

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
24 de junio de 2010 (24.06.2010)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/070170 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A01K 67/027 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)

Cáncer De Salamanca (IBMCC), Campus Miguel de Unamuno, E-37007 Salamanca (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2009/070560

(74) Mandatario: **PONS ARIÑO, Ángel**; Glorieta de Rubén Dario, 4, E-28010 Madrid (ES).

(22) Fecha de presentación internacional:
4 de diciembre de 2009 (04.12.2009)

(81) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200803543
15 de diciembre de 2008 (15.12.2008) ES

(71) Solicitantes (*para todos los Estados designados salvo US*): **CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; C/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). **UNIVERSIDAD DE SALAMANCA** [ES/ES]; Patio de Escuelas, 1, E-37008 Salamanca (ES).

(84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (*para US solamente*): **GARCÍA BUSTELO, Xose Ramón** [ES/ES]; Instituto De Biología Molecular Y Celular Del Cáncer De Salamanca (IBMCC), Campus Miguel de Unamuno, E-37007 Salamanca (ES). **RUIZ MACÍAS, Sergio** [ES/ES]; Instituto De Biología Molecular Y Celular Del Cáncer De Salamanca (IBMCC), Campus Miguel de Unamuno, E-37007 Salamanca (ES). **SANTOS DE DIOS, Eugenio** [ES/ES]; Instituto De Biología Molecular Y Celular Del

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: ANIMAL MODELS AND DERIVED CELLS FOR USE THEREOF IN DETERMINATION OF USEFUL COMPOUNDS IN THE TREATMENT OF T-CELL LYMPHOMAS

(54) Título : MODELOS ANIMALES Y CÉLULAS DERIVADAS PARA SU USO EN LA DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ÚTILES EN EL TRATAMIENTO DE LINFOMAS DE CÉLULAS T

(57) Abstract: The present invention lies in the field of biotechnology. It relates to a method for evaluating whether a compound is effective in the prevention and/or treatment of a disease associated with T-cell lymphomas.

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



WO 2010/070170 A1

**MODELOS ANIMALES Y CÉLULAS DERIVADAS PARA SU USO EN LA
DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS ÚTILES EN EL TRATAMIENTO DE
LINFOMAS DE CÉLULAS T.**

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

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

10

La activación del receptor de la célula T (abreviado a partir de ahora como RCT) induce la activación de múltiples vías de señalización necesarias para la correcta diferenciación y función de las células T (Kane et al. (2000) Curr. Opin. Immunol. 12:242–249). Vav1 es un factor de intercambio de nucleótidos de

15 guanosina (abreviado a partir de ahora como FING) que se expresa específicamente en células hematopoyéticas y que se activa de una manera dependiente de fosforilación tras la estimulación del RCT (Kane et al. (2000) Curr. Opin. Immunol. 12:242–249). De hecho, la fosforilación específica en

20 residuos de tirosina en Vav1 es un requisito necesario para la transducción de señales que conllevan al incremento en flujos de calcio, para la activación del factores de transcripción NFAT (del inglés, nuclear factor of activated T-cells) o a la activación de la vía de Ras/Erk (del inglés, extracellular signal-regulated kinase) (Bustelo (2001) Oncogene. 20:6372-6381). Los animales deficientes en

25 Vav1 tienen defectos en la diferenciación de timocitos CD44+CD25+ a CD44–CD25+ así como defectos en selección positiva y negativa (Tybulewicz et al. 2003). Como resultado de estos defectos, los animales deficientes en el gen Vav1 se caracterizan por una fuerte linfopenia de células T así como defectos en la proliferación, síntesis de citoquinas y activación de ERK tras la estimulación del RCT.

30

La familia de proteínas RasGRF está compuesta por dos miembros, RasGRF1 and RasGRF2 que trabajan como FINGs para GTPasas de la superfamilia Ras

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

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

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

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

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

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

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

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

Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un método para evaluar si un compuesto es efectivo en la prevención y/o tratamiento de neoplasias linfoides que comprende:
25

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

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

10

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

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

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

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

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

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

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

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

10

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

15

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

20

25

30

enteropático, linfoma y leucemia de células T en adultos, linfoma sistémico de célula grande o linfoma anaplásico de células grandes de tipo cutáneo primario.

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

10

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

30

de mamíferos no humanos de la invención, como por ejemplo, pero sin limitarse, proliferación, apoptosis, resistencia a drogas, capacidad tumoral o metastásica.

- 5 Otro aspecto de la invención, se refiere al uso de los modelos experimentales animales de mamíferos no humanos de la invención o a las células derivadas de los mismos para la identificación de nuevos marcadores con valor diagnóstico o pronóstico en neoplasias linfoides. Preferentemente, la identificación de marcadores tiene lugar mediante el análisis de la expresión
- 10 diferencial de genes entre un mamíferos no humano silvestre y un modelo experimental animal de mamífero no humano con deficiencia de la actividad de las proteínas Vav1 y/o RasGRF2, o de las células derivadas de los mismos. De acuerdo con la presente invención, la detección de la cantidad de producto de la expresión de los genes puede ser llevada a cabo por cualquier método de
- 15 determinación de la cantidad del producto de la expresión de los genes conocido por el experto en la materia. En una realización preferida, la detección del producto de la expresión de los genes se realiza determinando el nivel de RNAm derivado de su transcripción donde el análisis del nivel de RNAm se puede realizar, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención,
- 20 mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la ligasa (RT-LCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qRT-PCR), o cualquier otro método de
- 25 amplificación de ácidos nucleicos; microarrays de DNA elaborados con oligonucleótidos depositados por cualquier mecanismo; microarrays de DNA elaborados con oligonucleótidos sintetizados in situ mediante fotolitografía o por cualquier otro mecanismo; hibridación in situ utilizando sondas específicas marcadas con cualquier método de marcaje; mediante geles de electroforesis;
- 30 mediante transferencia a membrana e hibridación con una sonda específica; mediante RMN o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen utilizando nanopartículas paramagnéticas o cualquier otro tipo de nanopartículas

detectables funcionalizadas con anticuerpos o por cualquier otro medio. En una realización alternativa, la detección del producto de la expresión de los genes se realiza determinando el nivel proteína derivado de su traducción donde el análisis del nivel de proteína se puede realizar, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, mediante la incubación con un anticuerpo específico, por ejemplo, mediante Western blot, geles de electroforesis, chips de proteína, ELISA o cualquier otro método enzimático; mediante RMN o cualquier otra técnica de diagnóstico por imagen.

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

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

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

25 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.

DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

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

Figura 2. Muestra que los tumores linfoides de los ratones *Vav1*^{-/-};*Rasgrf2*^{-/-} contienen células CD3 positivas altamente proliferativas (A) Suspensiones celulares obtenidas de animales de los genotipos señalados se analizaron mediante citometría de flujo tras incubar las células con anticuerpos específicos contra CD3, una proteína expresada exclusivamente en linfocitos T. Los cuadrados rojos señalan las poblaciones tumorales CD3 positivas detectadas en los ratones *Vav1*^{-/-};*Rasgrf2*^{-/-} que habían desarrollado tumores en el sistema linfoide. SSC se refiere al parámetro conocido en citometría de flujo como "side scatter" o luz dispersada en el ángulo recto. (B) Suspensiones celulares aisladas de un ratón *Vav1*^{-/-};*Rasgrf2*^{-/-} sano y de cuatro ratones *Vav1*^{-/-};*Rasgrf2*^{-/-} que habían desarrollado tumores se analizaron mediante citometría de flujo tras incubar las células con anticuerpos contra CD4 y CD8, dos marcadores específicos de linfocitos T. (C) Suspensiones celulares aisladas de los tejidos indicados de un ratón *Vav1*^{-/-};*Rasgrf2*^{-/-} sano y de dos ratones *Vav1*^{-/-};*Rasgrf2*^{-/-} que habían desarrollado tumores se analizaron mediante citometría de flujo para determinar el número de blastos. Las líneas

verticales de color rojo indican el punto a partir del cual las células fueron consideradas como blastos. FCS se refiere al parámetro usado en citometría de flujo conocido por “forward scatter” o luz dispersada en el ángulo cónico pequeño. (D) Órganos obtenidos a partir de un ratón *Vav1*^{-/-};*Rasgrf2*^{-/-} fueron teñidos con anticuerpos contra CD3 (paneles superiores) o con anticuerpos contra PCNA (paneles inferiores) usando técnicas inmunocitoquímicas. Barra: 10 μm.

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

Figura 4. Muestra que los linfomas T encontrados en los ratones *Vav1*^{-/-};*Rasgrf2*^{-/-} y *Vav1*^{-/-} derivan de la glándula tímica. (A) Tinciones realizadas con hematoxilina/eosina e inmunohistoquímicas realizadas con anticuerpos contra CD3 y PCNA de secciones de órganos obtenidos de un ratón *Vav1*^{-/-};*Rasgrf2*^{-/-} con un tumor localizado en el timo. Barra: 10 μm. (B) Suspensiones celulares de los órganos indicados aislados de un ratón *Vav1*^{-/-};*Rasgrf2*^{-/-} sano (panel superior izquierdo) y de un ratón *Vav1*^{-/-};*Rasgrf2*^{-/-} (resto de paneles) que presentaba un linfoma de localización exclusivamente tímica fueron analizadas mediante citometría de flujo tras incubar las células con anticuerpos contra CD3. El cuadrado rojo señala la población anormal CD3 positiva que se detectó en el tumor intratímico. (C) Representación gráfica en la que se puede observar el porcentaje de animales con los genotipos indicados a la edad de un año que presentan timos normales o timos tumorales (sin metástasis en otros órganos). Dicha clasificación se basa en datos provenientes de citometría de flujo y datos histológicos.

Figura 5. Muestra la expresión del gen *Rasgrf2* en linfomas humanos es menor que en tejidos normales. Análisis de la expresión de los genes *Vav1* (panel

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

10 EJEMPLOS

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

EJEMPLO 1

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

En el transcurso de estudios de envejecimiento de los ratones de los genotipos silvestre (control), *Vav1*^{-/-}, *Rasgrf2*^{-/-} y *Vav1*^{-/-};*Rasgrf2*^{-/-}, se observó que mientras los ratones de genotipo silvestre presentaban bajas tasas de muerte/enfermedad hasta un año de edad (6%, n=32), los ratones *Vav1*^{-/-} (32%, n=25) y, sobre todo, los ratones *Vav1*^{-/-};*Rasgrf2*^{-/-} (68,56%, n= 35), eran más sensibles a morir o mostrar signos físicos de enfermedad grave a lo largo de su vida (Fig. 1A). Los ratones *Rasgrf2*^{-/-} mostraron en estos estudios unas tasas de muerte/enfermedad intermedias a las observadas en los ratones

Vav1^{-/-} y *Vav1*^{-/-};*Rasgrf2*^{-/-} (Fig. 1A). El examen de los animales muertos o sacrificados que mostraban signos de enfermedad grave indicó que la muerte/enfermedad se debía a la presencia de tumores linfoides altamente diseminados en estos animales. En concreto, se observaron hiperplasias del timo, esplenomegalias y linfadenopatías en la mayoría de animales analizados (Fig. 1B). Junto a ello, se apreció que el timo, el bazo y los ganglios linfáticos mostraban unas alteraciones histológicas importantes debido a la invasión y crecimiento de las células tumorales en dichos órganos (Fig. 1C). El análisis anatomopatológico de estos animales mostró también infiltraciones numerosas de las células tumorales en diversos órganos no hematopoyéticos como eran los riñones, hígados, intestinos y médula ósea (Fig. 1C y datos no mostrados).

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

marcadores CD4 y CD8 independientemente del órgano de donde habían sido purificadas (Fig. 2B).

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

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

20 1.2. La ontología de los tumores linfoides demuestra su origen en linfocitos del timo.

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

30

En el caso de los ratones jóvenes de todos los genotipos bajo análisis, no se detectaron ningún tipo de anormalidad histológica o tumores. Además, el

examen de las poblaciones linfocitarias presentes en el timo y el bazo mostraron las distribuciones habituales para cada genotipo (Fig. 3, n=20 animales de cada uno de los genotipos en estudio).

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

EJEMPLO 2

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

30

Las observaciones obtenidas en el ejemplo 1 indican que la delección del gen *Vav1* y/o la del gen *Rasgrf2* pueden participar en el desarrollo de tumores

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

20 MATERIALES Y MÉTODOS

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

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

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

PCR cuantitativa (Ejemplo 2): Para analizar la expresión de los genes *Vav1* y *Rasgrf2* en linfomas, se usó un panel de cDNAs provenientes de muestras de linfomas humanos deshidratados en una placa de 96 pocillos (TissueScan

Lymphoma Tissue qPCR Array I (2), Cat. Number LYRT101, Origene Technologies). Una descripción detallada de las muestras de linfomas contenido en este preparado comercial puede encontrarse en la dirección de Internet ([http://www.origene.com/geneexpression/disease-](http://www.origene.com/geneexpression/disease-panels/products/LYRT101.aspx)

- 5 panels/products/LYRT101.aspx). Las reacciones de PCR cuantitativa se realizaron en el aparato IQ5 Real-Time PCR detection system (BioRad) y para ello se utilizó el kit de SYBR® Green™ two-step qRT-PCR (Invitrogen). La muestra número 1 representa una media de la expresión relativa de 6 muestras diferentes de tejidos normales. A esta media se le dio un valor arbitrario de 1.
- 10 Los valores de expresión restantes se muestran en el estudio como porcentaje de variación respecto a dicho valor. Para eliminar variaciones espurias debidas a diferentes cargas de muestra, etc., los valores relativos de la expresión de *Vav1* y *Rasgrf2* obtenidos en cada muestra se normalizaron usando, para ello, el valor de la expresión del gen que codifica la enzima GAPDH.

REIVINDICACIONES

1. Método para evaluar si un compuesto es efectivo en la prevención y/o tratamiento de neoplasias linfoides que comprende:
5
a) La obtención o generación de un modelo experimental animal de mamífero no humano con deficiencia de la actividad de las proteínas Vav1 y/o RasGRF2 o a las células derivadas del mismo;
b) La administración del compuesto al modelo animal o células de a); y
10 c) La determinación de su efecto sobre al menos un parámetro indicativo de la enfermedad.
2. Método según la reivindicación 1 donde el modelo animal es un animal transgénico.
15
3. Método según la reivindicación 2 donde el animal transgénico es un animal *knock-out* de los genes *Vav1* y/o *Rasgrf2*.
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 donde el modelo
20 animal es un roedor o un primate no humano.
5. Método según la reivindicación 1 donde las células de mamífero no humano son del tejido linfoide.
- 25 6. Método según la reivindicación 5 donde las células del tejido linfoide son linfocitos T.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 donde la neoplasia linfoide es una neoplasia de las células T.
- 30 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 donde el parámetro indicativo de la enfermedad es la presencia de tumores linfoides.

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

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

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

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

15 b) Células derivadas de un ratón silvestre.

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

20

25

30

FIG. 1A

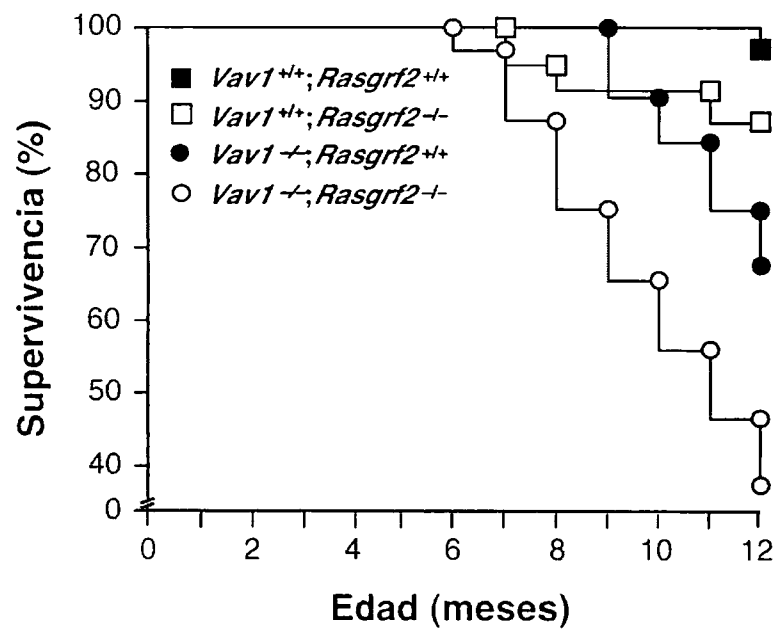


FIG. 1B

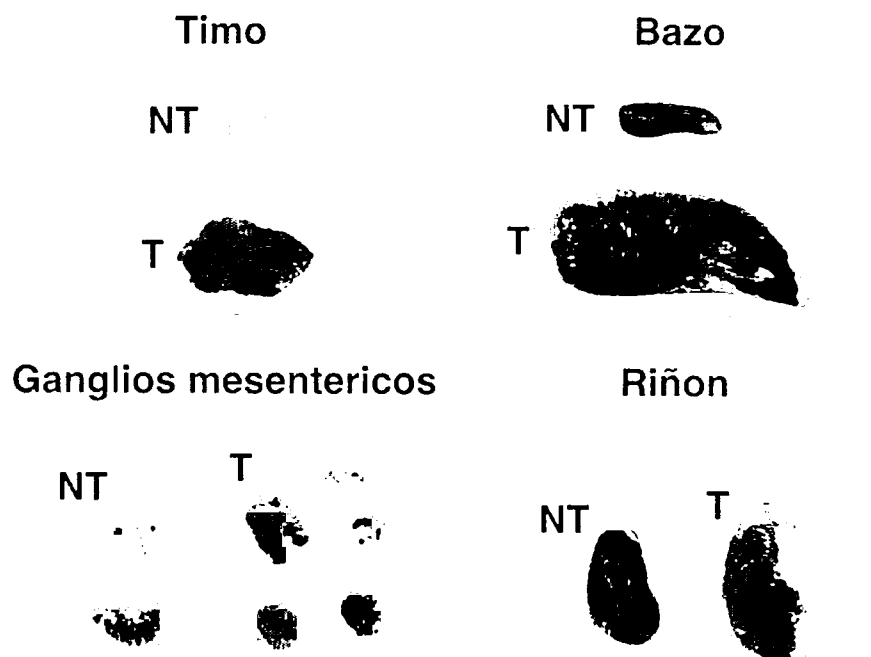


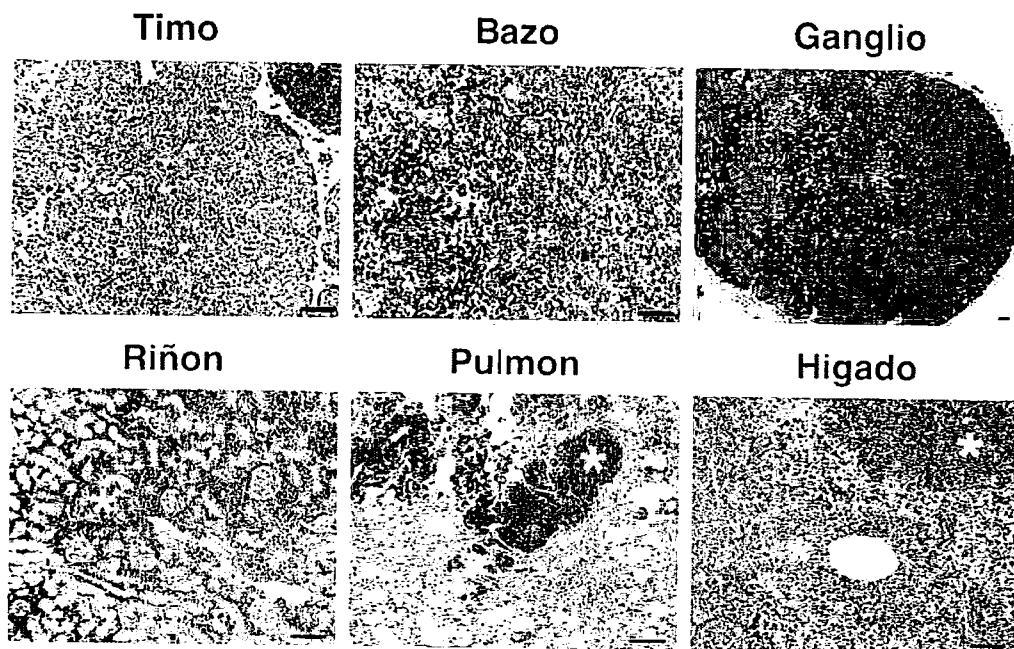
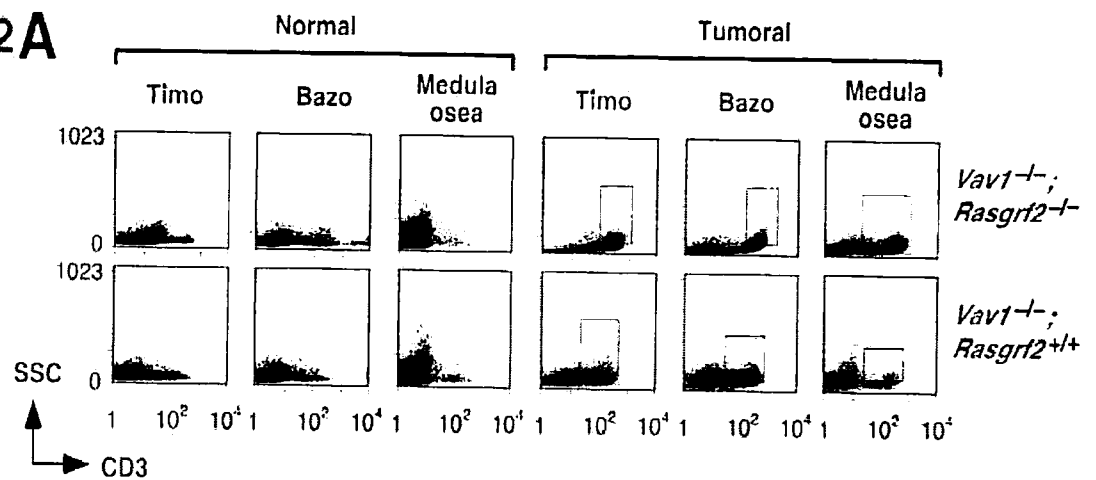
FIG. 1C**FIG. 2A**

FIG. 2B

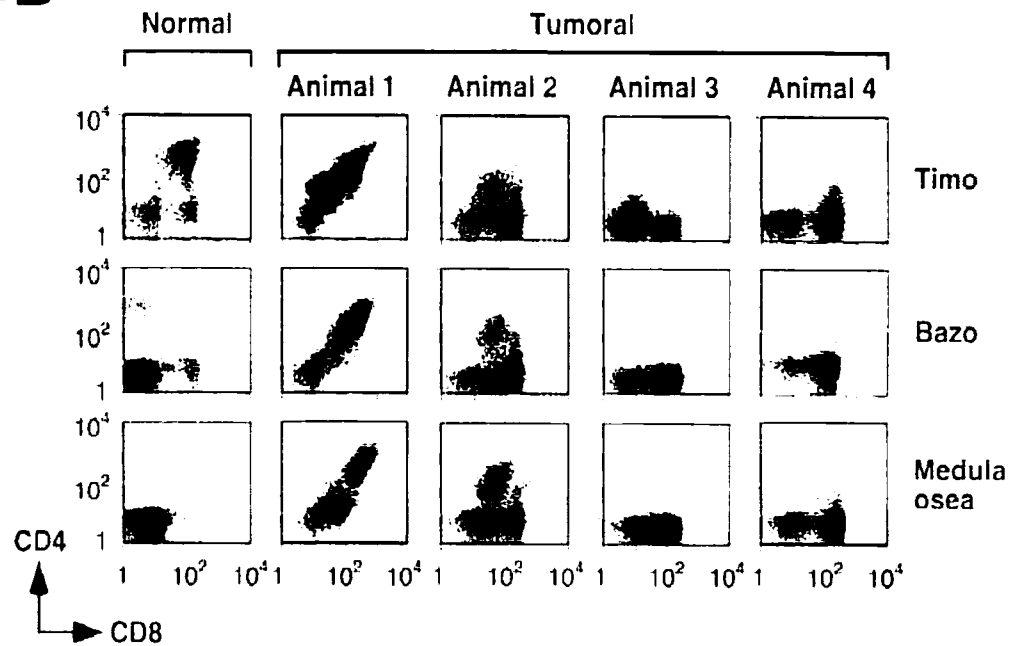


FIG. 2C

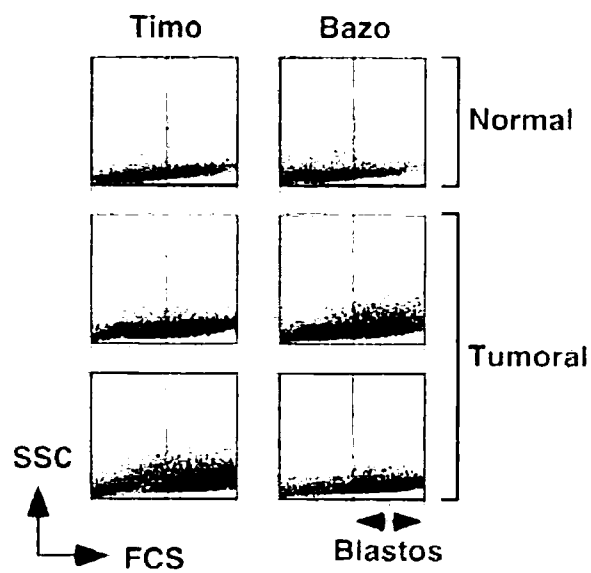


FIG. 2D

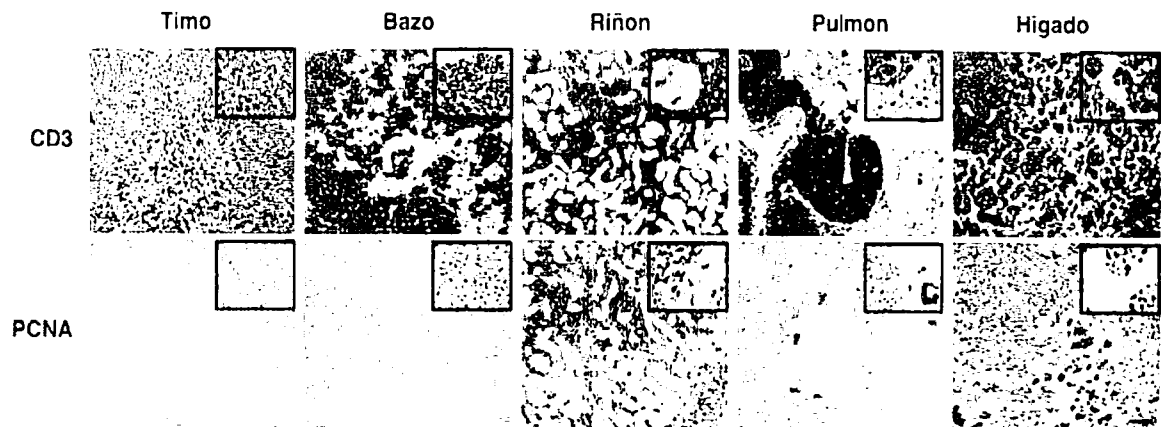


FIG. 3

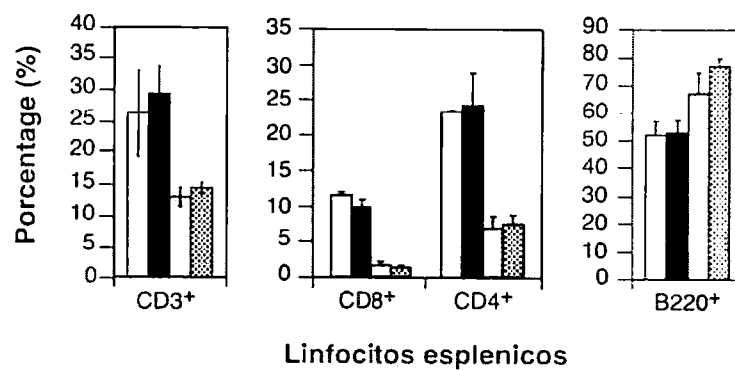
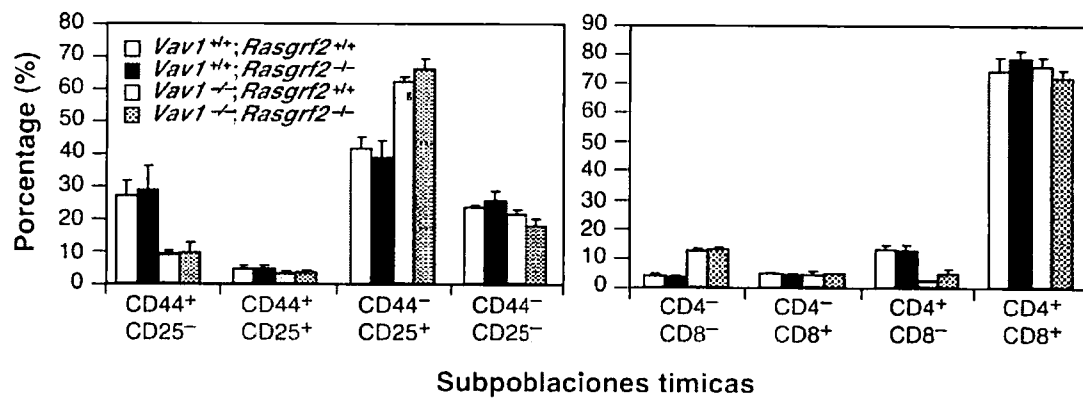


FIG. 4 A

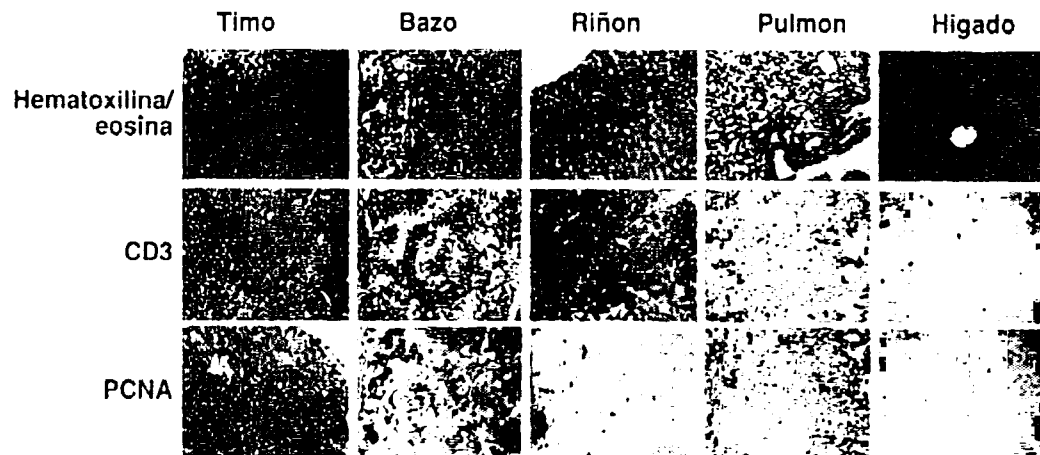


FIG. 4 B

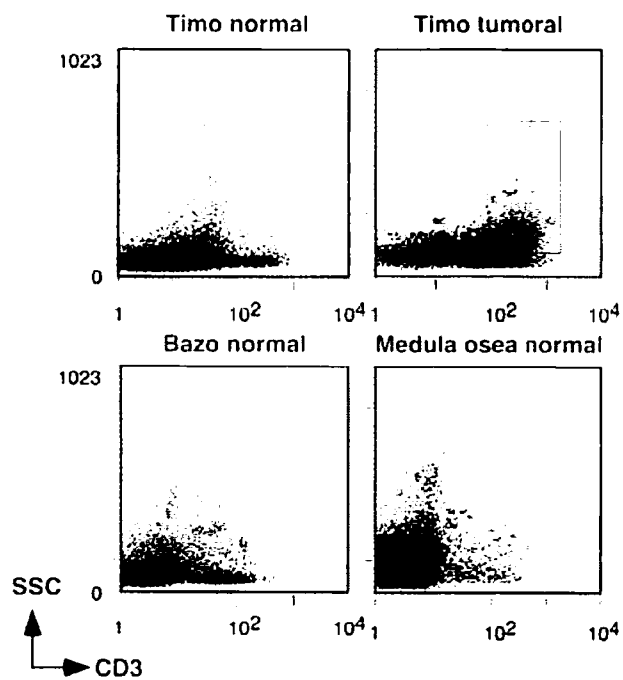


FIG. 4 C

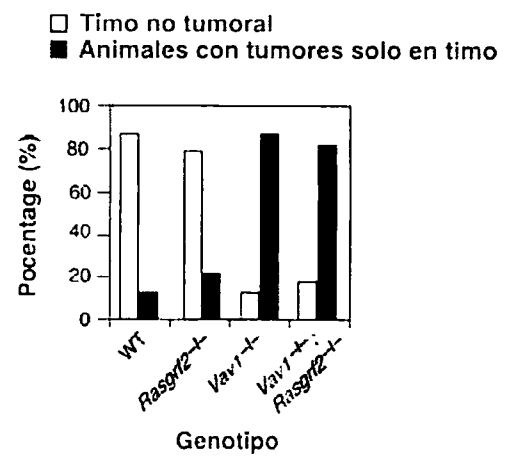
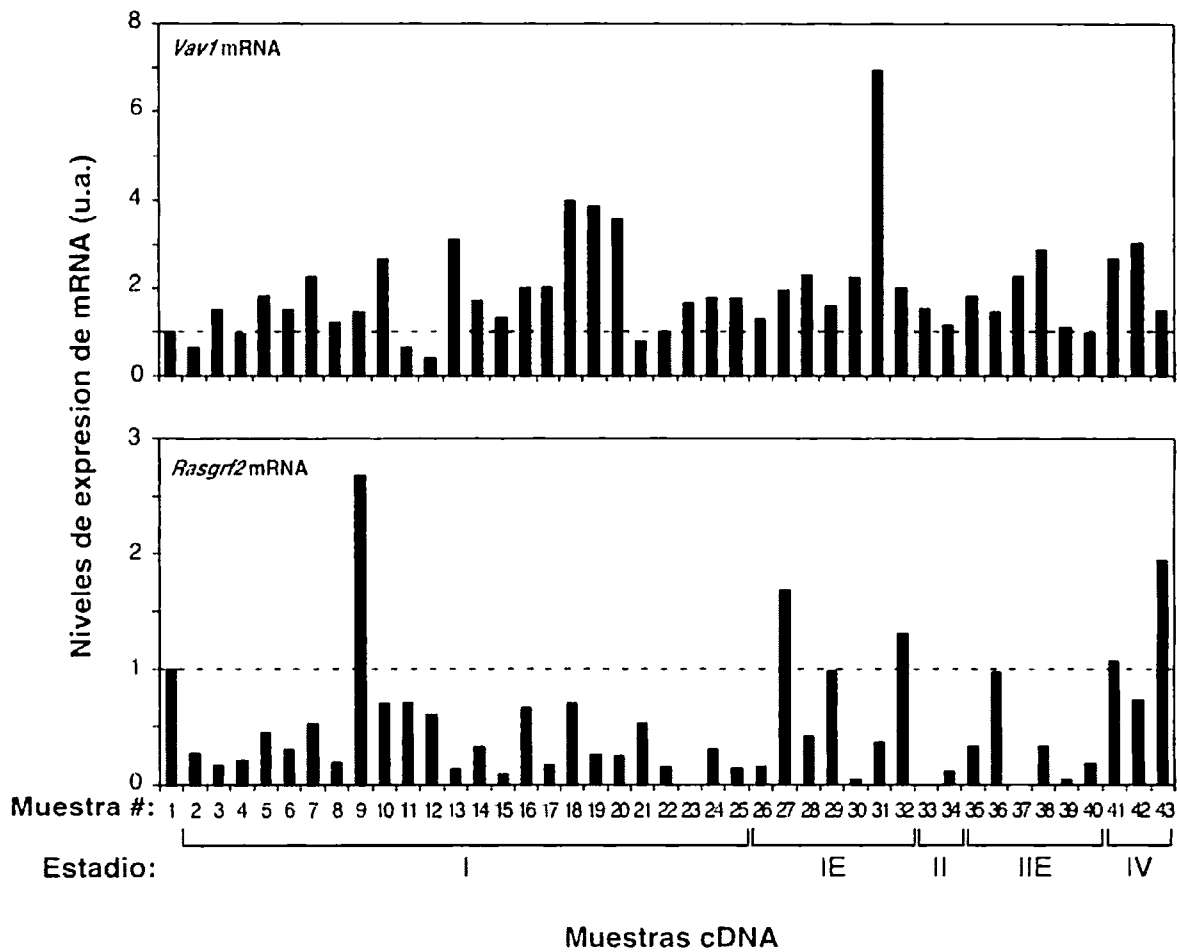


FIG. 5



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2009/070560

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

see extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A01K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC,WPI,MEDLINE,BIOSIS,EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RUIZ S. ET AL., "RasGRF2,a guanosine nucleotide exchange factor for Ras GTPases, participates in T-Cell signaling responses" Mol. Cell. Biol. (2007), 27:8127-8142. Pág. 8137-8138. Citado in the application	1-12
A	US 2006117399 A (UNIV TOLEDO) 01.06.2006,	1-12
A	US 6583333 B1 (COLD SPRING HARBOR) 24.06.2003,	1-12
A	US 2008070256 A1 (NAT JEWISH MED & RES CENTER) 20.03.2008,Citado in the application	1-12
A	KATZAV S. "Flesh and blood: The story of Vav1, a gene that signals in hematopoietic cells but can be transforming in human malignancies" Cancer letters (2007), 241-254	1-12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 March 2010 (12.03.2010)

Date of mailing of the international search report

(17/03/2010)

Name and mailing address of the ISA/
O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.

Facsimile No. 34 91 3495304

Authorized officer

M. Hernández Cuéllar

Telephone No. +34 91 349 84 09

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2009/070560

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: **1-12 (in part)**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Claims 1-12 are desiderata claims and are merely speculative. The method and kit covered by these claims are not clearly defined (PCT Article 6) and are not supported by the description (PCT Article 5).

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/ ES 2009/070560

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2006117399 A	01.06.2006	NONE	-----
-----	-----	-----	-----
US 6583333 B	24.06.2003	NONE	-----
-----	-----	-----	-----
US 2008070256 A	20.03.2008	WO 2008014420 A	31.01.2008
-----	-----	-----	-----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2009/070560

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01K 67/027 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°
PCT/ ES 2009/070560

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

Ver hoja adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

A01K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPODOC,WPI,MEDLINE,BIOSIS,EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

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

☐ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.		
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.		

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

12 Marzo 2010 (12.03.2010)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

17 de marzo de 2010 (17/03/2010)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

Paseo de la Castellana, 75 28071 Madrid, España.
N° de fax 34 91 3495304

Funcionario autorizado

M. Hernández Cuéllar

N° de teléfono +34 91 349 84 09

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/070560

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2.a) por los siguientes motivos:

1. ☐ Las reivindicaciones N°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:
2. ☒ Las reivindicaciones N°s: 1-12 (parcialmente)
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
Las reivindicaciones 1-12 son reivindicaciones de deseo y meramente especulativas. El método y el kit comprendidos en dichas reivindicaciones no se encuentran definidos claramente con arreglo al Art. 6PCT ni encuentran soporte en la descripción con arreglo al Art. 5 PCT. (Ver Hoja adicional)
3. ☐ Las reivindicaciones N°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N°s:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- ☐ Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido en el requerimiento.
- ☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/ ES 2009/070560

En consecuencia, la búsqueda se ha centrado en el potencial empleo de un de un animal deficiente en las proteínas Vav1 y/o RasGRF2 como modelo experimental para posibles aplicaciones biomédicas, entre ellas el estudio de los desórdenes proliferativos de las células T como por ejemplo linfomas.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES 2009/070560

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US 2006117399 A	01.06.2006	NINGUNO	-----
US 6583333 B	24.06.2003	NINGUNO	-----
US 2008070256 A	20.03.2008	WO 2008014420 A	31.01.2008

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A01K 67/027 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)