

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 390 470**

51 Int. Cl.:
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A01K 67/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06740686 .8**
96 Fecha de presentación: **05.04.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1874939**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **09.01.2008**

54 Título: **Complementación dirigida**

30 Prioridad:
05.04.2005 US 99735
17.11.2005 US 282847

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.11.2012

73 Titular/es:
AVEO PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
75 SIDNEY STREET, 4TH FLOOR
CAMBRIDGE, MA 02139, US

72 Inventor/es:
ROBINSON, MURRAY;
O'HAGAN, RONAN;
KANNAN, KARUPPIAH;
CAI, TI;
CHIU, MARIA, ISABEL;
LERNER, LORENA;
LIN, JIE y
ZHOU, YINGHUI

74 Agente/Representante:
ZEA CHECA, Bernabé

ES 2 390 470 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

Complementación dirigida

5 **Solicitudes relacionadas**

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud de Estados Unidos Nº de Serie 11/099.735, presentada el 5 de abril de 2005 y Nº de Serie 11/282.847, presentada el 17 de noviembre de 2005.

10 **Campo de la invención**

[0002] El campo de la invención es la biología molecular, oncología y desarrollo de fármacos.

Antecedentes de la invención

15

[0003] Los modelos de cáncer de ratón en los que los tumores primarios están dirigidos por oncogenes obtenidos por ingeniería genética de forma específica han sido herramientas crecientemente útiles en investigación de cáncer en años recientes. Aunque requieren marcos temporales relativamente largos para cruces genéticos y latencia de tumores espontáneos, los métodos actuales para producir tales ratones modificados por ingeniería genética generalmente han sido adecuados para producir números relativamente pequeños de genotipos para investigación básica.

20

[0004] Se describe un modelo de cáncer de mama inducible en el documento WO2004/089073.

25

[0005] El documento WO 2002/079419 describe un método para identificar un gen relacionado con cáncer. El método incluye (a) proporcionar células en las que la tumorigenicidad depende de la expresión de un oncogén; (b) mantener las células en condiciones en las que las células no expresan el oncogén, siendo las células tumorigénicas cuando se expresa el oncogén; (c) introducir en las células una molécula de ácido nucleico que se integre en el genoma de las células, marcando de este modo los loci en los que se integra la molécula de ácido nucleico; (d) identificar una célula en la que se ha inducido tumorigenicidad por integración de la molécula de ácido nucleico; y (e) identificar, como el gen relacionado con cáncer, un gen que se ha marcado en la célula de (d) por la molécula de ácido nucleico integrada.

30

35

[0006] John D. Allen y Anton Berns han descrito complementación de un oncogén inactivado para producir un tumor de tipo similar como una manera de explorar la ruta bioquímica en la que actúa el oncogén (Allen JD *et al*, *Seminars in Cancer Biology*, vol. 7, 1996, páginas 299-306).

40

[0007] Los tumores primarios de modelos de ratón serían particularmente útiles en estudios de desarrollo de fármacos, así como en investigación básica. Esto se debe a que fenotipos tumorales similares o indistinguibles, por ejemplo, carcinoma de mama, pueden experimentar transformación neoplásica a través de la adquisición espontánea de diferentes mutaciones, que conduce a diferentes genotipos de células tumorales. Debido a los diferentes fenotipos de diferentes tumores, un fármaco dado puede ser eficaz contra un tumor pero no contra el otro tumor del mismo fenotipo. En consecuencia, experimentos de xenotrasplantes convencionales que usan una línea celular de cáncer humano establecida probablemente proporcionan una imagen incompleta. Por la misma razón, los datos de ensayos clínicos simplemente indicarán que el fármaco es eficaz en algunos pacientes pero no en otros.

45

50

[0008] A pesar de la conveniencia de material de tumor primario genéticamente definido para estudios de desarrollo de fármacos, el tiempo y los recursos que se requerirían para generar los modelos de ratón necesarios han hecho poco práctico diseñar estudios de desarrollo de fármacos preclínicos en torno al uso de material tumoral primario en el que la tumorigenicidad depende de un gen preseleccionado de interés, es decir, gen diana.

Descripción resumida de la invención

55

[0009] La invención proporciona un método para producir una célula de ratón tumorigénica, la tumorigenicidad de la cual depende de un gen recombinante de interés, que comprende las etapas de proporcionar una célula de ratón condicionalmente tumorigénica que comprende una o más mutaciones de modo que ambos alelos de un gen supresor de tumores endógeno esté ausente o sea no funcional, y un oncogén recombinante unido operativamente a un promotor inducible, en el que la expresión del oncogén recombinante es necesaria y suficiente para tumorigenicidad de la célula de ratón condicionalmente tumorigénica, y el promotor inducible está en el estado no inducido; e introducir en la célula un gen recombinante de interés que complementa funcionalmente al oncogén, restaurando de este modo la tumorigenicidad sin expresión del oncogén recombinante inducible.

60

65

[0010] Son ejemplos de genes supresores de tumores que pueden suprimirse de forma útil Rb, P53, INK4a, PTEN, LATS, Apaf1, Caspasa 8, APC, DPC4, KLF6, GSTP1, ELAC2/HPC2, NKX3.1, ATM, CHK2, ATR, BRCA1, BRCA2, MSH2, MSH6, PMS2, Ku70, Ku80, DNA/PK, XRCC4, Neurofibromatosis de Tipo 1, Neurofibromatosis de Tipo 2,

Poliposis Adenomatosa del Colon, la proteína supresora de tumores de Wilms, Patched y FHIT. Son genes supresores de tumores preferentemente suprimidos INK4a, P53, PTEN y Rb. Se prefiere particularmente supresión de INK4a.

5 **[0011]** Los ejemplos de oncogenes recombinantes útiles en la presente invención incluyen Her2, KRAS, HRAS, NRAS, EGFR, MDM2, TGF- β , RhoC, AKT, c-myc, β -catenina, PDGF, C-MET, PI3K-110 α , CDK4, ciclina B1, ciclina D1, gen receptor de estrógenos, gen receptor de progesterona, ErbB1, ErbB3, PLK3, KIRREL, ErbB4, TGF α , ras-GAP, Shc, Nck, Src, Yes, Fyn, Wnt Bcl2, antígeno PyV MT y antígeno SV40 T. Son oncogenes preferidos Her2, KRAS C-MET, PI3K-CA y AKT. Se prefieren particularmente Her2 y KRas.

10

[0012] Los ejemplos de sistemas promotores inducibles adecuados para controlar la expresión del oncogén recombinante incluyen un sistema regulador del promotor dependiente de tetraciclina, un sistema promotor de metalotionina, un sistema promotor de IPTG/lacI, un sistema promotor de ecdisona, y un sistema Gal4/UAS.

15 **[0013]** También se describe en la presente memoria un método para ensayar un compuesto con respecto a efectos antitumorales. El método incluye las etapas de: (a) producir, como se ha descrito anteriormente, una multiplicidad de células de ratón tumorogénicas, la tumorogenicidad de las cuales depende de la expresión de un gen recombinante de interés; (b) implantar las células en una multiplicidad de ratones hospedadores; (c) obtener tumores en los ratones derivados de las células implantadas; (d) administrar cantidades adecuadas de un
20 compuesto de ensayo a los ratones; y (e) determinar efectos antitumorales, si los hubiera, del compuesto de ensayo.

[0014] Como se usa en la presente memoria, “knockout de supresor de tumores” significa una o más mutaciones tales que ambos alelos de un gen supresor de tumores endógeno están ausentes o no son funcionales.

25 **[0015]** A no ser que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende habitualmente por un experto habitual en la materia a la que pertenece la invención. En caso de conflicto, la presente memoria descriptiva, incluyendo definiciones, prevalecerá.

Breve descripción de los dibujos

30

[0016]

La **FIGURA 1** es un dibujo esquemático que ilustra el concepto básico de complementación dirigida.

35

La **FIGURA 2** es un dibujo esquemático que ilustra la propagación *in vivo* y “amplificación” de material tumoral para su uso en estudios de respuesta a fármacos.

La **FIGURA 3** es un dibujo esquemático que ilustra un diseño experimental básico para un ensayo de
40 respuesta a fármacos.

40

La **FIGURA 4** es un histograma que ilustra los niveles de ARNm de MET humano (hMET) y HGF humano (hHGF) en tumores Complementados Directos de MET/HGF (DC). Se ilustran los niveles de PCR en tiempo real (RT-PCR) para ARN de referencia de control humano y de ratón (hRef y Mref) y 14 tumores MET/HGF DC generados de forma independiente. Las flechas indican tumores DC hMEG/hHGF seleccionado para
45 estudios de propagación posteriores.

45

La **FIGURA 5** es un histograma que ilustra los niveles de ARNm de hMET en tumores MET/HGF-DC y propagación posterior. El análisis de RT-PCR se realizó en tres tumores complementados directos de MET/HGF generados de forma independiente y sus muestras propagadas. Se usó ARN de referencia universal humano (hr) como un control positivo y ARN de tumor CON DOXY (on dox) y de referencia universal de ARN de ratón (mr) se usaron como controles negativos.
50

50

La **FIGURA 6** es un histograma que ilustra los niveles de ARNm de hHGF en tumores MET/HGF-DC y propagación posterior. El análisis de RT-PCR se realizó en tres tumores complementados directos MET/HGF generados de forma independiente y sus muestras propagadas. Se usó ARN de referencia universal humano (hr) como un control positivo y se usaron ARN de tumor CON DOXY (on dox) y de referencia universal de ARN de ratón (mr) como controles negativos.
55

55

La **FIGURA 7** es una tabla que resume los resultados de ELISA de captura de hHGF en tumores hMET/hHGF-DC. Se prepararon lisados de células completas de tumores hMET/hHGF DC y sus homólogos propagados. Los niveles de hHGF se midieron por ELISA frente a una curva patrón preparada con proteína hHGF pura recombinante.
60

60

La **FIGURA 8** es una gráfica que resume datos sobre el efecto del anticuerpo anti-HGF (mAb294) en el crecimiento del tumor complementado con MET/HGF derivado de Her2 de mama 4272. Se inyectó anticuerpo
65

65

anti-HGF (mAb294) a 10 mg/kg o 1 mg/kg por vía intraperitoneal en tumor complementado con MET/HGF derivado de Her2 de mama 4272 dos veces por semana. El efecto del tratamiento con anticuerpo en el volumen tumoral se midió durante 30 días. Se usó PBS como un control.

5 **La FIGURA 9** es una gráfica que resume datos sobre el efecto del anticuerpo anti-HGF (mAb294) en el crecimiento del tumor complementado con MET/HGF derivado de Her2 de mama 4275. Se inyectó anticuerpo anti-HGF (mAb294) a 10 mg/kg o 1 mg/kg por vía intraperitoneal en tumor complementado con MET/HGF derivado de Her2 de mama 4275 dos veces por semana. El efecto del tratamiento con anticuerpo en el volumen tumoral se midió durante 30 días. Se usó PBS como un control.

10

Descripción detallada de la invención

15 **[0017]** La presente invención proporciona un método práctico para obtener eficazmente una célula de ratón tumorogénica, cuya tumorogenicidad depende de un gen humano recombinante. Sin pretender quedar ligado a la teoría, los inventores observan que, en general, la transformación neoplásica resulta de una acumulación de mutaciones, en lugar de una mutación sencilla. Por lo tanto, la mera transfección de una célula de ratón de tipo silvestre, por ejemplo, una célula epitelial mamaria, con un nuevo oncogén recombinante de interés no sería suficiente para producir una célula tumorogénica.

20 **[0018]** Para abordar esta cuestión, puede modificarse por ingeniería genética un ratón para que exprese un oncogén recombinante de una manera específica de tejido o específica de órgano, en el tejido u órgano diana, y para que carezca de expresión de un gen supresor de tumores. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 6.639.121; y documento WO 2005/020683. Después de un periodo de latencia durante el que se acumulan mutaciones, surgen tumores de forma espontánea en el tejido u órgano diana.

25

[0019] Estos tumores espontáneos generalmente dependen de la expresión del oncogén recombinante inducible. Cuando el inductor se retira del animal, el tumor retrocede y las células del tejido u órgano diana se hacen no tumorogénicas. Sin embargo, las células del tejido u órgano diana están solamente a una mutación de ser tumorogénicas. Todo lo que se necesita para restaurar la tumorogenicidad es: (1) expresión del oncogén recombinante inducible o (2) expresión de un gen que complemente funcionalmente al oncogén recombinante (FIGURA 1).

30 **[0020]** En lo que se refiere a la presente invención, se dice que las células en este punto son "células condicionalmente tumorogénicas". Se introduce un ácido nucleico que codifica el gen humano recombinante que complementa funcionalmente el oncogén recombinante en la célula condicionalmente tumorogénica por cualquier método adecuado, como se analiza adicionalmente posteriormente. Por lo tanto, se consigue complementación genética de una manera dirigida, para obtener una célula tumorogénica en la que la tumorogenicidad está dirigida por un gen humano preseleccionado. Típicamente, el gen humano es una diana terapéutica potencial para moléculas antineoplásicas en un programa de desarrollo de fármacos.

40

[0021] Puede usarse una fuente sencilla de células condicionalmente tumorogénicas, por ejemplo, un tumor primario sencillo, para generar numerosas líneas de material tumoral primario, dependiendo la tumorogenicidad de cada línea de un gen humano relacionado con cáncer preseleccionado diferente. Puede usarse una segunda fuente de células de ratón condicionalmente tumorogénicas, dependientes de un segundo oncogén, para generar líneas adicionales de material tumoral primario, dependiendo la tumorogenicidad de cada línea de un nuevo conjunto de genes relacionados con cáncer preseleccionados. Puede usarse una tercera fuente de células de ratón condicionalmente tumorogénicas dependientes de un tercer oncogén, y así sucesivamente.

45

50 **[0022]** Una ventaja notable de la presente invención es que cuando se usa una fuente única de células condicionalmente tumorogénicas para generar diferentes líneas de material tumoral primario introduciendo diferentes genes humanos, los efectos de los diferentes genes de interés en los tumores, con y sin tratamiento farmacológico, pueden evaluarse exactamente en el mismo fondo genético. Por el contrario, si se modificaron por ingeniería genética de forma independiente modelos de ratón separados para incorporar los mismos genes y se generan tumores espontáneos, el fondo genético del gen sería diferente en cada modelo. En consecuencia, el tipo de comparación posible con la presente invención no sería posible usando los modelos modificados por ingeniería genética por separado.

55

[0023] Observando la cuestión del fondo genético desde el lado contrario, puede introducirse un gen humano dado por separado en células condicionalmente tumorogénicas de múltiples tumores. Esto permitirá que se evalúe el efecto de un gen humano dado con y sin tratamiento farmacológico en diferentes fondos genéticos.

60

[0024] Para cualquier célula condicionalmente tumorogénica dada, se conoce el oncogén recombinante inducible. Teniendo el conocimiento del oncogén recombinante inducible, el experto puede identificar uno o más genes humanos que complementarán funcionalmente el oncogén recombinante inducible. Por ejemplo, se sabe que la tirosina quinasa receptora, Her2/Neu/ErbB2 es importante para la viabilidad de un subconjunto de cánceres de

65

mama humanos. Se sabe mucho acerca de los mediadores corriente abajo de Her2, y esta información se ha resumido por fuentes disponibles públicamente, por ejemplo, Biocarta. A partir de dicha información, el experto puede predecir un número útil de genes complementarios con una expectativa de éxito razonable. Por ejemplo, se espera que los genes que complementen Her2 incluyan ErbB1/EGFR, ErbB3, PLK3, KIRREL, PI3K, Ras, Akt, Raf, Erk1 y Erk2.

[0025] Uno de los genes que se espera que complemente Her2 es el gen ErbB3, también conocido como HER3, MDA-BF-1 y MGC88033, que codifica un miembro de la familia del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) de tirosinas quinasas receptoras. La proteína unida a membrana ErbB3 tiene un dominio de unión a neuregulina pero no un dominio de quinasa activa. Por lo tanto puede unirse al ligando neuregulina pero no transmitir la señal a la célula a través de fosforilación proteica. Sin embargo, sí forma heterodímeros con otros miembros de la familia del receptor de EGF que tienen actividad quinasa. La heterodimerización conduce a la activación de rutas que conducen a la proliferación o diferenciación celular. La amplificación de este gen y/o sobreexpresión de esta proteína se ha presentado en numerosos cánceres, incluyendo tumores de próstata, vejiga y mama (véase, por ejemplo, van der Horst *et al.*, 2005, *Int J Cancer* 115:519-527; Holbro *et al.*, 2003, *Proc Natl Acad Sci USA*. 100:8933-8938).

[0026] Otro gen que se espera que complemente Her2 es el gen designado PLK3 (quinasa de tipo polo 3), también conocido como CNK, FNK, PRK, y 1_44702099GP201. El gen PLK3 codifica una serina/treonina quinasa potencial y es un miembro de la familia "polo" de serina/treonina quinasas, que probablemente desempeña un papel en la progresión del ciclo celular y tumorigénesis (véase, por ejemplo, Li *et al.*, 1996, *J Biol Chem* 271:19402-19408). Se ha detectado alta expresión de PLK3 en cánceres de vejiga, mama, colon, ovario, páncreas y pulmón (véase, por ejemplo, Dai *et al.*, 2000, *Genes Chromosomes Cancer* 27:332-336; Li *et al.*, 1996, *J Biol Chem* 271:19402-19408).

[0027] Otro gen que se espera que complemente Her2 es el gen designado KIRREL, también conocido como NEPH1, FLJ10845, LOC348416 o 1_154843723, que codifica un miembro proteico de la familia de proteínas de tipo nefrina y contiene un dominio de inmunoglobulina. La expresión de KIRREL es elevada en condrosarcoma, glioblastomas, incluyendo glioblastomas que expresan EGFR activado mutante, astrocitomas y meduloblastomas, adenocarcinoma pancreático, carcinomas de mama y adenocarcinoma de colon y melanomas.

[0028] Otro gen que se sabe que está implicado en la tumorigénesis es mTOR quinasa. Los genes que se espera que complementen mTOR quinasa incluirían PI3Quinasa, Akt1, Rheb y S6Quinasa. Otro gen que se sabe que está implicado en tumorigénesis es KRas. Los genes que se espera que complementen KRas incluirían Raf, Mekk1, Mekk2, Erk1, Erk2 y Jnk1.

[0029] En algunos casos, el experto identificará el gen recombinante de interés en primer lugar, y después trabajará "hacia atrás" para identificar un oncogén que se complementaría funcionalmente por el gen de interés, basándose en el conocimiento disponible para un experto en la materia con respecto a rutas de transducción de señales y rutas bioquímicas que actúan en tipos de cáncer particulares. Ese oncogén se seleccionaría como el oncogén recombinante inducible para su uso en la producción de las células condicionalmente tumorigénicas.

[0030] El gen de interés introducido en las células de ratón condicionalmente tumorigénicas puede ser un gen de ratón. Sin embargo, puede ser preferible introducir el ortólogo humano del gen de interés en las células de ratón condicionalmente tumorigénicas. Una ventaja de emplear el gen humano es que cuando los tumores resultantes se usan posteriormente en estudios de desarrollo de fármacos, los compuestos de ensayo se ensayarán frente a las moléculas diana humanas en lugar de los ortólogos de ratón. El trabajo con las moléculas humanas eliminará una fuente potencial de imprevisibilidad relativamente pronto en el procedimiento de desarrollo de fármacos.

[0031] La fuente de células de ratón condicionalmente tumorigénicas puede ser tumores espontáneos que surgen en ratones transgénicos de línea germinal convencionales tales como los descritos en la Patente de Estados Unidos N° 6.639.121. Como alternativa, pueden ser tumores que surgen en ratones quiméricos tales como los descritos en el documento WO 2005/020683. En cualquier caso, el genoma de las células tumorales contendrá: (a) un oncogén unido operativamente a un promotor inducible, y (b) una mutación que confiere una predisposición genética para desarrollar cáncer, por ejemplo, un knockout de supresor de tumores.

[0032] Cuando se inyectan células madre embrionarias que contienen las modificaciones genéticas deseadas, es decir, un oncogén recombinante inducible y un segundo gen que confiere una predisposición a desarrollar cáncer, en un embrión de ratón de etapa temprana, por ejemplo, un blastocisto, el resultado es un ratón quimérico. Véase, por ejemplo, documento WO 2005/020683. Además del método de inyección de células ES anterior, también puede desarrollarse un animal mosaico a partir de un embrión que se ha infectado con construcciones virales que contienen los elementos genéticos deseados.

[0033] Conservando a la vez (en algún porcentaje de sus células) el mismo diseño genético que un ratón transgénico de línea germinal convencional, un ratón quimérico proporciona ciertas ventajas. Por ejemplo, para

generar un modelo de melanoma transgénico de línea germinal convencional como se describe en Chin *et al.*, 1999, Nature 400:468-472, habría que criar tres líneas animales con cuatro alteraciones genéticas respectivas, es decir, mutación nula INK4a homocigota, un transgén Tyr-rtTA, y un transgén tetO-H-ras, para obtener un animal transgénico con las cuatro alteraciones genéticas. Esta cría extensa requiere una cantidad considerable de tiempo.

- 5 Por el contrario, un modelo de melanoma quimérico no requiere cría. Solo se necesita establecer células ES con las cuatro alteraciones genéticas e inyectarlas en un blastocisto, que se desarrolla a un animal intacto tras su trasplante en el útero de una madre sustituta. El tiempo medio ahorrado puede ser hasta de un año. Una segunda ventaja es que en un ratón quimérico, los tumores espontáneos se desarrollen en un ambiente que incluye células normales. Esto se asemeja a la situación de enfermedad natural de forma más cercana que el ambiente celular en un ratón
10 transgénico de línea germinal, en el que cada célula está modificada genéticamente.

[0034] Puede establecerse una línea celular ES útil introduciendo más de dos construcciones de ácido nucleico en una célula ES simultánea o secuencialmente, en la que cada construcción puede contener uno o más elementos genéticos que provocarán alteraciones genéticas del genoma hospedador. Estos elementos genéticos también
15 pueden insertarse en un vector único, por ejemplo, un vector BAC, PAC, YAC o MAC.

[0035] Las alteraciones genéticas dirigidas pueden introducir un cambio deseado a una localización específica en un gen endógeno. Los ejemplos de los cambios incluyen una mutación nula (knock out) en un locus de gen supresor de tumores o una mutación de activación (knock in) en un oncogén celular. Por ejemplo, se puede reemplazar una
20 región codificante o reguladora de un gen supresor de tumores con un gen marcador seleccionable flanqueado por un par de sitios LoxP; o insertar una mutación negativa dominante en un gen supresor de tumores; o reemplazar el promotor nativo de un oncogén celular con un promotor constitutivo o inducible; o insertar una mutación de activación en un oncogén celular (véase, por ejemplo, Johnson *et al.*, 15 2001, Nature 410: 1111-1116). Una alteración genética tal puede conseguirse por recombinación homóloga. En una construcción de ácido nucleico
25 usada para recombinación homóloga, la alteración genética para introducir en el genoma hospedador está flanqueada por secuencias homólogas de la región genómica diana.

[0036] Los oncogenes útiles para modificar ratones por ingeniería genética (de línea germinal transgénicos o quiméricos) para desarrollar tumores espontáneos inducibles incluyen KRAS, HRAS, NRAS, receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), MDM2, TGF- β RhoC, miembros de la familia de AKT, myc (por ejemplo, c-myc), β -catenina, PDGF, C-MET, PI3K-CA, CDK4, ciclina B1, ciclina D1, gen del receptor de estrógenos, gen del receptor de progesterona, Her2 (también conocido como neu o ErbB2), ErbB1, ErbB3, ErbB4, TGF α , ras-GAP, Shc, Nck, Src, Yes, Fyn, Wnt, miembros de la familia antiapoptótica de Bcl2, y proteínas virales tales como antígenos PyV MT y SV40 T. También pueden usarse mutaciones de activación de estos oncogenes, por ejemplo, Her2V664E, K-
30 RasG12D, y β -catenina Δ 131.

[0037] Los genes supresores de tumores cuya inactivación es útil para modificar por ingeniería genética ratones (de línea germinal transgénicos o quiméricos) para desarrollar tumores espontáneos inducibles incluyen Rb, P53, INK4a, PTEN, LATS, Apaf1, Caspasa 8, APC, DPC4, KLF6, GSTP1, ELAC2/HPC2 o NKX3.1. Otros ejemplos de
40 genes supresores de tumores son los implicados en la reparación de daño de ADN (por ejemplo, ATM, CHK2, ATR, BRCA1, BRCA2, MSH2, MSH6, PMS2, Ku70, Ku80, DNA/PK, XRCC4 o MLH1), y señalización y diferenciación celular (por ejemplo, Neurofibromatosis de Tipo 1, Neurofibromatosis de Tipo 2, Poliposis Adenomatosa de Colon, la proteína supresora de tumores de Wilms, Patched o FHIT). Además de mutación diana, los genes supresores de tumores pueden inactivarse por un ARN antisentido, ARN de interferencia (ARNi), o agente de ribozima expresado a
45 partir de una construcción integrada de forma estable en el genoma hospedador.

[0038] Los ratones modificados por ingeniería genética para desarrollar tumores espontáneos inducibles para su uso como una fuente de células condicionalmente tumorogénicas pueden desarrollarse a partir de células ES que contienen un oncogén activo introducido así como uno o más genes supresores de tumores endógenos inactivados.
50 Por ejemplo, las células ES pueden contener alteraciones genéticas que den como resultado la expresión de una forma activada de EGFR (designada EGFR*) en combinación con expresión de p16^{INK4a} o p19^{ARF} reducida (por ejemplo, alteraciones genéticas que producen un genotipo EGFR*⁺ y INK4a/ARF^{-/-}); alteraciones genéticas que dan como resultado la expresión de PDGF en combinación con expresión de p53 reducida (por ejemplo, alteraciones genéticas que producen un genotipo PDGF⁺ y p53^{-/-}); alteraciones genéticas que dan como resultado expresión de
55 TGF- α en combinación con expresión de p53 reducida (por ejemplo, alteraciones genéticas que producen un genotipo TGF α ⁺ y p53^{-/-}); y alteraciones genéticas que dan como resultado expresión de PTEN reducida y expresión de p16^{INK4a} o p19^{ARF} reducida (por ejemplo, alteraciones genéticas que producen un genotipo PTEN^{-/-} e INK4a/ARF^{-/-}).

[0039] Un ejemplo de conjunto adecuado de modificaciones genéticas para producción de un modelo de cáncer de pulmón es TetO-EGFR* CCSP-rtTA, p53^{-/-} y PGK-puromicina (marcador de resistencia a antibióticos seleccionable). Un ejemplo de un conjunto adecuado de modificaciones genéticas para producción de un modelo de cáncer de colon es TetO- K-RAS, vilina-rtTA, APC^{-/-} y PGK-puromicina. Un ejemplo de un conjunto adecuado de modificaciones genéticas para producción de un modelo de cáncer de glioblastoma es TetO-EGFR*, Nestina-rtTA, p53^{-/-} y PGK-

puromicina. Un ejemplo de un conjunto adecuado de modificaciones genéticas para producción de un modelo de cáncer de próstata es TetO-AKT1, probasina-rtTA, Rb^{-/-} y PGK-puromicina. Un ejemplo de un conjunto adecuado de modificaciones genéticas para producción de un modelo de cáncer de hígado es TetO-β catenina, ApoE-rtTA, NF1^{-/-} y PGK-puromicina.

5

[0040] Diversos vectores son útiles para realizar manipulaciones genéticas y obtener las células de ratón modificadas genéticamente para practicar la presente invención. Los vectores adecuados pueden derivar de plásmidos, retrovirus, adenovirus o lentivirus. Los vectores de expresión típicamente incluyen diversos elementos genéticos unidos operativamente con un inserto de ácido nucleico heterólogo que codifica polipéptidos. Los ejemplos de tales elementos genéticos son los que afectan a la transcripción y procesamiento de ARN, por ejemplo, elementos operadores, silenciadores, promotores y potenciadores, señales de terminación de la transcripción, señales de corte y empalme de ARN y señales de poliadenilación. Otras señales afectan a la traducción, por ejemplo, secuencias consenso ribosomales. Se conoce en la técnica el uso de tales elementos de control de la expresión, incluyendo los que confieren expresión constitutiva o inducible, y expresión específica de desarrollo o de tejido.

[0041] Los vectores pueden introducirse en células de ratón, incluyendo células ES y células tumorales, por diversos métodos, incluyendo fusión celular (por ejemplo, fusión de esferoplastos), fusión de liposomas (transposomas), métodos de transfección de ácido nucleico convencionales tales como precipitación con fosfato cálcico, electroporación, microinyección o infección por vectores virales. Pueden usarse diversos métodos para explorar con respecto a células que han incorporado de forma estable las alteraciones genéticas deseadas. Tales métodos incluyen detección de resistencia a fármacos cuando se introduce conjuntamente un gen marcador de selección de fármacos (por ejemplo, un gen de resistencia a neomicina, un gen de resistencia a puromicina o un gen de resistencia a higromicina); detección de emisión de fluorescencia o bioluminiscencia cuando se introduce conjuntamente un gen marcador de fluorescencia o bioluminiscencia (por ejemplo, un gen que codifica una proteína verde, amarilla, azul o roja fluorescente, y genes de Luciferasa); reacción en cadena de la polimerasa (PCR); y análisis de transferencia de Southern.

[0042] Pueden situarse genes recombinantes, por ejemplo, un oncogén recombinante o un gen de interés, bajo el control de un promotor inducible tal como el sistema de promotor regulado por tetraciclina como se describe en por ejemplo, el documento WO 01/09308. Están disponibles en el mercado sistemas de expresión de mamíferos regulados por tetraciclina completos, por ejemplo, T-RexTM, Invitrogen, Carlsbad, CA. Cuando se usa un sistema tal, el agente inductor (por ejemplo, tetraciclina o doxiciclina) puede administrarse convenientemente en alimento o agua para beber. Otros promotores inducibles útiles incluyen el promotor de metalotionina, el sistema promotor de IPTG/lacI, el sistema promotor de ecdisona, y el sistema Gal4/UAS, que está disponible en el mercado, por ejemplo, GeneSwitchTM, Valentis, Inc., Burlingame, CA. El sistema "lox paradap lox" puede usarse para suprimir secuencias inhibitorias; induciendo de este modo irreversiblemente que comience la expresión de un gen particular en un tejido particular en un punto particular en el desarrollo del ratón. Para un análisis de promotores inducibles en células de ratón transgénicas y ratones transgénicos, véase Lewandoski, 2001, "Conditional Control of Gene Expression in the Mouse," *Nature Rev.* 2:743-755.

[0043] Pueden situarse genes recombinantes introducidos en las células de ratón bajo el control de un promotor específico de tejido, tal como un promotor de tirosinasa o un promotor de TRP2 en el caso de células de melanoma y melanocitos; un promotor de MMTV o WAP en el caso de células y/o cánceres de mama; un promotor de Vilina o FABP en el caso de células y/o cánceres intestinales; un promotor de PDX en el caso de células pancreáticas; un promotor de RIP en el caso de células beta pancreáticas; un promotor de Queratina en el caso de queratinocitos; un promotor de Probasina en el caso de epitelio prostático; un promotor de Nestina o GFAP en el caso de células y/o cánceres del sistema nervioso central (SNC); una Tirosina Hidroxilasa, promotor de S100 o promotor de neurofilamentos en el caso de neuronas; el promotor específico de páncreas descrito en Edlund *et al.*, 1985, *Science* 230: 912-916; un promotor de proteína secretora de células de Clara en el caso de cáncer de pulmón; y un promotor de miosina Alfa en el caso de células cardíacas.

[0044] También pueden usarse promotores regulados por el desarrollo en la práctica de la invención. Estos incluyen los promotores hox murinos (Kessel *et al.*, 1990, *Science* 249: 374-379) y el promotor de β-fetoproteína (Campes *et al.*, 1989, *Genes Dev.* 3: 537-546).

[0045] Puede usarse cualquier línea celular ES que proporcione quimerismo adecuado. Las líneas celulares útiles incluyen E14.1, WW6, CCE, J1, y AB1. Véase también Alex Joyner, Ed., *Gene Targeting, A Practical Approach*, Capítulo 4 (Virginia Papaioannou), Oxford Press, 2ª Ed., (2000). En general, cuando se usan ratones quiméricos, la extensión del quimerismo no es crítica. Se prefiere quimerismo de 10% a 90%.

[0046] Como se usa en la presente memoria, "quimérico" significa quimérico con respecto a ontogenia. En consecuencia, un ratón quimérico es un ratón que ha crecido, es decir, se ha desarrollado, directamente a partir de un embrión multicelular en el que se ha inyectado o agregado al menos una célula ES modificada genéticamente. Un ratón quimérico debe distinguirse de un ratón desarrollado morfológicamente que ha recibido un xenoinjerto, por

ejemplo, un injerto de órgano, un injerto tisular o un injerto de tumor de otro animal.

[0047] Puede generarse un ratón quimérico introduciendo células ES en un embrión hospedador. Esto puede realizarse, por ejemplo, por inyección o agregación de blastocisto con embriones preimplantación de etapa más temprana (por ejemplo, embrión de ocho células). El embrión se transfiere posteriormente a una madre sustituta para gestación. El quimerismo en el animal nacido puede determinarse por fenotipo (tal como color del pelaje, si el embrión hospedador y las células ES derivan de cepas animales de diferentes colores de pelaje), PCR, análisis de transferencia de Southern, o análisis bioquímico molecular de genes polimórficos (tales como glucosa fosfato isomerasa). Para facilitar la identificación de ratones quiméricos que tengan una alteración genética deseada, se pueden introducir conjuntamente un gen indicador detectable y la alteración genética deseada en las células ES. Los genes indicadores ejemplares incluyen los que codifican una proteína fluorescente tal como una proteína verde fluorescente, una proteína amarilla fluorescente, una proteína azul fluorescente o una proteína luminiscente tal como luciferasa o β -galactosidasa.

[0048] Para aumentar la contribución de células ES introducidas a un tejido específico, se puede usar un embrión hospedador que sea deficiente en la generación de este tejido. Esto puede conseguirse por cualquier método adecuado, incluyendo expresión inducible de un gen de toxina, por ejemplo, toxina diftérica, en un tipo celular específico, o delección específica de tejido de genes necesarios para generar este tipo celular. En un sistema de complementación tal, todas o la mayoría de las células del tipo celular o tejido deseado derivarán de las células ES introducidas.

[0049] Los ratones quiméricos proporcionan flexibilidad en el desarrollo de modelos de diferentes enfermedades. Por ejemplo, pueden establecerse líneas de células ES para diferentes modelos de cáncer suprimiendo ambos alelos de un gen supresor de tumores (por ejemplo p53) e introduciendo un gen indicador (por ejemplo, luciferasa), un gen transactivador de tetraciclina inversa específico de tejido (es decir, MMTV-rtTA) y un oncogén de elección (por ejemplo, Akt, Her2V664E, Her2, Bcl2, K-Ras y Ciclina D1) bajo el control de un promotor regulado por transactivador de tetraciclina inversa (rtTA).

[0050] La introducción del gen humano recombinante en la célula de ratón condicionalmente tumorigénica puede ser por cualquier método adecuado. Se conocen diversos métodos en la técnica, por ejemplo, vectores retrovirales, vectores lentivirales, lipofección y electroporación. Un método preferido es transducción usando un vector retroviral. Preferiblemente, las células tumorales se eliminan de un ratón donador, se someten a un procedimiento de transducción (u otro método para introducir el gen recombinante de interés), y se sitúan en un ratón receptor en un periodo de 48 horas. Se ha descubierto que devolver las células a un animal en un periodo de 48 horas conserva la expresión inducible del oncogén. Se observa en ocasiones pérdida de expresión inducible, cuando las células se mantienen *in vitro* durante periodos más largos.

[0051] Una vez que las células transducidas dan lugar a un tumor de complementación dirigido en el ratón receptor inicial, el material de tumor de complementación dirigido (células tumorales) puede propagarse en múltiples ratones receptores, que pueden dividirse en cohortes, conteniendo todas descendencia del tumor de complementación dirigido original (FIGURA 2). Opcionalmente, pueden tomarse muestras de material tumoral primario en este punto para preparación de ARN y análisis de micromatrices. Utilizando la presente invención, pueden diseñarse ensayos de respuesta a fármaco de tal modo, y con números suficientes de ratones que portan tumores, que se permite análisis estadístico de resultados (FIGURA 3). Esto permite la observación de variación intertumoral y uniformidad intratumoral.

[0052] Como se usa en la presente memoria, "compuesto de ensayo" significa macromoléculas, por ejemplo, polipéptidos, ácidos nucleicos, polisacáridos y lípidos, así como moléculas pequeñas. Los compuestos de ensayo pueden administrarse a ratones hospedadores que comprenden modelos de tumor de mama humanos reconstituidos de la presente invención a través de administración oral, rectal, vaginal, tópica, nasal, oftálmica o parenteral. La administración parenteral incluye inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular e intraesternal y técnicas de infusión. Una vía ejemplar de administración para experimentación en ratones es inyección en la vena de la cola.

[0053] Preferentemente, los compuestos de ensayo se formulan de una manera que tenga en consideración factores tales como la dosificación, solubilidad del compuesto y vía de administración. Las formulaciones sólidas para administración oral pueden contener vehículos o excipientes adecuados, tales como almidón de maíz, gelatina, lactosa, goma arábiga, sacarosa, celulosa microcristalina, caolín, manitol, fosfato dicálcico, carbonato cálcico, cloruro sódico o ácido algínico. Los disgregantes que pueden usarse, incluyen, por ejemplo, celulosa microcristalina, almidón de maíz, glicolato de almidón sódico, y ácido algínico. Los aglutinantes de comprimidos incluyen goma arábiga, metilcelulosa, carboximetil celulosa sódica, polivinilpirrolidona (Povidone™), hidroxipropil metilcelulosa, sacarosa, almidón y etilcelulosa. Los ejemplos de lubricantes incluyen estearatos de magnesio, ácido esteárico, fluido de silicona, talco, ceras, aceites y sílice coloidal.

[0054] Las formulaciones líquidas para administración oral preparadas en agua u otros vehículos acuosos pueden

contener agentes de suspensión tales como metilcelulosa, alginatos, tragacanto, pectina, kelgina, carragenina, goma arábica, polivinilpirrolidona y alcohol polivinílico. Las formulaciones líquidas también pueden incluir soluciones, emulsiones, jarabes y elixires que contienen, junto con el compuesto o los compuestos activos, agentes humectantes, edulcorantes y agentes saporíferos. Las formulaciones inyectables pueden contener vehículos tales como aceites vegetales, dimetilacetamida, dimetilformamida, etil lactato, etil carbonato, isopropil miristato, etanol, polioles (glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares). Los excipientes fisiológicamente aceptables incluyen, por ejemplo, dextrosa 5%, solución salina 0,9%, solución de Ringer u otros excipientes adecuados. Preparaciones intramusculares, por ejemplo, una formulación estéril de una forma salina soluble adecuada de los compuestos, pueden disolverse y administrarse en un excipiente farmacéutico tal como agua para inyección, solución salina 0,9% o solución de glucosa 5%.

[0055] Una forma insoluble adecuada del compuesto puede prepararse y administrarse como una suspensión en una base acuosa o una base oleosa farmacéuticamente aceptable. Tal como un éster de ácido graso de cadena larga (por ejemplo, etiloleato). Una formulación de pomada semisólida tópica típicamente contiene una concentración del principio activo de aproximadamente 1 a 20%, por ejemplo, 5 a 10%, en un vehículo tal como una base de crema farmacéutica. Diversas formulaciones para uso tópico incluyen gotas, tinturas, lociones, cremas, soluciones y pomadas que contienen el principio activo y diversos soportes y vehículos. El porcentaje óptimo del agente terapéutico en cada formulación farmacéutica varía de acuerdo con la formulación en sí misma y el efecto terapéutico deseado en las patologías específicas y regímenes terapéuticos correlacionados. La formulación farmacéutica es una técnica bien establecida, y se describe adicionalmente en Gennaro (ed.), Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª ed., Lippincott, Williams & Wilkins (2000) (ISBN: 0683306472); Ansel *et al.*, Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, 7ª ed., Lippincott Williams & Wilkins Publishers (1999) (ISBN: 0683305727); y Kibbe (ed.), Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association, 3ª ed. (2000) (ISBN: 091733096X).

[0056] Pueden emplearse numerosos parámetros para determinar si un compuesto de ensayo presenta “un efecto antitumoral”. Los ejemplos de tales parámetros incluyen cantidad de apoptosis en el tejido tumoral, nivel de angiogénesis en el tejido tumoral, número de crecimientos hiperplásicos tales como hiperplasias ductales, efectos en la diferenciación o morfogénesis del tejido tumoral, o simplemente el tamaño, por ejemplo, diámetro o volumen del tumor. La elección del parámetro o parámetros para medir, y su interpretación, dependerá de los objetivos del experimento particular. Dicha elección e interpretación está dentro de la experiencia habitual de la técnica.

[0057] Existe considerable libertad en el diseño experimental. Por ejemplo, en un tipo de diseño experimental los animales de ensayo y los animales de control pueden estar separados y ser sustancialmente idénticos. En otro tipo de diseño experimental, puede administrarse compuesto de ensayo y vehículo localmente a tumores separados, por ejemplo, lateral izquierdo y lateral derecho del mismo animal. Por supuesto, un panel de animales puede recibir un intervalo de dosificaciones en estudios de respuesta a dosis.

Ejemplos

[0058] La invención se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos. Los ejemplos se proporcionan para fines ilustrativos solamente y no deben interpretarse como limitantes del alcance o contenido de la invención de ninguna manera.

45 Ejemplo 1: Tumores inducibles espontáneos

[0059] Se modificaron por ingeniería genética ratones quiméricos para desarrollar tumores de mama espontáneos inducibles dependientes de Her2 para su uso como una fuente de células condicionalmente tumorigénicas. Los ratones se produjeron como sigue.

[0060] Se cotransfectaron células ES nulas homocigotas para Ink4a con las siguientes cuatro construcciones, como fragmentos separados: MMTV-rtTA, TetO-Her2^{V664E_{neu}}, TetO-luciferasa y PGK-puromicina. Se fenotiparon células resistentes a puromicina por PCR y transferencia de Southern. La expresión inducible de los oncogenes en células ES se analizó por transferencia de Northern. Las células ES transfectadas se inyectaron en blastocistos C57BL/6, que se trasplantaron a ratones hembra pseudoembarazadas para gestación que conduce a nacimiento de los ratones quiméricos.

[0061] La repetición terminal larga de virus de tumor mamario de ratón (MMTV) se usó para dirigir la expresión específica de mama del transactivador de tetraciclina inverso (rtTA). El rtTA permitió la expresión específica de mama del oncogén activado HER2 cuando se proporcionó doxiciclina a los ratones, por ejemplo, en su agua para beber.

[0062] La expresión inducible del oncogén HER2 y luciferasa se confirmó por ensayo de RT-PCR y luciferasa (respectivamente), usando células cultivadas derivadas del ratón. Se retiraron glándulas mamarias de ratones quiméricos y se digirieron con colagenasa. La mitad de los organoides recogidos se cultivaron en presencia de

doxiciclina, y la otra mitad se cultivó sin doxiciclina. Después de cinco días en cultivo, las células se tripsinizaron y se usó un décimo de las células para ensayo de luciferasa y el resto se usó para extracción de ARN.

5 **[0063]** El análisis histológico de tumores recogidos de ratones de modelo de cáncer de mama HER2 mostró adenocarcinomas invasivos. Se distinguieron dos patrones principales. Fueron un patrón de crecimiento en láminas sólido, y un patrón de crecimiento anidado con centros necróticos.

10 **[0064]** El análisis inmunohistoquímico de tumores mamarios de ratones de modelo de cáncer de mama HER2 reveló dos tipos celulares dentro de los tumores. El primer tipo celular fue de origen epitelial (positivo para citoqueratina), y mostró expresión de HER2 y proliferación fuerte. El segundo tipo celular fue de origen mesenquimal con apariencia de tipo fibroblástica. Estas células fueron positivas para colágeno. Estas células no mostraron proliferación fuerte, y presentaron función en el estroma. Se vio apoptosis en los centros necróticos de la parte epitelial de los tumores.

15 **[0065]** Se realizaron estudios de regresión tumoral usando los ratones de modelo de cáncer de mama de HER2. Se seleccionaron dos ratones, portando cada uno más de dos tumores inducidos por doxiciclina. El tamaño tumoral de dos tumores se midió cada uno usando calibradores antes y después de que se retirara la doxiciclina del agua para beber. La doxiciclina se retiró el día seis. El tamaño tumoral se midió diariamente. Se usaron mediciones de tamaño tumoral para calcular el volumen tumoral. Se representaron los resultados y se determinó la regresión de los
20 tumores. Todos los tumores retrocedieron, presentando dependencia de doxiciclina. El análisis inmunohistoquímico de regresión tumoral confirmó expresión de HER2 dependiente de doxiciclina. Por lo tanto, se mostró que el crecimiento y mantenimiento de los tumores dependía de la expresión de HER2.

Ejemplo 2: Propagación de tumores

25 **[0066]** Después de la inducción del promotor sensible a tetraciclina por doxiciclina, los ratones desarrollaron tumores mamarios con una latencia de aproximadamente 2-4 meses. Se seleccionaron por tamaño aproximadamente cinco tumores de mama primarios (>0,4 g) de un animal (dos de glándulas torácicas y tres de inguinales) para proporcionar suficientes células tumorales para propagación.

30 **[0067]** Se picaron aproximadamente 0,2 g de tumores primarios resecados quirúrgicamente y se digirieron con 1,5 ml de mezcla de digestión (colagenasa 4 mg/ml; Calbiochem cat. N° 234153) en medio RPMI (Gibco cat. N° 11875-093) en un tubo de polipropileno de 10 ml durante aproximadamente 2 horas a 37 °C con agitación constante a 400 rpm. Los tejidos digeridos se trituraron pasándolos a través de aguja de calibre 18 o usando tamices celulares (filtros de 40 µm (BD Falcon, cat. N° 352340) y 100 µm (BD Falcon cat. N° 352360)). La mezcla celular resultante se dejó reposar a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 minutos, seguido de aspiración de solamente la parte superior sin perturbar el material grueso no digerido en el fondo. Las células se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos, se lavaron dos veces con RPMI y se contaron usando hemocitómetro y se resuspendieron en HBSS (Gibco cat. N° 24020-117) para inyecciones, o se resuspendieron en medio de congelación (FBS 90% [Gibco cat. N° 10438-026] + DMSO 10%), seguido de reducción de la temperatura en serie para almacenamiento en nitrógeno líquido para su uso futuro.

45 **[0068]** De cada tumor primario, se inyectaron aproximadamente 0,1 millones de células/sitio por vía subcutánea en 30 sitios de ratones inmunocomprometidos, que después se alimentaron con agua con doxiciclina. Cada ratón recibió dos inyecciones, una en cada lateral de su espalda (subcutáneas). Por lo tanto, un tumor primario se expandió a 30 tumores propagados en 15 ratones, desarrollando cada uno de los ratones dos tumores en su espalda. De estos 30 tumores, se trataron 10 ratones que portaban tumores con vehículo (5 partes de Tween-80, 5 partes de alcohol etílico absoluto, 90 partes de dextrosa 5%), otros 10 ratones que portaban tumores se trataron con docetaxel 15 mg/kg (Biochemika, cat. N° 01885) y los 10 ratones que portaban tumores restantes se trataron con docetaxel 30 mg/kg (que ya se había determinado que están cerca de MTD para este fármaco). En total, se expandieron cinco tumores primarios a 150 tumores en 75 animales.

Ejemplo 3: Ensayo de respuesta a fármacos

55 **[0069]** Cuando los tumores alcanzaron aproximadamente 5 mm³ de tamaño, se iniciaron los tratamientos. Se proporcionó a los animales tres dosis con intervalo de 5 días. El experimento se terminó una semana después de la dosificación final. Entre los tumores propagados derivados de cualquier tumor primario dado, se esperaba uniformidad con respecto a latencia, velocidad de crecimiento y respuesta a fármaco (uniformidad intratumoral). Por el contrario, entre tumores propagados derivados de tumores primarios diferentes se esperaba variación con
60 respecto a velocidad de crecimiento, latencia y respuesta a fármaco (variación intertumoral).

[0070] Como se esperaba, se observó uniformidad intratumoral y variación intertumoral en la latencia y respuesta a fármaco de los tumores propagados. Se puntuó como una respuesta positiva si un tumor mostró una diferencia estadísticamente significativa en tamaño entre tratamiento con vehículo y fármaco al final de una semana después
65 de la última dosificación. Los tumores propagados que venían solamente de uno de los cinco tumores primarios

mostraron reducción significativa del crecimiento tumoral al tratamiento farmacológico mientras que los cuatro grupos restantes no mostraron ningún efecto.

Ejemplo 4: Preparación de células condicionalmente tumorogénicas para transfección

5 [0071] Se retiró quirúrgicamente un tumor HER2 de mama de ratón (evitando hemorragia excesiva) y se colocó inmediatamente en PBS en una placa de Petri. El tamaño y peso del tumor se midieron usando un calibrador y una balanza. Se transfirieron aproximadamente 0,2 g de tejido tumoral a una placa de Petri y se picó en trozos finos. A los trozos de tumor picado, se añadieron 1,5 ml de mezcla de digestión (colagenasa 4 mg/ml en medio RPMI 1640) y se transfirió a un tubo de polipropileno de 10 ml, seguido de incubación a 37 °C con agitación constante a 400 rpm durante 2 horas. El material tumoral digerido se pasó a través de una aguja 18G 5-10 veces. Se permitió que la materia particulada gruesa sedimentara durante aproximadamente 5 minutos, y después se aspiró el líquido sin perturbar el material grueso no digerido en el fondo. Se sedimentó por centrifugación una suspensión celular a 1000 rpm durante 5 minutos, se lavó dos veces usando RPMI y se contó usando hemocitómetro.

15 [0072] Las células se sembraron en una placa de Petri de 10 cm o 15 cm, y se alimentaron con medio nuevo al día siguiente, seguido de alimentación según fuera necesario. Una vez que las células comenzaron a unirse a la placa y se hicieron confluyentes tras su multiplicación, se dispersaron a placas adicionales usando EDTA/Tripsina 0,05%. Las células se adaptaron en general al cultivo tras dos pases como estos. Tras la compleción de los dos pases, las células se recogieron y se criopreservaron a -80 °C en medio de congelación (DMSO 90%/FBS 10%) para su uso futuro. Los cultivos generados usando este enfoque se ensayaron con respecto a la capacidad para producir tumores *in vivo* tras inducción de oncogenes, es decir, se ensayaron con respecto a estado tumorogénico condicional.

25 [0073] Para ensayar la capacidad de inducción condicional de la expresión de oncogenes en estas células *in vitro*, las células se cultivaron en presencia de inductor (doxiciclina) y se supervisaron con respecto a la inducción de oncogén modulada en presencia y ausencia del inductor. Para evaluar el estado tumorogénico condicional *in vivo*, las células se cultivaron en presencia de doxiciclina y se inyectaron por vía subcutánea en seis ratones inmunocomprometidos (1×10^6 células por sitio de inyección, dos sitios por ratón). Se administró doxiciclina a tres de los seis ratones a través de alimento o agua. Los tres ratones restantes se mantuvieron con alimento y agua sin doxiciclina. Los animales se controlaron con respecto a crecimiento tumoral. Solamente los animales que recibieron doxiciclina desarrollaron tumores en el sitio de inyección. Después de que los tumores alcanzaran un volumen de 500 mm³, la doxiciclina se retiró del agua/alimento. Esto provocó regresión del crecimiento tumoral, lo que indica que las células de estos tumores requerían la expresión del oncogén para seguir siendo tumorogénicas. Estas células condicionalmente tumorogénicas se usaron después para complementación dirigida, usando un oncogén recombinante, como se describe en el Ejemplo 5 (posterior).

Ejemplo 5: Complementación dirigida en células de tumor de mama

40 [0074] Construcciones de vector Se usaron vectores retrovirales para transducción de células de tumor de mama de ratón preparadas como se describe en el Ejemplo 4 (anterior). La cadena principal de retrovirus usada en la construcción de todos los vectores retrovirales siguientes fue pQCXIX, que se obtuvo comercialmente (BD Biosciences Clontech; Palo Alto, CA; cat. N° 9135-1) o pBMN-GFP, que está disponible en el mercado de Orbigen Inc. (San Diego, CA; cat N° PVL-10014).

45 [0075] El vector pQCDIG se construyó como sigue. Se obtuvo un fragmento de ADN de IRES-hrGFP 1452 pb digiriendo el vector pIRES-hrGFP II (Stratagene, San Diego, CA; cat N° 240032) con BamHI y XhoI. El fragmento de IRES-hrGFP se clonó después detrás del promotor de CMV en el vector pQCXIX. El vector resultante se digirió después con NotI y se trató con ADN polimerasa de Klenow y fosfatasa alcalina de ternero (New England Biolabs, Beverly, MA) para generar extremos romos clonables. Se clonó después un fragmento de ADN de 1,7 kb que contenía casete de fase de lectura de destino Gateway® (Invitrogen, Carlsbad, CA; cat N° 11828-029) en el vector digerido con NotI para generar construcción retroviral pQCDIG.

55 [0076] El vector pBGD-1 se construyó como sigue. Se digirió el vector pBMN-GFP con EcoRI y se trató con polimerasa Klenow para generar extremos romos. El vector se ligó después con casete de fase de lectura de destino Gateway® Rfc.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA; cat N° 11828-029) para generar construcción retroviral pBGD-1.

[0077] Los vectores pQ-LacZ y pB-LacZ se construyeron como sigue. Se clonó un fragmento de ADNc de LacZ de 3,1 kb (Marker Gene Technology, Inc., Eugene, OR; cat N° M1016) en el vector pENTR11 (Invitrogen; cat N° 11819-018) para generar el vector pENTR-LacZ. Se realizó reacción de recombinación LR Gateway® entre el vector pENTR-LacZ y el vector pQCDIG o pBGD-1. El vector resultante pQ-LacZ o pB-LacZ se confirmó por digestión con enzimas de restricción y secuenciación de ácido nucleico.

60 [0078] Los vectores pQ-HER2 y pB-HER2 se construyeron como sigue. Se clonó un fragmento de ADNc de HER2 3992 en el vector pENTR11 (Invitrogen, cat N° 11819-018) para generar el vector pENTR-HER2. El ADNc de HER2

usado en la preparación de esta construcción fue ErrB2^{V659E}. El número de acceso para ADNc de HER2 de tipo silvestre es M11730. Se empleó mutagénesis dirigida para cambiar el resto de aminoácido 659 de V a E. Se realizó reacción de recombinación LR Gateway[®] entre el vector pENTR-HER2 y el vector pQCDIG o pB-GD-1. El vector resultante pQ-HER2 o pB-HER2 se confirmó por digestión con enzimas de restricción y secuenciación de ácido nucleico.

[0079] El vector pB-ERBB3 se construyó como sigue. Se clonó un fragmento de ADNc de ERBB3 humano de 4,2 kb (ATCC, Manassas, VA; cat N° 8117300) en vector pENTR11 (Invitrogen; cat N° 11819-018) para generar el vector pENTR-ERBB3. Se realizó reacción de recombinación LR Gateway[®] entre el vector pENTR-ERBB3 y el vector pBGD-1. El vector resultante pB-ERBB3 se confirmó por digestión con enzima de restricción y secuenciación de ácido nucleico.

[0080] El vector pB-PLK3 se construyó como sigue. Se clonó un fragmento de ADNc de PLK3 humano de 2,1 kb (OriGene, Rockville, MD, cat N° TC117577) en el vector pENTR11 (Invitrogen; cat N° 11819-018) para generar el vector pENTR-PLK3. Se realizó reacción de recombinación LR Gateway[®] entre el vector pENTR-PLK3 y el vector pBGD-1. El vector resultante pB-PLK3 se confirmó por digestión con enzimas de restricción y secuenciación de ácido nucleico.

[0081] El vector pB-Kirrel se construyó como sigue. Se clonó un fragmento de ADNc de Kirrel1 de ratón de 1,8 kb (ATCC, Manassas, VA; cat N° MGC-38329) en el vector pENTR11 (Invitrogen; cat N° 11819-018) para generar el vector pENTR-Kirrel. Se realizó reacción de recombinación LR Gateway[®] entre el vector pENTR-Kirrel y el vector pBGD-1. El vector resultante pB-Kirrel se confirmó por digestión con enzimas de restricción y secuenciación de ácido nucleico.

[0082] El vector pB-MET se construyó como sigue. Se clonó un fragmento de ADNc de MET humano de 4,2 kb (OriGene, Rockville, MD, cat N° TC120029) en el vector pENTR11 (Invitrogen; cat N° 11819-018) para generar el vector pENTR-MET. Se empleó mutagénesis dirigida para cambiar la base 3717 de G a A para corregir una mutación puntual. Se realizó reacción de recombinación LR Gateway[®] entre el vector pENTR-MET y el vector pBGD-1. El vector resultante pB-MET se confirmó por digestión con enzimas de restricción y secuenciación de ácido nucleico.

[0083] El vector pB-HGF se construyó como sigue. Se clonó un fragmento de ADNc de HGF humano de 2,2 kb (Invitrogen, clon ID N° IOH29794) en el vector pENTR11 (Invitrogen, cat N° 11819-018) para generar el vector pENTR-HGF. Se realizó reacción de recombinación LR Gateway[®] entre el vector pENTR-HGF y el vector pBGD-1. El vector resultante pB-HGF se confirmó por digestión con enzimas de restricción y secuenciación de ácido nucleico.

[0084] El vector pB-ESM1 se construyó como sigue. Se clonó un fragmento de ADNc de ESM1 humano de 550 pb en el vector pENTR11 (Invitrogen, cat N° 11819-018) para generar el vector pENTR-ESM1. Se realizó reacción de recombinación LR Gateway[®] entre el vector pENTR-HGF y el vector pBGD-1. El vector resultante pB-ESM1 se confirmó por digestión con enzimas de restricción y secuenciación de ácido nucleico.

[0085] El vector pB-PTK7 se construyó como sigue. Se clonó un fragmento de ADNc de PTK7 humano de 3,2 kb en un vector modificado (delección de NcoI) pENTR11 (Invitrogen, cat N° 11819-018) para generar el vector pENTR-PTK7. Se realizó reacción de recombinación LR Gateway[®] entre el vector pENTR-HGF y el vector pBGD-1. El vector resultante pB-PTK7 se confirmó por digestión con enzimas de restricción y secuenciación de ácido nucleico.

[0086] *Retrovirus ecotrópico* Se obtuvo la línea celular de empaquetamiento de retrovirus ecotrópico EcoPack2-293 y Phoenix[™] en el mercado (BD Biosciences Clontech; Palo Alto, CA; cat N° 631507) y Orbigen Inc. (San Diego, CA; cat N° PVL-10014). Se cultivaron células EcoPack2-293 o células Phoenix[™] en medio DMEM (que contenía FBS 10%, penicilina 50 U/ml, estreptomycin 50 µg/ml) hasta 70% de confluencia. Se transfirieron 20 µg de ADN de vector retroviral en células EcoPack2-293 o Phoenix[™] usando reactivo de transfección Fugene6 (Roche Applied Science, Indianapolis, IN; cat N° 11814443001). La eficacia de transfección se supervisó por visualización de proteína verde fluorescente (GFP) 24 horas después de la transfección. El retrovirus se recogió 48 horas después de la transfección filtrando sobrenadante del medio a través de filtro de 0,45 micrómetros y se almacenó en -80 °C.

[0087] *Infección retroviral de células tumorales.* Se cultivaron células de tumor HER2 de mama de ratón en medio RPMI 1640 (que contenía FBS 10%, penicilina 50 U/ml, estreptomycin 50 µg/ml y doxiciclina 2 µg/ml). A aproximadamente 18-24 horas después de la siembra, o cuando las células sembradas tenían 70-80% de confluencia, las células de tumor de mama se infectaron con sobrenadante retroviral descongelado en presencia de polibreno (8 µg/ml) durante aproximadamente 8 horas. Tras la retirada del medio, se añadió medio nuevo durante una noche y este procedimiento se repitió al día siguiente. Cuando las células se infectaron con dos virus diferentes, se añadió un virus el primer día y el otro el segundo día.

[0088] *Complementación funcional.* Aproximadamente 24 horas después de la adición del segundo lote de virus, se tripsinizaron células de tumor de mama infectadas, se aclararon y se resuspendieron en Solución Salina

Equilibrada de Hank. Se inyectaron aproximadamente 1×10^6 células tumorales infectadas en el flanco de ratones SCID mantenidos sin doxiciclina. Los animales se observaron con respecto a desarrollo tumoral. Se inyectó de forma similar a animales de control mantenidos sin doxiciclina 1×10^6 células tumorales no infectadas o 1×10^6 células de tumor de mama infectadas con retrovirus pQ-LacZ.

5

[0089] Se desarrollaron tumores complementados con retrovirus pQ-HER2 o pB-HER2 después de aproximadamente 14 días en 6 de 6 sitios de inyección. No se observó tumor en ratones inyectados con células de tumor de mama o células de tumor de mama infectadas con retrovirus pQ-LacZ o pB-LacZ durante el periodo del experimento. Los tumores se recogieron y se congelaron rápidamente inmediatamente los tejidos tumorales en nitrógeno líquido. El ARN se aisló de tejido tumoral y se realizó PCR en tiempo real para confirmar la expresión del gen diana usando cebadores específicos del gen diana. El nivel de expresión de HER2 humano en tumores complementados fue aproximadamente 10-15 veces más alto que en la referencia humana normal, similar a tumores inducidos por doxiciclina. La expresión de construcciones retrovirales en células tumorales también se confirmó por inmunohistoquímica de proteína GFP en muestras tumorales fijadas con formalina.

10

[0090] Se observaron tumores complementados con retrovirus pB-ERBB3 después de aproximadamente 26 días en 15 de 18 sitios de inyección. Se examinó el nivel de expresión de ERBB3 humano en tumores complementados por PCR a tiempo real, que fue de aproximadamente 5-20 veces más alto que la referencia humana normal. La expresión de construcciones retrovirales en células tumorales también se confirmó por inmunohistoquímica de proteína GFP en muestras tumorales fijadas con formalina.

15

[0091] Se observaron tumores complementados con retrovirus pB-PLK3 después de aproximadamente 28 días en 3 de 6 sitios de inyección. Se examinó el nivel de expresión de PLK3 humana en tumores complementados por PCR en tiempo real, que fue de aproximadamente 2-5 veces más alto que la referencia humana normal. La expresión de construcciones retrovirales en células tumorales también se confirmó por inmunohistoquímica de proteína GFP en muestras tumorales fijadas con formalina.

20

[0092] Se observaron tumores complementados con retrovirus pB-Kirrel después de aproximadamente 31 días en 3 de 6 sitios de inyección. Se examinó el nivel de expresión de Kirrel1 de ratón en tumores complementados por PCR en tiempo real, que fue de aproximadamente 10-25 veces más alto que la referencia de ratón normal. La expresión de construcciones retrovirales en células tumorales también se confirmó por inmunohistoquímica de proteína GFP en muestras tumorales fijadas con formalina.

25

[0093] Se observaron tumores complementados con retrovirus tanto pB-MET como pB-HGF después de aproximadamente 30 días en 14 de 20 sitios de inyección. Se examinaron niveles de expresión de MET humano y HGF humano en los tumores complementados resultantes (MET/HGF) por PCR en tiempo real, que fueron aproximadamente 5-25 veces más altos y aproximadamente 20-80 veces más altos que la referencia humana normal, respectivamente (Figura 4). Este ejemplo demuestra que pueden generarse tumores complementados por la introducción simultánea de múltiples genes en las células receptoras.

30

[0094] Se observaron tumores complementados con retrovirus pB-ESM1 después de aproximadamente 41 días en 3 de 6 sitios de inyección. Se examinaron los niveles de expresión de ESM1 humano en tumores complementados por PCR en tiempo real, que fueron de aproximadamente 180-300 veces más altos que la referencia humana normal.

35

[0095] Se observó un tumor complementado con retrovirus pB-PTK7 después de aproximadamente 40 días en 1 de 6 sitios de inyección. Se examinó el nivel de expresión de PTK7 humano en el tumor complementado por PCR en tiempo real, que fue aproximadamente 6 veces más alto que la referencia humana normal.

40

50 **Ejemplo 6: Propagación *in vivo* de tumores de complementación dirigida**

[0096] Se propagaron tumores de complementación dirigida (DC) *in vivo*. Se picaron aproximadamente 0,2 g de tumor con complementación directa resecado quirúrgicamente y se resuspendieron en medio de congelación (FBS 90% [Gibco Cat. N° 10438-026] + DMSO 10%), seguido de reducción de temperatura en serie para almacenamiento en nitrógeno líquido para su uso futuro.

45

[0097] Se descongeló el tumor DC picado a 37 °C y las células se disociaron pasándolas a través de tamices celulares (filtros de 100 µl, BD Falcon Cat. N° 352360). Las células se recogieron y centrifugaron a 1000 rpm durante 5 minutos, se lavaron dos veces con PBS y se contaron usando hemocitómetro y se resuspendieron en una parte de PBS (Gibco Cat. N° 24020-117) y una parte de Matrigel (BD Cat. N° 3542334) para inyecciones. Se inyectaron aproximadamente 0,1 millones de célula por vía subcutánea en 10 ratones inmunocomprometidos, en un sitio sencillo por ratón.

50

[0098] Se observaron tumores complementados con MET /HGF propagados después de aproximadamente 24 días en 10 de 10 sitios de inyección. Se examinaron los niveles de expresión de MET humano y HGF humano en los

55

tumores complementados directos propagados (MET/HGF) por PCR en tiempo real, que fueron de aproximadamente 5 a 25 veces más altos y de aproximadamente 15-90 veces más altos que la referencia humana normal, respectivamente (Figura 5 y 6). También se confirmaron los niveles de proteína MET humana por análisis de transferencia de Western (no mostrado). Los niveles de HGF se confirmaron por ELISA de captura (Figura 7). Este ejemplo muestra como pueden propagarse los tumores DC *in vivo*, y que la sobreexpresión de ambos transgenes se mantuvo tras la propagación.

Ejemplo 7: Ensayo de respuesta a fármaco con tumores con complementación dirigida

- 10 [0099] Se ensayó la inhibición del crecimiento tumoral usando un anticuerpo monoclonal contra HGF humana mAb294 (R&D Systems). Se establecieron tumores por inoculación subcutánea de tumores HGF/MET disociados (4272 y 4275) en ratones desnudos hembra NCR. Cuando los tumores crecieron a 50 - 100 mm³, los animales se seleccionaron aleatoriamente en tres grupos. Un grupo recibió vehículo (PBS) y los otros dos recibieron 1 o 10 mg/kg de mAb294 por inyección i.p. dos veces por semana. Se determinó el tamaño tumoral por medición con calibrador y se calculó por la ecuación de (diámetro largo x diámetro corto²)/2, dos veces por semana. El experimento se terminó 3 días después de la cuarta dosis. En el tumor 4272, 1 mg/kg inhibió el crecimiento tumoral en 49,7% (p=0,08) y 10 mg/kg inhibieron el crecimiento tumoral en 89,9% (p=0,0034). En el tumor 4275, 1 mg/kg inhibió el crecimiento tumoral en 46,4% (p=0,027) y 10 mg/kg inhibieron el crecimiento tumoral en 74,8% (p<0,001) (Figuras 8 y 9). Otras realizaciones están dentro de las reivindicaciones siguientes.
- 15
- 20

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir un tumor, cuya tumorigenicidad depende de un genoma no recombinante, que comprende las etapas de:
- 5 (a) proporcionar una célula de ratón condicionalmente tumorigénica que comprende
- (i) una o más mutaciones tales que ambos alelos de un gen supresor de tumores endógeno estén ausentes o no funcionales, y
- 10 (ii) un oncogén recombinante unido operativamente con un promotor inducible, en el que
- (ii.1) la tumorigenicidad de la célula de ratón condicionalmente tumorigénica depende de la expresión del oncogén recombinante inducible y
- 15 (ii.2) el promotor inducible está en el estado no inducido;
- (b) introducir en la célula un gen humano recombinante de interés que complemente funcionalmente al oncogén recombinante, restaurando de este modo la tumorigenicidad sin expresión del oncogén recombinante inducible.
- (c) colocar la célula de la etapa (b) en un ratón receptor;
- 20 (d) mantener el ratón receptor y observar el ratón con respecto a desarrollo tumoral; y
- (e) recoger el tumor, cuya tumorigenicidad depende del gen humano recombinante.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el gen se selecciona del grupo que consiste en AKT1 humana, EGFR activada humana (EGFR*), mTOR humana, y tanto cMET como HGF humana
- 25 3. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en el que el gen supresor de tumores se selecciona del grupo que consiste en Rb, P53, INK4a, PTEN, LATS, Apaf1, Caspasa 8, APC, DPC4, KLF6, GSTP1, ELAC2/HPC2, NKX3.1, ATM, CHK2, ATR, BRCA1, BRCA2, MSH2, MSH6, PMS2, Ku70, Ku80, DNA/PK, XRCC4, Neurofibromatosis de Tipo 1, Neurofibromatosis de Tipo 2, Poliposis Adenomatosa del Colon, la proteína supresora
- 30 de tumores de Wilms, Patched y FHIT.
4. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el gen supresor de tumores se selecciona del grupo que consiste en INK4a, P53, PTEN y Rb.
- 35 5. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el gen supresor de tumores es INK4a.
6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el oncogén recombinante inducible se selecciona del grupo que consiste en Her2, KRAS, HRAS, NRAS, EGFR, MDM2, TGF- β , RhoC, AKT, c-myc, β -catenina, PDGF, C-MET, PI3K-110 α , CDK4, ciclina B1, ciclina D1, gen del receptor de estrógenos alfa, gen del receptor de
- 40 progesterona, ErbB1, ErbB3, PLK3, KIRREL, ErbB4, TGF α , ras-GAP, Shc, Nck, Src, Yes, Fyn, Wnt Bcl2, antígeno PyV MT y antígeno SV40 T.
7. El método de la reivindicación 6, en el que el oncogén recombinante inducible se selecciona del grupo que consiste en Her2, KRAS, C-MET, PI3K-CA y AKT.
- 45 8. El método de la reivindicación 7, en el que el oncogén recombinante inducible es Her2 o KRas.
9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que el sistema promotor inducible se selecciona del grupo que consiste en un sistema regulador promotor dependiente de tetraciclina, un sistema promotor de
- 50 metalotionina, un sistema promotor de IPTG/lacI, un sistema promotor de ecdisona y un sistema Gal4/UAS.

Célula condicionalmente tumorigénica

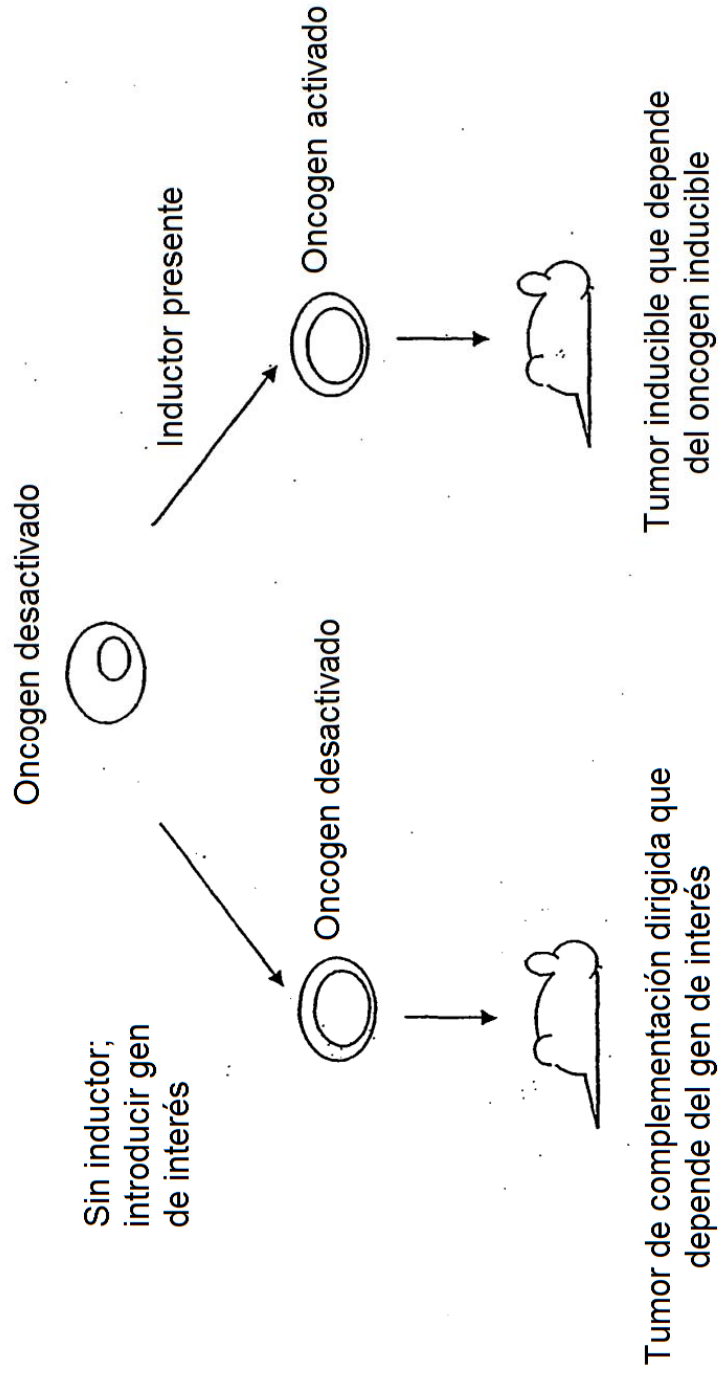


FIG. 1

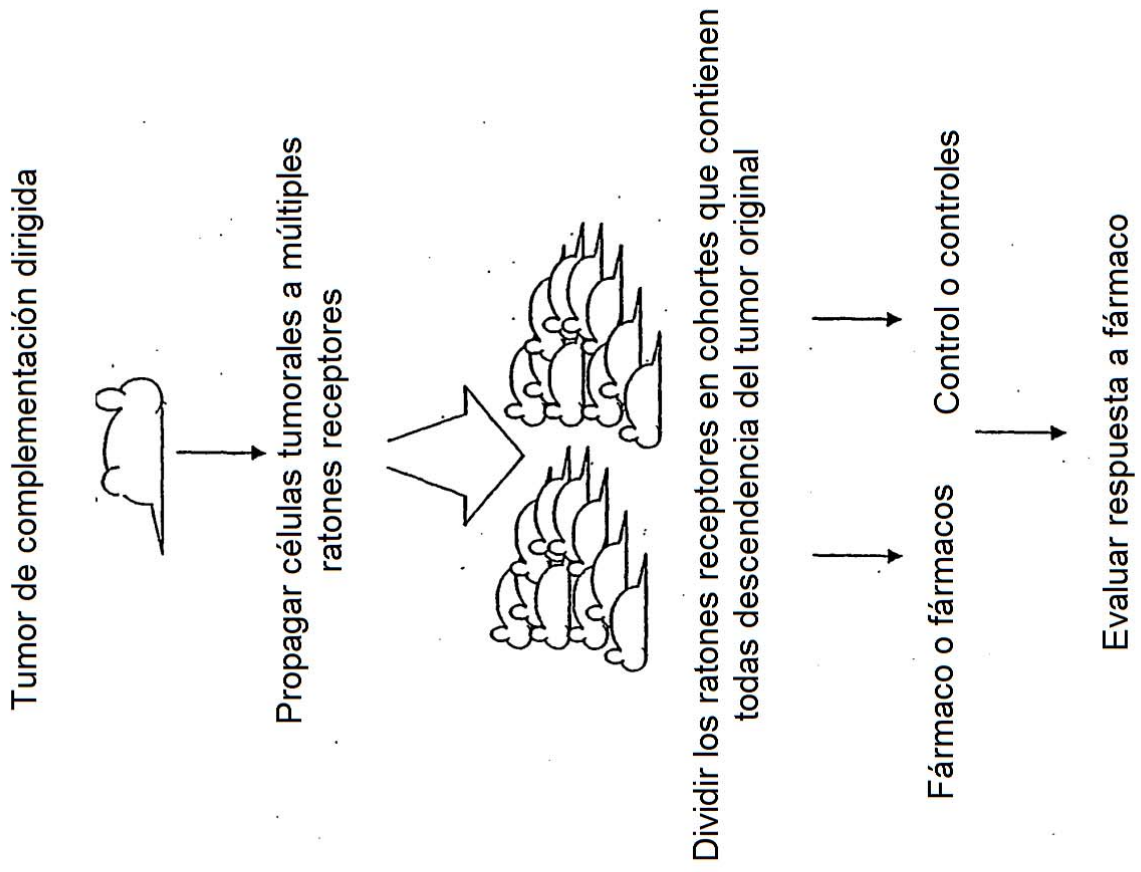


FIG. 2

Propagación de cada tumor de complementación dirigida a 30 animales diferentes, seguido de agrupamiento en 3 cohortes de tratamiento

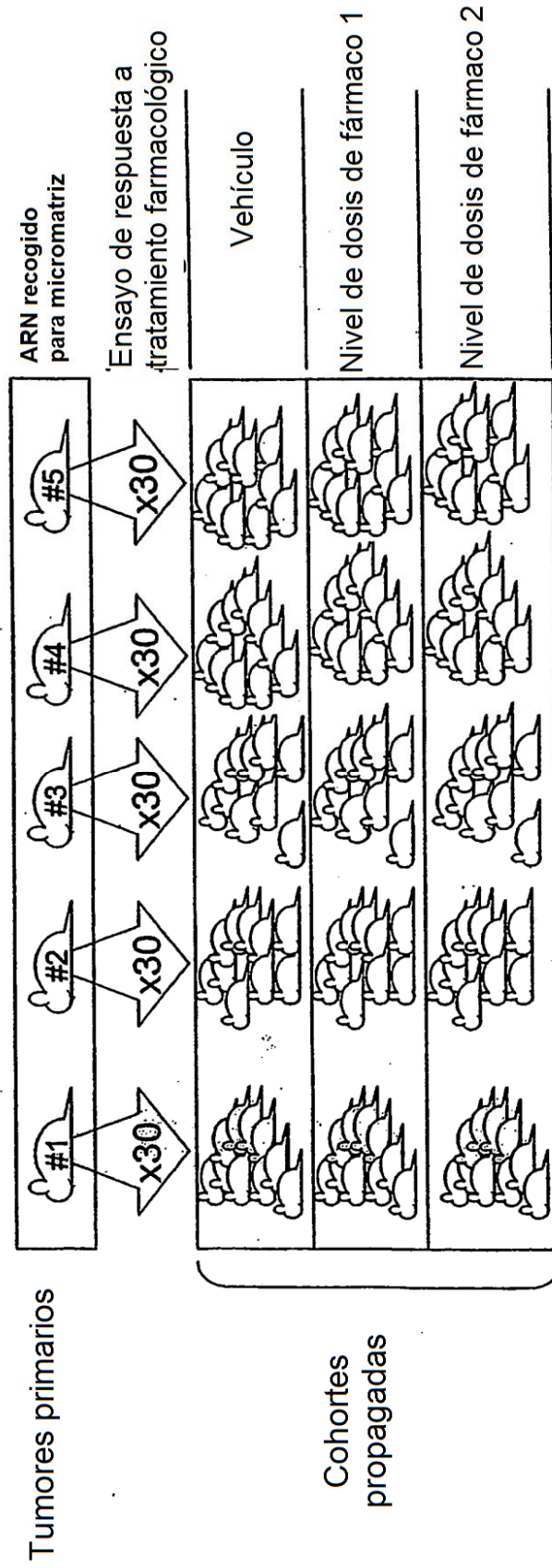


FIG. 3

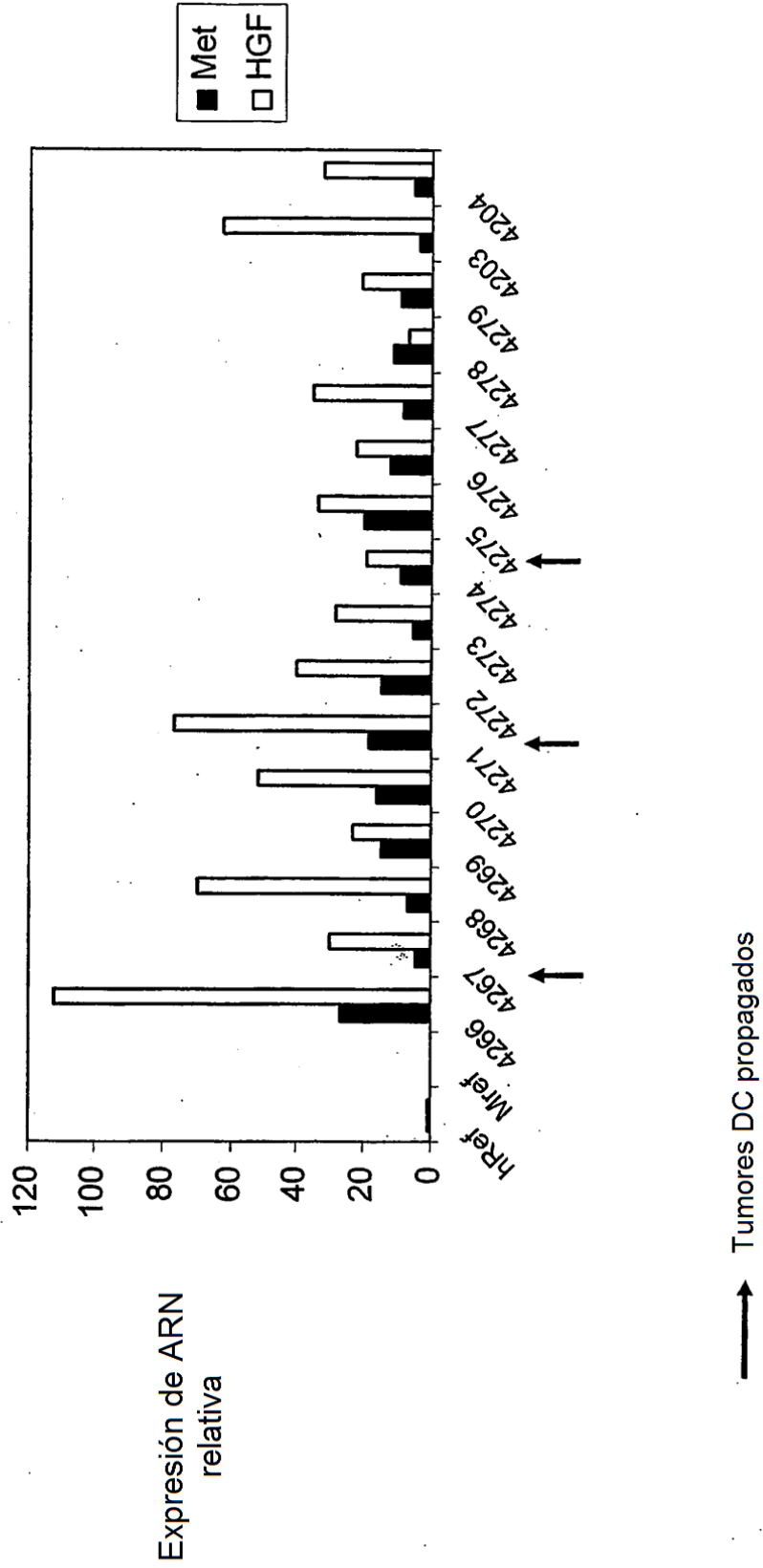


FIG. 4

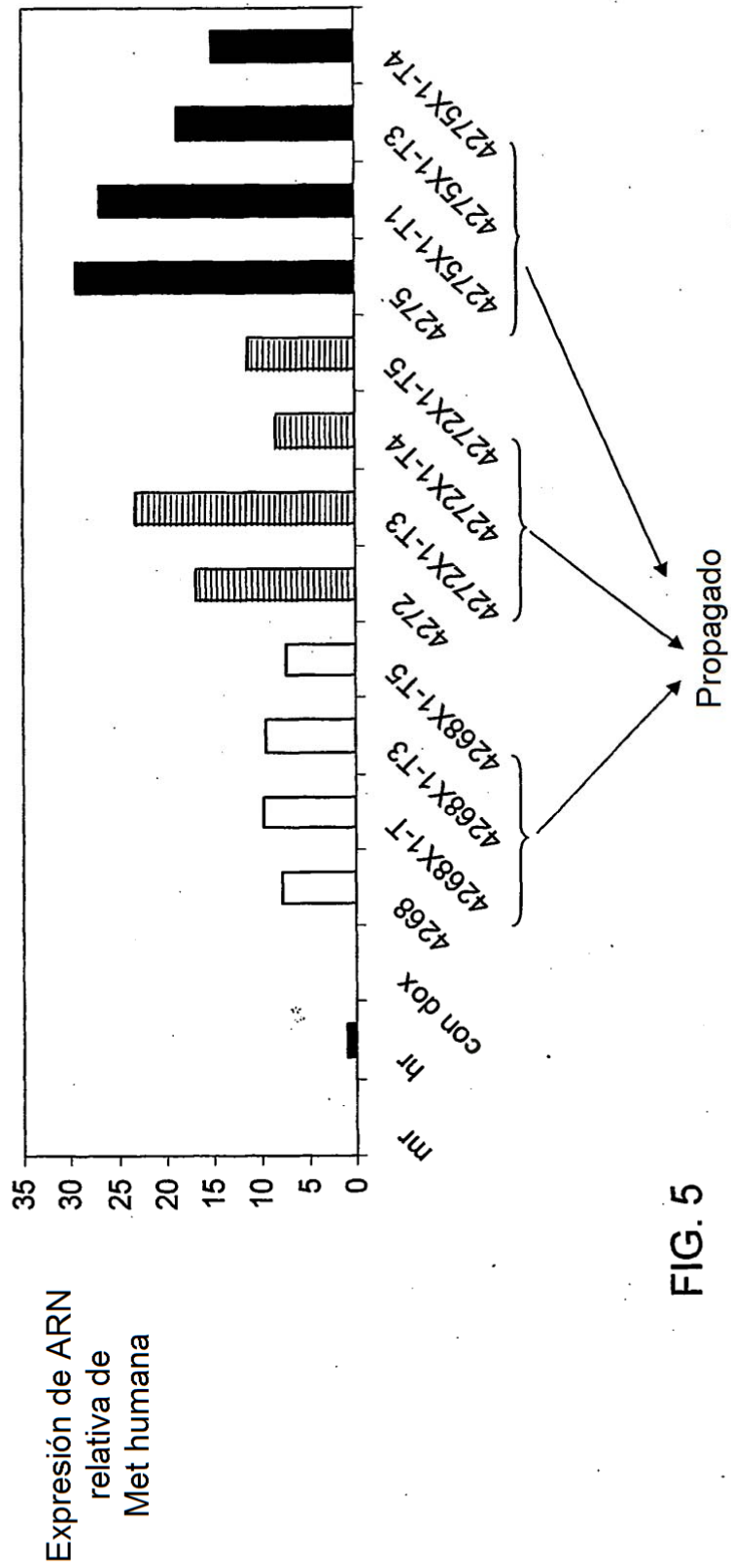


FIG. 5

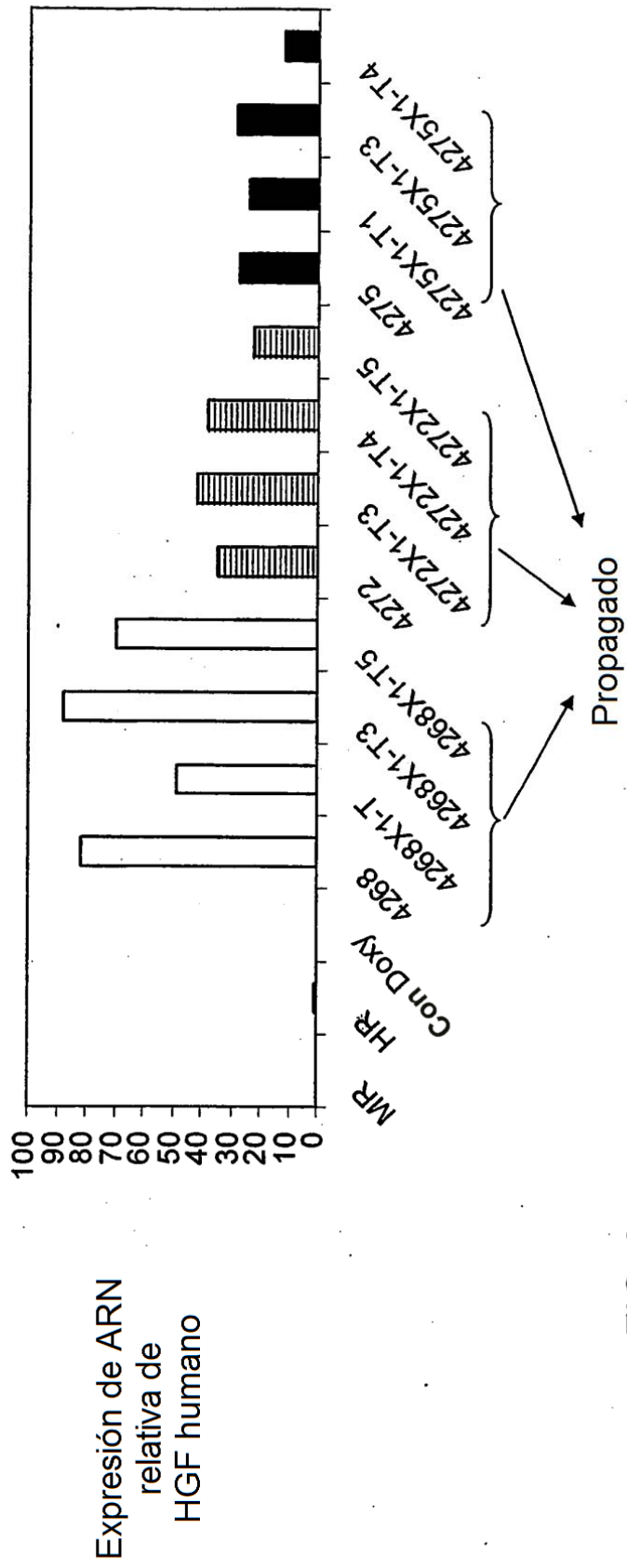


FIG. 6

Descripción de tumor DC	Nombre del tumor	Proteína HGF humana ng/mg	DESVIACIÓN TÍPICA
DC: (Met/HGF)-T3	4268	77,09	0,47
propagado X1 (Met/HGF)- T3	4268x#	23,50	1,07
propagado X1 (Met/HGF)- T3	4268x#3	51,77	1,60
propagado X1 (Met/HGF)- T3	4268x#5	40,26	5,48
DC: (Met/HGF)- T7	4272	19,99	0,83
propagado X1 (Met/HGF)- T7	4272x#3	10,95	0,48
propagado X1 (Met/HGF)- T7	4272x#4	15,49	0,41
propagado X1 (Met/HGF)- T7	4272x#5	8,35	0,57
DC: (Met/HGF)-T3'	4275	5,79	0,15
propagado X1 (Met/HGF)-T3'	4275x#1	5,93	0,16
propagado X1 (Met/HGF)-T3"	4275x#3	20,79	0,70
propagado X1 (Met/HGF)-T3'	4275x#4	6,46	0,69

FIG. 7

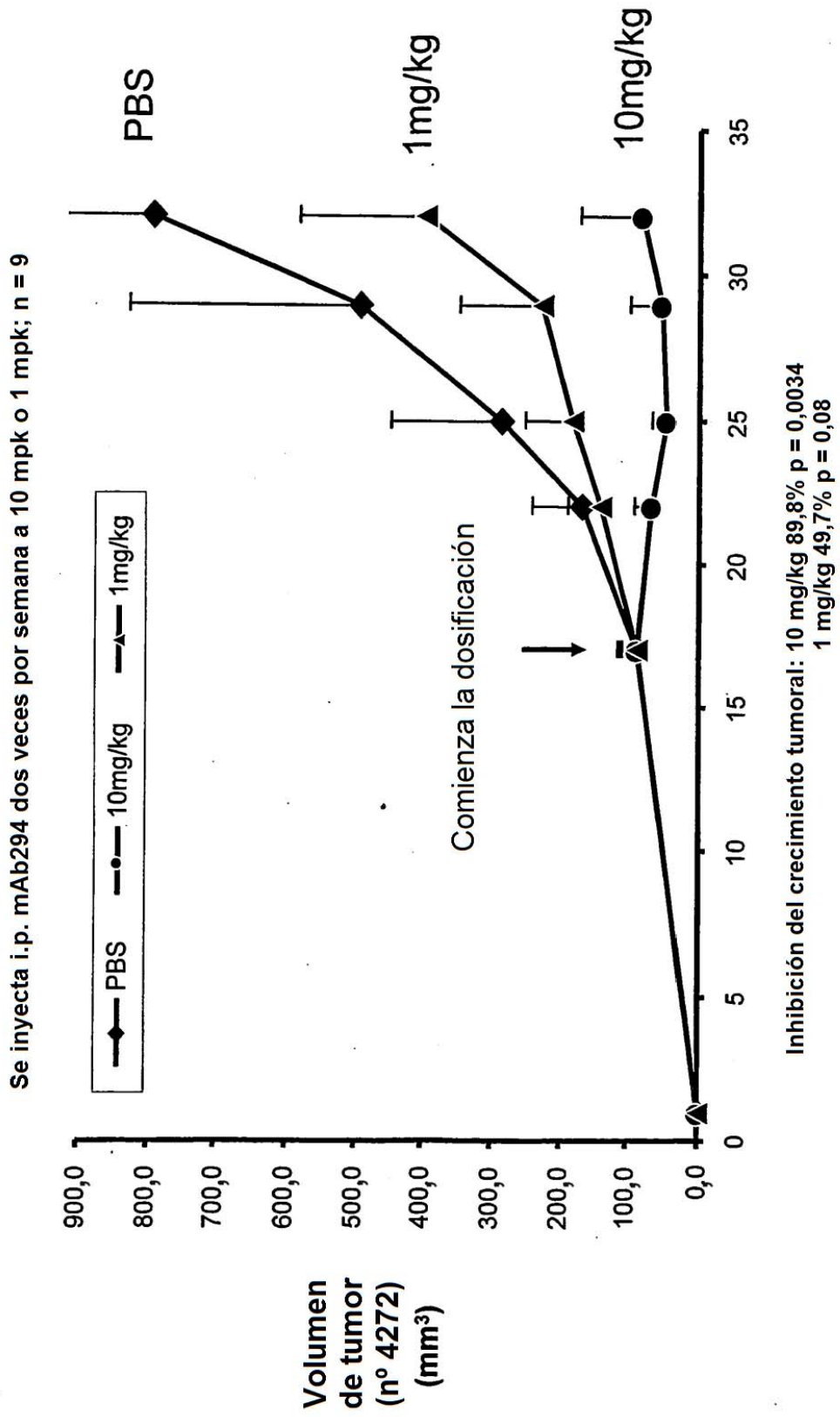
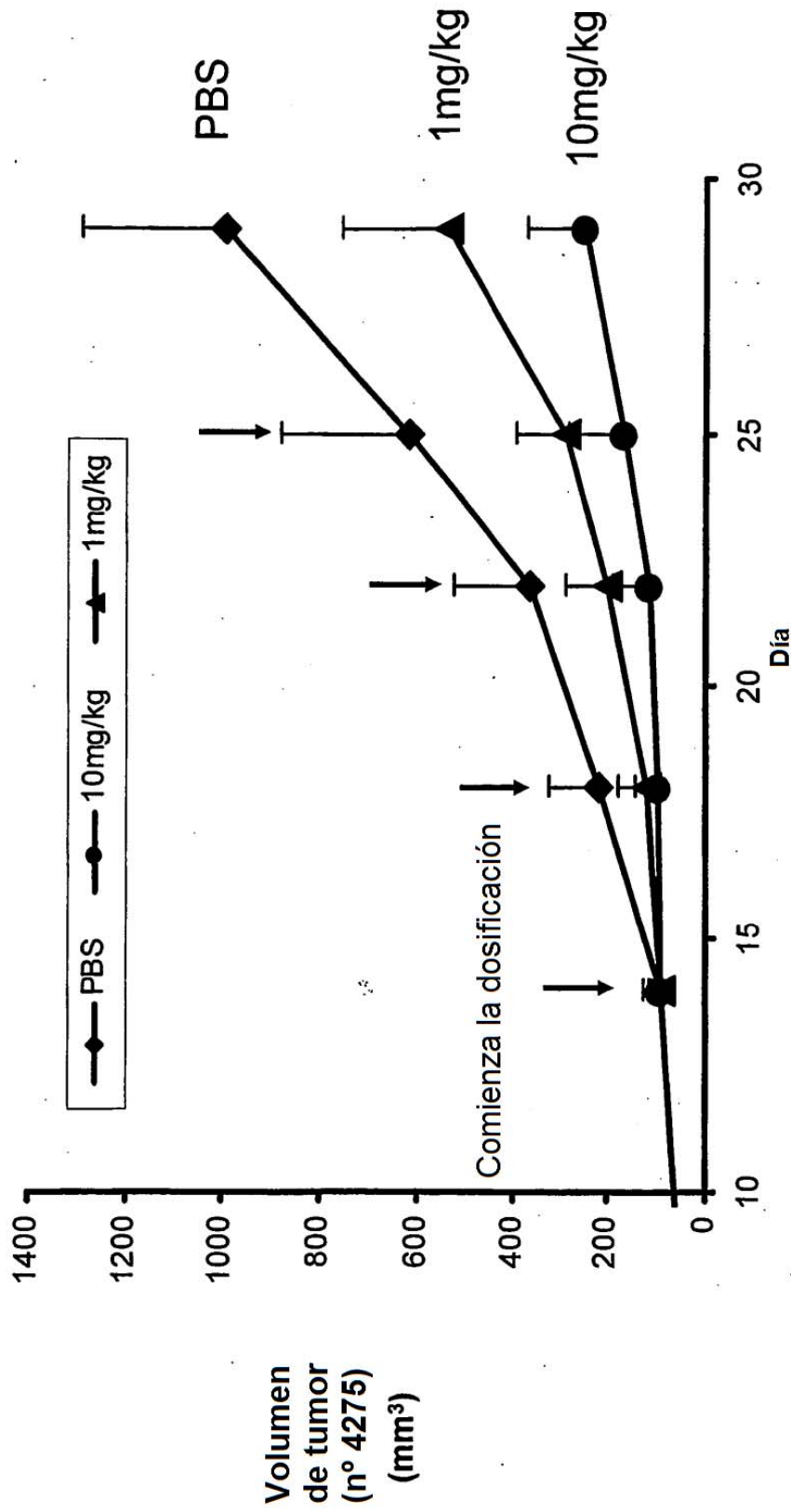


FIG. 8

Se inyecta i.p. mAb294 a 10 mpk o 1 mpk, dos veces por semana, n = 10
 PBS como control



Inhibición del crecimiento tumoral: 10 mg/kg 74,8% p < 0,001
 1 mg/kg 46,4% p = 0,0027

FIG. 9