



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 346 280**

② Número de solicitud: 200900084

⑤ Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

② Fecha de presentación: **13.01.2009**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **13.10.2010**

④ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
13.10.2010

⑦ Solicitante/s:
Universidad Autónoma de Madrid (Titular al 95 %)
Ciudad Universitaria - Cantoblanco
c/ Einstein, 13 - Pabellón C 2
28049 Madrid, ES
Instituto de Salud Carlos III (Titular al 5 %)

⑦ Inventor/es: **Fernández Piqueras, José;**
Santos Hernández, Javier;
Villa Morales, María;
González Sanches, Laura;
Fresno, Manuel y
Fernández Navarro, Pablo

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de neoplasias de células T.**

⑦ Resumen:

Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de neoplasias de células T.

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biología molecular y la medicina. Específicamente se refiere a un método para obtener datos útiles para el diagnóstico de neoplasias de células T. Asimismo, la presente invención se refiere a un método de diagnóstico de neoplasias de células T. Además, la presente invención se refiere a un kit para llevar a cabo dichos métodos.

ES 2 346 280 A1

DESCRIPCIÓN

Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de neoplasias de células T.

5 La presente invención se encuadra dentro del campo de la biología molecular y la medicina. Específicamente se refiere a un método para obtener datos útiles para el diagnóstico de neoplasias de células T. Asimismo, la presente invención se refiere a un método de diagnóstico de neoplasias de células T. Además, la presente invención se refiere a un kit para llevar a cabo dichos métodos.

10 Estado de la técnica anterior

Anexina A1 (ANXA1) es una proteína de interacción con fosfolípidos de manera dependiente de calcio implicada en la regulación de la proliferación y la apoptosis celular (Lim *et al.* FASEB J 2007; 21: 968-75). Sin embargo, los mecanismos por medio de los cuales ANXA1 regula estos procesos son en gran medida desconocidos. Se ha descrito el aumento o la disminución de la expresión de ANXA1 en diferentes tumores sólidos (Kumble *et al.* Cancer Res 1992; 52: 163-7; Ahn *et al.* Clin Exp Metástasis 1997; 15:151-6. Loging *et al.* Genome Res 2000; 10: 1393-402; Paweletz *et al.* Cancer Res 2000; 60: 6293-7; Hippo *et al.* Cancer Res 2001; 61: 889-95; Shen *et al.* (2005). Biochem Biophys Res Commun 2005; 326: 218-27; Silistino-Souza *et al.* Int J Cancer 2007; 120: 2582-9). Asimismo, se ha encontrado disminuida la expresión de ANXA1 en linfomas de células B (Vishwanatha *et al.* BMC Cancer 2004; 4: 1-8). Notablemente, las alteraciones de la expresión de ANXA1 siempre han sido observadas en las células tumorales *per se*.

El linfoma linfoblástico de tipo T (LLB-T) representa aproximadamente el 15% de todos los casos de linfoma linfocítico agudo en niños y aproximadamente el 25% de todos los casos en adultos. Es más común en los últimos años de la niñez, en la adolescencia y en los primeros años de la edad adulta, y se observa con mayor frecuencia en los hombres. El linfoma linfoblástico a menudo comienza como una masa grande en el área torácica, que se mueve rápidamente hacia la médula ósea. Se llama linfoma si en la médula ósea hay menos de un 25% de blastocitos y una masa mediastínica o hay una masa en otro lugar del cuerpo, y se denomina leucemia linfoblástica aguda de tipo T (LLA-T) si en la médula ósea hay más de un 25% de blastocitos. Se considera que es una forma muy agresiva de linfoma. El tratamiento consiste en quimioterapia intensiva, que a menudo comprende el trasplante de células madre y puede incluir radioterapia.

El diagnóstico morfológico de los diferentes tipos de linfomas desempeña un papel fundamental en la toma de decisiones terapéuticas y define, en cierta medida, el futuro de la vida del paciente, señalando riesgos, factores pronósticos o evolución esperada. En hematopatología, uno de los campos reconocidos de mayor dificultad diagnóstica, las diferencias existentes entre procesos muy diferentes pueden ser escasas, ausentes o artefactuales. Por tanto, es conveniente disponer del mayor número posible de herramientas que permitan el diagnóstico de los diferentes tipos de linfoma de manera precisa y eficaz.

40 Explicación de la invención

La presente invención se refiere a un método para obtener datos útiles para el diagnóstico de neoplasias de células T. Asimismo, la presente invención se refiere a un método de diagnóstico de neoplasias de células T. Además, la presente invención se refiere a un kit para llevar a cabo dichos métodos.

En la presente invención se identifica el gen de ANXA1 (*ANXA1*) como uno de los genes de susceptibilidad al desarrollo de linfomas linfoblásticos T inducidos con radiación gamma, de tal manera que se observa una subida de su expresión como respuesta inmediata a la radiación, pero una bajada significativa en los linfomas linfoblásticos de células T inmaduras. Sorprendentemente, a diferencia de lo observado en linfomas de células B y en otros tipos de tumores sólidos, ANXA1 se expresa en las células estromáticas del timo y no en las células tumorales *per se*. Por tanto, ANXA1 puede ser empleada como marcador tumoral de neoplasias de células T, y en particular, de linfomas linfoblásticos de tipo T.

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de neoplasias de células T que comprende:

- a. obtención de una muestra biológica aislada,
- b. análisis de la cantidad del producto de la expresión del gen *ANXA1* en la muestra obtenida en (a) y
- c. comparación de la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia.

Preferiblemente, los pasos (b) y/o (c) del método pueden ser total o parcialmente automatizados, por ejemplo, por medio de un equipo robótico sensor para la detección de la cantidad en el paso (b) o la comparación computerizada en el paso (c).

Además de los pasos especificados anteriormente puede comprender otros pasos adicionales, por ejemplo relacionados con el pre-tratamiento de la muestra o la evaluación de los resultados obtenidos mediante este método.

Otro aspecto de la presente invención, se refiere a un método de diagnóstico de neoplasias de células T que comprende los pasos (a)-(c) mencionados anteriormente, y que además comprende un paso (d) donde una cantidad detectada en el paso (b) del producto de expresión del gen *ANXA1* menor que la cantidad de referencia con la que se compara en el paso (c) es indicativa de la presencia de una neoplasia de células T.

5

El término “diagnóstico”, tal y como se utiliza en la presente invención, se refiere a la capacidad de detectar la presencia de una neoplasia de células T, cuando se aplica un método de clasificación de muestras basado en el análisis de la cantidad del producto de la expresión del gen *ANXA1* y en la comparación de la cantidad detectada con respecto a una cantidad de referencia. Esta detección tal y como es entendida por un experto en la materia no pretende ser correcta en un 100% de las muestras analizadas. Sin embargo, requiere que una cantidad estadísticamente significativa de las muestras analizadas sean clasificadas correctamente. La cantidad que es significativamente estadística puede ser establecida por un experto en la materia mediante el uso de diferentes herramientas estadísticas, por ejemplo, pero sin limitarse, mediante la determinación de intervalos de confianza, determinación del valor p, test de Student o funciones discriminantes de Fisher. Preferiblemente, los intervalos de confianza son al menos del 90%, al menos del 95%, al menos del 97%, al menos del 98% o al menos del 99%. Preferiblemente, el valor de p es menor de 0,1, de 0,05, de 0,01, de 0,005 o de 0,0001. Preferiblemente, la presente invención permite detectar correctamente la enfermedad en al menos el 60%, en al menos el 70%, en al menos el 80%, o en al menos el 90% de los sujetos de un determinado grupo o población analizada.

El término “linfoma linfoblástico de tipo T (LLB-T)”, según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (Harris *et al.* Annals of Oncology 1999; 10: 1419-1432), se refieren a un grupo heterogéneo de linfomas que generalmente afecta adolescentes o adultos jóvenes, cursan con un alto recuento de blastos en sangre periférica, masa mediastinal con síndrome de vena cava superior, rápida progresión, recaídas y compromiso del Sistema Nervioso Central. El linfoma linfoblástico a menudo comienza como una masa grande en el área torácica, que se mueve rápidamente hacia la médula ósea. Se llama linfoma, si en la médula ósea hay menos de un 25% de blastocitos y una masa mediastínica o hay una masa en otro lugar del cuerpo, y se denomina “leucemia linfoblástica aguda de tipo T (LLA-T)” si en la médula ósea hay más de un 25% de blastocitos. Se presenta con más frecuencia como forma tumoral que leucémica. En la afectación ganglionar puede haber compromiso parcial, con respeto de centros germinales y también presencia de un patrón pseudonodular. Puede haber cielo estrellado. En términos generales, los linfomas linfoblásticos de tipo T reflejan diferentes estadios en la diferenciación tímica. El linaje T es definido por la presencia de CD3 intracitoplasmático, o más raramente, de membrana. El fenotipo más comúnmente hallado es el estadio tardío cortical con expresión de CD1, CD2, CD5, CD7 y CD4/CD8 “doble positivo”, con expresión mínima de membrana de CD3. TdT es frecuentemente positivo. El fenotipo que sigue en frecuencia es el cortical temprano con expresión de CD2, CD5, CD7 y TdT intenso y CD4/CD8 “doble negativos”. Existen fenotipos más precoces, con expresión sólo de CD3 intracitoplasmático, CD7 y eventualmente CD34 y TdT. También puede encontrarse un fenotipo medular más maduro con segregación de CD4 y CD8, aunque es más raro. Algunas de las subvariedades tempranas pueden expresar CD10. También pueden aparecer marcadores mieloides aberrantes (Neoplastic Hematopathology. Knowles DM *et al.* Second Edition. 2001. Lippincott Williams & Wilkins). De aquí en adelante el término “linfoma linfoblástico de células T” será empleado para tanto para la forma tumoral (LLB-T) como para la forma leucémica (LLA-T).

40

La presente invención se refiere a un método de obtención de datos útiles para el diagnóstico, así como a un método de diagnóstico, de una neoplasia de células T como, por ejemplo, pero sin limitarse, leucemia linfoblástica aguda de tipo T y linfoma linfoblástico de tipo 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. Preferiblemente, la neoplasia de células T es un linfoma linfoblástico de tipo T. Más preferiblemente, el linfoma linfoblástico de tipo T tiene el inmunofenotipo CD4+CD8+.

50

El término “producto de la expresión”, tal y como se utiliza en la descripción, hace referencia a sus productos de transcripción o expresión (ARNm o proteína). O a cualquier forma resultante del procesamiento de dichos productos de transcripción o expresión.

La detección de la cantidad de producto de la expresión del gen *ANXA1* en la muestra obtenida, tal y como se utiliza en la descripción, hace referencia a la medida de la cantidad o la concentración, preferiblemente de manera semi-cuantitativa o cuantitativa. La medida puede ser llevada a cabo de manera directa o indirecta. La medida directa se refiere a la medida de la cantidad o la concentración del producto de la expresión del gen basada en una señal que se obtiene directamente del producto de la expresión del gen y que está correlacionada directamente con el número de moléculas del producto de la expresión del gen presente en la muestra. Dicha señal - a la que también podemos referirnos como señal de intensidad - puede obtenerse, por ejemplo, midiendo un valor de intensidad de una propiedad química o física del producto de expresión. La medida indirecta incluye la medida obtenida de un componente secundario (por ejemplo, un componente distinto del producto de la expresión génica) o un sistema de medida biológica (por ejemplo la medida de respuestas celulares, ligandos, “etiquetas” o productos de reacción enzimática).

65

De acuerdo con la presente invención, la detección de la cantidad de producto de la expresión del gen *ANXA1* puede ser llevada a cabo por cualquier método de determinación de la cantidad del producto de la expresión del gen. En una realización preferida, la detección del producto de la expresión del gen *ANXA1* se realiza determinando el

ES 2 346 280 A1

nivel de ARNm derivado de su transcripción donde el análisis del nivel de ARNm 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 encadena de la polimerasa (RT-PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qRT-PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la ligasa (RT-LCR), o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos; chips de DNA elaborados con oligonucleótidos depositados por cualquier mecanismo; chips 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 otra realización preferida, la detección de la cantidad de producto de la expresión del gen *ANXA1* en la muestra obtenida se realiza determinando el nivel de la proteína *ANXA1* o fragmentos de la misma, 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.

El término “anticuerpo” tal y como se utiliza en la presente invención incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos recombinantes de anticuerpos, combibodies, fragmentos Fab y scFv de anticuerpos, así como los dominios de unión a ligando.

El término “cantidad”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la cantidad absoluta o relativa del producto de la expresión del gen *ANXA1*, así como a cualquier otro valor o parámetro relacionado con la misma o que pueda derivarse de ésta. Dichos valores o parámetros comprenden valores de intensidad de la señal obtenidos a partir de cualquiera de las propiedades físicas o químicas de los productos de expresión de los genes especificados obtenidos mediante medida directa, por ejemplo, valores de intensidad de espectroscopia de masas o resonancia magnética nuclear.

Adicionalmente, dichos valores o parámetros incluyen todos aquellos obtenidos mediante medida indirecta, por ejemplo, cualquiera de los sistemas de medida descritos en otra parte del presente documento.

El término “comparación”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere pero no se limita, a la comparación de la cantidad del producto de la expresión del gen *ANXA1* de la muestra biológica a analizar con una cantidad de una fuente de referencia deseable descrita en otra parte de esta descripción. La comparación descrita en el apartado (b) del método de la presente invención puede ser realizada manualmente o asistida por ordenador.

El término “cantidad de referencia”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a la cantidad del producto de expresión que permite discriminar un linfoma linfoblástico de tipo T de otros linfomas de células T. Preferiblemente, dicha cantidad de referencia define una cantidad umbral. Las cantidades de referencia o umbrales adecuadas pueden ser determinadas por el método de la presente invención a partir de una muestra de referencia que puede ser analizada, por ejemplo, simultánea o consecutivamente, junto con la muestra biológica problema. Más preferiblemente, la cantidad umbral puede derivarse de los límites de distribución normal de una cantidad fisiológica encontrada en una población de sujetos control. Dicha cantidad umbral fisiológica puede ser determinada por varias técnicas bien conocidas, como por ejemplo, el cálculo de la media del producto de la expresión del gen encontrado en una población de sujetos control.

El término “muestra biológica aislada”, tal y como se utiliza en la descripción se refiere, pero no se limita, a tejidos y/o fluidos biológicos de un sujeto, obtenidos mediante cualquier método conocido por un experto en la materia que sirva para tal fin. Preferiblemente, la muestra biológica puede ser un tejido, por ejemplo, pero sin limitarse, una biopsia tumoral o un aspirado por aguja fina. Más preferiblemente, la muestra biológica es del timo o de los ganglios linfáticos. Aún más preferiblemente, la muestra biológica es del timo. El término “sujeto”, tal y como se utiliza en la descripción, se refiere a animales, preferiblemente mamíferos, y más preferiblemente, humanos.

En una realización preferida, el análisis de la cantidad del producto de la expresión del gen de *ANXA1* se realiza en el estroma o en una fracción enriquecida en células del mismo. El término “estroma” tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a aquellos elementos celulares y fibras de matriz extracelular que acompañan a los timocitos que hacen posible su supervivencia, proliferación y diferenciación. Entre los elementos celulares pueden encontrarse células epiteliales, fibroblastos, macrófagos, células dendríticas o células endoteliales.

Otro aspecto de la presente invención es un kit o dispositivo adaptado para llevar a cabo el método de la invención que comprende los elementos necesarios para:

- a. análisis de la cantidad producto de la expresión del gen *ANXA1* en la muestra obtenida y
- b. comparación de la cantidad detectada en el paso (a) con una cantidad de referencia.

Dicho kit puede comprender cebadores, sondas y todos aquellos reactivos necesarios para analizar la variación en el nivel de expresión del gen *ANXA1* por medio de cualquiera de los métodos descritos anteriormente en este documento.

El kit además puede incluir, sin ningún tipo de limitación, el uso de tampones, polimerasas, cofactores para obtener una actividad óptima de éstas, agentes para prevenir la contaminación, etc. Por otro lado el kit puede incluir todos los soportes y recipientes necesarios para su puesta en marcha y optimización. Preferiblemente, el kit comprende además las instrucciones para llevar a cabo el método de la invención.

5 Una realización preferida de la presente invención se refiere a un kit de la invención para la detección de los niveles de expresión de ARNm mediante una técnica, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, perteneciente al siguiente grupo: análisis *Northern blot*, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR), reacción en cadena de la ligasa en tiempo real (RT-LCR), hibridación o *microarrays*.

10 Otra realización preferida de la invención se refiere a un kit de la invención para la detección de los niveles de expresión de ARNm que consiste, a título ilustrativo y sin que limite la invención, en un *microarray* de ADN, un *gene-chip* de ADN o un *chip* microelectrónico de ADN, que comprenda sondas génicas.

15 Otra realización preferida de la invención se refiere a un dispositivo diagnóstico de la invención para la detección de los niveles de expresión de proteína mediante una técnica, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, perteneciente al siguiente grupo: ELISA, *Western blot* o dispositivo tipo *biochip* o *microarray* de proteínas que incluyan anticuerpos específicos.

20 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

30 Figura 1. Muestra los análisis realizados para la identificación de *Anxa1* como candidato para gen de resistencia en la región *Tlyr1*. (A) Incidencia de tumores en la cepa subcongénica de ratón *Tlyr1*. Los segmentos cromosómicos de la cepa C57BL/6J se indican como rectángulos abiertos. Los negros corresponden a segmentos de la cepa SEG/Pas. Los valores de Chi-cuadrado y las probabilidades asociadas *P* se calcularon comparando la incidencia tumoral en las cepas congénitas y subcongénicas con respecto a la incidencia en C57BL/6J. (B) El análisis de expresión en timo de los 9 genes localizados en *Tlyr1a*, se hizo mediante RT-PCR. (C) Análisis mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real de los 6 genes que se expresan en timo. Los resultados se muestran como los valores medios \pm la desviación estándar (SD) de tres experimentos independientes. Barras en gris claro, timos no tratados de C57BL/6J (usados como controles). Barras en negro, timos no tratados de NRH1. Barras blancas, timos de C57BL/6J tratados con radiación gamma (1,75 Gy). Barras en gris oscuro timos de NRH1 tratadas con radiación gamma (1,75 Gy). Las diferencias significativas se determinaron mediante un análisis de la desviación de la varianza (*one-way ANOVA*) con un test de comparación múltiple Bonferroni. **P*<0,0001.

45 Figura 2. Muestra *Western blots* representativos de la expresión de *Anxa1* en células estromáticas de timo (TSCs) y timocitos (Thy) de ratones NRH1 y C57BL/6J tratados con 1,75 Gy de radiación gamma (panel izquierdo), y de ratones que no desarrollaron linfoma tímico después del periodo de latencia (NO TL) y ratones que si desarrollaron tumor (TL) (panel derecho). Los valores de expresión de la proteína se estimaron mediante densitometría a partir de los *Western blots* (*Scion Image software*, *Scion Corporation*). Los números debajo de cada banda representan la cantidad de ANXA1 en relación con la de beta-actina (control interno) normalizada con respecto a la cantidad de *Anxa1* en muestras de timo no tratados.

50 Figura 3. Muestra un análisis representativo de SSCP del gen *Anxa1* en linfomas tímicos inducidos con radiación en híbridos F1(NRH1xC57BL/6J). Los tres primeros carriles a la izquierda representan muestras control de las cepas parentales C57BL/6J (B6) y NRH1 (N1) y el híbrido (F1). Los restantes carriles corresponden a linfomas inducidos en híbridos F1. Las muestras 2,3,4,9 y 10 han perdido el alelo B6 (-B6). Las 5,14 y 15 han perdido el alelo SEG/Pas (-S).

55 Figura 4. Muestra como los timocitos de NRH1 y C57BL/6J tratados con radiación gamma experimentan parada diferencial en G1 y apoptosis. (A) Gráficas representativas de distribución en ciclo celular mediante tinción con yoduro de propicio (PI) y citometría de flujo. Los timocitos no tratados de C57BL/6J se utilizaron como controles. ^a*P*<0,007, ^b*P*<0,004, ^c*P*<0,0001 comparados con el valor correspondiente en timocitos control. ^d*P*<0,026, ^e*P*<0,007, ^f*P*<0,002 comparados con los valores correspondientes de timocitos C57BL/6J tratados con radiación gamma (1,75 Gy). (B) Experimento representativo de la inducción de apoptosis estimada mediante ensayo TUNEL. Las barras horizontales indican el porcentaje de células apoptóticas. ^a*P*<0,0001 comparados con los valores correspondientes de timocitos control C57BL/6J; ^b*P*<0,002 comparados con los valores correspondientes de timocitos C57BL/6J tratados con radiación gamma (1,75 Gy). (C-D) Análisis mediante citometría de flujo de la expresión de CD4 y CD8. DP: CD4+CD8+. SP4: CD4+CD8-. SP8: CD8+CD4-. ^a*P*<0,0001 comparados con los valores correspondientes de células DPcontrol; ^b*P*<0,015 comparados con los valores correspondientes de células DP de C57BL/6J tratadas con radiación gamma (ANOVA con post-test Bonferroni). Los números bajo las gráficas en A y B representan el porcentaje medio de células \pm SD después de tres experimentos independientes. Los datos cuantitativos encima de las gráficas en C representan

los valores medios absolutos \pm SD de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante ANOVA con post-test Bonferroni.

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

Identificación del gen Anxa1 como candidato a gen de susceptibilidad al desarrollo de linfomas tímicos inducidos con radiación

Mapa de alta resolución de la región Tlyr1.- Como paso previo para la identificación de genes candidatos al desarrollo de linfomas tímicos inducidos con radiación (RITL), en este trabajo se ha construido un mapa de alta resolución de la región Tlyr1. La fase inicial consistió en la generación de haplotipos recombinantes congénicos (*nested recombinant haplotypes*, NRHs) para la región Tlyr1 mediante retrocruzamientos de ratones macho heterocigóticos congénicos para SEG/Pas (*Mus spretus*) en esta región (denominados (B6.Tlyr1SEG x B6) F1) con hembras de la cepa susceptible C57BL/6J, seguidos por intra-cruzamientos finales para conseguir la homocigosis. De esta manera se generaron tres cepas sub-congénicas diferentes (NRH1, NRH2 y NRH3), portadoras de fragmentos no-solapantes que cubrían la totalidad de la región Tlyr1 (Tlyr1a, Tlyr1b, y Tlyr1c) (Figura 1A). Para analizar la incidencia de RITL los ratones de la cepa congénica S6.Tlyr1SEG, de las cepas subcongénicas NRH, y de la cepa C57BL/6J (como referencia) fueron sometidos a dosis subletales y fraccionadas de radiación gamma (4 x 1,75 Gy). Para descartar la bien documentada diferencia en incidencia de RITL descrita entre los dos sexos (Mori *et al.* J Radiat Res 2000; 41:367-72), solo se analizó la incidencia de tumores en las hembras. Aunque las tres sub-regiones contribuían a una reducción de RITL, los datos fueron solo significativos con los ratones NRH1 (Figura 1A). Por tanto, nuestra búsqueda se centró en la región Tlyr1a, que contiene un segmento cromosómico de SEG/Pas de aproximadamente 3,2 Mb delimitado por los marcadores D19Mit41 y D19Mit96.

El gen que codifica la proteína Anxa1 es un buen candidato.- Una vez seleccionada la región Tlyr1a, el análisis *in silico* indicó la presencia de nueve genes anotados en esta región. Por tanto, el paso siguiente fue comprobar cuales de ellos se expresaban en el timo. Los análisis de RT-PCR demostraron que solo 6 de los 9 genes eran capaces de expresarse en timo (Figura 1B). Para ver si estos genes presentaban patrones diferenciales de expresión en respuesta a 1,75 Gy de radiación gamma, se estimaron los niveles de expresión transcripcional mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real en timos de ratones NRH1 y C57BL/6J. Sólo el gen Anxa1 presentó unos niveles de expresión significativamente diferentes (Figura 1C). Aparte de las diferencias cuantitativas, el análisis comparativo de la secuencia codificante de este gen entre NRH1 y C57BL/6J evidenció un cambio no-conservativo de un nucleótido (T689A) (*GeneBank accession number EU684130*; SEQ ID NO: 1) que se traduce en la variación de un aminoácido en la proteína (Tyr230Phe) que podría tener consecuencias en la actividad biológica de la proteína (Anxa1^{Tyr} en NRH1 y Anxa1^{Phe} en C57BL/6J). La acumulación de diferencias cualitativas y cuantitativas estaba indicando que el gen Anxa1 podría ser un buen candidato a gen de susceptibilidad en la región Tlyr1a.

Ejemplo 2

Análisis de la expresión de Anxa1 en diferentes fracciones del timo, enriquecidas en timocitos o células estromáticas

Los niveles de expresión de Anxa1 son mucho más elevados en el estroma tímico de los ratones NRH1 en respuesta a una dosis sub-letal de radiación gamma.- Puesto que el timo es un órgano complejo compuesto de timocitos y células estromáticas, se analizaron los patrones de expresión de este gen en fracciones separadas conteniendo solo timocitos o enriquecidos en células estromáticas. Los resultados demostraban que el gen Anxa1 se expresaba esencialmente en la fracción enriquecida en células estromáticas (TSC) mientras que era prácticamente imperceptible en timocitos. Además, los tratamientos con una dosis subletal de radiación inducían niveles más altos de expresión del gen en TSCs de ratones NRH1 que en los de C57BL/6J (Tabla 1). Estos resultados fueron confirmados mediante análisis de las proteínas (Tabla 1 y Figura 2).

ES 2 346 280 A1

TABLA 1

Efecto de la radiación gamma sobre la expresión del gen *Anxa1* expresión en timocitos y células del estroma tímico

Tratamiento con radiación gamma	Grupo experimental	Tipo celular	Expresión normalizada de RNA de <i>Anxa1</i> (media \pm SD)	N	Expresión normalizada de proteína ANXA1 (media \pm SD)	N
No	C57BL/6J (control)	Células del estroma tímico	3,53 \pm 0,22	3	1,20 \pm 0,26	3
		Timocitos	0,20 \pm 0,08		0,43 \pm 0,09	
	NRH1	Células del estroma tímico	3,64 \pm 0,26	3	1,40 \pm 0,17	3
		Timocitos	0,16 \pm 0,08		0,50 \pm 0,10	
1 x 1,75 Gy	C57BL/6J	Células del estroma tímico	7,43 \pm 0,20 ^a	3	2,30 \pm 0,21 ^c	3
		Timocitos	0,26 \pm 0,07		0,44 \pm 0,06	
	NRH1	Células del estroma tímico	9,39 \pm 0,08 ^{a,b}	3	3,50 \pm 0,31 ^{c,d}	3
		Timocitos	0,23 \pm 0,07		0,50 \pm 0,17	
4 x 1,75 Gy	C57BL/6J (No TL)	Células del estroma tímico	3,48 \pm 0,31	10	1,06 \pm 0,16	5
		Timocitos	0,10 \pm 0,06		0,34 \pm 0,12	
	C57BL/6J (TL)	Células del estroma tímico	2,43 \pm 0,29 ^a	10	0,46 \pm 0,14 ^c	5
		Timocitos	0,11 \pm 0,08		0,39 \pm 0,17	
	NRH1 (No TL)	Células del estroma tímico	3,30 \pm 0,33	10	1,14 \pm 0,19	5
		Timocitos	0,10 \pm 0,07		0,35 \pm 0,14	
	NRH1 (TL)	Células del estroma tímico	2,22 \pm 0,27 ^a	10	0,49 \pm 0,16 ^c	5
		Timocitos	0,08 \pm 0,04		0,32 \pm 0,15	

N es el tamaño de la muestra analizada. No TL representa ratones irradiados que no desarrollaron linfomas tímicos después del periodo de latencia. TL indica ratones que desarrollaron linfomas tímicos. Los datos se muestran como la media \pm la desviación estándar (SD) de los valores normalizados obtenidos en tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticas se determinaron mediante análisis de la desviación de la varianza (*one-way ANOVA*) con corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples.

^a $P < 0,0001$ comparado con el valor correspondiente de la expresión de RNA en estroma control.

^b $P < 0,0001$ comparado con el valor correspondiente de la expresión de RNA en estroma de ratones C57BL/6J tratados con 1,75Gy.

^c $P < 0,005$ comparado con el valor correspondiente de la expresión de proteína en estroma control.

^d $P < 0,003$ comparado con el valor correspondiente de la expresión de proteína en estroma de ratones C57BL/6J tratados con 1,75Gy.

La expresión de *Anxa1* está también alterada en el estroma de los timos de ratones con linfomas linfoblásticos de células T.- La exposición de los ratones a dosis fraccionadas de 1,75 Gy produce linfomas tímicos, sobre todo de tipo linfoblástico, que se caracterizan por la expansión incontrolada de timocitos inmaduros (Diamond *et al.* Mol Cell Biol 1988; 8: 2233-6). Para saber más sobre el papel del gen *Anxa1* en el desarrollo de RITL, se estudió la expresión de este gen en las dos fracciones celulares mencionadas de los timos (TSCs y timocitos) en ratones tratados que desarrollaron linfomas tímicos (portadores de RITL) (en todos los casos linfomas linfoblásticos de células T) y en ratones tratados que no llegaron a desarrollar linfomas una vez finalizado el periodo de latencia. Los resultados evidenciaron que, con independencia del genotipo, las TSCs de los linfomas mostraron una reducción significativa en los niveles de expresión transcripcional de *Anxa1* con respecto a los valores observados en las TSCs de los ratones no tratados (Tabla 1). Sin

embargo, no se observaron diferencias significativas entre las TSCs de ratones tratados que no llegaron a desarrollar linfomas y las TSCs control. La cantidad de proteína ANXA1 también disminuyó significativamente en las TSCs de los linfomas tímicos analizados (Tabla 1 y Figura 2). Llegado este punto hay que hacer constar que al secuenciar el cDNA de *Anxa1* no se encontró ninguna mutación en las muestras tumorales. Sin embargo, los análisis de LOH si evidenciaron frecuentes pérdidas alélicas en los linfomas inducidos en ratones NRH1 heterocigóticos (10 de 22, 45,4%), indicando que la reducción en los niveles de expresión del gen se podían atribuir, al menos en parte, a la delección de un alelo (Figura 3).

10 Ejemplo 3

Efecto del diferente nivel de expresión de Anxa1 sobre el ciclo celular y la apoptosis de timocitos inmaduros

15 *La radiación gamma produce parada celular en G1 y apoptosis de timocitos en ratones NRH1.*- Puesto que la radiación ionizante es capaz de inducir parada de ciclo y apoptosis en las células tratadas, se analizó si el efecto producido por los diferentes niveles de expresión del gen *Anxa1* (que se habían encontrado en las TSCs de los timos de ratones NRH1 y C57BL/6J tratados con 1,75 Gy) consistía también en alteraciones del ciclo celular y/o apoptosis en los timocitos de estos mismos ratones. En primer lugar, se estudió el ciclo celular y las tasas de apoptosis en timocitos extraídos 24 horas después del tratamiento con radiación gamma. El ciclo celular se analizó mediante tinción con PI y citometría de flujo (Figura 4A). Se detectó un incremento significativo de timocitos NRH1 en la fase G1 (parada en G1) con respecto a los timocitos de C57BL/6J, evidenciándose un efecto diferencial de la radiación entre estas dos cepas. Esta parada en G1 iba acompañada por un incremento significativo en la población celular sub-G1 de los timocitos NRH1. Después se determinaron los niveles de apoptosis inducida mediante ensayo TUNEL y citometría de flujo (Figura 4B). El tratamiento con 1,75 Gy inducía de manera significativa mayores tasas de apoptosis en timocitos de ratones NRH1 que en los de C57BL/6J. El porcentaje de células TUNEL-positivas era muy similar al de células en sub-G1 en todas las muestras (Figuras 2A-B), indicando que la fracción sub-G1 consistía básicamente en timocitos apoptóticos, como ya se había sugerido por otros autores (Nicoletti *et al.* J. Immune Methods 1991; 139: 271-9). Merece destacar el hecho de que los niveles de expresión de *Anxa1* en las TSCs estaban correlacionados positivamente con la tasa de parada en G1 ($R^2=0,948$, $P=0,018$) y las tasas de apoptosis de los timocitos ($R^2=0,963$, $P=0,013$). Por otro lado, se sabe que los timocitos inmaduros, sobre todo los CD4+CD8+, experimentan apoptosis fácilmente en respuesta a la radiación gamma (Yang *et al.* J Clin Immunol 1999; 19: 337-49). Por tanto, si los niveles de la expresión del gen *Anxa1* y la tasa de apoptosis de los timocitos están correlacionados positivamente, el incremento en los niveles de expresión de *Anxa1* debería provocar una reducción en el número de timocitos CD4+CD8+. Y, efectivamente, los análisis pertinentes demostraron que el tratamiento con 1,75 Gy producía una disminución altamente significativa de timocitos CD4+CD8+ en los ratones NRH1 con respecto a los timocitos de C57BL/6J (Figuras 4C-D) reflejándose, posiblemente, las diferencias existentes entre los niveles de expresión del gen *Anxa1* en las TSCs de ambas cepas ($R^2=0,956$, $P=0,02$).

40 *Materiales y métodos*

Inducción de linfomas tímicos.- Se han utilizado ratones C57BL/6J adquiridos en *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, USA). También cepas congénicas B6.*Tyrl*/SEG (Santos *et al.* Oncogene 2002; 21: 6680-3). Los experimentos se hicieron de acuerdo con la *European Commission Guidelines* (Directiva 86/609/CEE) para el uso de animales de laboratorio. Se realizó mediante exposición de todo el cuerpo de ratones de 4-5 semanas a cuatro dosis de 1,75 Gy (una a la semana). Una vez finalizado el tratamiento, los ratones se observaron durante un periodo de latencia de hasta 25 semanas para detectar el desarrollo de los tumores (Santos *et al.* Oncogene 2002; 21:6680-3).

Separación de fracciones celulares del timo.- Las muestras de timo se disgregaron mecánicamente y se filtraron a través de una malla de nylon (BD Biosciences) para aislar los timocitos. Las fracciones enriquecidas en células de estroma se trataron con colagenasa (Gray *et al.* J Immune Methods 2002; 260: 15-28) y las células CD45- se separaron por inmuno-magnetismo utilizando *anti-CD45-conjugated paramagnetic micro-beads*, siguiendo las instrucciones del proveedor (Miltenyi Biotech).

RT-PCR estándar.- La expresión transcripcional de los genes contenidos en la región *Tyrl1a* se realizó mediante RT-PCR convencional utilizando el *SuperScript First-Strand Synthesis System* (Invitrogen). El gen de la glucosa-6-fosfato-1-deshidrogenasa (*G6pd*) fue utilizado como control interno. En la tabla 2 se indican los cebadores utilizados, que fueron diseñados por TibMolBiol (Berlin, Germany). Los productos de la RT-PCR se visualizaron con bromuro de etidio en geles de agarosa al 1,5%.

60

65

ES 2 346 280 A1

TABLA 2

Secuencias de los cebadores utilizados en los experimentos de RT-PCR

Gen	Secuencias de cebadores (5'→3')	Tamaño (pb)
Trpm6	directo	SEQ ID NO: 2
	inverso	SEQ ID NO: 3
Rorb	directo	SEQ ID NO: 4
	inverso	SEQ ID NO: 5
Anxa1	directo	SEQ ID NO: 6
	inverso	SEQ ID NO: 7
Aldh1a7	directo	SEQ ID NO: 8
	inverso	SEQ ID NO: 9
Tmc1	directo	SEQ ID NO: 10
	inverso	SEQ ID NO: 11
Zfand5	directo	SEQ ID NO: 12
	inverso	SEQ ID NO: 13
Gda	directo	SEQ ID NO: 14
	inverso	SEQ ID NO: 15
Cgi67	directo	SEQ ID NO: 16
	inverso	SEQ ID NO: 17
Tmem2	directo	SEQ ID NO: 18
	inverso	SEQ ID NO: 19
G6pd	directo	SEQ ID NO: 20
	inverso	SEQ ID NO: 21

Secuenciación de DNA.- El RNA se extrajo de los timos mediante *Tripure Reagent* (Roche). Se diseñó una pareja de cebadores a partir de la secuencia del cDNA de gen *Anxa1*: SEQ ID NO: 22 (directo) y SEQ ID NO: 23 (*inverso*). La transcripción inversa se hizo con el *Superscript First-Strand Synthesis System* (Invitrogen), y la PCR subsiguiente con el *Expand High Fidelity PCR System* (Roche). Las reacciones de secuenciación se hicieron en un secuenciador automático ABI Prism 310 (Applied Biosystems).

RT-PCR cuantitativa a tiempo real.- La cuantificación de los niveles de expresión transcripcional se hizo mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real con la tecnología *LightCycler* (Roche). Las reacciones de RT-PCR se hicieron con RNA total utilizando el *one-step LightCycler SYBR Green I kit* (Roche). Los cebadores están descritos en la Tabla 2. Los valores de expresión de cada gen se calcularon tomando como referencia los correspondientes al gen de la *G6pd* (usado como referencia) y normalizado con respecto a los valores obtenidos en timos control no tratados (*LightCycler Relative Quantification software*, Roche).

Análisis de pérdidas de heterocigosidad en el locus Anxa1.- Se realizaron análisis de LOH mediante PCR/SSCP con los cebadores: SEQ ID NO: 24 (directo) y SEQ ID NO: 25 (inverso). Tras la PCR, las muestras se mezclaron con tampón de carga (1:1) conteniendo 0,08N NaOH y 95% formamida. Las muestras se calentaron a 95°C durante 10 min, y se analizaron con geles de poliacrilamida 0,5xMDE (*Mutation Detection Enhancement*) (BioWhitaker) en tampón 0,6xTBE. Tras la electroforesis, los fragmentos de DNA se tiñeron con plata siguiendo un protocolo estándar.

ES 2 346 280 A1

5 *Western blotting.*- Las proteínas se extrajeron de los lisados celulares con *TriPure Reagent* (Roche), se separaron en 8-12 % SDS-PAGE y se caracterizaron mediante electroforesis en membranas de nitrocelulosa (BioRad). Con posterioridad se incubaron con *anti-ANXA1 antibody* (R&D Systems) (dilución 1:5000). La detección de beta-actina con un anticuerpo monoclonal anti-beta-actina (Sigma), a 1:10000 dilución, se utilizó como control. La incubación con anticuerpos secundarios acoplados a *horseradish peroxidase* se hizo utilizando un *donkey anti-goat antibody for ANXA1* (Santa Cruz Biotechnology) y un *sheepanti-mouse antibody* para beta-actina (GE Healthcare) (dilución 1:1000). Las bandas se detectaron mediante el *ECLTM Western Blotting Detection kit* (GE Healthcare). Los niveles de proteína se estimaron densitométricamente usando el *Scion Image program* (Scion Corp). Los valores se calcularon como la cantidad de proteína ANXA1 con respecto a la de beta-actina, y se normalizaron con respecto a la cantidad de ANXA1 en timos control.

15 *Tinción inmunofluorescente y análisis mediante citometría de flujo.*- Los timocitos recién aislados de ratones no tratados y tratados con 1,75 Gy fueron examinados mediante tinción inmunofluorescente y citometría de flujo. Se utilizó *fluorescein (FITC)-conjugated rat anti-mouse CD4* y *phycoerythrin (PE)-conjugated rat antimouse CD8a* (ambos de BD Pharmigen) para un análisis bi-color de células CD4 y CD8 en un *Coulter Epics XL-MCL flow cytometer* (Beckman Coulter). Además, se utilizó *biotin-conjugated rat anti-mouse CD4*, *PE-conjugated rat anti-mouse CD8a*, y *FITC-conjugated hamster anti-mouse CD3e* (BD Pharmigen) para un análisis de flujo tri-color en un *FACSCalibur flow cytometer* (BD Biosciences). Todos los anticuerpos se usaron con diluciones 1:100.

20 *Cuantificación de la apoptosis y ensayos TUNEL.*- Las células se fijaron en 3,7% formaldehído en PBS durante 20 min a 4°C y se permeabilizaron con 0,1% Tritón X-100 citrato sódico durante 5 min a 4°C. La tinción se realizó con las células en suspensión mediante un ensayo TUNEL comercial (Roche). El porcentaje de células apoptóticas se determinó con un *Coulter Epics XL-MCL flow cytometer* o un *FACSCalibur flow cytometer*.

25 *Análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo tras tinción con ioduro de propidio (PI).*- Las células fueron recogidas y fijadas en *ice-cold* etanol al 70%. Tras la tinción se resuspendieron en PBS conteniendo 50 microg/ml de RNase A (Sigma) durante 15 min a temperatura ambiente. Por último se añadió la solución PI de tinción (Sigma) a una concentración final de 50 microg/ml. El contenido en DNA se estimó con un *Coulter Epics XL-MCL flow cytometer* o un *FACSCalibur flow cytometer*.

30 *Análisis estadístico.*- Las diferencias en la incidencia de tumores inducidos en los diferentes grupos muestrales se estimaron mediante test de Chi-square (χ^2). Se consideraron significativos los valores de Probabilidad (P) $<0,0125$ (con la corrección de Bonferroni (α/N), siendo $\alpha = 0,05$ y N (número de comparaciones) =4). El test de Kolgomorov-Smirnov fue usado para estimar el ajuste a la normalidad de las series de datos, y el test de Levene para la homogeneidad de las varianzas. Para las comparaciones múltiples se realizó un análisis de desviación de la varianza (*one-way ANOVA*) con una comparación Bonferroni post-test. Todos los test estadísticos se hicieron con el software SPSS (versión 14.0).

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de neoplasias de células T que comprende:

5

- a. obtención de una muestra biológica aislada,
- b. análisis de la cantidad del producto de la expresión del gen *ANXA1* en la muestra obtenida en (a) y
- c. comparación de la cantidad detectada en el paso (b) con una cantidad de referencia.

10

2. Método de diagnóstico de neoplasias de células T que comprende los pasos (a)-(c) según la reivindicación 1, que además comprende un paso:

15

- d. asignación de la desviación observada en el paso (c) con la presencia de una neoplasia de células T.

3. Método según la reivindicación 2 donde en el paso (d) una cantidad detectada en el paso (b) del producto de expresión del gen *ANXA1* menor que la cantidad de referencia con la que se compara en el paso (c) es indicativa de la presencia de una neoplasia de células T.

20

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde la neoplasia de células T es un linfoma linfoblástico de tipo T.

25

5. Método según la reivindicación 4 donde el linfoma linfoblástico de tipo T tiene el inmunofenotipo CD4+ CD8+.

6. Método según las reivindicaciones 1 a 5 donde la muestra biológica es del timo o de los ganglios linfáticos.

30

7. Método según la reivindicación 6 donde la muestra biológica es del timo.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde el análisis de la cantidad del producto de la expresión del gen de *ANXA1* se realiza en el estroma de la muestra o en una fracción enriquecida en células del mismo.

35

9. Kit para llevar a cabo el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende los elementos necesarios para:

- a. análisis de la cantidad producto de la expresión del gen *ANXA1* en la muestra obtenida y
- b. comparación de la cantidad detectada en el paso (a) con una cantidad de referencia.

40

10. Kit según la reivindicación 9 que además comprende las instrucciones para llevar a cabo el método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

45

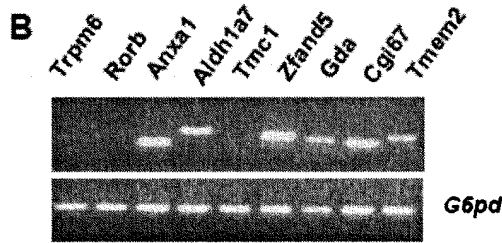
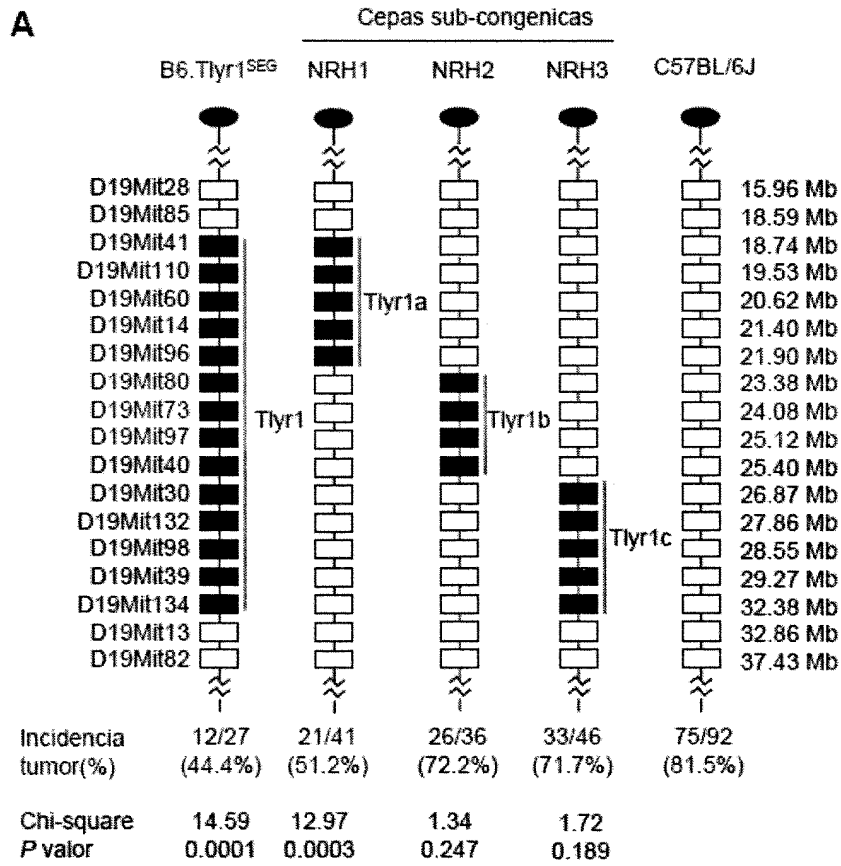
50

55

60

65

FIG.1



Niveles de RNA en timos no tratados

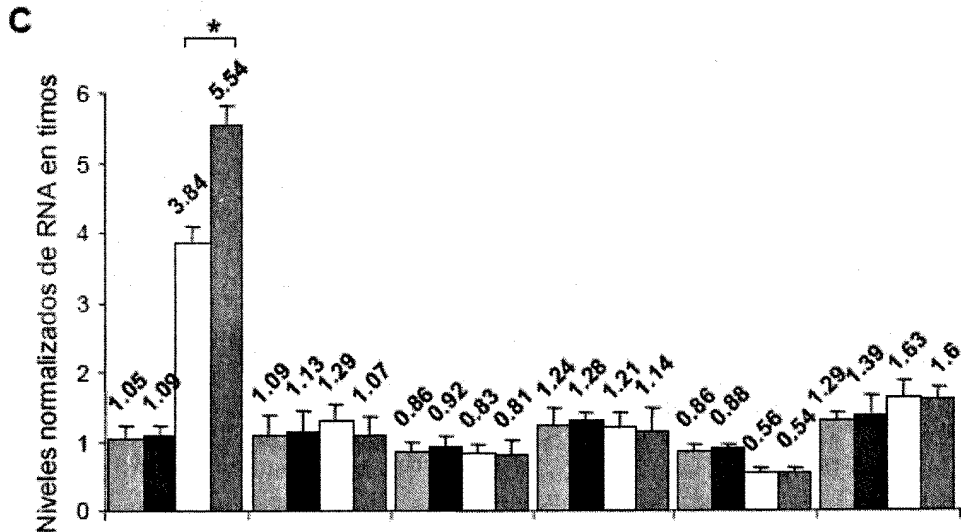
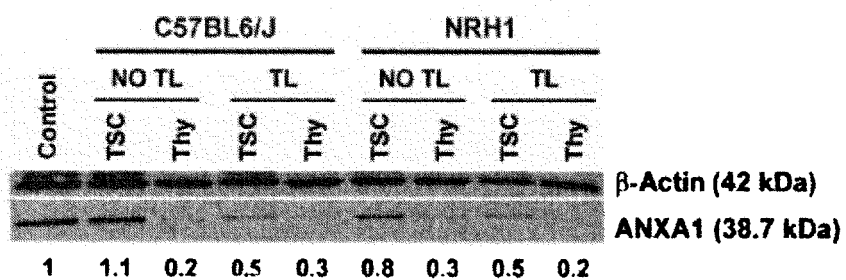


FIG.2

A.



B.

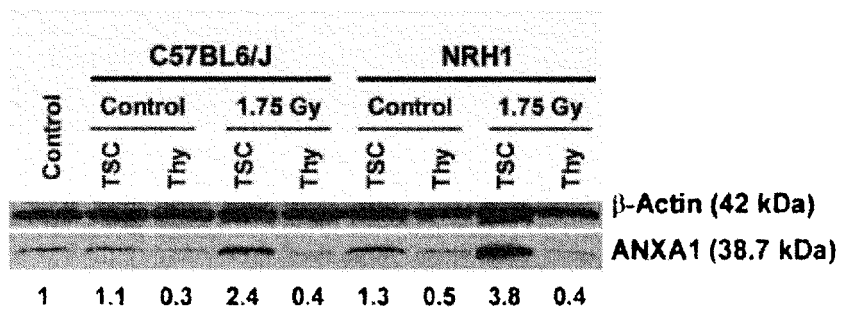


FIG.3

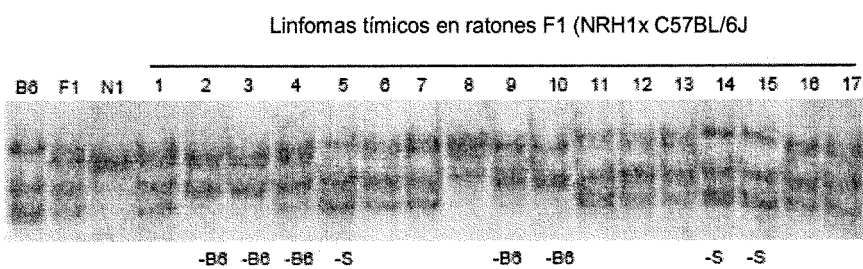
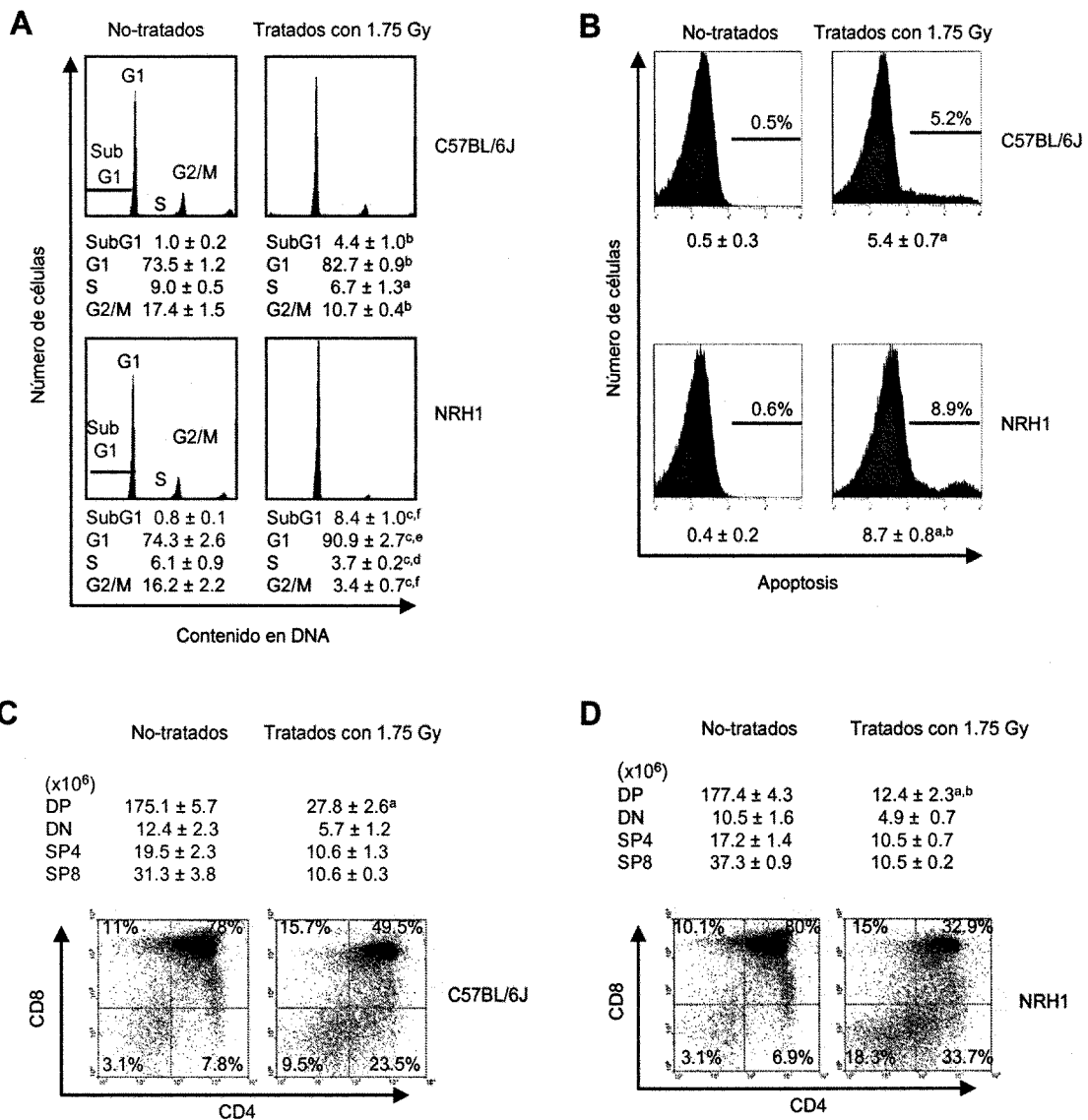


FIG. 4



ES 2 346 280 A1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad Autónoma de Madrid
Instituto de Salud Carlos III

5

<120> Método de obtención de datos útiles para el diagnóstico de neoplasias de células T

<130> ES1595.19

10

<160> 25

<170> PatentIn versión 3.5

15

<210> 1

<211> 1041

<212> DNA

20

<213> *Mus musculus*

<400> 1

25

atggcaatgg tatcagaatt cctcaagcag gcccgttttc ttgaaaatca agaacaggaa
60

tatgttcaag ctgtaaaatc atacaaaggt ggtcctgggt cagcagtgag cccctaccct
120

30

tccttcaatg taccctcgga tgttgctgcc ttgcacaaag ctatcatggt taaaggtgtg
180

gatgaagcaa ccatcattga cattcttacc aagaggacca atgctcagcg ccagcagatc
240

35

aaggccgcgt acttacagga gaatggaaag cccttgatg aagtcttgag aaaagccctt
300

acaggccacc tggaggaggt tgttttggt atgctaaaaa ctccagctca gtttgatgca
360

40

gatgaactcc gtggtgccat gaagggactt ggaacagatg aagacactct cattgagatt
420

ttgacaacaa gatctaacga acaaatcaga gagattaata gagtctacag agaagagctg
480

45

aaaagagatc tggccaaaga catcacttca gatacatctg gagactttcg gaaagccttg
540

cttgctcttg ccaaggggtga ccggtgtcag gacttgagtg tgaatcaaga tttggctgat
600

50

acagatgcca gggctttgta tgaagctgga gaaaggagaa aggggacaga cgtgaacgtg
660

ttcactacaa ttctgaccag caggagctat cctcatcttc gcagagtgtt tcagaattac
720

55

ggaaagtaca gtcaacatga catgaacaaa gctctggacc tggaaactgaa ggggtgacatt
780

gagaagtgcc tcacaacat cgtgaagtgt gccaccagca ctccagcttt ctttgccgag
840

60

aagctgtacg aagccatgaa gggcgccgga actcgccata aggcattgat caggattatg
900

gtctcccggt cggaattga catgaatgaa atcaaagtat ttaccagaa gaagtatgga

65

ES 2 346 280 A1

960

atctctcttt gccagccat cctggatgaa accaaaggag actatgaaaa aatcctggtg
1020

gctctgtgtg gtggaaacta g
1041

10 <210> 2

<211> 24

<212> DNA

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador directo para la secuencia del gen Trpm6 de *Mus musculus*

20 <400> 2

atgctgttca cttacacagt gttg
24

25 <210> 3

<211> 24

<212> DNA

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Cebador inverso para la secuencia del gen Trpm6 de *Mus musculus*

<400> 3

agtttccatg aggttccagt actc
24

40 <210> 4

<211> 24

<212> DNA

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> Cebador directo para la secuencia del gen Rorb de *Mus musculus*

<400> 4

55 gacatgactg ggatcaaaca gata
24

<210> 5

60 <211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

65 <220>

<223> Cebador inverso para la secuencia del gen Rorb de *Mus musculus*

ES 2 346 280 A1

<400> 5

gccagctgat ggagttcttc
20

5

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador directo para la secuencia del gen Anxa1 de *Mus musculus*

15

<400> 6

accaagagga ccaatgctca
20

20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso para la secuencia del gen Anxa1 de *Mus musculus*

30

<400> 7

cggagttcat ctgcatcaaa
20

35

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador directo para la secuencia del gen Aldh1a7 de *Mus musculus*

45

<400> 8

aagttaggcc ctgcccttag
20

50

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso para la secuencia del gen Aldh1a7 de *Mus musculus*

60

<400> 9

taatttgcca acctctgttg atc
23

65

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

ES 2 346 280 A1

<213> Secuencia Artificial

<220>

5 <223> Cebador directo para la secuencia del gen Tmc1 de *Mus musculus*

<400> 10

10 **tttccggcta cctctttcct**
20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Cebador inverso para la secuencia del gen Tmc1 de *Mus musculus*

<400> 11

25 **ggctgtttca gggttaccaa**
20

<210> 12

<211> 21

30 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Cebador directo para la secuencia del gen Zfand5 de *Mus musculus*

<400> 12

40 **ggacagctag tggttccaac a**
21

<210> 13

<211> 20

45 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

50 <223> Cebador inverso para la secuencia del gen Zfand5 de *Mus musculus*

<400> 13

55 **cacctctggt ttcgggtag**
20

<210> 14

<211> 20

60 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

65 <223> Cebador directo para la secuencia del gen gda de *Mus musculus*

ES 2 346 280 A1

<400> 14

tagtgacccc acgctttacc
20

5

<210> 15

<211> 29

<212> DNA

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso para la secuencia del gen gda de *Mus musculus*

15

<400> 15

tgtcagaaga ttgtttttat catagacat
29

20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador directo para la secuencia del gen Cgi67 de *Mus musculus*

30

<400> 16

ccaacagaga agaacctgta
20

35

<210> 17

<211> 23

<212> DNA

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso para la secuencia del gen Cgi67 de *Mus musculus*

45

<400> 17

aggtgagagg agaatgaaga ata
23

50

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

55 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador directo para la secuencia del gen Tmem2 de *Mus musculus*

60

<400> 18

tttgtcgggg agagtaggaa
20

65

<210> 19

<211> 20

ES 2 346 280 A1

<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Cebador inverso para la secuencia del gen Tmem2 de *Mus musculus*

<400> 19

10 **aagccaattg cactgctgta**
 20

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

15

20 <220>
<223> Cebador directo para la secuencia del gen G6pd de *Mus musculus*

<400> 20

25 **taatgagctg gtcacccgtg**
 20

<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

30

35 <220>
<223> Cebador inverso para la secuencia del gen G6pd de *Mus musculus*

<400> 21

40 **caggcttccc tgagttcatc**
 20

<210> 22
<211> 24
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

45

50 <220>
<223> Cebador directo para la secuencia del gen Anxa1 de *Mus musculus*

<400> 22

55 **ctctaaaaat ggcaatggta tcag**
 24

<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

60

65 <220>
<223> Cebador inverso para la secuencia del gen Anxa1 de *Mus musculus*

ES 2 346 280 A1

<400> 23

ttgcagaata gttgggatgt
20

5

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador directo para la secuencia del gen Anxa1 de *Mus musculus*

15

<400> 24

aaggagaaag gggacagacg
20

20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador inverso para la secuencia del gen Anxa1 de *Mus musculus*

30

<400> 25

aataaaggaa cagcatcgcc
20

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 346 280

② Nº de solicitud: 200900084

③ Fecha de presentación de la solicitud: 13.01.2009

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: **G01N 33/574** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	LEE KYUNG-HUN. "Identification of gene expression signatures in Korean acute leukemia patients". Genomics & Informatics. 30.09.2006. Vol. 4, Nº. 3, páginas 97-102. ISSN 1598-866X.	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

27.09.2010

Examinador

J. Manso Tomico

Página

1/4

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

G01N

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

INVENES, EPODOC, WPI, EMBASE, NPL, BIOSIS, MEDLINE, GENECARDS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.09.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	3-8	SÍ
	Reivindicaciones	1,2,9,10	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones		SÍ
	Reivindicaciones	1-10	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	Lee Kyung-Hun. "Identification of gene expression signatures in Korean acute leukemia patients". Genomics & Informatics. 30.09.2006. Vol. 4, N ^o . 3, páginas 97-102. ISSN 1598-866X.	30-09-2006

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 de patente divulga un estudio sobre la expresión de anexina 1 (ANXA 1) en diferentes fracciones del timo de ratones NRH1 como respuesta a la aplicación de una dosis sub-lethal de radiación gamma. Además divulga el efecto de la radiación sobre el desarrollo del ciclo celular y la apoptosis de timocitos inmaduros.

En concreto, las reivindicaciones 1-8 caracterizan un método de obtención de datos para el diagnóstico de neoplasias de células T y en concreto de la leucemia linfoblástica aguda de células T, donde una disminución del producto de expresión del gen ANXA 1 sería indicativo de la presencia de tal enfermedad. Las reivindicaciones 9 y 10 caracterizan un Kit para desarrollar el método.

D01, como estado de la técnica más cercano al objeto de la solicitud, divulga un estudio donde se muestra la expresión de una batería de genes en pacientes con leucemia linfoblástica aguda (ALL) y muestra su utilidad para la diferenciación entre ALL y AML (leucemia mieloide aguda). En concreto, se describe que la anexina 1 muestra una expresión relativamente aumentada en pacientes con ALL (figura 4.b).

Por tanto, a la luz del estado de la técnica, las reivindicaciones 1 y 2 no serían nuevas, según lo mencionado en el art. 6 de la LP. Las reivindicaciones 9 y 10 hacen referencia a un Kit caracterizado por comprender los elementos necesarios para llevar a cabo el método de análisis de diagnóstico propuesto, lo que equivale a decir que el Kit comprende al menos un reactivo específico para detectar el producto codificado por el gen anexina 1. A la luz de lo divulgado en D01, tal Kit carece de novedad.

Las reivindicaciones 3-8 carecen de actividad inventiva puesto que su contenido excede el alcance de lo divulgado en la descripción, y por tanto la solución que proponen las mismas al problema planteado no supondría una contribución sobre el estado de la técnica anterior. En ningún momento, la presente solicitud divulga que la anexina 1 haya sido utilizada con fines diagnósticos de la enfermedad leucemia linfoblástica aguda de células T, no se aportan datos experimentales que permitan sostener una expresión diferencial entre poblaciones control - enfermos, ni aportan puntos de corte con valor predictivo sobre la enfermedad. La divulgación de la expresión alterada de dicho gen en el timo de ratones con linfomas linfoblásticos de células T, no permite por sí sólo, extender el alcance de lo divulgado a la protección de un método de diagnóstico del linfoma linfoblástico de tipo T, inmunofenotipo CD4+ CD8+, de cualquier tipo de individuo.