

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 352 773**

21 Número de solicitud: 200900085

51 Int. Cl.:
A61P 35/02 (2006.01)
G01N 33/88 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **13.01.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **23.02.2011**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
23.02.2011

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

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

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **Prostaglandina E2 para la prevención o el tratamiento de linfomas linfoblásticos.**

57 Resumen:

Prostaglandina E2 para la prevención o el tratamiento de linfomas linfoblásticos.

La presente invención se encuadra dentro del campo de la biología molecular y la medicina. Específicamente, se refiere al uso de la prostaglandina E2 (PGE2) o cualquiera de sus sales, derivados o análogos biológicamente activos, o cualquiera de sus combinaciones, para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento del linfoma linfoblástico.

ES 2 352 773 A1

DESCRIPCIÓN

Prostaglandina E2 para la prevención o el tratamiento de linfomas linfoblásticos.

5 La presente invención se encuadra dentro del campo de la biología molecular y la medicina. Específicamente, se refiere al uso de la prostaglandina E2 (PGE2) o cualquiera de sus sales, derivados o análogos biológicamente activos, o cualquiera de sus combinaciones, para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento del linfoma linfoblástico.

10 Estado de la técnica anterior

15 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 cuáles ANXA1 regula estos procesos son en gran medida desconocidos.

20 ANXA1 ha sido implicada en la producción de prostaglandina E2 (PGE2) (Hayashi *et al.* Biochem Mol Biol Int 1993). Se ha descrito la capacidad de PGE2 para inducir parada del ciclo celular y apoptosis en timocitos (Mastino *et al.* Dev Immunol 1992; 2: 263-71; de Silva *et al.* Biochem J 2003; 370: 315-21). Asimismo se ha visto que PGE2 también es capaz de inhibir la proliferación en células procedentes de linfomas de células T (Pessina *et al.* Blut. 1984 Jul;49(1):45-51). No obstante, los mecanismos implicados en la regulación por PGE2 en linfomas originados en linfocitos maduros, podrían no ser efectivos en el caso de linfomas originados en linfoblastos. De hecho, se ha descrito que PGE2 no es capaz de inhibir la apoptosis de células procedentes de leucemias linfoblásticas aguda (Truffinet *et al.* Int J Cáncer. 2007 Aug 15;121(4):924-7).

30 El linfoma linfoblástico es un tipo de linfoma no Hodgkin caracterizado porque se encuentran demasiados linfocitos inmaduros o linfoblastos en los ganglios linfáticos o en la glándula del timo, que se pueden diseminar a otros lugares del cuerpo. Desde el punto de vista histológico es indistinguible de la leucemia aguda linfoblástica y se utiliza con fines prácticos para su distinción el porcentaje de infiltración blástica de la médula ósea.

35 Las neoplasias linfoides constituyen un grupo heterogéneo de diferentes tipos de cáncer, que tienen en común su origen en células del sistema linfático, pero que pueden ser muy variables en cuanto a la respuesta a diferentes tratamientos. 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 identificar compuestos que permitan una terapia más específica y eficaz para cada tipo de linfoma.

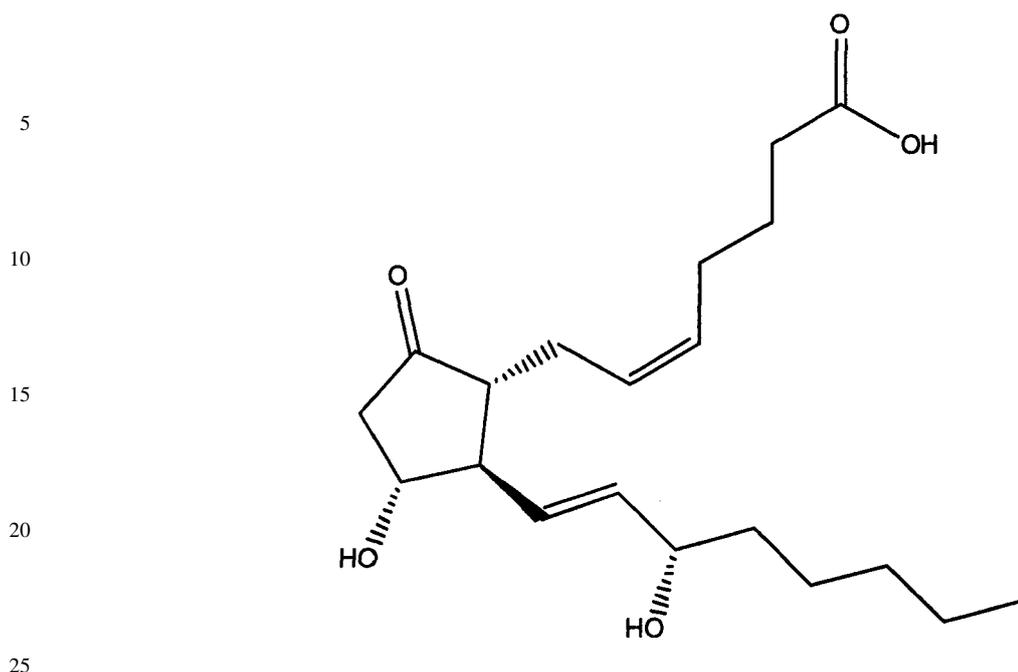
40 Explicación de la invención

La presente invención se refiere al uso de la prostaglandina E2 (PGE2) o cualquiera de sus sales, derivados o análogos biológicamente activos, o cualquiera de sus combinaciones, para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento del linfoma linfoblástico.

45 En la presente invención se identifica el gen de ANXA1 (*ANXA1*) como uno de los genes de susceptibilidad al desarrollo de linfomas linfoblásticos de tipo 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 sólo se expresa en las células estromáticas del timo y no en las células tumorales *per se*. Los inventores han demostrado que ANXA1 ejerce su acción protectora, al menos en parte, mediante la secreción de Prostaglandina E2 (PGE2). El análisis del efecto de la expresión de PGE2 ha puesto de manifiesto su capacidad para inducir la parada del ciclo celular y la apoptosis celular de los timocitos CD4+CD8+CD3^{low} procedentes de linfomas linfoblásticos de tipo T.

55 Un primer aspecto de la invención se refiere al uso de la PGE2 o cualquiera de sus sales, derivados o análogos biológicamente activos, o cualquiera de sus combinaciones, para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento del linfoma linfoblástico.

60 Las prostaglandinas son ácidos grasos monocarboxílicos con 20 átomos de carbono, 5 de los cuales (C8-C12) forman un anillo ciclopentano y el resto se distribuyen en dos cadenas alifáticas laterales. Todas las prostaglandinas tienen un grupo hidroxilo en el C15, necesario para su actividad biológica, según sean los grupos funcionales del anillo ciclopentano, se clasifican en 7 familias (A, B, C, D, E, F, I) y en 3 series: 1, 2 y 3, según el número de dobles enlaces presentes en las cadenas alifáticas; el subíndice A o B indica la posición del grupo oxidrilo del C9 en relación con el plano del anillo pentagonal central. La prostaglandina E2 (PGE2) o dinoprostona, tiene la configuración característica del grupo E y contiene dos dobles enlaces en las cadenas laterales. La estructura química del PGE2 es:



El término “sales” se refiere a sales aniónicas o catiónicas. Entre los aniones que pueden formar parte de las sales aniónicas se encuentran, por ejemplo, pero sin limitarse, sulfato, bisulfato, citrato, maleato, cloruro, bromuro, yoduro, fosfato, acetato, lactato, oxalato, fumarato, tartrato o gluconato. Entre los cationes que pueden formar parte de las sales catiónicas se encuentran por ejemplo, pero sin limitarse, sodio, potasio, calcio, magnesio, amonio, colina, etanolamina, dietanolamina, etilendiamina o dietilendiamina.

El término “análogo” se refiere a una sustancia química similar a otra sustancia química en estructura o función. El término análogo incluiría también aquellas sustancias isómeros, enantiómeros o diastereoisómeros de PGE₂, así como mezclas de los mismos. Por ejemplo, isómeros Z o E teniendo en cuenta los enlaces múltiples de las cadenas alifáticas, e incluyendo isómeros ópticos o enantiómeros, teniendo en cuenta la presencia de centros quirales. El término “derivado” se refiere a una sustancia química producida a partir de otra sustancia química directamente o mediante modificación o mediante sustitución parcial. Algunos de los análogos y derivados de la PGE₂ están ampliamente descritos en el estado de la técnica. El término “biológicamente activos” se refiere a aquellos análogos o derivados que son capaces de ejercer un efecto similar al observado para la PGE₂ sobre las células de un linfoma linfoblástico. Esto puede ser evaluado, por ejemplo, pero sin limitarse, analizando el efecto de los análogos o derivados sobre la proliferación o la apoptosis de las células de un linfoma linfoblástico. Existen muchos métodos para analizar la proliferación o la apoptosis que son ampliamente conocidos por el experto en la materia. Algunos métodos de análisis de la proliferación son, por ejemplo, pero sin limitarse, estimación del número de mitosis por campo mediante hematoxilina-eosina (H-E), incorporación de timidina triada, cuantificación del ADN, cuantificación de organizadores nucleolares mediante impregnación argéntica (AgNOR), medida de la actividad metabólica, inmunodetección de antígenos ligados al ciclo (Ki-67 o PCNA) o incorporación de BrdU. Algunos métodos de análisis de la apoptosis son, por ejemplo, pero sin limitarse, análisis morfológico de la condensación y/o fragmentación de la cromatina y los cuerpos apoptóticos, ensayos de detección de la fragmentación del DNA (DAPI o yoduro de propicio), análisis de alteraciones de membrana (Anexina V), técnicas de marcaje *in situ* (TUNEL o ISEL) o detección de proteínas relacionadas con la apoptosis (Fas, Apo-1, CD59 o p53).

El término “linfoma linfoblástico”, tal y como se utiliza en la presente descripción, se refiere a un tipo de linfoma no Hodgkin caracterizado porque se encuentran demasiados linfocitos inmaduros o linfoblastos en los ganglios linfáticos o en glándula del timo, que se pueden diseminar a otros lugares del cuerpo. Desde el punto de vista histológico es indistinguible de la leucemia aguda linfoblástica (LLA) y se utiliza con fines prácticos para su distinción el porcentaje de infiltración blástica de la médula ósea: si es mayor del 25% (aunque hay algunos grupos que utilizan la cifra del 10%), se trata de leucemia, y si es menor, de linfoma. De hecho, en la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Harris *et al.* Annals of Oncology 1999; 10: 1419-1432), se clasifica como leucemia/linfoma, distinguiéndose 2 grupos dependiendo del inmunofenotipo: leucemia linfoblástica de precursores B (LLA-B)/linfoma linfoblástico (LLB-B) y leucemia linfoblástica de precursores T (LLA-T)/linfoma linfoblástico (LLB-T). De aquí en adelante el término “linfoma linfoblástico” será empleado para tanto para la forma tumoral (LLB) como para la forma leucémica (LLA).

El término “linfoma linfoblástico de tipo T (LLB-T)”, según la clasificación de la OMS, se refiere a un grupo heterogéneo de linfomas que generalmente afecta adolescentes o adultos jóvenes, cursan con un alto recuento de lin-

foblastos 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 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, 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. Un fenotipo medular más maduro con segregación de CD4 y CD8 es más raro. Algunas de las subvariedades tempranas pueden expresar CD10. También pueden aparecer marcadores mieloides aberrantes.

El término “linfoma linfoblástico de tipo B (LLB-B)”, según la clasificación de la OMS, se refiere a una neoplasia de células comprometidas con el linaje de células B que ocurre más frecuentemente en la infancia. Representan más del 70% de las leucemias en los niños, con un pico de incidencia alrededor de los 4 años. Un segundo pico de incidencia ocurre en adultos. La proliferación se halla constituida por linfoblastos de pequeño a mediano tamaño con nucléolos poco conspicuos. Compromete fundamentalmente médula ósea y sangre periférica pero puede aparecer como tumor sólido nodal o extranodal. El compromiso medular es usualmente extenso, en general más del 90% en el momento del diagnóstico. Las mitosis son abundantes. Otras características morfológicas que pueden estar presentes son fibrosis, necrosis y osteopenia. La fibrosis en ocasiones puede ser extensa, y puede causar aspirados “secos”. La osteopenia es un fenómeno más frecuente en LLA de los niños. La variedad más común es LLA de tipo común (LLA pre-pre-B): Representa aproximadamente un 70% de la LLA de los niños, 50% en los adolescentes y 50% en los adultos. Los blastos son típicamente pequeños. El fenotipo clásico incluye un CD45+ débil (incluso puede ser negativo), TdT+, HLA-DR+, CD19+, CD22+, CD79a+, CD10+, CD34 puede ser positivo. Esta forma clásica suele tener buen pronóstico y se asocia con frecuencia a hiperdiploidía.

Preferiblemente, la presente invención se refiere, pero no se limita, al uso de la PGE2 o cualquiera de sus sales, derivados o análogos biológicamente activos, o cualquiera de sus combinaciones, para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento del linfoma linfoblástico de células T. Más preferiblemente, del linfoma linfoblástico de células T con inmunofenotipo CD4+ CD8+. Aún más preferiblemente, del linfoma linfoblástico de células T con inmunofenotipo CD4+ CD8+ CD3/ow.

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 linfocitos que hacen posible su supervivencia, proliferación y diferenciación. Entre los elementos celulares pueden encontrarse células epiteliales, fibroblastos, macrófagos, células dendríticas y células endoteliales.

Preferiblemente, la presente invención se refiere, pero no se limita, al uso de la PGE2 o cualquiera de sus sales, derivados o análogos biológicamente activos, o cualquiera de sus combinaciones, para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento del linfoma linfoblástico donde existe una deficiencia de ANXA1 en el estroma del timo o los ganglios linfáticos. Más preferiblemente, del linfoma linfoblástico donde una deficiencia de ANXA1 en el timo.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una composición farmacéutica que comprende PGE2 o cualquiera de sus sales, derivados o análogos biológicamente activos, o cualquiera de sus combinaciones, para la prevención o el tratamiento del linfoma linfoblástico. Preferiblemente, el linfoma linfoblástico es de tipo T. Más preferiblemente, del linfoma linfoblástico de células T con inmunofenotipo CD4+ CD8+. Aún más preferiblemente, del linfoma linfoblástico de células T con inmunofenotipo CD4+ CD8+ CD3/ow.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, la composición farmacéutica que comprende PGE2 o cualquiera de sus sales, derivados o análogos biológicamente activos, o cualquiera de sus combinaciones, comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la invención se refiere a la composición farmacéutica que comprende PGE2 o cualquiera de sus sales, derivados o análogos biológicamente activos, o cualquiera de sus combinaciones, y además, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable, otro principio activo. Como se emplea aquí, el término “principio activo”, “sustancia activa”, “sustancia farmacéuticamente activa”, “ingrediente activo” ó “ingrediente farmacéuticamente activo” significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

Las composiciones de la presente invención pueden igualmente administrarse en combinación con otras terapias empleadas en el tratamiento de la enfermedad como, por ejemplo, pero sin limitarse, radioterapia.

Las composiciones de la presente invención pueden formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica. Así, pueden estar, sin limitarse, en disolución acuosa estéril o en fluidos biológicos, tal como suero. Las disoluciones acuosas pueden estar tamponadas o no tamponadas y tienen componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo, pero sin limitarse a, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes, y similares, y nutrientes incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas y minerales. Alternativamente, las composiciones pueden prepararse para su administración en forma sólida. Las composiciones pueden combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a; aglutinantes tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes tales como ácido algínico o almidón de maíz; lubricantes tales como estearato de magnesio, deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina; o agentes aromatizantes tales como menta o salicilato de metilo.

Tales composiciones y/o sus formulaciones pueden administrarse en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse a, intraperitoneal, intravenoso, intramuscular, subcutáneo, intracecal, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal o dérmico.

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, pero sin limitarse, la edad, peso, sexo o tolerancia del mamífero. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad de PGE2, de sus sales, derivados o análogos biológicamente activos o de sus combinaciones que produzcan el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dichas sales, derivados o análogos biológicamente activos y el efecto terapéutico a conseguir. Los “adyuvantes” y “vehículos farmacéuticamente aceptables” que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia.

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 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 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 varianza (*one-way* ANOVA) con un test de comparación múltiple Bonferroni. **P*<0,0001.

Figura 2. Muestra el análisis mediante *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 sí desarrollaron tumor (TL) (panel derecho). Los valores de expresión de la proteína se estimaron mediante densitometría a partir de los *Westerns* (*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.

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).

Figura 4. Muestra como los timocitos de NRH1 y C57BL/6J tratados con radiación gamma muestran parada diferencial en G1 y apoptosis. (A) Gráficas representativas de distribución en ciclo celular mediante tinción con 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 porcenta-

je 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.

Figura 5. Muestra que las células HEK 293 transfectadas con *Anxa1*^{Tyr} - y *Anxa1*^{Phe} producen diferentes cantidades de PGE2. (A) Western blot de ANXA1 en células HEK 293. Control, células no transfectadas. pcDNA3, células transfectadas con el vector vacío. *Anxa1*^{Phe}, células transfectadas con *Anxa1*-cDNA de ratones C57BL/6J. *Anxa1*^{Tyr}, células transfectadas con *Anxa1*-cDNA de ratones NRH1. Las células de la línea epitelial de ratón 427 se usaron como control. Los datos corresponden a un experimento representativo de tres que dieron resultados similares. mAnxa1, *Anxa1* de ratón. hAnxa1, ANXA1 humana. (B) Niveles de producción de PGE2 por las células HEK 293 control y transfectadas. La presencia de PGE2 en los sobrenadantes se calculó mediante ensayos ELISA. Los resultados se muestran como la media \pm SD de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticas se estimaron mediante un *one-way* ANOVA con corrección Bonferroni para múltiples comparaciones. * $P < 0,004$.

Figura 6. Muestra cambios en la incidencia de apoptosis de los timocitos después del tratamiento con diluciones seriadas de PGE2 concentraciones durante 8, 16 y 24 h, con respecto a los controles sin tratar. La gráfica superior (●) corresponde al tratamiento durante 16 horas. La inferior (■) al tratamiento durante de 24 horas. La intermedia (▲) corresponde a los tratamientos durante 8 horas.

Figura 7. Muestra que PGE2 causa la eliminación selectiva de timocitos primarios de ratón CD4+CD8+CD3^{low} mediante apoptosis. (A) Análisis de apoptosis mediante ensayo TUNEL y citometría de flujo. ^a $P < 0,003$, ^b $P < 0,0001$, comparados con los valores correspondientes de timocitos control no tratados; ^c $P < 0,0001$, comparados con los valores correspondientes de timocitos tratados con 0,01 μ M de PGE2; ^d $P < 0,0001$, comparados con los valores correspondientes de timocitos tratados con 100 μ M de PGE2. (B) Análisis mediante citometría de flujo de la expresión de CD3, CD4 y CD8. DP, CD4+CD8+. SP4 CD4+CD8-. SP8, CD4-CD8+. Barras negras, CD3-. Barras gris claro, CD3^{low}. Barras blancas, CD3+. ^a $P < 0,0001$, comparados con los valores correspondientes de timocitos control; ^b $P < 0,037$, ^c $P < 0,0001$, comparados con los valores correspondientes de timocitos tratados con 0,01 μ M de PGE2; ^d $P < 0,0001$, comparados con los valores correspondientes de timocitos tratados con 10 μ M de PGE2; ^e $P < 0,0001$, comparados con los valores correspondientes de timocitos tratados con 100 μ M de PGE2. (C) Análisis de distribución del ciclo celular mediante PI y citometría e flujo. Barras negras, Sub-G1. Barras gris claro, G1. Barras blancas, S. Barras gris oscuro, G2/M. ^a $P < 0,014$, ^b $P < 0,0001$, comparados con los valores correspondientes de timocitos control; ^c $P < 0,0001$, comparados con los valores correspondientes de timocitos tratados con 0,01 μ M de PGE2; ^d $P < 0,0001$, comparados con los valores correspondientes de timocitos tratados con 100 μ M de PGE2. Los histogramas representan el porcentaje medio de células \pm SD de tres experimentos independientes. Las estimaciones estadísticas se hicieron con ANOVA y post-test Bonferroni.

Figura 8. Muestra la inducción de apoptosis y parada de ciclo celular en células Thy278 de ratón, y en células humanas Karpas-45 con altas dosis de PGE2. (A) Análisis de apoptosis mediante ensayo TUNEL y citometría de flujo en células Thy278 (fila superior) y Karpas-45 (fila inferior). ^a $P < 0,0001$, comparados con los valores correspondientes de células control no tratadas. (B) Análisis de la distribución del ciclo celular mediante PI y citometría de flujo en células Thy278 (fila superior) y Karpas-45 (fila inferior). Barras negras, Sub-G1. Barras gris claro, G1. Barras blancas, S. Barras gris oscuro, G2/M. ^a $P < 0,0001$, comparados con los valores correspondientes de células control. Los histogramas representan porcentajes medios de células \pm SD de tres experimentos independientes. La significación estadística se estimó 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 reso-

lución 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.*Tlyr1*SEG x B6) F1) con hembras de la cepa susceptible C57BL/6J, seguidos por intra-cruzamientos finales para conseguir la homocigosidad. 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 B6.*Tlyr1*SEG, de las cepas subcongenicas 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).

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).

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 Anxa1 (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.

Ejemplo 3

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

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 ($R^2=0,956$, $P=0,02$).

Ejemplo 4

Efecto de PGE2 sobre el ciclo celular y la apoptosis de timocitos inmaduros

El alelo Anxa1^{Tyr} induce una producción más alta de PGE2 en las células transfectadas.- Puesto que las células epiteliales del timo transfectadas con el cDNA de *Anxa1* aumentan su producción de PGE2 (Hayashi *et al.* Biochem. Mol Biol Int 1993; 31: 143-51) y esta molécula es capaz de inducir la apoptosis de los timocitos inmaduros CD4+CD8+ thymocytes (Mastino *et al.* Dev Immunol 1992; 2: 263-71.), se desarrollaron experimentos *in vitro* con células humanas HEK 293 transfectadas con un vector de expresión (pcDNA3) que contenía la secuencia completa del cDNA de cada uno de los dos alelos del gen *Anxa1* de ratón (*Anxa1^{Tyr}* o *Anxa1^{Phe}*). La elección de este tipo de células se debió a tres razones fundamentales. En primer lugar porque producen niveles muy bajos de ANXA1 endógena. En segundo lugar porque la isoforma humana de ANXA1 se puede distinguir fácilmente de la de ratón. Y, finalmente, porque es muy fácil cultivarlas y transfectarlas. La funcionalidad de cada alelo fue determinada cuantificando la cantidad de PGE2 extracelular producido por las células HEK transfectadas en ensayos ELISA. La producción de proteína ANXA1 por las células transfectadas se determinó mediante *Western blot*, como un control de calidad de la transfección. Como se muestra en la Figura 5A, la cantidad de proteína aumentó 2,5-veces en las células que sobre-expresaban ANXA1 sin que se llegaran a observar diferencias significativas entre los dos tipos de *Anxa1* transfectantes. Sin embargo, la producción de PGE2 por las células transfectadas con *Anxa1^{Tyr}* fue significativamente más alta (1,3-veces) que por las transfectadas con *Anxa1^{Phe}* (Figura 5B). Puesto que las cantidades de ANXA1 eran similares, las diferencias observadas en la producción de PGE2 se podrían atribuir a la diferente actividad biológica de los dos alelos de *Anxa1*.

PGE2 induce apoptosis en timocitos inmaduros CD4+CD8+CD3^{ow}.- Para averiguar si existía una relación causal entre la cantidad de PGE2 y la capacidad de los timocitos para experimentar apoptosis, se analizó (en primer lugar) la respuesta apoptótica de los timocitos primarios de C57BL/6J mediante ensayos TUNEL *in vitro* utilizando diluciones seriadas de PGE2 desde 0,01 hasta 100 microM. Para seleccionar las condiciones idóneas del experimento se analizaron comparativamente los resultados obtenidos a 8 h, 16 h y 24 h después de cada tratamiento. Los resultados demostraron que los timocitos tratados de C57BL/6J experimentaban niveles más altos de apoptosis que los observados en cultivos no tratados, siendo las diferencias mayores a las 16 h (Figura 6). La inducción de apoptosis por PGE2 era claramente significativa a concentraciones tan bajas como 0,01 microM, similar a 0,1 y 10 microM, y mucho más alta a 100 microM (Figura 7A). Nuestros datos revelaban que la administración de una dosis dada de PGE2 en el medio producía una inducción similar de apoptosis en timocitos primarios de los ratones NRH1 (datos no mostrados). El paso siguiente fue investigar cuales eran las sub-poblaciones de timocitos afectadas por la exposición a PGE2. Para ello, se trataron cultivos de timocitos primarios de la cepa C57BL/6J durante 16 h con PGE2 y se analizaron después mediante citometría de flujo para determinar la expresión de los antígenos de superficie CD4, CD8 y CD3. Se pudo comprobar que la administración de PGE2 disparaba la muerte selectiva timocitos inmaduros CD4+CD8+CD3^{ow} (Figura 7B). Puesto que se había sugerido que PGE2 podría interferir también con el procesamiento de las células linfoides provocando la parada del crecimiento celular (de Silva *et al.* Biochem J 2003; 370: 315-21), también se exploró esta posibilidad determinando el número de timocitos en distintas fases del ciclo celular. Comparados con los timocitos control, los tratados con PGE2 no mostraron cambios significativos en la distribución del ciclo celular, pero sí aumentos significativos en el número de timocitos en sub-G1 siguiendo una pauta dependiente de dosis (Figura 7C). Para demostrar si la inducción de apoptosis por PGE2 operaba también en timocitos transformados, se analizaron los niveles de apoptosis en una línea celular derivada de un linfoma tímico compuesto por timocitos inmaduros CD4+CD8+ (Thy278) (Schmitz *et al.* Oncogene 2006; 25: 7587-96.). Se observaron cambios significativos solo a las 24 h después del tratamiento con PGE2 100 microM (Figure 8A). Los cambios en la distribución del ciclo celular fueron también evidentes solo después del tratamiento con PGE2 100 microM, observándose una parada significativa en la fase G1 (Figura 8B).

Finalmente, para investigar la capacidad de PGE2 para inducir apoptosis o parada de ciclo celular en linfomas T humanos se analizaron tres líneas celulares derivadas de leucemias linfoblásticas humanas de células T (T-ALL) que representaban tres estadios diferentes de diferenciación de las células T: Karpas-45 (CD4+CD8+CD3-), Peer (CD4+CD8+CD3+) y Jurkat (CD4+CD8+CD3+). Se encontraron diferencias significativas en los niveles inducidos de apoptosis sólo en Karpas-45 24 horas después del tratamiento con 100 microM de PGE2 (Figura 8A). En este caso, la inducción de apoptosis iba acompañada de una parada significativa de las células en G2/M (Figura 8B).

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.*Tyr1*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).

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

ES 2 352 773 A1

5 *RT-PCR estándar.*- La expresión transcripcional de los genes contenidos en la región *Tylr1a* 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%.

10 *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).

15 *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).

20 *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*) (BioWhittaker) en tampón 0,6xTBE. Tras la electroforesis, los fragmentos de DNA se tiñeron con plata siguiendo un protocolo estándar.

25 *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.

30 *Clonaje de cDNAs del gen Anxa1 y transfecciones transitorias.*- Los fragmentos de DNA purificados que contenían el cDNA completo de los diferentes alelos del gen *Anxa1* se sometieron a una digestión doble con *HindIII* y *BamHI*, y se clonaron en el plásmido pcDNA3 (Invitrogen). Los cebadores usados para el clonaje fueron: *Anxa1HindIII*. SEQ ID NO: 26 (*directo*); *Anxa1BamHI*: SEQ ID NO: 27 (*inverso*). Utilizando el *Expand High Fidelity PCR System* (Roche) y los mencionados cebadores se amplificaron fragmentos de 1081 bp, que incluían la secuencia codificante completa del gen. Las transfecciones se hicieron en *human embryonic kidney (HEK) 293 cells* utilizando lipofectamina (Invitrogen). Las células HEK 293 fueron cultivadas en DMEM, suplementado con 10% FBS, 2 mM L-glutamina (Invitrogen), 0,1 mg/ml ampicilina (Roche), y 64 microg/ml gentamicina (Sigma). La línea de células epiteliales de ratón 427 (proporcionada amablemente por la Dr. Barbara Knowles) fue utilizada como control en *Western blots* para identificar la isoforma de ANXA1 de ratón (Faas *et al.* Eur J Immune 1993; 23:1201-14).

35 *Determinación de PGE2 por las células trasfectadas.*- La producción de PGE2 se determinó en los sobrenadantes de los cultivos celulares mediante ensayos ELISA utilizando el *ACE competitive EIA kit* (Cayman Chemical). En este ensayo, el blanco (PGE2) compete con una PGE2-acetylcholinesterase (ACE) conjugada (PGE2 trazador) por una cantidad limitada de anticuerpo PGE2-monoclonal anclado a la placa. Las células HEK 293 y los sobrenadantes se recogieron 24 h después de la transfección. Las concentraciones de PGE2 se determinaron espectrofotométricamente midiendo la cantidad de PGE2 trazador unida a la placa, que sería inversamente proporcional a la cantidad de PGE2 libre.

40 *Cultivos de células T y tratamientos con PGE2.*- Los timocitos recién aislados y las células Thy278 de ratón (proporcionadas amablemente por el Dr. Ingo Schmitz, University of Düsseldorf, Germany) se cultivaron en RPMI-1640 suplementado con 10% FBS, 100 U/ml penicilina, 100 microg/ml streptomycin, 2 mM L-glutamina (Invitrogen), 1 mM sodium piruvato, 1% aminoácidos no esenciales (ambos de Biowhittaker), y 0,05 mM 2-mercaptoetanol (Merck). Las líneas comerciales derivadas de leucemias linfoblásticas de tipo T humanas Karpas-45 (CD4+CD8+CD3-), Peer (CD4+CD8+CD3+), y Jurkat (CD4+CD8-CD3+), obtenidas de la Germán Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ), se cultivaron siguiendo protocolos descritos previamente (Villa-Morales *et al.* Oncogene 2006; 25: 2022-9). La PGE2 (Cayman Chemical) se añadió al medio de cultivo en el momento de la siembra. Se utilizaron diluciones seriadas de PGE2, entre 0,01 y 100 microM. Las células se recogieron a las 8 h, 16 h y 24 h después de cada tratamiento.

45 *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

ES 2 352 773 A1

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.

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*.

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*.

Análisis estadístico.- Las diferencias en la incidencia de tumores inducidos en los diferentes grupos muestrales se estimaron mediante test de Chi-cuadrado (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 la 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).

ES 2 352 773 A1

REIVINDICACIONES

5 1. Uso de la prostaglandina E2 (PGE2) o cualquiera de sus sales, derivados o análogos biológicamente activos, o cualquiera de sus combinaciones, para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento del linfoma linfoblástico.

2. Uso según la reivindicación 1 donde el linfoma linfoblástico es de tipo T.

10 3. Uso según la reivindicación 2 donde el linfoma linfoblástico de tipo T tiene el inmunofenotipo CD4+ CD8+.

4. Uso según la reivindicación 3 donde el linfoma linfoblástico de tipo T tiene el inmunofenotipo CD4+ CD8+ CD3^{low}.

15 5. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 donde existe una deficiencia de ANXA1 en el estroma del timo o de los ganglios linfáticos.

6. Uso según la reivindicación 5 donde existe una deficiencia de ANXA1 en el estroma del timo.

20 7. Uso de una composición farmacéutica que comprende PGE2 o cualquiera de sus sales, derivados o análogos biológicamente activos, o cualquiera de sus combinaciones, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

8. Uso de la composición farmacéutica según la reivindicación 7 que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 9. Uso de una preparación combinada que comprende, al menos, una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 y otro principio activo para su uso por separado, simultáneo ó secuencial.

30

35

40

45

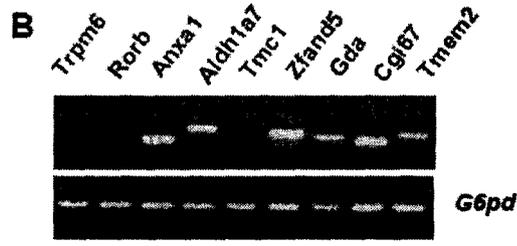
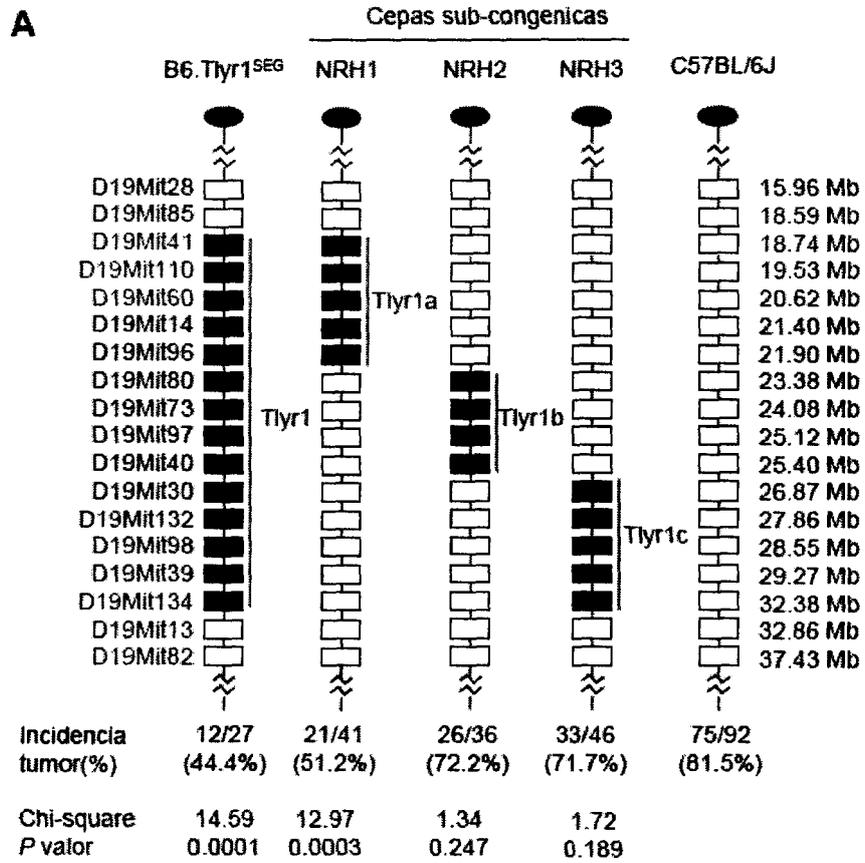
50

55

60

65

FIG.1



Niveles de RNA en timos no tratados

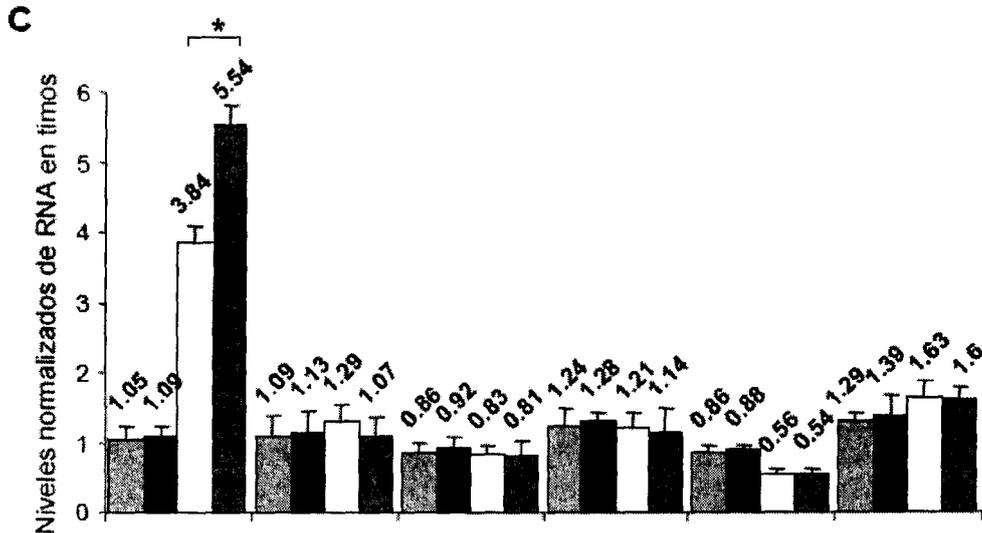


FIG. 4

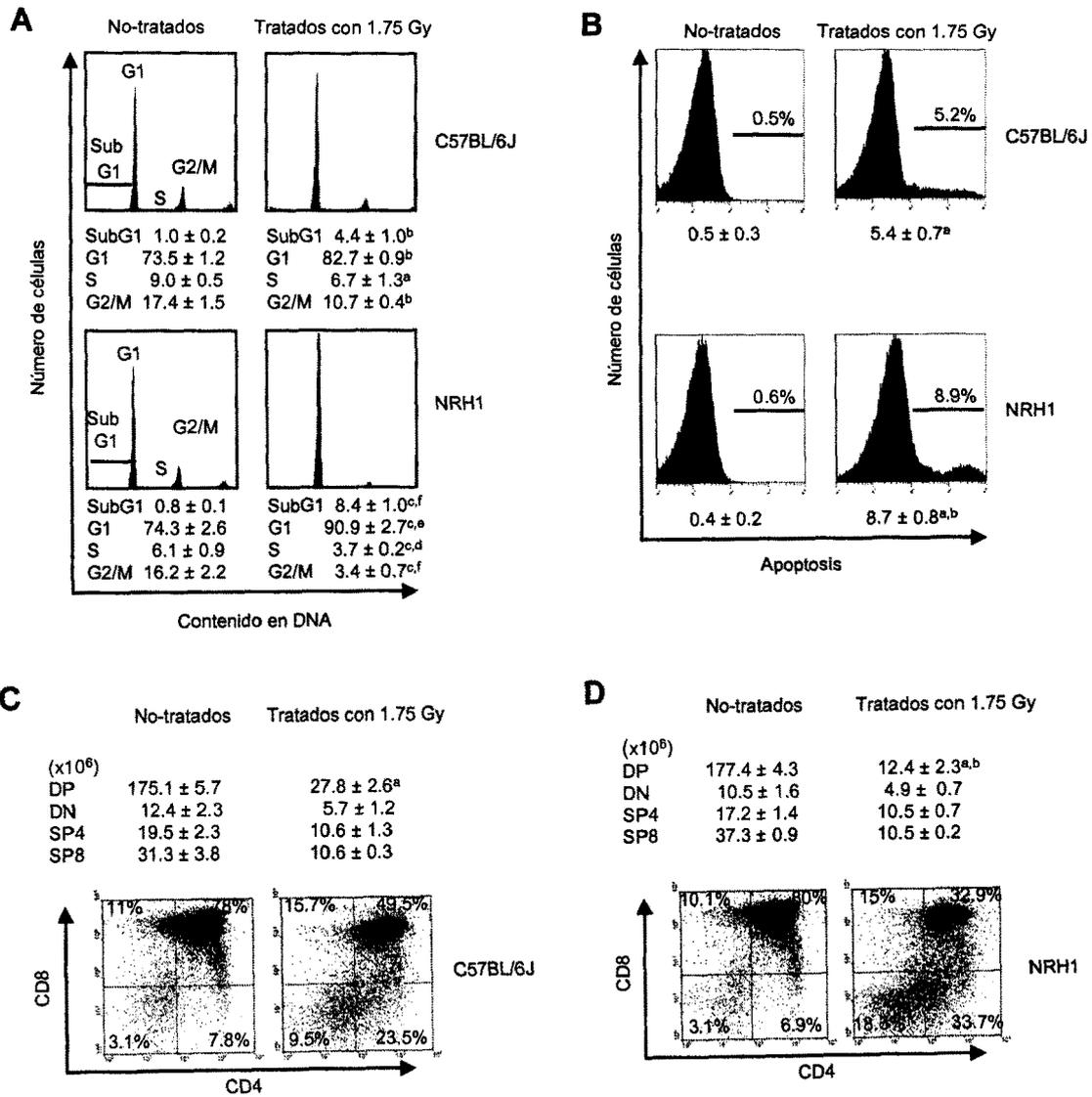


FIG 5.

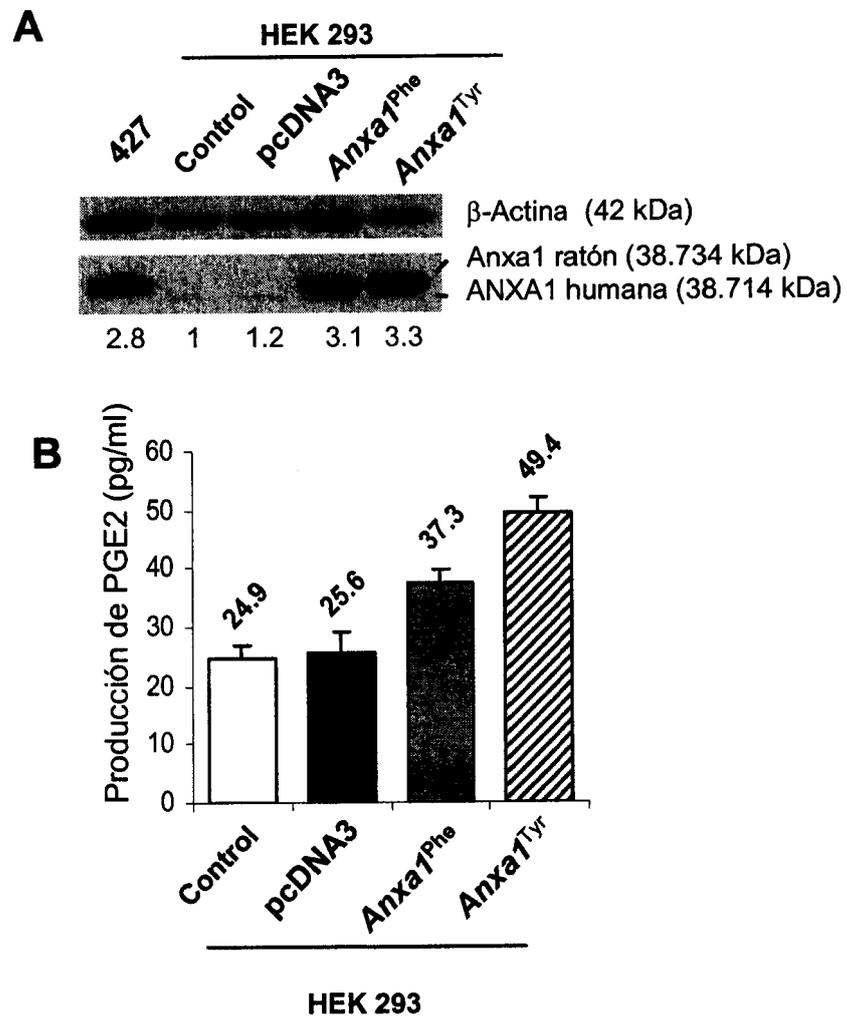


FIG 6.

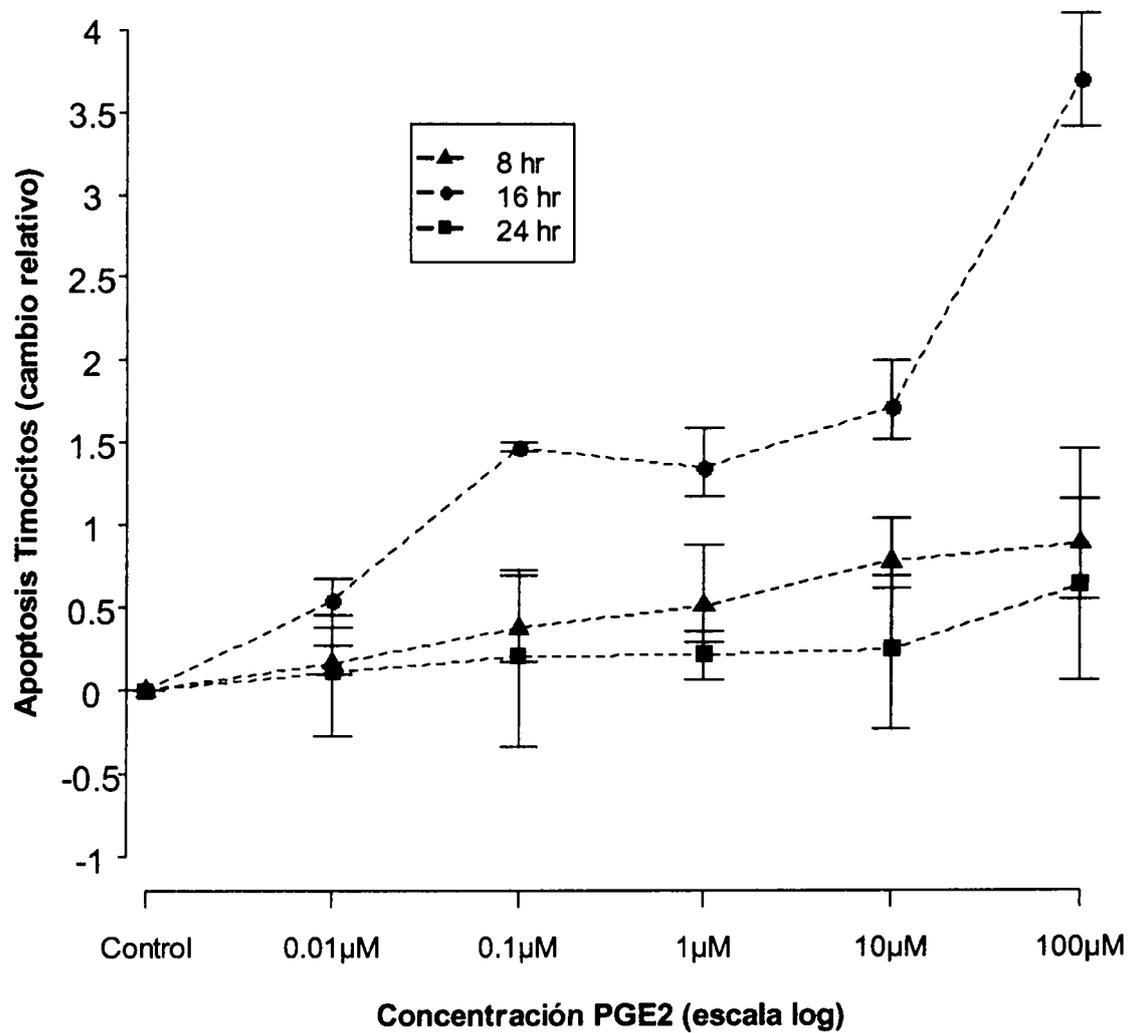


FIG 7.

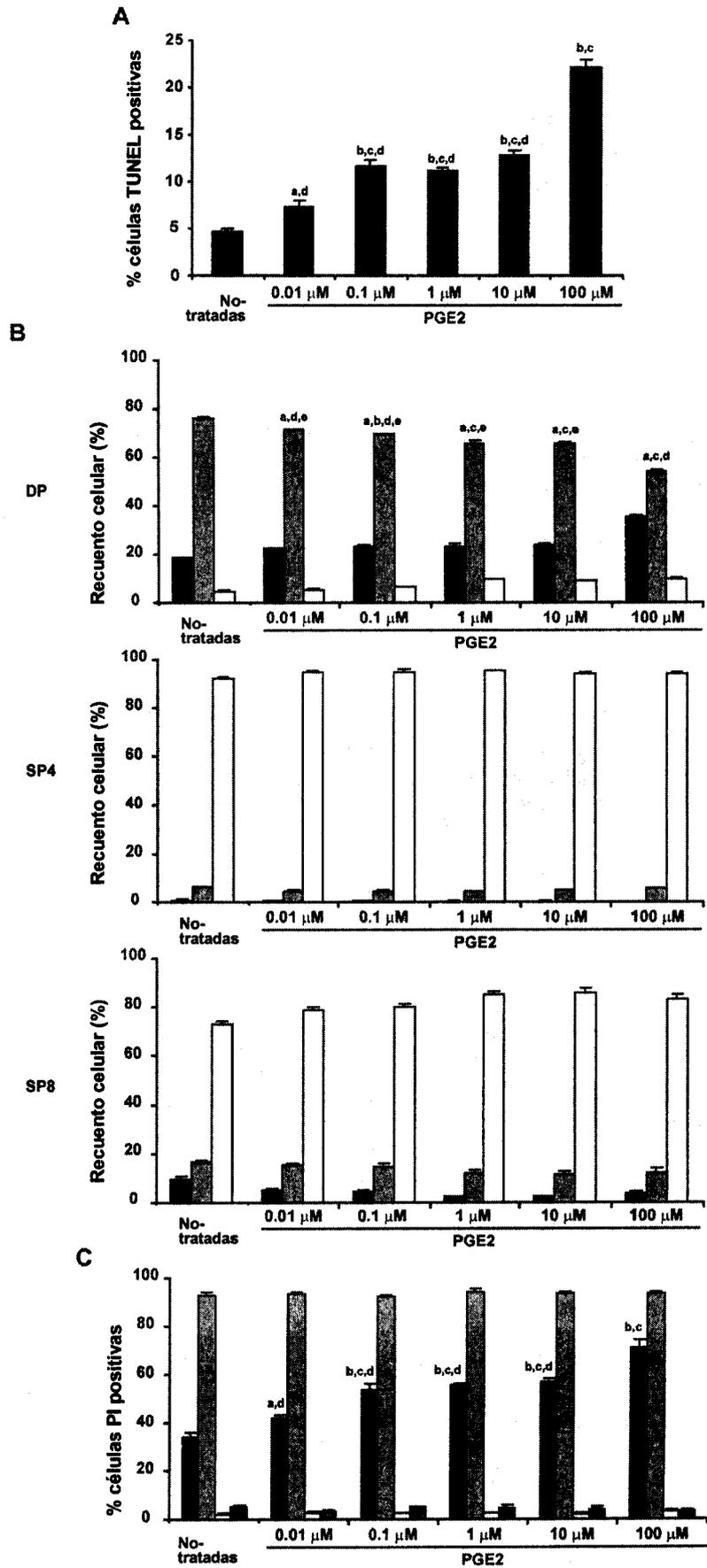


FIG 8.

A

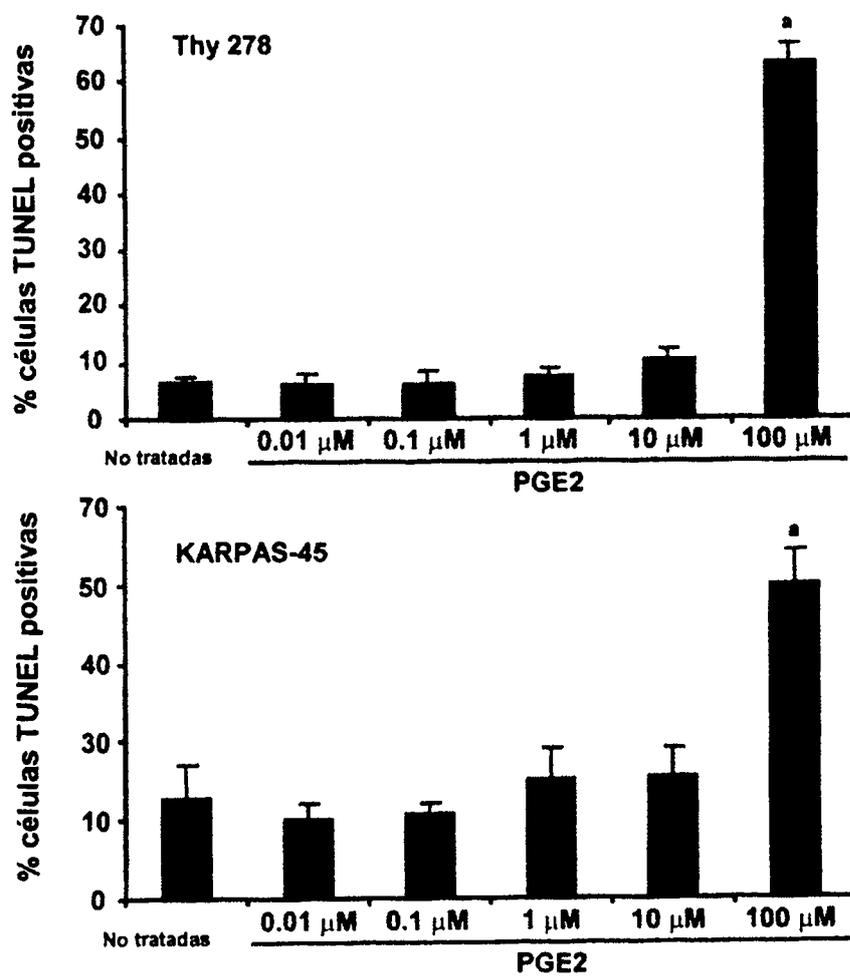
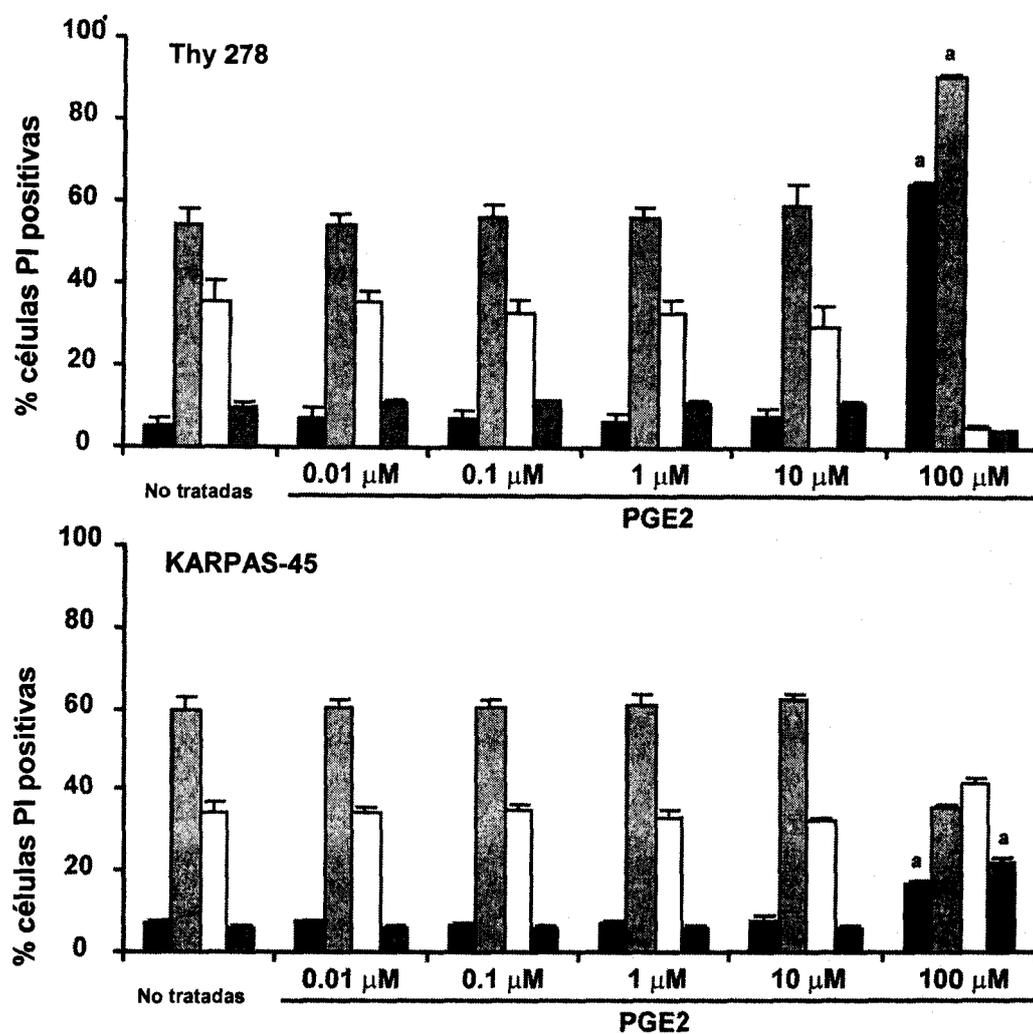


FIG 8.

B



ES 2 352 773 A1

LISTA DE SECUENCIAS

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

5

<120> Prostaglandina E2 para la prevención o el tratamiento de linfomas linfoblásticos

<130> ES1595.18

10

<160> 27

<170> PatentIn version 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 tatcctcgga tgttgctgcc ttgcacaaag ctatcatggt taaagggtg
180

gatgaagcaa ccatcattga cattcttacc aagaggacca atgctcagcg ccagcagatc
240

35

aaggccgctg acttacagga gaatggaaag cccttgatg aagtcttgag aaaagccctt
300

40

acaggccacc tggaggaggt tgttttggct atgctaaaaa ctccagctca gtttgatgca
360

gatgaactcc gtggtgccat gaagggactt ggaacagatg aagacactct cattgagatt
420

45

ttgacaacaa gatctaacga acaaatcaga gagattaata gagtctacag agaagagctg
480

aaaagagatc tggccaaaga catcacttca gatacatctg gagactttcg gaaagccttg
540

50

cttgctcttg ccaaggggtga ccgttgtcag gacttgagtg tgaatcaaga tttggctgat
600

acagatgcca gggctttgta tgaagctgga gaaaggagaa aggggacaga cgtgaacgtg
660

55

ttcactacaa ttctgaccag caggagctat cctcatcttc gcagagtgtt tcagaattac
720

60

ggaaagtaca gtcaacatga catgaacaaa gctctggacc tggaaactgaa ggggtgacatt
780

gagaagtgcc tcacaacat cgtgaagtgt gccaccagca ctccagcttt ctttgccgag
840

65

aagctgtacg aagccatgaa gggcgccgga actcgccata aggcattgat caggattatg
900

ES 2 352 773 A1

gtctcccgtt cggaattga catgaatgaa atcaaagtat tttaccagaa gaagtatgga
960

5 **atctctcttt gccaaagccat cctggatgaa accaaaggag actatgaaaa aatcctggtg**
1020

gctctgtgtg gtggaaacta g
1041

10

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

15

<213> Artificial Sequence

<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

30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

35

<220>

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

<400> 3

40

agtttccatg aggttccagt actc
24

45

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

50

<220>

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

55

<400> 4

gacatgactg ggatcaaaca gata
24

60

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

65

<213> Artificial Sequence

ES 2 352 773 A1

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

5 <400> 5

gccagctgat ggagttcttc
20

10 <210> 6
<211> 20
<212> DNA

15 <213> Artificial sequence

<220>
<221> Cebador directo para la secuencia del gen Anxa1 de *Mus musculus*

20 <400> 6

accaagagga ccaatgctca
25 20

<210> 7
<211> 20
<212> DNA

30 <213> Artificial Sequence

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

<400> 7

40 **cggagttcat ctgcatcaaa**
20

45 <210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

50 <220>
<223> Cebador directo para la secuencia del gen Aldh1a7 de *Mus musculus*

55 <400> 8

aagttaggcc ctgcccttag
20

60 <210> 9
<211> 23
<212> DNA

65 <213> Artificial Sequence

<220>

ES 2 352 773 A1

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

<400> 9

5 **taatttgcca acctctgttg atc**
 23

10 <210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

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

20 <400> 10

tttccggcta cctctttcct
 20

25

<210> 11

<211> 20

30 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

35 <221> Cebador inverso para la secuencia del gen Tmc1 de *Mus musculus*

<400> 11

40 **ggctgtttca gggttaccaa**
 20

<210> 12

45 <211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

50 <220>

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

<400> 12

55

ggacagctag tggttccaac a
 21

60 <210> 13

<211> 20

<212> DNA

65 <213> Artificial sequence

<220>

ES 2 352 773 A1

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

<400> 13

5

cacctctggtt ttcggggtag
20

10 <210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

15

<220>

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

20

<400> 14

tagtgacccc acgctttacc
20

25

<210> 15

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

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

<400> 15

40

tgtcagaaga ttgtttttat catagacat
29

<210> 16

45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

50

<220>

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

<400> 16

55

ccaacagaga agaacctgta
20

60

<210> 17

<211> 23

<212> DNA

65

<213> Artificial Sequence

<220>

ES 2 352 773 A1

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

<400> 17

5

aggtgagagg agaatgaaga ata
23

10 <210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

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

20 <400> 18

tttgtcgggg agagtaggaa
20

25

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

30

<213> Artificial Sequence

<220>

35 <223> Cebador inverso para la secuencia del gen Tmem2 de *Mus musculus*

<400> 19

40 **aagccaattg cactgctgta**
20

<210> 20

45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

50 <220>

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

<400> 20

55

taatgagctg gtcacccgtg
20

60 <210> 21

<211> 20

<212> DNA

65 <213> Artificial Sequence

<220>

ES 2 352 773 A1

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

<400> 21

5 **caggcttccc tgagttcatc**
 20

10 <210> 22
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

15

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

20 <400> 22

ctctaaaaat ggcaatggta tcag
 24

25

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

30

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

35

 <400> 23

40 **ttgcagaata gttgggatgt**
 20

45

 <210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

50

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

55

aaggagaaag gggacagacg
 20

60

 <210> 25
 <211> 20
 <212> DNA

65 <213> Artificial Sequence

 <220>

ES 2 352 773 A1

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

<400> 25

5

aataaaggaa cagcatcgcc
20

10 <210> 26

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15

<220>

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

20 <400> 26

aagcttctct aaaaatggca atggtatcag
30

25

<210> 27

<211> 26

30 <212> DNA

<213> Artificial sequence

<220>

35 <223> Cebador inverso para la secuencia del gen Anxa1 de *Mus musculus*

<400> 27

40 **ggatccttgc agaatagttg ggatgt**
26

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud:200900085

②② Fecha de presentación de la solicitud: 13.01.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **A61P35/02** (2006.01)
G01N33/88 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	FÖLLER MICHAEL et al. "PGE2-induced apoptotic cell death in K562 human leukaemia cells". Cellular physiology and biochemistry. 2006 . Vol. 17; Nº. 5-6; páginas 201-210. ISSN 1015-8987.	1-9
X	BROWN D. M. et al. "Prostaglandin E2 induces apoptosis in immature normal and malignant B lymphocytes". CLINICAL IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY. 01.06.1992. Vol. 63, Nº. 3, páginas 221-229. ISSN 0090-1229.	1-9
X	GEORGE R. et al. "EP4 mediates PGE2 dependent cell survival through the PI3 kinase/AKT pathway". Prostaglandins and Other Lipid Mediators. 26.01.2007. Vol. 83, Nº. 1-2, páginas 112-120. ISSN 1098-8823.	1-9

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
26.11.2010

Examinador
J. Manso Tomico

Página
1/4

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

A61P, 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, MEDLINE, BIOSIS, NPL

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 26.11.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-9	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-9	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 se publica.

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	Föller Michael et al. "PGE2-induced apoptotic cell death in K562 human leukaemia cells". Cellular physiology and biochemistry. 2006 . Vol. 17; Nº. 5-6; páginas 201 - 210. ISSN 1015-8987	
D02	Brown D. M. et al. "Prostaglandin E2 induces apoptosis in immature normal and malignant B lymphocytes". CLINICAL IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY. 01.06.1992. Vol. 63, Nº. 3, páginas 221 - 229. ISSN 0090-1229.	
D03	George R. et al. "EP4 mediates PGE2 dependent cell survival through the PI3 kinase/AKT pathway". Prostaglandins and Other Lipid Mediators. 26.01.2007. Vol. 83, Nº. 1-2, páginas 112 - 120. ISSN 1098-8823.	

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 describe el papel de la prostaglandina E2 (PGE2) en la inducción de apoptosis en timocitos inmaduros con inmunofenotipo CD4+CD8+CD3low. Para ello investiga la relación causal existente entre la cantidad de PGE2 y la capacidad de los timocitos para experimentar apoptosis, analizando la respuesta apoptótica de los timocitos primarios denominados C57BL/6J, mediante ensayos TUNEL in vitro, utilizando diluciones seriadas de PGE2, y comprobando que el administración de PGE2 dispara la muerte selectiva de esos timocitos inmaduros CD4+CD8+CD3low.

En base a lo anterior se reivindica el uso de la PGE2 para la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento del linfoma linfoblástico.

Los documentos que representan del estado de la técnica más cercano al objeto de la solicitud divulgan la relación de PGE2 y su capacidad apoptótica en casos de linfoma o leucemia.

D01 divulga la capacidad apoptótica mediada por PGE2 en células leucémicas humanas K562 a través de un mecanismo de incremento del calcio intracitosólico (fig. 1). Otra serie de mecanismos que desencadena la PGE2 y que contribuyen al desencadenamiento de la apoptosis son: la activación de las caspasas, la disminución de los potenciales mitocondriales de membrana, la fragmentación del DNA, etc. (figuras 1-6).

D02 divulga el papel de la PGE2 en la inducción de apoptosis de células CH31 que corresponden a células B inmaduras de linfoma.

Por otra parte, D03 describe el papel protector contra apoptosis de la PGE2 en células Jurkat tratadas con Campotecina (que da lugar a una inducción de la actividad caspasa y desencadena la apoptosis celular. En este caso, el tratamiento de estas células con PGE2 antes de la adición de Campotecina redujo el nivel de actividad caspasa en un 30%.

A la luz de estado de la técnica anterior a la presente solicitud, ninguno de los documentos seleccionados divulga el uso de la PGE2 en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de un linfoma linfoblástico de células T de inmunofenotipo CD4+CD8+CD3low. Por tanto, las reivindicaciones 1-9 serían nuevas en la medida que se refieren al linfoma linfoblástico citado.

Sin embargo las reivindicaciones 1-9 no tendrían actividad inventiva dado que el experto en la materia, a la luz de la información del estado de la técnica se sentiría inclinado a probar la capacidad de la PGE2 para inducir apoptosis en células de linfoma o leucemia, independientemente del inmunofenotipo concreto de cada una, y tendría altísimas probabilidades de éxito. Por otro lado, las reivindicaciones 1-9 no tendrían actividad inventiva porque no suponen una solución al problema que plantea las reivindicaciones, es decir la provisión de compuestos para la elaboración de un medicamento eficaz para el tratamiento de linfoma CD4+CD8+CD3low. En ninguna parte de la solicitud se muestra la capacidad terapéutica de la PGE2 en el tratamiento de pacientes con esa enfermedad, sino que lo que realmente muestra la descripción es la capacidad de la PGE2 para inducir apoptosis en timocitos inmaduros C57BL/6J, por lo que el problema que plantea la invención es en realidad la provisión de compuestos para la inducción de apoptosis en esas células de linfoma linfoblástico.