

(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
9 de Abril de 2009 (09.04.2009)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2009/043959 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
G01N 33/574 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01) A61K 45/00 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2008/070182

(22) Fecha de presentación internacional:
2 de Octubre de 2008 (02.10.2008)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P 200702595 3 de Octubre de 2007 (03.10.2007) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo
US): CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTIFICAS [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid
(ES). UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID
[ES/ES]; Einstein, 3, Ciudad Universitaria de Cantoblanco,
E-28049 Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): CAM-
PANERO GARCIA, Miguel Ramón [ES/ES]; c/ Serrano,
117, E-28006 Madrid (ES). MOLINA PRIVADO, Irene
[—/ES]; c/ Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).

(74) Mandatario: MARTÍN SANTOS, Victoria Sofía; C/ Ex-
planada 8, 4º, E-28040 Madrid (ES).

(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, 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, 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.

(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, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF,
BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN,
TD, TG).

Declaración según la Regla 4.17:

— sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea
concedida una patente (Regla 4.17(ii))

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional
— antes de la expiración del plazo para modificar las reivin-
dicaciones y para ser republicada si se reciben modifica-
ciones
— con la parte de lista de secuencias de la descripción publi-
cada separadamente en forma electrónica y disponible por
medio de la Oficina Internacional previa petición

(54) Title: METHOD FOR IDENTIFYING PATIENTS WITH SPORADIC BURKITT'S LYMPHOMA, IDENTIFICATION
METHOD AND USE OF COMPOUNDS FOR THE TREATMENT OF SPORADIC BURKITT'S LYMPHOMA

(54) Título: PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN DE PACIENTES CON LINFOMA DE BURKITT ESPORÁDICO, PRO-
CEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN Y USO DE COMPUESTOS PARA EL TRATAMIENTO DE LINFOMA DE BURKITT
ESPORÁDICO

(57) Abstract: The invention relates to a method for the effective diagnosis of patients with sporadic Burkitt's lymphoma, based on
identifying protein E2F1 in biological samples from said patients, which can be performed by RT-PCR or western blot. In addition,
E2F1 has been shown to play an etiopathogenic role in the aforementioned disease and, as such, E2F1-specific RNAi can be used
to treat said patients.

(57) Resumen: La presente invención describe un procedimiento de diagnóstico eficaz de pacientes con linfoma de Burkitt espo-
rádico basado en la identificación de la proteína E2F1 en muestras biológicas de dichos pacientes, que puede ser llevado a cabo
mediante RT-PCR o western blot. Además, se ha demostrado que E2F1 presenta un papel etiopatogénico en esta enfermedad por lo
que RNAi específicos de E2F1 pueden ser utilizados para el tratamiento de los mismos.

WO 2009/043959 A1

**PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN DE PACIENTES CON
LINFOMA DE BURKITT ESPORÁDICO, PROCEDIMIENTO DE
IDENTIFICACIÓN Y USO DE COMPUESTOS PARA EL TRATAMIENTO
DE LINFOMA DE BURKITT ESPORÁDICO**

5

DESCRIPCIÓN

10 **OBJETO DE LA INVENCION**

La presente invención describe un procedimiento de diagnóstico eficaz de pacientes con linfoma de Burkitt esporádico basado en la identificación de la proteína E2F1 en muestras biológicas de dichos pacientes, que puede ser llevado a cabo mediante RT-PCR o western blot. Además, se ha demostrado que E2F1 presenta un papel etiopatogénico en esta enfermedad por lo que RNAi específicos de E2F1 pueden ser utilizados para el tratamiento de los mismos.

La presente invención se enmarca dentro del sector biotecnológico y farmacéutico y de referencia para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y de tratamiento de una enfermedad determinada, el linfoma de Burkitt esporádico (LBE).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La Organización Mundial de la Salud reconoce la existencia de tres variantes de linfoma de Burkitt (LB): endémico (se da preferentemente en África ecuatorial), esporádico y asociado a inmunodeficiencias (Wright DH. What is Burkitt's lymphoma and when is it endemic? Blood 1999; 93(2): 758).

El diagnóstico del linfoma de Burkitt esporádico se basa en criterios morfológicos, inmunohistoquímicos y de hibridación *in situ*. Sin embargo, estos criterios no están permitiendo un diagnóstico todo lo preciso que sería deseable. De hecho, se producen algunos casos de diagnóstico erróneo en los que un linfoma de Burkitt ha sido diagnosticado como linfoma difuso de células B grandes y viceversa. Es deseable, por lo tanto, disponer de nuevos métodos que contribuyan a un diagnóstico más preciso de esta patología. El marcador genético característico de BL es una translocación recíproca entre el gen c-myc del cromosoma 8 y uno de los tres loci de los genes de las inmunoglobulinas (Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM. Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1982; 79(24): 7824-7; Hecht JL, Aster JC. Molecular biology of Burkitt's lymphoma. J Clin Oncol 2000; 18(21): 3707-21; Taub R, Kirsch I, Morton C, et al. Translocation of the c-myc gene into the immunoglobulin heavy chain locus in human Burkitt lymphoma and murine plasmacytoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1982; 79(24): 7837-41) que causa un aumento notable de la expresión de c-myc. Sin embargo, diversos estudios examinando el papel de c-myc en la patogénesis de LB han concluido que la translocación de c-myc no es el único evento crítico (Hotchin NA, Allday MJ, Crawford DH. Deregulated c-myc expression in Epstein-Barr-virus-immortalized B-cells induces altered growth properties and surface phenotype but not tumorigenicity. Int J Cancer 1990; 45(3): 566-71). Además, este tipo de translocación también tiene lugar en otros tipos de linfomas que a menudo se confunden con el linfoma de Burkitt esporádico, como es el caso de los linfomas difusos de células B grandes. La determinación del nivel de expresión relativa de c-myc no resultaría, por lo

sión relativa de c-myc no resultaría, por lo tanto, de interés como criterio diagnóstico.

La expresión de E2F1 ha sido analizada cualitativa-
5 tivamente mediante inmunohistoquímica en 124 casos de
varios tipos de linfoma de tipo no-Hodgkin (Lai R,
Medeiros LJ, Coupland R, McCourty A, Brynes RK. Immuno-
histochemical detection of E2F-1 in non-Hodgkin's lym-
10 phomas: a survey of 124 cases. Mod Pathol. 1998 May;
11(5): 457-63) describiéndose una expresión relativamen-
te elevada en linfoma de células del manto, linfoma
linfoblástico, linfoma de células pequeñas no fragmenta-
das y linfoma hepatoesplénico de células T gamma-delta.
La sobre-expresión de E2F1 también ha sido descrita
15 empleando diversas técnicas en otros tipos de tumores.
Así, se ha descrito la existencia de una expresión
elevada de E2F1 en carcinoma de células no-pequeñas de
pulmón (Kotsinas A, Evangelou K, Zacharatos P, Kittas C,
Gorgoulis VG. Proliferation, but not apoptosis, is
20 associated with distinct beta-catenin expression pat-
terns in nonsmall-cell lung carcinomas: Relationship
with adenomatous polyposis coli and G1-to S-phase cell-
cycle regulators. Am J Pathol 2002; 161: 1619-34) y en
algunos casos de carcinoma ductal pancreático (Yamazaki
25 K, Yajima T, Nagao T, et al. Expression of transcription
factor E2F-1 in pancreatic ductal carcinoma: an immuno-
histochemical study. Pathol Res Pract 2003; 199(1): 23-
8) mediante inmunohistoquímica; en carcinoma gastroin-
testinal y carcinoma de colon (Suzuki T, Yasui W, Yoko-
zaki H, Naka K, Ishikawa T, Tahara E. Expression of the
30 E2F family in human gastrointestinal carcinomas. Int J
Cancer 1999; 81:535-8) mediante northern e inmunoblot;
en carcinoma de células pequeñas de pulmón (Eymin B,
Gazzeri S, Brambilla C, Brambilla E. Distinct pattern of
35 *E2F1* expression in human lung tumours: E2F1 is upregu-

lated in small cell lung carcinoma. *Oncogene* 2001; 20: 1678-87) mediante inmunoblot e inmunohistoquímica; en muestras de glioblastoma (Alonso MM, Fueyo J, Shay JW, Aldape KD, Jiang H, Lee OH, Johnson DG, Xu J, Kondo Y, 5 Kanzawa T, Kyo S, Bekele BN, Zhou X, Nigro J, McDonald JM, Yung WK, Gomez-Manzano C. Expression of transcription factor E2F1 and telomerase in glioblastomas: Mechanistic linkage and prognostic significance. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97:1589-600), mediante inmunoblot y 10 análisis global de expresión génica con microarrays y en tumores anaplásicos de tiroides y papilares (Onda M, Nagai H, Yoshida A, et al. Up-regulation of transcriptional factor E2F1 in papillary and anaplastic thyroid cancers. *J Hum Genet* 2004; 49(6): 312-8) mediante PCR 15 semi-cuantitativa y PCR cuantitativa empleando el gen GAPDH (no la ACTINA) como referencia.

Sin embargo, por el momento no se conoce ningún método diagnóstico del LBE basado en la determinación de 20 la expresión relativa del gen E2F1 para el, con técnicas como la PCR cuantitativa que precisa pequeñas cantidades de muestra biológica y con el grado de exactitud que se describe en la presente invención.

25 Por otro lado, el linfoma de Burkitt, un linfoma no-Hodgkin de células B muy agresivo, es rápidamente letal si no se trata a tiempo, pero es curable con un tratamiento intensivo de quimioterapia (Blum KA, Lozanski G, Byrd JC. Adult Burkitt leukemia and lymphoma. *Blood* 2004; 104(10): 3009-20). Debido a que la mayoría 30 de las veces los efectos secundarios de este tratamiento no son muy bien tolerados (Divine M, Casassus P, Koscielny S, et al. Burkitt lymphoma in adults: a prospective study of 72 patients treated with an adapted pediatric LMB protocol. *Ann Oncol* 2005; 16(12): 1928-35) los 35

pacientes se beneficiarían de terapias alternativas dirigidas contra dianas moleculares específicas que podrían reducir la toxicidad sistémica del tratamiento convencional.

5

En este sentido, diversos descubrimientos sugieren que distintos mecanismos patogénicos están implicados en los distintos tipos de LB. Mientras que el virus de Epstein-Barr, la malaria, arbovirus y promotores tumorales de plantas están relacionados con el LB endémico (van den Bosch CA. Is endemic Burkitt's lymphoma an alliance between three infections and a tumour promoter? Lancet Oncol 2004; 5(12): 738-46), se conoce muy poco sobre los mecanismos implicados en la formación de LBE. Así, un mayor conocimiento de las bases moleculares del proceso de linfomagénesis de LBE podría ayudar a desarrollar tratamientos de menor toxicidad. Dado que los factores E2F activadores pueden funcionar como oncogenes se procedió a analizar su papel en la formación del linfoma de Burkitt.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Un objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de identificación de un linfoma de Burkitt esporádico, en adelante procedimiento de identificación de LBE de la invención, basado en la identificación de los niveles de la presencia de E2F1 en una muestra biológica que comprende las siguientes etapas:

30 a) identificación de los niveles de expresión de E2F1, ajustándolos con los niveles de un marcador control, preferentemente ACTINA beta cuando proceda, en una muestra biológica, y

b) comparación de los niveles de E2F1 observados en a) con una muestra biológica control, e

35

c) identificación de una muestra como LBE cuando los niveles de E2F1 superan a los obtenidos en la muestra control por encima de un umbral determinado.

Un objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de identificación de un LBE en el que la identificación de E2F1 se lleva a cabo mediante RT-PCR cuantitativa de un precursor génico de E2F1 y en el que los niveles de E2F1 se ajustan a los de ACTINA beta. Este procedimiento está basado en la extracción de RNA, ya sea RNA polyA+ o RNA total o RNA polyA+, de una muestra biológica sospechosa de LBE y de un tejido control y la amplificación de la secuencia de E2F1 se lleva a cabo con adecuados oligonucleótidos o cebadores específicos tanto para la región codificante o no codificante de dicho RNA mensajero (por ejemplo, frente a las regiones 5' o 3' no traducidas del RNA).

Otro objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de identificación de un LBE en el que la identificación de E2F1 de a) se refiere a la forma proteica del gen E2F1 (SEQ ID NO 2) y la identificación de ACTINA beta se refiere a su forma proteica (SEQ ID NO 4) y se lleva a cabo mediante el uso de anticuerpos específicos de la proteína E2F1 en técnicas, por ejemplo, de inmunoblot o Western blot y de inmunohistoquímica.

Otro objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de identificación y evaluación de la actividad de compuestos inhibidores de la proteína E2F1 útiles para el tratamiento del LBE, en adelante procedimiento de identificación de compuestos de la presente invención, que comprende los siguientes pasos:

a) Puesta en contacto de un sistema biológico donde exista una expresión de E2F1 que produzca parcial

o totalmente un fenotipo LBE con el compuesto candidato objeto de este procedimiento, e incubación en las condiciones adecuadas,

5 b) determinación de un parámetro indicativo de disminución de los niveles de E2F1 o de regresión de un fenotipo LBE, e

10 c) identificación de un compuesto inhibidor de la actividad de la proteína E2F1 cuando se observa una regresión de dicho fenotipo LBE o una disminución de los niveles de E2F1.

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto o agente inhibidor de la actividad de la proteína E2F1, en adelante uso de un
15 compuesto de la presente invención, en la elaboración de medicamentos o composiciones farmacéuticas para el tratamiento de pacientes humanos con LBE.

Otro objeto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica o un medicamento para
20 el tratamiento del LBE, en adelante composición farmacéutica de la presente invención, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o agente inhibidor de la proteína E2F1, junto con, opcio-
25 nalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la inven-
30 ción en un método de tratamiento de un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por LBE, en adelante uso de la composición farmacéutica de la presente invención, consistente en la administración de dicha composición terapéutica que inhibe el proceso patológico del
35 LBE.

La presente invención se basa en que los inventores han identificado el papel etiopatogénico del gen E2F1 y su transcrito proteico en pacientes con linfoma de Burkitt esporádico (LBE) y, sorprendentemente, la utilidad para un diagnóstico de LBE de la determinación de los niveles de expresión de E2F1 compensándolos con los niveles del gen de actina beta y su transcrito, al contrario que lo observado cuando se utilizó otros genes de control, como es el caso del ARN ribosómico de la subunidad 18S de los ribosomas o el ARN mensajero correspondiente a los genes GAPDH y GUSB (datos no mostrados). En estos últimos casos los niveles de expresión E2F1 fueron completamente anárquicos para el objetivo de distinguir los casos de LBE, sin poder definir un patrón concreto con ningún tipo de patología. En la presente invención se ha compensado la señal de expresión E2F1 con la señal de ACTINA beta para cada muestra analizada, de forma particular utilizando el valor equivalente de plásmidos que expresan ambos marcadores, y se ha observado que es posible determinar un valor mínimo que separa perfectamente todas las muestras de pacientes con LBE de los controles; y de forma más concreta y como ejemplo experimental, que un nivel de expresión de E2F1 superior al equivalente de 2.5 ng de plásmido es determinante para la identificación de un linfoma de Burkitt esporádico, frente a lo observado en muestras de tejidos control (amígdalas o nódulos linfáticos reactivos o tejido sano circundante al tumor), y que incluso permite la identificación de falsos positivos identificados por otros métodos (ver ejemplo 1).

En primer lugar, se han puesto a punto varios métodos de determinación de la expresión relativa del gen E2F1 mediante PCR en tiempo real (PCR cuantitativa), PCR semicuantitativa e inmunoblot, que servirían para confirmar el diagnóstico de linfoma de Burkitt esporádi-

co. Para ello, y en el caso de la PCR, se han basado en la relación entre la expresión del gen E2F1 y la del gen de la beta-ACTINA.

5 En segundo lugar, los datos descritos en la presente invención indican que la expresión de E2F1 se encuentra desregulada en líneas celulares de BL y en tumores de LBE, que su expresión elevada es necesaria para la formación de tumores en ratones, el crecimiento de colonias en agar blando y la proliferación celular y sugieren que esta expresión elevada podría ser necesaria para la progresión de éstas células a través de G2/M. Más particularmente, los resultados claramente indicaron que la expresión de E2F1 es mucho más elevada en estas líneas celulares y muestras de tumores que en las líneas de LCL y los tejidos control o en otros tipos de linfoma, respectivamente.

20 Se ha descrito en la literatura que algunos genes implicados en el crecimiento y la proliferación celular se expresan altamente en algunos tumores. Sin embargo, la expresión elevada de E2F1 en líneas celulares de LB y en las muestras tumorales de LBE de la presente invención no parece ser debida a una mayor presencia de células capaces de proliferar en estos casos que en otras líneas celulares o en otros tumores porque i) las líneas celulares de LB y LCL analizadas mostraban niveles de proliferación prácticamente idénticos y ii) la expresión de E2F1 en muestras de LBE era mucho más elevada que en muestras de DLBCL con un nivel de proliferación similar. Los datos aquí descritos más bien sugieren que la expresión elevada de E2F1 es necesaria para la formación de tumores puesto que la reducción de su expresión en células de LB mediante la expresión de shRNAs específicos para E2F1 con lentivirus notablemente reducía la capacidad de estas células para formar colonias en agar blando y para formar tumores en

ratones inmunodeficientes SCID. Apoyando esta conclusión, se ha descrito que la desactivación de uno o los dos alelos de *E2f1* retrasaba la aparición del linfomas generados por sobreexpresión de c-myc en un modelo murino transgénico (Baudino TA, Maclean KH, Brennan J, et al. Myc-mediated proliferation and lymphomagenesis, but not apoptosis, are compromised by E2f1 loss. Mol Cell 2003; 11(4): 905-14).

Por otro lado, se sabe que la translocación de c-myc no es el único evento crítico en la patogénesis de BL (7). De hecho, la sobreexpresión de c-myc en células normales induce su acumulación en la fase G2 del ciclo celular y normalmente las convierte en aneuploides (Felsher DW, Zetterberg A, Zhu J, Tlsty T, Bishop JM. Overexpression of MYC causes p53-dependent G2 arrest of normal fibroblasts. Proc Natl Acad Sci U S A 2000; 97(19): 10544-8). En la presente invención se ha demostrado que la reducción de la expresión de E2F1 en células de LB no sólo disminuye su capacidad de proliferación sino que induce su acumulación en la fase G2 o M del ciclo celular. Parece, por lo tanto, que la expresión elevada de E2F1 podría cooperar con c-myc en la formación de LBE ayudando a las células a pasar la fase G2 del ciclo celular. E2F1 llevaría a cabo este papel induciendo la expresión de genes necesarios para la progresión a través de G2 y M.

Estos datos sugieren que la expresión elevada de E2F1 podría cooperar con la expresión elevada de c-myc en la formación de LBE. Dado que los ratones E2F1^{-/-} se desarrollan normalmente, parece claro que la expresión de E2F1 no es necesaria para la proliferación de células normales. En concreto, la expresión de E2F1 no es necesaria para la proliferación de los linfocitos T en respuesta a señales homeostáticas o a la estimulación in vivo (DeRyckere D, DeGregori J. E2F1 and E2F2 are diffe-

rentially required for homeostasis-driven and antigen-induced T cell proliferation in vivo. J Immunol 2005; 175(2): 647-55), por lo que parece probable, a priori, que la disminución de la expresión de E2F1 en pacientes de LBE no tendría porqué causar inmunodepresión. En conjunto, estos datos sugieren que E2F1 actúa como inductor del fenotipo patológico del LBE, es decir, que existe una relación directa -no sólo una asociación temporal- entre la actividad del gen E2F1 y la etiopatogenia de esta enfermedad. De esta forma, la presencia de E2F1, ya sea forma génica o proteína, puede considerarse un marcador del LBE y, por tanto, utilizarse su identificación como diagnóstico de LBE; y por otro lado, E2F1 puede considerarse como diana terapéutica de gran utilidad en la identificación de nuevos fármacos para el tratamiento del LBE, e incluso, su inhibición génica como una forma de terapia. Estas aproximaciones terapéuticas se basan en el uso de compuestos o agentes inhibidores de la actividad de E2F1.

Por lo tanto, un objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de identificación de un linfoma de Burkitt esporádico, en adelante procedimiento de identificación de LBE de la invención, basado en la identificación de los niveles de la presencia de E2F1 en una muestra biológica que comprende las siguientes etapas:

a) identificación de los niveles de expresión de E2F1, ajustándolos con los niveles de un marcador control, preferentemente ACTINA beta cuando proceda, en una muestra biológica, y

b) comparación de los niveles de E2F1 observados en a) con una muestra biológica control, e

c) identificación de una muestra como LBE cuando los niveles de E2F1 superan a los obtenidos en la muestra control por encima de un umbral determinado.

Tal como se utiliza en la presente invención el término "E2F1" y "ACTINA beta" se refieren tanto al gen o proteína E2F1 (SEQ ID NO 1 y NO 2, respectivamente) (códigos de acceso son NM_005225 y NP_005216, respectivamente) como al gen o proteína ACTINA beta (SEQ ID NO 3 y NO 4, respectivamente) (códigos de acceso son NM_001101 y NP_001092, respectivamente), respectivamente, así como a cualquier secuencia de nucleótidos o de aminoácidos (aás.) análoga a éstas. En el sentido utilizado en esta descripción, el término "análoga" pretende incluir cualquier secuencia de nucleótidos o aminoácidos que pueda ser aislada o construida en base a las secuencias de nucleótidos o aás. mostradas en la presente memoria, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos o aás. conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más nucleótidos o aás, la adición de uno o más nucleótidos o aás. en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más nucleótidos o aás. en cualquier extremo o en el interior de la secuencia, y que constituya una secuencia codificante o péptido con actividad similar a las secuencias de la invención, es decir, sea capaz de inducir el LBE.

En general, una secuencia de nucleótidos o de aminoácidos análoga es sustancialmente homóloga a la secuencia de aminoácidos comentada anteriormente. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "sustancialmente homóloga" significa que las secuencias de nucleótidos o aás. en cuestión tienen un grado de identidad de, al menos, un 40%, preferentemente de, al menos, un 85%, o más preferentemente de, al menos, un 95%.

El grupo o muestras biológicas control puede obtenerse a partir de muestras de personas sanas, o incluso desarrollarse artificialmente muestra biológica

control como por ejemplo un plásmido que contiene el ADNc de E2F1.

Un objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de identificación de un LBE en el que la identificación de E2F1 se lleva a cabo mediante RT-PCR cuantitativa de un precursor génico de E2F1 y en el que los niveles de E2F1 se ajustan a los de ACTINA beta. Este procedimiento está basado en la extracción de RNA, ya sea RNA polyA+ o RNA total o RNA polyA+, de una muestra biológica sospechosa de LBE y de un tejido control y la amplificación de la secuencia de E2F1 se lleva a cabo con adecuados oligonucleótidos o cebadores específicos tanto para la región codificante o no codificante de dicho RNA mensajero (por ejemplo, frente a las regiones 5' o 3' no traducidas del RNA).

Una realización particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención basado en una RT-PCR cuantitativa donde el umbral distintivo de LBE es un nivel de expresión de E2F1 superior al equivalente de 2.5 ng de plásmido, utilizado como control.

Una realización particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención basado en una RT-PCR cuantitativa con unos cebadores específicos de E2F1 y ACTINA beta que se corresponden, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, respectivamente, con los siguientes E2F1 5' (SEQ ID NO8), E2F1 3' (SEQ ID NO9), ACTINA beta 5' (SEQ ID NO10) y ACTINA beta 3' (SEQ ID NO11), suministrados por la casa comercial Applied Biosystem y que amplifican la región "AGTCATTGCCAAGAAGTCCAAGAACCACATCCAGTGGCTGGGCAGCCACACCACAGTGGGCGTCGGCGGACGGCTTGAGGGGT" y "GCGCCCTATAAAACCCAGCGGCGGACGCGCCACCACCGCCGAGACCGCGTCCGCCCGCGAGCACAGAGCCTCGCCTTTGCCGATCCGCCGCCCGTCCACACCCGCCGCCAGCTACCATGGATGAATATCGCCGCGCTCGTCGTCGACAACGGCTCCGGCATGTGCA" de E2F1 y ACTINA beta, respectivamente. El diseño y

la preparación de oligos o cebadores para una amplificación de ambos genes por PCR es una tarea fácilmente posible para un experto medio en la materia, pudiéndose diseñar oligos tanto de la región codificante como de la no codificante de ambos genes.

Otra realización particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención basado en una PCR semi-cuantitativa con unos cebadores específicos de E2F1 y Actina beta tal como se indica anteriormente.

En este último caso, la reacción de PCR semi-cuantitativa se puede llevar a cabo empleando varias diluciones seriadas del ADN complementario (obtenido como se describe en ejemplo 1) preparado a partir de las muestras que se van a analizar o empleando una dilución única de este ADN pero llevando a cabo la reacción de PCR durante distinto número de ciclos (por ejemplo: 24, 26, 28, 30, 32 y 34 ciclos).

Otra realización particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención basado en la técnica de Northern blot con sondas de polinucleótidos específicas de los cDNAs de los genes E2F1 y ACTINA beta (SEQ ID NO1 y 3, ver Ejemplo 2).

Otro objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de identificación de un LBE en el que la identificación de E2F1 se lleva a cabo mediante hibridación *in situ* con un precursor de E2F1.

La realización de estos análisis de identificación de los niveles de expresión de E2F1 y Actina puede ser llevado a cabo por un experto medio del área de la biomedicina gracias a la información descrita en la presente invención y en el estado de la técnica por distintas técnicas (Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.).

Otro objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de identificación de un LBE en el que la identificación de E2F1 de a) se refiere a la forma proteica del gen E2F1 (SEQ ID NO 2) y la identificación de ACTINA beta se refiere a su forma proteica (SEQ ID NO 4) y se lleva a cabo mediante el uso de anticuerpos específicos de la proteína E2F1 en técnicas, por ejemplo, de inmunoblot o Western blot y de inmunohistoquímica. Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales, fragmentos o derivados de los mismos. En la Figura 6 se presentan los resultados de un inmunoblot frente E2F1 y actina beta donde se observa como los niveles expresión de las proteínas E2F1 y actina beta en muestras de LBE se distinguen perfectamente (elevados y disminuidos niveles de E2F1 y actina beta, respectivamente) cuando se comparan con muestras control. Para llevar a cabo un inmunoblot habría que preparar un extracto total de proteínas a partir de biopsias del tejido tumoral estudiado y de los tejidos control (tejido sano circundante al tumor o amígdalas o nódulos linfáticos reactivos de otros individuos). Estas muestras se fraccionan en un gel de acrilamida con SDS, se transfieren a una membrana de nitrocelulosa o de PVDF y se hibridan con anticuerpos anti-E2F1 y anti-actina. Estos anticuerpos pueden estar o no conjugados a fluorocromos. En el caso de estar acoplados a estos fluorocromos, cada uno de los anticuerpos ha de estar acoplado a un fluorocromo diferente de modo que emitan energía en longitudes de onda no solapantes. En el caso de emplear anticuerpos no conjugados a ningún fluorocromo, será necesario emplear anticuerpos anti-E2F1 y anti-actina generados en distintas especies animales (por ejemplo, anti-E2F1 generado en conejo y anti-actina generado en ratón). Una vez incubada la membrana con ambos anticuerpos, se procederá a incubarla con anticuerpos anti-

inmunoglobulina de ratón y anti-inmunoglobulina de conejo conjugados a fluorocromos diferentes que emitan energía en longitudes de onda no solapantes. La emisión de energía de cada anticuerpo se mide con un sistema de documentación de imágenes (como por ejemplo el Odyssey de la compañía Lycor) y esta señal es directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra. Se calcula entonces la relación entre la señal de E2F1 y la de actina beta para cada muestra y se compara esta relación entre las muestras tumorales y las de los tejidos control. La relación E2F1/Actina beta en los tejidos tumorales ha de ser, por lo menos, 2 veces superior a la detectada en los tejidos control. El mayor problema de este método y una clara desventaja con respecto a los métodos descritos más arriba basados en la técnica de PCR es obtener suficiente cantidad de extracto de proteínas para llevar a cabo el ensayo. El análisis mediante inmunohistoquímica se realizaría sobre cortes de tejido (ya sea congelado o incluido en parafina) procedente de muestras tumorales o de tejidos control (amígdalas o nódulos linfáticos reactivos o tejido sano circundante al tumor). Se llevará a cabo la tinción con anticuerpos anti-E2F1 y anti-actina generados en distintas especies de animales (como en el caso del inmunoblot). Estos anticuerpos pueden estar acoplados a fluorocromos que emitan energía a longitudes de onda no solapantes o no estar conjugados y emplear, entonces, anticuerpos secundarios acoplados a este tipo de fluorocromos. La señal emitida por los anticuerpos es directamente proporcional a la cantidad de proteína expresada en las células y se medirá con equipos de detección. Se calcula entonces la relación entre la señal de E2F1 y la de actina beta para cada muestra y se compara esta relación entre las muestras tumorales y las de los tejidos control. La relación E2F1/Actina en los tejidos

tumorales ha de ser, por lo menos, 2 veces superior a la detectada en los tejidos control.

Por otro lado, este procedimiento de diagnóstico de un LBE puede realizarse utilizándose a E2F1 como
5 único marcador o de forma conjunta con otros marcadores de LBE o de otras enfermedades, por ejemplo formando parte de un microarray de expresión biológica, ya sea en forma génica -a partir de RNAm- o en forma de proteína.

Otro objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de identificación y evaluación de
10 la actividad de compuestos inhibidores de la proteína E2F1 útiles para el tratamiento del LBE, en adelante procedimiento de identificación de compuestos de la presente invención, que comprende los siguientes pasos:

15 a) Puesta en contacto de un sistema biológico donde exista una expresión de E2F1 que produzca parcial o totalmente un fenotipo LBE con el compuesto candidato objeto de este procedimiento, e incubación en las condiciones adecuadas,

20 b) determinación de un parámetro indicativo de disminución de los niveles de E2F1 o de regresión de un fenotipo LBE, e

c) identificación de un compuesto inhibidor de la actividad de la proteína E2F1 cuando se observa una
25 regresión de dicho fenotipo LBE o una disminución de los niveles de E2F1.

Otro objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de identificación de la invención donde el sistema biológico de a) consiste en una línea
30 celular o un animal transgénico donde se encuentre regulada, de forma constante o condicionada, la expresión de la proteína E2F1, y donde su expresión provoca un fenotipo LBE o un incremento de la proteína E2F1.

Otro objeto de la presente invención lo constituye un procedimiento de identificación de la invención
35

donde el parámetro indicativo de regresión de un fenotipo LBE de b) pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: formación de colonias en agar blando o formación de tumores in vivo; y en el caso de la disminución de la expresión de los niveles de E2F1 se lleva a cabo por las técnicas indicadas anteriormente: PCR, Northern blot, inmunoblot, inmunohistoquímica, etc.

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de un compuesto o agente inhibidor de la actividad de la proteína E2F1, en adelante uso de un compuesto de la presente invención, en la elaboración de medicamentos o composiciones farmacéuticas para el tratamiento de pacientes humanos con LBE.

Tal como se utiliza en la presente invención el término "compuesto/agente inhibidor o antagonista" se refiere a una molécula que cuando se une o interactúa con la proteína E2F1 (por ejemplo, SEQ ID N02), o con fragmentos funcionales de la misma, disminuye o elimina la intensidad o la duración de la actividad biológica de dicha proteína. En esta definición se incluye además aquellos compuestos que impiden o disminuyen la expresión del gen codificante de la proteína E2F1 (SEQ ID N01), es decir, que impiden o disminuyen la transcripción del gen, la maduración del RNAm, la traducción del RNAm y la modificación post-traducciona. Un agente inhibidor puede estar constituido por un péptido, una proteína, un ácido nucleico o polinucleótido, un carbohidrato, un anticuerpo, un compuesto químico o cualquier otro tipo de molécula que disminuya o elimina el efecto y/o la función de la proteína E2F1.

A título de ejemplo de los inhibidores de E2F1 que se podrían utilizar bajo el alcance de la presente invención, se han descrito péptidos que inhiben la interacción de cualquier miembro de la familia E2F (hay

8 miembros) con el DNA (con las secuencias de promotores que normalmente regulan; Bandara LR, Girling R, La Thangue NB. Apoptosis induced in mammalian cells by small peptides that functionally antagonize the Rb-regulated E2F transcription factor. Nat Biotechnol. 1997 Sep; 15(9): 896-901; ver <http://www.patentstorm.us/patents/6841385.html>) aunque no se describen datos concretos de tratamiento de enfermedades. También existe una patente para el uso de péptidos inhibidores de la actividad E2F (E2F en general, no E2F1 en particular) basados en la capacidad de éstos péptidos para inhibir la formación de dímeros de E2F (las proteínas E2F tienen que dimerizar para ser funcionales): <http://www.patentstorm.us/patents/6713449-fulltext.html>. También se ha empleado oligos antisentido de E2F1 para el tratamiento de un modelo experimental murino de enfermedad de Parkinson inducible (Hoglinger GU, Breunig JJ, Depboylu C, Rouaux C, Michel PP, Alvarez-Fischer D, Boutillier AL, Degregori J, Oertel WH, Rakic P, Hirsch EC, Hunot S; The pRb/E2F cell-cycle pathway mediates cell death in Parkinson's disease; Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Feb 27; 104(9):3585-90).

El empleo de oligos anti-sentido para E2F1 ya está patentado (ver <http://www.patentstorm.us/patents/6187587.html> y <http://www.patentstorm.us/patents/5759803.html>), pero no para LBE, por lo que podrían utilizarse.

A modo ilustrativo, dicho polinucleótido puede ser un polinucleótido que codifica una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína E2F1, o bien un polinucleótido que codifica una ribozima, un aptámero, un RNA de interferencia ("small interference RNA" o siRNA o "short hairpin RNA" o shRNA) o un microRNA específico

del mRNA de la proteína E2F1, o bien combinaciones de los mismos.

Estos polinucleótidos mencionados pueden ser utilizados en un proceso de terapia génica en el que mediante cualquier técnica o procedimiento se permita la integración de los mismos en las células de un paciente humano. Este objetivo puede conseguirse mediante la administración a estas células linfoides de una construcción génica que comprende uno de los polinucleótidos mencionados con el fin de transformar dichas células permitiendo su expresión en el interior de las mismas de manera que se inhiba la expresión de la proteína E2F1. Ventajosamente, dicha construcción génica puede estar incluida dentro de un vector, tal como, por ejemplo, un vector de expresión o un vector de transferencia.

Tal como se utiliza en la presente invención el término "vector" se refiere a sistemas utilizados en el proceso de transferencia de un gen exógeno o de una construcción génica exógena al interior de una célula, permitiendo de este modo la vehiculación de genes y construcciones génicas exógenas. Dichos vectores pueden ser vectores no virales o vectores virales (Pfeifer A, Verma IM (2001) Gene therapy: promises and problems. Annu Rev Genomics Hum Genet 2: 177-211) y su administración puede ser preparada por un experto en la materia en función de las necesidades y especificidades de cada caso.

Por tanto, en otra realización particular de la invención dicho uso de un compuesto de la invención se basa en que el compuesto inhibidor es un ácido nucleico o polinucleótido que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína E2F1 humana y que incluye, al menos, una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

a) una secuencia de nucleótidos antisentido es-

pecífica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína E2F1,

b) una ribozima específica del mRNA de la proteína E2F1,

5 c) un aptámero específico del mRNA de la proteína E2F1,

d) un RNA de interferencia (iRNA) específico del mRNA de la proteína E2F1, y

10 e) un microRNA específico del mRNA de la proteína E2F1.

Con anterioridad se han descrito oligonucleótidos antisentido anti E2F1 (Hoglinger GU, Breunig JJ, Depboylu C, Rouaux C, Michel PP, Alvarez-Fischer D, Boutillier AL, Degregori J, Oertel WH, Rakic P, Hirsch EC, Hunot S; The pRb/E2F cell-cycle pathway mediates cell death in Parkinson's disease; Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Feb 27; 104(9): 3585-90. Trinh E, Boutillier AL, Loeffler JP.; Regulation of the retinoblastoma-dependent Mdm2 and E2F-1 signaling pathways during neuronal apoptosis; Mol Cell Neurosci.; 2001 Feb; 17(2): 342-53. Prost S, Lu P, Caldwell H, Harrison D. E2F regulates DDB2: consequences for DNA repair in Rb-deficient cells. Oncogene. 2007 May 24; 26(24): 3572-81), siRNAs que inhiben su expresión (Rogoff HA, Pickering MT, Frame FM, Debatis ME, Sanchez Y, Jones S, Kowalik TF. Apoptosis associated with deregulated E2F activity is dependent on E2F1 and Atm/Nbs1/Chk2. Mol Cell Biol. 2004 Apr; 24(7): 2968-77. Prost S, Lu P, Caldwell H, Harrison D. E2F regulates DDB2: consequences for DNA repair in Rb-deficient cells. Oncogene. 2007 May 24; 26(24): 3572-81) o microRNA (O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. Nature 2005; 435(7043): 839-43). Por otro lado, estas técnicas de inhibición génica, y más concretamente la vehiculización

15
20
25
30
35

de los compuestos -oligonucleótidos antisentido, iRNA, ribozimas o aptameros- puede llevarse a cabo mediante el uso de nanopartículas que incrementan el éxito de dicha transferencia (Lu PV and Woodle MC, Adv Genet 54: 117-42, 2005; Hawker CJ and Wooley KL, Science 19 (309): 5 1200-5, 2005).

Así, una realización particular de la invención lo constituye el uso de un RNAi que se une preferentemente al RNAm de E2F1, o varios RNAi, y que pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: SEQ ID NO5, SEQ ID NO6 y SEQ ID NO7 (ver Ejemplo 3).

SEQ ID NO5: AGGATGGATATGAGATGGGA (E2F1-1)

SEQ ID NO6: CTGAGGAGTTCATCAGCCTT (E2F1-2)

15 SEQ ID NO7: GTGGACTCTTCGGAGAACTT (E2F1-3)

Estos RNAi se unen a distintas regiones del RNA de E2F1). La primera de estas secuencias corresponde a la región 3' no traducida del ARNm de E2F1 (E2F1-1), mientras que las dos restantes corresponden a distintas zonas de la región codificante (E2F1-2 y 3).

Las secuencias de nucleótidos a) a -e) mencionadas previamente impiden la expresión del gen en mRNA o del mRNA en la proteína E2F1, y, por tanto, anulan su función biológica, y pueden ser desarrolladas por un experto en el sector de ingeniería genética en función del conocimiento existente en el estado del arte sobre transgénesis y anulación de la expresión génica (Clarke, A.R. (2002) Transgenesis Techniques. Principles and Protocols, 2^a Ed. Humana Press, Cardiff University; 25 Patente US20020128220. Gleave, Martin. TRPM-2 antisense therapy; Puerta-Fernández E et al. (2003) Ribozymes: recent advances in the development of RNA tools. FEMS Microbiology Reviews 27: 75-97; Kikuchi, et al., 2003. RNA aptamers targeted to domain II of Hepatitis C virus 30 IRES that bind to its apical loop region. J. Biochem.

133, 263-270; Reynolds A. et al., 2004. Rational siRNA design for RNA interference. Nature Biotechnology 22 (3): 326-330).

Otro objeto de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica o un medicamento para el tratamiento del LBE, en adelante composición farmacéutica de la presente invención, que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o agente inhibidor de la proteína E2F1, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

Una realización particular de la presente invención lo constituye una composición farmacéutica en la que el compuesto inhibidor es un ácido nucleico o polinucleótido que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína E2F1 humana y que incluye, al menos, una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína E2F1,

b) una ribozima específica del mRNA de la proteína E2F1,

c) un aptámero específico del mRNA de la proteína E2F1,

d) un RNA de interferencia (iRNA) específico del mRNA de la proteína E2F1, y

e) un microRNA específico del mRNA de la proteína E2F1.

Al igual que lo comentado anteriormente, una realización particular de la invención lo constituye la composición farmacéutica de la invención en la que el inhibidor de E2F1 es un RNAi que se une preferentemente a la secuencia de RNAm de E2F1 y que pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: SEQ ID NO5, SEQ ID NO6 y SEQ ID NO7

(ver Ejemplo 3).

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad del agente o compuesto inhibidor de la actividad de la proteína E2F1, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los compuestos, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

En una realización particular, dicha composición terapéutica se prepara en forma de una forma sólida o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la composición terapéutica proporcionada por esta invención se efectúa por vía parenteral, por vía oral, por vía intraperitoneal, subcutánea, etc. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de medicamentos y de los excipientes necesarios para la obtención de las mismas puede encontrarse, por ejemplo, en el "Tratado de Farmacia Galénica", C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid.

Otro objeto de la presente invención lo constituye el uso de la composición farmacéutica de la invención en un método de tratamiento de un mamífero, prefe-

rentemente un ser humano, afectado por LBE, en adelante uso de la composición farmacéutica de la presente invención, consistente en la administración de dicha composición terapéutica que inhibe el proceso patológico del LBE.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Se complementa la presente memoria descriptiva, con un juego de planos, ilustrativos del ejemplo preferente y nunca limitativos de la invención.

Figura 1.- Recta patrón de los valores de Ct de E2F1, cuya ecuación correspondiente es: $y = -0.2805x + 7.5516$, con un valor de $R = 0,994$.

Figura 2.- La expresión de E2F1 es mayor en líneas celulares de BL que en LCL. En el panel **A** se muestra el análisis mediante Northern blot de la expresión de RNA mensajero de E2F1, E2F2, E2F3, y ACTINA en las líneas celulares de BL y LCL indicadas. En el panel **B** se muestra el análisis de la expresión de E2F1 mediante PCR cuantitativa en las líneas celulares de BL y LCL indicadas, representado como la media de tres experimentos independientes \pm DE. Se muestra la expresión relativa a la encontrada en la línea celular LCL IB4. En el panel **C** se muestra un análisis representativo de la expresión de proteína E2F1 y tubulina mediante inmunoblot en las líneas celulares de BL y LCL indicadas. La señal de E2F1 se normalizó respecto a la de tubulina en cada muestra, y se usó como referencia el valor de la línea celular LCL Dana. Los números bajo el panel de tubulina indican la expresión de E2F1 en cada línea celular relativa a la de Dana para este experimento. El panel **D** muestra la media \pm DE de la expresión de E2F1 relativa a la encontrada en la línea Dana en cuatro experimentos independientes. En el panel **E** se muestran las curvas de creci-

miento de la línea de BL DG75 y de la línea LCL JY. El panel **F** muestra un experimento representativo de incorporación de BrdU en células DG75 y JY marcadas con yoduro de propidio. En el panel **G** se muestran los perfiles de ciclo celular representativos de células DG75 y JY.

Figura 3.- La expresión de E2F1 está descontrolada en LBE. En el panel **A** se muestra el ratio de los niveles de expresión relativa de E2F1 en amígdalas (T1 y T2) y nódulos linfáticos (LN1 a LN3) reactivos, usados como tejidos control en relación a la muestra LN3. Los paneles **B** y **C** muestran el ratio de los niveles de expresión relativa de E2F1 en diferentes muestras de LB esporádico (LBE1 a LBE30) (panel B) y otros linfomas de células B (panel C) relativos a la muestra T2. El panel **D** muestra la apariencia morfológica clásica de un LBE (BL3), de un DLBCL (DLBCL4) y de una amígdala control (T2) mediante tinción con hematoxilina-eosina y la tinción de E2F1 de las mismas muestras. Se muestra también la escala.

Figura 4.- E2F1 es necesario para la formación de tumores de BL. (A) Se determinó la capacidad de crecimiento en agar blando de las células DG75 y JY. En las filas superior e inferior se muestran fotografías de los pocillos y microfotografías de las colonias de los pocillos, respectivamente. **(B)** Las flechas indican la presencia del tumor formado por células DG75 y la ausencia de formación de tumor por células JY en un ratón SCID representativo. **(C)** Se realizó inmunoblot con extractos celulares de células DG75 transducidas con lentivirus portadores de los shRNAs indicados con anticuerpos frente a las proteínas indicadas. **(D)** A partir de cuatro experimentos independientes se calculó el porcentaje de expresión de E2F1 en células DG75 infectadas con los lentivirus indicados relativo a las células

DG75 infectadas con el lentivirus vacío (None) y se muestra como la media \pm DE. **(E)** Se analizó la capacidad de crecimiento en agar blando de células DG75 infectadas con los lentivirus indicados y muestran fotografías de los pocillos que contienen estas células. **(F)** Se muestra una cuantificación de cuatro experimentos independientes similares al mostrado en el panel E relativa a las células infectadas con el vector vacío (None). **(G)** Se analizó la capacidad de células DG75 infectadas con los lentivirus indicados para formar tumores subcutáneos en ratones SCID. En el primer panel se muestra un ratón representativo que desarrolló tumores por las células DG75 infectadas con el lentivirus vacío (None) o el portador del shRNA control. En el 2_panel se muestra la masa tumoral extirpada formada por las células portadoras del shRNA control, mientras que en el tercer panel se muestra una tinción con hematoxilina y eosina de este tumor y en el 4_ y 5_ panel se muestran tinciones de E2F1 y Ki67, respectivamente, de este tumor. **(H)** Se muestra el número de tumores grandes (>100 mg) y pequeños (<100 mg) formados por las células DG75 transducidas con los lentivirus codificantes de los shRNAs indicados.

Figura 5.- El panel A muestra las curvas de crecimiento de células DG75 transducidas con lentivirus portadores de los shRNAs indicados. En el panel B, se muestra la incorporación de BrdU de estas mismas células, relativa a la de las células infectadas con el lentivirus vacío (None), como la media \pm DE de tres experimentos independientes. Los perfiles de ciclo celular representativos de estas mismas células y de células no transducidas se muestran en el panel C. El porcentaje de cada una de estas células en G0/G1, S, y G2/M se indica en el panel D como la media \pm DE de tres experimentos independientes.

Figura 6.- La relación de proteína E2F1/Actina-

beta es muy superior en LBS que en tejidos control. Se muestra un análisis representativo de la expresión de proteína E2F1, tubulina y actina beta mediante inmunoblot en tres muestras de LBS (BL1 a BL3), una muestra de amígdala reactiva (T1) y dos muestras de nódulo linfático reactivo (LN1, LN2). La señal de E2F1 se normalizó respecto a la de actina beta en cada muestra, y se usó como referencia el valor de la muestra LN1. Los números bajo el panel de Actina indican la expresión de E2F1 en cada muestra relativa a la de LN1 para este experimento.

Figura 7.- La expresión elevada de EF21 es necesaria para mantener la capacidad de formación de tumores de las células BL2. Se determinó la capacidad de células BL2 infectadas con los lentivirus indicados para formar tumores subcutáneos en ratones SCID. $2e^6$ células fueron inoculadas subcutáneamente en hembras de 8 semanas de edad de ratones SCID. Se muestra el peso de los tumores extraídos al cabo de tres semanas.

Figura 8.- Curva de crecimiento de células DG75 transducidas con lentivirus portadores de los shRNA indicados. $10e^5$ células DG75 infectadas con los lentivirus indicados fueron cultivadas en placas de 96 pocillos por triplicado. El crecimiento celular fue medido mediante recuento celular 24, 48, 72 y 96 horas después de la siembra. La tinción con azul tripán confirmó que más del 95% de las células eran viables.

Figura 9.- Medida de la capacidad de proliferación de distintas líneas celulares transducidas con lentivirus portadores de los shRNA indicados. 50.000 células de las líneas celulares DG75, Imr-90 y MCF-7 fueron cultivadas en placas de 96 pocillos por triplicado en presencia de 10 μ Ci de timidina tritiada durante 20

horas. La incorporación de timidina fue medida en un mínimo de tres experimentos. Se representa la incorporación de timidina relativa a las células infectadas con el lentivirus no portador de shRNA (none) calculada para el promedio de un mínimo de tres experimentos.

Figura 10.- Expresión relativa de los niveles de la proteína E2F1 en las líneas celulares de linfoma de Burkitt (LB), linfocitos B inmortalizados (LCL) y linfoma difuso de células B grandes indicadas. El nivel de expresión de E2F1 se determinó mediante inmunoblot cuantitativo empleando como referencia actina-beta. Los datos muestran relativos al nivel de expresión en la línea celular JY.

15

REALIZACIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

Ejemplo 1.- El análisis de la expresión del gen E2F1 y actina mediante PCR cuantitativo permite la identificación de células y pacientes con linfoma de Burkitt

De entre los distintos métodos posibles se muestra un ejemplo de análisis mediante PCR cuantitativa. Se ha analizado la expresión relativa del gen E2F1 mediante PCR cuantitativa en varias biopsias de amígdalas (T1 y T2) y nódulos linfáticos reactivos (LN1 y LN2) -todos ellos como controles de referencia-, linfoma de Burkitt esporádico (LBE1-LBE6), y otros tipos de linfomas (linfomas foliculares, LF1 y LF2; linfoma de células de manto, LCM1 y LCM2; y, linfoma de la zona marginal del bazo, SMZL1 y SMZL2, ver Tabla 3). Se obtuvieron ARN mensajero o total de todas estas muestras de pacientes o de tejidos así como de un cultivo de células de la línea celular DG75 y se generaron el ADN complementario (ADNc) a partir de este ARNm. Posteriormente, se ha llevado a

35

cabo la PCR cuantitativa empleando diluciones seriadas de la muestra de ADNc (1:4, 1:8, 1:16 y 1:32) de las células DG75, diluciones seriadas de plásmidos portadores del ADNc de la ACTINA beta y de E2F1 humanos (0.1 ng, 1 ng, 10 ng y 100 ng) y las muestras de ADNc de los distintos tejidos indicados anteriormente sin diluir. Todas las reacciones de PCR cuantitativa se llevaron a cabo por triplicado empleando cebadores u óligos y sondas marcadas con 6-FAM específicas para E2F1 o para ACTINA beta humanas obtenidas de Applied Biosystems (SEQ ID NO8-11).

El Kit de PCR cuantitativa de Applied para ACTINA beta es el "beta Actin TaqMan Gene Expression Assay (4331182)", Ref. Hs99999903_m1 (SEQ ID NO10-11), cuya secuencia del amplicón de este kit es de 171 pares de bases:

```
GCGCCCTATAAAACCCAGCGGCGCGACGCGCCACCACCGCCGAGACCGCGTCCGCC  
CCGCGAGCACAGAGCCTCGCCTTTGCCGATCCGCCGCCCGTCCACACCCGCCGCCA  
GCTCACCATGGATGAATATCGCCGCGCTCGTCGTCGACAACGGCTCCGGCATGTGC
```

A. El primer forward (5') forma parte del DNA genómico de la ACTINA beta, pero se encuentra fuera de la región transcrita indicada en NCBI.

El Kit de PCR cuantitativa de Applied para E2F1 es el TaqMan Gene Expression Assay (4331182), Ref. Hs00153451_m1, cuya secuencia del amplicón es de 84 pares de bases:

```
AGCTCATTGCCAAGAAGTCCAAGAACCACATCCAGTGGCTGGGCAGCCACACCACA  
GTGGGCGTCGGCGGACGGCTTGAGGGGT.
```

Estas sondas llevan unido un inhibidor de la emisión de fluorescencia del fluorocromo 6-FAM de modo que mientras la sonda mantiene su integridad no emite fluorescencia. Sin embargo, a medida que aumenta la cantidad de producto amplificado aumenta (en relación directa) la cantidad de sonda degradada y el fluorocromo 6-FAM se libera de la inhibición de emisión de su fluo-

rescencia por el inhibidor mencionado. Por lo tanto, la emisión de fluorescencia en la reacción de PCR es directamente proporcional a la cantidad de producto específico amplificado. En lugar de este sistema de cebadores
5 específicos y sonda proporcionados por Applied Biosystems, también sirve cualquier otro sistema que permita determinar la cantidad de producto amplificado en cada ciclo de la reacción de PCR. Se comprobó que la eficiencia de los cebadores específicos para E2F1 y para ACTINA
10 beta era equivalente. Posteriormente, se construyeron curvas estándar empleando para ello diluciones seriadas de ADN complementario generado a partir de ARN total extraído de la línea celular de linfoma de Burkitt DG75 (o de cualquier otra línea celular que se encuentre
15 proliferando) y/o diluciones seriadas a partir de muestras de concentración conocida de plásmidos que contengan el ADN complementario correspondiente o al ARN mensajero de ACTINA beta o al ARN mensajero de E2F1. También se llevó a cabo una reacción de amplificación
20 con cada uno de los conjuntos de cebadores y sonda en ausencia de molde como control negativo. Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado como mínimo empleando una máquina de PCR en tiempo real.

Los datos de fluorescencia obtenidos durante la
25 amplificación se muestran en una gráfica logarítmica que permite conocer el número de ciclo en el que empieza a detectarse el producto amplificado (Ct). En este punto, es importante especificar el umbral en el que se debe interpretar los datos porque por debajo del valor umbral
30 puede haber un ruido de fondo que interfiere en los valores de Ct y dificulta la interpretación. Este umbral puede ser elegido automáticamente por el sistema o manualmente por el usuario para cada experimento, y es fácilmente ejecutable por un técnico experto en la
35 materia.

Para cada muestra se calcula la media del valor Ct de cada triplicado. Así, se analizaron los valores de Ct para la ACTINA beta y E2F1 obtenidos en las curvas estándar para comprobar la existencia de una relación lineal entre estos valores y las correspondientes diluciones de plásmido y de ADN complementario obtenido de las células DG75. Para cada muestra se resta el valor medio de Ct de E2F1 en función del valor medio de Ct de la ACTINA beta para obtener el valor Ct compensado. Se obtiene una recta patrón representando la cantidad de plásmido añadido en escala logarítmica frente al valor medio de Ct correspondiente en escala lineal. Se obtiene la ecuación correspondiente a la recta obtenida. A partir de esta ecuación se obtiene el valor correspondiente al logaritmo en base 10 de la cantidad de plásmido a la que equivale la cantidad de ARNm presente en cada muestra. Para considerar que una muestra de tumor expresa niveles de E2F1 elevados, se consideró solamente valores superiores al equivalente de 2,5 ng de plásmido.

La fórmula obtenida será del tipo:

$$y = (a \times \text{Ct compensado}) + k$$

Donde "y" es el logaritmo en base 10 de la cantidad de ADN presente en la muestra y "a" y "k" son la pendiente y la constante, respectivamente, de la recta patrón. Para calcular la cantidad de ADN presente en cada muestra sólo se tiene que emplear la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad de ADN} = 10^y$$

De esta forma, se calcularon los valores medios de Ct de cada triplicado obtenidos para las diluciones de plásmido fueron los siguientes (Tabla 1):

Plásmido E2F1	E2F1 Ct	Plásmido Actina	B-Actin Ct
0,1 ng	30,21	0,1 ng	29,88

1 ng	27,07	1 ng	27,12
10 ng	23,79	10 ng	23,96
100 ng	19,49	100 ng	20,05

Con los valores de Ct de E2F1 se elaboró una recta patrón (ver Figura 1), cuya ecuación correspondiente es:

$$y = -0.2805x + 7.5516$$

con un valor de $R^2 = 0,994$

Los valores medios de Ct de cada triplicado obtenidos para las diluciones de ADNc de las células DG75 fueron los siguientes (Tabla 2):

10

ADNc	Ct E2F1	Ct Actina
505 1:1	24,98	21,14
505 1:4	27,09	23,12
505 1:8	28,16	24,40
505 1:16	29,25	25,34
505 1:32	30,31	26,64

Aquí se indican los valores medios de Ct de cada triplicado obtenidos para las muestras de los distintos tejidos, Ct E2F1 y Ct Actina (Tabla 3):

15

Muestra	Ct E2F1	Ct Actina	Ct comp	y	Cantidad de ADN
Muestras diferentes de linfoma de Burkitt esporádico					
LBE1	24,61	18,81	24,61	0,65	4,45
LBE2	23,46	19,02	23,25	1,03	10,72
LBE3	24,98	21,14	22,65	1,20	15,79
LBE4	23,88	17,84	24,85	0,58	3,81
LBE5	23,36	17,08	25,09	0,51	3,27
LBE6	23,75	17,73	24,83	0,59	3,86

Muestras de amígdalas reactivas					
T1	24,75	16,86	26,70	0,06	1,15
T2	25,34	17,05	27,10	-0,05	0,89
Muestras de Nódulos linfáticos reactivos					
LN1	29,66	20,81	27,66	-0,21	0,62
LN2	29,24	19,05	29,00	-0,58	0,26
LN3	25,21	16,93	27,09	-0,05	0,90
Muestras de linfoma folicular					
LF1	23,55	14,32	28,04	-0,31	0,49
LF2	24,30	15,01	28,10	-0,33	0,47
Linfoma de células del manto					
LCM1	24,97	17,50	26,28	0,18	1,52
LCM2	26,09	18,90	26,00	0,26	1,82
Muestras de linfoma de la zona marginal del bazo					
SMZL1	26,90	17,82	27,88	-0,27	0,54
SMZL2	26,27	18,56	26,52	0,11	1,30

Al compensar el valor de Ct de E2F1 para los valores de Ct de Actina beta tomando como referencia, en este caso particular, el de la muestra BL1 se obtuvieron los valores de Ct de E2F1 compensado (Ct comp) indicados en la Tabla 3:

Al sustituir el valor de Ct comp por la "x" en la fórmula obtenida a partir de la curva patrón ($y = -0.2805x + 7.5516$) se obtuvieron los siguientes valores de "y" que corresponden al logaritmo en base 10 de la cantidad de ADN presente en la muestra equivalente a la cantidad de ADN de plásmido que se obtiene al efectuar el siguiente cálculo: Cantidad de ADN = 10^y (ver Tabla 3, columna "Cantidad ADN").

El valor de la "Cantidad de ADN" obtenido es directamente proporcional a la cantidad de ARN mensajero de E2F1 presente en cada muestra (Tabla 3, columna Y).

Se observa que los valores de "y" obtenidos para

los tejidos control (T1, T2 y LN1 a LN3) oscilan entre el equivalente de 0,26 ng y 1,15 ng de plásmido, mientras que los valores de "y" correspondientes a las muestras de linfoma folicular, linfoma de células del manto o linfoma de la zona marginal del bazo oscilan entre el equivalente de 0,47 y 1,30 ng de plásmido. En cambio, los valores de "y" obtenidos para las muestras de linfoma de Burkitt esporádico superan en todos los casos el equivalente a 3 ng de plásmido.

Posteriormente, este estudio se amplió a un total de 30 muestras de linfoma de Burkitt esporádico, 5 casos de linfoma folicular, 6 casos de linfoma de células del manto y 4 casos de linfoma de la zona marginal del bazo (ver Ejemplo 3). En todos los casos analizados de linfoma de Burkitt se obtuvieron siempre valores superiores al equivalente de 3 ng de plásmido, siendo 3,27 ng y 25,93 ng los valores más bajo y más alto, respectivamente. En ninguno de las muestras de los otros tipos de linfoma mencionado se superó el valor equivalente a 1,8 ng de plásmido.

Es interesante destacar que una de las muestras analizadas que estaba clasificada inicialmente en el BT del CNIO con el diagnóstico de linfoma de Burkitt esporádico proporcionó un valor de ADN equivalente a 0,38 ng de plásmido. Esto llevó a investigar en más profundidad esta muestra y se encontró que era positiva para proteínas del virus de Epstein-Barr y que procedía de un paciente que había recibido un trasplante, por lo que el diagnóstico correcto era de linfoma de Burkitt asociado a inmunodeficiencia y no de LBE.

En función de estos datos y metodología particular, se puede considerar suficiente margen de seguridad, establecer el valor del equivalente a 2,5 ng de plásmido como el valor mínimo para que el diagnóstico de una muestra sea compatible con el de linfoma de Burkitt

esporádico.

Es necesario indicar que cuando se utilizaron niveles de expresión de genes distintos de la Actina beta, concretamente los genes GAPDH, GUSB o el correspondiente al ARN ribosómico de la subunidad 18S para
5 ajustar los valores obtenidos de E2F1, los resultados así obtenidos no permitían establecer ningún tipo de correlación con el diagnóstico de LBE y, por lo tanto, no eran capaces de discriminar de la forma conseguida
10 con Actina beta, es decir, un 100% de sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de LBE.

Ejemplo 2.- El análisis de la expresión de E2F1 mediante Northern e inmunohistoquímica facilita la identificación de células y pacientes con linfomas

15 **2.1.- La expresión de E2F1 es mayor en líneas celulares de BL que en LCL**

Dado que los miembros activadores de la familia de factores de transcripción E2F (E2F1-E2F3) podrían estar implicados en la formación de tumores (Dimova DK, Dyson NJ. The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. Oncogene 2005; 24(17): 2810-26),
20 estos factores son candidatos potenciales para cooperar con c-myc en la formación de linfomas. Para comprobar esta hipótesis, se comparó la expresión de los genes E2F potencialmente oncogénicos entre líneas celulares de BL
25 (células B transformadas) y líneas LCL (inmortalizadas por el virus de Epstein-Barr). El análisis mediante Northern blot de la expresión de E2F1-E2F3 en varias líneas de BL y LCL indicaba que la expresión de E2F1
30 sólo era detectada en líneas de BL y no en las de LCL, mientras que los niveles de expresión de E2F2, E2F3 y ACTINA gamma (empleada como un control de carga) eran similares en todas las líneas analizadas (Figura 2A). Al comparar el nivel de expresión de E2F1 entre líneas
35 celulares de BL y LCL mediante qPCR se encontró que éste

era 6-20 veces más alto en las líneas de BL que en la línea de LCL IB4 (línea celular linfoblastoide B obtenida a partir de linfocitos B extraídos de cordón umbilical, inmortalizados mediante infección con el virus de Epstein-Barr y que ha sido descrita en King, W., A. L. Thomas-Powell, N. Raab-Traub, M. Hawke, and M. Kieff. 1980. Epstein-Barr virus RNA. V. Viral RNA in a restrictively infected, growth-transformed cell line. J. Virol. 36:506-518) mientras que la expresión era muy similar entre todas las líneas de LCL (Figura 2B). El análisis de la expresión de la proteína E2F1 mediante inmunoblot indicaba que sus niveles también eran más elevados en las líneas de BL que en las de LCL (Figuras 2C y 2D). Sin embargo, las diferencias en la expresión de E2F1 entre líneas de BL y LCL fueron menores a nivel de proteína que a nivel de mRNA (comparar Figuras 2B y 2D). Este hallazgo podría ser debido a la capacidad de c-myc para inducir la expresión del conjunto de microRNAs (*mir-17-92*) que regula negativamente la traducción de E2F1 (O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. Nature 2005; 435(7043): 839-43).

En algunos casos se ha descrito la existencia de una correlación entre el nivel de expresión de genes implicados en el crecimiento y la proliferación celular y el nivel de proliferación de las células en cultivo. Para descartar que los niveles elevados de expresión de E2F1 en las líneas de BL fueran debidas a la presencia de un mayor porcentaje de células con capacidad de proliferación en los cultivos de líneas de BL que en los de LCL, se compararon el nivel de crecimiento de las líneas de BL DG75 y Mutu-1 con el de las líneas de LCL JY y X50-7 y se descubrió que éstos eran prácticamente idénticos (Figura 2E y datos no mostrados). Más del 98% de las células presentes en los cultivos celulares eran

viables, según se determinó mediante la exclusión de azul tripán. La incorporación de BrdU y la distribución entre las fases del ciclo celular también fueron prácticamente idénticas entre ambos tipos de líneas celulares (Figuras 2F, 2G y datos no mostrados). En conjunto, estos datos indicaban que los cultivos de las líneas celulares de BL y LCL contenían niveles similares de células con capacidad proliferativa.

2.2.- La expresión de E2F1 en líneas celulares de BL y en tumores LBE está descontrolada.

A continuación se comparó el nivel de expresión de E2F1 mediante PCR cuantitativa en 30 muestras tumorales de pacientes de LBE con la de tejidos control procedentes de amígdalas (T1 y T2) y nódulos linfáticos reactivos (LN1-LN3) y con la de biopsias de pacientes de LCM, SMZL, DLBCL y LF. La expresión relativa de E2F1 fue muy similar entre los distintos tejidos control (Figura 3A). El 100% de las muestras de LBE (1-30) mostraron un nivel de expresión de E2F1 5-45 veces superior al del tejido control T2 (Figura 3B), mientras que las muestras de LCM, SMZL y LF mostraron niveles de expresión de E2F1 muy similares al del tejido control T2 (Figura 3C). En el caso de las muestras de DLBCL, la mitad de los casos mostraron una expresión de E2F1 similar a la del tejido control T2 mientras que la otra mitad de las muestras mostró un nivel de expresión de E2F1 3-4 veces superior al de la muestra T2 (Figura 3C). Es de destacar que aunque la expresión de E2F1 en las muestras 3 y 4 de DLBCL era muy similar a la del tejido control, su índice de proliferación era tan elevado como el de las muestras de LBE (más del 90%), como se puede observar en inmunotinciones de Ki67 (datos no mostrados). Los niveles de expresión de la proteína E2F1 también eran más elevados en una biopsia de LBE (LBE3) que en una muestra de DLBCL con un nivel de proliferación similar a los sBL (DLBCL4)

o que en el tejido control T2, según se determinó mediante inmunohistoquímica (Figura 3D). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la expresión elevada de E2F1 podría ser característica de la mayoría, sino de todos los casos, de LBE. Además, coincidiendo con las observaciones empleando líneas celulares de BL y LCL, parece que la expresión elevada de E2F1 no es un simple marcador de proliferación celular puesto que algunos casos de DLBCL que presentan un nivel de proliferación similar al de los casos de LBE muestran niveles de expresión de E2F1 mucho menores.

Ejemplo 3.- La reducción de la expresión de E2F1 disminuye la capacidad de las células de BL de formar tumores.

Ya se sabía que las líneas celulares de BL, pero no las de LCL, eran capaces de formar colonias en agar blando y de producir tumores malignos al ser inyectadas subcutáneamente en ratones inmunodeficientes. De acuerdo con estos datos, se observó que la línea celular EBV⁻ de BL DG75, pero no la línea de LCL JY, era capaz de formar colonias en agar blando y de producir tumores en ratones SCID (Figuras 4A y 4B).

Para comprobar si era necesaria una expresión elevada de E2F1 en las células de BL para mantener su capacidad tumorigénica, se infectaron células de la línea DG75 con lentivirus codificantes para ningún shRNA (None), para un shRNA frente a ninguna diana (Control) o para 3 shRNAs diferentes específicos para E2F1 (E2F1-1, E2F1-2 y E2F1-3, SEQ ID NO5, N6 y N7, respectivamente). Al determinar la expresión de E2F1 en células infectadas con estos lentivirus, tras una selección de las células transducidas con puromicina, se observó que los RNA interferentes E2F1-1 y E2F1-2 reducían notablemente la expresión de E2F1 (más del 70%), que el RNA interferente E2F1-3 pobremente reducía la expresión de E2F1 y que el

shRNA control prácticamente no modificaba la expresión de E2F1 en comparación con la ausencia (None) de shRNA (Figuras 4C y 4D). Ninguno de estos lentivirus afectó significativamente la expresión de E2F2, E2F3, c-myc o tubulina (Figura 4C), sugiriendo que el efecto de los shRNAs frente a E2F1 eran realmente específicos para este gen.

Las células infectadas con el lentivirus vacío (None) o con el shRNA control eran capaces de formar colonias eficientemente en agar blando, mientras que las células que expresaban los shRNA E2F1-1 y E2F1-2 apenas formaban colonias y las células que expresaban el shRNA E2F1-3 mostraron una capacidad de formación de colonias en agar blando ligeramente reducida con respecto a las células que no expresaban ningún shRNA (Figuras 4E y 4F). Las secuencias de E2F1 reconocidas por los shRNA:

- E2F1-1: AGGATGGATATGAGATGGGA
- E2F1-2: CTGAGGAGTTCATCAGCCTT
- E2F1-3: GTGGACTCTTCGGAGAACTT

A continuación se analizó el papel de la expresión elevada de E2F1 en células de BL sobre su capacidad para formar tumores *in vivo*. Para ello, se inoculó subcutáneamente células DG75 transducidas con los distintos lentivirus en ratones SCID. La inoculación de células infectadas con lentivirus vacíos (None) o con la secuencia control indujo la formación de tumores en un plazo de 2-3 semanas en 9 de 9 ratones SCID (Figuras 4G y 4H). Estos tumores consistían en masas sólidas (Figura 4G, 2_ panel) formadas por células linfoides tumorales (Figura 4G, tercer panel) que expresaban altos niveles de E2F1 (Figura 4G, 4_ panel) y Ki67 (Figura 4G, 5_ panel). Por el contrario, ninguno de los 9 ratones inoculados con células DG75 que expresaban el shRNA E2F1-1 formaron tumores y la mayoría de los ratones inoculados con células DG75 que expresaban los shRNA

E2F1-2 ó E2F1-3 o no formaron tumores o formaron tumores mucho más pequeños que los formados en los ratones inoculados con células DG75 infectadas con el lentivirus vacío (Figura 4H). Estos datos indican que la reducción de la expresión de E2F1 notablemente inhibe la capacidad de formación de tumores de las células de BL y sugieren que la expresión elevada de E2F1 podría desempeñar un papel relevante en la formación de LBE.

Se extendieron los ensayos a una línea adicional de linfoma de Burkitt a una línea adicional de linfoma de Burkitt esporádico, BL2 (Figura7). En este modelo animal, la inoculación subcutánea de células BL2 infectadas con lentivirus no portadores de ninguna secuencia de shRNA (None) o con lentivirus portadores de una secuencia de shRNA no dirigida frente a ninguna diana (Control) dio lugar a la formación de tumores en todos los casos (n=4). En cambio la inoculación de células BL2 infectadas con lentivirus portadores de la secuencia de shRNA E2F1-1 no produjo formación de tumores en ninguno de los casos (n=4) y la inoculación de células infectadas con virus portadores de la secuencia de shRNA E2F1-2 no dio lugar a la formación de tumores en 3 de los 4 casos estudiados (Figura 7) y solo se produjo un tumor de menor tamaño que los observados en presencia de los virus vacíos (None) o control. Por lo tanto, una expresión elevada de E2F1 no solo es necesaria para la formación de tumores en la línea celular de linfoma de Burkitt esporádico DG75, sino que también es necesaria para la formación de tumores de la línea celular de linfoma de Burkitt esporádico BL2. Estos datos indican que la reducción de la expresión de E2F1 notablemente inhibe la capacidad de formación de tumores de las células de Linfoma de Burkitt esporádico y sugieren que la expresión elevada de E2F1 podría desempeñar un papel

relevante en al formación de este tumor.

La reducción de la expresión de E2F1 disminuye la capacidad de proliferación de las células de BL.

5 Para investigar el mecanismo implicado en la inhibición de la formación de tumores por los shRNA específicos de E2F1, se comparó la capacidad de crecimiento en cultivo de las células DG75 con niveles de expresión de E2F1 normales o reducidos. Las células infectadas con
10 lentivirus vacíos (None) o con una secuencia de shRNA frente a ninguna diana (Control) aumentaron su número cerca de 14 veces tras 4 días en cultivo, mientras que las células que expresaban el shRNA E2F1-1 apenas aumentaron su número 2 veces en el mismo periodo de tiempo
15 (Figura 5A). Esta reducción de la capacidad de crecimiento en cultivo podía ser debida a una reducción de la capacidad de proliferación o a un aumento de la muerte celular. Dado que más de un 98% de las células presentes en todos los cultivos de células infectadas con los
20 distintos lentivirus eran viables, según se determinó mediante exclusión de azul tripán, parecía probable que la diferencia en la capacidad de crecimiento fuera debida a distintos niveles de proliferación. De hecho, al analizar la capacidad de incorporación de BrdU se
25 descubrió que las células portadoras del shRNA E2F1-1 sólo incorporaban un 50% menos de BrdU que las células portadoras del shRNA control o que las células que no expresaban ningún shRNA (None) (Figura 4B). Además, el análisis del ciclo celular mostraba que las células
30 infectadas con un lentivirus vacío (None) o con el portador del shRNA control presentaban una distribución muy similar a la de las células no infectadas mientras que las células que expresaban el shRNA E2F1-1 mostraban una clara acumulación en la fases G2/M del ciclo celular
35 (Figura 5D).

Se ha estudiado en mayor profundidad el efecto de los distintas secuencias de shRNA para E2F1 sobre el crecimiento in Vitro de las células de linfoma de Burkitt esporádico y se ha observado que las células infectadas con lentivirus vacíos (None) o con una secuencia control (Control) aumentaron su número cerca de 14 veces tras 4 días en cultivo, las células que expresaban los shRNA E2F1-1, E2F1-2 y E2F1-3 apenas aumentaron su número en 2, 4 y 5 veces, respectivamente (Figura 8). De esta forma, se demuestra que no solo el shRNA E2F1-1 es capaz de inhibir la proliferación celular de las células de linfoma de Burkitt esporádico (Figura 5 A), sino que también los shRNA E2F1-2 y E2F1-3 llevan a cabo el mismo efecto.

15

Se ha determinado que la reducción de la expresión de E2F1 en células de la línea celular de linfoma de Burkitt esporádico DG75 inhibía su capacidad de proliferación (Figura 5 B). Además se ha podido demostrar que la reducción de la expresión de E2F1 mediante las secuencias de shRNA empleadas no inhibe la capacidad proliferativa de la línea celular primaria de fibroblastos diploides humanos, Imr-90 (Figura 9). Estos datos apoyan la hipótesis de que los tratamientos del linfoma de Burkitt basados en conseguir la reducción de la expresión de E2F1 podrían no presentar efectos secundarios adversos dado que no afectaría a células primarias.

Esta hipótesis también se ve apoyada por datos publicados que demuestran que los ratones deficientes en E2F1 son viables hasta una edad avanzada (Field et al., 1996; Yamasaki et al., 1996). Además, la falta de expresión de E2F1 podría no causar ni siquiera inmunosupresión puesto que se ha demostrado que la falta de expresión de E2F1 en ratones no inhibe la proliferación de linfocitos T (DeRyckere and DeGregori, 2005).

35

Materiales y Métodos

Northern blot y Análisis por PCR cuantitativo

5 Se preparó RNA total según estaba descrito (9).
Se analizó el RNA (20 µg) mediante Northern Blot e
hibridación con fragmentos de DNA de E2F1, E2F2, E2F3 y
γ-actina marcados con 32P. La hibridación y los lavados
se realizaron según estaba descrito (9). La PCR cuanti-
10 tativa (qPCR) se llevó a cabo según las instrucciones
del proveedor (Applied Biosystems, Foster City, CA),
usando sondas específicas para E2F1 y ACTINA humanos.

Pacientes y Células

15 Todos los casos fueron seleccionados de consul-
tas efectuadas al Centro Nacional de Investigaciones
Oncológicas (CNIO) y a través de la Red Española de
Bancos de Tumores. Los estudios fueron aprobados por las
Comisiones Éticas pertinentes y los pacientes aportaron
consentimiento por escrito tras ser informados. Las
20 biopsias de los distintos linfomas fueron revisadas por
M.A. Piris y su equipo de expertos hematopatólogos
usando los criterios de la Organización Mundial de la
Salud (10). Treinta muestras de sBL de pacientes no
inmunodeficientes y muestras de amígdalas y nódulos
25 linfáticos reactivos y biopsias de de linfomas de célu-
las del manto (LCM), linfomas de la zona marginal del
bazo (SMZL), linfoma difuso de células B grandes (DLBCL)
y linfoma folicular (LF) fueron seleccionados finalmen-
te. Las líneas linfoblastoides de linfocitos B (LCL)
30 X50-7, JY, Dana e IB4 y las líneas de BL Raji, Rael,
Mutu-I, Akata y DG75 fueron cultivadas en RPMI 1640,
mientras que la línea celular de riñón humano mientras
293-T fue cultivada en Dulbecco's modified Eagle medium.
Ambos medios fueron suplementados con 10% de suero
35 bovino fetal inactivado por calor (GIBCO, Invitrogen

Corp.), 2 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina.

Producción de Lentivirus e Infecciones

Las células 293-T fueron transfectadas con 20 µg
5 de vector basado en MISSION pLKO.1-puro, 15 µg de psPAX2
y 5 µg de pMD2G-VSVG usando el método de precipitación
de DNA con fosfato cálcico. Los vectores empleados
basados en MISSION pLKO.1-puro se obtuvieron de Sigma-
Aldrich (St. Louis, Missouri) y o no contenían ningún
10 shRNA o codificaban para un shRNA control (un shRNA que
genera un siRNA con una secuencia errónea de al menos 5
pares de bases con respecto a cualquier gen humano o de
ratón conocido) o para distintos shRNA específicos para
E2F1. Para la transducción de células DG75, incubamos
15 las células en presencia de medio que contenía las
partículas virales y 8 µg/ml de sulfato de protamina
durante 16 horas. Las células no transducidas fueron
eliminadas del cultivo mediante incubación con 1 µg/ml
de puromicina.

20 Inmunoblot e Inmunohistoquímica

Para la hibridación de las membranas se usaron
anticuerpos anti-E2F1, anti-E2F2, anti-E2F3, anti-E2F4,
o anti-c-myc de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz,
CA), anti-Tubulina de Sigma-Aldrich seguidos de anti-
25 cuerpos anti-ratón o anti-conejo acoplados a peroxidasa
(Sigma-Aldrich). Las muestras de tejido incluidas en
parafina se tiñeron con anti-E2F1 (Santa Cruz) o con
anti-Ki67 (DAKO, Copenhagen, Denmark) y fueron coteñidas
con hematoxilina o simplemente teñidas con hematoxilina
30 y eosina.

Crecimiento Celular, Proliferación Celular, Análisis de Ciclo Celular y Apoptosis.

Para determinar el nivel de crecimiento celular,
se resuspendieron las células a una concentración de 2 x
35 10⁵/ml y se cultivaron en placas de 24 pocillos por

triplicado. Se midió el crecimiento mediante recuento de células a distintos intervalos. La viabilidad celular se confirmó mediante exclusión de azul tripán. Para el marcaje con BrdU, se usó el kit "FITC BrdU flow kit" (BDBiosciences, San José, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El análisis del ciclo celular se llevó a cabo como se describió previamente (11) empleando yoduros de propidio. La apoptosis se determinó mediante marcaje con anexina V-FITC (Bender MedSystems, Viena, Austria). Las células teñidas con BrdU, yoduro de propidio y anexina-V se analizaron empleando un citómetro de flujo FACScan (BDBiosciences).

Ensayos de Transformación in vitro e in vivo

Los pocillos de placas de 6 pocillos se cubrieron con medio RPMI 1640 que contenía 0.5% de agarosa SeaPlaque (FMC, Rockland, Maine) y FCS al 10%. Sobre esta base se depositaron 104 células embebidas medio RPMI 1640 con 0.3% de agarosa SeaPlaque y FCS al 10%. Se contó el número de colonias crecidas al cabo de 2-3 semanas de la siembra de las células en placas por triplicado. Células DG75 (2×10^6) resuspendidas en 0.1 ml de tampón fosfato salino fueron inyectadas subcutáneamente en hembras de 6-8 semanas de edad de ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) C.B.-17. Se extirparon las masas tumorales, se pesaron y se incluyeron en parafina para su análisis inmunohistoquímico.

Por último se han llevado a cabo estudios comparando la relación entre la expresión de las proteínas E2F1 y Actina en varias líneas celulares de Linfoma de Burkitt, de linfoblastos B inmortalizados y de Linfoma Difuso de Células B grandes. Los resultados obtenidos indican que la relación E2F1/Actina es mucho más elevada en las líneas celulares de Linfoma de Burkitt que en las

de linfoblastos inmortalizados (Figura 10A) y que también es mucho más elevada en las líneas de Burkitt que en las de Linfoma Difuso de Células B grandes (Figura 10B).

5

Estos datos apoyan fuertemente la utilidad de métodos de determinación de la expresión protéica de E2F1 relativa a la de actina-beta para el diagnóstico diferencial entre Linfoma de Burkitt y el Linfoma Difuso de células B grandes.

10

No alteran la esencialidad de esta invención variaciones en materiales, forma, tamaño y disposición de los elementos componentes, descritos de manera no limitativa, bastando ésta para proceder a su reproducción por un experto.

15

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento de identificación de un linfoma de Burkitt esporádico (LBE) caracterizado porque se basa en la identificación de los niveles de la presencia de la proteína E2F1 humana en una muestra biológica y porque comprende las siguientes etapas:

a) identificación de los niveles de expresión de E2F1, ajustándolos con los niveles de un marcador control, preferentemente ACTINA beta humana cuando proceda, en una muestra biológica, y

b) comparación de los niveles de E2F1 observados en a) con una muestra biológica control, e

c) identificación de una muestra como LBE cuando los niveles de E2F1 superan a los obtenidos en la muestra control por encima de un umbral determinado.

2.- Procedimiento de identificación según la reivindicación 1 caracterizado porque E2F1 y ACTINA beta se corresponden con el gen o proteína E2F1 (SEQ ID NO 1 y NO 2, respectivamente) y con el gen o proteína ACTINA beta (SEQ ID NO 3 y NO 4, respectivamente), respectivamente.

3.- Procedimiento de identificación según la reivindicación 1 caracterizado porque la muestra biológica control se desarrolla de forma artificial, preferentemente, un plásmido que contiene el ADNc del gen E2F1 humano.

4.- Procedimiento de identificación según la reivindicación 1 caracterizado porque la identificación de E2F1 se lleva a cabo mediante RT-PCR cuantitativa de un precursor génico de E2F1 y en el que los niveles de E2F1 se ajustan a los de ACTINA beta.

5.- Procedimiento de identificación según la reivindicación 4 caracterizado porque se utiliza RNA, ya sea RNA polyA+ o RNA total o RNA polyA+, de una muestra

biológica sospechosa de LBE y de un tejido control y la amplificación de la secuencia del RNAm del gen E2F1 y ACTINA beta se llevan a cabo con adecuados oligonucleótidos o cebadores específicos ya sean, tanto para la
5 región codificante o no codificante del UNAM.

6.- Procedimiento de identificación según la reivindicación 5 caracterizado porque los oligos utilizados para la RT-PCR para la amplificación de E2F1 y ACTINA beta se corresponden con las SEQ ID NO8-9 y SEQ
10 ID NO10-11, respectivamente.

7.- Procedimiento de identificación según la reivindicación 4 caracterizado porque el umbral distintivo de LBE es un nivel de expresión de E2F1 superior al equivalente de 2.5 ng de plásmido, utilizado como control.
15

8.- Procedimiento de identificación según la reivindicación 1 caracterizado porque el procedimiento se lleva a cabo mediante la técnica de PCR semicuantitativa con unos cebadores específicos de E2F1 y Actina beta.
20

9.- Procedimiento de identificación según la reivindicación 1 caracterizado porque el procedimiento se lleva a cabo mediante la técnica de Northern blot con sondas de polinucleótidos específicas de los cDNAs de los genes E2F1 y ACTINA beta (SEQ ID NO1 y 3).
25

10. Procedimiento de identificación según la reivindicación 1 caracterizado porque el procedimiento se lleva a cabo mediante la técnica de hibridación *in situ* con un precursor de E2F1.
30

11. Procedimiento de identificación según la reivindicación 1 caracterizado porque la identificación de E2F1 de a) se refiere a la forma proteica del gen E2F1 (SEQ ID NO 2) y la identificación de ACTINA beta se refiere a su forma proteica (SEQ ID NO 4) y se lleva a cabo mediante el uso de anticuerpos específicos de la
35

proteína E2F1 y ACTINA beta, respectivamente, en técnicas inmunológicas, por ejemplo, de inmunoblot o Western blot y de inmunohistoquímica.

5 12.- Procedimiento de identificación según la reivindicación 11 caracterizado porque los anticuerpos son monoclonales o policlonales, fragmentos o derivados de los mismos.

10 13.- Procedimiento de identificación según las reivindicaciones 1 a la 12 caracterizado porque se realiza con el marcador E2F1 como único marcador o de forma conjunta con otros marcadores de LBE.

15 14.- Procedimiento de identificación según las reivindicaciones 1 a la 13 caracterizado porque se lleva a cabo formando parte de un microarray de expresión biológica, ya sea en forma génica -a partir de RNAm- o en forma de proteína.

20 15.- Uso del procedimiento de identificación según las reivindicaciones 1 a la 14 para el diagnóstico de LBE a partir de muestras biológicas humanas aisladas del cuerpo humano.

16.- Procedimiento de identificación y evaluación de la actividad de compuestos inhibidores de la proteína o del gen E2F1 útiles para el tratamiento del LBE caracterizado porque comprende los siguientes pasos:

25 a) Puesta en contacto de un sistema biológico donde exista una expresión de E2F1 que produzca parcial o totalmente un fenotipo LBE con el compuesto candidato objeto de este procedimiento, e incubación en las condiciones adecuadas,

30 b) determinación de un parámetro indicativo de disminución de los niveles de E2F1 o de regresión de un fenotipo LBE, e

35 c) identificación de un compuesto inhibidor de la actividad de la proteína E2F1 cuando se observa una regresión de dicho fenotipo LBE o una disminución de los

niveles de E2F1.

17.- Procedimiento de identificación y evaluación según la reivindicación 16 caracterizado porque el sistema biológico de a) consiste en una línea celular o un animal transgénico donde se encuentre regulada, de forma constante o condicionada, la expresión de la proteína E2F1, y donde su expresión provoca un fenotipo LBE o un incremento de E2F1.

18.- Procedimiento de identificación y evaluación según la reivindicación 16 caracterizado porque el parámetro indicativo de regresión de un fenotipo LBE de b) pertenece al siguiente grupo: formación de colonias en agar blando o formación de tumores in vivo; y en el caso de la disminución de la expresión de los niveles de E2F1 se lleva a cabo por las técnicas: PCR, Northern blot, inmunoblot e inmunohistoquímica.

19.- Uso de un compuesto o agente inhibidor de la actividad de la proteína E2F1 en la elaboración de medicamentos o composiciones farmacéuticas para el tratamiento de pacientes humanos con LBE.

20.- Uso de un compuesto o agente inhibidor de la actividad de la proteína E2F1 según la reivindicación 19 caracterizado porque es un ácido nucleico o polinucleótido que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína E2F1 humana y que incluye, al menos, una secuencia de nucleótidos seleccionada entre:

- a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína E2F1,
- b) una ribozima específica del mRNA de la proteína E2F1,
- c) un aptámero específico del mRNA de la proteína E2F1,
- d) un RNA de interferencia (iRNA) específico del mRNA de la proteína E2F1, y

e) un microRNA específico del mRNA de la proteína E2F1.

21.- Uso de un compuesto o agente inhibidor de la actividad de la proteína E2F1 según la reivindicación 5 20 caracterizado porque el RNAi de d) es un RNAi, o mezcla de varios, perteneciente al siguiente grupo: SEQ ID NO5, SEQ ID NO6 y SEQ ID NO7.

22.- Composición farmacéutica o un medicamento para el tratamiento del LBE caracterizado porque comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto o agente inhibidor de la proteína E2F1, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. 10

23.- Composición farmacéutica según la reivindicación 22 caracterizada porque el compuesto inhibidor es un ácido nucleico o polinucleótido que impide o disminuye la expresión del gen codificante de la proteína E2F1 humana y que incluye, al menos, una secuencia de nucleótidos seleccionada entre: 15

a) una secuencia de nucleótidos antisentido específica de la secuencia del gen o del mRNA de la proteína E2F1, 20

b) una ribozima específica del mRNA de la proteína E2F1,

c) un aptámero específico del mRNA de la proteína E2F1, 25

d) un RNA de interferencia (iRNA) específico del mRNA de la proteína E2F1, y

e) un microRNA específico del mRNA de la proteína E2F1. 30

24.- Composición farmacéutica según la reivindicación 23 caracterizada porque el RNAi de d) es, al menos, un RNAi que pertenece al siguiente grupo: SEQ ID NO5, SEQ ID NO6 y SEQ ID NO7.

25.- Uso de la composición farmacéutica según 35

las reivindicaciones 22 a la 24 en un método de tratamiento de un mamífero, preferentemente un ser humano, afectado por LBE, consistente en la administración de dicha composición terapéutica que inhibe el proceso

5 patológico del LBE.

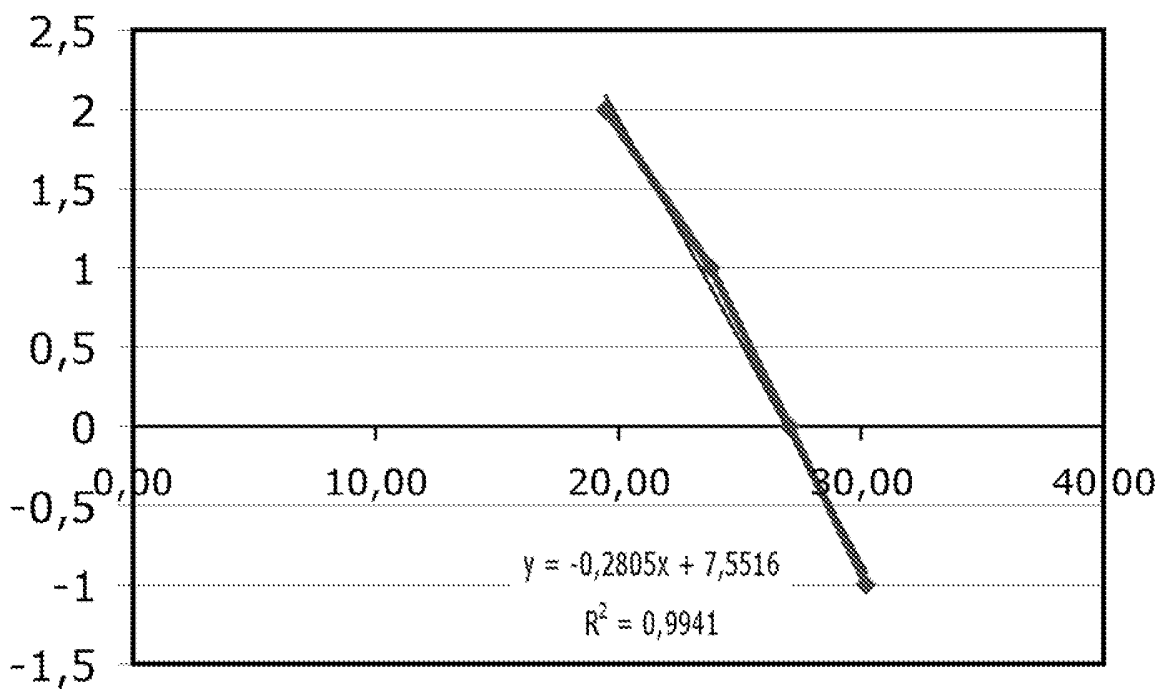


FIG. 1

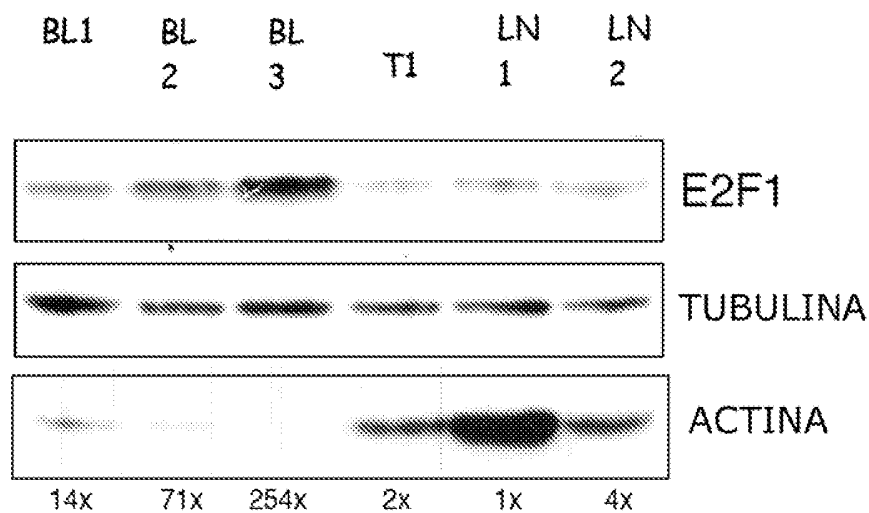


FIG. 6

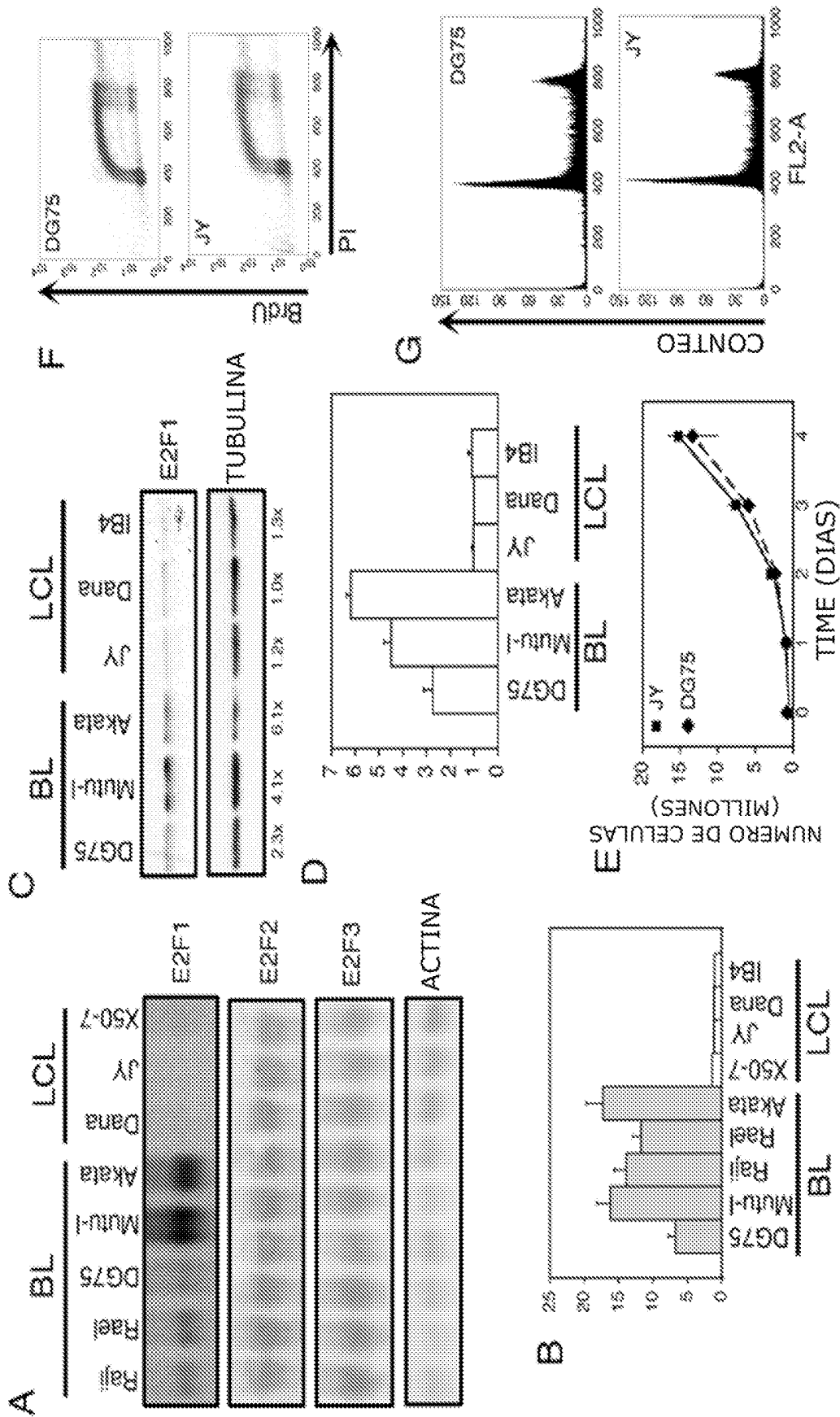


FIG.2

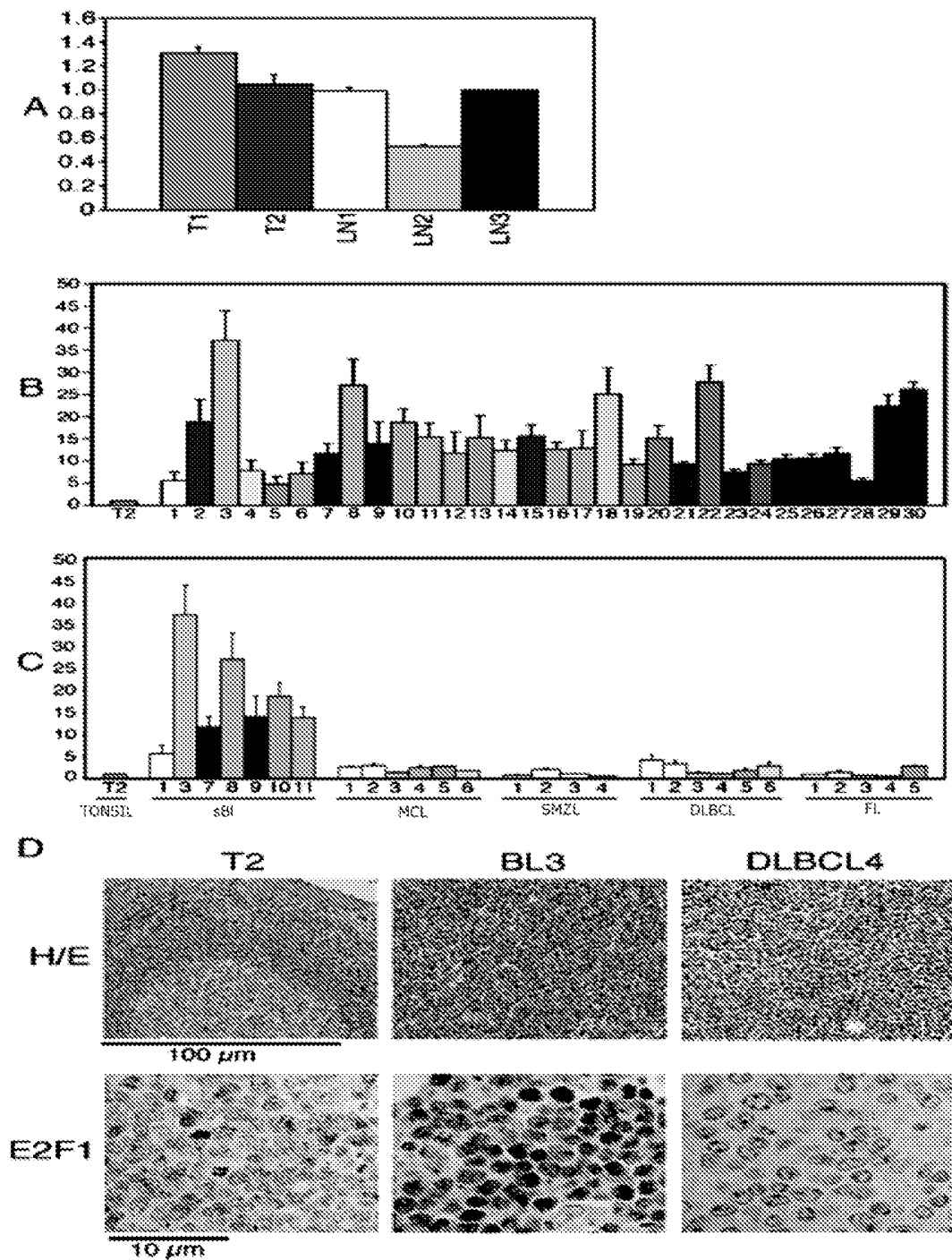


FIG.3

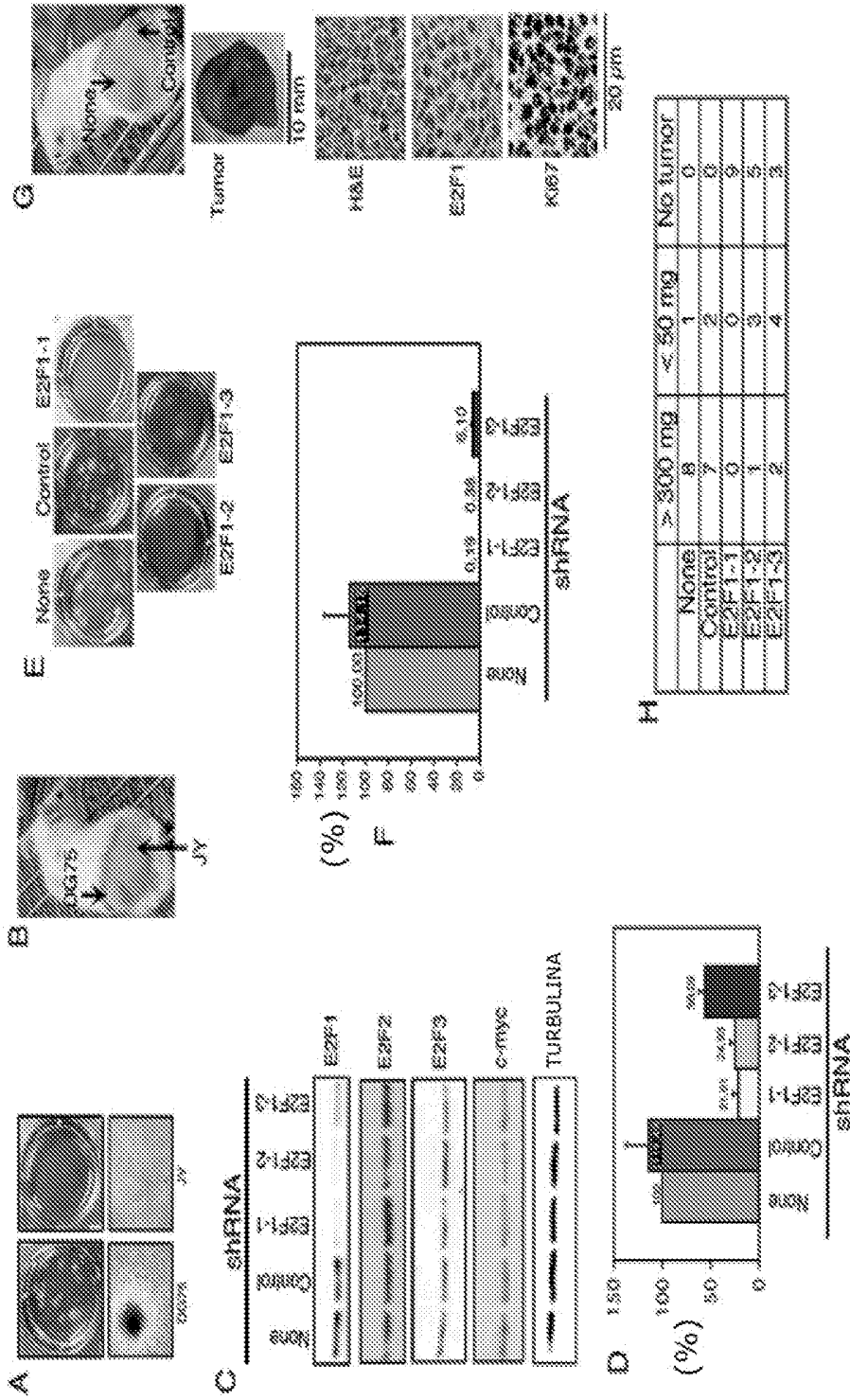


FIG.4

5/7

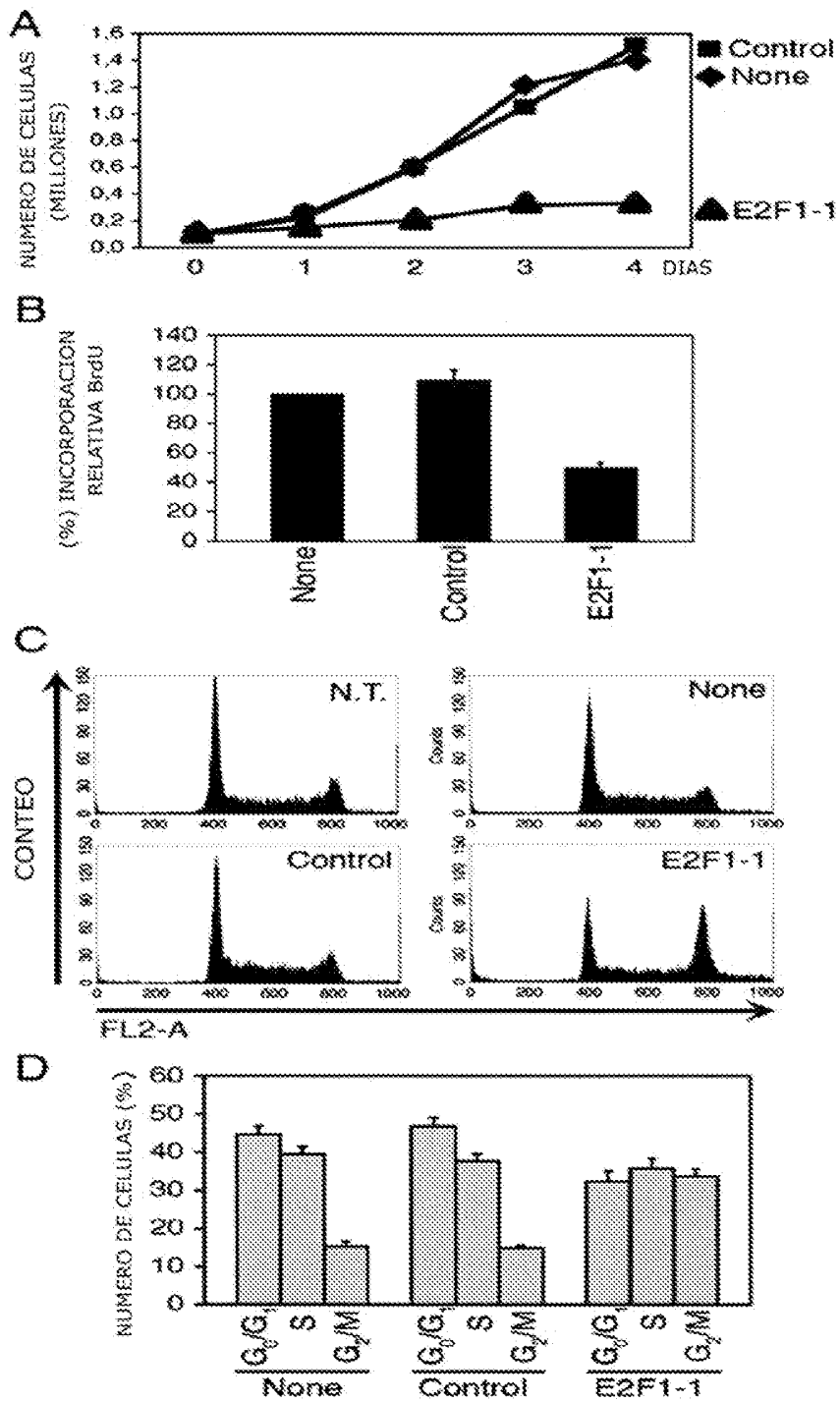


FIG.5

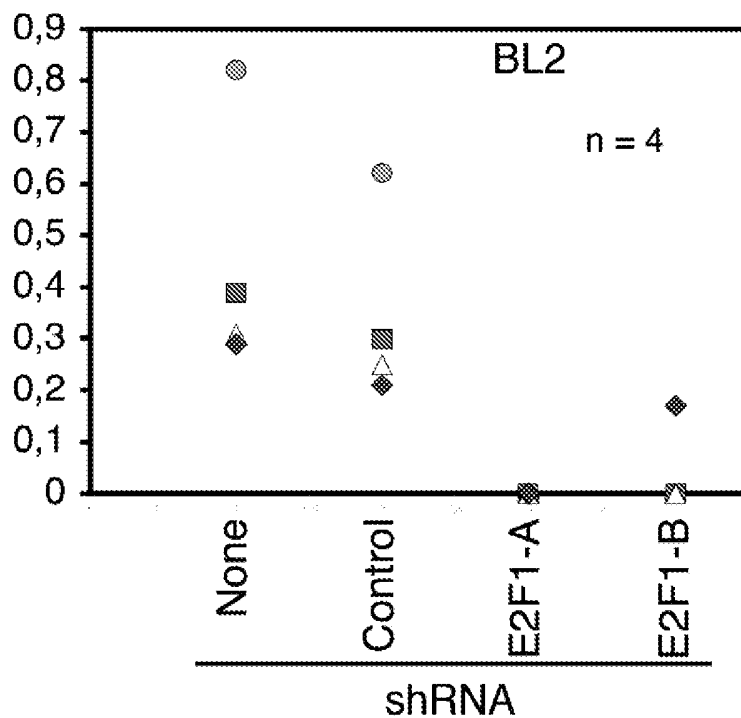


FIG.7

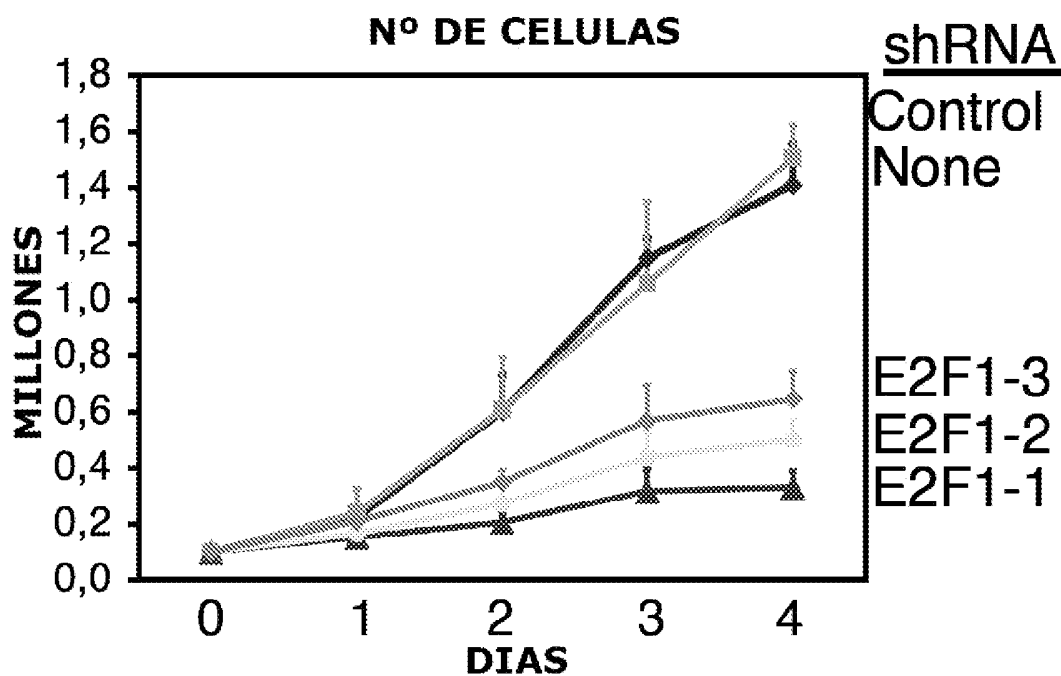


FIG.8

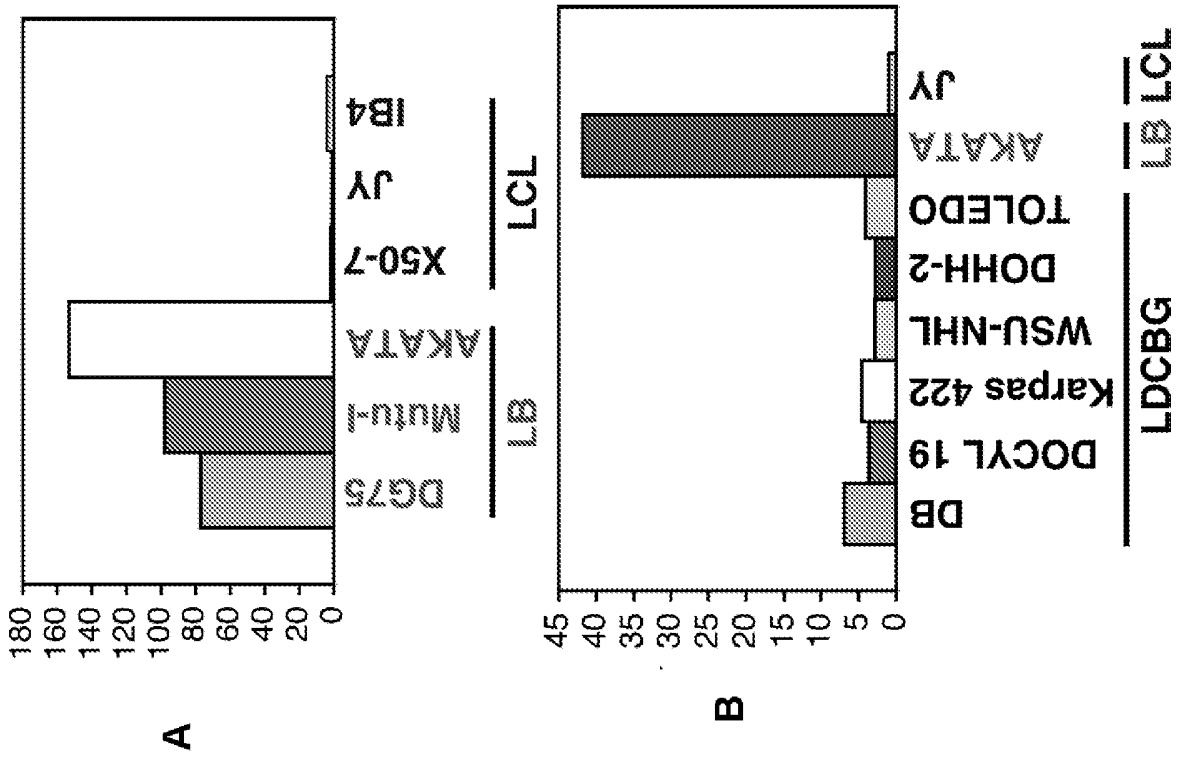


FIG.10

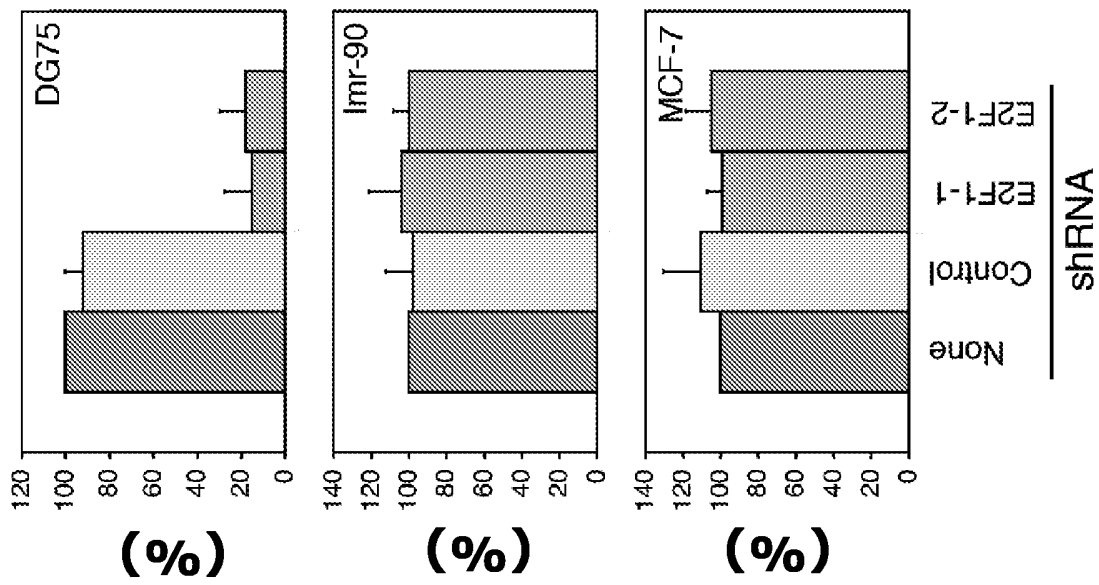


FIG.9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/ES2008/070182

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. G01N33/574 G01N33/68 C12N15/11 A61K45/00

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)

C12N G01N

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 practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, INSPEC, FSTA, COMPENDEX, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MOLINA-PRIVADO ET AL.: "E2F1 expression is deregulated in Burkitt lymphoma cell lines and Tumour samples and might contribute to the lymphomagenesis of these Tumours"[Online] 19 February 2007 (2007-02-19), XP002516043 Retrieved from the Internet: URL:http://www.cnio.es/eventos/descargas/CC/220242_1269,42_booklet.pdf> [retrieved on 2009-02-18] abstract	16-18
Y	* idem *	20,21, 23,24
	----- -/--	

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

- *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)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *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
- *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
- *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 such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

27 February 2009

Date of mailing of the international search report

10/03/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Adida, Anne

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/ES2008/070182

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>AIELLO A ET AL: "Expression of differentiation and adhesion molecules in sporadic Burkitt's lymphoma." HEMATOLOGICAL ONCOLOGY 1990 JUL-AUG, vol. 8, no. 4, July 1990 (1990-07), pages 229-238, XP002516044 ISSN: 0278-0232 abstract page 230, line 11 - line 13 page 236, line 35 - line 41</p>	1-3,5-15
X	<p>FERRY JUDITH A: "Burkitt's lymphoma: clinicopathologic features and differential diagnosis." THE ONCOLOGIST APR 2006, vol. 11, no. 4, April 2006 (2006-04), pages 375-383, XP002516045 ISSN: 1083-7159 paragraph "Staging, Treatment, and Outcome"</p>	19,22,25
Y	<p>US 2006/239990 A1 (NABEL ELIZABETH G [US] ET AL) 26 October 2006 (2006-10-26) paragraphs [0072] - [0076], [0186], [0187], [0193] claims 1,5,8</p>	20,21, 23,24
P,X	<p>PRIVADO I M ET AL: "Role of E2F1 in sporadic Burkitt lymphoma formation" EUROPEAN JOURNAL OF CANCER. SUPPLEMENT, PERGAMON, OXFORD, GB, vol. 6, no. 9, 1 July 2008 (2008-07-01), page 74, XP022833805 ISSN: 1359-6349 [retrieved on 2008-07-01] abstract</p>	1-3,5-25
A	<p>LAI R ET AL: "Immunohistochemical detection of E2F-1 in non-Hodgkin's lymphomas: a survey of 124 cases." MODERN PATHOLOGY : AN OFFICIAL JOURNAL OF THE UNITED STATES AND CANADIAN ACADEMY OF PATHOLOGY, INC MAY 1998, vol. 11, no. 5, May 1998 (1998-05), pages 457-463, XP008102537 ISSN: 0893-3952 cited in the application the whole document</p>	
A	<p>US 6 187 587 B1 (POPOFF IAN [US] ET AL) 13 February 2001 (2001-02-13) cited in the application the whole document</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/ES2008/070182

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2006239990	A1	26-10-2006	NONE
US 6187587	B1	13-02-2001	AU 4334601 A 12-09-2001
			EP 1268507 A1 02-01-2003
			JP 2003525058 T 26-08-2003
			WO 0164706 A1 07-09-2001

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2008/070182

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

INV. G01N33/574 G01N33/68 C12N15/11 A61K45/00

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

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

C12N G01N

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)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, INSPEC, FSTA, COMPENDEX, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	MOLINA-PRIVADO ET AL.: "E2F1 expression is deregulated in Burkitt lymphoma cell lines and Tumour samples and might contribute to the lymphomagenesis of these Tumours" [Online] 19 febrero 2007 (2007-02-19), XP002516043 Recuperado del internet: URL : http://www.cnio.es/eventos/descargas/CC/220242_1269,42_booklet.pdf > [recuperado el 2009-02-18] resumen	16-18
Y	* idem *	20, 21, 23, 24

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. 26 febrero 2009 (26.02.09) Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 10 marzo 2009 (10.03.09)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional EPO Funcionario autorizado
Nº de fax Nº de teléfono

C (Continuación).		
DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	<p>AIELLO A ET AL : "Expression of differentiating and adhesion molecules in sporadic Burkitt's lymphoma." HEMATOLOGICAL ONCOLOGY 1990 JUL-AUG , vol. 8, no. 4, julio 1990 (1990-07), páginas 229-238, XP002516044 ISSN: 0278-0232 resumen página 230, línea 11 - línea 13 página 236, línea 35 - línea 41</p>	1-3,5-15
X	<p>FERRY JUDITH A: "Burkitt's lymphoma: clinicopathologic features and differential diagnosis." THE ONCOLOGIST APR 2006, vol. 11, no. 4, abril 2006 (2006-04), páginas 375-383, XP002516045 ISSN: 1083-7159 párrafo "Staging, Treatment, and Outcome"</p>	19,22,25
Y	<p>US 2006/239990 AI (NABEL ELIZABETH G [US] ET AL) 26 octubre 2006 (2006-10-26) párrafos [0072] - [0076], [0186], [0187], [0193] reivindicaciones 1, 5, 8</p>	20,21,23,24
P,X	<p>PRIVADO I M ET AL : "Role of E2F1 in sporadic Burkitt lymphoma formation" EUROPEAN JOURNAL OF CANCER. SUPPLEMENT, PERGAMON, OXFORD, GB, vol. 6, no. 9, 1 julio 2008 (2008-07-01), página 74, XP022833805 ISSN: 1359-6349 [recuperado el 2008-07-01] resumen</p>	1-3,5-25
A	<p>LAI R ET AL: "Immunohistochemical detection of E2F-1 in non-Hodgkin's lymphomas: a survey of 124 cases." MODERN PATHOLOGY: AN OFFICIAL JOURNAL OF THE UNITED STATES AND CANADIAN ACADEMY OF PATHOLOGY , INC MAY 1998, vol. 11, no. 5, May 1998 (1998-05), pages 457-463, XP008102537 ISSN: 0893-3952 citado en la solicitud todo el documento</p>	
A	<p>US 6 187 587 B1 (POPOFF IAN [US] ET AL) 13 febrero 2001 (2001-02-13) citado en la solicitud todo el documento</p>	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2008/070182

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
US 2006239990 A1	26-10-2006	NINGUNA	
US 6187587 B1	13-02-2001	AU 4334601 A EP 1268507 A1 JP 2003525058 T WO 0164706 A1	12-09-2001 02-01-2003 26-08-2003 07-09-2001