

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 368 328**

51 Int. Cl.:
C12N 15/85 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04716577 .4**
96 Fecha de presentación: **03.03.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1601775**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.12.2005**

54 Título: **MODELO DE ROEDOR PARA LA RÁPIDA IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS ACTIVOS FARMACÉUTICOS IN VIVO.**

30 Prioridad:
05.03.2003 WO PCT/EP03/02264

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2011

73 Titular/es:
**JANSSEN PHARMACEUTICA NV
TURNHOUTSEWEG 30
2340 BEERSE, BE**

72 Inventor/es:
**BELIËN, Ann, Trudo, Josée;
ARTS, Janine;
MARIËN, Ann, Odette, Adolf y
VALCKX, Annemie, Francine**

74 Agente: **de Justo Bailey, Mario**

ES 2 368 328 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Modelo de roedor para la rápida identificación de compuestos activos farmacéuticos *in vivo*.

5 Esta invención se refiere a un modelo de roedor para crecimiento neoplásico, en particular crecimiento canceroso. Específicamente, el modelo de roedor permite la identificación de compuestos activos farmacéuticos *in vivo*, comprendiendo el uso de células tumorales transfectadas de manera estable con un vector de expresión que comprende un gen indicador operativamente unido a un promotor que también controla la expresión de una proteína asociada con regresión tumoral, estabilización del crecimiento tumoral o inhibición de la metástasis.

10

Antecedentes de la invención

Desde hace tiempo ha habido una necesidad de un modelo animal no humano representativo para someter a prueba la eficacia de nuevos agentes antineoplásicos propuestos sin tener que realizar estudios de xenoinjertos a largo plazo. Los presentes modelos *in vivo* con los que se someten a prueba posibles agentes antineoplásicos implican implantar células tumorales en un animal no humano, tratar el animal con el nuevo agente antineoplásico propuesto y monitorizar entonces los animales para determinar el efecto del tratamiento sobre el crecimiento del tumor. Para ayudar a la visualización de las células tumorales contra el fondo de las células huésped, muchos modelos *in vivo* usan células tumorales transfectadas de manera estable con un gen indicador tal como la familia luciferasa y la familia aecuatorina de moléculas bioluminiscentes.

Una desventaja importante de estos modelos *in vivo*, en el desarrollo de agentes antitumorales, es el rendimiento limitado, es decir, se requiere un gran número de animales y una gran cantidad del compuesto antitumoral propuesto. Además, estos modelos *in vivo* llevan mucho tiempo, ya que requieren un tiempo suficiente para que el tumor implantado crezca en el animal. Por consiguiente, se propuso recientemente un modelo mejorado por Lassota P. en la solicitud internacional de patente (PCT/EP02/00106) publicada como WO 02/055742 el 18 de julio de 2002. En este modelo, se hacen crecer las células tumorales con un gen indicador, que se activa mediante el agente antitumoral, en un dispositivo de encapsulación semipermeable biocompatible, que se implanta en el animal no humano y se extrae tras la exposición del animal al compuesto que va a someterse a prueba. Sin embargo, en vista del entorno artificial de las células tumorales, es cuestionable si la respuesta de las células tumorales imita realmente la situación *in vivo* en la que un compuesto tiene que introducirse en la circulación, infiltrarse en el tejido tumoral y ejercer su efecto biológico.

35 Sambucetti *et al.* ("Histone deacetylase inhibition selectively alters the activity and expression of cell cycle proteins leading to specific chromatin acetylation and antiproliferative effects" J. Biol. Chem., vol. 274, n.º 49, 3 de diciembre de 1999, págs. 34940-34947) da a conocer células tumorales transfectadas de manera transitoria con un constructo génico p21^{WAF}-Luc.

40 Xiao *et al.* ("Sodium butyrate induces NIH3T3 cells to senescence-like state and enhances promoter activity of p21 WAF/CIP-1 in p53-independent manner", Biochem. Biophys. Res. Comm., vol. 237, 1997, págs. 457-460) da a conocer un promotor de p21WAF/CIP-1 en el que se han delecionado dos elementos de respuesta a P53, se ha ligado a un gen indicador de luciferasa y se ha transfectado en una línea celular de fibroblastos NIH3T3.

45 Por consiguiente, para satisfacer la necesidad de un modelo animal no humano para enfermedad neoplásica humana, que no tiene las deficiencias mencionadas anteriormente, la presente invención da a conocer un modelo de roedor que tiene la capacidad de imitar realmente la actividad farmacológica de un compuesto antineoplásico propuesto *in vivo*. Un modelo que permite la monitorización de la actividad antineoplásica de un compuesto de una forma no invasiva y que comprende el uso de células tumorales transformadas de manera estable, que se habían transfectado con un vector de expresión que contiene un gen indicador operativamente unido a un promotor que también controla la expresión de una proteína que está asociada con regresión tumoral. Con el fin de proporcionar el modelo animal deseado, las células deben:

- conservar la capacidad para formar un tumor cuando se implantan o inyectan en el animal;
- 55 - generar una señal que es análoga a la respuesta endógena de una proteína asociada con regresión tumoral;
- generar una señal con una buena razón de señal con respecto a ruido, para permitir un análisis en tiempo real del efecto cinético de sustancias farmacológicas *in vivo*;
- 60 - generar una señal con una buena reproducibilidad para proporcionar una baja variabilidad entre animales; y
- generar una señal que permite una obtención de imágenes no invasiva de la respuesta inducida.

Sumario de la invención

65

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una línea celular tumoral transformada de manera estable

que se ha transfectado con un vector de expresión que contiene un gen indicador operativamente unido a un promotor, en la que el gen indicador consiste en una proteína fluorescente y en la que dicho promotor consiste en un fragmento de promotor de p21 definido por SEQ ID NO: 1.

- 5 En comparación con los modelos *in vivo* tradicionales, la presente invención difiere en que el gen indicador no se expresa de manera constitutiva, sino sólo tras la exposición a un compuesto de prueba que da como resultado la expresión de una proteína o enzima asociada con regresión tumoral. Sólo cuando un compuesto que va a someterse a prueba se introduce en la circulación y se infiltra en el tumor, puede generar la señal del indicador, siempre que promueva la expresión de una proteína asociada con regresión tumoral y el promotor de dicha proteína esté operativamente unido al gen indicador.

15 El modelo es sumamente ventajoso con respecto a modelos *in vivo* previos, puesto que el tiempo de recambio para someter a prueba la actividad farmacéutica *in vivo* de compuestos antineoplásicos propuestos se reduce. En los modelos *in vivo* tradicionales, normalmente se tarda de 4 a 5 semanas en obtener un resultado, en el presente modelo, una vez que se forma el tumor en el animal no humano, es posible observar los efectos de un compuesto de prueba en un par de días. Además, en vista de la claridad y reproducibilidad de la señal fluorescente, los tumores pueden observarse a través de la piel y medirse usando un sistema de obtención de imágenes de cuerpo completo automatizado. Como consecuencia, se necesita un número inferior de animales para obtener efectos estadísticos significativos. Una ventaja adicional del presente modelo animal es la sensibilidad y receptividad de la señal fluorescente dentro de un amplio intervalo de concentración del compuesto de prueba. Esta combinación permite realizar un análisis cinético en tiempo real para determinar la actividad *in vivo* del compuesto de prueba y predecir la eficacia antitumoral del compuesto de prueba cuando se combina con el cambio en el peso del tumor observado. Esta combinación de características permite la obtención de imágenes no invasiva tras cantidades limitadas de dosificación con el compuesto de prueba (4 días en lugar del periodo tradicional de 30 días), conduciendo a una disminución del tiempo experimental y por tanto del compuesto de prueba, así como a una disminución en el sufrimiento de los animales y la ocupación de las instalaciones para animales.

30 La proteína p21 actúa como inhibidor de la actividad cinasa dependiente de ciclinas y detiene eficazmente la progresión del ciclo celular. Se ha mostrado una amplia variedad de agentes antitumorales que activan el promotor de p21, incluyendo agentes que dañan el ADN e inhibidores de histona desacetilasa que activan el promotor de p21 a través del elemento de respuesta a p53 (ubicado en la región de -4500 pb a -1300 pb en relación con la caja TATA) o sitios sp1 (ubicados en la región de -60 pb a +40 pb en relación con la caja TATA), respectivamente y que conducen a un aumento de la expresión de la proteína p21. En la presente invención, se usa un promotor de p21 que consiste en un fragmento de promotor de p21 definido por SEQ ID No:1, caracterizado porque dicho fragmento de promotor no comprende los elementos de respuesta a p53 y por consiguiente no responde a elementos que dañan el ADN. Un promotor de p21 que consiste en un promotor de p21 que comprende los elementos de respuesta a p53, respondiendo dicho promotor de p21 a agentes que dañan el ADN definidos por SEQ ID No:1. Alternativamente, se describe un promotor que responde a agentes que dañan el ADN que consiste en un promotor mínimo tal como el promotor basal de timidina cinasa del virus del herpes simple (VHS-TK) que comprende al menos un elemento de respuesta a p53. La presente invención proporciona un modelo selectivo para los efectos farmacológicos *in vivo* de inhibidores de histona desacetilasa.

45 También es un objeto de la presente invención proporcionar un método *in vitro* de examen de un compuesto para determinar la actividad antineoplásica, que comprende las etapas de:

- poner en contacto las células tumorales según la invención con el compuesto que va a someterse a prueba; y
- medir la expresión del gen indicador;

50 en el que un aumento de la expresión del gen indicador en comparación con los niveles de control identifica que el compuesto tiene actividad antineoplásica. En la presente invención, el gen indicador es una proteína fluorescente y la expresión del gen indicador se mide como la cantidad de luz fluorescente emitida. En la presente invención, el método de examen *in vitro* es selectivo para inhibidores de histona desacetilada y comprende células tumorales transfectadas de manera estable con un vector de expresión que comprende un fragmento de promotor de p21 definido por SEQ ID No:1, caracterizado porque dicho fragmento de promotor no comprende los elementos de respuesta a p53. Se describe un método de examen *in vitro* selectivo para agentes que dañan el ADN tales como por ejemplo actinomicina D, que comprende células tumorales transfectadas de manera estable con un vector de expresión que comprende al menos un elemento de respuesta a p53. Tal vector de expresión podría comprender el elemento de respuesta a p53 que consiste en SEQ ID No.10., como parte de un promotor mínimo tal como el promotor de VHS-TK.

65 En una realización adicional, la presente invención proporciona roedores para examinar la actividad farmacéutica de un compuesto, comprendiendo dicho animal una célula tumoral transformada de manera estable según la invención. Dichas células tumorales podrían inyectarse o implantarse quirúrgicamente como una suspensión de células tumorales bajo la piel del roedor para proporcionar un modelo subcutáneo, en el órgano de origen del tumor (por ejemplo células tumorales de pulmón en los pulmones) para proporcionar un modelo ortotópico, en la cavidad

peritoneal del roedor para proporcionar el modelo peritoneal o en los vasos sanguíneos del roedor para proporcionar el modelo de metástasis. En una realización preferida, las células tumorales se inyectan por vía subcutánea para proporcionar el modelo subcutáneo.

5 De este modo, es un objeto de la presente invención proporcionar un método de examen de un compuesto para determinar la actividad farmacéutica, que comprende las etapas de:

- administrar células tumorales según la invención a un roedor en una cantidad suficiente para efectuar la producción de un tumor en dicho roedor;

10

- dejar a las células tumorales suficiente tiempo para formar un tumor en dicho roedor;

- administrar un compuesto potencialmente activo a dicho roedor; y

15

- evaluar el efecto de dicho compuesto sobre las células tumorales midiendo la expresión del gen indicador.

La incubación con compuestos activos farmacéuticos dará como resultado un aumento de la expresión de proteína fluorescente en comparación con los niveles de control.

20

Estos y otros aspectos de la presente invención se tratarán en más detalle a continuación en el presente documento.

Breve descripción del dibujo

25 Figura 1A: Respuesta a la dosis del constructo de promotor de p21 a agentes que dañan el ADN e inhibidores de histona desacetilasa (HDACi) del clon 1. Se tratan las células durante 24 h con los compuestos indicados, es decir, los agentes que dañan el ADN camptotecina (camp.), bleomicina (bleo) y doxorubicina (dox) y los compuestos HDACi TSA, Mitsui, compuesto X y SAHA. Se midió la fluorescencia usando el aparato Ascent Fluoroskan tal como se describe en M&M. Se calculó la inducción en veces como fluorescencia tras la inducción dividida entre la fluorescencia de células tratadas con DMSO. El clon 1 mostró una inducción de 5 veces tras el tratamiento con TSA 10^{-7} M; una inducción de 2 veces con Mitsui 10^{-6} M y una inducción de 3 veces con compuesto X 10^{-6} M.

30

35 Figura 1B: Respuesta a la dosis del constructo de promotor de p21 a agentes que dañan el ADN e inhibidores de histona desacetilasa (HDACi) del clon 5. Se tratan las células durante 24 h con los compuestos indicados, es decir los agentes que dañan el ADN camptotecina (camp.), bleomicina (bleo) y doxorubicina (dox) y los compuestos HDACi TSA, Mitsui, JNJ99 (Comp.X) y SAHA. Se midió la fluorescencia usando el aparato Ascent Fluoroskan tal como se describe en M&M. Se calculó la inducción en veces como fluorescencia tras la inducción dividida entre la fluorescencia de células tratadas con DMSO. El clon 5 mostró una inducción de 5 veces tras el tratamiento con TSA 10^{-7} M; una inducción de 2 veces con Mitsui 10^{-6} M y una inducción de 4 veces con compuesto X 10^{-6} M.

40

40 Figura 2. Visualización *in vivo* de la fluorescencia de xenoinjertos. Se inyectó de manera subcutánea el clon 1 (10^7 células/200 μ l) en el flanco de ratones desnudos. Desde el día 12 en adelante, se les dosificó diariamente a los animales durante 6 días disolvente, Mitsui (20 mpk) o compuesto X (40 mpk). Se evaluaron los tumores en ratones vivos para determinar la fluorescencia con el sistema de obtención de imágenes de cuerpo completo automatizado de desarrollo interno y se comparó la intensidad de fluorescencia. La inducción de ZsGreen era muy clara 3 días tras la administración de la primera dosis y se alcanzó una meseta 5 días tras comenzar el tratamiento.

45

50 Figura 3. Respuesta del constructo de promotor de p53RE al agente que daña el ADN actinomicina D en clones de A2780 y HCT116. Se tratan las células durante 24 h con actinomicina D. Se midió la fluorescencia usando el aparato Fluoroskan tal como se describe en el ejemplo 2. Se calculó la inducción en veces como fluorescencia tras la inducción dividida entre la fluorescencia de células tratadas con DMSO. El clon 36 de A2780 mostró una inducción de 2 veces tras el tratamiento con 10 ng/ml de actinomicina D; se observó una inducción de 2 a casi 4 veces con los clones de HCT116.

55

55 Figura 4. El modelo de promotor de p21^{waf, cip1}-ZsGreen predice el efecto biológico de inhibidores de HDAC *in vitro*. Se trató el clon 5 de las células de tumor de ovarios A2780 transfectadas con pG13-basic-ZsGreen-1300 durante 24 horas con las concentraciones indicadas de los inhibidores de HDAC SAHA (*), MS-275 (Δ), LAQ-824 (\square) y TSA (\bullet), o con disolvente (DMSO al 0,1%). La figura 4A muestra la inducción de la proteína p21 del clon 5 tal como se mide usando un ELISA de p21. La figura 4B representa la fluorescencia inducida en el clon 5 tal como se mide usando el aparato Ascent Fluoroskan. El patrón de inducción para p21 es idéntico al patrón de inducción del vector de expresión de ZsGreen que responde a p21 pG13-basic-ZsGreen-1300.

60

65 Figura 5. El modelo de promotor de p21^{waf, cip1}-ZsGreen predice el efecto antitumoral de MS-275 en ratones individuales *in vivo*. Se inyectaron por vía subcutánea a ratones desnudos células de tumor de ovarios A2780p21^{waf, cip1}-ZsGreen humanas (10^7 células / ratón) y se trataron posteriormente desde el día 4 por v.o. con vehículo (grupo control, hidroxipropil- β -ciclodextrina al 20%) o MS-275 (QD) a las dosis indicadas. Se evaluó el peso del tumor y la fluorescencia de tumores individuales en el día 28, usando el sistema de obtención de imágenes de

cuerpo completo automatizado.

Figura 6. Vector de expresión 53RE_TK/pGL3-basic-ZsGreen.

5 Descripción detallada

Vectores

La presente invención se refiere a una célula tumoral transformada de manera estable que se ha transfectado con un vector que comprende un gen que codifica para una proteína fluorescente operativamente unido a un fragmento de promotor de p21 definido por SEQ ID No:1.

Operativamente unido tal como se usa en el presente documento significa fusionar funcionalmente un promotor con un gen en el marco apropiado para expresar el gen bajo el control del promotor.

La proteína fluorescente puede seleccionarse por ejemplo del grupo que consiste en EGFP, EYFP, DsRed, ZsGreen, ZsYellow, HcRed o proteínas fluorescentes desestabilizadas tales como pDsRed, pHcRed1, pd2EGFP o pd2EYFP. En una realización particular de la presente invención, el gen indicador es la proteína fluorescente ZsGreen. Dichas moléculas indicadoras y las secuencias génicas de las mismas se conocen en la técnica y están disponibles comercialmente tales como las proteínas fluorescentes comercializadas por Clontech, San Diego, California.

Las técnicas y los protocolos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo en la preparación de constructos de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas, se describen en detalle en *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausbel *et al.* eds., John Wiley & Sons, 1997.

Los vectores según la invención pueden elegirse o construirse a partir de vectores disponibles comercialmente tales como pCAT3, pGL2, pGL3 o pSV- β -Galactosidasa y comprenden normalmente secuencias reguladoras apropiadas así como uno o más genes marcadores seleccionables, por ejemplo un gen de resistencia a ampicilina en el caso de un plásmido bacteriano o un gen de resistencia a neomicina para un vector de mamífero. Tal como se muestra a modo de ejemplo a continuación en el presente documento, en una realización de la presente invención el vector se construye a partir del vector básico pGL3. Dichas secuencias de vector se conocen en la técnica y están disponibles comercialmente tales como el vector básico pGL3 comercializado por Promega, Madison, WI. Se describen vectores que contienen como una de las secuencias reguladoras una secuencia de promotor no sólo compatible con la célula huésped para la que se diseña el vector de expresión sino que también responde a compuestos, incluyendo proteínas, péptidos, oligonucleótidos y moléculas pequeñas, que se sabe que tienen un efecto fisiológico deseado en la célula huésped respectiva. Por consiguiente, la secuencia de promotor en los vectores de expresión descritos comprende al menos un elemento de secuencia reguladora, también conocido como elemento de respuesta, caracterizado porque regula la expresión del gen indicador ligado y se activa debido a la unión o liberación de un factor de transcripción, en el que la presencia o ausencia de dicho factor de transcripción se correlaciona con el estado fisiológico deseado de la célula huésped. Por ejemplo, si el estado fisiológico deseado consiste en la inducción de la detención del ciclo celular y la diferenciación en la célula huésped, la secuencia de promotor puede comprender los motivos ricos en GC encontrados en la parte proximal del promotor de p21^{WAF-1/Cip1} que se sabe que se activan tras la exposición a activadores de p21 tales como los factores de transcripción Sp1 y Sp3 así como otros inductores de la detención del ciclo celular y la diferenciación celular tales como hormonas esteroides, factor de crecimiento nervioso, factor de necrosis tumoral α , ésteres de forbol, inhibidores de fosfatasa, interferón γ y las proteínas supresoras de tumores Smad.

Por consiguiente, el promotor descrito en el presente documento puede ser o bien un promotor que se produce de manera natural, tal como el promotor de p21^{WAF-1/Cip1} que también controla la expresión de una proteína cuyo nivel de expresión depende del estado fisiológico deseado, o bien fragmentos del mismo que tienen actividad promotora tal como el fragmento de promotor de p21 definido por SEQ ID No:1 tal como se describe en los ejemplos más adelante en el presente documento, para obtener las células tumorales transformadas de manera estable en la presente invención. También se describen secuencias de promotor que consisten en un constructo de ADN recombinante que comprende uno de los elementos de secuencia reguladora anteriormente mencionados, tales como los elementos de respuesta a p53 operativamente unidos a elementos de promotor mínimo tales como el promotor de interleucina 6 (IL6) mínimo (phu.IL6Pluc+ Plaisance *et al.* (1997) MCB 17, 3733-3743), el promotor de E1B mínimo (pMCSluc disponible comercialmente de Stratagene) o el promotor de TK para luciferasa disponible comercialmente (pTKluc Promega), o el promotor de VHS-TK mínimo que comprende el elemento de respuesta a p53. Adicionalmente, se conoce un promotor que también controla la expresión de una proteína que está asociada con regresión tumoral o un fragmento de la misma que tiene actividad promotora.

Células diana

La presente invención se refiere a una célula diana transformada de manera estable con un vector de expresión

descrito en la reivindicación 1.

Dichos constructos de vector pueden introducirse en las células diana por medio de cualquier método conocido tal como transfección o transducción, usando preferiblemente métodos de transfección convencionales tales como liposomas, precipitación con fosfato de calcio, electroporación y uso de una pistola génica.

Ya que es un aspecto adicional de la presente invención proporcionar un modelo de roedor para crecimiento neoplásico, en particular crecimiento canceroso, los vectores descritos en las reivindicaciones se introducirán en células diana que pueden formar un tumor cuando se implantan o se inyectan en el roedor. Los ejemplos de líneas celulares adecuadas incluyen melanomas, líneas de tumor de pulmón, líneas de tumor renal, líneas de tumor de colon, líneas de tumor de próstata, líneas de tumor de ovarios, líneas de tumor mamario, líneas de tumor del sistema nervioso central, líneas de células leucémicas, etc. En una realización, las células diana consisten en una línea celular de tumor de ovarios, en particular A2780 (n.º de ECACC 93112520), en otra realización las células diana consisten en una línea celular de carcinoma colorrectal, en particular HCT116 (n.º de ATCC CCL-247). Pueden seleccionarse células diana adicionales de diversas líneas celulares, que incluyen diversas líneas celulares de mamíferos, especialmente líneas celulares humanas. Debe indicarse que las células diana tal como se usan en el presente documento incluyen cualquiera de las células anteriormente mencionadas, ya transformadas con un sistema de expresión para un marcador de selección tal como neomicina, una proteína terapéutica tal como metioninasa o un producto génico indicador. Por ejemplo, en una realización alternativa de la invención, las células diana que pueden formar un tumor cuando se administran a un roedor, ya están transformadas con un sistema de expresión que codifica para una proteína indicadora tal como luciferasa de luciérnaga o una proteína fluorescente (véase anteriormente). Estas células pueden transformarse con un vector descrito en la reivindicación 1, siempre que las longitudes de onda de emisión de las proteínas luminiscentes, es decir, el gen indicador que proporciona el color basal y el vector descrito en la reivindicación 1 que proporciona el color inducible, no se solapan entre sí. Las posibles combinaciones incluyen entre otras DsRed con las proteínas fluorescentes potenciadas EBFP, ECFP, EGFP y EYFP; ZsGreen con DsRed; EGFP con EYFP; EGFP con EBFP; EBFP con EYFP; o ECFP con EYFP. Una vez transformadas con los vectores descritos en la reivindicación 1, estas células permiten una detección eficaz del tumor completo, por ejemplo para establecer si las células tumorales administradas tenían tiempo suficiente para formar un tumor en dicho roedor, en combinación con el sistema inducible descrito en el presente documento para estudiar la actividad antineoplásica de un compuesto de prueba. En particular, para estudiar si el compuesto que va a someterse a prueba entra en el tumor mediante difusión pasiva y/o angiogénesis. En cualquier caso, la elección de la célula diana dependerá del estado fisiológico que va a investigarse. Alternativamente, el vector de expresión descrito en la reivindicación 1 tiene una expresión basal baja pero detectable del gen indicador con un buen factor de inducción para alcanzar significación. La baja expresión basal puede usarse para establecer si las células tumorales administradas tenían tiempo suficiente para formar un tumor en dicho roedor. Por tanto, no se requiere doble transfección de las células diana. Esta realización ventajosa se producía cuando el vector descrito en la reivindicación 1 comprende ZsGreen como gen indicador.

Por tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar una línea celular tumoral transformada de manera estable, que se ha transfectado con un vector de expresión descrito en la reivindicación 1. En particular, una línea celular de carcinoma de ovarios transformada de manera estable, preferiblemente células A2780 que comprenden un vector de expresión que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína fluorescente operativamente unida a un fragmento de promotor de p21 que consiste en la secuencia definida por SEQ ID No.1. En la que en una realización adicional la proteína fluorescente se selecciona del grupo que consiste en EGFP, EYFP, DsRed, ZsGreen, ZsYellow, HcRed o proteínas fluorescentes desestabilizadas tales como pDsRed, pHcRed1, pd2EGFP o pd2EYFP y en una realización específica la proteína fluorescente consiste en ZsGreen. En una realización preferida, las células transformadas de manera estable se seleccionan de los clones depositados en la Colección Coordinada Belga de Microorganismos (BCCM) el 20 de enero de 2003 como pGL3-basic-ZsGreen-1300-clon 1 y pGL3-basic-ZsGreen-1300-clon 2 con los respectivos números de registro LMBP 5958CB y LMBP 5959CB. Dichos clones comprenden un vector de expresión derivado del vector pGL3 disponible comercialmente y que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica para ZsGreen operativamente unida a un promotor que responde a activadores de p21, consistiendo dicho promotor en la secuencia de promotor de p21 definida por SEQ ID No.1, en la que dichos clones se caracterizan porque tienen una expresión de fluorescencia basal baja que tras la inducción con inductores conocidos de la detención del ciclo celular y diferenciación celular tales como Mitsui (a.k.a. MS-275 - Shering - número de registro 209783-80-2), permiten la detección de la fluorescencia por medio de un sistema de obtención de imágenes de cuerpo completo automatizado.

En vista de estas características, es decir:

- capacidad para formar un tumor cuando se implantan o inyectan en un roedor,
- baja fluorescencia basal,
- una fluorescencia que puede inducirse tras la exposición a inductores conocidos de la detención del ciclo celular y diferenciación celular de un modo específico, y

- que a un nivel detectable usando técnicas de obtención de imágenes de cuerpo completo no invasivas,

dichos clones proporcionan una importante herramienta para estudiar la actividad farmacéutica *in vivo* de compuestos antineoplásicos propuestos. En comparación con los modelos *in vivo* tradicionales, el uso de estas células en roedores permite que se evalúen compuestos a puntos de tiempo más tempranos en el proceso de descubrimiento de fármacos sin realizar estudios farmacocinéticos (PK) y farmacodinámicos (PD) que consumen tiempo y compuesto.

También se describen líneas celulares transformadas con un vector de expresión que comprende una secuencia de promotor que consiste en un constructo de ADN recombinante que comprende uno de los elementos de secuencia reguladora anteriormente mencionados, tales como los elementos de respuesta a p53 operativamente unidos a elementos de promotor mínimo tales como el promotor de interleucina 6 (IL6) mínimo (phu.IL6Pluc+ Plaisance *et al.* (1997) MCB 17, 3733-3743), el promotor de E1B mínimo (pMCSluc disponible comercialmente de Stratagene) o el promotor de TK para luciferasa disponible comercialmente (pTKluc Promega). En particular, una línea celular de carcinoma de ovarios o línea celular de carcinoma colorrectal transformada de manera estable, preferiblemente células HCT116 o células A2780 que comprenden un vector de expresión que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína fluorescente operativamente unida a un promotor que responde a activadores de p53, comprendiendo preferiblemente dicho promotor el elemento de respuesta a p53 (SEQ ID No.10), consistiendo más preferiblemente dicho promotor en el promotor de VHS-TK mínimo que comprende el elemento de respuesta a p53 (Seq ID No.10), consistiendo incluso más preferiblemente en la secuencia de promotor de VHS-TK que responde a p53 (SEQ ID No.13). En la que además la proteína fluorescente se selecciona del grupo que consiste en EGFP, EYFP, DsRed, ZsGreen, ZsYellow, HcRed o proteínas fluorescentes desestabilizadas tales como pDsRed, pHcRed1, pd2EGFP o pd2EYFP y en una realización específica la proteína fluorescente consiste en ZsGreen. Se describen células transformadas de manera estable, que consisten en células A2780 o HCT116 transfectadas con el vector p53RE_TK/pGL3-Basic-ZsGreen (figura) derivado del vector pGL3 disponible comercialmente y que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica para ZsGreen operativamente unida a un promotor que responde a activadores de p53, comprendiendo dicho promotor la secuencia de promotor de VHS-TK que responde a p53 (SEQ ID No. 14), en la que dichos clones se caracterizan porque tienen una expresión de fluorescencia basal baja que tras la inducción con activadores de p53 tales como exposición a agentes que dañan el ADN, hipoxia, agotamiento de nucleótidos o activación oncogénica permite la detección de la fluorescencia por medio de un sistema de obtención de imágenes de cuerpo completo automatizado. En vista de estas características, es decir:

- capacidad para formar un tumor cuando se implantan o inyectan en un roedor,

- baja fluorescencia basal,

- una fluorescencia que puede inducirse tras la exposición a inductores conocidos de la detención del ciclo celular y diferenciación celular de un modo específico, y

- que a un nivel detectable usando técnicas de obtención de imágenes de cuerpo completo no invasivas,

dichos clones proporcionan una importante herramienta para estudiar la actividad farmacéutica *in vivo* de compuestos antineoplásicos propuestos. En comparación con los modelos *in vivo* tradicionales, el uso de estas células en roedores permite que se evalúen compuestos a puntos de tiempo más tempranos en el proceso de descubrimiento de fármacos sin realizar estudios farmacocinéticos (PK) y farmacodinámicos (PD) que consumen tiempo y compuesto.

Ensayos

También es un objeto de la presente invención proporcionar el uso de las líneas celulares de la invención en un ensayo de examen *in vitro* para identificar compuesto farmacéuticamente activos, comprendiendo dicho método poner en contacto las células transformadas según la invención con el compuesto que va a someterse a prueba; y medir la expresión del gen indicador. Compuestos farmacéuticamente activos tal como se usa en el presente documento se refiere a compuestos que pueden activar la secuencia de promotor presente en el vector de expresión.

En la realización particular para identificar compuestos con actividad antineoplásica, las células transformadas de manera estable en el método de examen anteriormente mencionado comprenden un vector de expresión descrito en la reivindicación 1. Por tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un método *in vitro* para identificar compuestos con actividad antineoplásica, comprendiendo dicho método; poner en contacto células tumorales transformadas de manera estable según la invención con el compuesto que va a someterse a prueba, y medir la expresión de la proteína fluorescente.

En una realización preferida del método de examen *in vitro* anteriormente mencionado, las células tumorales transformadas de manera estable consisten en células de carcinoma de ovarios transformadas de manera estable,

preferiblemente células A2780 que comprenden un vector de expresión que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína fluorescente operativamente unida a un promotor que responde a activadores de p21, que consiste en el fragmento de promotor definido por SEQ ID No.1. En la que en una realización adicional la proteína fluorescente se selecciona del grupo que consiste en EGFP, EYFP, DsRed, ZsGreen, ZsYellow, HcRed o proteínas fluorescentes desestabilizadas tales como pDsRed, pHcRed1, pd2EGFP o pd2EYFP y en una realización específica la proteína fluorescente consiste en ZsGreen o ZsRed. En una realización más preferida, las células tumorales transformadas de manera estable usadas en el método de examen *in vitro* se seleccionan de los clones depositados en BCCM con los números de registro LMBP 5958CB y LMBP 5959CB. También se describe un método de examen *in vitro*, usando las células tumorales transformadas de manera estable que consisten en células de carcinoma colorrectal transformadas de manera estable o células de carcinoma de ovarios transformadas de manera estable, preferiblemente células A2780 o células HCT116, que comprenden un vector de expresión que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína fluorescente operativamente unida a un promotor que responde a activadores de p53, comprendiendo preferiblemente dicho promotor el elemento de respuesta a p53 (SEQ ID No. 10), consistiendo incluso más preferiblemente dicho promotor en el promotor de VHS-TK mínimo que comprende el elemento de respuesta a p53 (SEQ ID No. 13). La proteína fluorescente puede seleccionarse del grupo que consiste en EGFP, EYFP, DsRed, ZsGreen, ZsYellow, HcRed o proteínas fluorescentes desestabilizadas tales como pDsRed, pHcRed1, pd2EGFP o pd2EYFP y puede ser específicamente la proteína fluorescente ZsGreen. Las células transformadas de manera estable usadas en el método *in vitro* pueden ser células A2780 o HCT116 transfectadas con el vector p53RE_TK/pGL3-Basic-ZsGreen (figura 6).

Los expertos apreciarán fácilmente que el ensayo anteriormente mencionado puede adaptarse a fines de examen de alto rendimiento. Por ejemplo, los ensayos en los que se evalúa la actividad antineoplásica midiendo el cambio en fluorescencia pueden diseñarse alrededor de un instrumento denominado Lector de Placas de Obtención de Imágenes de Fluorescencia ("*FLuorescence Imaging Plate Reader*") ((FLIPR®), Molecular Devices Corporation). En su configuración más común, excita y mide la fluorescencia emitida por compuestos fluorescentes. Usa un láser de ión argón para producir excitación de alta potencia de un fluoróforo, un sistema de óptica para explorar rápidamente desde la parte superior a la inferior de una placa de 96/384 pocillos y una cámara CCD sensible, enfriada para capturar la fluorescencia emitida. También contiene una cabezal de pipeteo de 96/384 pocillos que permite que el instrumento suministre disoluciones de los agentes de prueba a los pocillos de una placa de 96/384 pocillos. El ensayo de FLIPR está diseñado para medir señales de fluorescencia de poblaciones de células antes, durante y después de la adición de compuestos, en tiempo real, a partir de todos los 96/384 pocillos simultáneamente. El ensayo de FLIPR puede usarse para examinar y caracterizar compuestos funcionalmente activos en las células tumorales transfectadas de manera estable según la invención.

Un ensayo de examen de alto rendimiento, específicamente útil para identificar activadores de p21 o p53 podría consistir en una disposición de una única etapa en la que las células de carcinoma de ovarios, en particular las células A2780 transformadas de manera estable con un vector de expresión descrito en la reivindicación 1, se incuban con un compuesto de prueba y tras un tiempo suficiente para permitir la interacción (8 - 24 horas, normalmente 12-24 horas, en particular 24 horas) se mide el cambio en unidades de fluorescencia relativa usando un lector de placas de fluorescencia automatizado tal como FLIPR o Ascent Fluoroskan (disponible comercialmente de Thermo Labsystems, Bruselas, Bélgica).

Modelo de roedor

También es una realización de la presente invención proporcionar roedores que comprenden una célula diana según la invención. En particular, proporcionar un modelo de roedor para crecimiento neoplásico, en particular crecimiento canceroso.

Por consiguiente, la presente invención proporciona un método para preparar un modelo animal no humano para crecimiento neoplásico, comprendiendo dicho método administrar a dicho animal no humano una cantidad de células tumorales transformadas de manera estable según la invención, suficiente para efectuar la producción de un tumor en dicho animal no humano. En el que dicho animal no humano para su uso como modelos son roedores. Para una analogía más estrecha con sujetos humanos, se describe el uso de primates. Son particularmente útiles sujetos susceptibles de desarrollo tumoral, tales como sujetos con sistemas inmunitarios dañados, normalmente ratones desnudos o ratones SCID. Se describe el uso de cualquier sujeto vertebrado apropiado, estando dictada la elección principalmente por la conveniencia y similitud con el sistema de interés final. El modelo de roedor de la invención es un roedor tal como ratones desnudos y la cantidad de células para efectuar la producción de un tumor oscila normalmente entre 10^6 y 10^3 células (véase por ejemplo el documento US 6.251.384). Preferiblemente, tal administración es subcutánea y los tumores se forman como masas sólidas.

Los modelos de roedor anteriormente mencionados pueden usarse en un método para examinar compuestos con actividad antineoplásica. Preferiblemente, las células tumorales administradas a dicho roedor consisten en células de carcinoma de ovarios transformadas de manera estable, preferiblemente células A2780 que comprenden un vector de expresión que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína fluorescente operativamente unida a un promotor que responde a activadores de p21, consistiendo dicha secuencia de promotor

en el fragmento de promotor de 21 definido por SEQ ID No.1. En el que en una realización adicional la proteína fluorescente se selecciona del grupo que consiste en EGFP, EYFP, DsRed, ZsGreen, ZsYellow, HcRed o proteínas fluorescentes desestabilizadas tales como pDsRed, pHcRed1, pd2EGFP o pd2EYFP y en una realización específica la proteína fluorescente consiste en ZsGreen o ZsRed. En una realización más preferida, las células tumorales transformadas de manera estable usadas en el método de examen *in vivo* se seleccionan de los clones depositados en la BCCM con los números de registro LMBP 5958CB y LMBP 5959CB .

También se describe un método de examen *in vivo* usando células tumorales transformadas con un vector de expresión que comprende una secuencia de promotor que consiste en un constructo de ADN recombinante que comprende uno de los elementos de secuencia reguladora anteriormente mencionado, tales como los elementos de respuesta a p53 operativamente unidos a elementos de promotor mínimo tales como el promotor de interleucina 6 (IL6) mínimo (phu.IIL6Pluc+ Plaisance *et al.* (1997) MCB 17, 3733-3743), el promotor de E1B mínimo (pMCSluc disponible comercialmente de Stratagene) o el promotor de TK para luciferasa disponible comercialmente (pTKluc Promega). Las células tumorales transformadas de manera estable usadas en el examen *in vivo* pueden consistir en células de carcinoma colorrectal transformadas de manera estable o células de carcinoma de ovarios transformadas de manera estable, preferiblemente células A2780 o células HCT116, que comprenden un vector de expresión que contienen una secuencia de ácido nucleico que codifica para una proteína fluorescente operativamente unida a un promotor que responde a activadores de p53, comprendiendo preferiblemente dicho promotor el elemento de respuesta a p53 (SEQ ID No. 10), consistiendo incluso más preferiblemente dicho promotor en el promotor de VHS-TK mínimo que comprende el elemento de respuesta a p53 (SEQ ID No. 13). La proteína fluorescente puede seleccionarse del grupo que consiste en EGFP, EYFP, DsRed, ZsGreen, Zs Yellow, HcRed o proteínas fluorescentes desestabilizadas tales como pDsRed, pHcRed1, pd2EGFP o pd2EYFP y puede ser específicamente la proteína fluorescente ZsGreen. Las células transformadas de manera estable usadas en el método *in vivo* pueden consistir en células A2780 o HCT116 transfectadas con el vector p53RE_TK/pGL3-Basic-ZsGreen (figura 6).

Cuando se usan en métodos de examen *in vivo*, las células tumorales transformadas de manera estable administradas a dicho roedor deben haber tenido suficiente tiempo para formar un tumor en dicho roedor. Un tumor y en particular un tumor sólido medible con calibre se forma normalmente 7-20 días tras la administración de las células tumorales transformadas de manera estable al roedor. En una realización específica, usando las células A2780 transformadas según la invención y en particular usando las células de carcinoma de ovarios depositadas en la BCCM con los números de registro LMBP 5958CB o LMBP 5959CB, se obtiene un tumor medible con calibre 12 días tras la inyección de las células.

Por consiguiente, en una realización adicional, la presente invención proporciona un método para producir un modelo de roedor *in vivo* para identificar compuestos con actividad antineoplásica, comprendiendo dicho método las etapas de:

administrar células tumorales según la invención a un roedor, en el que las células tumorales transformadas de manera estable según la invención se administran normalmente como una suspensión de células tumorales que comprende de 10^6 a 10^8 células que se inyectan bajo la piel del roedor; y

dejar a las células tumorales suficiente tiempo para formar un tumor en dicho roedor, que en la realización particular usando las células de carcinoma de ovarios tal como se explicó de manera resumida anteriormente, consiste normalmente en 7-14 días, más preferiblemente 9-12 días y en particular 12 días.

El modelo de roedor que puede obtenerse siguiendo el método anteriormente mencionado puede usarse posteriormente en un método *in vivo* para identificar compuestos con actividad antineoplásica, comprendiendo dicho método las etapas de:

administrar un compuesto potencialmente activo a un roedor según la invención, preferiblemente un ratón desnudo al que se le inyectaron células de carcinoma de ovarios tal como se explicó de manera resumida anteriormente, en el que el compuesto potencialmente activo puede administrarse a través de todas las vías de administración clínicamente relevantes incluyendo por vía intravenosa, por vía oral y por vía intraperitoneal; y

evaluar el efecto de dicho compuesto potencialmente activo sobre las células tumorales midiendo la expresión del gen indicador.

A lo largo de toda esta descripción, las expresiones “métodos convencionales”, “protocolos convencionales” y “procedimientos convencionales”, cuando se usan en el contexto de técnicas de biología molecular, deben entenderse como protocolos y procedimientos que se encuentran en un manual de laboratorio habitual tal como: Current Protocols in Molecular Biology, editores F. Ausubel *et al.*, John Wiley and Sons, Inc. 1994, o Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T., Molecular Cloning: A laboratory manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 1989.

Ejemplo 1**MATERIAL Y MÉTODOS***Cultivo celular y reactivos*

5 Se cultivaron células A2780 (ATCC) en medio R-PMI 1640 complementado con FCS al 10%, L-glutamina 2 mM y gentamicina a 37°C en un incubador humidificado con 5% de CO₂. Se cultivaron células HCT116 (ATCC) en medio 5a de Mc Coy complementado con FCS al 10%, L-glutamina 2 mM y gentamicina a 37°C en un incubador humidificado con 5% de CO₂. Todas las disoluciones de cultivo celular las proporciona Gibco-BRL (Gaithersburg, MD). Otros materiales los proporciona Nunc.

Producción de un fragmento de promotor de p21 de 4500 kb y un fragmento de promotor de p21 de 1300 kb

15 Se extrajo ADN genómico de células A2780 en proliferación y se usó como molde para el aislamiento por PCR anidada del promotor de p21. Se realizó la primera amplificación durante 20 ciclos a una temperatura de hibridación de 55°C usando el par de oligonucleótidos GAGGGCGCGGTGCTTGG (SEQ ID No.2) y TGCCGCCGCTCTCTCACC (SEQ ID No.3) con el ADN genómico como molde. El fragmento de 4,5 kb resultante que contenía el fragmento de -4551 a +88 en relación con la caja TATA volvió a amplificarse con los oligonucleótidos TCGGGTACCGAGGGCGCGGTGCTTGG (SEQ ID No.4) y ATACTCGAGTGCCGCCGCTCTCTCACC (SEQ ID No.5) durante 20 ciclos con hibridación a 88°C dando como resultado un fragmento de 4,5 kb y posteriormente con el par de oligonucleótidos TCGGGTACCGGTAGATGGGAGCGGATAGACACATC (SEQ ID No.6) y ATACTCGAGTGCCGCCGCTCTCTCACC (SEQ ID No.7) durante 20 ciclos con hibridación a 88°C dando como resultado un fragmento de 1,3 kb que contenía el fragmento de -1300 a +88 en relación con la caja TATA. Se usaron los sitios de restricción XhoI y KpnI presentes en los oligonucleótidos (secuencia subrayada) para la subclonación.

Constructo de promotor de p21

30 Se eliminó el indicador luciferasa de pGL3-basic y se sustituyó por el indicador ZsGreen (del plásmido pZsGreen1-N1) en los sitios de restricción KpnI y XbaI. Se construyó pGL3-basic-ZsGreen-1300 mediante inserción del fragmento de 1,3 kb anteriormente mencionado de la región de promotor de p21 humano en pGL3-basic-ZsGreen en los sitios XhoI y KpnI. Todas las enzimas de restricción las proporciona Boehringer Mannheim (Alemania).

Transfección transitoria y transfección estable

35 Se sembraron en placa células A2780 en una placa de 6 pocillos a una densidad de 2×10^5 células, se incubaron durante 24 horas y se transfectaron con 2 μ g de vector pGL3-basic-ZsGreen-1300 y 0,2 μ g de vector pSV2neo usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Bruselas, Bélgica) tal como describe el fabricante. Se seleccionaron las células transfectadas durante 10 días con G418 (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) y se hicieron crecer suspensiones de células individuales. Tras tres semanas, se obtuvieron 80 clones individuales.

Inducción de la actividad promotora de p21

45 Se expandieron el conjunto transfectado de A2780 y los 80 clones seleccionados y se sembraron a 10000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. 24 horas tras la siembra, se trataron las células durante otras 24 horas con compuestos dirigidos (que afectan a los sitios sp1 en la región de promotor de p21 proximal) o agentes que dañan el ADN (que afectan a los elementos de respuesta a p53). Posteriormente, se fijaron las células con PFA al 4% durante 30 min. y se tiñeron por contraste con colorante Hoechst. Se monitorizó la activación del promotor de p21 que conducía a la producción de ZsGreen y por tanto a la fluorescencia, usando el aparato Ascent Fluoroskan (Thermo LabSystems, Bruselas, Bélgica) y mediante microscopio de fluorescencia (Zeiss).

Evaluación in vivo

55 Se inyectó el clon seleccionado por vía subcutánea (10^7 células/200 μ l) en el flanco de ratones desnudos y se obtuvo un tumor medible con calibre tras 12 días. Desde el día 12 en adelante, se les dosificó diariamente a los animales por vía oral durante 6 días disolvente, Mitsui 20 mpk (a.k.a. MS-275 - Shering - número de registro 209783-80-2) o JNJX 40 mpk (10, 10 y 4 animales respectivamente). Se evaluaron los tumores para determinar la fluorescencia mediante el sistema de obtención de imágenes de cuerpo completo automatizado de desarrollo interno (estereomicroscopio fluorescente tipo Olympus® SZX12 equipado con un filtro GFF y acoplado a una cámara CCD tipo JAI® CV-M90 controlado mediante un paquete de software basado en el software IMAQ Vision de National Instruments®).

60

RESULTADOS

Inducción del fragmento de promotor de 1300 pb de p21 mediante inhibidores de HDAC in vitro

5 Se trataron un conjunto transfectado estable de A2780 y los 80 clones seleccionados con TSA (10^{-7} M), bleomicina (15 mU) y Mitsui (10^{-6} M) tal como se describe en M&M. De 80 clones, 6 clones respondieron al tratamiento con TSA y Mitsui. Cuatro de estos clones mostraron una expresión de fluorescencia basal tan baja que no pudo detectarse con el aparato Fluoroskan, pero pudieron seleccionarse mediante evaluación manual de la producción de ZsGreen usando el microscopio de fluorescencia. Los otros dos clones pudieron medirse y mostraron una inducción de 5
10 veces mediante TSA (10^{-7}) y una inducción de 1,2-1,5 veces mediante Mitsui (10^{-6}).

Se evaluaron estos 6 clones en una respuesta a la dosis a agentes que dañan el ADN (camptotecina, bleomicina y doxorubicina) e inhibidores de HDAC (TSA, Mitsui, compuesto X y Saha). El clon 1 mostró una inducción de 5 veces en respuesta a TSA 10^{-7} , 1,8 veces a Mitsui 10^{-6} M y 3 veces a JNJX 10^{-6} M (figura 1). Los agentes que dañan el
15 ADN no pudieron activar el fragmento de 1300 pb del promotor de p21 (figura 1). El clon 5 mostró respuestas idénticas (figura 1). La inducción del clon 2, 3, 4 y 6 no pudo medirse mediante el aparato Fluoroskan debido a problemas de sensibilidad del sistema, pero pudo visualizarse un aumento en la fluorescencia usando el microscopio de fluorescencia (datos no mostrados).

20 *Inducción del promotor de p21 mediante inhibidores de HDAC in vivo*

Se inyectaron a los ratones los clones 1, 2, 3 y 5 y se les dosificó el compuesto (disolvente, Mitsui 20 mpk o JNJ'99 40 mpk) tal como se describe en M&M. La inducción y expresión de ZsGreen basal eran demasiado bajas en el clon 2 y 3 como para detectarse mediante el sistema de obtención de imágenes de cuerpo completo automatizado. Pudo
25 medirse la fluorescencia basal del clon 1 y 5 y la inducción de ZsGreen era muy clara 3 días tras la administración de la primera dosis y alcanzó una meseta tras 5 días (figura 2).

DISCUSIÓN

30 Se ha mostrado que varios inhibidores de histona desacetilasa conocidos tales como TSA, Mitsui y SAHA inducen la transactivación del promotor de $p21^{waf1, cip1}$ murino a través de la región de -60 pb a +40 pb en relación con la caja TATA. Esta región está presente en el presente constructo de promotor de 1300 pb de $p21^{waf1, cip1}$. Los presentes datos confirman que estos agentes inducen la producción de ZsGreen en las células A2780 transfectadas con pGL3-basic-ZsGreen-1300 *in vitro*. Los agentes que dañan el ADN (camptotecina, bleomicina y doxorubicina) ejercen su
35 actividad a través de la regulación dependiente de p53 del promotor de $p21^{waf1, cip1}$. Los elementos de respuesta a p53 están ubicados más en el sentido de 3' del promotor de $p21^{waf1, cip1}$ en regiones no presentes en el fragmento de promotor de 1300 pb. Esto explica la falta de capacidad de respuesta del sistema a agentes que dañan el ADN. A partir de estos datos, se concluye que el presente sistema indicador proporciona un modelo para investigar los acontecimientos moleculares asociados con la desacetilación de histonas y revela la especificidad del sistema
40 indicador *in vitro*. Este concepto puede usarse también para someter a prueba agentes que dañan el ADN específicamente o cualquier otro fármaco adaptando el elemento de respuesta.

La acción *in vivo* de un compuesto es mucho más compleja y necesita estudios en animales laboriosos para determinar si el compuesto se introduce en la circulación, alcanza el tumor en una forma activa y si la concentración
45 dentro del tumor es lo suficientemente alta como para ejercer su actividad biológica. Se ha mostrado en estudios de PK/PD más complicados que el compuesto Mitsui puede alcanzar el tumor y que la concentración alcanzada en el tumor es lo suficientemente alta como para detener el crecimiento del tumor. En este informe, se muestra que el compuesto Mitsui induce la fluorescencia en el xenoinjerto de A2780 transfectado con pGL3-basic-ZsGreen-1300 tras 4 días de tratamiento, lo que implica que el compuesto alcanza el tumor y ejerce su acción biológica *in vivo*.
50 Esto confirma que este sistema es una herramienta *in vivo* muy poderosa que permite obtener conclusiones rápidas y precisas sobre la actividad *in vivo*, lo que permite que se evalúen compuestos a puntos de tiempo más tempranos en el proceso de descubrimiento de fármacos sin realizar estudios PK/PD que consumen tiempo y compuesto.

Ejemplo 2 (con fines ilustrativos solamente)

55

MATERIAL Y MÉTODOS

Cultivo celular y reactivos

60 Se cultivaron células A2780 (ATCC) en medio R-PMI 1640 complementado con FCS al 10%, L-glutamina 2 mM y gentamicina a 37°C en un incubador humidificado con 5% de CO₂. Se cultivaron células HCT116 (ATCC) en medio 5a de Mc Coy complementado con FCS al 10%, L-glutamina 2 mM y gentamicina a 37°C en un incubador humidificado con 5% de CO₂. Todas las disoluciones de cultivo celular las proporciona Gibco-BRL (Gaithersburg, MD). Otros materiales los proporciona Nunc.

Producción de un elemento de respuesta a p53

Se encargaron los siguientes oligos p53RE directo CCCTGCCTGGACTTGCCTGGGTCGACCCTGCCTGGACTTGCCTGGC (SEQ ID No.8) y p53RE inverso TCGAGCCAGGCAAGTCCAGGCAGGGTCGACCCAGGCAAGTCCAGGCAGGGAGCT (SEQ ID No.9) a Eurogentec. Se hibridó el par de oligonucleótidos mediante una disminución escalonada de la temperatura de hibridación cada 5 minutos partiendo de 65°C pasando por 50°C, 40°C, 30°C hasta una temperatura final de 20°C en tampón de hibridación (tris 150 mM pH 7,6, MgCl₂ 15 mM, DTT 23 mM). Se formó un fragmento con salientes de SacI/XhoI, para fines de clonación (el elemento de respuesta es la secuencia subrayada) (SEQ ID No.10):

10 TCCCTG CCTGGACTTG CCTGGGTCGA CCCTGCCTGG ACTTGCCTGG C
CTCGAGGGAC GGACCTGAAC GGACCCAGCT GGGACGGACC TGAACGGACC GAGCTC

Constructo

15 Se eliminó el indicador luciferasa del pGL3-basic y se sustituyó por el indicador ZsGreen (a partir del plásmido pZsGreen1-N1) en los sitios de restricción KpnI y XbaI. Se obtuvo el promotor mínimo de VHS-TK (promotor basal de timidina cinasa del virus del herpes simple) mediante PCR, se usó el plásmido pTK Luc (Clontech n.º 6252-1) como molde. Se diseñaron cebadores para amplificar el promotor mínimo de VHS-TK junto con el sitio de clonación múltiple del plásmido pTK Luc. Se realizó la amplificación durante 30 ciclos a una temperatura de hibridación de 20 58°C usando el par de oligonucleótidos GTACCGAGCTCTTACGCGTG (SEQ ID No. 11) y GTGGATCCCTGCTTCATCCCCGTGGC (SEQ ID No. 12) con el plásmido como molde. El sistema Expand High Fidelity PCR lo proporcionó Roche. Se usaron los sitios de restricción SacI y BamHI presentes en los oligonucleótidos (secuencia subrayada) para la subclonación. Mediante la inserción del fragmento de PCR de 197 pb 25 anteriormente mencionado en el pGL3-basic-ZsGreen1-N1 en los sitios SacI/BglII, se construyó el constructo TK/pGL3-basic-ZsGreen. Todas las enzimas de restricción las proporcionó Roche (Alemania). Se clonó entonces el elemento de respuesta a p53, en los sitios de clonación SacI/XhoI del vector TK/pGL3-basic-ZsGreen, en frente del promotor de TK para obtener el constructo p53RE_TK/pGL3-basic-ZsGreen (figura 6).

Transfección estable

30 Se sembraron en placa células A2780 y células HCT116 en una placa de 6 pocillos a una densidad de 4x10⁵ células, se incubaron durante 24 horas y se transfectaron con 2 µg de vector p53RE_TK/pGL3-basic-ZsGreen y 0,2 µg de vector pMC1-neo-Poly A usando Lipofectamine y Plus Reagent (Invitrogen, Bruselas, Bélgica) tal como se describe por el fabricante. Se seleccionaron las células transfectadas durante 16 días con G418 (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) y se hicieron crecer suspensiones de células individuales. Tras tres semanas, se obtuvieron 60 clones individuales a partir de las células HCT116 transfectadas y se obtuvieron 40 clones individuales a partir de las células A2780 transfectadas.

Inducción de la actividad de p53RE_tk

40 Se expandieron el conjunto transfectado de A2780 y HCT116 y los clones seleccionados y se sembraron a 20000 células por pocillo en placas de 96 pocillos. 24 horas tras la siembra, se trataron las células durante otras 24 horas con agentes que dañan el ADN (que afectan a los elementos de respuesta a p53). Se monitorizó la activación de 45 p53RE_tk que conducía a la producción de ZsGreen y por tanto a la fluorescencia, mediante el aparato Ascent Fluoroskan (Thermo LabSystems, Bruselas, Bélgica) y mediante microscopio de fluorescencia (Zeiss).

RESULTADOS

Inducción de p53RE_tk mediante un agente que daña el ADN in vitro

50 Se trataron el conjunto transfectado estable de HCT116 y A2780 y los clones seleccionados con actinomicina D (10 ng/ml). De los clones seleccionados, 6 clones de HCT116 y 2 de A2780 respondieron al tratamiento con actinomicina D. Para estos 8 clones, pudo detectarse una inducción de la fluorescencia de al menos dos veces con el aparato Fluoroskan en respuesta al tratamiento. En particular el clon 36 de Es2780 y los clones 5 y 36 de HCT116 55 mostraron una expresión de fluorescencia basal baja detectable con un fuerte factor de inducción en respuesta al tratamiento con actinomicina (figura 3).

Listado de secuencias

60 <110> Janssen Pharmaceutica N.V.
<120> Modelo animal para la identificación rápida de compuestos activos farmacéuticos *in vivo*
65 <130> PRD 2036

<150> PCT/EP03/02264

<151> 05-03-2003

5 <160> 14

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

10 <211> 1279

<212> ADN

15 <213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Fragmento de 1300 pb de la secuencia de promotor de p21 desde la posición -1300 hasta +88 en relación con la caja TATA

<400> 1

ES 2 368 328 T3

ggtaccggta gatgggagcg gatagacaca tcaactcattt ctgtgtctgt cagaagaacc 60
 agtagacact tccagaattg tcctttattt atgtcatctc cataaaccat ctgcaaatga 120
 gggttatttg gcattttttgt cattttggaa ccacagaaat aaaggatgac aagcagagag 180
 ccccgggcag gaggcaaaag tcctgtgttc caactatagt catttctttg ctgcatgatc 240
 tgagttaggt caccagactt ctctgagccc cagtttcccc agcagtgtat acgggctatg 300
 tggggagtat tcaggagaca gacaactcac tcgtcaaate ctccccttcc tggccaacaa 360
 agctgctgca accacagggg tttcttctgt tcaggtgagt gtaggggtgta gggagattgg 420
 ttcaatgtcc aattcttctg tttccctgga gatcaggttg cccttttttg gtagtctctc 480
 caattccctc cttcccggaa gcatgtgaca atcaacaact ttgtatactt aagttcagtg 540
 gacctcaatt tcctcatctg tgaataaac gggactgaaa aatcattctg gcctcaagat 600
 gctttgttgg ggtgtctagg tgctccaggt gcttctggga gaggtgacct agtgagggat 660
 cagtgggaat agaggtgata ttgtggggct tttctggaaa ttgcagagag gtgcatcggt 720
 tttataattt atgaattttt atgtattaat gtcatectcc tgatcttttc agctgcattg 780
 ggtaaatcct tgccctgccag agtgggtcag cgggtgagcca gaaagggggc tcattetaac 840
 agtgctgtgt cctcctggag agtgccaact cattctccaa gtaaaaaaag ccagatttgt 900
 ggctcacttc gtggggaaat gtgtccagcg caccaacgca ggcgagggac tgggggagga 960
 gggaaagtgcc ctctgcagc acgcgaggtt cggggaccgg ctggcctgct ggaactcggc 1020
 caggctcagc tgctccgcgc tgggcagcca ggagcctggg ccccggggag ggcgggtccc 1080
 ggcggcgcgg tgggcccagc gcgggtcgc tccttgaggc gggcccgggc ggggcgggtt 1140
 tatatcaggg ccgcgctgag ctgcgccagc tgaggtgtga gcagctgccg aagtcagttc 1200
 cttgtggagc cggagctggg cgcggattcg ccgaggcacc gaggcactca gaggaggtga 1260
 gagagcggcg gcactcgag 1279

<210> 2

5 <211> 17

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Cebador directo específico de P21

15 <400> 2

gagggcgcgg tgcttgg

17

<210> 3

20 <211> 18

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador inverso específico de p21
 <400> 3
 10 tgccgccgct ctctacc 18
 <210> 4
 15 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Cebador directo específico de p21
 25 <400> 4
 tcgggtaccg agggcgcggt gcttgg 26
 <210> 5
 30 <211> 27
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador inverso específico de p21
 40 <400> 5
 atactcgagt gccgccgctc tctacc 27
 45 <210> 6
 <211> 35
 <212> ADN
 50 <213> Secuencia artificial
 <220>
 55 <223> Cebador directo específico de p21
 <400> 6
 60 tcgggtaccg gtagatggga gcggatagac acatc 35
 <210> 7
 <211> 27
 65 <212> ADN

<213> Secuencia artificial
 <220>
 5 <223> Cebador inverso específico de p21
 <400> 7
 atactcgagt gccgccgctc tctcacc 27
 10 <210> 8
 <211> 46
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Cebador directo de p53RE
 <400> 8
 25 ccctgcctgg actgcctgg gtcgaccctg cctggacttg cctggc 46
 <210> 9
 <211> 54
 30 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> Cebador inverso de p53RE
 <400> 9
 40 tcgagccagg caagtccagg cagggctgac ccaggcaagt ccaggcaggg agct 54
 <210> 10
 45 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> Elemento de promotor de p53 RE
 55 <400> 10
 tcctgcctg gacttgctg gctgaccct gcctggactt gcctggc 47
 <210> 11
 60 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 368 328 T3

```

<220>
<223> Cebador directo de VHS-TK
5 <400> 11
gtaccgagct cttacgcgtg                                     20
<210> 12
10 <211> 26
<212> ADN
15 <213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador inverso de VHS-TK
20 <400> 12
gtggatccct gcttcatccc cgtggc                             26
25 <210> 13
<211> 256
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial
<220>
35 <323> Promotor mínimo de p53RE_TK
<400> 13
    aggtaccgag ctccctgcct ggacttgctt gggtcgacce tgectggact tgectggctc     60
    gagatctgcc gccccgactg catctgcgtg ttcgaattcg ccaatgacaa gacgctgggc     120
    ggggtttgtg tcatcataga actaaagaca tgcaaatata tttcttccgg ggacaccgcc     180
    agcaaacgcg agcaacgggc cacgggggatg aagcagggat ctgcgatcta agtaagctga     240
    tccaccgggc gccacc                                     256
40 <210> 14
<211> 952
45 <212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
50 <223> Inserto de p53RE_TK-ZsGreen usado en el vector básico pGL3
<400> 14

```

ES 2 368 328 T3

aggtaccgag ctccctgcct ggacttgcct gggtcgaccc tgcctggact tgccctggctc 60
 gagatctgcc gccccgactg catctgcgtg ttcgaattcg ccaatgacaa gacgctgggc 120
 ggggtttgtg tcatcataga actaaagaca tgcaaatata tttcttccgg ggacaccgcc 180
 agcaaacgcg agcaacgggc cacgggggatg aagcagggat ctgcatctta agtaagctga 240
 tccaccggtc gccaccatgg cccagtccaa gcacggcctg accaaggaga tgaccatgaa 300
 gtaccgcatg gagggctgcg tggacggcca caagtctgtg atcaccggcg agggcatcgg 360
 ctacccttc aagggcaagc aggccatcaa cctgtgcgtg gtggagggcg gccccttgcc 420
 cttcgccgag gacatcttgt ccgccgcctt catgtacggc aaccgctgtt tcaccgagta 480
 cccccaggac atcgtcgact atttcaagaa ctctgcccc gccggctaca cctgggaccg 540
 ctcttctctg ttcgaggacg gcgccgtgtg catctgcaac gccgacatca ccgtgagcgt 600
 ggaggagaac tgcattgtacc acgagtccaa gttctacggc gtgaacttcc ccgcccagcg 660
 ccccgatgatg aagaagatga ccgacaactg ggagccctcc tgcgagaaga tcatccccgt 720
 gcccagcag ggcattctga agggcgacgt gagcatgtac ctgctgctga aggacgggtg 780
 ccgcttgccg tgcagttcg acaccgtgta caaggccaag tccgtgcccc gcaagatgcc 840
 cgactggcac tcatccagc acaagctgac ccgcgaggac cgcagcgacg ccaagaacca 900
 gaagtggcac ctgaccgagc acgccatcgc ctccggctcc gccttgcct ga 952

REIVINDICACIONES

- 5 1. Célula tumoral transformada de manera estable que se ha transfectado con un vector de expresión que contiene un gen indicador operativamente unido a un promotor, en la que el gen indicador consiste en una proteína fluorescente, y en la que dicho promotor consiste en un fragmento de promotor de p21 definido por SEQ ID NO:1.
2. Célula tumoral según la reivindicación 1, consistiendo las células tumorales transformadas de manera estable en células de carcinoma de ovarios o células de carcinoma colorrectal transformadas de manera estable.
- 10 3. Célula tumoral según las reivindicaciones 1 ó 2, en la que la proteína fluorescente se selecciona del grupo que consiste en EGFP, EYFP, DsRed, ZsGreen, ZsYellow, HcRed o proteínas fluorescentes desestabilizadas tales como pDsRed, pHcRed1, pd2EGFP o pd2EYFP.
- 15 4. Célula tumoral según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 depositada en la Colección Coordinada Belga de Microorganismos como pGL3-basic-ZsGreen-1300-clon 1 el 20 de enero de 2003 con el número de registro LMBP 5958CB.
- 20 5. Célula tumoral según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 depositada en la Colección Coordinada Belga de Microorganismos como pGL3-basic-ZsGreen-1300-clon 2 el 20 de enero de 2003 con el número de registro LMPB 5959CB.
6. Modelo de roedor para examinar la actividad farmacéutica de un compuesto, comprendiendo dicho modelo de roedor una célula tumoral transformada de manera estable según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
- 25 7. Roedor según la reivindicación 6, en el que las células tumorales transformadas de manera estable se inyectan o se implantan quirúrgicamente bajo la piel del roedor.
8. Método para preparar un roedor según la reivindicación 6 ó 7, método que comprende administrar a dicho roedor una cantidad de células según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 suficiente para efectuar la producción de un tumor en dicho roedor.
- 30 9. Método según la reivindicación 8, en el que el roedor está genéticamente inmunocomprometido o es singénico con dicho tumor.
- 35 10. Método *in vitro* de examen de un compuesto para determinar la actividad antineoplásica, que comprende las etapas de:
- 40 poner en contacto las células tumorales según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 con el compuesto que va a someterse a prueba; y
- medir la expresión del gen indicador.
11. Método de examen de un compuesto para determinar la actividad farmacéutica, que comprende las etapas de:
- 45 proporcionar un roedor según la reivindicación 6 ó 7 al que se le ha administrado un compuesto potencialmente activo; y
- evaluar el efecto de dicho compuesto sobre las células tumorales midiendo la expresión del gen indicador.

Fig 1 A

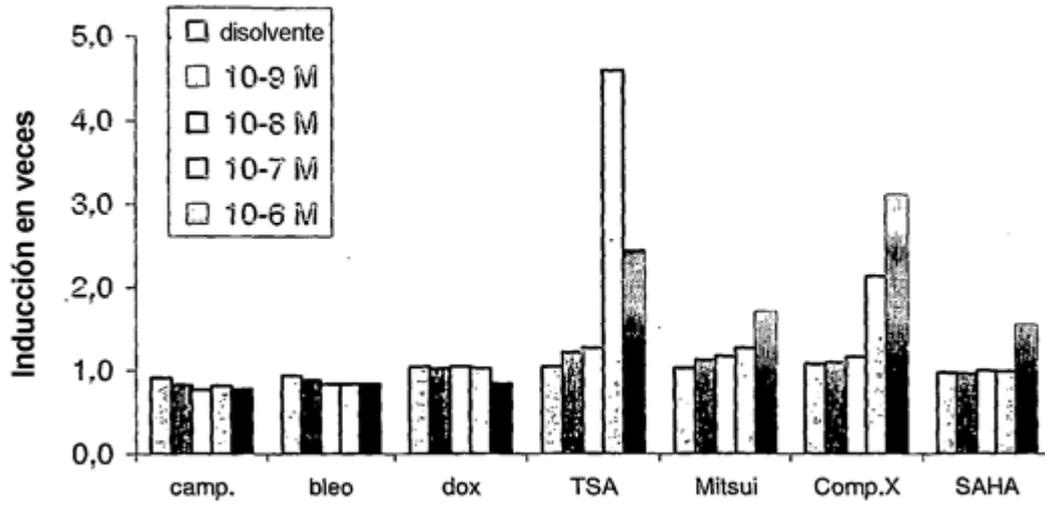


Fig 1 B

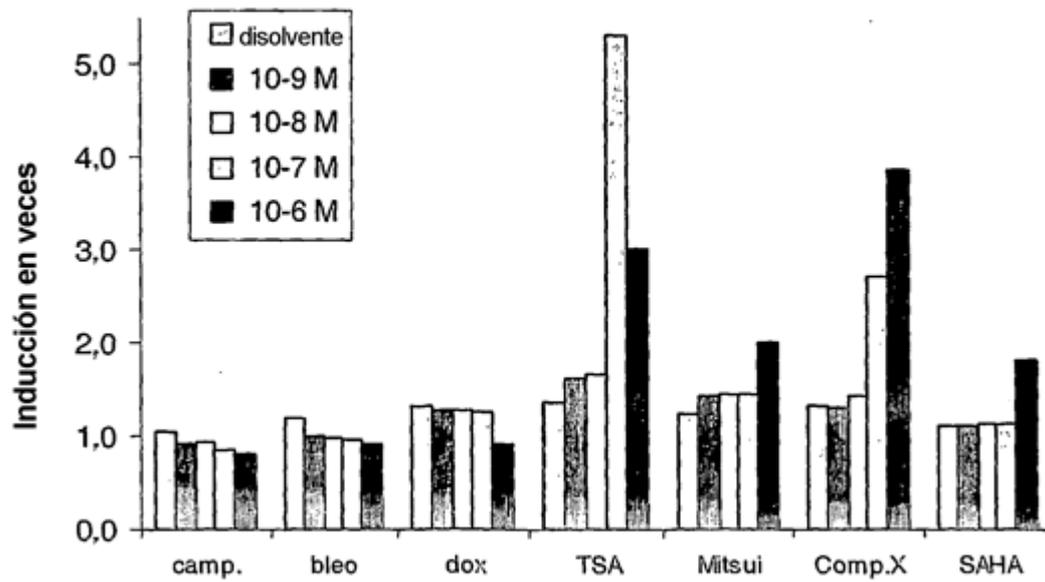


Fig 2

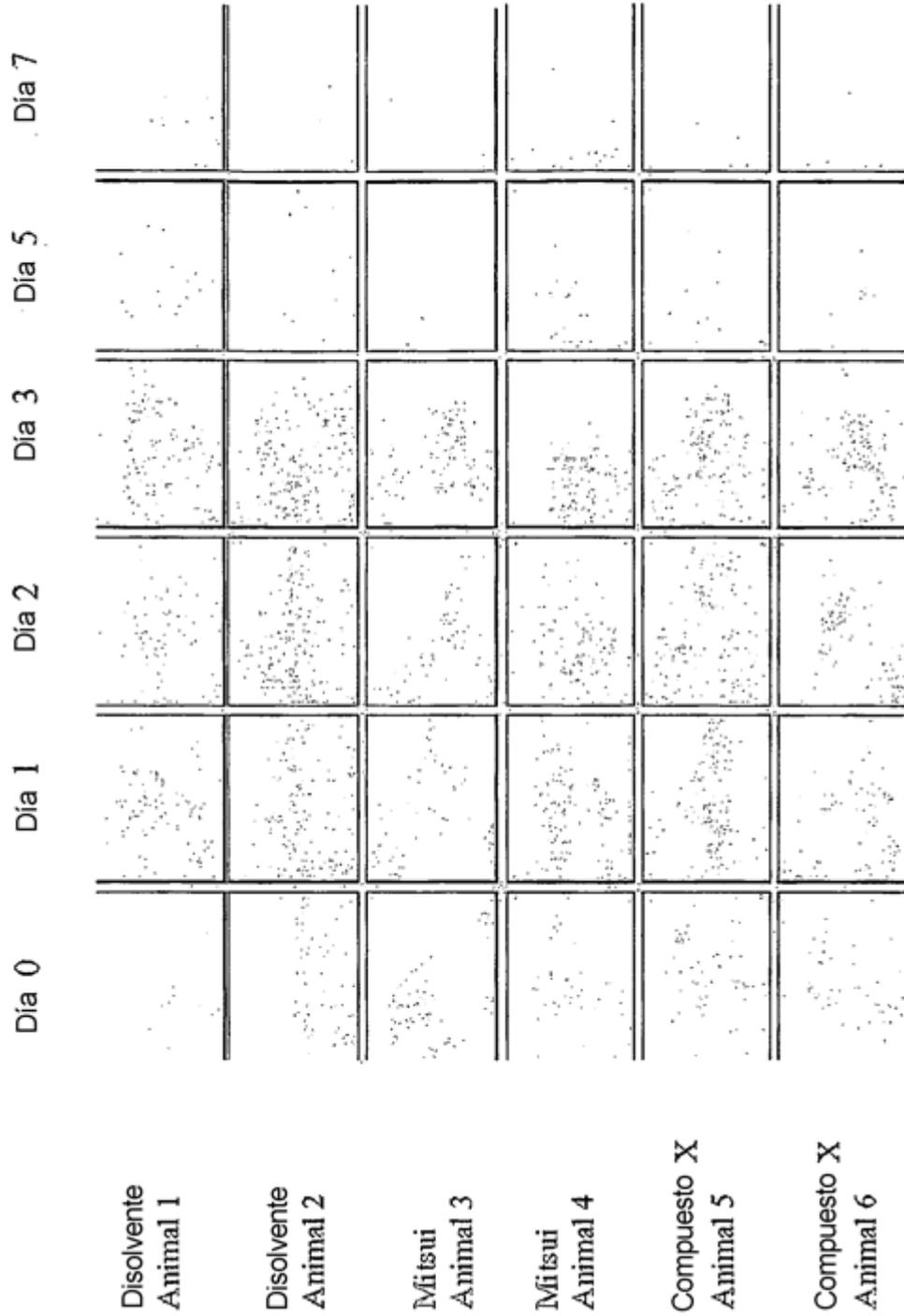


Fig 3

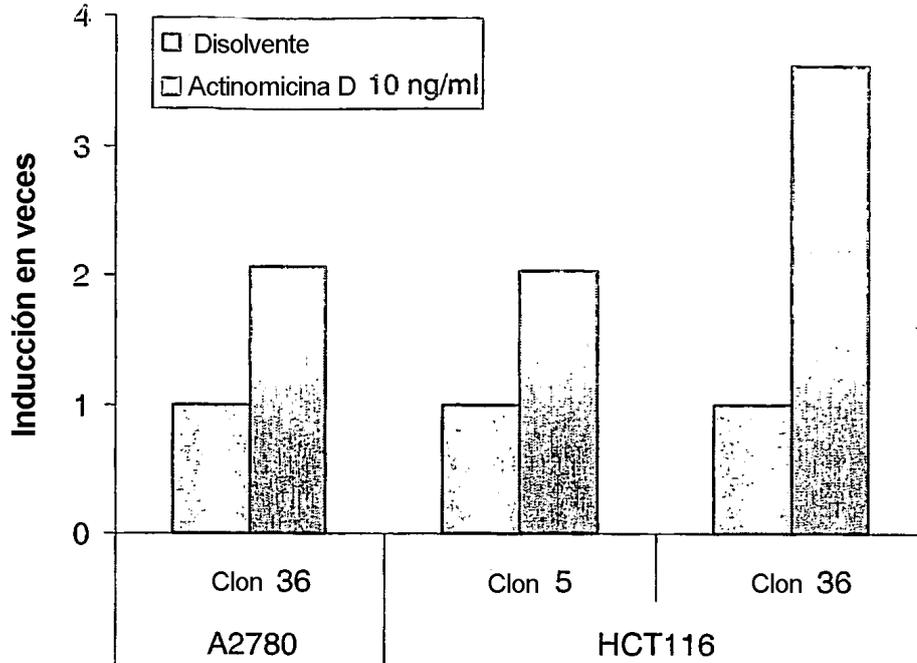


Fig 4

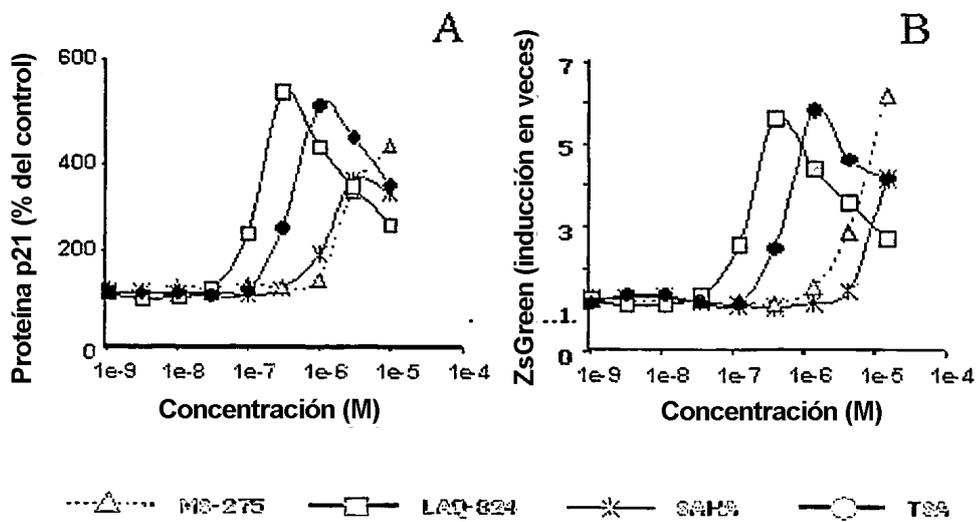


Fig 5

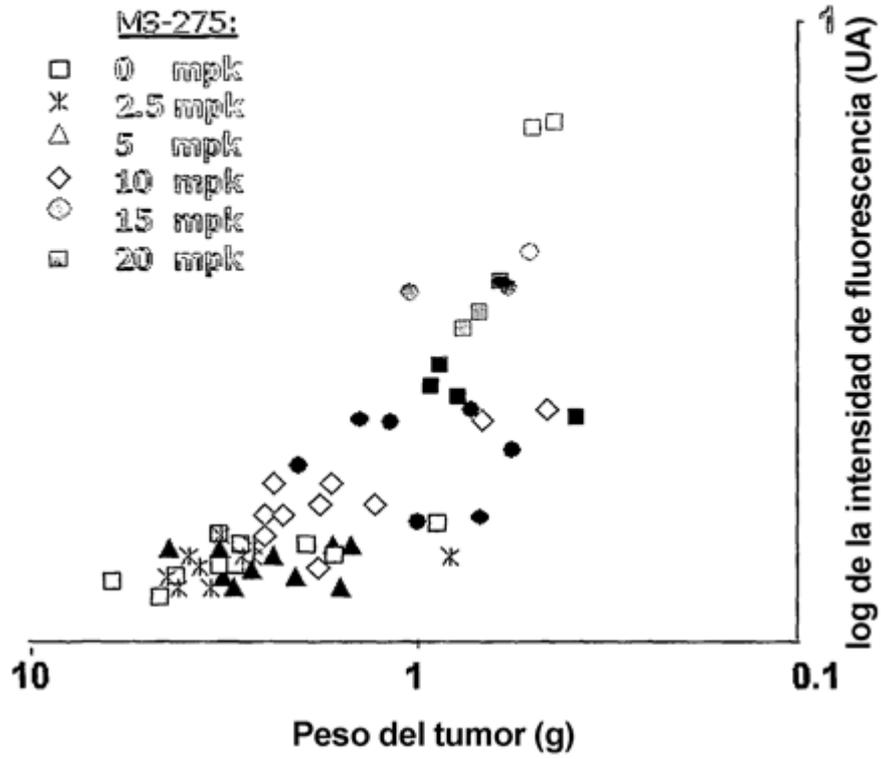


Fig 6

