



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① Número de publicación: **2 242 469**

② Número de solicitud: 200202634

⑤ Int. Cl.

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **15.11.2002**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **01.11.2005**

Fecha de la concesión: **14.06.2006**

⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **16.07.2006**

⑥ Fecha de publicación del folleto de la patente:
16.07.2006

⑦ Número de la solicitud inicial: **200100151**

⑧ Titular/es: **Universidad de Salamanca (O.T.R.I.)
Patio de Escuelas, 1
37008 Salamanca, ES
Consejo Superior de Investigaciones Científicas**

⑨ Inventor/es: **Sánchez García, Isidro;
Orfao de Matos, Alberto y
Pérez Losada, Jesús**

⑩ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑪ Título: **Composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer.**

⑫ Resumen:

Composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer. La composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que reconoce a la proteína SLUG, o a un fragmento de la misma, o de un compuesto que interfiere con la función de *Slug* a nivel del ADN, o a nivel del ARN o a nivel de la proteína (SLUG), opcionalmente junto con los excipientes farmacéuticamente aceptables.

ES 2 242 469 B1

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

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer.

5 Campo de la invención

La invención se refiere al empleo del gen *Slug* para detectar la presencia de células cancerosas en una muestra biológica basado en la expresión aberrante de dicho gen *Slug*, o de sus productos de transcripción o expresión. La invención también se refiere al empleo del gen *Slug*, o de sus productos de transcripción o expresión (ARN o proteína), en el tratamiento del cáncer.

Antecedentes de la invención

Los recientes avances en el tratamiento del cáncer han puesto de manifiesto que para planificar un tratamiento adecuado del cáncer y determinar un pronóstico preciso es necesario disponer de métodos sensibles para detectar la existencia de cáncer, el tipo de cáncer y el estadio del mismo con el fin de conocer su localización concreta y su posible extensión a otros tejidos. Un diagnóstico preciso del cáncer puede contribuir a reducir el número de fallecimientos por esta causa y a mejorar la calidad de vida de los pacientes ya que permite seleccionar el tratamiento más adecuado (quimioterapia, resección quirúrgica, etc.) y reducir las incomodidades al paciente al definir el punto final del tratamiento terapéutico.

Los marcadores de pronóstico proporcionan información importante para el tratamiento y desarrollo del cáncer en los pacientes. De hecho, para la aplicación de terapia sistémica adyuvante en el tratamiento de algunos tipos de cánceres primarios, la identificación de los pacientes de alto y bajo riesgo constituye uno de los hitos principales. Se conocen diversos marcadores de pronóstico, tanto clásicos, por ejemplo, tamaño del tumor, estado del nódulo linfático, histopatología, estado del receptor de esteroides, como de segunda generación, por ejemplo, velocidad de proliferación, ploidía del ADN, oncogenes, receptores de los factores de crecimiento y algunas glicoproteínas, que resultan muy útiles para tomar decisiones terapéuticas (McGuire, W.L., Pronostic Factors for Recurrence and Survival, en "Educational Booklet American Society of Clinical Oncology", 25th Annual Meeting, 89-92 (1989); Contesso *et al.*, Eur. J. Clin. Oncol., 25:403-409 (1989)). Aunque ninguno de los marcadores de pronóstico conocidos satisface completamente el objetivo de distinguir entre pacientes de alto y bajo riesgo, la combinación de distintos marcadores puede mejorar la predicción del pronóstico de un paciente, por lo que continúa la búsqueda de nuevos marcadores de pronóstico que puedan añadirse a los existentes actualmente para colaborar en el pronóstico del cáncer, de su progresión y de la enfermedad residual tras tratamiento.

Por otra parte, la mayoría de los métodos usados para la detección de células cancerosas tienen una sensibilidad muy limitada, aunque los métodos moleculares basados en el análisis de ácidos nucleicos han mejorado dicha sensibilidad (Burchill S.A. & Selby P.J., J. Pathol. 190:6-14 (2000)). No obstante, ninguna de estas estrategias permite distinguir una célula tumoral invasiva de una célula tumoral no invasiva.

El gen *Slug* es un gen presente en los vertebrados que codifica un factor de transcripción del tipo "dedos de zinc" (SLUG) implicado en las transiciones epiteliales-mesenquimales (Nieto *et al.*, Science 264:835-849 (1994)).

Compendio de la invención

La invención se enfrenta, en general, con el problema de encontrar un marcador para la detección de células cancerosas, tales como las células tumorales mesenquimales.

La solución proporcionada por esta invención se basa en que los inventores han descubierto, sorprendentemente, que la expresión del gen *Slug* está relacionada con la presencia de células cancerosas, tales como las células tumorales mesenquimales, ya que han podido observar que dichas células malignas expresan niveles significativamente elevados del gen *Slug* y/o de sus productos de transcripción o expresión cuando se comparan con células normales. Diversos ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto que el producto del gen SLUG se expresa en células de muestras de tejidos que presentan células tumorales mesenquimales pero no se expresa, o lo hace a niveles prácticamente inapreciables, en muestras de tejidos normales. En una realización particular, los inventores han observado que el gen *Slug* regula la capacidad diseminativa de las células leucémicas con BCR-ABL, lo que indica que dicho gen *Slug* juega un papel en la invasión tumoral.

Entre las posibles aplicaciones derivadas del descubrimiento arriba mencionado se incluyen la posibilidad de utilizar el gen *Slug*, o sus productos de transcripción o expresión, para detectar la invasividad tumoral y/o como diana terapéutica en el tratamiento del cáncer.

Por tanto, un objeto de esta invención lo constituye un método para detectar la presencia de células cancerosas en una muestra de ensayo basado en la evaluación de la expresión del gen *Slug* o de sus productos de transcripción o expresión (ARN o proteína).

Un objeto adicional de esta invención lo constituye el empleo del gen *Slug* o de sus productos de transcripción o expresión, como diana terapéutica para el tratamiento del cáncer.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra la regulación positiva del gen *Slug* por BCR-ABL. La Figura 1A muestra el resultado del análisis de transferencia de Northern de ARN total aislado a partir de células Ba/F3 (banda 1), Ba/F3+p190 (banda 2) y Ba/F3+p210 (banda 3). Se realizaron experimentos de control en células Ba/F3 transfectadas con un vector vacío. La membrana de nylon se hibridó con un fragmento de ADNc de SLUG y después se purificó y rehibridó con una sonda de β -actina. La Figura 1B muestra el resultado del análisis de transferencia de Northern del ARN total aislado a partir de células Ba/F3+Combip190 desarrolladas en ausencia (banda 1) o presencia de tetraciclina (banda 2), Ba/F3+p190 (banda 2) y células Ba/F3 de control (banda 3). La mancha de transferencia se hibridó con fragmentos de ADNc de *Slug*, *Bcl-2* y *myc*, y después se purificó y rehibridó con una sonda de β -actina.

La Figura 2 muestra la expresión de ARNm de SLUG en tejidos de ratón normal. La Figura 2A muestra el resultado del análisis de transferencia de Northern de ARN total aislado a partir de diversos tejidos de ratón [pulmón, SP (sangre periférica), corazón, testículo, cerebro, intestino, riñón, músculo, hígado, bazo, timo y MO (médula ósea)], hibridado con una sonda de ADNc de *Slug* y después purificado y rehibridado con una sonda de β -actina. Se indica la movilidad de los ARN 28S y 18S. (SP, sangre periférica; MO, médula ósea). La Figura 2B ilustra la expresión del ARNm de SLUG en ratones transgénicos BCR-ABL¹⁹⁰ y BCR-ABL²¹⁰ y recoge los resultados del análisis de transferencia de Northern del ARN total aislado a partir de sangre periférica de ratones de control (banda 1), y de ratones transgénicos BCR-ABL¹⁹⁰ (bandas 2 a 4) y BCR-ABL²¹⁰ (bandas 5 a 6), hibridado con una sonda de ADNc y después purificado y rehibridado con una sonda de β -actina. Se indica la movilidad de los ARN 28S y 18S.

La Figura 3 ilustra que el SLUG endógeno está presente en líneas de células invasivas humanas. Cada ARN se transcribió mediante retrotranscripción (RT) y los productos de PCR se transfirieron a una membrana de nylon y se analizaron por hibridación con sondas oligonucleotídicas internas marcadas terminalmente específicas para cada gen. Se evaluaron los ARN para la línea de células hematopoyéticas no leucémicas 707 (banda 1), para la línea de células leucémicas mieloides U937 (banda 2), para las líneas leucémicas de células T ALL-SIL (banda 3) y KOPTI-KI (banda 4), para la línea de células leucémicas pre-B 697 (banda 5), para muestras de pacientes con t(9;22) (bandas 6 a 8) y para las líneas de células leucémicas humanas positivas para t(9;22) K562 (banda 9), TOM-1 (banda 190) y Nalm-1 (banda 11).

La Figura 4 ilustra el efecto del gen *Slug* sobre la supervivencia de células Ba/F3 en ausencia de factor de crecimiento. La Figura 4A muestra el resultado del análisis de transferencia de Northern de ARN total aislado a partir de células Ba/F3 transfectadas con ADNc de SLUG de ratón (banda 1) y células Ba/F3 de control (banda 2). La membrana de nylon se hibridó con un fragmento de ADNc de SLUG y después se purificó y rehibridó con una sonda de β -actina. La Figura 4B es una gráfica que ilustra la supervivencia de células Ba/F3 que expresan la proteína SLUG en ausencia de IL-3. Las células que crecían exponencialmente en medio suplementado con IL-3 se ajustaron a 5×10^5 células/ml en el día 0 y se cultivaron después de la eliminación de IL-3. Se muestra el número de células viables para las células Ba/F3 transfectadas con BCR-ABL y con SLUG en ausencia de IL-3. La Figura 4C ilustra que la muerte celular va acompañada por aparición de la escalera de ADN por rotura inter-nucleosomal después de la privación de IL-3. Se aisló ADN de bajo peso molecular 24 horas después de la privación de IL-3 a partir de células Ba/F3+*Slug* (banda 1), Ba/F3+p210 (banda 2), Ba/F3+p190 (banda 3) y a partir de células Ba/F3 de control (banda 4). El ADN se marcó terminalmente, se resolvió por electroforesis en un gel de agarosa al 2% y se visualizó por autorradiografía.

La Figura 5 ilustra la represión del ARNm de SLUG en células Ba/F3 que expresan BCR-ABL con un ADNc anti-sentido frente a SLUG. La Figura 5A muestra los resultados del aislamiento del ARN total a partir de células Ba/F3+p210 (banda 1) y Ba/F3+p190 (banda 2) transfectadas con un vector que expresaba el gen *Slugh* (gen *Slug* de ratón) sin sentido. El ARN celular se hibridó con una sonda de ADNc de *Slugh* de ratón. El filtro se desnudó y se rehibridó con ABL y β -actina. La Figura 5B muestra los resultados del análisis de hibridación de filtro de Northern de células Ba/F3 que expresaban BCR-ABL transfectadas (banda 1, Ba/F3+p210+Aslug; banda 3, Ba/F3+p190+Aslug) y no transfectadas (bandas 2, Ba/F3+p210; banda 4, Ba/F3+p190). Como sonda, se usó un oligonucleótido de *Slugh* sin sentido que comprende las primeras 49 bases de la secuencia codificante del ADNc de *Slugh* de ratón. La Figura 5C ilustra que la diferenciación linfocítica y mielocítica específica de células B inducida en células Ba/F3 por oncogenes BCR-ABL¹⁹⁰ y BCR-ABL²¹⁰, respectivamente, no se ve influenciada por la supresión de *Slug*. En dicha Figura 5C se muestran los perfiles de expresión de células Ba/F3+p190 (panel izquierdo superior) Ba/F3+p190+*Slug* sin sentido (panel derecho superior), Ba/F3+p210 (panel izquierdo inferior) y Ba/F3+p210+*Slug* sin sentido (panel derecho inferior). Las células se tiñeron con anticuerpos monoclonales B220 (marcador específico de células B) y Gr-1 (marcador específico de mieloides) y se analizaron por citometría de flujo.

La Figura 6 recoge los requerimientos de *Slug* en la tumorigenicidad de células Ba/F3 que expresan BCR-ABL. Las células Ba/F3 iniciales que expresaban oncogenes BCR-ABL crecieron como tumores en ratones desnudos (REF). Análogamente, se descubrió que la formación de tumores se observaba ya a los cinco días después de la inyección de las líneas de células que expresaban BCR-ABL. A diferencia de estos controles, las células Ba/F3 que expresaban BCR-ABL y *Slug* sin sentido son mucho menos tumorigénicas. Los tumores se escindieron para realizar un análisis macroscópico en el día 20 después de la inyección celular. En promedio, el peso de los tumores encontrados en los ratones a los que se inyectaron células Ba/F3 que expresaban BCR-ABL era dos veces mayor que el de los tumores inducidos por células que expresaban BCR-ABL y la construcción *Slug* sin sentido.

La Figura 7 ilustra el efecto de *Slug* en el desarrollo de tumores por células BCR-ABL. La Figura 7A muestra el resultado de un análisis macroscópico de tumores inducidos por células Ba/F3+p190, mientras que las Figuras 7B y 7C muestran el aspecto histológico de los tumores inducidos en ratones desnudos. La sección teñida con hematoxilina-eosina del tumor de ratón desarrollado después de la inyección de células Ba/F3+p190 (Figura 7B) en comparación con la sección del tumor del ratón desarrollado después de la inyección de células Ba/F3+p190 en las que se había suprimido específicamente la expresión de *Slug* (Figura 7C). Las células Ba/F3+p190 que expresan *Slugh* desobedecen el orden social de límites de órganos y migran como células individuales produciendo metástasis en diferentes regiones. Se observaron resultados similares en secciones múltiples de los dos tumores. Las imágenes de las Figuras 7B y 7C están ampliadas a 40 aumentos.

La Figura 8 es una representación que ilustra el modelo del papel de *Slug* en el desarrollo del cáncer. En la Figura 8A se muestra que en el sistema hematopoyético, las células progenitoras normales, no comprometidas, con capacidad de auto-renovación se diferencian en células maduras. Durante esta transición, la expresión de *Slug* está regulada negativamente. Estas células progenitoras normales no comprometidas son responsables de señales del medio que regulan el número de células maduras producidas y limitan la auto renovación de las células inmaduras. Cuando en situaciones fisiológicas estas células progenitoras normales no comprometidas migran, el gen *Slug* podría promover la supervivencia permitiéndolas realizar su función. Si esto no se consigue en un periodo de tiempo específico, sufrirían apoptosis, ya que se han visto privadas de las señales externas necesarias. En la Figura 8B se ilustra la situación en caso de leucemogénesis; en este caso, la célula diana en la que existe la anomalía cromosómica es un progenitor no comprometido (Cobaleda *et al.*, Blood 95:1007-1113 (2000); Sánchez-García *et al.*, Current Genomics, 1:71-80 (2000)). Como resultado de esto, se bloquea la diferenciación de la célula diana, pero la inhibición de la diferenciación no es suficiente para la transformación, porque la supervivencia y la proliferación de las células diana se restringiría a un microentorno particular. Así pues, tienen que existir otros cambios genéticos que permitan el crecimiento de las células fuera de su entorno normal, además de mutaciones que bloqueen la diferenciación. Los oncogenes de fusión creados como resultado de anomalías cromosómicas asociadas con tumores mesenquimales (tanto leucemias como tumores sólidos) bloquean la diferenciación y tienen la capacidad de activar genes diana tales como *Slug* que promueven la supervivencia (con independencia de las señales externas requeridas) y la migración de las células diana defectuosas en diferentes entornos. Estos datos refuerzan la idea de que la transformación puede producirse como resultado de la creación/activación de un solo oncogen.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere, en general, al empleo del gen *Slug* o de sus productos de transcripción o expresión (ARN o proteína) en la detección y/o tratamiento de células cancerosas. El gen *Slug* codifica un factor de transcripción del tipo “dedos de zinc” (SLUG) implicado en las transiciones epiteliales-mesenquimales. Ahora se ha descubierto que células cancerosas, en particular, células tumorales mesenquimales, expresan niveles significativamente elevados del gen *Slug* y/o de sus productos de transcripción o expresión (ARN o proteína), cuando se comparan con células normales, lo que permite establecer un método para la detección de dichas células malignas basadas en la expresión aberrante del gen *Slug* o de sus productos de transcripción o expresión (ARN o proteína).

1. Detección de células cancerosas

En un primer aspecto, la invención proporciona un método para la detección de células cancerosas en una muestra de ensayo, basado en la evaluación de la expresión aberrante del gen *Slug* o de sus productos de transcripción o expresión (ARN o proteína), en comparación con la expresión de dicho gen o de sus productos de transcripción o expresión (ARN o proteína) en una muestra de control. Este método puede ser aplicado a cualquier vertebrado sospechoso de tener dichas células, en particular, a un mamífero, por ejemplo, un ser humano.

El método proporcionado por esta invención es adecuado para la detección de células cancerosas que expresen dicho gen *Slug* o sus productos de transcripción o expresión (ARN o proteína), tales como células tumorales mesenquimales, por ejemplo, leucemias y sarcomas, y, por tanto, tiene utilidad en el diagnóstico de la enfermedad causada por dichas células, así como en la evaluación de su progresión y en la determinación de enfermedad residual tras tratamiento, aspectos esenciales en el tratamiento de dicha enfermedad.

En el sentido utilizado en esta descripción el término “muestra de ensayo” se refiere a una muestra biológica de un vertebrado sospechoso de tener células tumorales mesenquimales o cancerosas.

El término “muestra de control”, tal como aquí se utiliza incluye (i) muestras biológicas de vertebrados que no tienen células tumorales mesenquimales o cancerosas, y (ii) muestras biológicas de vertebrados que tienen células tumorales mesenquimales o cancerosas con el fin de obtener información relativa al pronóstico de la enfermedad entre vertebrados que contienen dichas células.

Por “expresión aberrante” tal como se utiliza en esta descripción debe entenderse, en general, la expresión alterada de un gen o de sus productos de transcripción o expresión (ARN o proteína) en células procedentes de un tejido tumorigénico respecto a la expresión de dicho gen o de sus productos de transcripción o expresión (ARN o proteína) en células normales del mismo tejido no tumorigénico. La expresión aberrante de un gen incluye la amplificación del gen, la sobreexpresión del gen y la expresión del gen en células que normalmente no lo expresan.

ES 2 242 469 B1

1.A Detección basada en la expresión aberrante del gen *Slug*

La invención proporciona un método para detectar la presencia de células cancerosas en una muestra de ensayo, basado en la expresión aberrante del gen *Slug*, que comprende:

- 1) obtener una muestra biológica de un vertebrado sospechoso de tener células cancerosas, con lo que se obtiene una muestra de ensayo;
- 2) evaluar la expresión del gen *Slug* en las células contenidas en dicha muestra de ensayo; y
- 3) comparar la expresión del gen *Slug* en las células de la muestra de ensayo con la expresión del gen *Slug* en las células de una muestra de control;

en donde la presencia de una expresión aberrante del gen *Slug* en las células de la muestra de ensayo, cuando se compara con la expresión del gen *Slug* en las células de la muestra de control, es indicativa de la presencia de células cancerosas en dicha muestra de ensayo.

En una realización particular, el método para la detección de células cancerosas basado en la expresión aberrante del gen *Slug* proporcionado por esta invención se aplica a un ser humano sospechoso de tener dichas células. La secuencia de ADNc del gen *Slug* humano así como la secuencia de aminoácidos deducida a partir del ADNc han sido descritos por Nieto y col. (Nieto *et al.*, 1994, citado *supra*).

En una realización particular, las células cancerosas a detectar son células tumorales mesenquimales, por ejemplo, leucemias o sarcomas.

La muestra de ensayo se obtiene a partir de una muestra biológica del vertebrado a ensayar. Dicha muestra biológica puede ser obtenida por cualquier método convencional, por ejemplo, mediante biopsia de tejido o extracción de sangre.

La expresión aberrante del gen *Slug* en células tumorales mesenquimales o cancerosas incluye la amplificación del gen *Slug*, la sobreexpresión de dicho gen y la expresión del mismo en células que normalmente no lo expresan. Actualmente se admite que la amplificación del ADN juega un papel crucial en la progresión de los tumores permitiendo que las células cancerosas regulen numerosos genes. Por otra parte, la frecuencia de la amplificación del ADN así como el incremento del número de copias durante la progresión de diversos cánceres, generalmente en pacientes que no responden al tratamiento, sugiere que la sobreexpresión de los genes diana amplificados confiere una ventaja selectiva a las células malignas.

La expresión del gen *Slug* puede ser evaluada por cualquier método convencional apropiado, por ejemplo, determinando el nivel de ARNm correspondiente al gen *Slug* (ARNm de SLUG), o bien determinando el número de copias de gen *Slug* producidas.

En el sentido utilizado en esta descripción, “determinar el nivel de ARNm de SLUG” incluye cualquier método que permite medir o estimar cualitativa o cuantitativamente el nivel de ARNm que se puede traducir en la proteína SLUG en las células de una muestra de ensayo bien directamente o bien relativamente comparándolo con el nivel de ARNm de SLUG en las células de una muestra de control. Asimismo, “determinar el número de copias de gen *Slug* producidas” incluye cualquier método que permite medir o estimar cualitativa o cuantitativamente el número de copias producidas del gen *Slug* en células de una muestra de ensayo bien directamente o bien relativamente comparándolo con el número de copias del gen *Slug* producidas en células de una muestra de control. En una realización particular, el nivel de ARNm de SLUG o el número de copias del gen *Slug* producidas en las células de la muestra de ensayo se mide o estima y se compara con el nivel de ARNm de SLUG o con el número de copias del gen *Slug* producidas en las células de la muestra de control.

En una realización particular, la muestra de control puede ser una muestra biológica de un vertebrado que no tiene células cancerosas, por ejemplo, células tumorales mesenquimales. En este caso, una vez que se conoce el nivel de ARNm de SLUG o el número de copias del gen *Slug* en la muestra de control, la información resultante se puede utilizar repetidamente como patrón a efectos comparativos. Alternativamente, la muestra de control puede ser una muestra biológica de un vertebrado que tiene células cancerosas, por ejemplo, células tumorales mesenquimales, con lo que, en este caso, el nivel de ARNm de SLUG o el número de copias del gen *Slug* proporcionará información relativa al pronóstico de la enfermedad entre vertebrados que contienen dichas células.

La determinación del número de copias del gen *Slug* puede realizarse por cualquier método convencional apropiado, por ejemplo, visualizando fragmentos dobles extracromosómicos [extrachromosomal double minutes (dmin)] o regiones de tinción homogéneamente integradas [integrated homogeneously staining regions (hsrs)] (Gebhart *et al.*, Breast Cancer Res. Treat. 8:125 (1986); Dutrillaux *et al.*, Cancer Genet. Cytogenet. 49:203 (1990)), mediante técnicas de hibridación utilizando sondas apropiadas obtenidas por métodos convencionales a la vista de la secuencia de nucleótidos del gen *Slug*, etc.

Asimismo, el nivel de ARNm de SLUG puede determinarse por cualquier método convencional apropiado, por ejemplo, mediante análisis Northern blot (Harada *et al.*, Cell 63:303-312 (1990)), mapeo con la nucleasa S1 (Fujita *et*

5 *al.*, Cell 49:357-367 (1987)), reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (patentes norteamericanas US 4.683.195, US 4.683.202, US 4.965.188), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) (Makino *et al.*, Technique 2:295-301 (1990)), técnicas de hibridación, microarrays (Wooster R., Trends in Genetics 16:327-329 (2000)), etc. En una realización particular, la expresión del ARNm de *Slug* se ha evaluado mediante un análisis Northern blot y RT-PCR [véase el apartado Materiales y Métodos].

De acuerdo con la invención, la presencia de una expresión aberrante del gen *Slug* en la muestra de ensayo, cuando se compara con la expresión del gen *Slug* en la muestra de control, es indicativa de la presencia de células tumorales mesenquimales o cancerosas en dicha muestra de ensayo.

10 1.B Detección basada en el producto de expresión del gen *Slug*

La invención también proporciona un método para detectar la presencia de células cancerosas en una muestra de ensayo, basado en la expresión del producto de expresión del gen *Slug* (proteína SLUG), que comprende:

- 15 a) obtener una muestra biológica de un vertebrado sospechoso de tener células cancerosas, con lo que se obtiene una muestra de ensayo;
- 20 b) evaluar la expresión de la proteína SLUG en células de dicha muestra de ensayo; y
- c) comparar la expresión de la proteína SLUG en las células de la muestra de ensayo con la expresión de la proteína SLUG en las células de una muestra de control;

25 en donde la presencia de una expresión aberrante de la proteína SLUG en las células de la muestra de ensayo, cuando se compara con la expresión de la proteína SLUG en las células de la muestra de control, es indicativa de la presencia de células cancerosas en dicha muestra de ensayo.

En una realización particular, las células cancerosas a detectar son células tumorales mesenquimales, por ejemplo, leucemias o sarcomas.

30 Al igual que en la alternativa precedente [1.A], la muestra de ensayo se obtiene a partir de una muestra biológica del vertebrado a ensayar, por ejemplo, un ser humano, mediante cualquier método convencional, por ejemplo, mediante biopsia de tejido o extracción de sangre.

35 La expresión de la proteína SLUG puede ser evaluada por cualquier método convencional apropiado, por ejemplo, mediante técnicas basadas en el empleo de anticuerpos, técnicas basadas en el diagnóstico por imagen *in vivo*, citometría de flujo, proteómica, etc.

40 A modo de ejemplo, la expresión de la proteína SLUG en tejidos puede ser estudiada empleando los métodos inmuno-histológicos clásicos, en los que el reconocimiento específico es proporcionado por un anticuerpo anti-SLUG mientras que el sistema de detección puede utilizar unos anticuerpos secundarios marcados con marcadores apropiados. La expresión de la proteína SLUG en tejidos también puede estudiarse mediante un ensayo Western blot o dot/slot (Jalkanen *et al.*, J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985); Jalkanen *et al.*, J. Cell. Biol. 105:3087-3096 (1987)), mediante inmunoensayos, tales como ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima) o RIA (radioinmunoensayo).

45 Adicionalmente, la expresión de la proteína SLUG puede ser detectada *in vivo* mediante técnicas de diagnóstico por imagen mediante el empleo de anticuerpos anti-SLUG unidos a marcadores apropiados, por ejemplo, marcadores detectables por rayos X, resonancia magnética nuclear (RMN), etc. Una revisión del diagnóstico por imagen de tumores puede encontrarse en Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer (S.W. Burchiel & B.A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982)).

50 Los anticuerpos anti-SLUG que pueden utilizarse en el método proporcionado por esta invención pueden ser anticuerpos frente a la proteína SLUG intacta o frente a un fragmento antigénico de la misma, opcionalmente conjugado a un portador. Los anticuerpos pueden ser policlonales o, preferentemente, monoclonales, los cuales pueden obtenerse mediante la tecnología del hibridoma (Kohler *et al.*, Nature 256:495 (1975)). Alternativamente se pueden utilizar fragmentos de anticuerpos, por ejemplo Fab, F(ab')₂, etc.

60 Otros métodos para determinar la expresión de la proteína SLUG en tejidos incluyen la citometría de flujo (Ward M.S., Pathology 31:382-392 (1999), proteómica (Pandey M. & Mann M., Nature 405:837-846 (2000); Chambers *et al.*, J. Pathol. 192:280-288 (2000)), etc.

65 De acuerdo con la invención, la expresión aberrante de la proteína SLUG en células de la muestra de ensayo, cuando se compara con la expresión de la proteína SLUG en células de la muestra de control, es indicativa de la presencia de células cancerosas en dicha muestra de ensayo.

2. Tratamiento del cáncer

En un segundo aspecto, la invención se refiere al empleo del gen *Slug* o de sus productos de transcripción o expresión en el tratamiento del cáncer, en particular, en el tratamiento de patologías relacionadas con la presencia de células cancerosas, tales como células tumorales mesenquimales, por ejemplo, leucemias y sarcomas.

En el sentido utilizado en esta descripción, “el empleo del gen *Slug* o de sus productos de transcripción o expresión en el tratamiento del cáncer” incluye cualquier método que permite interferir cualitativa o cuantitativamente con el gen *Slug*, el nivel de ARNm que se puede traducir en la proteína SLUG o con la propia proteína SLUG.

En este sentido, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que reconoce a la proteína SLUG, o a un fragmento de la misma, o de un compuesto que interfiere con la función de *Slug* a nivel del ADN, o a nivel del ARN o a nivel de la proteína (SLUG), opcionalmente junto con los excipientes farmacéuticamente aceptables.

Los anticuerpos anti-SLUG que pueden utilizarse en la elaboración de la composición farmacéutica proporcionado por esta invención pueden ser anticuerpos frente a la proteína SLUG intacta o frente a un fragmento antigénico de la misma, opcionalmente conjugado a un portador. Los anticuerpos pueden ser policlonales o, preferentemente, monoclonales, los cuales pueden obtenerse mediante la tecnología del hibridoma (Kohler *et al.*, Nature 256:495 (1975)). Alternativamente se pueden utilizar fragmentos de anticuerpos, por ejemplo Fab, F(ab')₂, etc., los cuales pueden obtenerse por métodos convencionales.

El compuesto que interfiere con la función de *Slug* tanto a nivel de ADN como de ARN o proteína (SLUG) puede ser cualquier compuesto, o mezcla de compuestos, que impida la expresión del gen *Slug*, o que inactive el ARNm de SLUG que se genera, por ejemplo, mediante oligonucleótidos antisentido o ribozimas, o que inactive la proteína SLUG, por ejemplo, mediante el empleo de anticuerpos o que compita el efecto de dicha proteína con dominantes negativos (Choo, Y., *et al.* J. Mol. Biol. 273:525-532, (1997); Cobaleda, C., & Sánchez-García, I., Blood 95:731-737 (2000)).

Los excipientes que pueden estar presentes en la composición farmacéutica de la invención dependerán, entre otras cosas, de la forma de administración de dicha composición farmacéutica. Una revisión de las distintas formas de administración de principios activos, de los excipientes a utilizar y de sus procedimientos de fabricación puede encontrarse en el Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993.

La invención también se refiere a un método para el screening *in vitro* de agentes antitumorales basado en la regulación de la expresión del gen *Slug* que comprende (i) desarrollar un sistema celular que, en determinadas condiciones, expresa el gen *Slug*, (ii) poner en contacto dicho sistema celular con el compuesto a ensayar, y (iii) evaluar la expresión del gen *Slug*, de manera que si no se expresa el gen *Slug* el compuesto ensayado es un agente antitumoral potencial.

La interferencia con la función del gen *Slug* se puede hacer a nivel del ADN impidiendo su expresión, inactivando el ARNm que se genera mediante oligonucleótidos antisentido o ribozimas, inactivando la proteína mediante el empleo de anticuerpos o compitiendo el efecto de dicha proteína con dominantes negativos (Choo, Y., *et al.* J. Mol. Biol. 273:525-532, (1997); Cobaleda, C. & Sánchez-García, I., Blood 95:731-737 (2000)).

A continuación se ilustrará la invención mediante un ensayo realizado por los inventores que pone de manifiesto que el gen *Slug* regula la capacidad diseminativa de las células leucémicas con *BCR-ABL*.

1. Materiales y métodos

Cultivos celulares

Las líneas celulares usadas incluyen células Ba/F3 (Palacios y Steinmetz, Cell 41:727 (1985)) y células Ba/F3 que expresan las proteínas humanas BCR-ABLP¹⁹⁰ (Ba/F3 + p190) y BCR-ABLP²¹⁰ (Ba/F3 + p210) (Sánchez-García y Grütz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:5287-5291 (1995)). Las células se mantuvieron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con un 10% de suero de ternero fetal (FCS). Cuando fue necesario, se añadió un 10% de medio acondicionado con WEHI-3B como fuente de IL-3 (interleucina-3).

Análisis de la diferencia representacional (RDA)

El RDA se realizó tal como describen Hubank y Schatz (Hubank y Schatz, Nucleic Acid Res. 22:5640-5648 (1994)). En resumen, se aislaron ARNm de células Ba/F3, Ba/F3 + p190 y Ba/F3 + p210. Se extrajo una muestra de 10 mg de ARNm de cada población celular para el análisis RDA. Se sintetizaron ADNc a partir de los ARNm y se digirieron con Dpn II. A los ADNc digeridos con Dpn II se añadieron adaptadores compuestos de dos oligonucleótidos: (R-24) [SEC. ID. N°: 1] y (R-12) [SEC. ID. N°: 2]. La mezcla resultante se amplificó por PCR con oligonucleótidos R-24 [SEC. ID. N°: 1] y los adaptadores se escindieron con Dpn II. Después, se unió un segundo par de adaptadores: (J-24) [SEC. ID. N°: 3] y (J-12) [SEC. ID. N°: 4] a los fragmentos amplificados procedentes de células Ba/F3 + p190 y Ba/F3 + p210 (tester) y se hibridaron con los fragmentos de ADNc amplificados con R-24 [SEC. ID. N°: 1] procedentes de

ES 2 242 469 B1

células Ba/F3 (inductor) con una relación de 1:100 durante 20 horas. La mezcla de hibridación se usó como molde para la amplificación basada en PCR.

5 Se realizó una segunda vuelta de sustracción retirando los adaptadores J [SEC. ID. N°: 3 y SEC. ID. N°: 4] de una alícuota del producto de la primera vuelta de PCR, uniendo un tercer par de adaptadores oligonucleotídicos: (N-24) [SEC. ID. N°: 5] y (N-12) [SEC. ID. N°: 6] e hibridando con amplicones inductores a una relación de 1:1000. Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 2,0% y las bandas individuales se subclonaron y examinaron por análisis de transferencia de Northern con respecto a la expresión diferencial.

10 *Retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)*

Para analizar la expresión de SLUG en líneas de células humanas y en muestras de sangre periférica de pacientes positivos con respecto a Ph-1, se realizó una RT de acuerdo con el protocolo del fabricante en una reacción de 20 μ l que contenía 50 ng de hexámeros aleatorios, 3 μ g de ARN total y 200 unidades de transcriptasa inversa Superscript II RNasa H⁻ (GIBCO/BRL). Los parámetros de los ciclos térmicos para las reacciones de PCR y las secuencias de los cebadores específicos fueron las siguientes: SLUG, 30 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 56°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, cebador con el sentido correcto [SEC. ID. N°: 7] y cebador sin sentido [SEC. ID. N°: 8]; c-ABL, 30 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 56°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, cebador con el sentido correcto [SEC. ID. N°: 9] y cebador sin sentido [SEC. ID. N°: 10]. La amplificación del ARNm de c-ABL sirvió como control para evaluar la calidad de cada muestra de ARN. Las secuencias de las sondas internas fueron las siguientes:

SLUG: SEC. ID. N°: 11, y

c-ABL: SEC. ID. N°: 12.

25 *Clonación de ADNc de Slug de longitud completa por RT-PCR*

El ADNc de *Slug* de ratón se clonó por RT-PCR usando el cebador de avance [SEC. ID. N°: 13] y el cebador inverso [SEC. ID. N°: 14] (número de acceso del GenBank U79550).

30 *Análisis del ARN*

El ARN citoplásmico total (10 μ g) se glioxiló y fraccionó en geles con un 1,4% de agarosa en tampón Na₂HPO₄ 10 mM (pH 7,0). Después de la electroforesis, el gel se transfirió a membranas de nylon Hybond-N (Amersham), que se trataron con luz UV y se hibridaron con sondas marcadas con ³²P. La carga se controló volviendo a tratar los filtros con una sonda de ADNc de β -actina. El oligonucleótido *Slugh* sin sentido usado como sonda comprende las primeras 34 bases de la secuencia codificante del ADNc de *Slugh* de ratón.

40 *Construcción de plásmidos para estudios in vivo*

Se realizó la amplificación por PCR del ADNc de *Slug* de ratón para facilitar la clonación, añadiendo enzimas de restricción, usando cebadores que hibridaban con los extremos 5' y 3' del ADNc y amplificando una región que incluía la región codificante entera del gen. El ADNc de *Slugh* de ratón se clonó tanto en la orientación con sentido como en la orientación sin sentido en el vector pEF-BOS (denominado BOS-slug y BOS-antislug, respectivamente), que contenía secuencias del promotor EF1- α seguidas de una región de poliengarce unida a la señal de poli(A) adenilación del ADNc de G-CSF humano, como se ha descrito (Mizushima y Nagata, Nucleic Acid Res. 18:4322 (1990)). El vector Combi-p190 se obtuvo reemplazando el ADNc de la luciferasa del plásmido Combi-tTA (Schultze *et al.*, Nature Biotechnology 14:499-503 (1996)) por el ADNc de BCR-ABL^{p190}. La autenticidad de las construcciones se confirmó por secuenciación del ADN.

50 *Transfección celular*

Se transfectaron células Ba/F3 por electroporación (960 μ F, 220 V) con 20 μ g de Combi-p190, respectivamente, junto con 1 μ g de vector de expresión MC1-neo. En las células (Ba/F3 + Combi-p190) se analizó por transferencia de Northern la expresión de *BCR-ABL* en presencia y en ausencia de tetraciclina (20 ng/ml). Estas células fueron resistentes a la ausencia de IL-3 cuando se desarrollaron en presencia de tetraciclina.

55 *Expresión del gen Slug murino en células que expresan Ba/F3 y BCR-ABL y ensayo de supervivencia celular*

60 Se transfectaron células Ba/F3, Ba/F3+p190 y Ba/f3+p210 por electroporación (960 μ F, 220 V) con 20 μ g de BOS-Slug y BOS-antislug, respectivamente, junto con 1 μ g de vector de expresión puro MCI. En las líneas celulares se analizó la expresión de *Slug* por transferencia de Northern. Las células se seleccionaron con respecto a la resistencia a la ausencia de IL-3 y la viabilidad celular se determinó por exclusión con azul de trypan.

65 *Análisis del ADN*

Se aisló ADN de bajo peso molecular como se indica a continuación. Las células se recogieron en 1,5 ml de medio de cultivo, se microcentrifugaron durante 1 minuto a 1.500 rpm (400 x g) y los sedimentos se suspendieron en 300

ES 2 242 469 B1

5 μ l de tampón de proteinasa K. Después de un periodo de incubación de una noche a 55°C, el ADN se precipitó con etanol, se suspendió en 200 μ l de tampón TE que contenía 50 μ l/ml de RNasa A y se incubó a 37°C durante 2 h. El ADN se extrajo con fenol y cloroformo y se precipitó con etanol. Se marcaron terminalmente alícuotas de ADN (2 μ g) con α 32-dCTP y se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2%. Después de la electroforesis, el gel se transfirió a Hybond-N (Amersham) y se autorradiografió durante 2 h a -70°C.

Análisis del fenotipo

10 Para la tinción de citometría se usaron los siguientes anticuerpos monoclonales anti-ratón de Pharmingen: el marcador linfocitario CD45R/B220 y el marcador mielocítico Gr-1. Se incubaron suspensiones de una sola célula de las muestras de líneas celulares diferentes obtenidas por técnicas rutinarias con CD32/CD16 anti-ratón (Pharmingen) purificado para bloquear la unión mediante receptores Fc y con una dilución adecuada de los diferentes anticuerpos a temperatura ambiente o a 4°C, respectivamente. Las muestras se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en PBS. Las células muertas de las muestras se excluyeron por tinción con yoduro de propidio. Las muestras y los datos se analizaron por FACScan usando el software CellQuest (Becton Dickinson).

Ensayo de tumorigenicidad

20 Para ensayar la tumorigenicidad de las diversas líneas celulares, se inyectaron por vía subcutánea, en los dos flancos de ratones macho (desnudos) atímicos de 2 a 4 semanas de edad, 10⁶ células resuspendidas en 200 μ l de solución salina tamponada con fosfato. En los animales se examinó la formación de tumores durante dos meses.

Análisis histológico

25 Las muestras de tumor se fijaron en formalina al 10% durante una noche, después se procesaron, se incluyeron en bloques de parafina, se tiñeron secciones de 6 μ m con hematoxilina y eosina, se examinaron histológicamente y se fotografiaron. Todas las secciones se tomaron a partir de porciones homogéneas y viables de los tumores sometidos a resección.

30 II. Resultados

BCR-ABL regula positivamente la expresión de Slug en las células hematopoyéticas

35 La caracterización molecular de ciertas anomalías cromosómicas asociadas con el cáncer humano ha revelado que la consecuencia principal son proteínas de fusión específicas de tumores. Una idea común que surge es que la creación de estas proteínas altera el desarrollo normal de las células diana específicas de tumores bloqueando la apoptosis (Cobaleda *et al.*, BioEssays 20:922 (1998), pero los aspectos más amenazadores para la vida del proceso oncogénico son la invasión y la metástasis. Aunque se ha apreciado correctamente el significado clínico de tal expresión del fenotipo maligno, los avances en la comprensión de los mecanismos moleculares implicados en la invasión han retrasado otros trabajos de desarrollo en el campo del cáncer. Así pues, una primera etapa crítica para comprender la transformación maligna mediada por los productos de las anomalías cromosómicas asociadas con la leucemia es la identificación de los genes respondedores corriente abajo a los que se dirigen estas proteínas. Se están utilizando como modelo de estudio los oncogenes *BCR-ABL* y se ha sacado partido de un sistema celular que usa una línea de células Ba/F3 precursoras hematopoyéticas murinas transducida con vectores que codificaban la proteína de fusión BCR-ABL (Sánchez-García y Grütz, 1995 citado *supra*). La expresión de BCR-ABL en Ba/F3 induce la transformación celular, confiere un crecimiento independiente de citocinas y bloquea la apoptosis (Daley y Baltimore, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:9312 (1988); Sánchez-García y Grütz, 1995 citado *supra*). Para identificar dianas potenciales de la acción de BCR-ABL, se ha elegido el proceso sustractivo del análisis de la diferencia representacional (RDA). Usando moléculas de ARNm procedentes de células Ba/F3, de células Ba/F3 que expresaban BCR-ABLp190 (Ba/F3 + p190) y de células Ba/F3 que expresaban BCR-ABLp210 (Ba/F3 + p210), se prepararon ADNc y se sometieron a tres vueltas de hibridación secuencial y de amplificación por PCR de acuerdo con el protocolo de RDA de Hubank y Schatz (Hubank y Schatz, 1994 citado *supra*). Varios fragmentos de ADNc amplificados diferencialmente se subclonaron individualmente y se ensayaron con respecto a la expresión génica diferencial por transferencia de Northern de ARN de Ba/F3. Se identificó un fragmento de ADNc que representaba un gen regulado de forma diferencial y se denominó I-1. La comparación de las secuencias demostró que el fragmento I-1 de 527 nucleótidos correspondía a una parte de la región codificante y la región 3' no traducida de ADNc de SLUG murino (Nieto *et al.*, 1994, citado *supra*), identificada con la utilidad de búsqueda BLAST (National Center for Biotechnology Information).

60 La capacidad de los oncogenes *BCR-ABL* de estimular la producción de ARNm de SLUG se ensayó por hibridación con filtros de Northern de ARNm de células Ba/F3, Ba/F3+p190 y Ba/F3+p210 (Figura 1A). El análisis de transferencia de Northern mostró la expresión de SLUG en células Ba/F3+p190 y Ba/F3+p210. Este ensayo demuestra que las células positivas con respecto a BCR-ABL expresan el ARNm de SLUG, pero que las células de control no lo hacen. Por lo tanto, estos datos indican una clara relación entre la activación del gen *Slug* y la expresión de BCR-ABL en este sistema.

La presencia de BCR-ABL se requiere para la expresión aberrante de SLUG

Los datos descritos anteriormente demuestran la expresión aberrante de SLUG en células que contienen el gen de fusión BCR-ABL. Para determinar si se requiere BCR-ABL para la transcripción del gen *Slug*, se crearon células Ba/F3 en las que la expresión del gen *BCR-ABL* podía regularse exógenamente. Se aprovechó el sistema Combi-tTa, que tiene el transactivador y el promotor mínimo del operador tet que dirige a la unidad de expresión génica en un solo plásmido (Schultze *et al.*, 1996 citado *supra*). La proteína represora tet fusionada al dominio transactivador de VP16 viral se unía, en ausencia de tetraciclina, a un promotor mínimo del operador tet obtenido por ingeniería genética y activaba la transcripción de BCR-ABL (Combi-p190). En presencia de la molécula efectora, la unión se anulaba y el promotor se silenciaba (Figura 1B). En este sentido, aunque se detectó BCR-ABLP¹⁹⁰ en Ba/F3+Combi190 sin tetraciclina, no se encontró ARNm en presencia de tetraciclina (20 ng/ml). Estos datos indican que la inducción de BCR-ABL puede reprimirse completamente por la tetraciclina.

La especificidad de la activación del gen *Slug* se analizó por análisis de hibridación de filtros de Northern en células Ba/F3+Combi190. Después de dos días en cultivo, en presencia o en ausencia de tetraciclina, se determinó la expresión de SLUG. Como se muestra en la Figura 1B, la expresión de SLUG se redujo rápidamente coincidiendo con la reducción de la expresión del ARNm de BCR-ABLP190. Además, en estas células se analizó si la expresión de dos efectores corriente abajo bien conocidos de los oncogenes BCR-ABL, Myc (Sawyers *et al.*, Cell 70:901-910 (1992)) y Bcl-2 (Sánchez-García y Grütz, 1995 citado *supra*; Sánchez-García y Martín-Zanca, J. Mol. Biol. 267:225 (1997)) era dependiente de la presencia de BCR-ABL. Como se muestra en la Fig 1B, aunque se detectaba la expresión tanto de Bcl2 como de Myc en Ba/F3+Combi190 sin tetraciclina, no se pudo encontrar ningún ARNm en presencia de tetraciclina (Figura 1B). Esta observación confirma que los cambios observados en la expresión génica se estimulaban por BCR-ABL.

La expresión de Slug está presente en líneas celulares y en células de sangre periférica de pacientes con leucemia positiva con respecto al cromosoma Philadelphia

El descubrimiento de que BCR-ABL regula positivamente la expresión de *Slug* en células Ba/F3, motivó que los inventores ensayaran si los niveles de expresión de *Slug* también se regulan positivamente como consecuencia de la expresión de BCR-ABL en células madre primarias, la diana natural de la proteína de fusión BCR-ABL oncogénica (Cobaleda *et al.*, 2000; Sánchez-García, 2000, citados *supra*). Los análisis de transferencia de Northern de un espectro de tejidos de ratón indicaron que, con raras excepciones, SLUG se expresa ampliamente en tejidos de ratón (Figura 2A). Sin embargo, SLUG no se expresaba por los leucocitos de sangre periférica (Figura 2A). Sabiendo que SLUG no se expresaba en la sangre periférica de ratones normales, se ensayaron los efectos posibles de la expresión de BCR-ABL sobre los niveles de ARNm de SLUG en la sangre periférica de los ratones BCR-ABL transgénicos con leucemia (Castellanos *et al.*, Blood 90:2168 (1997)). Se examinaron células madre de ratón que expresaban BCR-ABL por hibridación con filtros de Northern (Figura 2B). Cada banda de ARN se evaluó con respecto a la integridad y la carga por hibridación con una sonda de β -actina (Figura 2B, sección inferior). De acuerdo con los resultados observados en las células Ba/F3, las células inmaduras con BCR-ABL producían un aumento de la expresión de SLUG. Después se ensayó si la expresión de SLUG también está presente en células inmaduras de pacientes de leucemias humanas positivas para Ph1. Se demostró que el producto de expresión del gen *Slug* estaba ausente en las células procedentes de muestras humanas normales (Figura 3, banda 1). Por el contrario, la expresión de SLUG estaba presente en células de pacientes con el cromosoma Philadelphia (Figura 3, bandas 6-8). Las líneas celulares K562, Nalm-1 y TOM-1, positivas para t(9;22), proceden de pacientes con LMC y de pacientes LLA positivos para Ph1. Por lo tanto, se compararon estas líneas celulares con una línea celular humana no leucémica con respecto a la expresión de SLUG. El examen de los ARNm para la expresión de SLUG por PCR de transcriptasa inversa reveló que *Slug* está presente en todas estas líneas de células positivas para Ph1 (Figura 3, bandas 9-11). El descubrimiento de que la expresión de SLUG está presente en las células después de la expresión del BCR-ABL de transformación, junto con el descubrimiento de que el gen *Slug* está presente en líneas celulares y en células de médula ósea aisladas de pacientes con leucemias positivas para BCR-ABL, sugiere que la presencia del gen *Slug* puede ser un componente en la invasión de leucemias positivas para BCR-ABL.

Slug está presente en líneas celulares de pacientes con leucemias con otras anormalidades cromosómicas

Como SLUG es un miembro de la familia Snail de proteínas implicadas en la formación del mesodermo (Nieto *et al.*, 1994 citado *supra*) y su expresión es bastante promiscua (Figura 2), posteriormente se analizó la expresión del gen *Slug* en otros tumores mesenquimales. En la Figura 3 se muestran ejemplos de ARN de otras cuatro líneas celulares de leucemia que carecen de t(9;22), incluyendo el linaje B temprano 697 (Figura 3, banda 5), el mielóide U937 (Figura 3, banda 2) y las líneas de células T ALL-SIL (Figura 3, banda 3) y KOPTI-KI (Figura 2, banda 4). Como se muestra en la Figura 3, en todas las líneas de células leucémicas se demostró la expresión del gen *Slug*. En este sentido, los descubrimientos recientes demuestran que SLUG también se expresa en células leucémicas t(17;19) (Inukai *et al.*, Molecular Cell 4:343-352 (1999)) y en células de rhabdomyosarcoma que expresan la translocación PAX3-FKHR (Khan *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:13264-13269 (1999)). Así pues, estos resultados combinados indican que la expresión de *Slug* no es rara en tumores mesenquimales (tanto leucemias como sarcomas) transformados bajo los auspicios de otras alteraciones genéticas y sugieren que el gen *Slug* puede ser un componente de la biología del cáncer, no sólo de leucemias positivas para BCR-ABL, sino también posiblemente de otros cánceres mesenquimales.

Actividad antiapoptótica de SLUG

Para comprender mejor la función de SLUG en la biología del cáncer, también se aprovechó la línea de células Ba/F3 transducida con vectores que codificaban la proteína de fusión BCR-ABL (Sánchez-García y Grütz, 1995, citado *supra*). La expresión de BCR-ABL en Ba/F3 confiere un crecimiento independiente de citocinas y bloquea la apoptosis (Daley y Baltimore, 1988; Sánchez-García y Grütz, 1995, citados *supra*). Así pues, los inventores se preguntaron si SLUG podía realizar estas funciones en ausencia de la oncoproteína. Así pues, se transfectaron células Ba/F3 con un vector que expresaba *Slug* (Figura 4A) y se analizó la viabilidad celular en ausencia de IL-3. Como se muestra en la Figura 4, las células Ba/F3 que expresaban los oncogenes BCR-ABL sobrevivían con poca pérdida de viabilidad y las que expresaban *Slug* no sufrían apoptosis después de la eliminación de IL-3 del medio de crecimiento (Figura 4B, 4C). Esta observación confirma los resultados previos (Inukai *et al*, 1999 citado *supra*) e indica que *Slug* bloquea la apoptosis en el sistema de células de ensayo. Así pues, su disregulación por BCR-ABL en células Ph⁺ probablemente contribuye a las propiedades de supervivencia celular prolongada de las células t(9;22). El gen *Slug* podría sustituir a BCR-ABL en la promoción de la supervivencia de las células Ba/F3 murinas privadas del factor de crecimiento, lo que sugiere que es más probable que esté implicado en la resistencia de la muerte celular características de las leucemias Ph⁺ y una etapa clave hacia el desarrollo de leucemias positivas con respecto a t(9;22).

La supresión del gen Slug compromete la tumorigenicidad de oncogenes BCR-ABL afectando a la capacidad de diseminación de células leucémicas BCR-ABL

Los resultados anteriores ponen de manifiesto la idea de que la expresión de BCR-ABL protege a las células de la apoptosis induciendo una ruta del gen *Slug*. En este caso, sería de esperar que se produjera alguna modificación del crecimiento y la tumorigenicidad de las células Ba/F3 que expresan BCR-ABL sobre la alteración del nivel de la expresión de *Slug*. Se transfectaron células Ba/F3 que expresaban BCR-ABL con un vector que expresaba el ADNc de *Slugh* de ratón sin sentido (BCS-antislug) y se establecieron clones (Figura 5A). Se extrajo el ARN y los niveles de ARNm de *Slugh* se compararon con los presentes en las células de control no transfectadas (Figura 5B). En las células transfectadas con BOS-antislug se detectó *Slugh* sin sentido y en las células Ba/F3 que expresaban BCR-ABL transfectadas con BOS-antislug no se vio afectado el nivel de BCR-ABL (Figura 5A). Por otra parte, no se detectó ARNm de SLUG en las células transfectadas con *Slugh* sin sentido, aunque sí estuvo presente en células Ba/F3-p190 y Ba/F3-p210 (Figura 5B). Las consecuencias de la supresión de la expresión de *Slugh* se evaluaron examinando el programa de diferenciación impuesto por oncogenes BCR-ABL en células Ba/F3 y la tumorigenicidad *in vivo* de las diversas líneas celulares por inyección en ratones desnudos.

Para determinar si la expresión de *Slug* es un componente crítico *per se* del programa de diferenciación inducido por los oncogenes BCR-ABL, los inventores midieron después la capacidad de diferenciar precursores hematopoyéticos que expresaban BCR-ABL transfectados en los que la expresión de *Slug* se hubiera suprimido específicamente. Los efectos de la supresión de la expresión de *Slugh* sobre la diferenciación celular en células Ba/F3 que expresaban BCR-ABL se evaluaron analizando la expresión de marcadores hematopoyéticos específicos en las diversas líneas celulares. Como se muestra en la Figura 5C, las células Ba/F3 iniciales que expresan oncogenes *BCR-ABL-p190* o *BCR-ABL-p210* se diferencian específicamente en células mieloides y linfoides como se define por la presencia del marcador mieloides Gr-1 o del marcador linfoides B220, respectivamente. De forma análoga, no se vio afectada la diferenciación de células Ba/F3 que expresaban BCR-ABL en las que la expresión de *Slug* se había suprimido específicamente (Figura 5C). Estos resultados demuestran que el efecto de los oncogenes BCR-ABL en la diferenciación no depende de la expresión de *Slug*.

Posteriormente, los presentes investigadores examinaron la capacidad tumorigénica *in vivo* de las diversas líneas celulares. Las células Ba/F3 iniciales que expresaban los oncogenes BCR-ABL crecieron como tumores en ratones desnudos (Sánchez-García y Grütz, 1995 citado *supra*). Análogamente, se descubrió que se observaba formación de tumores tan sólo cinco días después de la inyección de las líneas de células que expresaban BCR-ABL. A diferencia de estos controles, las células Ba/F3 que expresaban BCR-ABL y *Slugh* sin sentido eran mucho menos tumorigénicas (Figura 6). Los tumores se escindieron para realizar el análisis macroscópico el día 20 después de la inyección de las células. En promedio, el peso de los tumores encontrados en los ratones a los que se habían inyectado células Ba/F3 que expresaban BCR-ABL fue dos veces mayor que el peso de los tumores de los ratones a los que se habían inyectado células que expresaban BCR-ABL y la construcción de *Slugh* sin sentido (Figura 6). Durante el desarrollo de los tumores invasivos *in vivo*, las células tumorales desobedecen el orden social de los límites de los órganos y entran en tejidos extraños. Así pues, posteriormente se procedió con el examen histológico de los tumores BCR-ABL generados en presencia o en ausencia de *Slug*. En los tumores originados como resultado de células Ba/F3 que expresaban BCR-ABL en las que se había suprimido la expresión de *Slugh*, las células se acumulaban, pero la proliferación se limitaba sistemáticamente al medio permisivo (Figura 7). Por el contrario, en los tumores generados como resultado de células Ba/F3 que expresaban BCR-ABL en las que no se había modificado la expresión de *Slug* se extendían los límites previos del medio permisivo y, por consiguiente, progresaba el tumor. Como se muestra en la Figura 7, *Slug* confiere claramente un comportamiento metastático a las células BCR-ABL, permitiendo la migración de las células tumorales como células individuales. Se encontraron resultados similares en secciones múltiples de tumores y para las dos formas (p190 y p210) del oncogen *BCR-ABL*. Así pues, estos resultados demuestran que el gen *Slug* tiene un papel fundamental en la transición de un tumor *in situ* a invasivo, permitiendo la migración de las células tumorales como células individuales.

III. Discusión

SLUG regula la capacidad invasiva de células BCR-ABL: consecuencias para la patogénesis de tumores mesenquimales

5 En la leucemogénesis, las futuras células tumorales son células madre primitivas en las que se bloquea la diferenciación (Cobaleda *et al.*, 2000; Sánchez-García, 2000, citados *supra*), pero la inhibición de la diferenciación no es suficiente para la transformación porque la supervivencia y la proliferación de las células diana se restringe a un microentorno particular. Así pues, la transformación debe depender de cambios genéticos que permiten a las células desarrollarse fuera de su medio normal además de mutaciones que bloquean la diferenciación. Para validar esta hipótesis, se intentó identificar la diana corriente abajo de los genes BCR-ABL fusionados por t(9;22)(q34;q11) en las células hematopoyéticas. La identificación de los productos génicos corriente abajo que confieren la naturaleza neoplásica son un prerequisite para la comprensión total del mecanismo de la leucemogénesis. En el presente estudio se ha identificado el gen *Slug* como un gen diana corriente abajo implicado en el proceso leucemogénico inducido por el gen de fusión quimérico BCR-ABL. Los estudios de los presentes investigadores no establecen si el promotor de *Slug* es una diana directa de BCR-ABL o si más bien este gen se implica como un elemento de ciertas cascadas bioquímicas que responden a la modulación por la proteína quimérica. El descubrimiento de que la expresión de *Slug* está presente en las células después de la expresión del BCR-ABL transformante, junto con el descubrimiento de que *Slug* está presente en líneas celulares y en células de médula ósea aisladas de pacientes con leucemias positivas con respecto a BCR-ABL, indican que la presencia de *Slug* tiene que ser un componente importante de la naturaleza maligna de las leucemias positivas con respecto a BCR-ABL. Esto sugiere la posibilidad de que *Slug* pueda contribuir al bloqueo de la diferenciación o ser responsable de la capacidad diseminativa de esta enfermedad.

25 Otros descubrimientos de los inventores definen la función biológica de *Slug* en el contexto de la transformación celular dependiente de oncogenes *BCR-ABL*. Los datos presentados aquí demuestran que *Slug*, que se activa por la expresión de oncogenes *BCR-ABL*, media la prevención de la apoptosis en el sistema Ba/F3. Además, se produce una modificación del crecimiento y la tumorigenicidad de las células que expresan BCR-ABL alterando el nivel de expresión de *Slug*. En tumores *in vivo* originados como resultado de células BCR-ABL en las que se había suprimido previamente la expresión de *Slug*, las células se acumulaban, pero la proliferación se limitaba sistemáticamente al medio permisivo. Por el contrario, en los tumores generados como resultado de células BCR-ABL en las que no se ha modificado previamente la expresión de *Slug*, se extienden los límites previos del medio permisivo y, por consiguiente, progresa el tumor, desobedeciendo el orden de límites y entrando en tejidos extraños. Así pues, *Slug* confiere claramente un comportamiento metastático a las células BCR-ABL en transición de *in situ* a invasivo, permitiendo la migración de las células tumorales como células individuales.

35 Los descubrimientos de los inventores son coherentes con un modelo en el que células madre que llevan la proteína de fusión BCR-ABL expresarían constitutivamente *Slug*, promoviendo tanto la supervivencia aberrante de la célula diana tumoral con independencia de las señales externas requeridas, que permite a la célula crecer fuera de su medio normal, como la migración de las células diana defectuosas en diferentes medios (Figura 8). Sin embargo, un aumento de la expresión de *Slug* no puede ser el único acontecimiento implicado en la transformación por oncogenes *BCR-ABL*. La razón es la siguiente: aunque la expresión de *Slug* constitutiva reemplaza a las señales de supervivencia inducidas a través de receptores de crecimiento y permite que las células crezcan fuera de su microentorno normal, los resultados de los presentes investigadores demuestran que el efecto de los oncogenes *BCR-ABL* en la diferenciación no depende de la expresión de *Slug*. Así pues, se requieren otros componentes además de *Slug* para reconstituir la señal de transformación de BCR-ABL.

50 Los inventores han demostrado que los oncogenes *BCR-ABL* son suficientes por sí mismos para inducir la expresión de *Slug*, y que *Slug* se requiere para la actividad biológica de estos oncogenes en la invasión celular. Como *Slug* es una proteína implicada en la formación del mesodermo (Nieto *et al.*, 1994 citado *supra*; Savagner *et al.*, J. Cell Biology 137:1403-1419 (1997)) y su expresión es bastante promiscua (Figura 2), puede tener un papel más general en la biología del cáncer que el asociado específicamente a la transformación de BCR-ABL. Así pues, la expresión de *Slug* podría servir como mecanismo de invasión celular para proteínas de fusión encontradas en otras leucemias y proteínas asociadas con sarcomas. De hecho, la expresión de *Slug* no es rara en tumores mesenquimales (tanto leucemias como sarcomas) transformados bajo los auspicios de otras alteraciones genéticas (Inukai *et al.*, 1999; Khan *et al.*, 1999, citados *supra*), lo que sugiere que *Slug* puede ser un componente de la invasión tumoral no sólo de leucemias positivas para BCR-ABL, sino también posiblemente de otros cánceres mesenquimales. Por lo tanto, *Slug* parece ser un mecanismo de invasión tumoral tanto para leucemias como para sarcomas. En conclusión, con el presente trabajo se ha establecido el mecanismo responsable de la capacidad de invasión por BCR-ABL y se han presentado indicios que sugieren que *Slug* podría representar un mecanismo potencialmente amplio de invasión tumoral para tumores mesenquimales. Por lo tanto, el propio *Slug* podría constituir una diana atractiva para el tratamiento (puede considerarse un marcador de malignidad) y la modulación terapéutica de la capacidad invasiva en el tratamiento del cáncer humano.

65 *La metástasis y la tumorigenicidad pueden tener el mismo control genético*

La conversión leucémica de las células diana tumorales (Cobaleda *et al.*, 2000; Sánchez-García, 2000, citados *supra*) en células con un estado de crecimiento autónomo implica que ciertos genes específicos tienen que activarse para desacoplar el control de proliferación/diferenciación y generar señales intracelulares que puedan sustituir a los

requisitos de los factores de crecimiento durante la invasión y la diseminación celular. Durante el desarrollo de tumores invasivos, las células tumorales desobedecen el orden social de límites de órganos y entran en tejidos extraños. Sólo durante la transición de un tumor *in situ* a un tumor invasivo, las células tumorales penetran en la membrana basal epitelial y entran en el estroma intersticial subyacente interactuando con las células estromáticas. Así pues, una definición del comportamiento de las células de tumores metastáticos es la tendencia a cruzar límites de compartimentos tisulares y a entremezclarse con diferentes tipos celulares. Los inventores han demostrado que las células BCR-ABL se comportan como células de tumores metastáticos. Se asume que el bloqueo de la diferenciación es la consecuencia de la alteración de las propiedades de las proteínas de fusión quiméricas (Sánchez-García, Annu. Rev. Genetics 31:429-453 (1997)), BCR-ABL en el presente caso. Se ha sospechado que también pueden producir metástasis otros genes distintos de los oncogenes que se ha demostrado que son relevantes para la tumorigénesis. Sin embargo, los resultados demuestran claramente que la transfección de oncogenes *BCR-ABL* en una célula receptora apropiada puede inducir el fenotipo completo de tumorigenicidad e invasión. Estos hallazgos demuestran que una proteína de fusión impone a la célula diana un programa de diferenciación alterado y un agente específico inductor de la invasión que se requiere para que una célula tumoral se transforme en invasiva. El modelo de los inventores también revela que los genes efectores de la invasión pueden regularse independientemente de los que confieren tumorigenicidad por el mismo gen de fusión, lo cual representa un nuevo mecanismo de acción oncogénica. Considerando conjuntamente estos datos, se refuerza la idea de que la transformación puede producirse como resultado de la creación/activación de un solo oncogen (Sánchez-García, 1997, citado *supra*). Un tópico interesante para la investigación futura será la identificación de los factores que modulan la expresión de *Slug* y la posible implicación de otras oncoproteínas que inducen su expresión.

Slug asocia la invasión y el desarrollo tumoral

SLUG es un miembro de la familia Snail de factores de transcripción con “dedos de zinc” que comparten un papel conservado desde el punto de vista evolutivo en la formación del mesodermo en invertebrados y vertebrados (Nieto *et al.*, 1994, citado *supra*). En el pollo, *Slug* se expresa por células epiteliales ectodérmicas durante su transición a células mesenquimales. Los embriones de pollo tratados con oligonucleótidos sin sentido dirigidos contra *Slug* muestran una formación del mesodermo inapropiada relacionada con defectos en la migración celular en compartimentos de transición de epiteliales a mesenquimales (Nieto *et al.*, 1994, citado *supra*). Así pues, *Slug* induce la migración celular en la transición epitelial-mesenquimal, en la formación del mesodermo y en la migración de las células de la cresta neural (Fuse *et al.*, Genes & Development 8, 2270-2281 (1994)). Sin embargo, en ratones, la activación de las transiciones epiteliales-mesenquimales está bajo el control de Snail (Cano *et al.*, Nature Cell Biology 2:76-83 (2000)), que permite la migración del mesodermo temprano en forma de células epiteliales. Por consiguiente, los ratones sin *Slug* se desarrollan normalmente (Jiang *et al.*, Development Biology 198:277-285 (1998)). Además, se ha demostrado que el gen Snail activa el EMT asociado con la adquisición del fenotipo invasivo en tumores epiteliales sólidos (Batlle *et al.*, Nature Cell Biology 2:84-89 (2000); Cano *et al.*, 2000 citado *supra*), donde contribuye al primer acontecimiento del proceso metastático. Así pues, la inducción de EMT parece ser una función asociada específicamente al gen Snail en el ratón (Cano *et al.*, 2000 citado *supra*).

Los datos presentados aquí demuestran que *Slug* es un regulador importante de la capacidad de invasión durante la progresión de tumores mesenquimales en los que no se requieren los EMT. Esta idea podría ampliarse al papel de *Slug* en la adquisición por parte de las células madre mesenquimales de la capacidad de migrar. En apoyo a esta teoría, los experimentos de los inventores indican que, *in vivo*, *Slug* no se expresa en la sangre periférica de los ratones normales, pero está presente en la sangre periférica de ratones transgénicos BCR-ABL con leucemia, definiendo un fenotipo indiferenciado, pluripotente y migratorio en las células mesenquimales. Así pues, es concebible que la presencia de *Slug* se requiera en ciertas fases del desarrollo normal para una expansión apropiada y para la supervivencia de las células hematopoyéticas tempranas (Figura 8). Conjuntamente, los resultados proporcionan una asociación molecular entre un regulador de las etapas iniciales del desarrollo y la leucemogénesis, y ofrecen pistas para comprender las alteraciones moleculares que conducen al comportamiento invasivo de leucemias, en particular, y tumores mesenquimales, en general.

REIVINDICACIONES

5 1. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que reconoce a la proteína SLUG, o a un fragmento de la misma, o de un compuesto que interfiere con la función de *Slug* a nivel del ADN, o a nivel del ARN o a nivel de la proteína (SLUG), opcionalmente junto con los excipientes farmacéuticamente aceptables.

10 2. Composición según la reivindicación 1, en la que dicho anticuerpo que reconoce a la proteína SLUG, o a un fragmento de la misma, es un anticuerpo frente a la proteína SLUG intacta, o frente a un fragmento antigénico de la misma, opcionalmente conjugado a un portador.

15 3. Composición según la reivindicación 1, en la que dicho anticuerpo que reconoce a la proteína SLUG, o a un fragmento de la misma, es un anticuerpo monoclonal o policlonal.

4. Composición según la reivindicación 1, en la que dicho compuesto que interfiere con la función de *Slug* a nivel de ADN, o de ARN o de proteína (SLUG) se selecciona entre oligonucleótidos antisentido, ribozimas y anticuerpos que inactivan la proteína SLUG.

20 5. Empleo de un anticuerpo que reconoce a la proteína SLUG, o a un fragmento de la misma, o de un compuesto que interfiere con la función de *Slug* a nivel de ADN, a nivel de ARN o a nivel de la proteína (SLUG), en la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

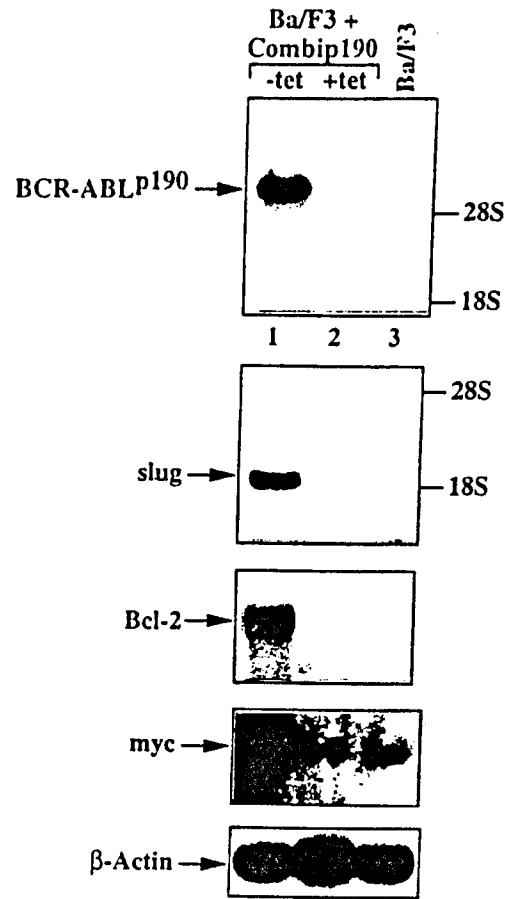
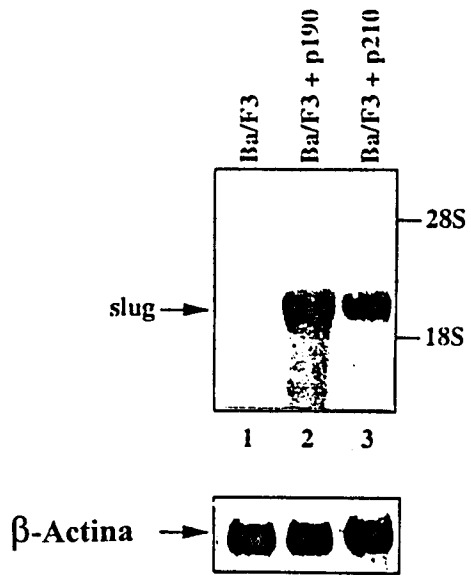


FIGURA 1

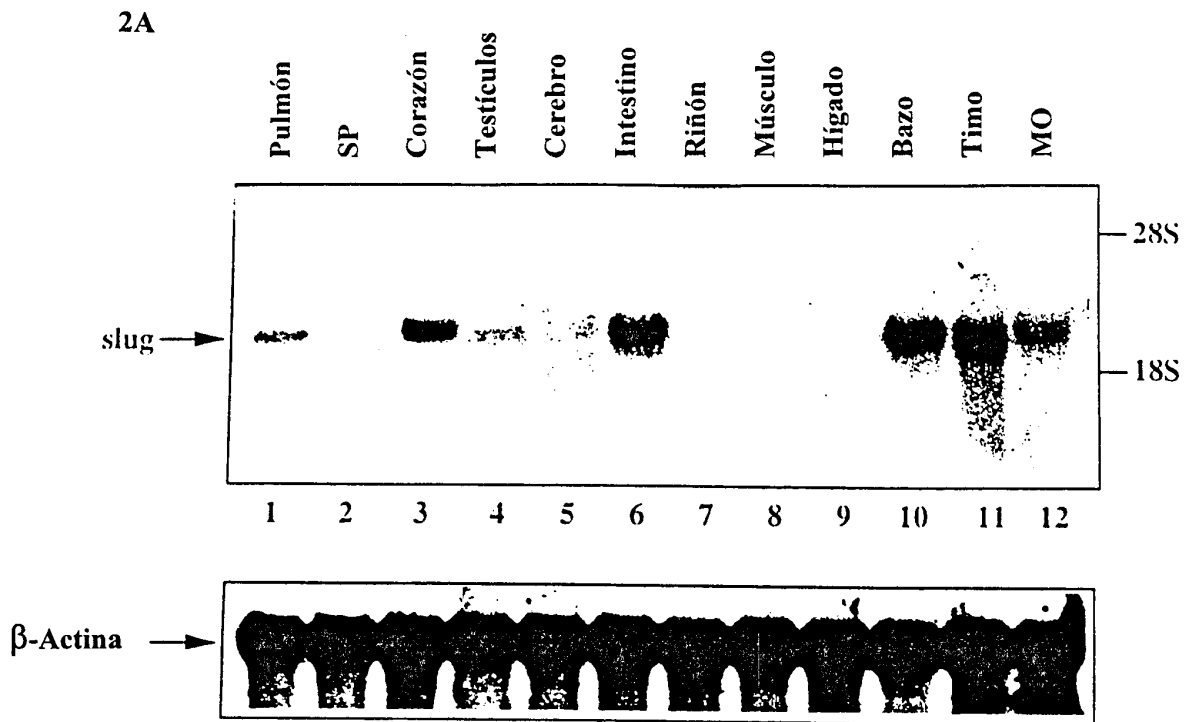
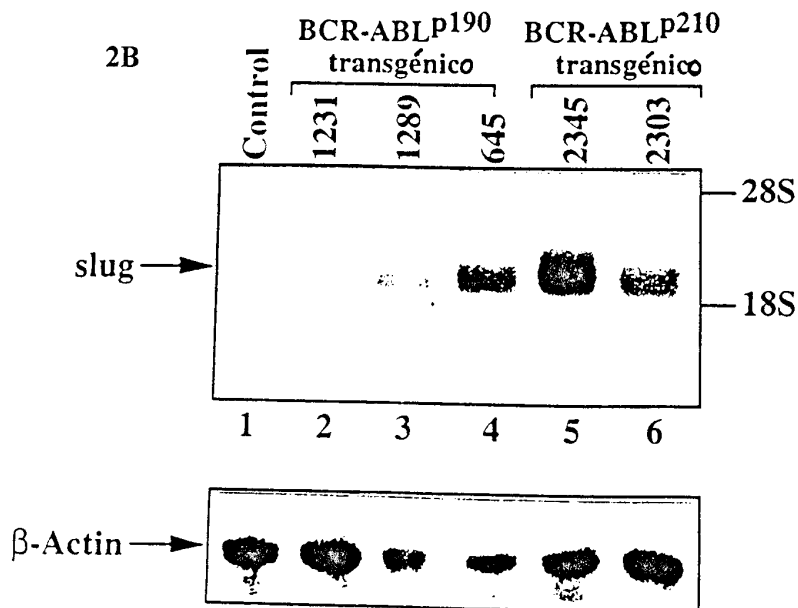


FIGURA 2



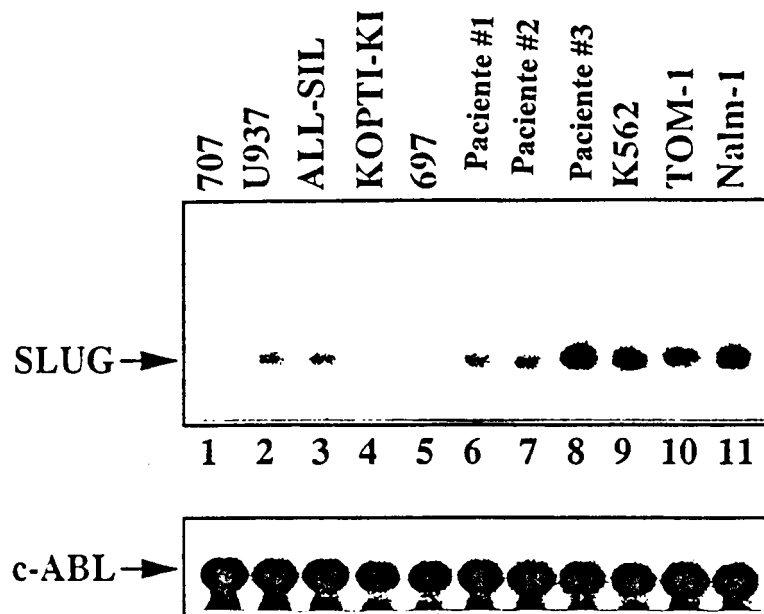


FIGURA 3

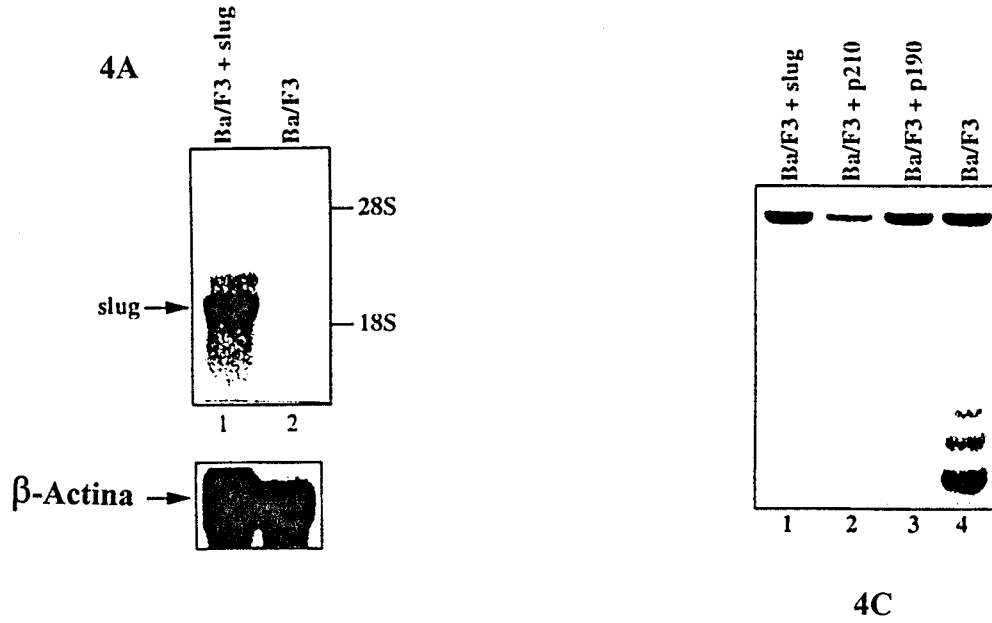
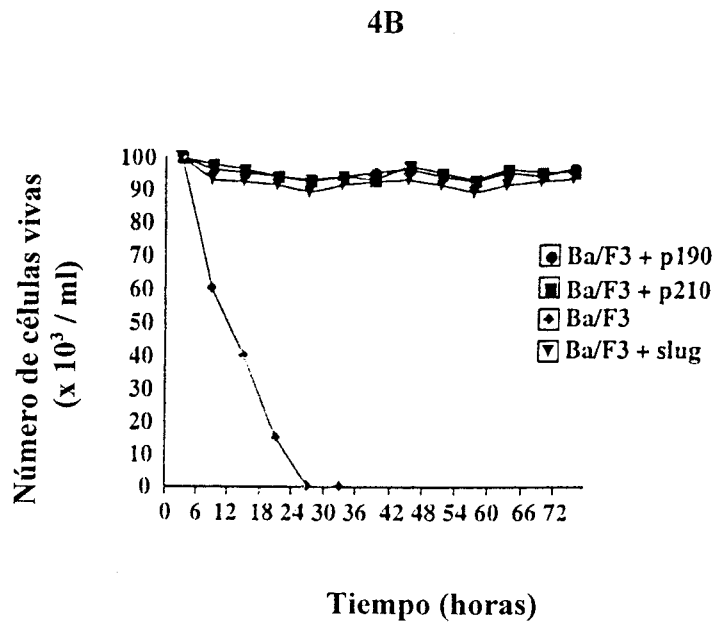


FIGURA 4



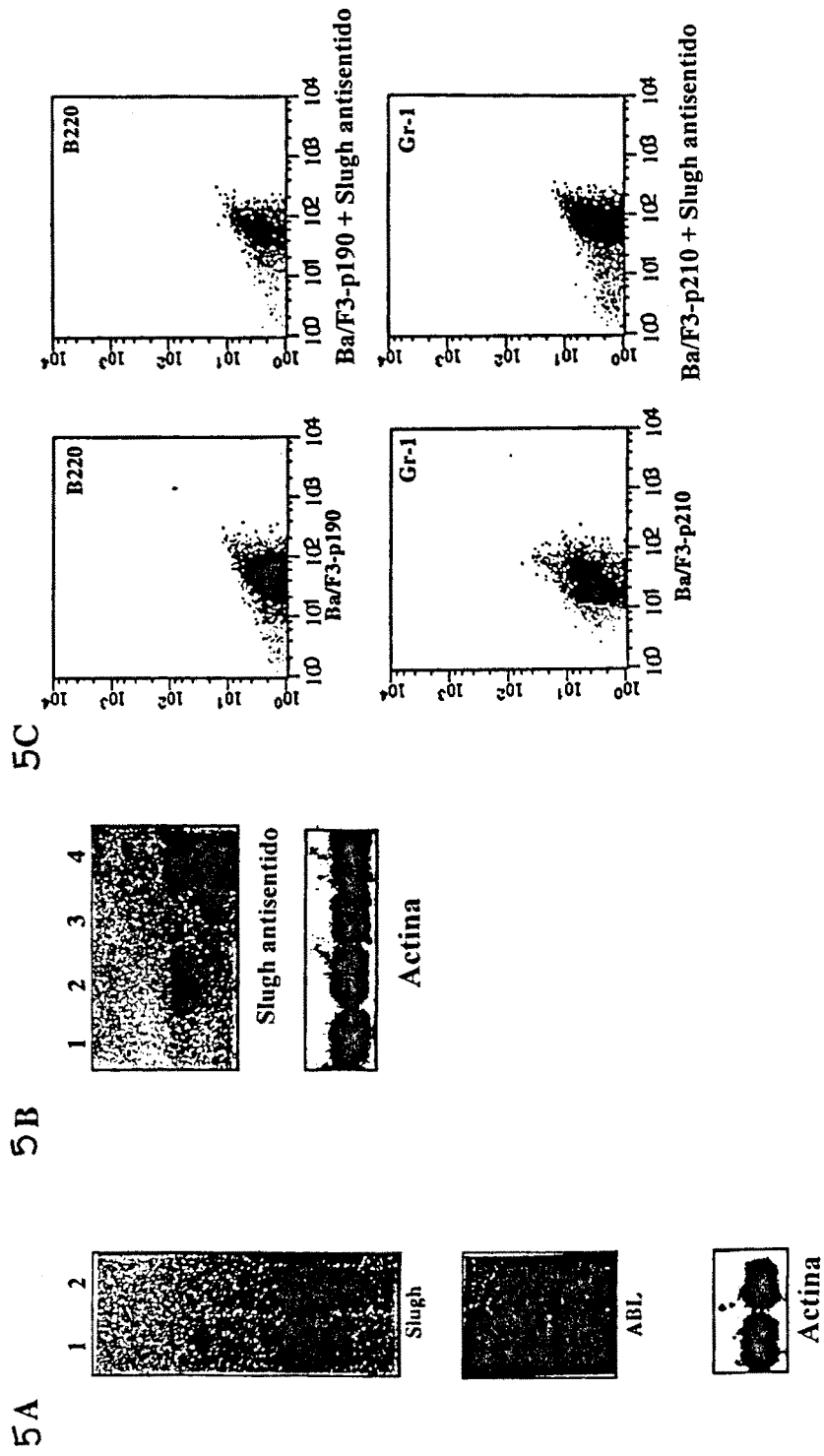
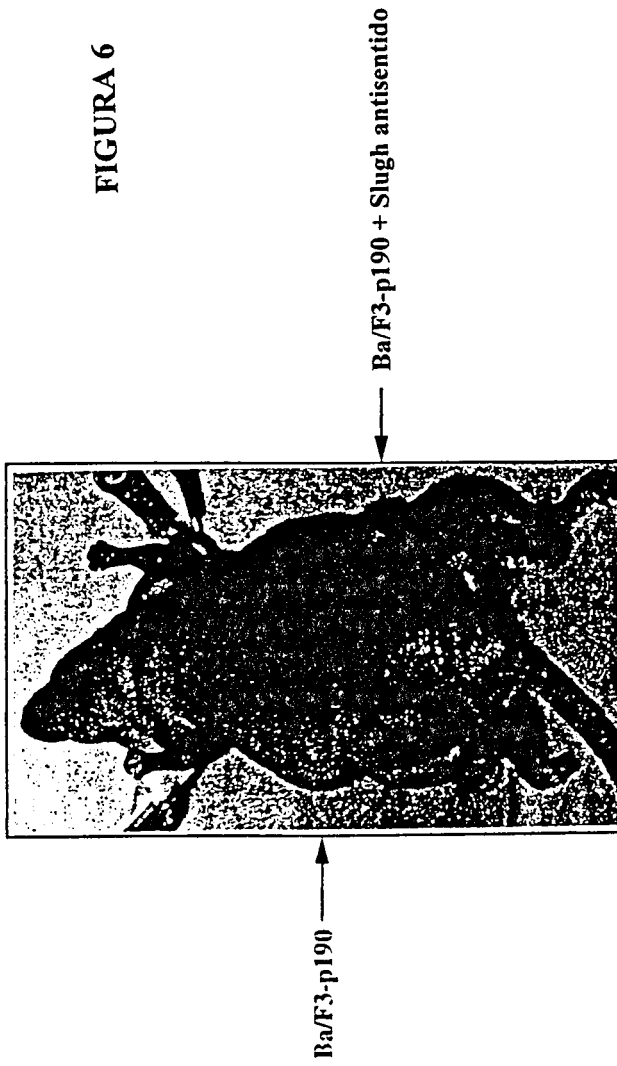


FIGURA 5

FIGURA 6



	Incidencia del tumor	Tiempo de latencia (días)	Peso del tumor (g)
Ba/F3-p190	12/12	5-7	1.3 ± 0.3
Ba/F3-p210	12/12	5-7	1.4 ± 0.2
Ba/F3-p190 + Slugh antisentido	12/12	9-11	0.5 ± 0.25
Ba/F3-p210 + Slugh antisentido	12/12	9-12	0.6 ± 0.3

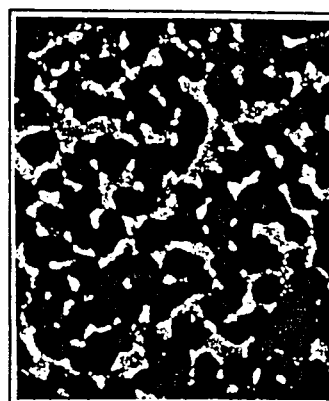


7A



7B

Ba/F3-p190



7C

Ba/F3-p190 + Slugh antisentido

FIGURA 7

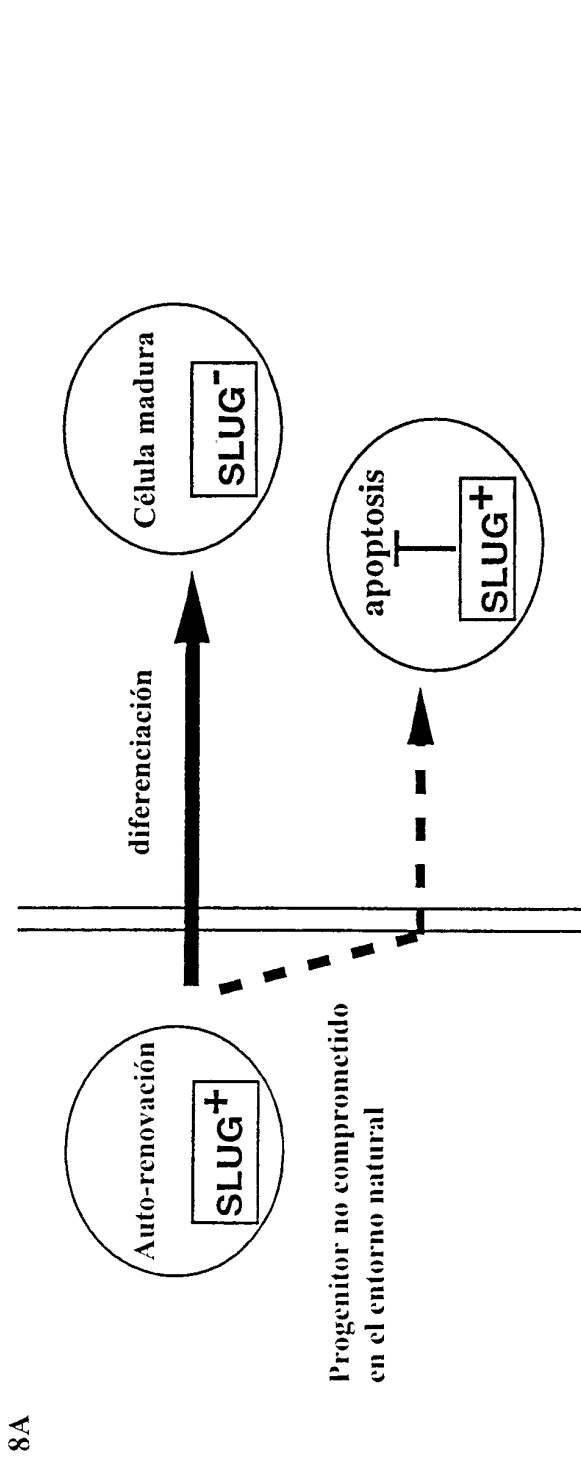
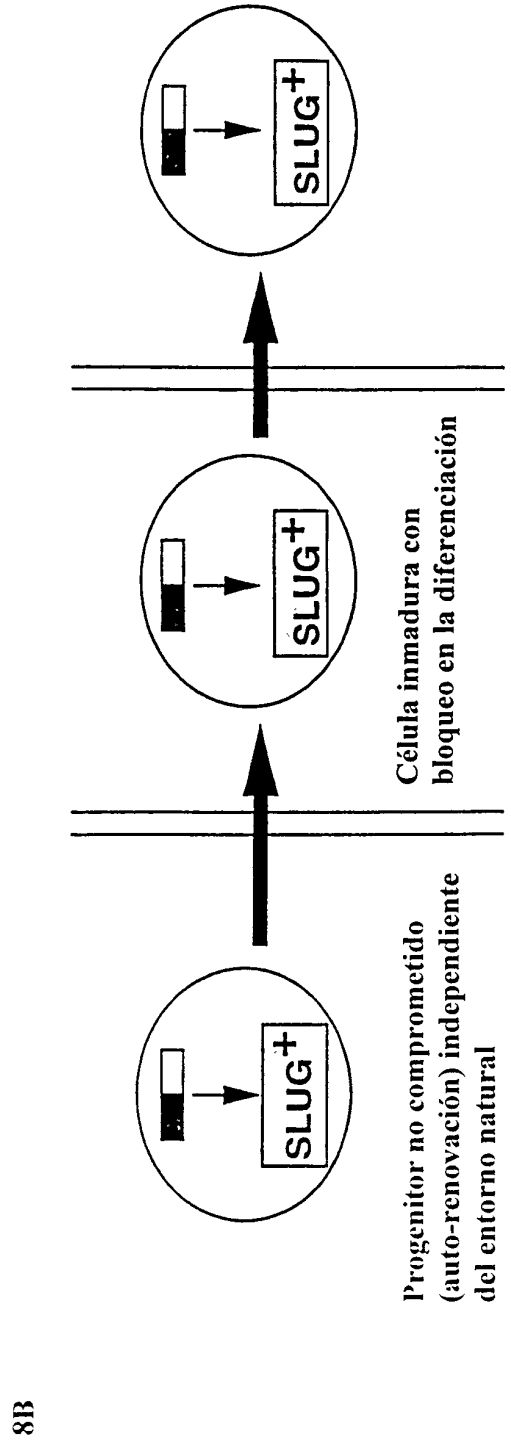


FIGURA 8



ES 2 242 469 B1

LISTA DE SECUENCIAS

	<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS	
5	<110> UNIVERSIDAD DE SALAMANCA	
	<120> COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER	
10	<160> 14	
	<170> PatentIn version 2.1	
15	<210> 1	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<223> Oligonucleótido iniciador R-24	
	<400> 1	
25	agcactctcc agcctctcac cgca	24
	<210> 2	
30	<211> 12	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<223> Oligonucleótido iniciador R-12	
	<400> 2	
40	gatctgcggt ga	12
	<210> 3	
	<211> 24	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<223> Oligonucleótido iniciador J-24	
50	<400> 3	
	accgacgtcg actatccatg aaca	24
55	<210> 4	
	<211> 12	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<223> Oligonucleótido iniciador J-12	
65	<400> 4	
	gatctgttca tg	12

ES 2 242 469 B1

	<210> 5		
	<211> 24		
	<212> ADN		
5	<213> Secuencia artificial		
	<223> Oligonucleótido iniciador N-24		
10	<400> 5		
	aggcaactgt gctatccgag ggaa		24
15	<210> 6		
	<211> 12		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
20	<223> Oligonucleótido iniciador N-12		
	<400> 6		
25	gatcttcct cg		12
	<210> 7		
30	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
35	<223> Oligonucleótido iniciador		
	<400> 7		
40	gcctcaaaa agccaaacta		20
	<210> 8		
	<211> 20		
45	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<223> Oligonucleótido iniciador sin sentido		
50	<400> 8		
	cacagtgatg gggctgtatg		20
55	<210> 9		
	<211> 20		
	<212> ADN		
60	<213> Secuencia artificial		
	<223> Oligonucleótido iniciador		
65	<400> 9		
	gtatcatctg actttgagcc		20

ES 2 242 469 B1

	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<223> Oligonucleótido iniciador sin sentido	
10	<400> 10	
	gtaccaggag tgtttctcca	20
15	<210> 11	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<223> Sonda interna	
	<400> 11	
25	gacacacata cagtgattat ttcc	24
	<210> 12	
30	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<223> Sonda interna	
	<400> 12	
40	taactaaagg tgaaaagctc c	21
	<210> 13	
	<211> 20	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<223> Oligonucleótido iniciador	
50	<400> 13	
	atgccgcgct ccttctggt	20
55	<210> 14	
	<211> 20	
	<212> ADN	
60	<213> Secuencia artificial	
	<223> Oligonucleótido iniciador	
65	<400> 14	
	tcagtggtgcc acacagcagc	20



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 242 469

② Nº de solicitud: 200202634

③ Fecha de presentación de la solicitud: 15.11.2002

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.7: A61K 38/00, 39/00, 31/7088, C12N 15/12

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	INUKAI, T. et al. "SLUG, a ces-1-related zinc finger transcription factor gene with antiapoptotic activity, is a downstream target of the E2A-HLF oncoprotein". MOL. CELL., 1999, Vol. 4, Nº 3, páginas 343-352. Ver todo el documento.	1-5
Y	KHAN, J. et al. cDNA microarrays detect activation of a myogenic transcription program by the PAX3-FKHR fusion oncogene". PROC. NATL. ACAD. SCI. U S A, 1999, Vol. 96, Nº 23, páginas 13264-13269. Ver todo el documento.	1-5
A	SEIDEL, M.G. et al. "Slug, a leukemogenic zinc finger transcriptional repressor inhibits apoptosis in hematopoietic progenitors". En: Annual Meeting of the German and Austrian Society for Hematology and Oncology; Graz, Austria; octubre 21-25, 2000". Publicado en: ONKOLOGIE, 2000, Vol. 23, página 5. Ver todo el documento.	1-5
A	INUKAI, T. et al. "Identification of the antiapoptotic zinc-finger transcription factor SLUG as a downstream target of E2A-HLF oncogenic fusion protein". En: "40th Annual Meeting of the American Society of Hematology; Miami Beach, Florida, USA; diciembre 4-8, 1998". Publicado en: BLOOD, 1998, Nº 10, suppl. 1, part 1-2, página 479 A. Ver todo el documento.	1-5
A	HEMAVATHY, K. et al. "Snail/Slug family of repressors: Slowly going into the fast lane of development and cancer". GENE, 2000, Vol. 257, páginas 1-12. Ver todo el documento.	1-5
A	HEMAVATHY, K. et al. "Human Slug is a repressor that localizes to sites of active transcription". MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, 2000, Vol. 26, Nº 14, páginas 5087-5095. Ver todo el documento.	1-5

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

11.10.2005

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/1