



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 161 612**

② Número de solicitud: 009901466

⑤ Int. Cl.<sup>7</sup>: C12N 15/12

G01N 33/574

G01N 33/50

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫ Fecha de presentación: **01.07.1999**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **01.12.2001**

Fecha de concesión: **08.05.2002**

⑮ Fecha de anuncio de la concesión: **01.06.2002**

⑯ Fecha de publicación del folleto de patente:  
**01.06.2002**

⑰ Titular/es:  
**Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
Serrano, 117  
28006 Madrid, ES  
Universidad Autónoma de Madrid**

⑱ Inventor/es: **Cano García, Amparo;  
Nieto Toledano, M<sup>a</sup> Angela;  
Rodrigo Castro, M<sup>a</sup> Isabel;  
Locascio, Annamaria;  
García del Barrio, Marta;  
Blanco Fernández de Valderrama, M<sup>a</sup> José;  
Portillo Pérez, Francisco y  
Pérez Moreno, Mirna Alicia**

⑲ Agente: **No consta**

⑳ Título: **Procedimiento para identificar un compuesto que inhiba la función represora de Snail.**

㉑ Resumen:

Procedimiento para identificar un compuesto que inhiba la función represora de Snail  
El procedimiento consiste en añadir dicho compuesto a las células transformadas con capacidad de expresar el marcador pronóstico Snail, para después determinar la disminución o eliminación total de la capacidad de expresar dicho marcador de pronóstico en esas células transformadas. Por último, se realiza la selección de dicho compuesto para el tratamiento de la invasión y metástasis tumoral si dichas células transformadas presentan una disminución o eliminación total de la expresión de Snail (y una reversión de sus propiedades invasivas y metastásicas).

ES 2 161 612 B1

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

## DESCRIPCION

Procedimiento para identificar un compuesto que inhiba la función represora de Snail.

### Sector de la invención

Biomedicina. Proteínas diana de compuestos antitumorales.

Sistema de identificación de candidatos a compuestos antitumorales

Marcadores de invasión y metástasis tumorales, su uso como marcadores de pronóstico de la enfermedad y como guía de los profesionales médicos para seleccionar o evaluar tratamientos.

### Estado de la técnica

La proteína cadherina E no sólo se ha comprobado que media en la adhesión intercelular de células epiteliales durante el desarrollo embrionario y en los tejidos adultos, sino que además está implicada en la transformación fenotípica que se observa en los tumores epiteliales durante su progresión a tumores invasivos. En este proceso de invasión de las células tumorales la expresión de la proteína cadherina E se reduce o se anula y esta pérdida se asocia con la adquisición de propiedades migratorias. Las alteraciones funcionales de cadherina E y/o sus proteínas asociadas, cateninas, han sido asociadas con una menor diferenciación y mayor agresividad tumoral [Takeichi, M. Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Curr. Op. Cell Biol.* 5, 806-811 (1993); Birchmeier, W. & Behrens, J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim. Biophys. Acta* 1198, 11-26 (1994)] e incluso se han visto implicadas en la transición de adenomas a carcinomas invasivos [Perl, A.K., P. Wilgenbus, U. Dahl, H. Semb & Christofori, G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature* 392, 190-193 (1998).]. Por todo ello, el gen de la cadherina E ha sido considerado como un gen supresor de la invasión tumoral [Frixen, U. H., et al. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J. Cell Biol.* 113, 173-185 (1991); Vleminckx, K., Vakaet, L. J., Maree, M., Fiers, W. & Van Roy, F. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell* 66, 107-119 (1991); Miyaki, M. et al. Increased cell-substratum adhesion, and decreased gelatinase secretion and cell growth, induced by E-cadherin transfection of human colon carcinoma cells. *Oncogene* 11, 2547-2552 (1995); Llorens, A. et al. Downregulation of E-cadherin in mouse skin carcinoma cells enhances a migratory and invasive phenotype linkend to matrix metalloproteinase-9 gelatinase expression. *Lab. Invest.* 78, 1-12 (1998).] por lo que los mecanismos moleculares que controlan su expresión o función son de suma importancia en el conocimiento de los procesos tumorales invasivos.

La expresión del gen de la cadherina E está regulada por varios elementos localizados en la región 5'proximal de su promotor [Behrens, J., Löwrick, O., Klein, H. L. & Birchmeier, W. The E-cadherin promoter: functional analysis of a GC-rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element. *Proc. Natl. Acad.*

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Sci. USA 88, 11495-11499 (1991); Ringwald, M., Baribault, H., Schmidt, C. & Kemler, R. The structure of the gene coding for the mouse cell adhesion molecule uvomorulin. *Nucleic Acids Res.* 19, 6533-6539 (1991); Bussemakers, M. J., Giroldi, L. A., van Bokhoven A. & Schalken, J. A. Transcriptional regulation of the human E-cadherin gene in human prostate cancer cell lines: characterization of the human E-cadherin gene promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203, 1284-1290 (1994), Giroldi, L. A. et al. Role of E-boxes in the repression of E-cadherin expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241, 453-458 (1997)]. Entre ellos, destaca el elemento E-pal que contiene dos cajas E, identificado en el promotor de la cadherina E de ratón (entre las posiciones -90 a -70) y que actúa como represor en células normales y transformadas deficientes de cadherina E [Behrens, J., Löwrick, O., Klein, H. L. & Birchmeier, W. The E-cadherin promoter: functional analysis of a GC-rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 11495-11499 (1991); Hennig, G., Löwrick, O., Birchmeier, W. & Behrens, J. Mechanisms identified in the transcriptional control of epithelial gene expression. *J. Biol. Chem.* 271, 595-602 (1996); Fardallo, M. L., Rodrigo, I., Behrens, J., Birchmeier, W. & Cano, A. Analysis of the E-cadherin and P-cadherin promoters in murine keratinocyte cell lines from different stages of mouse skin carcinogenesis. *Mol. Carcinog.* 20, 33-47 (1997); Rodrigo, I., Cato, A.C.B. & Cano, A. Regulation of E-cadherin gene expression during tumor progression: the role of a new Ets-binding site and the E-pal element. *Exp. Cell Res.* 248, 358-371 (1999)]. Los factores de transcripción que interactúan con este elemento o en la región correspondiente del promotor del gen de cadherina E humano [Bussemakers, M. J., Giroldi, L. A., van Bokhoven A. & Schalken, J. A. Transcriptional regulation of the human E-cadherin gene in human prostate cancer cell lines: characterization of the human E-cadherin gene promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 203, 1284-1290 (1994); Giroldi, L. A. et al. Role of E-boxes in the repression of E-cadherin expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 241, 453-458 (1997)] son desconocidos.

Los factores de transcripción potenciales represores de la expresión del gen de la cadherina E podrían ser de gran utilidad en la identificación de nuevos candidatos antitumorales que actuaran inhibiendo la función de estos factores, y por tanto del proceso invasivo y metastásico. Además, su presencia podría utilizarse como marcadores de progresión y malignidad tumoral.

### Descripción

#### Descripción resumida

Se ha identificado el factor de transcripción Snail como un represor de la expresión de cadherina E, actuando por interacción directa con la caja E2 del elemento E-pal del promotor. La expresión ectópica de Snail en células epiteliales induce la transición epitelio-mesénquima y la adquisición de propiedades migratorias concomitante a la inhibición de la expresión de cadherina E y la pérdida de otros marcadores de diferenciación epitelial. La presente invención presenta, y forman

parte de ella:

- una nueva proteína diana para la identificación de nuevos compuestos antitumorales, y
- un nuevo marcador de invasión y metástasis tumoral y su uso como marcador de pronóstico de la enfermedad y como guía de los profesionales médicos para seleccionar o evaluar tratamientos.

### Descripción detallada

*Snail es un factor de transcripción que actúa como represor directo de la expresión de cadherina E*

La identificación de los factores de transcripción que interaccionan con el elemento E-pal se realizó mediante una aproximación tipo híbrido sencillo ("one-hybrid") usando la secuencia E-pal de ratón (-90/-70) oligomerizada para dirigir la expresión del gen HIS3 de *S. cerevisiae* como cebo y una genoteca de cDNA de NIH3T3 fusionada al dominio de activación GAL4 como presa. Se aislaron 130 clones capaces de interaccionar con (y dirigir la transcripción del gen testigo HIS3) la construcción que contiene el elemento E-pal nativo y que no reconocieron el elemento oligomérico mutado. Esta forma mutada del elemento E-pal contiene 2 bases cambiadas (TT en lugar de GC) que eliminan la caja E2. Esta forma mutada ha sido descrita como responsable de la eliminación del efecto represor en el promotor de la cadherina E de ratón [Hennig, G., Löwrick, O., Birchmeier, W. & Behrens, J. Mechanisms identified in the transcriptional control of epithelial gene expression. *J. Biol. Chem.* 271, 595-602 (1996); Faraldo, M. L., Rodrigo, I., Behrens, J., Birchmeier, W. & Cano, A. Analysis of the E-cadherin and P-cadherin promoters in murine keratinocyte cell lines from different stages of mouse skin carcinogenesis. *Mol. Carcinog.* 20, 33-47 (1997)].

La secuenciación de los clones aislados permitió identificar que un 49% de los mismos contenían insertos que codificaban para la secuencia completa o parcial del cDNA de Snail de ratón [Nieto, M. A., Bennet, M. F., Sargent, M. G. & Wilkinson, D. G. Cloning and developmental expression of *Sna*, a murine homologue of the *Drosophila snail* gene. *Development* 116, 227-237 (1992); Smith, D. E., Del Amo, F. F. & Gridley, T. Isolation of *Sna*, a mouse homologous to the *Drosophila* gene snail and escargot: its expression pattern suggests multiple roles during post-implantation development. *Development* 116, 1033-1039 (1992)], mientras que un único clon codificaba para una secuencia parcial del cDNA de Slug de ratón.

Para determinar el efecto de Snail como un factor de transcripción en el contexto de la región proximal del promotor de cadherina E (-178/+92), se subclonó la secuencia completa del cDNA de Snail en un vector de expresión (pcDNA3) y se analizó su actividad por cotransfección en dos líneas celulares de queratinocitos epidérmicos de ratón, MCA3D y PDV. Ambas líneas habían sido caracterizadas previamente por el alto nivel de expresión de cadherina E y de la

actividad del promotor [Faraldo, M. L., Rodrigo, I., Behrens, J., Birchmeier, W. & Cano, A. Analysis of the E-cadherin and P-cadherin promoters in murine keratinocyte cell lines from different stages of mouse skin carcinogenesis. *Mol. Carcinog.* 20, 33-47 (1997); Rodrigo, I., Cato, A.C.B. & Cano, A. Regulation of E-cadherin gene expression during tumor progression: the role of a new Ets-binding site and the E-pal element. *Exp. Cell Res.* 248, 358-371 (1999); Navarro, P. et al. A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule in tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. *J. Cell Biol.* 115, 517-533 (1991)]. La cotransfección de Snail en células MCA3D (Fig. 1A) y PDV (Fig. 1B) produjo una fuerte represión del promotor nativo de cadherina E (95% y 75%, respectivamente), pero no del promotor que contiene la caja E2 mutada (Fig. 1). Estos resultados confirman los obtenidos por el método de screening one-hybrid y demuestran que Snail es un represor directo de la transcripción del gen de la cadherina E actuando a través de su unión a la caja E2 del elemento E-pal.

*Snail induce la conversión fibroblástica de células epiteliales y la adquisición de migración*

Para proporcionar más datos sobre el papel de la proteína Snail en la regulación del gen de la cadherina E y su participación en la transición epitelio-mesénquima, se expresó ectópicamente en varias líneas celulares. La expresión transitoria de Snail se analizó inicialmente en las líneas de queratinocitos MCA3D y PDV, que presentan la ventaja de su capacidad de crecer en grupos aislados estableciendo fuertes contactos intercelulares mediados por cadherina E incluso a baja densidad, y exhiben muy baja motilidad celular [Navarro, P. et al. A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule in tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. *J. Cell Biol.* 115, 517-533 (1991); Lozano, E. & Cano, A. Cadherin/catenin complexes in murine epidermal keratinocytes: E-cadherin complexes containing either b-catenin or plakoglobin contribute to stable cell-cell contacts. *Cell Adh. Commun.* 6, 51-67 (1998), Gómez M., Navarro P. & Cano A. Cell adhesion and tumor progression in mouse skin carcinogenesis: increased synthesis and organization of fibronectin is associated with the undifferentiated spindle phenotype. *Invasion & Metastasis* 14,17-26 (1994); Frontelo, P. et al. Transforming growth factor b1 induces squamous carcinoma cell variants with increased metastatic abilities and a disorganized cytoskeleton. *Exp. Cell Res.* 244, 420-432 (1998)]. La sobreexpresión de Snail eliminó los contactos intercelulares en las 24-48 horas después de la transfección en ambos tipos celulares como consecuencia de la inhibición de la expresión de cadherina E (Fig. 2 b y 2 f) y de otras proteínas asociadas, como plakoglobina. Simultáneamente a estos cambios, la morfología de las células transfectadas con Snail se encuentra profundamente alterada. En ambas líneas celulares se observaron abundantes prolongaciones de membrana y largos filamentos asemejando "filopodia".

La expresión estable de Snail se realizó en la línea celular MDCK, la cual exhibe un fenotipo epitelial "prototípico" y en cultivo se dispone en una monocapa. Este fenotipo no se ve afectado

por la expresión del vector control en seis clones independientes aislados (Fig. 3 a), que mantienen la expresión de cadherina E (Fig. 3 b) y de plakoglobina (Fig. 3 c) en los contactos intercelulares. Sin embargo, la expresión estable de Snail induce una dramática conversión a un fenotipo fibroblástico completamente desdiferenciado. Las células MDCK transfectadas con Snail pierden la capacidad de crecer como una monocapa y de su inhibición por contacto. En su lugar, estas células forman redes creciendo unas sobre otras con extensiones de membrana extremadamente largas (Fig. 3 d). El análisis de la expresión de cadherina E y plakoglobina mostró la pérdida de ambas moléculas en las células MDCK transfectadas con Snail (Fig. 3 e, f). Adicionalmente, la expresión estable de Snail en las células MDCK indujo un fuerte comportamiento migratorio, lo que se comprobó mediante ensayos de migración en heridas inducidas en los cultivos (Fig. 4).

*Snail se expresa en tumores indiferenciados y en zonas de invasión de carcinomas epidermoides*

El análisis de la expresión endógena de Snail por RT-PCR en un panel de líneas celulares que varían en la expresión de cadherina E mostró una correlación inversa entre la expresión de ambas moléculas y una asociación de la expresión de Snail con la capacidad invasiva y metastásica de las mismas (Fig. 5). La cadherina E se observó en la línea celular epitelial, no tumoral MCA3D y en la línea celular tumoral PDV, que a pesar de su origen tumoral no presenta capacidad invasiva ni metastásica. Sin embargo, en ninguna de ellas se constató la presencia de Snail. Por el contrario, en las líneas celulares tumorales con capacidad invasiva y metastásica, HaCa4 y Carb, la ausencia de cadherina E se asociaba con la presencia de Snail.

La expresión de Snail se analizó mediante hibridación in situ en tumores epidermoides inducidos en ratones inmunodeprimidos bien por las diferentes líneas, bien por tratamiento químico en la piel del ratón. En ambos casos, se observó una alta expresión de Snail en tumores indiferenciados (Fig. 6f, h) y en zonas de invasión de carcinomas epidermoides (Fig. 6 l) que han perdido la expresión de cadherina E (Fig. 6 k). Por el contrario, no se detectó expresión de Snail en tumores bien diferenciados no invasivos (Fig. 6 b, 6 d).

En conjunto, estos datos muestran que Snail es un represor directo de la expresión de cadherina E, implicado en la transición epitelio-mesénquima que ocurre durante la invasión tumoral. Por tanto, la presencia de Snail es un nuevo marcador de progresión tumoral, específicamente asociado a la adquisición del fenotipo invasivo y metastásico, lo que permite su uso como un marcador pronóstico de tumores humanos y como guía de los profesionales médicos para seleccionar o evaluar tratamientos antitumorales, y que forma parte de la presente invención.

Además, estos datos indican claramente el papel inductor directo de Snail en la adquisición de estas características de invasión y metástasis tumoral por lo que Snail puede considerarse una proteína diana de nuevos compuestos antitumorales. A partir de esta proteína se pueden elabo-

rar ensayos para la identificación de nuevos candidatos antitumorales basados en líneas celulares transformadas por la proteína Snail y en donde el análisis de la regulación de la expresión de Snail por un candidato antitumoral identificaría nuevos compuestos antitumorales, y que forman parte de la presente invención. El análisis de la regulación de la expresión de Snail podría realizarse mediante la determinación de la presencia o no de Snail tras el contacto con el candidato antitumoral, o también a través de otro tipo de señal de la inhibición de la función de Snail en células transformadas con genes testigo, ej. HIS3 y LacZ, y que forman parte de la presente invención.

### Descripción de las figuras

Figura 1

*Snail reprime la actividad del promotor de la cadherina E en líneas celulares epiteliales*

Células MCA3D (Fig. 1A) y PDV (Fig. 1B) se transfectaron con el promotor nativo de Cadherina E (wt-178) o con una versión mutada (mEpal) fusionada al gen marcador CAT en presencia de 1 g de vector pcDNA3 control o conteniendo Snail. La gráfica presenta los niveles de actividad CAT del promotor. La actividad del promotor se expresa como medida relativa a la del promotor nativo en presencia del vector control.

Figura 2

*La expresión transitoria de Snail en queratinocitos epidérmicos induce pérdida de cadherina E y plakoglobina y pérdida de adhesión célula-célula*

Se transfectaron células MCA3D (a-d) y PDV (e-h) con vector control (mock, a, c, e, g) o conteniendo el cDNA de Snail (b, d, g, h) y se analizó la presencia de cadherina E y plakoglobina por inmunocitoquímica visualizada por microscopía confocal a las 48 horas.

Figura 3

*La transfección estable de Snail en células epiteliales MDCK induce una conversión epitelio-mesénquima concomitante con la pérdida de cadherina E y plakoglobina*

Imágenes de contraste de fases de células transfectadas con el vector control (a) y con el vector conteniendo Snail (d). Imágenes de microscopía confocal que muestran expresión de cadherina E (b, e) y plakoglobina (c, f) en células control y transfectadas con Snail, respectivamente.

Figura 4

*Snail induce un fenotipo migratorio en células epiteliales*

El comportamiento migratorio se analizó en un modelo de herida in vitro. Los cultivos de células MDCK controles (mock) o transfectadas con Snail se arañaron con una punta de pipeta y se tomaron fotografías inmediatamente (t=0, a, d) y 10 horas después (b, e).

Figura 5

*Análisis de la expresión, endógena de Snail por RT-PCR en un panel de líneas celulares*

La expresión endógena de Snail se correlaciona inversamente con la de cadherina E en líneas celulares de queratinocitos de ratón normales y transformadas.

Figura 6

*La expresión de Snail se asocia a carcinomas invasivos y a áreas de invasión en carcinomas epi-*

*dermoides*

Se indujeron tumores en ratones desnudos con células PDV (a-d) o CarB (e-h) o por tratamiento químico (i-l). Se analizaron por hibridación in situ con sondas para cadherina E (a, c, e, g, i, k) o para Snail (b, d, f, h, j, l). Cadherina E se expresa en áreas diferenciadas de los carcinomas epidermoides (a, c, i, k), mientras que en estos tumores no se aprecia expresión de Snail (b, d, j). Los carcinomas invasivos no expresan cadherina E (e, g) y expresan Snail (f, h). En tumores inducidos químicamente, se observa expresión de Snail en áreas indiferenciadas invasivas (l, que no expresan cadherina E (k)).

## Ejemplos

## Ejemplo 1

*Aislamiento del cdna de snail de ratón utilizando la metodología del híbrido sencillo*

El oligonucleótido que contiene la secuencia del elemento E-pal del promotor de cadherina-E (CD-E) de ratón (nucleótidos de -90 a -70) conteniendo dianas para los enzimas de restricción Sall en 5' y XhoI en 3' se concatenó en sentido directo hasta un total de 6 repeticiones completas mediante ligación con técnicas habituales, aislamiento en geles de poliacrilamida y clonaje en el vector pHISi (Clontech, Palo Alto, CA) que contiene el gen testigo HIS3 de *S. cerevisiae*, y elementos de replicación de levadura y bacterias y genes de selección apropiados. De esta forma la expresión del gen HIS3 queda bajo el control del elemento E-pal concatenado. La correcta inserción de las secuencias reguladoras se comprobó mediante PCR, digestión con enzimas de restricción apropiados y secuenciación. El vector "cebo" así generado se denominó pHIS-E6. El mismo método se utilizó para generar vectores en los que se introdujo una versión mutante del elemento E-pal, también concatenado 6 veces en sentido directo, en la que los dos oligonucleótidos centrales, GC, fueron sustituidos por TT. Al vector "cebo" mutante generado se le denominó pHIS-mE6. Los vectores cebo pHIS-E6 y pHIS-mE6 se integraron independientemente en el locus cromosómico URA3 de la cepa de levadura YM4271 (Clontech, Palo Alto, Ca) mediante técnicas habituales de transformación y selección de estirpes estables que mantienen el crecimiento en presencia de 20 mM 3-aminotriazole (3ATZ). Las estirpes seleccionadas se denominaron E-pal HIS3 (construcción E-pal nativo) y mE-pal HIS3 (construcción E-pal mutada). La estirpe de levadura E-pal HIS3 fué sometida a transformación con una genoteca de cDNA comercial de células NIH3T3 que contiene los diferentes insertos de cDNA fusionados al dominio de activación de GAL4 en el vector pACT2 (Clontech, Palo Alto, Ca), amplificada previamente para obtener un título de 3x10<sup>6</sup> clones independientes mediante técnicas habituales. Las levaduras transformantes se seleccionaron por su capacidad de crecimiento en ausencia de Histidina y en presencia de 20 mM 3ATZ, aislándose 300 clones independientes. Los plásmidos conteniendo las diferentes secuencias de cDNA se aislaron de las levaduras transformantes y fueron utilizados posteriormente para transformar *E. coli* (cepa DH5 $\alpha$ ), recuperándose 221 clones inde-

pendientes de *E. coli* de los que se aislaron los plásmidos correspondientes. Para eliminar falsos positivos los 221 plásmidos se introdujeron independientemente en paralelo en las estirpes de levadura generadas previamente conteniendo el gen HIS3 bajo el control del elemento E-pal silvestre (estirpe E-pal HIS3) o E-pal mutado (estirpe mE-pal HIS3), seleccionándose aquellos plásmidos que conferían crecimiento en ausencia de histidina y leucina y en presencia de 20 mM 3ATZ exclusivamente en la estirpe E-pal HIS3, siendo su número total de 130. Los insertos de dichos plásmidos fueron analizados inicialmente mediante digestiones con diversos enzimas de restricción y sometidos a secuenciación en un secuenciador automático. Las secuencias obtenidas se analizaron en bancos de datos de cDNA utilizando el programa BLAST/FASTA. 49% de los clones identificados codificaban para la secuencia total o parcial del cDNA de Snail de ratón.

## Ejemplo 2

*Transfección transitoria y estable de msnail en células epiteliales*

La secuencia completa del cDNA Snail de ratón (mSnail) contenida en uno de los clones identificados en el screening del híbrido sencillo se aisló del vector pACT2 mediante digestión con los enzimas de restricción EcoRI y HindIII y se subclonó en los sitios EcoRI/HindIII del vector pcDNA3 (Invitrogene), que contiene el gen neo que confiere resistencia al antibiótico G418 y se secuenció en los dos extremos. Al vector así generado se le denominó pcDNA3-mSnail.

La construcción del promotor de cadherina E de ratón, -178, que contiene las secuencias de -178 a +92 pb del gen fusionadas al gen testigo CAT (Chloramfenicol Acetyl Transferase), y la construcción mEpal (en la que los dos nucleótidos centrales GC del elemento E-pal se mutaron por TT) se han descrito previamente [Behrens, J., Löwrick, O., Klein, H. L. & Birchmeier, W. The E-cadherin promoter: functional analysis of a GC-rich region and an epithelial cell-specific palindromic regulatory element. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 11495-11499 (1991); Hennig, G., Löwrick, O., Birchmeier, W. & Behrens, J. Mechanisms identified in the transcriptional control of epithelial gene expression. J. Biol. Chem. 271, 595-602 (1996); Faraldo, M. L., Rodrigo, I., Behrens, J., Birchmeier, W. & Cano, A. Analysis of the E-cadherin and P-cadherin promoters in murine keratinocyte cell lines from different stages of mouse skin carcinogenesis. Mol. Carcinog. 20, 33-47 (1997)] y fueron cedidas por el Dr. J. Behrens.

a) *Análisis de la actividad del promotor de cadherina E*

Las células MCA3D y PDV se sembraron a subconfluencia (3x10<sup>5</sup> células/placa de 6 cm de diámetro, P-60) en medio de crecimiento HamF12 conteniendo 10% suero bovino fetal (Gibco) y se incubaron 24 h a 37°C en un incubador conteniendo 5% CO<sub>2</sub> y una humedad del 95%. A continuación, el medio fué reemplazado por medio fresco DMEM, 10% suero bovino fetal manteniéndose en el incubador durante 6 h adicionales. Los cultivos fueron sometidos a cotransfección utilizando Lipofectamina Plus (Life Tech-

nologies), siguiendo las instrucciones del proveedor, utilizando 2.5  $\mu\text{g}$  de la construcción -178, mE-pal o el vector control pCATbasic (carente de secuencias promotoras) (Promega) y en presencia de 1  $\mu\text{g}$  de pcDNA3-mSnail o del plásmido pcDNA3 vacío. Como control adicional, la actividad de las construcciones del promotor de cadherina E se comparó con la del vector pCAT-control (Promega) que contiene el gen testigo CAT bajo el control del promotor de SV-40, por lo que las células se transfectaron en paralelo con dicho vector. La eficiencia de la transfección se analizó por cotransfección en todos los cultivos con 2.5  $\mu\text{g}$  del plásmido CMV-Luc que contiene el gen testigo luciferasa bajo el control del promotor de cytomegalovirus. 24 h después de la transfección el medio fue eliminado y tras lavar con PBS las células se recogieron raspando suavemente las placas y se sometieron a centrifugación (2.000 rpm, 4 min). Los extractos se obtuvieron resuspendiendo el pellet celular en 100  $\mu\text{l}$  de un tampón conteniendo 10 mM Fosfato pH 8.0 y sometidas a 4 ciclos de congelación en  $\text{N}_2$  líquido-descongelación a 37°C. La actividad luciferasa se determinó inicialmente en alícuotas de 5  $\mu\text{l}$  utilizando un kit comercial y un luminómetro. Alícuotas de los diferentes extractos conteniendo actividades equivalentes de luciferasa se analizaron para la actividad CAT, utilizando como sustrato  $\text{C}^{14}$ -chloramfenicol (Amersham) y como cofactor Acetil-CoA (Sigma) siguiendo el método descrito previamente [Faraldo, M. L., Rodrigo, I., Behrens, J., Birchmeier, W. & Cano, A. Analysis of the E-cadherin and P-cadherin promoters in murine keratinocyte cell lines from different stages of mouse skin carcinogenesis. *Mol. Carcinog.* 20, 33-47 (1997); Rodrigo, I., Cato, A.C.B. & Cano, A. Regulation of E-cadherin gene expression during tumor progression: the role of a new Ets-binding site and the E-pal element. *Exp. Cell Res.* 248, 358-371 (1999)]. La actividad CAT obtenida en células MCA3D y PDV para la construcción-178 del promotor nativo de cadherina E fué el 70 % y 50 %, respectivamente, de la del vector pCAT-SV40. Las actividades CAT obtenidas se normalizaron a la obtenida con la construcción-178 en presencia del vector vacío pcDNA3 en cada línea celular. Los ensayos de transfección fueron realizados en cultivos duplicados equivalentes de cada una de líneas celulares para todas las condiciones experimentales analizadas.

b) *Efecto de la expresión de msnail en el fenotipo celular y expresión de marcadores epiteliales*

Se realizaron transfecciones transitorias con 2  $\mu\text{g}$  de mSnail (vector pcDNA3-mSnail) y controles "mock" (vector vacío pcDNA3) en las líneas de queratinocitos de ratón MCA3D y PDV, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, excepto que las células se sembraron sobre cubreobjetos circulares (1.2 cm de diámetro) depositados sobre las placas P-60. Al cabo de 24 h y 48 h tras la transfección los cristales correspondientes a las dos condiciones experimentales de cada línea celular se fijaron con metanol (-20°C) durante 30 s, y se sometieron a análisis de la expresión de cadherina E y plakoglobina mediante inmunofluorescencia [Navarro, P. et al. A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule in

tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. *J. Cell Biol.* 115, 517-533 (1991)]. Las imágenes fueron analizadas en un microscopio confocal (Leica).

5 Transfecciones estables de msnail y control "mock" se realizaron en la línea epitelial MDCK, crecidas en medio DMEM, 10 % suero bovino fetal, en cultivos paralelos y siguiendo el protocolo descrito anteriormente. A las 48-72 h de la transfección, cuando los cultivos alcanzaron la confluencia, el medio se cambió por medio fresco y se le añadió 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de G418, seleccionándose las células resistentes a G418 al cabo de 2-3 semanas de crecimiento en presencia del antibiótico. La población total generada ("pool") en ambos tipos de cultivos (msnail y mock) fué recogida y se procedió a la obtención de clones independientes mediante dilución. Para ello se sembraron 100 células de cada tipo de población en placas P-100 (10 cm diámetro) y se crecieron en medio DMEM, 10 % suero bovino fetal y 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de G418. Se obtuvieron colonias independientes resistentes a G418 al cabo de 2-3 semanas adicionales, las cuales fueron aisladas por tripsinización utilizando cilindros de clonaje (5 mm de diámetro interno) y amplificadas por sucesivos pases en placas de cultivo de tamaño progresivo (T6->F12.5->F25->F75) manteniendo la presión del antibiótico en todas las fases del cultivo. Se aislaron un total de 10 clones independientes de la transfección de msnail y 6 clones independientes de la transfección mock. Los diferentes clones fueron analizados para la expresión de cadherina E y plakoglobina mediante inmunofluorescencia (análisis por microscopía confocal) e inmunotransferencia, y para expresión de msnail mediante RT-PCR tras extracción del RNA-polyA+ de los diferentes clones y el uso de amplímeros adecuados para amplificar un fragmento de 388 pares de bases, según la secuencia del cDNA de mSnail.

Ejemplo 3

*Obtención de tumores*

a) *Tumores inducidos en ratones inmunodeprimidos por las líneas celulares*

45 Los tumores se indujeron en ratones macho atímicos nu/nu de la cepa BalC de 8 semanas de edad mediante inyección subcutánea de células PDV, HaCa4 o CarB como se ha descrito [Navarro, P. et al. A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule in tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. *J. Cell Biol.* 115, 517-533 (1991)]. Las diferentes líneas celulares se crecieron a confluencia en botellas F75, se tripsinizaron y resuspendieron en tampón Fosfato salino (PBS) a una densidad de  $1 \times 10^7$  células/ml en PBS. Las células se inyectaron subcutáneamente en los dos flancos de cada ratón ( $1 \times 10^6$  células/sitio inyección) utilizando jeringas de insulina y agujas hipodérmicas de 25 gauge. Habitualmente se inoculan 3 animales por cada línea celular (6 sitios de inyección/línea). Los animales se obtuvieron de la unidad de producción de IFA-CREDO (France) y se mantuvieron en condiciones estériles en la instalación específica para estos animales en el animalario del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) y de acuerdo con las normas institucionales de manejo de animales. Los animales inyectados se observaron 3

veces por semana, determinándose la aparición de los tumores por inspección visual y medida de su tamaño mediante un calibre. Los animales fueron sacrificados por asfixia en éter cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 1.5-2.0 cm de diámetro externo. Los tumores fueron extirpados, una fracción de ellos fijada en formaldehído para posterior análisis histológico, y el resto fue congelado inmediatamente en isopentano enfriado en un baño de nitrógeno líquido directamente o embebidos en OCT (TissueTek). Las muestras fueron almacenadas a -70°C hasta su posterior utilización.

b) *Inducción de tumores en la piel de ratón por carcinogénesis química*

Los tumores se indujeron en la piel dorsal de ratones BalC de 8-10 semanas de edad, obtenidos en la unidad de producción del animalario del IIB, mediante el protocolo de dos estadios DMBA/TPA como se ha descrito [Cano, A. et al. Expression pattern of the cell adhesion molecules E-cadherin, P-cadherin and integrin is altered in pre-malignant skin tumors of p53-deficient

mice. Int. J. Cancer 65, 254-262 (1996)]. Una semana previa al inicio del experimento, el dorso de los animales (20 en total) fue rasurado, tras lo cual se aplicó tópicamente una dosis única del carcinógeno dimethylben(z)antraceno (DMBA) a una concentración de 50 µg/ml disuelto en acetona. Una semana después se inició la promoción mediante aplicación tópica del éster de forbol tetradecanoylphorbolacetate (TPA) a una concentración de 50 µg/ml disuelto en etanol. El TPA fue aplicado cada 3 días durante un total de 30 semanas. Los animales se mantuvieron en observación semanal hasta un total de 50 semanas. Al cabo de 10 semanas de tratamiento con TPA se detectó la aparición de los primeros tumores de tipo papiloma que prosiguieron apareciendo a lo largo del tratamiento y posteriormente, obteniéndose una media de 5-6 tumores/ratón. Una pequeña proporción de los papilomas (5%) progresaron tras cesar el tratamiento con TPA hacia carcinomas. Los animales fueron sacrificados a diferentes intervalos y los tumores extraídos y congelados como se ha descrito anteriormente.

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para identificar un compuesto que inhiba la función represora de Snail **caracterizado** por las siguientes etapas:

- a) añadir dicho compuesto a las células transformadas con capacidad de expresar el marcador pronóstico Snail,
- b) determinación de la disminución o eliminación total de la capacidad de expresar dicho marcador de pronóstico en esas células transformadas,
- c) y la selección de dicho compuesto para el tratamiento de la invasión y metástasis tumoral si dichas células transformadas presentan una disminución o eliminación total de la expresión de Snail (y una reversión de sus propiedades invasivas y metastásicas).

2. Procedimiento según la reivindicación 1 para identificar un compuesto que inhiba la función represora de Snail basado en la utilización de estirpes de levadura *S. cerevisiae* que expresan el gen HIS3-bajo el control del elemento E-pal en su versión nativa y mutante, y **caracterizado** por las siguientes etapas:

- a) transformación de las estirpes de levadura con el vector pACT2-mSnail, que contiene la secuencia completa del cDNA de Snail, en presencia y ausencia de dicho compuesto,
- b) determinación del crecimiento de las levaduras transformadas a partir de la estirpe que expresa el gen HIS3 bajo el control de E-pal nativo en ausencia de histidina y leucina y en presencia de 3ATZ,
- c) determinación de la ausencia de efecto in-

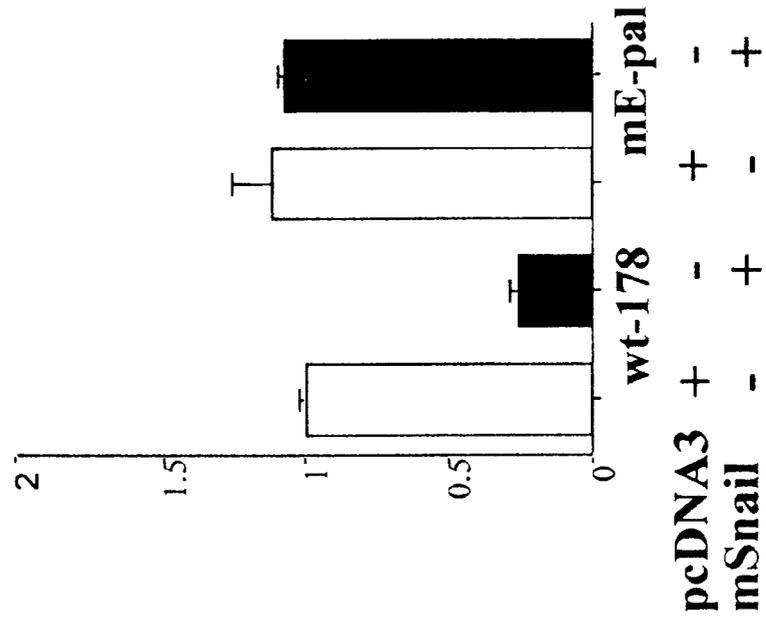
hibidor de dichos compuestos en las levaduras transformadas por pACT2-mSnail (Snail mutado) en estirpes de levadura que expresan el gen HIS3 bajo el control de E-pal nativo en ausencia de histidina y leucina y en presencia de 3ATZ,

- d) y la selección de dicho compuesto para el tratamiento de la invasión y metástasis tumoral si dichas células estirpes de *S. cerevisiae* presentan una disminución o eliminación total de su capacidad de crecimiento.

3. Procedimiento según la reivindicación 1 para identificar un compuesto que inhiba la función represora de Snail basado en la utilización de estirpes de levadura *S. cerevisiae* que expresan el gen LacZ bajo el control del elemento E-pal en su versión nativa y mutante, y **caracterizado** por las siguientes etapas:

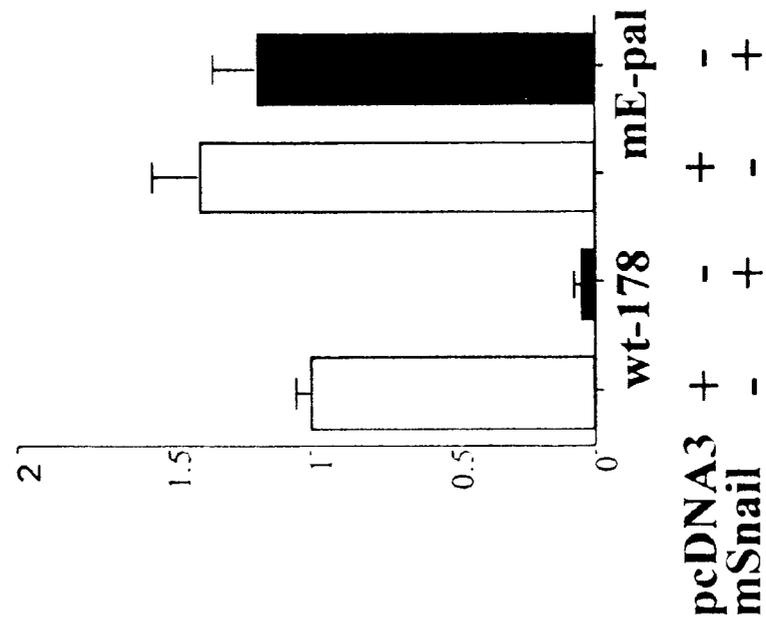
- a) transformación de las estirpes de levadura con el vector pACT2-mSnail, que contiene la secuencia completa del cDNA de Snail, en presencia y ausencia de dicho compuesto,
- b) determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de las levaduras transformadas a partir de la estirpe que expresa el gen LacZ bajo el control de E-pal nativo,
- c) determinación de la ausencia de efecto inhibidor de dichos compuestos en las levaduras transformadas por pACT2-mSnail en estirpes de levadura que expresan el gen LacZ bajo el control de E-pal mutado,
- d) y la selección de dicho compuesto para el tratamiento de la invasión y metástasis tumoral si dichas células estirpes de *S. cerevisiae* presentan una detección positiva de actividad  $\beta$ -galactosidasa.

**Fig. 1B**



**Figura 1**

**Fig. 1A**



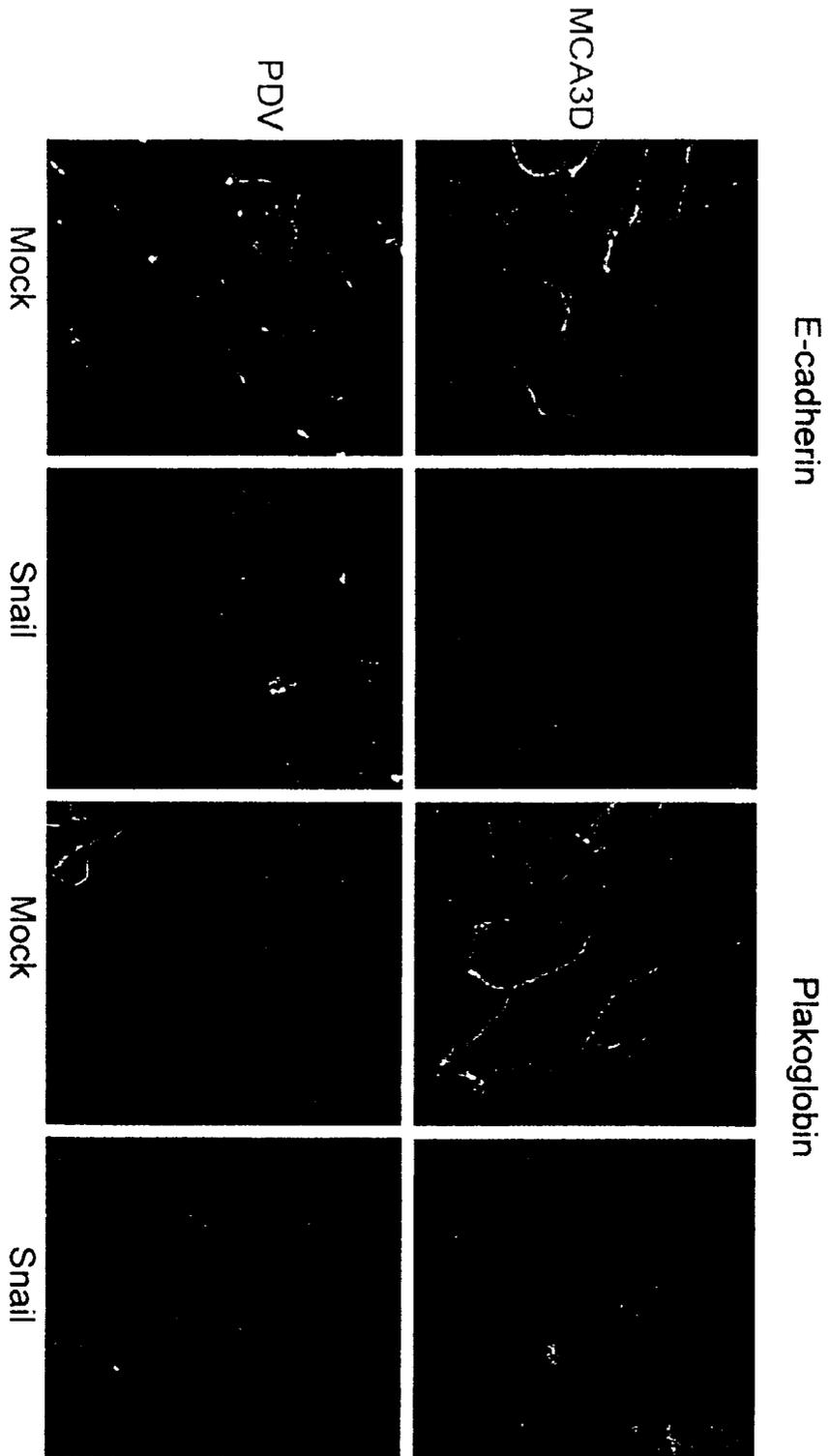


Figura 2

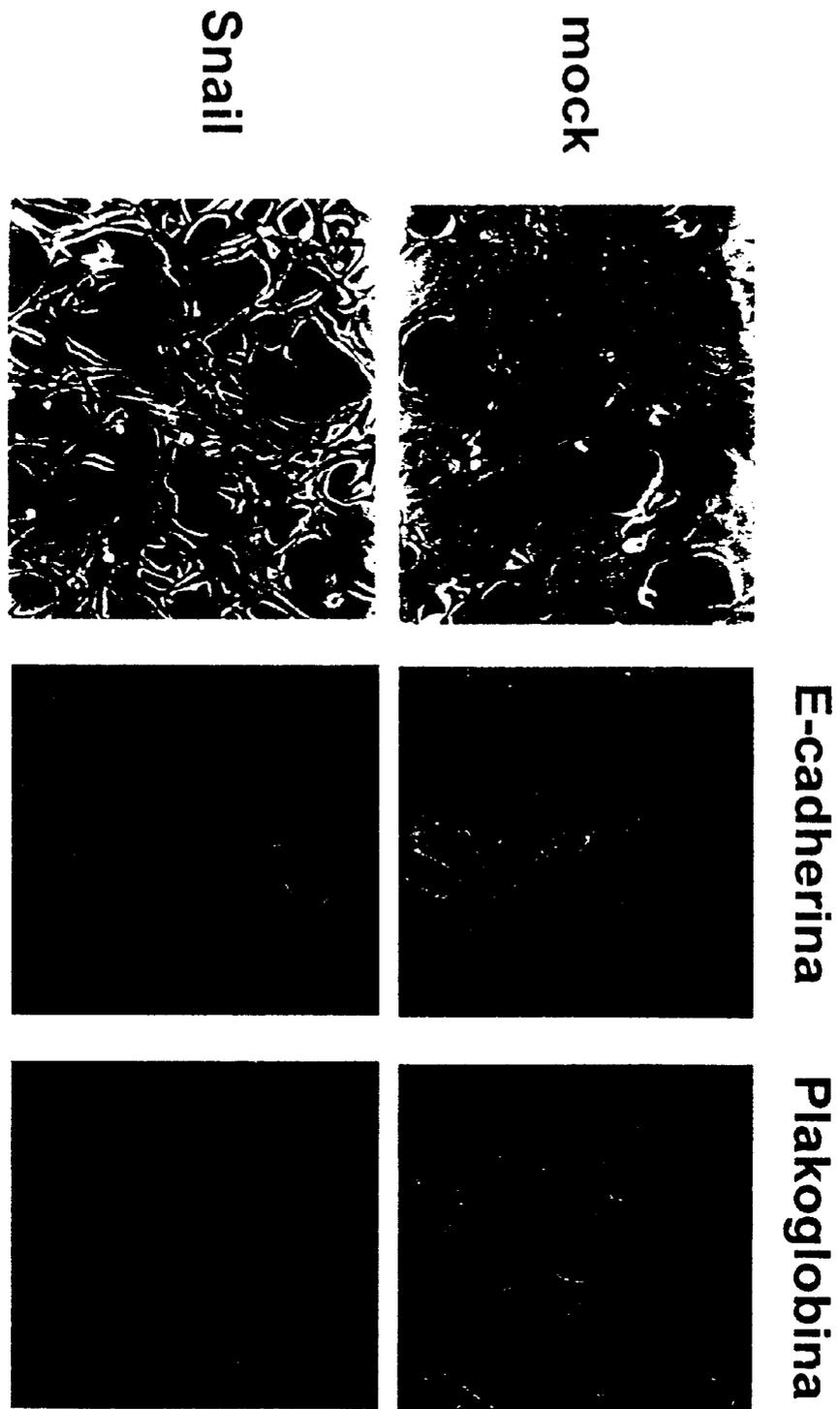


Figura 3

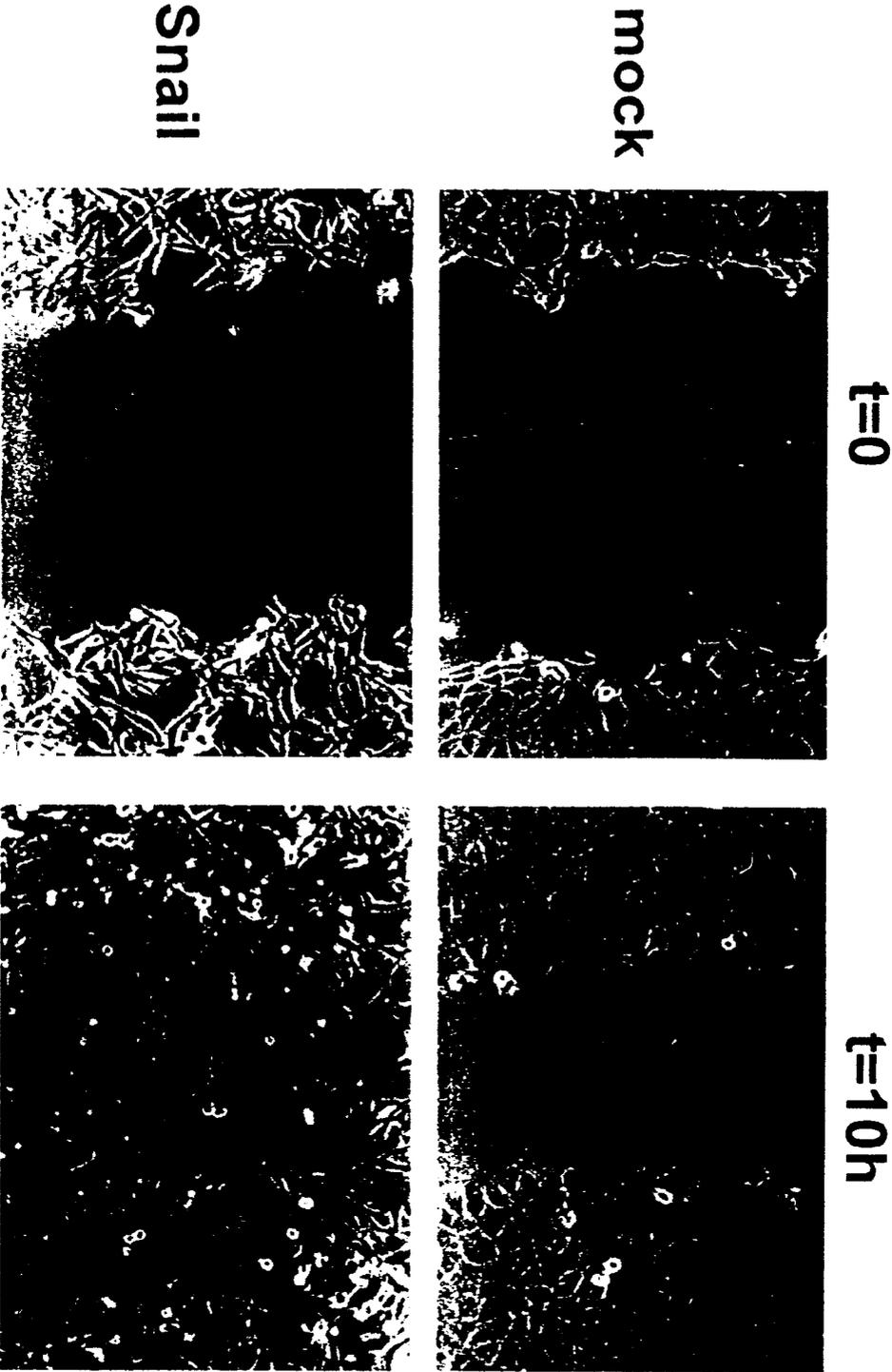


Figura 4

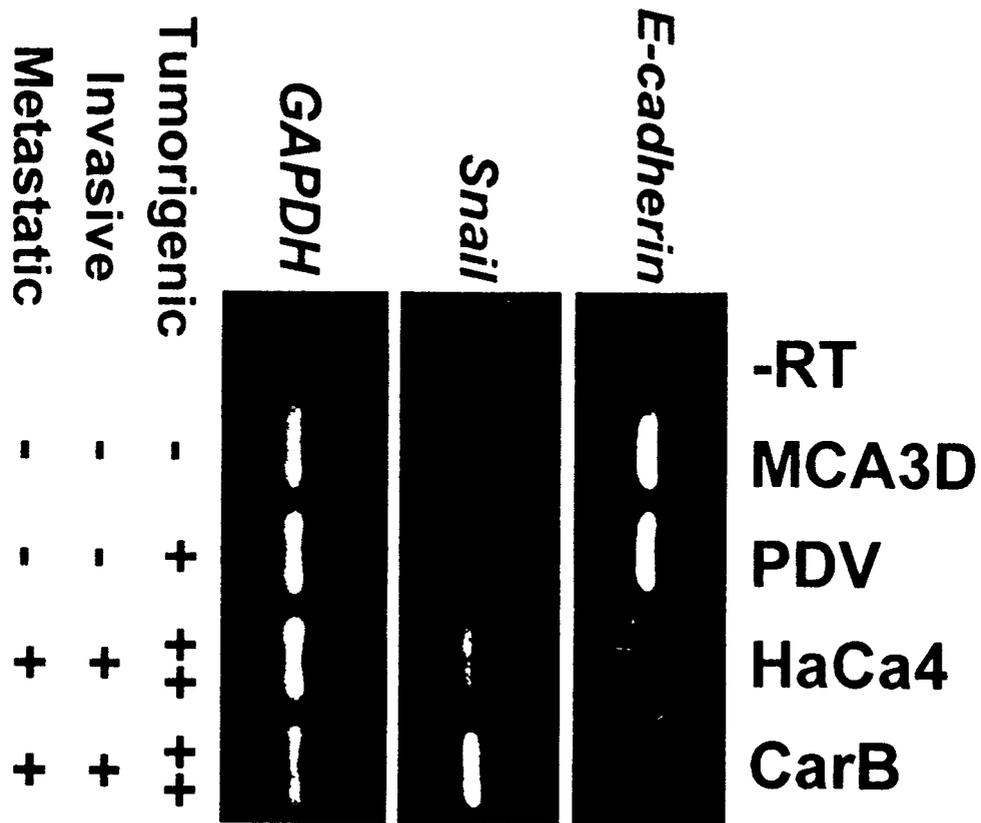


Figura 5

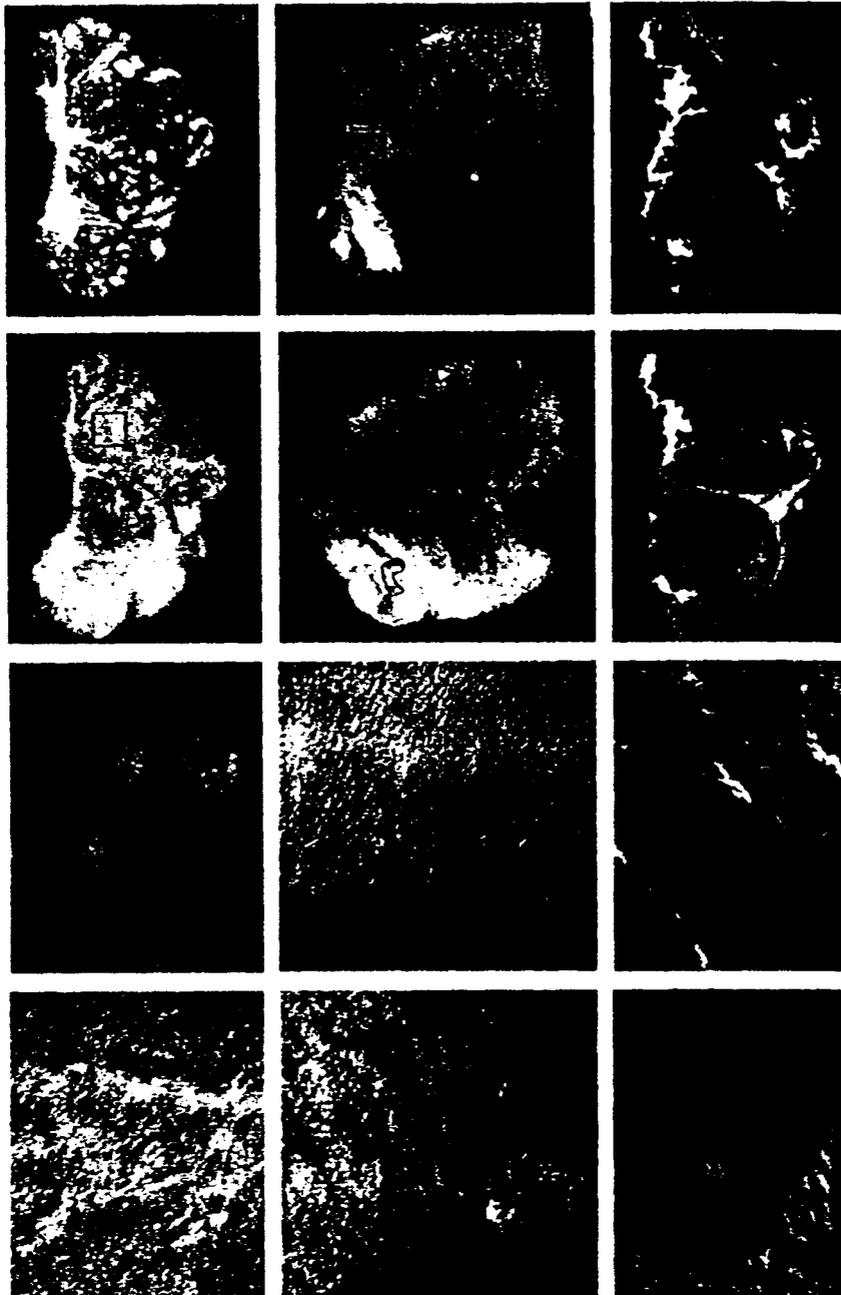


Figura 6



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.<sup>7</sup>: C12N 15/12, G01N 33/574, 33/50

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	HIROKI NAKAYAMA et al. The transition to endoreduplication in Trophoblast Giant Cells is Regulated by de mSNA Zinc Finger Transcription Factor, Developmental Biology, (1998), 199, páginas 150-163.	1-3
Y	HIROKI ODA et al. Dynamic Behavior of the Cadherin-Based Cell-Cell Adhesion System during Drosophila Gastrulation, (1998), 203, páginas 435-450.	1-3
Y	PIERRE SAVAGNER et al. The Zinc-Protein slug Causes Desmosome Dissociation, an initial and necessary step for Growth factor-induced Epithelial-Mesenchymal Transition, The Journal of Cell Biology, 16 junio 1997, Vol. 137, páginas 1403-1419.	1-3
Y	NAOYUKI FUSE et al. Diploidy of Drosophila imaginal cells is maintained by transcriptional repressor encoded by escargot, Genes & Development, (1994), 8, páginas 2270-2281.	1-3
Y	WO 9920168 A2 (UNIVERSITY OF OTAGO) 29.04.1999, páginas 4-6,21-23.	1-3
Y	WO 9602002 A1 (JACK SCHALKEN) 25.01.1996, páginas 2-5,14.	1-3
A	DAVID E. SMITH et al. Isolation of Sna, a mouse gene homologous to the Drosophila genes snail and escargot: its expression suggests multiple roles during postimplantation development, Development (1992), 116, páginas 1033-1039.	1-3

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

**Fecha de realización del informe**

31.10.2001

**Examinador**

M. Hernández Cuéllar

**Página**

1/2



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.<sup>7</sup>: C12N 15/12, G01N 33/574, 33/50

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	BUSEMAKERS M.J.G. et al. Transcriptional regulation of the human E-cadherin gene in human prostate cancer cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 15 septiembre 1994, Vol. 203, n° 2, páginas 1284-1290.	1-3

**Categoría de los documentos citados**

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n°:

**Fecha de realización del informe**

31.10.2001

**Examinador**

M. Hernández Cuéllar

**Página**

2/2