



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 341 747**

② Número de solicitud: 200802841

⑤ Int. Cl.:

C12N 5/07 (2010.01)

C12N 15/85 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **07.10.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **25.06.2010**

⑬ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
25.06.2010

⑦ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

⑦ Inventor/es: **Thomson Okatsu, Timothy;**
Celià Terrassa, Antoni;
Meca Cortés, Óscar;
Blanco Fernández, Jerónimo;
Rubio Vidal, Nuria y
Vilalta Colomer, Marta

⑦ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑤ Título: **Modelos celulares de cáncer de próstata.**

⑤ Resumen:

Modelos celulares de cáncer de próstata.

Líneas celulares, PC-3/S-luc y PC-3/M-luc, derivadas de la línea de cáncer de próstata PC-3, modificadas de forma que expresan el gen luciferasa (luc) para el desarrollo de un modelo de cáncer, útil para el diagnóstico y/o pronóstico de cáncer, específicamente de próstata, determinando la diferente expresión génica de los marcadores biológicos de invasividad y metástasis. Así como, un método *in vitro* de búsqueda de agentes para tratamiento o prevención del cáncer.

ES 2 341 747 A1

DESCRIPCIÓN

Modelos celulares de cáncer de próstata.

5 La presente invención se encuentra dentro del campo de la biología, la biología molecular y la biotecnología, y específicamente se relaciona con la búsqueda de productos con potenciales aplicaciones terapéuticas. En particular, la invención se refiere a un método para la búsqueda de compuestos frente al cáncer y/o útiles en terapias adyuvantes al tratamiento de dicha enfermedad.

10 **Estado de la técnica anterior**

La progresión del cáncer a mayores niveles de malignidad está estrechamente unida a la emergencia de poblaciones de células madre (CSCs) dotadas de una capacidad de una autorrenovación ilimitada, supervivencia bajo estrés, y el establecimiento de metástasis distantes. Actualmente no está claro si una sola población adquiere todas las características necesarias de las células cancerosas para dar lugar a metástasis, o si varias poblaciones emergen secuencialmente o de forma paralela, cada una con funciones especializadas dentro del tumor.

Existen evidencias acumuladas que sustentan la noción de que el proceso de adquisición de características “agresivas” en el cáncer, o tumores malignos, es determinada tanto por mutaciones genéticas como por la imposición de modificaciones epigenéticas heredables sobre determinados genes. Dentro de un tumor, estos eventos genéticos y epigenéticos adquiridos de novo pueden, bien emerger secuencialmente en una sola línea, o pueden ocurrir en paralelo en múltiples linajes independientes. En cualquiera de los dos escenarios de evolución celular del cáncer, el resultado final es la coexistencia dentro de un tumor particular de subpoblaciones celulares, cada una dotada con fenotipos particulares (heterogeneidad intratumoral). Existen también evidencias recientes que muestran que la imposición de modificaciones epigenéticas que causan la reprogramación genética en células tumorales puede ser inducida, al menos en parte, en respuesta a estímulos medioambientales no tumorales, que incluye factores tales como TGF- β , PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) o EGF (factor de crecimiento epidérmico), hormonas, o estrés hipóxico. Por tanto, las células cancerosas dotadas con la capacidad de una autorrenovación indefinida (células madre cancerosas, CSCs), pero que retienen todavía una cierta capacidad para la diferenciación, podrían evolucionar a diferentes tipos celulares de cáncer, en respuesta a influencias medioambientales y a nuevas mutaciones. Al igual que en todo nicho ecológico, estas subpoblaciones podrían interactuar entre sí, bien compitiendo por recursos comunes, o bien cooperando para beneficio mutuo. Estas poblaciones tumorales pueden interactuar con, y usar para su beneficio, elementos no tumorales, como se ha mostrado de manera convincente en numerosos modelos de progresión tumoral y metástasis. Uno de los fenotipos en los que las CSCs se pueden diferenciar en respuesta a estímulos ambientales, es el fenotipo invasivo y el mótil, este último denominado generalmente transición epitelio-mesenquimal (TEM). Entre las influencias ambientales, la interacción de células tumorales con microambientes no tumorales o no cancerosos, puede contribuir a la inducción de marcadores restrictivos heredables epigenéticos que dirigen la evolución de subpoblaciones de células tumorales dotadas de distintas propiedades malignas. Los muy diferentes requerimientos de las células neoplásicas para adquirir fenotipos totalmente malignos, aunque componen un escenario complejo, proporcionan numerosas oportunidades para el desarrollo de terapias dirigidas a varios factores no solapados y vías involucradas en este proceso.

Además existen evidencias de que, más allá de la capacidad de invadir tejidos locales, la habilidad de las células tumorales de metastatizar a órganos distantes está asociada con su pluripotencia y su autorrenovación no restringida, características normalmente adscritas a las células madre. Se ha demostrado para varios tipos de tumores sólidos que tales células madre cancerosas (CSCs) pueden ser detectadas en un tumor primario, lo que explica porqué la expresión genética en tumores primarios puede ser un factor predictivo de riesgo para la metástasis. Aún no está claro si una única célula porta todas las anomalías genéticas que facilitan tanto su invasividad y su capacidad para metastatizar, si distintas especies clonales portan mutaciones fenotípicas complementarias que cooperan de forma combinada para un comportamiento agresivo, o si una sola progenie clonal de células madre cancerosas retiene su capacidad para divisiones asimétricas dando lugar a al menos, dos poblaciones, una con características fibroblastoides que facilitan la invasión local de todas las poblaciones tumorales, y otra población con más características de células madre, incluyendo la autorrenovación y la capacidad de metastatizar. Hay evidencias que soportan tanto la hipótesis de evolución clonal como la hipótesis de células madre cancerosa, dos visiones de la evolución del tumor que no son necesariamente mutuamente excluyentes, y también hay evidencias que tanto los eventos genéticos como epigenéticos subyacen en la evolución fenotípica del tumor. Lo que aún no es conocido es si estos estados representan características estables o plásticas, o los moduladores que median la generación de tales subpoblaciones (heterogeneidad intratumoral).

60 **Descripción de la invención**

Los autores de la presente invención han generado y caracterizado un modelo celular de progresión de cáncer de próstata, en el que han identificado una subpoblación con características CSCs y otra población con características comúnmente asociadas con la transición epitelio-mesenquimal (TEM). Bajo condiciones de cultivo estándar, estas dos subpoblaciones fueron fenotípicamente estables y mostraron capacidades divergentes de invasión y clonogenicidad *in vitro*, y potencial metastático *in vivo*, reflejado en sus muy diferentes repertorios transcripcionales. Mediante la exposición de células fenotipadas como CSC a diferentes factores y moduladores, se ha podido inducir de forma reproducible un cambio hacia la adquisición de características TEM. Este cambio fenotípico fue acompañado con la reprogramación de los genes que determinan el estatus CSC o TEM, y fue asociado con la adquisición de marcadores

de histona en los promotores correspondientes, lo que es característico del silenciamiento transcripcional. Estas evidencias sugieren que, en este modelo, CSC y TEM son alternativas diferentes, no estados solapados, y que factores medioambientales inducen a marcadores epigenéticos que dictan la evolución de CSCs hacia el establecimiento de distintas subpoblaciones solapadas dotadas de funciones especializadas dado un determinado tumor.

5

La presente invención proporciona un modelo para el estudio de los procesos invasivos, clonogénicos y metastásicos que tienen lugar en el desarrollo y progresión del cáncer.

Así, un primer aspecto de la invención se refiere a un modelo celular dual de cáncer, de ahora en adelante modelo celular de la invención, que comprende:

10

- a) la línea celular de cáncer de próstata PC-3/S, cuyas células expresan el gen luciferasa (luc), y
- b) la línea celular de cáncer de próstata PC-3/M, cuyas células expresan el gen luciferasa (luc).

15

La línea celular PC-3/S se obtuvo mediante pases celulares *in vitro* a través de Matrigel, siendo seleccionadas por su invasividad, a partir de la línea celular PC-3 depositada en la autoridad internacional de depósito *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD) con el número CRL-1435, tal y como se describe en Nithipatikom *et al.*, 2002. (Eicosanoids and Other Bioactive Lipids in Cáncer, Inflammation and Radiation Injury, 5. Edited by Honn *et al.*, Kluwer Academic/Plenum Publishers). De ahora en adelante, a la línea celular PC-3/S que expresa el gen de la luciferasa se la denominará PC-3/S-luc.

20

La línea celular PC-3/M es una sublínea de PC-3, obtenida a partir de la metástasis del hígado producida en un ratón nude tras la inyección intraesplénica de células de la línea PC-3 depositada en la autoridad internacional de depósito *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD) con el número CRL-1435, y que fue seleccionada por sus características altamente metastásicas, tal y como se describe en Kozlowski *et al.*, 1984. (*Cáncer Research* 44:3522-3529). De ahora en adelante, a la línea celular PC-3/M que expresa el gen de la luciferasa se la denominará PC-3/M-luc.

25

En esta memoria “luciferasa” se usa como un término genérico que agrupa un grupo de enzimas capaces de producir bioluminiscencia en la naturaleza. En las reacciones de luminiscencia la luz es producida por la oxidación de la luciferina (un pigmento), y la reacción requiere ATP (adenosina trifosfato). En esta memoria, por tanto “luciferasa” no se refiere a moléculas específicas, sino que es un término genérico para referirnos a un sustrato y su enzima asociada capaces de producir bioluminiscencia. La más conocida es la *firefly luciferase*, de *Photinus pyralis*, por lo que en una realización particular de la invención, la enzima luciferasa es la de *Photinus pyralis*.

30

Las células PC-3/M-luc y PC-3/S-luc muestran propiedades altamente divergentes, ya que PC-3/M-luc se comportan como células madre neoplásicas altamente clonogénicas y metastásicas pero poco invasivas, mientras que PC-3/S-luc se comportan como células con propiedades mesenquimales, con alta capacidad invasiva pero baja clonogenicidad o capacidad metastásica. Estas líneas celulares poseen, conjuntamente, una extraordinaria capacidad de discriminación extrema o exclusión recíproca entre los procesos mencionados.

40

Por tanto, el modelo celular de la invención permite conocer con facilidad genes que regulan la autorrenovación/pluripotencia y genes que regulan la capacidad invasiva, determinando la diferente expresión génica de las dos líneas celulares de dicho modelo. El poder asignar genes a una de estas funciones relevantes en metástasis, bien característicos de células madre neoplásicas, o bien de células en transición epitelio-mesénquima (TEM), es muy útil para el diagnóstico y pronóstico, así como para validar dichos genes como posibles dianas terapéuticas en cáncer.

45

Así pues, otro aspecto de la invención se refiere al uso del modelo de la invención para determinar la diferente expresión génica de los marcadores biológicos de invasividad y de metástasis. En una realización preferida de este aspecto de la invención, la diferente expresión génica se usa para el diagnóstico del cáncer. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, la diferente expresión génica se usa para el pronóstico del cáncer. En una realización aún más preferida de este aspecto de la invención, el cáncer es cáncer de próstata.

50

Tal como se utiliza en la presente invención el término “diferente expresión génica” se refiere a diferencias cuantitativas de los niveles de expresión génica de determinados marcadores biológicos, así como si existen o no dichos marcadores biológicos. El término “marcadores biológicos” tal como se utiliza en la presente invención se refiere tanto a los genes, detectables en su forma de RNAm o su correspondiente cDNA transcrito por RT-PCR, como a las proteínas codificadas por dichos genes.

55

La transición epitelio-mesénquima (TEM) se caracteriza por la adquisición por parte de células epiteliales de características mesenquimales que les permiten desprenderse de las células vecinas, reorganizar su citoesqueleto, degradar la lámina basal y la matriz extracelular subyacente, y adquirir la capacidad de migrar a través de esta última. Ejemplos de transición epitelio-mesénquima son la formación del mesodermo a través de la línea primitiva, la diferenciación de la cresta neural, la disgregación del dermomiótomo o la formación del mesénquima valvuloseptal en los cojines endocárdicos, y es un mecanismo involucrado en la fibrosis tisular. Además, la TEM ha sido descrita como proceso fundamental en la progresión tumoral y en patologías inflamatorias crónicas que pueden afectar órganos como riñones, hígado, pulmón...

60

65

ES 2 341 747 A1

El término “célula madre” se refiere a una célula indiferenciada relativamente quiescente que es capaz de proliferar y dar lugar a más células madre, teniendo asimismo la habilidad de generar un gran número de células progenitoras que, a su vez, pueden dar lugar a células diferenciadas, o células hija diferenciadas o diferenciables. Pueden automantenerse, lo que significa que con cada división celular, una célula hija será también una célula madre.

Otro aspecto se refiere a un método *in vitro* de búsqueda e identificación (*screening*), de ahora en adelante método de la invención, de agentes potencialmente útiles en el tratamiento o prevención del cáncer que comprende:

- a) poner en contacto las líneas celulares del modelo de la invención con el compuesto a analizar, y
- b) medir la supervivencia celular en las líneas celulares de a).

La detección de la supervivencia celular puede hacerse por varios métodos. Así, la detección podría realizarse mediante técnicas de citometría de flujo, citometría de flujo FACS (*Fluorescence-activated cell sorting*), o de microscopía, o utilizando técnicas de inmunocitoquímica (células), o por cualquier otro método.

El uso comparado y simultáneo de estas dos líneas celulares del modelo de la invención en ensayos funcionales, permite determinar con mucha facilidad si la actividad del agente que sometemos a estudio está dirigido contra componentes de la célula madre neoplásica, o al componente invasivo. Además, si un agente (compuesto o fármaco) afecta ambos procesos, debido a que en el modelo celular dual de la invención se da la propiedad de exclusión recíproca entre ambos procesos, es indicio de que dichos compuestos tienen efectos inespecíficos, es decir, que afectan indistintamente tanto a la capacidad clonogénica como a la capacidad invasiva de las células, o bien que presenta efectos tóxicos generales.

Así pues, una realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso del método de la invención para la selección de agentes útiles para el tratamiento del cáncer invasivo. Otra realización preferida de este aspecto de la invención se refiere al uso del método de la invención para la selección de agentes útiles para el tratamiento del cáncer metastásico. En una realización aún más preferida de este aspecto de la invención, el agente es útil en el tratamiento del cáncer de próstata.

En esta memoria se entiende por “cáncer invasivo” aquel que se ha propagado más allá de la capa de células donde se originó por primera vez para afectar a los tejidos adyacentes. Por “cáncer metastásico” en esta memoria, se entiende aquel en el que las células cancerosas se han propagado a áreas distantes del cuerpo por medio del sistema linfático o del torrente sanguíneo.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método *in vivo* de búsqueda e identificación de agentes potencialmente útiles en el tratamiento o prevención del cáncer que comprende:

- a) introducir la línea celular PC-3/M-luc en un mamífero no humano,
- b) introducir la línea celular PC-3/S-luc en otro mamífero no humano de la misma especie,
- c) expresar de forma recombinante el agente, o administrar el agente a los mamíferos según a) y b),
- d) comparar el nivel de emisión de luminiscencia en el mamífero no humano de la invención de a) con:
 - i. el nivel de emisión de luminiscencia en el mismo mamífero no humano antes de la administración del compuesto,
 - ii. el nivel de emisión de luminiscencia en el mamífero no humano según b), ó
 - iii. un nivel estándar de emisión de luminiscencia para los mamíferos no humanos según a) o b),

donde un cambio favorable con el nivel del indicador (disminución de la luminiscencia) en relación con el cambio de referencia usando animales normales no inyectados con las líneas celulares citadas en (a) y (b), en condiciones comparables, indica que el compuesto es activo para tratar dicha enfermedad; un cambio favorable con el nivel del indicador (disminución de la luminiscencia) en relación con el cambio experimentado por el mamífero según b) indica que el compuesto es activo frente al cáncer invasivo, y un cambio favorable con el nivel del indicador (disminución de la luminiscencia) en relación con el cambio experimentado por el mamífero según a) indica que el compuesto es activo frente al cáncer metastásico.

En una realización preferida de este aspecto de la invención, el mamífero no humano es un ratón. En otra realización preferida de este aspecto de la invención, el cáncer es cáncer de próstata.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

Descripción de las figuras

Fig. 1. Seguimiento *in vivo*, no invasivo de la capacidad tumorigénica y metastática de las PC-3/M-luc (parte superior de la imagen) y las PC-3/S-luc (parte inferior de la imagen). Para cada subclon, 5×10^6 células fueron inyectadas intramuscularmente en las patas traseras de ratones SCID (“Severe Combined ImmunoDeficiency”), y el crecimiento fue monitorizado por luminometría cuantitativa e imagen hasta que los tumores alcanzaron un diámetro de 1,5 cm.

Fig. 2. Imagen ilustrativa de la gran expresión diferencial entre las PC-3/M-luc y PC-3/S-luc. PC-3/M-luc y PC-3/S-luc expresan programas transcriptómicos altamente divergentes. EL análisis transcriptómico se llevó a cabo en un microarray Affymetrix U133 2.0 y, después de la normalización, los genes expresados de forma diferencial fueron seleccionados por medio de SAM. Se muestra el mapa de agrupamiento jerárquico generado por selección de genes con las mayores diferencias en los niveles de expresión entre PC-3/M-luc y PC-3/S-luc ($5 \leq \log_2[M/S \text{ ratio}]$).

Fig. 3. Validación por PCR cuantitativa de genes relacionados con el fenotipo de células madre cancerosas (CSC) y genes de propios de transición epitelio mesénquima (EMT). Se empleó el ensayo TaqMan para la determinación por RT-PCR semicuantitativa de los genes. El gráfico muestra los ratios entre ambos tipos celulares de los niveles transcritos normalizados para los niveles de transcritos ribosomales RPS18.

Fig. 4. Las células PC-3/M-luc y PC-3/S-luc exhiben propiedades muy divergentes *in vitro*. (A) Curvas de crecimiento mostrando la elevada tasa de crecimiento de las células PC-3/M-luc y comparativamente una baja tasa de crecimiento de las células PC-3/S-luc. (B) Análisis de citometría de flujo ilustrando la distribución de las poblaciones celulares en diferentes fases del ciclo celular, que muestra que las células PC-3/M-luc tienen una proporción significativa de células en la fase S en comparación con las células PC-3/S-luc. (C) Ensayo de formación de colonias en agar blando mostrando el elevado potencial clonogénico de las células PC-3/M-luc, y la pobre clonogenicidad de las células PC-3/S-luc. (D) ensayos de invasividad Transwell-Matrigel mostrando que las células PC-3/M-luc son poco invasivas, mientras las células PC-3/S-luc tienen una elevada capacidad invasiva.

Fig. 5. El inhibidor HDAC Trichostatin A (TSA) induce un cambio de marcadores en el fenotipo *in vitro* y el programa transcripcional de las células. (A) Tratamiento con 300 nM TSA durante 48 h induce la invasividad de células PC-3/M-luc en ensayos Transwell-Matrigel (de 8 a 10 veces por encima de las células control). (B) El tratamiento con 30 nM TSA impide completamente la formación de colonias en agar blando. (C) El tratamiento con 30 nM TSA inhibe el crecimiento de las células PC-3/M-luc. (D) El tratamiento de las células PC-3/M-luc con 300 nM TSA durante 48 h induce significativamente la expresión de los genes asociados con la transición epitelio-mesénquima, expresada normalmente a elevados niveles en la línea PC-3/S-luc. (E) El tratamiento con células PC-3/M-luc con 300 nM TSA durante 48 h inhibe significativamente la expresión de genes pluripotenciales.

Fig. 6. Factor de crecimiento transformante β (TGF- β) induce un cambio marcado *in vitro* en el fenotipo *in vitro* y el programa transcripcional de las células PC-3/M-luc. El tratamiento con 70 pM TGF- β durante 48 h induce la invasividad de las células PC-3/M-luc en ensayos Transwell-Matrigel (2.5-4 veces mayor que las células control). (B) El tratamiento con 70 pM TGF- β inhibe la formación de colonias en agar blando. (C) El tratamiento con 70 pM TGF- β durante 48 h inhibe el crecimiento de las células PC-3/M-luc. (D) El tratamiento con 70 pM TGF- β durante 48 h induce significativamente la expresión de genes asociados con la transición epitelio-mesénquima, normalmente expresados a altos niveles en la línea PC-3/S-luc. (E) Tratamiento de células PC-3/M-luc con 70 pM TGF- β durante 48 h inhibe significativamente la expresión de genes pluripotenciales.

Fig. 7. El CoCl_2 induce un cambio marcado *in vitro* en el fenotipo y el programa transcripcional de las células PC-3/M-luc. (A) El tratamiento de las células PC-3/M-luc con 150 μM CoCl_2 durante 48 h induce su invasividad en ensayos Transwell-Matrigel (4 veces mayor que las células control). (B) El tratamiento de las células PC-3/M-luc con 15 μM CoCl_2 inhibe completamente la formación de colonias en agar blando. (C) El tratamiento de las células PC-3/M-luc con 150 μM CoCl_2 durante 48 h induce significativamente la expresión de genes asociados con la transición epitelio-mesénquima, normalmente expresados a elevados niveles en la línea PC-3/S-luc. (D) El tratamiento de las células PC-3/M-luc con 150 μM CoCl_2 durante 48 h induce significativamente la expresión de genes pluripotenciales.

Fig. 8. Las células PC-3/M-luc y PC-3/S-luc muestran un enriquecimiento diferente de modificaciones específicas de histonas en los promotores de genes de pluripotencialidad o mesenquimales. Se muestran los resultados de la inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) en células PC-3/M-luc (negro) y en células PC-3/S-luc (gris) en los promotores de los genes (A)SOX2, (B)KLF9, (C) TWIST2 y (D) RUNX2, para detectar las modificaciones de acetilación de la Histona H3 (Ac-H3), acetilación de la Histona H4 (Ac-H4) y metilación en la lisina 27 de la Histona H3 (H3K27Me₃).

Ejemplos

Generación de clones celulares derivados de la línea PC-3 con expresión constitutiva y estable de la luciferasa de luciérnaga

PC-3/S-luc y PC-3/M-luc, son dos clones que provienen de la línea celular humana PC-3 aisladas de metástasis en hueso de un adenocarcinoma de próstata, en el año 1979. La línea celular PC-3/M-luc fue originalmente seleccionada en 1984 en el laboratorio del Dr. I. Fidler por el proceso de recolección de nódulos metastásicos formados en el hígado 6 meses después de la inyección en el bazo de PC-3.

Para la creación de estos clones se utilizó el plásmido pRC/CMV-luc construido clonando la región codificadora del gen luciferasa (luc) de *Photinus pyralis*, extraído del vector pGL2-Control (Promega Corporation, Madison, Wisconsin), en el vector pRC/CMV (Invitrogen, San Diego, California), bajo el control del promotor de citomegalovirus. El plásmido pRC/CMV contiene el gen de resistencia al antibiótico G418.

La transfección fue llevada a cabo por lipofección, 24 horas después de sembrar en placas de petri 3×10^5 células/60 mm, usando una mezcla de 15 μ l de lipofectamina (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, Maryland) y 2 μ g de vector pRC/CMV-luc. Las células fueron incubadas 24 horas con el plásmido. Una incubación adicional de 48 horas con medio estándar antes de empezar la selección de las células transfectadas con G418 (500 μ g/ml en medio) (Life Technologies, Inc.). Simultánea selección y clonaje para obtener colonias individuales. Las células transfectadas y cultivadas en medio con G418 son sembradas en placas de 96 pocillos a una dilución estimada para contener el equivalente de $\frac{1}{2}$ célula por pozo y cultivadas hasta la obtención de colonias provenientes de una única célula, clones. A partir de aquí se seleccionó, tanto para PC-3 y PC-3/M, el clon con mayor expresión de luc.

La posterior expansión y cultivo de estos clones se ha hecho en medio RPMI 1640 (PAA) y suplementado con piruvato sódico, aminoácidos no esenciales, L-glutamina, penicilina-streptomicina, 10% de suero fetal bovino y 200 μ g/ml de G418 como factor de selección.

Análisis de la capacidad de crecimiento de los clones celulares PC-3/S-luc y PC-3/M-luc en ratones SCID

Para la formación de tumores intramusculares a partir de estas células y analizar su capacidad tumorigénica, se inocularon por inyección intramuscular ambos tipos celulares en ratones SCID (deficitarios en linfocitos T, B y células NK). Se utilizaron 4 ratones tanto por PC-3/S-luc como para PC-3/M-luc, y en cada uno de ellos se les inyectó, en las piernas posteriores, 100 μ l de medio de cultivo sin FBS y con una concentración de células en suspensión de 5×10^3 células/ μ l.

Una vez introducido las células tumorales con capacidad de expresar luciferasa, el seguimiento no invasivo y análisis de imágenes se procedió como es descrito en El Hilali *et al.* Lab Invest 2002, 82:1563-1571. Los ratones se anestesiaron y seguidamente se les inyectó intraperitonealmente 50 μ l de luciferina (16.7 mg/ml en PBS) (Promega Corporation). Se capturó una imagen a tiempo cero (día 1) y se realizó un seguimiento del desarrollo tumoral con la captación de una imagen por semana. Los tumores se dejaron crecer hasta llegar a 1.5 cm de diámetro y entonces los ratones fueron sacrificados.

Para la toma de imágenes los animales fueron situados a 20 cm del objetivo de la cámara de alta eficiencia ORCA-2BT Imaging System (Hamamatsu Photonics, Hamamatsu City, Japan) provista con una cámara C4742-98-LWG-MOD de 512x512 píxeles, cargada con CCD ("Charge Coupled Device") refrigerada a -80°C. Inmediatamente después de la adquisición de la imagen, mientras el animal permanece a la misma posición, se realizó una segunda toma la fuente de luz blanca de dentro de la cámara de detección. La cuantificación y análisis de los fotones captados en imágenes se procesaron con el Wasabi Image Analysis Software (Hamamatsu Photonics). Las mediadas de luz emitida se expresan como fotones contados (PHCs). Para calcular el número de PHCs de un área de interés seleccionada, el número de PHCs es extraído de la imagen captada calculándose la media del número de PHC/píxel, con el programa Wasabi. La misma operación se realiza para un área de igual tamaño en una parte del animal que no contenga células implantadas para obtener el ruido de fondo por píxel de la toma de imágenes. El número neto de PHCs se obtiene restando el ruido de fondo a la media PHC/píxel por el número de píxeles del área de interés. Las imágenes en color son generadas en base a un patrón arbitrario que representa niveles de intensidad estándar (azul=baja intensidad; rojo=alta intensidad).

Los resultados obtenidos fueron que las PC-3/M-luc formaron grandes tumores a las dos semanas de haberles inyectado las células, incluso pudiéndose observar, en 3 de los 4 ratones, la aparición de focos de metastásicos en nódulos linfáticos de la región abdominal (Fig. 1). Por el contrario, las PC-3/S-luc mostraron baja capacidad tumorigénica, cuando a las 2 semanas el número de células con luciferasa en el lugar de la inyección había disminuido, sin mostrar ningún tipo de capacidad tumorigénica y no fue hasta los 3 meses cuando formaron importantes tumores e incluso presencia de algún pequeño foco metastásico en nódulos linfáticos de la región abdominal, en tres de los 4 ratones utilizados para estas células (Fig. 1).

Por tanto los resultados muestran como la línea celular proveniente del clon PC-3/M-luc tienen una elevadísima capacidad tumorigénica y alto potencial metastático, mientras que la línea celular establecida a partir del clon PC-3/S-luc tienen mucha menor capacidad tumorigénica y en consecuencia bajo potencial metastático.

Análisis del perfil transcripcional

Para la obtención de ARN para el análisis del perfil transcripcional por microarrays de ambos tipos celulares se sembraron en placas de 3.5cm de diámetro por triplicado y se dejaron crecer hasta llegar a una confluencia del 70-80%, entonces se lisaron y se purificó el ARN según el protocolo del kit de extracción utilizado que fue el RNeasy Mini Kit (Qiagen) para extracción en células de mamífero, realizando el paso opcional de incubación con DNase (Qiagen). El ARN purificado después de comprobar su concentración y su integridad con bioanalyzer se amplificó y convirtió en ARNc biotinilado (10 µg), luego fue procesado e hibridado en chips de Affymetrix U133 Plus 2.0. El conjunto de datos resultantes del microarray se normalizaron según el RMA (Robust Multi-array Algorithm) y a continuación se realizó un paso de filtraje de sondas, eliminando los valores que tenían un valor de expresión menor a 5. Para el análisis comparativo de los perfiles transcripcionales entre ambos tipos celulares e identificar los genes diferencialmente expresados, se aplicó el Significance Analysis of Microarrays (SAM-R), seleccionando los genes con un FDR (False Discovery Rate) menor a 10% (Q<10).

El resultado del análisis muestra que más de 8000 genes se expresan de forma significativamente diferencial entre PC-3/S-luc y PC-3/M-luc (Fig. 2). Éste es un hecho muy interesante teniendo en cuenta que ambos clones provienen, aunque distintamente, de la misma línea celular, PC-3. Y en consecuencia refleja, de alguna forma, la diferencia/divergencia en cuanto a comportamiento se refiere, observado en estas células. Profundizando en el análisis del perfil transcriptómico se observan grupos de genes funcionalmente relacionados en ambos tipos celulares. En el caso de las PC-3/M-luc aparecen altamente más expresados genes relacionados con fenotipos de células madre/transit amplifying (normales y/o cancerosas) incluyendo factores de transcripción propios de dicho fenotipo como MYC, SOX2, KLF4, KLF9, WT1, PITX2, TP63, EZH2, BMI1 además de marcadores propios de células madre de próstata como son CD44, ALDH1, ITGA6, GPR49, CD24, SCA-1. Por otro lado, las PC-3/S-luc expresan más genes involucrados en transición epitelio-mesénquima (TEM) como son los factores de transcripción TWIST1, TWIST2, SNAI2, ZEB1, RUNX1, RUNX2, SOX9 e importantes marcadores de dicho fenómeno como Fibronectina, Vimentina y la ausencia de la E-cadherina, la cual si está presente en las PC-3/M-luc. En cuanto a vías de señalización y red de interacciones entre ellas, las PC-3/M-luc expresan genes propios de reparación de ADN, replicación de ADN, y de transición mitótica y puntos de control, mientras que la PC-3/S-luc presentan genes involucrados en vías activas de NF-κ B y vías Hedgehog, además de expresar numerosos genes de citocinas, quimiocinas y sus receptores.

La expresión de multitud de genes explica la divergencia de fenotipos observados entre las dos líneas celulares. A modo de ejemplo, en las PC-3/M-luc, genes altamente más expresados que en PC-3/S-luc involucrados en crecimiento, inhibición de la diferenciación, iniciación del cáncer y progresión tumoral, como SATB1 (metástasis y progresión tumoral), MTA-1 y C-MET los cuales promueven la expresión de genes metastáticos, ID1 y ID3 implicados en la iniciación tumoral, OPG (metástasis a os), ANGPTL4 implicado en colonización de tejidos y marcadores epiteliales como E-Cadherina y TACSTD1. En el caso del subclon PC-3/S-luc, se encuentran interesadamente más expresados genes involucrados en invasión, migración, modelación de la matriz extracelular, tales como LCM2 (migración, MMP14 (invasión, angiogénesis), SOX4 implicado en invasión y SOX9 inductor de transición epitelio mesénquima, además de los remodeladores de matriz extracelular durante el proceso de invasión como ITGB1, ITGA3, RhoB, Rock, Podoplanin (invasión), o ILK y Endothelin-1 los cuales también promueven transición epitelio-mesénquima.

La enorme cantidad de información que nos proporciona este tipo de análisis transcripcional y su profundo análisis, anteriormente explicado, muestra patrones de expresión claramente distintos e inclusive mutuamente excluyentes, entre los dos subclones, lo cual reseña su divergencia fenotípica y los clasifica como células madre cancerosas en el caso de las PC-3/M-luc. En el caso de las PC-3/S-luc muestra patrones de expresión de genes propios de células que han sufrido una transición epitelio-mesénquima.

Análisis cuantitativo de la expresión de genes de células madre cancerosas (CSC) y de transición epitelio-mesénquima mediante RT-PCR a tiempo real

La PCR cuantitativa se llevo a cabo con el LighCycler480 de Roche. El ADN complementario se sintetizó con el kit de retrotranscripción de Applied Biosystems (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit). Cada gen en concreto fue analizado con sondas TaqMan (Applied Biosystems), las cuales llevan la propia sonda con los específicos oligonucleótidos incorporados, o con sondas de la Universal Probe Library (UPL) de Roche, las cuales requieren de un diseño de oligonucleótidos específicos para el gen en cuestión y que fue llevado a cabo con el software ProbeFinder2.44 online versión (Roche). Los genes analizados fueron KLF9, ADRB2, EZH2, RUNX2, TWIST2, KLF4, SOX2, MYC, SNAI2, SATB1, XIST, SNAI1, TWIST1, CDH1 y VIM. Las referencias y secuencias de las sondas para cada caso están indicadas en la tabla 1 para TaqMan, y tabla2 para UPL. Los niveles de amplificación del RPS18 fueron utilizados como referencia interna para estimar los niveles relativos de los transcritos analizados.

ES 2 341 747 A1

TABLA 1

Listado de genes y referencias de los ensayos comerciales Taqman

GEN	Sonda TaqMan
KLF9	Hs00230918_m1
ADRB2	Hs00240532_s1
EZH2	Hs00544830_m1
RUNX2	Hs00231692_m1
RPS18	Hs99999901_s1
TWIST2	Hs02379973_s1
KLF4	Hs00358836_m1
SOX2	Hs01053049_s1
MYC	Hs00153408_m1
SNAI2	Hs00161904_m1

TABLA 2

Listado de genes, sondas y secuencias de las parejas de oligonucleótidos analizados por UPL

GEN	Sonda UPL	Primer	Secuencia 5' -> 3'
SATB1	GCTGCCCA #44	FW	SEQ ID NO: 1
		REV	SEQ ID NO: 2
XIST	#78	FW	SEQ ID NO: 3
		REV	SEQ ID NO: 4
SNAI1	CCTTCCAGC #11	FW	SEQ ID NO: 5
		REV	SEQ ID NO: 6
TWIST1	#6	FW	SEQ ID NO: 7
		REV	SEQ ID NO: 8
CDH1	AGAAGAGGA #35	FW	SEQ ID NO: 9
		REV	SEQ ID NO: 10
VIM	GGAGGCAG #16	FW	SEQ ID NO: 11
		REV	SEQ ID NO: 12
RPS18	GGCCCTGG #81	FW	SEQ ID NO: 13
		REV	SEQ ID NO: 14

El análisis cuantitativo respecto a los genes de pluripotencia y asociados con un fenotipo de célula madre cancerosa como, KLF4, MYC, SOX2, XIST KLF9 y EZH2, validaron los resultados del microarray, y mostraron niveles de 2 ordenes de magnitud de expresión superior en PC-3/M-luc que en PC-3/S-luc (Fig. 3). Por otra parte los genes implicados en la transición epitelio-mesénquima como, TWIST2, SNAI2 y RUNX2 se analizaron y corroboraron los datos del perfil transcripcional y en algunos casos con valores de dos órdenes de magnitud superior en PC-3/S-luc que en PC-3/M-luc (Fig. 3).

Considerando el conjunto de resultados y la validación por PCR cuantitativa de genes clave para los fenotipos que parecen disponer estas células, se sostiene la idea de que las PC-3/M-luc sean células madre cancerosas (CSC), acorde con su comportamiento y perfiles de expresión génica, mientras que las PC-3S-luc serian células que han sufrido una transición epitelio-mesénquima, desde que se comportan como tales y expresan genes propios de dicho fenómeno.

ES 2 341 747 A1

Todo esto sugiere una importante y sorprendente divergencia entre los fenotipos de CSC y EMT, inclusive llegando a ser mutuamente exclusivos en nuestro modelo celular.

5 *Análisis de la capacidad invasiva in vitro de los clones celulares PC-3/M-luc y PC-3/S-luc en cámaras de Borden (Transwell) revestidas con matrigel*

Con el objetivo de determinar la capacidad invasiva *in vitro* de los clones *per se*, se realizaron ensayos de invasión utilizando los soportes Transwell de 24 pocillos (Costar), derivados de las cámaras de Borden. Previamente y para recrear un entorno fisiológico, se reconstituyó (50 μ l) en los soportes una matriz extracelular artificial (matrigel, BD Biosciencias) a una concentración de 410 μ g/ml a la que se suplementó una concentración de 200 μ g/cm² de ácido hialurónico (Sigma-Aldrich), para estimular la invasividad de las células.

Partiendo de un cultivo al 80% de confluencia de clones PC-3/M-luc y otro de PC-3/S-luc, se tripsinizaron las células y se sembraron 5x10⁵ células en sendas placas de poliestireno de 10 cm de diámetro (Corning). Después de 2 días de ser mantenidas en medio completo con 10% de suero fetal bovino (FBS) y atmósfera húmeda al 5% CO₂ a 37°C, el medio fue retirado, se realizaron dos lavados con tampón fosfato salino (PBS) y se añadió a las placas medio completo sin FBS. Las células se mantuvieron deprivadas de suero en el medio durante 16 horas, tiempo tras el cual se procedió a sembrar células de ambos clones en soportes Transwell revestidos de matrigel. Para ello, se lavaron las células con PBS dos veces, se añadió tripsina-EDTA 1x (PAA) y se recuperaron las células de ambos clones, depositándolas en tubos falcón de 50 ml (Costar-Corning). Una vez obtenido el resuspendido celular de ambos clones, se centrifugaron a 1.300 rpm, durante 5 minutos, con el fin de obtener un pellet celular. Se retiró el medio con tripsina de los tubos Falcon y el pellet celular se resuspendió en medio completo con 0,5% de FBS y 0,1 de albúmina de suero bovino (BSA, Sigma-Aldrich). Tras recotar las células mediante un hematocitómetro (cámara de Neubauer mejorada, Optik Lab) con el colorante vital trypan blue y por duplicado, se tomó un volumen que contuviera 750.000 células y se resuspendió en medio con 0,5% de FBS y 0,1 BSA hasta llegar a 1ml. De esta suspensión celular, realizada para cada clon, se tomaron 200 μ l con una densidad celular de 600 células/ μ l, y se sembraron en los soportes del soporte Transwell dispuestos al afecto, y por triplicado en cada línea celular. Previamente se rehidrató la matrigel con un volumen de 50 μ l de medio con 0,5% de FBS y 0,1 BSA. Una vez sembradas las células de cada línea celular, se añadieron 600 μ l de medio con 0,5% de FBS y 0,1 BSA en las cámaras inferiores de la placa, con lo que se estableció un sistema entre ambas cámaras apto para la permitir la invasión de las células desde la cámara superior hasta la cámara inferior del pocillo. La placa se dejó incubar así 48 horas en atmósfera húmeda al 5% CO₂ a 37°C.

Una vez transcurridas las 48 horas, las células de ambos clones que demostraron ser invasivas, se recolectaron. Para ello se desmontaron los sistemas de dos cámaras, y se retiró el medio, se hizo un lavado con PBS en las cámaras inferiores y se procedió a tripsinizar las células, tanto adheridas a la cara exterior de la cámara superior, como las adheridas en la cara interior de la cámara inferior. Estas células se depositaron en medio completo y se centrifugaron (1.300 rpm, 5 minutos) Una vez que se retiró el medio con tripsina, se resuspendieron de nuevo con PBS, y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 3 minutos. Tras aspirar el PBS, se añadieron 50 μ l de Tampón de Lisis Pasivo (Promega) y las muestras se dejaron en agitación fuerte durante 15 minutos. El método de detección de las células de ambos clones que demostraron ser invasivas en las condiciones ensayadas, se realizó mediante medición luminométrica de la enzima luciferasa integrada establemente en el genoma de estas células, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante (Luciferase assay system kit, Promega), mediante un fluorímetro (Victor3 1420, Perkin Elmer corp) y el programa Wallack station (protocolo luc-Ren). Las unidades de luz relativas (RLU's) se correlacionaron a un determinado número de células gracias a un patrón de diluciones de un número de células conocido para ambas líneas celulares y siguiendo el mismo protocolo. El tratamiento de los datos obtenidos se procesó con la hoja de cálculo Excel (incluida en el paquete Office de Microsoft).

50 *Resultados*

Los clones PC-3/S-luc demostraron poseer, en las condiciones ensayadas, un potencial invasivo significativamente superior al de los clones PC-3/M-luc. El número de células del clon PC-3/S-luc invasivas, superó en más de 40 veces el número de células invasivas de los clones PC-3/M-luc.

55

Elaboración de rectas patrón para correlacionar número de células y actividad luciferasa en los clones PC-3/M-luc y PC-3/S-luc

Para correlacionar la actividad luciferasa de los clones PC-3/M-luc y PC-3/S-luc con un número de células determinado, se realizaron sendas rectas patrones. Para ello, a partir de placas en cultivo al 80% de confluencia de ambos tipos de clones, se tripsinizaron las células. Tras centrifugar a 1.300 rpm durante 5 minutos, se aspiró el medio con tripsina y se resuspendió en medio completo con 10% de FBS. Se recotaron las células con el hematocitómetro mediante tinción con el colorante vital trypan blue y se preparó una suspensión celular en medio completo con 10% de FBS de 1,25x10⁵ células/ml. A partir de esta suspensión, se prepararon por quintuplicado, las siguientes suspensiones de células que constituyeron los puntos de la recta patrón en sendas líneas celulares:

- 0,8 μ l de la suspensión celular más 199,2 μ l de PBS (punto de la recta patrón de 100 células).

ES 2 341 747 A1

- 2,4 μ l de la suspensión celular más 197,6 μ l de PBS (punto de la recta patrón de 300 células).
- 5,2 μ l de la suspensión celular más 194,8 μ l de PBS (punto de la recta patrón de 650 células).
- 5 - 8 μ l de la suspensión celular más 192 μ l de PBS (punto de la recta patrón de 1000 células).
- 40 μ l de la suspensión celular más 160 μ l de PBS (punto de la recta patrón de 5.000 células).
- 10 - 48 μ l de la suspensión celular más 152 μ l de PBS (punto de la recta patrón de 6.000 células).

Al obtener estas suspensiones celulares en ambos clones, se centrifugaron a 10.000 rpm durante 3 minutos, se aspiró el medio con PBS y se añadieron 50 μ l de tampón de lisis pasivo (Promega) para seguidamente depositar los quintuplicados en agitación fuerte durante 15 minutos. Posteriormente, se procedió a la detección de la actividad luciferasa de las células de ambos clones siguiendo el protocolo indicado por el fabricante (Luciferase assay system kit, Promega), en el que a 20 μ l de lisado, se le añaden 100 μ l de sustrato de la enzima luciferasa (LAR II). Acto seguido las muestras se leyeron mediante un fluorímetro (Victor3 1420, Perkin Elmer corp) y el programa Wallack station (protocolo luc-Ren). El tratamiento de los datos obtenidos se procesó con la hoja de cálculo Excel (incluida en el paquete Office de Microsoft).

20 *Resultados*

Las células del clon PC-3/S-luc demostraron poseer una actividad luciferasa superior (aprox. 3 veces superior) al de los clones PC-3/M-luc.

25 *Análisis del crecimiento in vitro de los clones celulares PC-3/M-luc y PC-3/S-luc en medio semisólido (test de clonogenicidad en agar blando)*

En placas de 12 pocillos (Costar), se creó un sistema de dos fases con diferentes concentraciones de agar, por triplicado para cada clon celular. Para obtener la capa inferior, se parte de una agar (Invitrogen) al 5% (diluido con agua estéril) que se calentó hasta la fusión. Seguidamente se diluyó este agar al 5% con medio RPMI completo con 10% de FBS precalentado a 46°C, hasta una concentración del 0,5% de agar. Seguidamente, y tras dejar enfriar 30 minutos a T^a ambiente, se procedió a añadir la capa superior del sistema, con una concentración del 0,3% de agar. Para ello, se diluyó el agar al 0,5% preparado con anterioridad, con una suspensión de células de cada uno de los clones celulares (13,4 x 10³ células/ml), que proceden de respectivas placas en cultivo en medio RPMI completo con 10% de FBS y que se hallaban a una confluencia del 80%. Por el volumen añadido, esta capa superior contiene unas 3.000 células (por triplicado por cada clon celular). Finalmente y tras dejar enfriar 30 minutos a T^a ambiente, se añadió en cada uno de los triplicados de cada clon celular un volumen de medio RPMI completo con 10% de FBS. A continuación, se incubaron las placas a 37°C en atmósfera húmeda con un 5% de CO₂ durante 9 días en los que se cambió el medio cada 2 días. Al acabar el ensayo, se fijaron las colonias celulares con glutaraldehído al 0,5% y se tiñeron con cristal violeta al 0,025%. Finalmente, y tras lavar varias veces con PBS, se observaron las colonias con lupa y se tomaron fotografías (Lupa Leica MZ6 con cámara olympus ZFX116 acoplada) para su posterior recuento (uso del software Adobe Photoshop). El criterio para considerar una agregación celular como una colonia, fue que ésta tuviera un diámetro igual o superior a los 0,1 mm (30-50 células aprox.).

45 *Resultados*

En las condiciones ensayadas, los clones PC-3/M-luc demostraron poseer un potencial para formar colonias en un medio hostil (potencial clonogénico) muy superior al del clon celular PC-3/S-luc. Los clones PC-3/M-luc formaron 35 veces más colonias que el clon PC-3/S-luc.

50 *Análisis del crecimiento in vitro de los clones celulares PC-3/M-luc y PC-3/S-luc sobre sustrato plástico (curvas de crecimiento)*

Partiendo de placas en cultivo confluentes al 80% de cada clon celular, se obtuvo una suspensión celular de 25.000 células/ml y se sembraron por sextuplicado en 4 placas de 96 pocillos de poliestireno (Nunc) 5x10³ células de cada clon celular. Las placas se dejaron incubar en atmósfera húmeda al 5% CO₂ a 37°C. Al cabo de 24 horas se procesó una de las placas para cada clon, siendo este el primer punto de la recta para evaluar el crecimiento de los clones celulares. Se aspiró el medio y se realizaron lavados con PBS. Al retirar el tampón, se añadió el tampón de lisis pasivo (Promega) en cada pocillo de los sextuplicados y para cada clon celular. Tras dejar la placa en agitación fuerte durante 15 minutos, se procedió a la detección de la actividad luciferasa de las células de ambos clones siguiendo el protocolo indicado por el fabricante (Luciferase assay system kit, Promega), en el que a 20 μ l de lisado, se le añaden 100 μ l de sustrato de la enzima luciferasa (LAR II). Acto seguido las muestras se leyeron mediante un fluorímetro (Victor3 1420, Perkin Elmer corp) y el programa Wallack station (protocolo luc-Ren). El tratamiento de los datos obtenidos se procesó con la hoja de cálculo Excel (incluida en el paquete Office de Microsoft). Tras 48 y 72 horas, se procesaron por el mismo método sendas placas de ambos clones celulares, y se cambió el medio de las placas restantes (medio RPMI completo con 10% de FBS), que se procesaron al 6º día posterior a la siembra de las células.

ES 2 341 747 A1

Resultados

Los clones celulares PC-3/M-luc demostraron poseer una tasa de proliferación significativamente superior a la del clon celular PC-3/S-luc. Al cabo de los seis días de ensayo, la población celular de los clones PC-3/M-luc duplicó la población celular de los clones PC-3/S-luc.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 341 747 A1

REIVINDICACIONES

1. Modelo celular de cáncer que comprende:

- 5
- a. la línea celular de cáncer de próstata PC-3/S, modificada genéticamente para expresar el gen luciferasa (luc), y
 - b. línea celular de cáncer de próstata PC-3/M, modificada genéticamente para expresar el gen luciferasa (luc).
- 10

2. Uso del modelo de cáncer según la reivindicación 1, para determinar la diferente expresión génica de los marcadores biológicos de invasividad y de metástasis.

15 3. Uso del modelo de cáncer según la reivindicación 2, para el diagnóstico del cáncer.

4. Uso del modelo de cáncer según la reivindicación 2, para el pronóstico del cáncer.

20 5. Uso del modelo de cáncer según cualquiera de las reivindicaciones 2-4, donde el cáncer es cáncer de próstata.

6. Método *in vitro* de búsqueda e identificación de agentes potencialmente útiles en el tratamiento o prevención del cáncer que comprende:

- 25
- a. poner en contacto las líneas celulares de la invención con el compuesto a analizar, y
 - b. medir la supervivencia celular en ambas líneas celulares.

30 7. Uso del método según la reivindicación 6, para la selección de agentes útiles para el tratamiento del cáncer invasivo.

8. Uso del método según la reivindicación 6, para la selección de agentes útiles para el tratamiento del cáncer metastásico.

35 9. Uso del método según cualquiera de las reivindicaciones 6-8, donde el cáncer es cáncer de próstata.

40

45

50

55

60

65

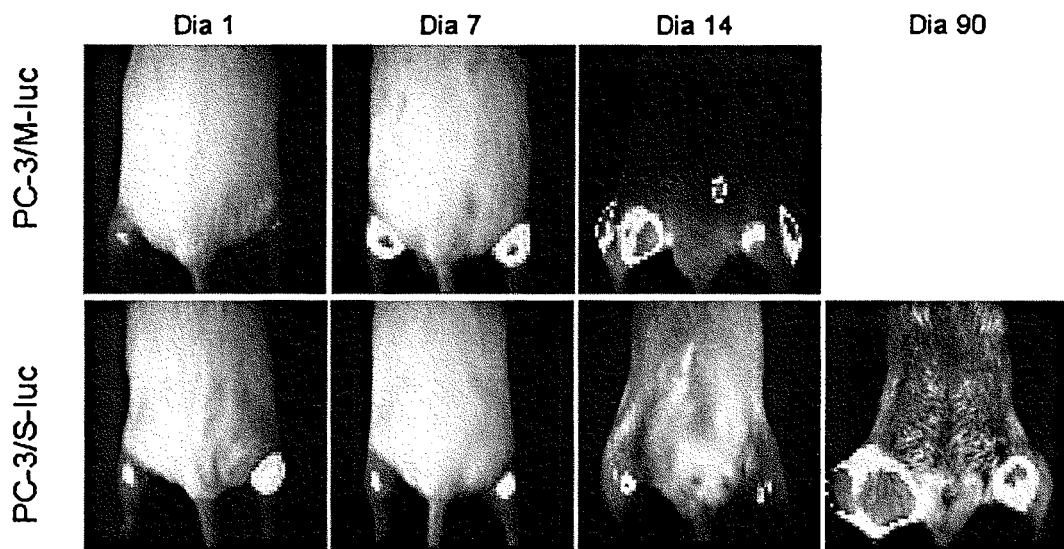


FIG. 1

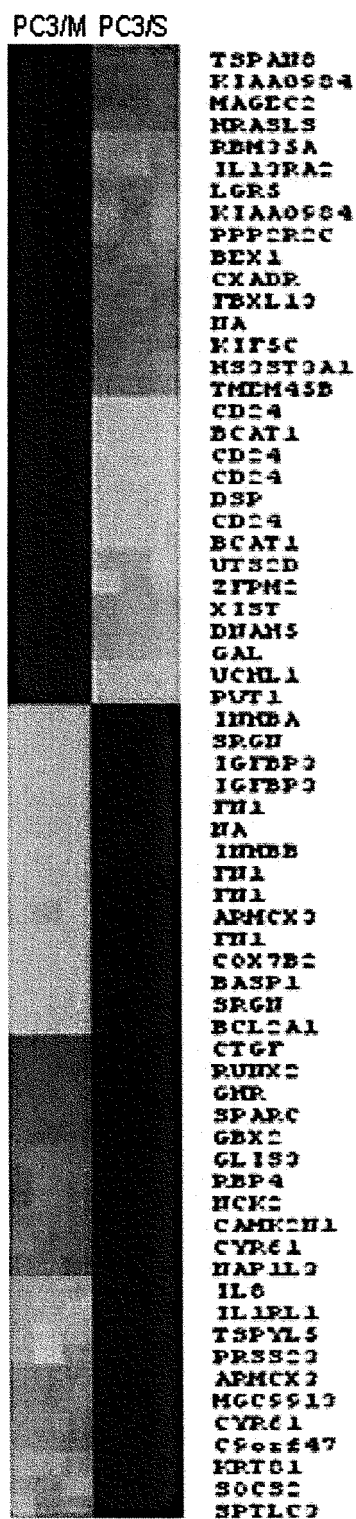


FIG. 2

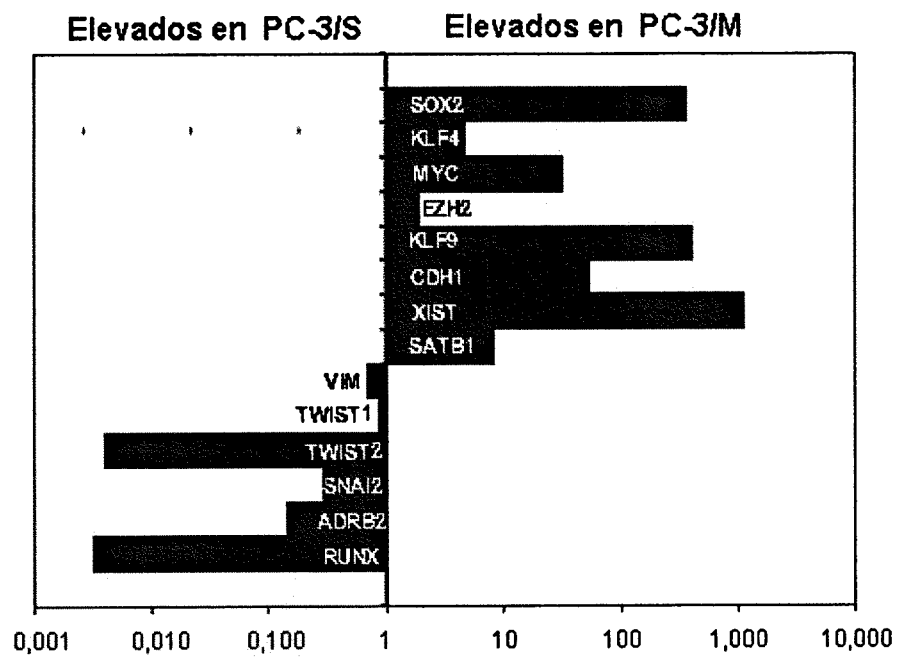


FIG. 3

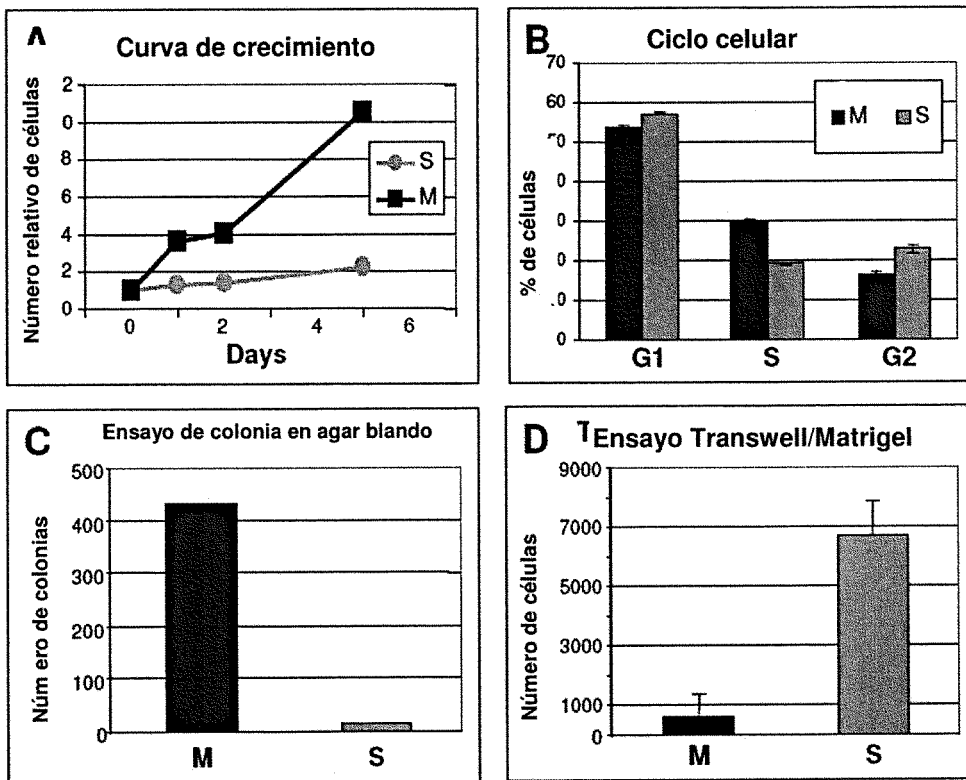


FIG. 4

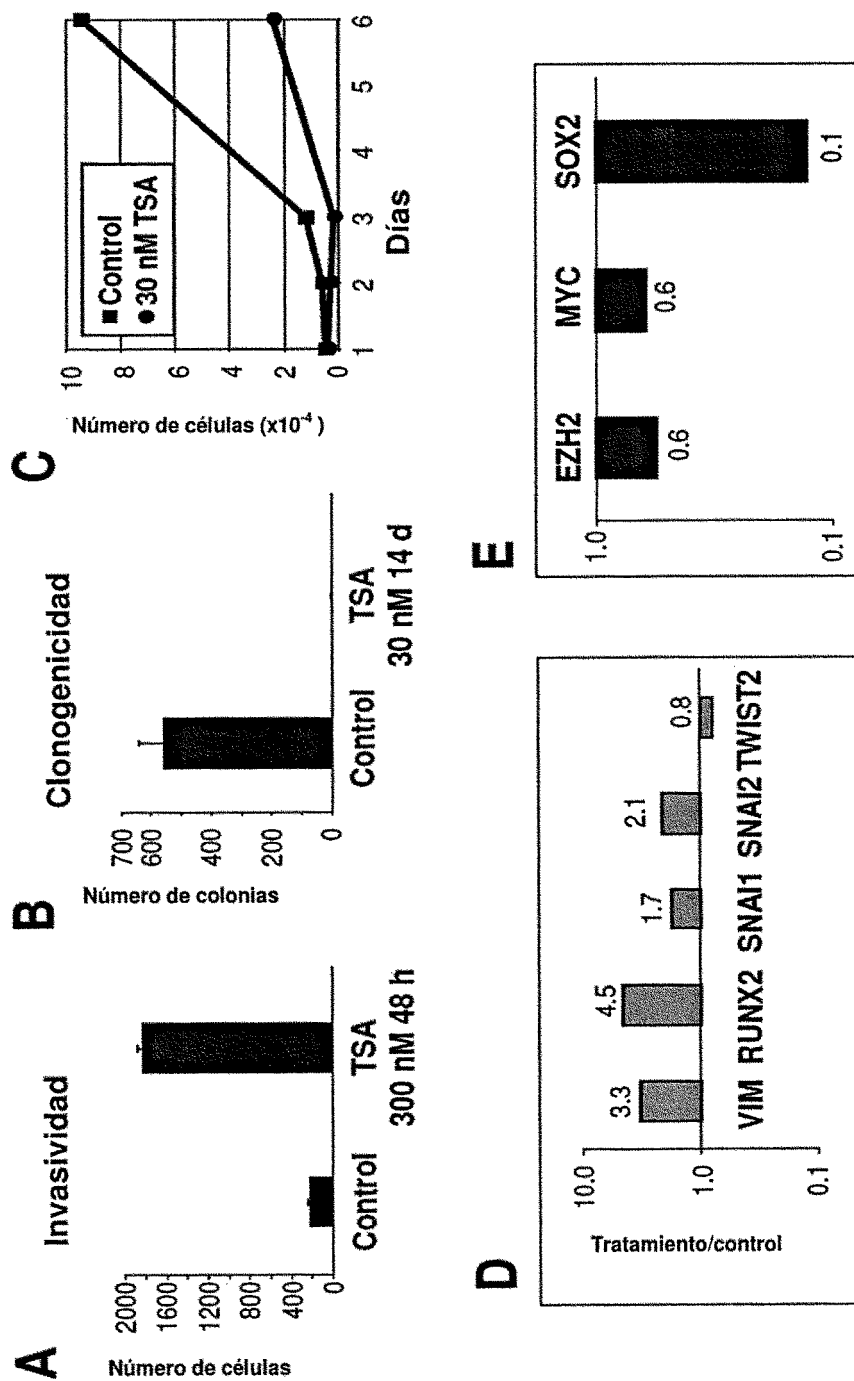


FIG. 5

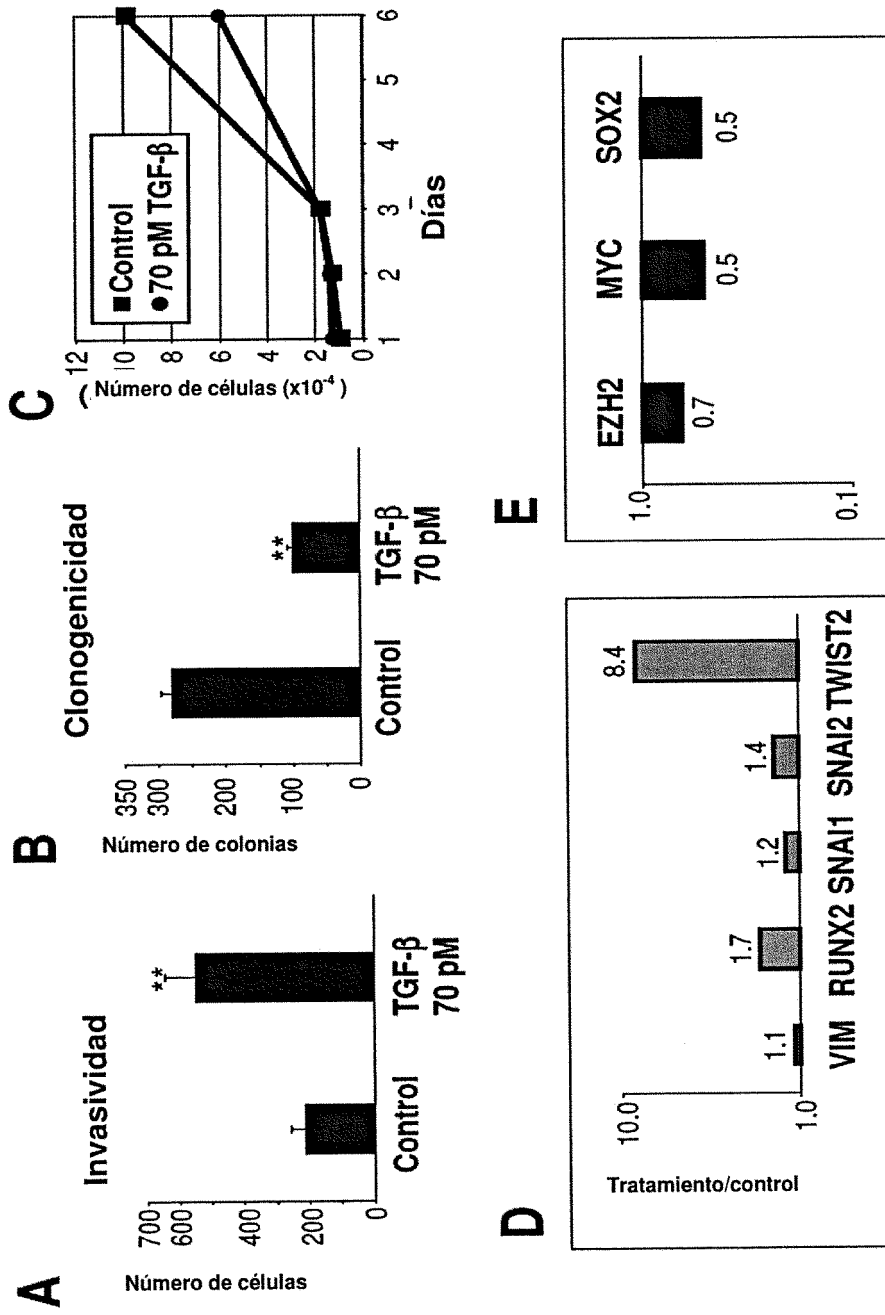


FIG. 6

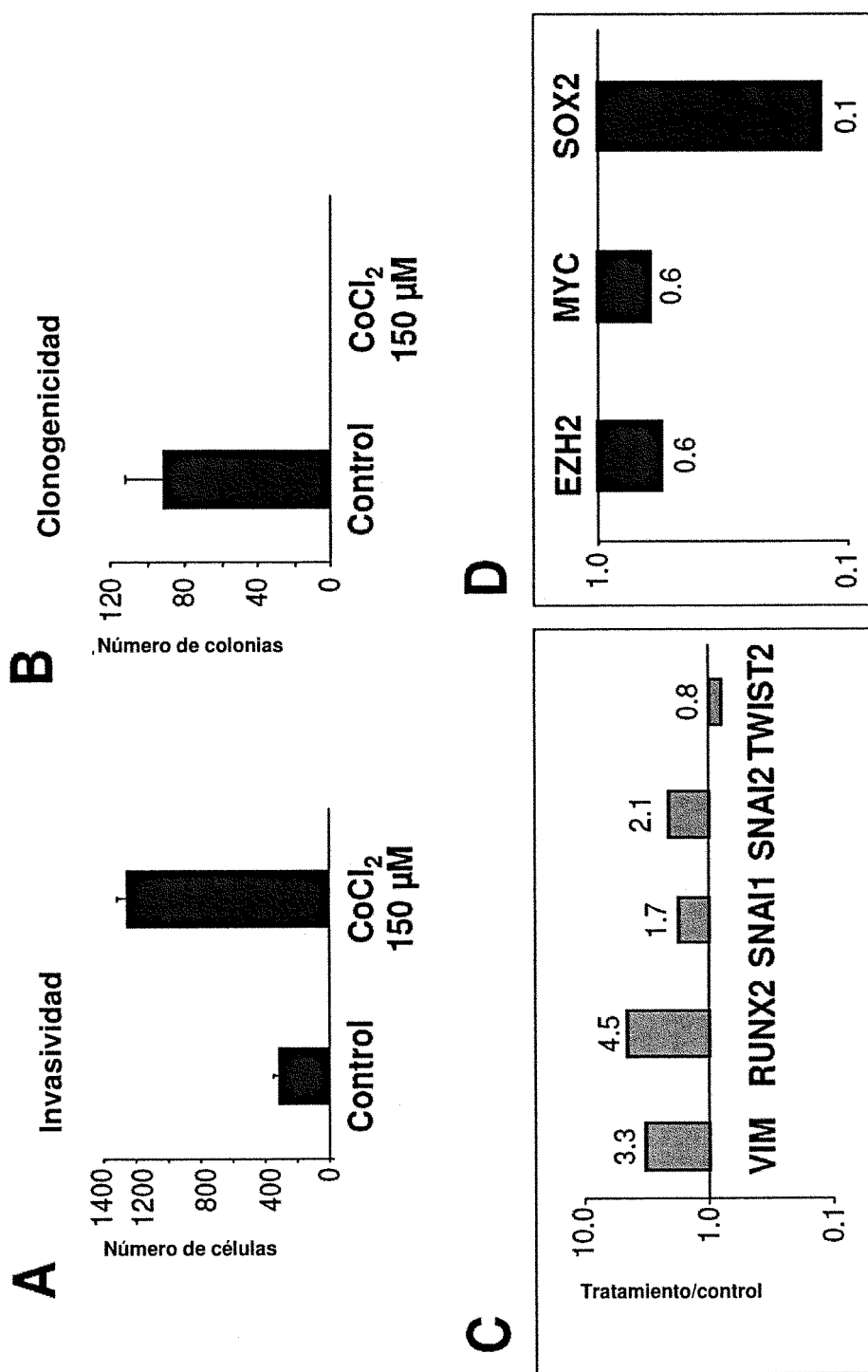


FIG. 7

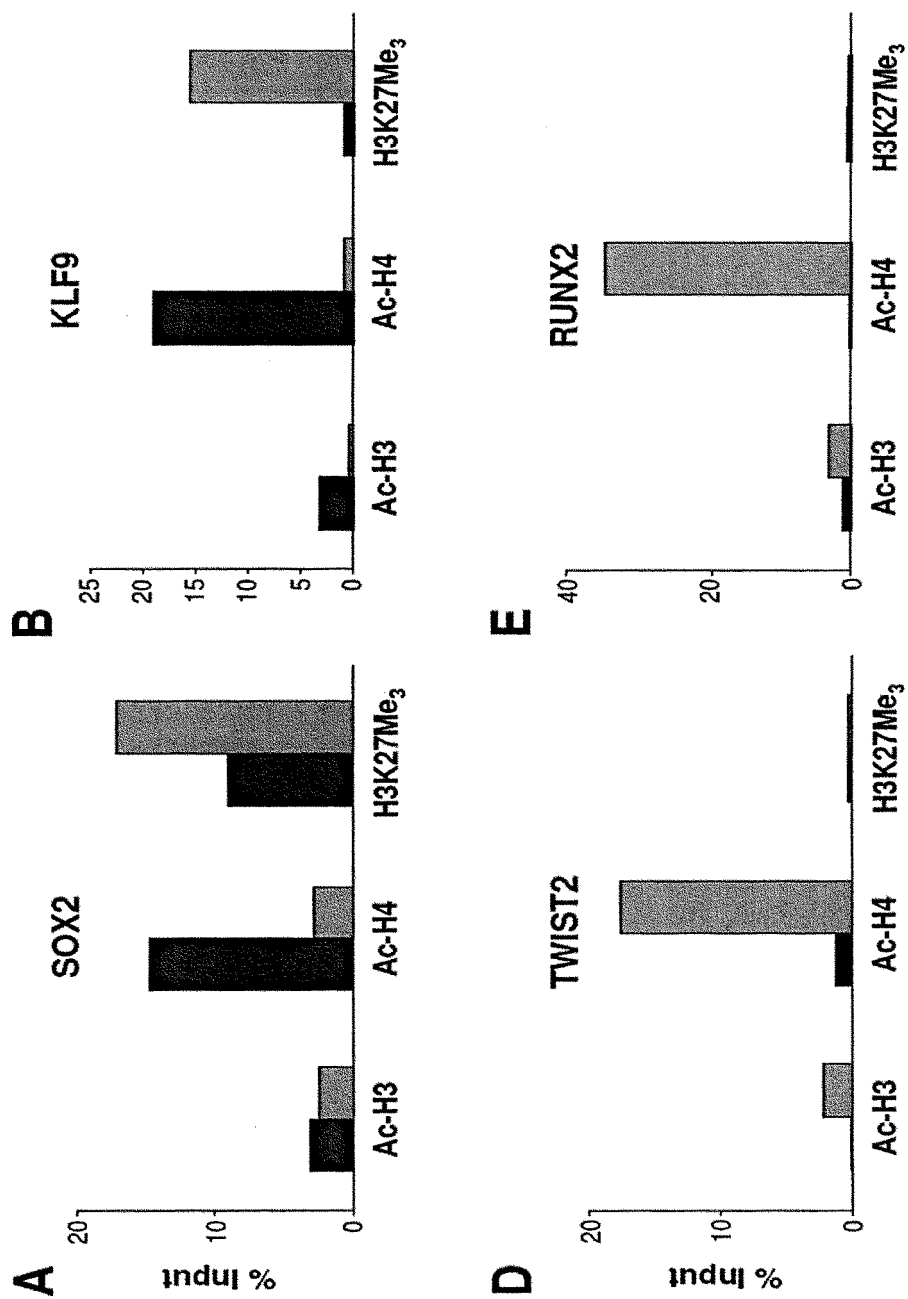


FIG. 8



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 341 747

② Nº de solicitud: 200802841

③ Fecha de presentación de la solicitud: 07.10.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	EL HILALI N. et al. Different Effect of Paclitaxel on Primary Tumor Mass, Tumor Cell Contents, and Metastases for Four Experimental Human Prostate Tumors Expressing Luciferase Clinical Cancer Research. 2005, Vol. 11, páginas 1253-1258, página 1253, resumen; página 1254, columna 2; página 1255, columna 2; página 1257, columnas 1-2.	1, 6-9
Y		2-5
Y	SONG A. et al. Screening of Differently Expressed Genes in Human Prostate Cancer Cell Lines with Different Metastasis Potentials. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2007, Vol. 27(5), páginas 582-585, todo el documento.	2-5
A	YEMELIANOV A. et al. Effects of IKK inhibitor PS1145 on NK-kB function, proliferation, apoptosis and invasion activity in prostate carcinoma cells. Oncogene. 2006, Vol. 25, páginas 387-398, página 387, resumen; página 388, columna 1; página 391, columnas 1-2; página 395, columna 2; página 397, columna 1.	6-9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

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

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

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

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

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

11.06.2010

Examinador

Mª D. García Grávalos

Página

1/5

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 5/07 (2010.01)

C12N 15/85 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

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

C12N, G01N, A61P

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 11.06.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1	SÍ
	Reivindicaciones 2-9	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	SÍ
	Reivindicaciones 1-9	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de **aplicación industrial**. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión:

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como ha sido publicada.

1. Documentos considerados:

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EL HILALI N. et al. Clinical Cancer Research. 2005, Vol. 11, páginas 1253-1258.	01-02-2005
D02	SONG A. et al. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci. 2007, Vol. 27(5), páginas 582-585.	2007
D03	YEMELIANOV A. et al. Oncogene. 2006, Vol. 25, páginas 387-398.	2006

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención divulga dos líneas celulares, PC-3/S-luc y PC-3/M-luc, derivadas de la línea de cáncer de próstata PC-3, modificadas de forma que expresan el gen luciferasa (luc) para desarrollo de un modelo de cáncer (reivindicación 1), útil para diagnóstico y/o pronóstico de cáncer, especialmente de próstata, determinando la diferente expresión génica de los marcadores biológicos de invasividad y metástasis (reivindicaciones 2-5). Se refiere también a un método de búsqueda de agentes para tratamiento o prevención del cáncer, mediante el cultivo de las líneas indicadas en presencia de los compuestos a analizar (reivindicaciones 6-9).

El documento D01 divulga el efecto de un agente antineoplásico, paclitaxel, en el crecimiento de tumores primarios y metástasis, empleando células de cáncer de próstata transfectadas con el gen luciferasa (luc) en un método que permite determinar el número de células tumorales mediante la determinación de la cantidad de luz emitida por estas células (ver página 1253, resumen; página 1254, columna 2; página 1255, columna 2; página 1257, columnas 1-2).

El documento D02 divulga un modelo de screening de la diferente expresión de genes en dos líneas celulares, derivadas de la línea de cáncer de próstata PC-3, con alto y bajo potencial metastático respectivamente que permiten la construcción de dos librerías de células de cáncer de próstata con diferente potencial metastático (ver todo el documento).

El documento D03 divulga el efecto del inhibidor PS1145 en la proliferación, invasividad y apoptosis mediante ensayos in vitro, empleando diferentes células de cáncer de próstata (ver página 387, resumen; página 388, columna 1; página 391, columnas 1-2; página 395, columna 2; página 397, columna 1).

1. NOVEDAD (Art. 6.1 LP 11/1986)**1.1. REIVINDICACIONES 1- 9**

El documento D01 se considera el más cercano al estado de la técnica, ya que anticipa las líneas celulares de cáncer de próstata PC-3/S-luc y PC-3/M-luc en el desarrollo de un modelo de cáncer.

En consecuencia, la reivindicación 1 no cumple con el requisito de novedad (Art. 6.1 LP 11/1986).

Las reivindicaciones 2-9 cumplen con el requisito de novedad (Art. 6.1 LP 11/1986).

Hoja adicional

2. ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP 11/1986)

2.1. REIVINDICACIONES 2- 9

La diferencia entre el documento D01 y el objeto técnico de las reivindicaciones 2-9 de la presente solicitud, radica en que este documento no hace referencia al uso de las líneas PC-3/S-luc y PC-3/M-luc en un modelo para determinar la diferente expresión génica de marcadores de invasividad y metástasis (reivindicaciones 2-5), ni a su uso en un método "in vitro" para búsqueda de agentes para tratamiento o prevención del cáncer (reivindicaciones 6-9).

Aunque el documento D01 no incluye el uso de las líneas PC-3/S-luc y PC-3/M-luc en un método in vitro para búsqueda de nuevos productos, estos métodos son tan ampliamente conocidos en el estado de la técnica que se considera obvio para un experto en la materia el desarrollo de un sistema de screening in vitro empleando estas líneas.

Por otra parte, la diferente expresión génica de marcadores de invasividad y metástasis se encuentra recogida en el documento D02, que divulga un modelo de screening empleando líneas celulares de cáncer de próstata, derivadas de PC-3, con alto y bajo potencial metastático.

A la vista de los documentos D01 y D02, se considera que sería obvio para un experto en la materia realizar un estudio de la diferente expresión génica de marcadores de invasividad y metástasis empleando las líneas PC-3/S-luc y PC-3/M-luc.

En consecuencia, la invención tal y como se recoge en las reivindicaciones 2-9 carece de actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986).

El documento D03, se refiere al estado de la técnica y no se considera relevante en relación con el objeto de la invención.