puede ser utilizado como modelo de estudio *in vivo* del papel desempeñado por las proteínas Vav1 y/o RasGRF2 endógenas en neoplasias linfoides, así como para el diseño y la evaluación de compuestos que podrían ser potencialmente interesantes para el tratamiento de las mismas. Asimismo, el uso de las células derivadas de dichos modelos animales podrían servir para el estudio *in vitro* de determinados aspectos implicados en la formación de neoplasias linfoides, y en el diseño y evaluación de compuestos que pudieran actuar modulando dichos aspectos.

El término proteína Vav1 se refiere a una enzima intracelular cuya actividad es dependiente de fosforilación en tirosinas y que promueve el intercambio de nucleótidos de guanosina en las GTPasas de la familia Rho/Rac. El gen que codifica a la proteína Vav1 se denomina científicamente *Vav1*. Ratones carentes de versiones funcionales del gen *Vav1* se denominan como ratones *Vav1*^{-/-}.

El término proteína RasGRF2 se refiere a una enzima intracelular cuya actividad es dependiente de fosforilación en tirosinas y que promueve el intercambio de nucleótidos de guanosina en las GTPasas de la superfamilia Ras. El gen que codifica a la proteína RasGRF2 se denomina científicamente *Rasgrf2*. Ratones carentes de versiones funcionales del gen *Rasgrf2* se denominan como ratones *Rasgrf2*^{-/-}.

La deficiencia conjunta en los genes *Vav1* y *Rasgrf2* se denota científicamente como *Vav1*^{-/-};*Rasgrf2*^{-/-}.

Tal como se utiliza en la presente invención el término “mamífero no humano” se refiere a un animal mamífero no humano de cualquier fondo genético, preferentemente animales de laboratorio como roedores, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, pertenecientes al siguiente grupo: conejos, hámsteres, ratas y ratones, o primates no humanos.

El término “modelo experimental animal” de mamífero no humano, tal y como se utiliza en la descripción, hace referencia a un animal viable en el que los niveles de la proteínas Vav1 y/o RasGRF2 han sido reducidos o anulados a través de diversas técnicas farmacológicas o genéticas mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin. Preferentemente, el modelo experimental animal es un animal transgénico.

El término “transgénico”, aplicado a mamífero no humano, tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a mamíferos no humanos que contienen un transgén e incluye, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención, a modelos animales *knock-out*, *knock-in* o *knock-down*, condicionales o inducibles, generados mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin, en cualquier fondo genético. Preferente, el animal transgénico es un “animal *knock-out*” de los genes *Vav1* y/o *Rasgrf2* endógeno.

ES 2 341 213 B1

El término “*knock-out*” tal como se utiliza en la presente invención se refiere a la supresión parcial o total de la expresión de al menos una parte de una proteína codificada por una secuencia de DNA endógeno en una célula, tanto en su forma de RNA como proteica. El mamífero no humano *knock-out* de la invención puede poseer células somáticas y germinales en las que al menos un alelo, de los genes *Vav1* y/o *Rasgrf2* endógenos se encuentra inactivado. En una realización preferida, el mamífero no humano *knock-out* de la invención posee células somáticas y germinales en las que ambos alelos, de uno los genes *Vav1* y/o *Rasgrf2* endógenos se encuentran inactivados. En una realización muy preferida, el mamífero no humano *knock-out* de la invención posee células somáticas y germinales en las que ambos alelos los genes *Vav1* y *Rasgrf2* endógenos se encuentran inactivados.

En otra realización preferida, los modelos experimentales animales de mamíferos no humanos de la invención pueden ser utilizados para obtener células para cultivo celular o para la generación de líneas celulares estables, mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin. Preferentemente, las células obtenidas a partir del modelo experimental animal son células del tejido linfático. Más preferentemente linfocitos T, los cuales pueden ser derivados del propio timo o de otros órganos invadidos por las células T tumorales como pueden ser el bazo, los ganglios linfáticos periféricos, hígado, riñón, pulmón o intestinos.

Las células obtenidas a partir del modelo experimental de mamífero no humano de la invención pueden carecer de la expresión parcial o total de las proteínas *Vav1* y/o *RasGRF2* endógenas. Estas células puede presentar al menos un alelo, de los genes *Vav1* y/o *Rasgrf2* endógenos inactivado. En una realización preferida, estas células presentan ambos alelos, de uno los genes *Vav1* y/o *Rasgrf2* endógenos, inactivados. En una realización muy preferida, las células presentan ambos alelos de los genes *Vav1* y *Rasgrf2* endógenos inactivados.

El método de la presente invención permite evaluar si un compuesto es efectivo en la prevención y/o tratamiento de neoplasias linfoides, como linfomas Hodkings, neoplasias de células B, neoplasias de células T, neoplasias de células natural killer (NK) o enfermedades linfoproliferativas asociadas inmunodeficiencia, tanto infantiles como aquellas desarrolladas en el adulto. Preferentemente, neoplasia es una neoplasia de células T como, por ejemplo, pero sin limitarse a, leucemia linfoblástica aguda precursora de células T y linfoma linfoblástico precursor de células T, leucemia linfocítica y leucemia prolinfocítica crónicas de células T, leucemia linfocítica granular de células T, micosis fungoides y síndrome de Sezary, linfoma periférico de célula T, linfoma hepatoesplénico de células T gamma y delta, linfoma de apariencia paniculítica subcutáneo de células T, linfoma angioinmunoblástico de células T, linfoma extranodal de células TI NK de tipo nasal, linfoma intestinal de células T de tipo enteropático, linfoma y leucemia de células T en adultos, linfoma sistémico de célula grande o linfoma anaplásico de células grandes de tipo cutáneo primario.

El término “compuesto”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a cualquier compuesto de origen natural o sintético, con una actividad terapéutica génica o una actividad terapéutica farmacológica. Los conceptos de terapia génica así como el de terapia farmacológica son bien conocidos para un experto en la materia. Preferentemente, el compuesto es un agente antineoplásico.

En una realización preferida, la determinación de la efectividad del compuesto, puede ser llevada a cabo mediante la medida de un parámetro que sea indicativo de la enfermedad en los modelos experimentales animales de mamíferos no humanos de la invención, como por ejemplo, pero sin limitarse, morfología linfocitaria, índice proliferativo linfocitario, velocidad de crecimiento que tiene el linfoma, extensión de la enfermedad, determinada según el número, localización y tamaño de las áreas ganglionares y extraganglionares afectas, marcadores séricos (como por ejemplo, pero sin limitarse, LDH y beta2-microglobulina), la expresión de marcadores de la superficie linfocitaria y la morbilidad o mortalidad, donde un cambio favorable con el nivel del indicador en relación con el cambio de referencia usando animales no tratados en condiciones comparables, indica que el compuesto es activa/o para tratar dicha enfermedad. El estudio de dichos parámetros puede ser realizado por diferentes técnicas conocidas por un experto en la materia, entre los que se encuentran, pero sin limitarse, hemograma, radiografías, ultrasonido, tomografía axial computarizada (CT Scan), resonancia magnética por imágenes (MRI), centellograma con galio, tomografía por emisión de positrones TEP (PET scan), gammagrafía ósea, análisis de médula ósea, punción lumbar, citometría de flujo, biopsia quirúrgica o necropsia. En una realización alternativa, la determinación de la efectividad del compuesto, puede ser llevada a cabo mediante la medida de un parámetro que sea indicativo de la enfermedad en las células derivadas de los modelos experimentales animales de mamíferos no humanos de la invención, como por ejemplo, pero sin limitarse, proliferación, apoptosis, resistencia a drogas, capacidad tumoral o metastásica.

Otro aspecto de la invención, se refiere al uso de los modelos experimentales animales de mamíferos no humanos de la invención o a las células derivadas de los mismos para la identificación de nuevos marcadores con valor diagnóstico o pronóstico en neoplasias linfoides. Preferentemente, la identificación de marcadores tiene lugar mediante el análisis de la expresión diferencial de genes entre un mamíferos no humano silvestre y un modelo experimental animal de mamífero no humano con deficiencia de la actividad de las proteínas *Vav1* y/o *RasGRF2*, o de las células derivadas de los mismos. De acuerdo con la presente invención, la detección de la cantidad de producto de la expresión de los genes puede ser llevada a cabo por cualquier método de determinación de la cantidad del producto de la expresión de los genes conocido por el experto en la materia. En una realización preferida, la detección del producto de la expresión de los genes se realiza determinando el nivel de RNAm derivado de su transcripción donde el análisis del nivel de RNAm se puede realizar, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la ligasa (RT-LCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qRT-PCR), o cualquier otro método

de amplificación de ácidos nucleicos; microarrays de DNA elaborados con oligonucleótidos depositados por cualquier mecanismo; microarrays de DNA elaborados con oligonucleótidos sintetizados *in situ* mediante fotolitografía o por cualquier otro mecanismo; hibridación *in situ* utilizando sondas específicas marcadas con cualquier método de mareaje; mediante geles de electroforesis; mediante transferencia a membrana e hibridación con una sonda específica; mediante RMN o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen utilizando nanopartículas paramagnéticas o cualquier otro tipo de nanopartículas detectables funcionalizadas con anticuerpos o por cualquier otro medio. En una realización alternativa, la detección del producto de la expresión de los genes se realiza determinando el nivel proteínico derivado de su traducción donde el análisis del nivel de proteína se puede realizar, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, mediante la incubación con un anticuerpo específico, por ejemplo, mediante Western blot, geles de electroforesis, chips de proteína, ELISA o cualquier otro método enzimático; mediante RMN o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen.

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit adaptado para llevar a cabo el método para la evaluar si un compuesto es efectivo en la prevención y/o tratamiento de neoplasias linfoides, que comprende:

- a) Células derivadas un modelo experimental animal de mamífero no humano con deficiencia de la actividad de las proteínas Vav1 y/o RasGRF2; y
- b) Células derivadas de un ratón silvestre.

Dicho kit puede comprender también los elementos necesarios para la determinación de su efecto sobre al menos un parámetro que sea indicativo de la enfermedad en las células derivadas de los modelos experimentales animales de mamíferos no humanos de la invención, como por ejemplo, pero sin limitarse, proliferación o apoptosis. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo el primer método de la invención.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Las siguientes figuras y ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Figura 1. Muestra que la pérdida conjunta de los genes para *Rasgrf2* y *Vav1* incrementa la formación de linfomas linfoblásticos en el ratón. (A) Representación esquemática mediante un histograma de tipo Kaplan-Meier del porcentaje de ratones de los diferentes genotipos indicados que no desarrollaron tumores en función del tiempo (en meses), $n \geq 24$. (B) Apariencia macroscópica del timo, bazo, ganglios mesentéricos y riñón provenientes de animales control y de animales en los que se había desarrollado un linfoma. Barra=1 cm. NT, órgano sin tumor. T, órgano con tumor. (C) Secciones histológicas teñidas con hematoxilina/eosina de los tejidos indicados en los que se observa la pérdida de la arquitectura celular normal en el timo, bazo y ganglios mesentéricos así como el infiltrado de células metastáticas localizadas en tejidos no-hematopoyéticos tales como riñón, pulmón e hígado. Barra: 10 μm .

Figura 2. Muestra que los tumores linfoides de los ratones *Vav1*^{-/-};*Rasgrf2*^{-/-} contienen células CD3 positivas altamente proliferativas (A) Suspensiones celulares obtenidas de animales de los genotipos señalados se analizaron mediante citometría de flujo tras incubar las células con anticuerpos específicos contra CD3, una proteína expresada exclusivamente en linfocitos T. Los cuadrados rojos señalan las poblaciones tumorales CD3 positivas detectadas en los ratones *Vav1*^{-/-};*Rasgrf2*^{-/-} que habían desarrollado tumores en el sistema linfoide. SSC se refiere al parámetro conocido en citometría de flujo como “side scatter” o luz dispersada en el ángulo recto. (B) Suspensiones celulares aisladas de un ratón *Vav1*^{-/-};*Rasgrf2*^{-/-} sano y de cuatro ratones *Vav1*^{-/-};*Rasgrf2*^{-/-} que habían desarrollado tumores se analizaron mediante citometría de flujo tras incubar las células con anticuerpos contra CD4 y CD8, dos marcadores específicos de linfocitos T. (C) Suspensiones celulares aisladas de los tejidos indicados de un ratón *Vav1*^{-/-};*Rasgrf2*^{-/-} sano y de dos ratones *Vav1*^{-/-};*Rasgrf2*^{-/-} que habían desarrollado tumores se analizaron mediante citometría de flujo para determinar el número de blastos. Las líneas verticales de color rojo indican el punto a partir del cual las células fueron consideradas como blastos. FCS se refiere al parámetro usado en citometría de flujo conocido por “forward scatter” o luz dispersada en el ángulo cónico pequeño. (D) Órganos obtenidos a partir de un ratón *Vav1*^{-/-};*Rasgrf2*^{-/-} fueron teñidos con anticuerpos contra CD3 (paneles superiores) o con anticuerpos contra PCNA (paneles inferiores) usando técnicas inmunocitoquímicas. Barra: 10 μm .

Figura 3. Muestra la ausencia de tumores en ratones de corta edad independientemente de su genotipo. Representación esquemática del porcentaje de subpoblaciones de timocitos (paneles superiores) y linfocitos esplénicos (paneles inferiores) obtenidos de animales con los genotipos indicados (n=5).

Figura 4. Muestra que los linfomas T encontrados en los ratones *Vav1*^{-/-}; *Rasgrf2*^{-/-} y *Vav1*^{-/-} derivan de la glándula tímica. (A) Tinciones realizadas con hematoxilina/eosina e inmunohistoquímicas realizadas con anticuerpos contra CD3 y PCNA de secciones de órganos obtenidos de un ratón *Vav1*^{-/-};*Rasgrf2*^{-/-} con un tumor localizado en el timo. Barra: 10 μm . (B) Suspensiones celulares de los órganos indicados aislados de un ratón *Vav1*^{-/-};*Rasgrf2*^{-/-} sano (panel superior izquierdo) y de un ratón *Vav1*^{-/-};*Rasgrf2*^{-/-} (resto de paneles) que presentaba un linfoma de localización exclusivamente tímica fueron analizadas mediante citometría de flujo tras incubar las células con anticuerpos contra

CD3. El cuadrado rojo señala la población anormal CD3 positiva que se detectó en el tumor intratímico. (C) Representación gráfica en la que se puede observar el porcentaje de animales con los genotipos indicados a la edad de un año que presentan timos normales o timos tumorales (sin metástasis en otros órganos). Dicha clasificación se basa en datos provenientes de citometría de flujo y datos histológicos.

Figura 5. Muestra la expresión del gen *Rasgrf2* en linfomas humanos es menor que en tejidos normales. Análisis de la expresión de los genes *Vav1* (panel superior) y *Rasgrf2* (panel inferior) humanos mediante PCR cuantitativa en un panel de muestras de linfomas humanos representativos de diferentes estadios de la enfermedad. La muestra 1 representa la expresión relativa media de 6 muestras de tejido linfoide proveniente de diferentes animales control (línea discontinua) mientras que el resto de las muestras se refieren como porcentaje de cambio respecto a la muestra control. La expresión del gen de la *Gapdh* se usó como valor para la normalización de los valores de expresión entre las diferentes muestras, u.a., unidades arbitrarias.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con fines ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

Ejemplo 1

1.1. La deficiencia de los genes *Vav1* y/o *Rasgrf2* acelera y agrava el desarrollo de tumores de linfocitos T altamente proliferativos en ratones de la cepa B10.BR

En el transcurso de estudios de envejecimiento de los ratones de los genotipos silvestre (control), *Vav1*^{-/-}, *Rasgrf2*^{-/-} y *Vav1*^{-/-};*Rasgrf2*^{-/-}, se observó que mientras los ratones de genotipo silvestre presentaban bajas tasas de muerte/enfermedad hasta un año de edad (6%, n=32), los ratones *Vav1*^{-/-} (32%, n=25) y, sobre todo, los ratones *Vav1*^{-/-};*Rasgrf2*^{-/-} (68,56%, n= 35), eran más sensibles a morir o mostrar signos físicos de enfermedad grave a lo largo de su vida (Fig. 1A). Los ratones *Rasgrf2*^{-/-} mostraron en estos estudios unas tasas de muerte/enfermedad intermedias a las observadas en los ratones *Vav1*^{-/-} y *Vav1*^{-/-};*Rasgrf2*^{-/-} (Fig. 1A). El examen de los animales muertos o sacrificados que mostraban signos de enfermedad grave indicó que la muerte/enfermedad se debía a la presencia de tumores linfoides altamente diseminados en estos animales. En concreto, se observaron hiperplasias del timo, esplenomegalias y linfadenopatías en la mayoría de animales analizados (Fig. 1B). Junto a ello, se apreció que el timo, el bazo y los ganglios linfáticos mostraban unas alteraciones histológicas importantes debido a la invasión y crecimiento de las células tumorales en dichos órganos (Fig. 1C). El análisis anatomopatológico de estos animales mostró también infiltraciones numerosas de las células tumorales en diversos órganos no hematopoyéticos como eran los riñones, hígados, intestinos y médula ósea (Fig. 1C y datos no mostrados).

Los tumores presentes en estos animales se identificaron como de origen linfoide, puesto que estudios por citometría de flujo indicaron que las células tumorales presentes en el timo, bazo y médula ósea de estos animales expresaban altos niveles de CD3, un antígeno de superficie expresado específicamente en linfocitos T y no en otros tipos celulares (Fig. 2A). De igual forma, estudios realizados por técnicas inmunocitoquímicas revelaron que las células tumorales presentes en los órganos hematopoyéticos y no hematopoyéticos de estos animales eran positivas para dicho marcador de células T (Fig. 2D). Pese a esta uniformidad en cuanto a la expresión de este marcador, estudios subsecuentes demostraron que las células tumorales podían tener distinto inmunofenotipo para otros dos marcadores de células T, las proteínas CD4 y CD8, dependiendo del animal analizado. Por ejemplo, se pudieron detectar animales en donde las células tumorales eran homogéneamente doble positivas para CD4 y CD8, otros en los que las células tumorales pertenecían a dos subgrupos diferentes (doble positivas para CD4 y CD8 y poblaciones positivas solo para el marcador CD8) y animales en los que las células tumorales se teñían homogéneamente para CD8 y no para el marcador CD4 (Fig. 2B). En todo caso, siempre se observó que para un animal concreto, todas las células tumorales tenían el mismo inmunofenotipo para los marcadores CD4 y CD8 independientemente del órgano de donde habían sido purificadas (Fig. 2B).

Análisis llevados a cabo por técnicas de citometría de flujo demostraron que los tumores estaban compuestos por células en estado blástico (Fig. 2C), una indicación de que tenían alto potencial proliferativo. Consistente con esta observación, estudios inmunohistoquímicos revelaron la presencia en los órganos de animales con tumores de células altamente positivas para PCNA (del inglés proliferating cell nuclear antigen) (Fig. 2D), un marcador proliferativo estándar. Resultados similares se obtuvieron con ratones de todos los genotipos bajo estudio en este trabajo que habían desarrollado tumores diseminados (datos no mostrados).

Estos resultados indican que la ausencia del gen *Vav1* incrementa el porcentaje de tumores derivados de células T de ratones de la cepa B10.BR y, adicionalmente, que la ausencia combinada de este gen con la deficiencia en el gen *Rasgrf2* acorta el periodo de latencia de desarrollo de estos tumores así como su agresividad y letalidad.

ES 2 341 213 B1

1.2. La ontología de los tumores linfoides demuestra su origen en linfocitos del timo

Para investigar el origen de estos tumores, se procedió al estudio de animales jóvenes de entre seis y ocho semanas de edad, un periodo durante el cual no se detectaron muertes por linfomas. Además, se usaron también animales de un año de edad de los genotipos silvestre, *Vav1*^{-/-};*Rasgrf2*^{-/-} y *Vav1*^{-/-};*Rasgrf2*^{-/-} que no habían mostrado signos de enfermedad y/o incomodidad y que, por tanto, habían sido clasificados en nuestro primer análisis como “libres de cáncer”.

En el caso de los ratones jóvenes de todos los genotipos bajo análisis, no se detectaron ningún tipo de anomalía histológica o tumores. Además, el examen de las poblaciones linfocitarias presentes en el timo y el bazo mostraron las distribuciones habituales para cada genotipo (Fig. 3, n=20 animales de cada uno de los genotipos en estudio).

Por el contrario, se pudo observar que los ratones supuestamente “libres de cáncer” de un año de edad sí presentaban alteraciones. Estas alteraciones eran hiperplasias del timo, las cuales se debían a la presencia dentro del timo de linfocitos T altamente positivos para los marcadores PCNA y CD3 (Fig. 4A,B), características similares a las previamente observadas en las células tumorales de ratones con tumores diseminados. Sin embargo, y a diferencia de éstos últimos, no se detectó ningún tipo de infiltración o proceso metastático de células linfoblásticas positivas para el marcador CD3 en órganos que no fuesen el timo (Fig. 4A,B). Estas alteraciones restringidas al timo se detectaron en ratones *Vav1*^{-/-} (85% de los casos, n=14) y *Vav1*^{-/-};*Rasgrf2*^{-/-} (80% de los casos, n=14) (Fig. 4C). En cambio, los porcentajes de ratones con tumores exclusivamente localizados en el timo fue mucho menor en caso de animales con genotipos silvestre (17%, n=25) y *Rasgrf2*^{-/-} (22%, n=20) (Fig. 4C). Tomados colectivamente, estos resultados indican que: (a) la delección del gen *Vav1* aumenta la tendencia de los ratones correspondientes a generar tumores linfoblásticos altamente proliferativos en el timo; (b) la delección del gen *Rasgrf2* conjuntamente con la del gen *Vav1* acelera la aparición de dichos tumores linfoblásticos con alta capacidad de diseminación en órganos hematopoyéticos y no hematopoyéticos del ratón; (c) en ambos casos, las células tumorales son positivas para el marcador de células T CD3 y poseen alta capacidad proliferativa.

Ejemplo 2

Evidencia de bajos niveles de expresión del gen *Rasgrf2* en linfomas humanos

Las observaciones obtenidas en el ejemplo 1 indican que la delección del gen *Vav1* y/o la del gen *Rasgrf2* pueden participar en el desarrollo de tumores linfoides en humanos. Con la intención de verificar esta posibilidad, se analizó la expresión mediante PCR cuantitativa de ambas proteínas en un panel de muestras que contenían linfocitos de 6 individuos normales y muestras procedentes de 42 pacientes que poseían diferentes tipos de linfomas humanos. Estas muestras incluían estadios diferentes de progresión tumoral de los tumores así como linfomas derivados de células T y B (Fig. 5). Mientras que se vio que el gen *Vav1* no sufría disminuciones de su expresión en dicha colección de tumores respecto a los niveles presentes en individuos sanos, se observó en cambio que la expresión del gen *Rasgrf2* estaba disminuida en un 81% de las muestras tumorales analizadas (Fig. 5). La expresión del gen *Rasgrf2* se vio completamente reprimida en un linfoma linfocítico de estadio I (muestra 23), un linfoma folicular de estadio II (muestra 33), y un linfoma de células del manto de estadio ME (muestra 37). En cambio, se observaron niveles de expresión del gen *Rasgrf2* comparables o superiores a los individuos sanos sólo en tres (7%, muestras 29, 36 y 41) y cuatro casos (9%, muestras 9, 27, 32 y 43), respectivamente (Fig. 5). Estos datos sugieren que la inhibición, parcial o total, de la expresión del gen *Rasgrf2* puede representar un factor coadyuvante en el desarrollo de linfomas.

Materiales y métodos

Ratones (Ejemplos 1.1 y 1.2): Los ratones deficientes en el gen *Vav1* se obtuvieron y fueron inicialmente descritos por V. Tybulevicz (NIMR, Londres, Reino Unido, UE) (Turner *et al*, 1997). Los ratones deficientes en el gen *Rasgrf2* se obtuvieron y fueron inicialmente descritos por E. Santos (Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca, España) (Fernández-Melarde *et al*, 2002). Los ratones deficientes conjuntamente en los genes *Vav1* y *Rasgrf2*, se generaron mediante cruces de los anteriores ratones. Todos los ratones usados en este estudio se homogeneizaron en la cepa genética B10.BR. Los animales se sacrificaron siguiendo la normativa internacional a la edad de un año o cuando se detectaron *de visu* signos evidentes de enfermedad debidos al desarrollo del tumor.

Análisis de citometría de flujo (Ejemplos 1.1 y 1.2): Los órganos extraídos de los ratones en estudio se homogeneizaron utilizando una malla de 50 μm (Falcon) estéril para generar suspensiones celulares. En el caso de células de médula ósea, los fémures de los ratones se extrajeron y la médula ósea se extrajo mediante la introducción de un flujo de solución salina en la cavidad ósea. Las suspensiones celulares se trataron mediante choque hipotónico en 0.17 M NH_4Cl para eliminar los eritrocitos contaminantes y, tras varios lavados en solución salina, las poblaciones linfocitarias se marcaron con anticuerpos específicos para marcadores de membrana acoplados a compuestos fluorescentes. Los anticuerpos contra los marcadores CD4, CD3, CD8, CD44, CD25 y B220 fueron todos ellos comprados a BD Biosciences. Los blastos se detectaron utilizando los parámetros SSC y FCS habituales en este tipo de técnicas. Los análisis de citometría de flujo se llevaron a cabo en un citómetro FACSCalibur (BD Biosciences) y los datos se analizaron con los programas informáticos Cell Quest (BD Biosciences), Paint-a-Gate y WinMDI 2.8.

ES 2 341 213 B1

Histología y análisis inmunohistológicos (Ejemplos 1.1 y 1.2): Los tejidos seleccionados se fijaron en paraformaldehído al 4% en solución salina durante 48 horas tras lo cuál se embebieron en parafina. Las secciones histológicas se tiñeron con hematoxilina/eosina (Sigma) o se procesaron para inmunohistoquímica. Las tinciones inmunohistoquímicas se realizaron en secciones desparafinadas mediante protocolos estandarizados. Los anticuerpos contra CD3 se obtuvieron de DAKO, utilizándose a una dilución de 1:200. El anticuerpo monoclonal contra PCNA (clon PC10) se obtuvo de Cell Signalling y se usó a una dilución de 1:100. Los anticuerpos secundarios conjugados con la peroxidada de rábano contra inmunoglobulinas de ratón necesarios para revelar las inmunohistoquímicas se obtuvieron de GE Healthcare.

PCR cuantitativa (Ejemplo 2): Para analizar la expresión de los genes *Vav1* y *Rasgrf2* en linfomas, se usó un panel de cDNAs provenientes de muestras de linfomas humanos deshidratados en una placa de 96 pocillos (TissueScan Lymphoma Tissue qPCR Array I (2), Cat. Number LYRT101, Origene Technologies). Una descripción detallada de las muestras de linfomas contenido en este preparado comercial puede encontrarse en la dirección de Internet (<http://www.origene.com/geneexpression/disease-panels/products/LYRT101.aspx>). Las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron en el aparato IQ5 Real-Time PCR detection system (BioRad) y para ello se utilizó el kit de SYBR[®] Green[™] two-step qRT-PCR (Invitrogen). La muestra número 1 representa una media de la expresión relativa de 6 muestras diferentes de tejidos normales. A esta media se le dio un valor arbitrario de 1. Los valores de expresión restantes se muestran en el estudio como porcentaje de variación respecto a dicho valor. Para eliminar variaciones espurias debidas a diferentes cargas de muestra, etc., los valores relativos de la expresión de *Vav1* y *Rasgrf2* obtenidos en cada muestra se normalizaron usando, para ello, el valor de la expresión del gen que codifica la enzima GAPDH.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Método para evaluar si un compuesto es efectivo en la prevención y/o tratamiento de neoplasias linfoides que comprende:

- 10 a) La obtención o generación de un modelo experimental animal de mamífero no humano con deficiencia de la actividad de las proteínas Vav1 y/o RasGRF2 o a las células derivadas del mismo;
- 15 b) La administración del compuesto al modelo animal o células de a); y
- 20 c) La determinación de su efecto sobre al menos un parámetro indicativo de la enfermedad.

25 2. Método según la reivindicación 1 donde el modelo animal es un animal transgénico.

30 3. Método según la reivindicación 2 donde el animal transgénico es un animal *knock-out* de los genes *Vav1* y/o *Rasgrf2*.

35 4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde el modelo animal es un roedor o un primate no humano.

40 5. Método según la reivindicación 1 donde las células de mamífero no humano son del tejido linfoide.

45 6. Método según la reivindicación 5 donde las células del tejido linfoide son linfocitos T.

50 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde la neoplasia linfoide es una neoplasia de las células T.

55 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde el parámetro indicativo de la enfermedad es la presencia de tumores linfoides.

60 9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde el parámetro indicativo es la mortalidad o la morbilidad asociada a la presencia de la neoplasia.

65 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 donde el compuesto es un agente antineoplásico.

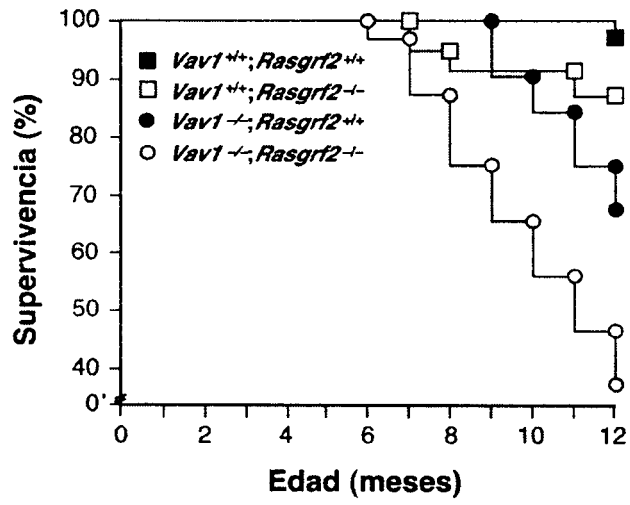
70 11. Kit adaptado para llevar a cabo el método para la evaluar si un compuesto es efectivo en la prevención y/o tratamiento de neoplasias linfoides, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 que comprende:

- 75 a) Células derivadas de un modelo experimental animal de mamífero no humano con deficiencia de la actividad de las proteínas Vav1 y/o RasGRF2; y
- 80 b) Células derivadas de un ratón silvestre.

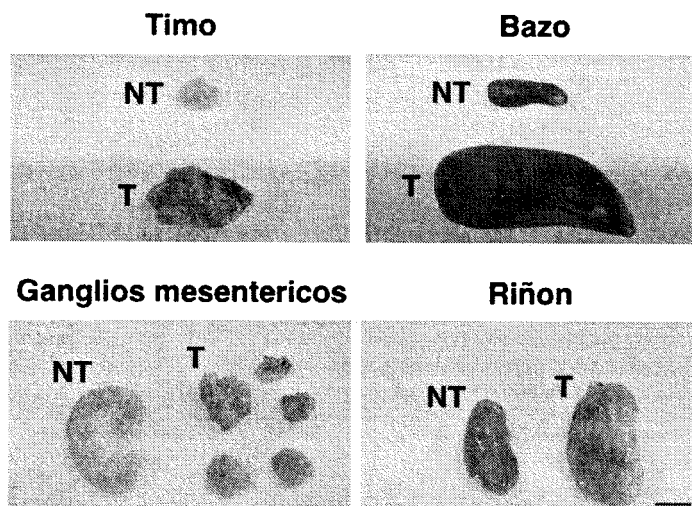
85 12. Kit según la reivindicación 11 que además comprende las instrucciones para llevar a cabo dicho método.

FIG. 1

A



B



C

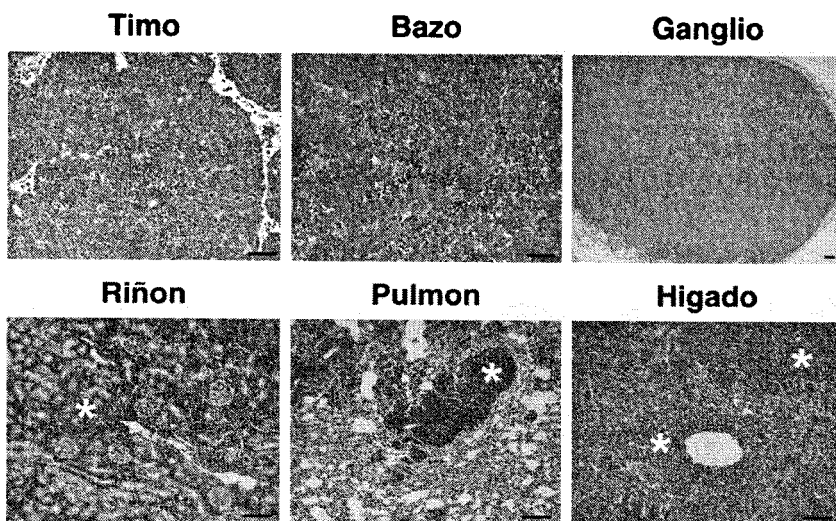


FIG. 2

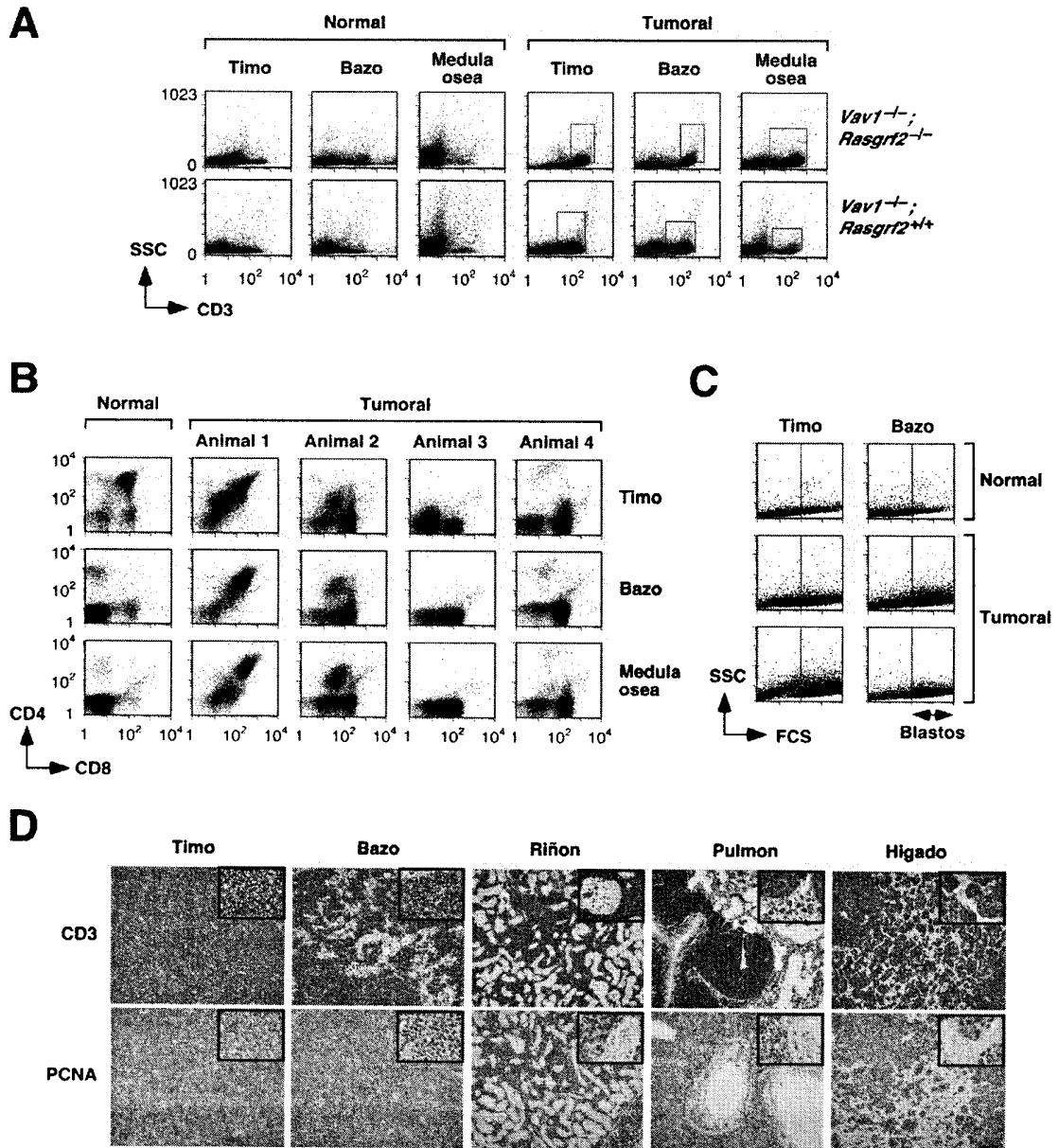


FIG. 3

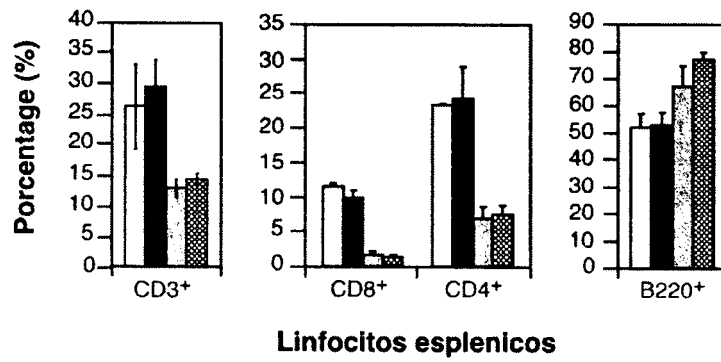
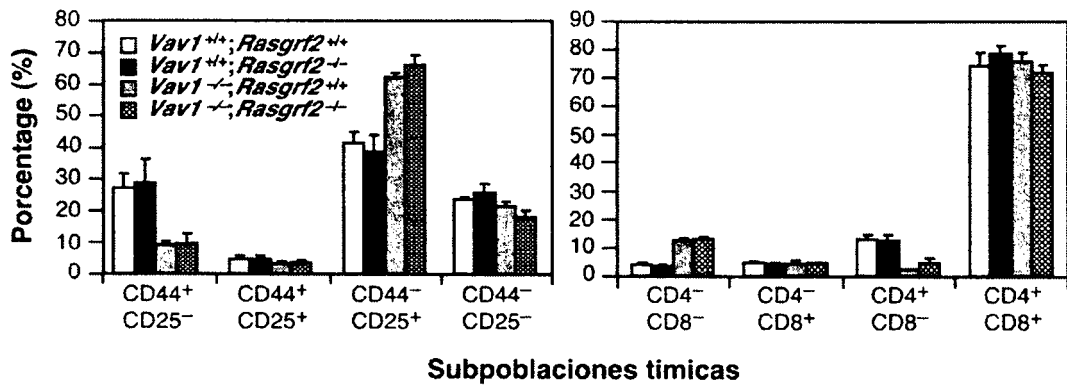
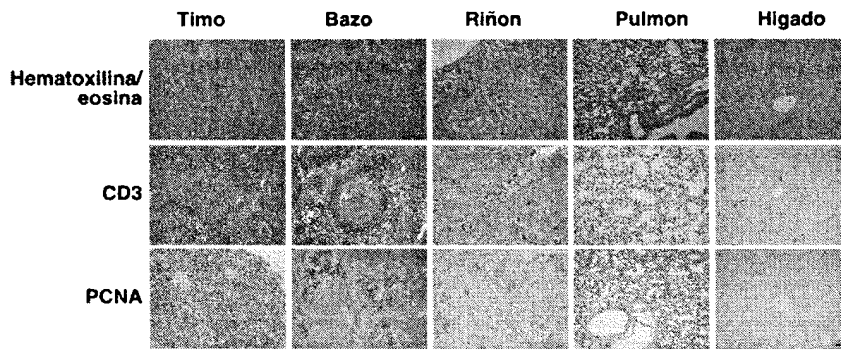
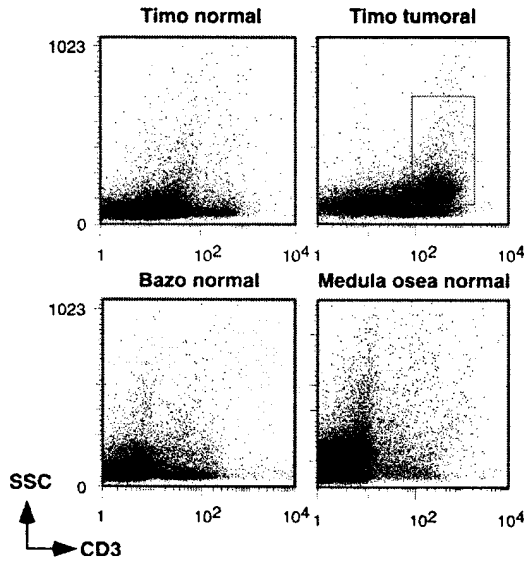


FIG. 4

A



B



C

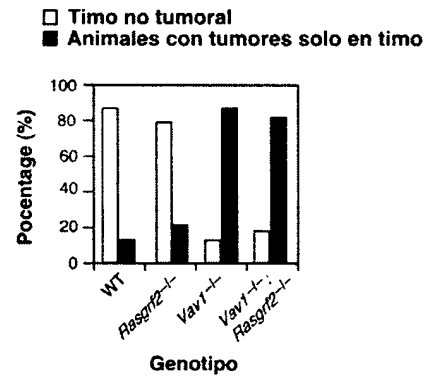
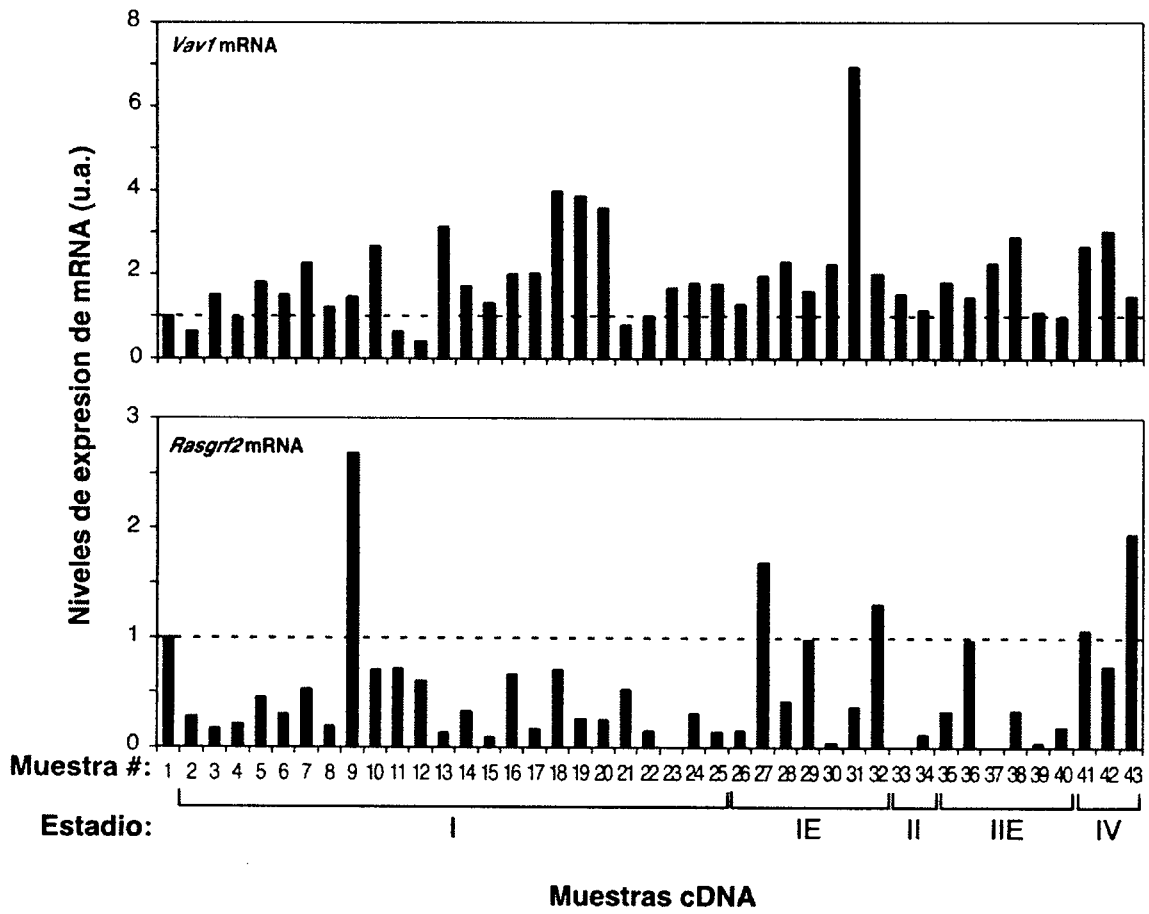


FIG. 5





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 341 213

② Nº de solicitud: 200803543

③ Fecha de presentación de la solicitud: 15.12.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **A01K 67/027** (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	RUIZ S. ET AL., "RasGRF2,a guanosine nucleotide exchange factor for Ras GTPases, participates in T-Cell signaling responses" Mol. Cell. Biol. (2007), 27:8127-8142. Pág. 8137-8138. Todo el documento. Citado en la solicitud	1-12
A	US 2006117399 A (UNIV TOLEDO) 01.06.2006	1-12
A	US 6583333 B1 (COLD SPRING HARBOR) 24.06.2003	1-12
A	US 2008070256 A1 (NAT JEWISH MED & RES CENTER) 20.03.2008,Citado en la solicitud	1-12
A	KATZAV S. "Flesh and blood: The story of Vav1, a gene that signals in hematopoietic cells but can be transforming in human malignancies" Cancer letters (2007), 241-254	1-12

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:

Fecha de realización del informe 11.03.2010	Examinador M. Hernández Cuéllar	Página 1/4
---	---	----------------------

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

A01K, C12Q

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

EPODOC,WPI,MEDLINE,BIOSIS,EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 11.03.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SÍ
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-12	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	RUIZ S. ET AL., "RasGRF2, a guanosine nucleotide exchange factor for Ras GTPases, participates in T-Cell signaling responses" Mol. Cell. Biol. (2007), 27:8127-8142. Pág. 8137-8138. Citado en la solicitud	2007
D02	US 2006117399 A	01-06-2006
D03	US 6583333 B1	24-06-2003
D04	US 2008070256 A1	20-03-2008

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud propone el empleo de un animal no humano deficiente en la expresión de las proteínas Vav1 y/o RasGRF2 endógenas como modelo experimental para la determinación del efecto de un compuesto o combinación de compuestos útiles en el tratamiento de linfomas de células T.

1.- NOVEDAD

Esta Oficina considera que las reivindicaciones 1-12 cumplen el requisito de novedad

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA

El objeto de las reivindicaciones 1-12 es la intención o propósito de utilizar un animal no humano deficiente en la expresión de las proteínas Vav1 y/o RasGRF2 endógenas como modelo experimental para la determinación del efecto de un compuesto o combinación de compuestos útiles en el tratamiento de linfomas de células T.

El documento D01 se refiere al factor RasGRF2 y su participación como un nuevo componente de la señalización del RCT en linfocitos T. En este documento se utilizan ratones silvestres, deficientes en el gen Vav1, deficientes en el gen RasGRF2 y ratones deficientes conjuntamente en los genes Vav1 y RasGRF2 para realizar una comparación de la función de las células T. Esta comparación permite demostrar que la vía de RasGRF2 coopera funcionalmente con la de Vav1 para asegurar valores óptimos de transformación blástica y proliferación tras la estimulación de dichos linfocitos a través de su RCT. Debido a ello, la ausencia de RasGRF2 agrava los defectos en transformación blástica y proliferativos que poseen los linfocitos deficientes en el gen Vav1 estimulados a través de su RCT.

Como el propio solicitante indica "los modelos experimentales de animales de laboratorio tienen un reconocido potencial para el análisis de la función in vivo de un gen así como para el estudio de compuestos que potencialmente podrían ser útiles en el tratamiento o prevención de patologías relacionadas con la expresión nula o inadecuada de dicho gen". Los documentos D02-D04 se ejemplan de dichos animales.

En consecuencia, a la vista de la información aportada en el documento D01 resultaría obvio para un experto en la materia el propósito o intención de utilizar un animal no humano knockout para los genes Vav1 y/o RasGRF2 como modelo experimental para aplicaciones biomédicas, entre ellas el tratamiento o prevención de desordenes proliferativos de las células T como por ejemplo los linfomas. En este sentido, esta Oficina considera que las reivindicaciones 1-12 carecen de actividad inventiva