

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 397 874**

21 Número de solicitud: 201031322

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

C12R 1/91 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

03.09.2010

43 Fecha de publicación de la solicitud:

12.03.2013

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (100.0%)
CENTRO DE INNOVACIÓN E TRANSFERENCIA
DE TECNOLOGÍA EDF EMPRENDIA CAMPUS SUR
15782 SANTIAGO DE COMPOSTELA
(A Coruña) ES**

72 Inventor/es:

**BRAVO LÓPEZ, Susana Belén;
RODRÍGUEZ GARCÍA-RENDUELES, María Elena;
CAMESELLE TEIJEIRO, José Manuel y
ÁLVAREZ VILLAMARÍN, Clara**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **LÍNEAS CELULARES Y SU USO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE FÁRMACOS PARA EL
CARCINOMA TIROIDEO.**

57 Resumen:

Líneas celulares y su uso para la identificación de fármacos para el carcinoma tiroideo.

La presente invención se refiere al uso un sistema de líneas celulares de carcinoma tiroideo modificadas para expresar p27Kip1 exógeno en niveles estables o niveles inferiores de TNIP2 respecto de los niveles control, y al animal no humano que comprende dichas líneas. Además, la presente invención se refiere al uso de dichas líneas y dicho animal para el cribado de fármacos para el carcinoma tiroideo, así como a un kit que comprende dichas líneas.

ES 2 397 874 A1

DESCRIPCIÓN

Líneas celulares y su uso para la identificación de fármacos para el carcinoma tiroideo.

5 La presente invención pertenece al campo de la Biología Celular, la Biotecnología y la Biomedicina, y se refiere al uso de líneas celulares de carcinoma tiroideo, modificadas para expresar p27Kip1 exógeno en niveles estables o inferiores de TNIP2 respecto de los niveles control, y al animal no humano que comprende dichas líneas. Además, la presente invención se refiere al uso de dicha línea y dicho animal para el cribado de fármacos para el carcinoma tiroideo.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 La búsqueda de nuevos fármacos antitumorales está actualmente determinada por las alteraciones moleculares identificadas en las células tumorales. Estas alteraciones definen un contexto molecular que hace que las células tumorales sean sensibles a unos compuestos determinados. La combinación de los abordajes tradicionales con la información molecular actual permite el diseño de nuevos modelos celulares y animales para la búsqueda de fármacos que eliminen selectivamente las células tumorales.

20 Hasta la fecha, existen muchas dificultades para encontrar nuevos fármacos antitumorales específicos para eliminar exclusivamente las células con un contexto molecular determinado. En particular, es de especial interés encontrar fármacos antitumorales contra las células tumorales con un fenotipo más agresivo, capaces de invadir otros tejidos y de provocar metástasis.

25 El inhibidor 1B de quinasa dependiente de ciclina (CDKN1B, p27, KIP1 o p27Kip1) es una proteína codificada en humanos por el gen p27Kip1. Esta proteína pertenece a la familia de proteínas inhibitoras de quinasas dependientes de ciclinas. p27Kip1 interacciona con quinasas dependientes de ciclina (CDK, del inglés “*cyclin-dependent kinases*”), controla la progresión del ciclo celular en la fase G1 y suele considerarse una proteína inhibitora del ciclo celular, generalmente por inhibición de CDK2, debido a que su principal función es frenar o ralentizar el ciclo de división celular. Sin embargo, p27Kip1 es capaz de activar CDK4.

30

En WO03063581 se estudian líneas celulares y animales transgénicos que contienen mutaciones en p27Kip1 que resultan en la pérdida del sitio de fosforilación de CDK2 y que tienen como consecuencia un aumento en el tamaño de al menos una porción del animal, que presenta tejidos agrandados o células más grandes que los tejidos de los animales no transgénicos.

35

En WO2001051604 se describen animales recombinantes, entre ellos el ratón, que contienen células con información genética alterada y que sirven para identificar agentes antitumorales. Además, también se describe que la identificación de los compuestos antiproliferativos puede ser realizada utilizando líneas celulares, preferentemente líneas celulares tumorales humanas con información genética alterada, más particularmente de genes supresores de tumores o de oncogenes, entre los que se incluye p27Kip1, aunque no se proporcionan ejemplos en este caso particular. La alteración puede ser producida por expresión constitutiva de oncogenes o por interferencia de ARN para genes supresores de tumores.

40

45 En WO9924603 se describe un método de cribado de compuestos con actividad antitumoral donde se emplea un organismo con una alteración en un gen que es análogo u homólogo a un defecto primario tumoral. Una de las alteraciones estudiada es la pérdida de expresión de p27Kip1 como contexto molecular tumoral para el cribado de fármacos.

45

50 TNIP2 (de “*TNFAIP3 interacting protein 2*”), también llamado 2KLIP, ABIN2 o FLIP1, es una proteína que se une al dominio de tipo dedo de zinc en el extremo carboxilo terminal de la proteína A20 (TNFAIP3) y está involucrada en la activación de la vía de señalización de las quinasas ERK y MAPK, en varios tipos celulares.

50

El papel de ABIN2 (TNIP2) en la regeneración hepática ha sido estudiada en ratones transgénicos con sobreexpresión de este gen (Li CC. *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006. 342 (1):300-309) pero hasta la fecha no se ha estudiado el efecto de la represión de TNIP2 en modelos animales. Sí se han generado líneas celulares donde la expresión de ABIN2 (TNIP2) está inhibida mediante ARN de interferencia, con el objetivo de caracterizar la cascada de señalización en la que participa dicha molécula (Lang V. *et al.* Mol. Cell Biol. 2004. 24 (12):5235-5248).

55

60 La obtención de una línea celular primaria tiroidea que deriva de un carcinoma tiroideo papilar y su transfección para la sobreexpresión de p27Kip1 o la represión de la expresión de p27Kip1 mediante ARN de interferencia se describe en Bravo SB. *et al.* Anal Biochem 2010. 400 (2):219-228. Sin embargo, este trabajo no estudia la agresividad de las líneas celulares modificadas.

60

Por tanto, no se ha descrito hasta la fecha ningún modelo celular ni animal como los que aporta la presente invención para la identificación de nuevos fármacos antitumorales, especialmente dirigidos a eliminar aquellas células que presenten un fenotipo más agresivo y sean capaces de invadir otros tejidos.

5 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona nuevas líneas celulares y modelos animales basados en dichas líneas, que permiten el cribado de fármacos antitumorales.

10 Millones de personas sufren bocio, una enfermedad proliferativa de las células foliculares del tiroides que puede convertirse en neoplásica. Las neoplasias tiroideas tienen un bajo índice de proliferación y una alta incidencia de metástasis. Los autores de la presente invención han establecido cultivos primarios de células tiroideas humanas de distintas patologías proliferativas del tiroides, como son la enfermedad de Graves, el bocio multinodular, el adenoma folicular o el carcinoma papilar, además de metástasis de los nódulos linfáticos y de muestras de tejido de tiroides normal. El estudio de estos cultivos ha llevado a los autores a conocer el entorno molecular en el que las células del tiroides se vuelven cancerosas y adquieren un fenotipo de menor diferenciación que las hace más agresivas y les confiere una mayor capacidad metastásica.

20 Los autores han generado líneas celulares de carcinoma tiroideo papilar que expresan p27Kip1 exógeno o que tienen disminuida la expresión de TNIP2, y estas dos características, sorprendentemente, tienen un mismo efecto en el comportamiento celular cuando son introducidas en un modelo animal no humano: provocan un aumento en la invasión de los tejidos adiposo y muscular cercanos. Esta característica es de vital importancia puesto que implica que las células han adquirido la capacidad de migrar activamente y de atravesar barreras físicas entre tejidos, lo que es clave en el pronóstico de un cáncer.

25 Es sobradamente conocido en el estado de la técnica que p27Kip1 frena la inhibición celular y que su delección o inactivación va asociada a mayores niveles de proliferación celular, mayor tamaño de los órganos o del cuerpo y/o cáncer. Sin embargo, los autores de la presente invención describen que las células de carcinoma tiroideo son más agresivas, tienen mayor capacidad invasiva y presentan un fenotipo más maligno (con peor pronóstico clínico) cuando son modificadas de forma que los niveles de p27Kip1 no pueden disminuir y se mantienen constantes en la célula.

30 Por tanto, los autores de la presente invención presentan un nuevo modelo celular y animal para el cribado y la identificación de nuevos fármacos antitumorales. Los modelos que aporta la presente invención permiten discriminar el efecto de nuevas moléculas y compuestos sobre una población de carcinoma tiroideo más diferenciado, y otra más agresiva y de mayor capacidad metastásica, es decir, permiten encontrar aquellos fármacos capaces de frenar la metástasis y combatir así tumores más agresivos de peor pronóstico.

35 Las líneas celulares de la presente invención están modificadas genéticamente para expresar p27Kip1 exógeno y/o una ARN de interferencia de TNIP2. Estas modificaciones son las responsables de que las células tumorales presenten un fenotipo más agresivo y tengan mayor capacidad de invasión de tejidos. Por tanto, la presente invención proporciona nuevas herramientas para la identificación de fármacos antitumorales especialmente dirigidos a células tumorales en estadios avanzados, con un fenotipo de menor diferenciación que se asocia a una alta agresividad y capacidad de invadir otros tejidos, con mal pronóstico clínico.

40 Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de una línea celular de carcinoma tiroideo que comprende p27Kip1 exógeno, de una línea celular de carcinoma tiroideo caracterizada por expresar niveles inferiores de TNIP2 respecto de los niveles control, o de ambas, para la identificación de fármacos eficaces para el tratamiento del carcinoma tiroideo. En una realización preferida de la invención, se usa una línea celular de carcinoma tiroideo que comprende p27Kip1 exógeno, es decir, que expresa de manera estable el ARN mensajero del p27Kip1 exógeno y la proteína p27Kip1 exógena. En una realización preferida de la invención, la línea celular de carcinoma tiroideo expresa niveles estables de p27Kip1. Los niveles estables de p27Kip1 son invariables y son los niveles que presenta una línea celular de carcinoma tiroideo control, que no comprende p27Kip1 exógeno. En otra realización preferida de la invención, se usa una línea celular de carcinoma tiroideo que expresa niveles inferiores del ARN mensajero y de proteína de TNIP2, respecto de los niveles control. En otra realización preferida de la invención, se usan ambas líneas celulares.

45 Una "línea celular de carcinoma tiroideo" es una línea celular obtenida mediante el cultivo de una porción de tejido de carcinoma tiroideo. Preferiblemente, el tejido de carcinoma tiroideo es de origen humano. Dicho tejido puede ser fresco y proceder de biopsias o cirugías realizadas en pacientes con patologías de la glándula tiroides. Los cultivos celulares pueden realizarse siguiendo cualquier protocolo descrito para este fin en el estado de la técnica, como son por ejemplo, pero sin limitarse, los protocolos descritos en los ejemplos de la presente memoria.

50 El término "exógeno", tal y como se emplea en la presente memoria, se refiere a p27Kip1, más particularmente se refiere al ARN mensajero o a la proteína p27Kip1 que se expresan en las células a partir de la secuencia de ADN introducida en las células. El término "exógeno" se entiende en contraposición a "endógeno", siendo el p27Kip1

endógeno el expresado de manera natural en las células, codificado por el correspondiente gen del genoma celular, sujeto a regulación. Mientras que los niveles de p27Kip1 endógeno disminuyen en presencia de TGF- β (factor de crecimiento transformante beta, del inglés, “*transforming growth factor beta*”) los niveles de p27Kip1 exógeno se mantienen estables e invariables y no se ven afectados en presencia de este factor, como se ilustra en la figura 1C de la presente memoria.

La expresión “niveles estables” hace precisamente referencia a lo mostrado en la figura 1C, es decir, a que la expresión de p27Kip1 exógeno permite que los niveles de la proteína p27Kip1 exógena se mantengan estables ante estímulos proapoptóticos, como por ejemplo TGF- β , en las líneas celulares de carcinoma tiroideo de la invención, transformadas para expresar exógenamente p27Kip1. Estas líneas presentan los niveles de p27Kip1 de una línea sin transformar en ausencia de estímulos, es decir, estas líneas presentan unos niveles de p27Kip1 estables y constantes, imposibles de disminuir mediante factores proapoptóticos.

La transformación antes mencionada se refiere a la introducción en las células de una secuencia de ADN que comprende al menos un promotor y la secuencia que codifica para p27Kip1. La línea control empleada por los inventores, denominada sencillamente Rc en la presente memoria, fue generada introduciendo, en la misma línea original T-PC2, el vector Rc con el promotor CMV (citomegalovirus) pero sin la secuencia que codifica para p27Kip1, es decir, introduciendo en las células el vector vacío.

El efecto conseguido mediante la introducción en la línea celular de p27Kip1 exógeno es una resistencia a la apoptosis, es decir, una inducción de la supervivencia celular.

En las líneas celulares de la invención que expresan p27Kip1 exógeno de manera estable, esta proteína es capaz de interactuar con la quinasa dependiente de ciclo CDK4 y activarla.

Las líneas celulares de carcinoma tiroideo descritas en la presente invención que expresan p27Kip1 exógeno en niveles estables, llevan en su genoma un ADN exógeno que comprende al menos un promotor y la secuencia que codifica para p27Kip1. La secuencia que codifica para p27Kip1 puede ser cualquier secuencia nucleotídica que codifica para la proteína p27Kip1 de cualquier especie. Preferiblemente, es una secuencia nucleotídica que codifica para la proteína p27Kip1 de un mamífero, más preferiblemente, de humano o de perro, gato, vaca, rata o ratón. Como se muestra en la tabla 1, la homología de secuencia entre el ADN que codifica para la proteína p27Kip1 en humano, perro, gato, vaca, rata y ratón es de al menos un 84%. La homología de secuencia entre las proteínas p27Kip1 de estas especies es de al menos un 98%.

Por tanto, en lo que respecta a la presente invención, p27Kip1 es preferiblemente una secuencia nucleotídica con al menos 84% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6 (secuencia codificante de NP_034005) o una secuencia aminoacídica con al menos un 98% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 7 (NM_009875).

Tabla 1. Porcentajes de identidad entre las secuencias nucleotídicas que codifican para p27Kip1 y las secuencias aminoacídicas de p27Kip1 de humano, perro, gato, rata y vaca frente a las respectivas secuencias de ratón.

Especie	% de identidad	
	ADN	proteína
<i>Mus musculus</i>	100	100
<i>Homo sapiens</i>	88	99
<i>Canis lupus familiaris</i>	84	98
<i>Felis catus</i>	89	98
<i>Rattus norvegicus</i>	97	100
<i>Bos taurus</i>	86	99

La expresión “expresa niveles inferiores”, tal y como se emplea en la presente memoria, se refiere a que la línea celular está transformada para expresar niveles inferiores del ARN mensajero y de la proteína TNIP2. Dichos niveles son inferiores cuando se comparan con los niveles control. El término “niveles control” se refiere a los niveles de dicho ARN mensajero o proteína en la línea celular primaria de carcinoma tiroideo de origen, sin transformar, llamada “línea celular original”. La transformación antes mencionada se refiere a la introducción en las células de una secuencia de ADN que comprende al menos un promotor y la secuencia que codifica para un ARN de interferencia de TNIP2.

5 Como puede observarse en las figuras 1 y 2 de esta memoria, y como está descrito en los ejemplos, los autores de la presente invención han obtenido distintas líneas derivadas de cultivos celulares de carcinoma tiroideo papilar humano, que han transformado mediante la inserción del gen p27Kip1 bajo el promotor de CMV, o mediante la inserción de una secuencia de ADN que codifica para un ARN pequeño en horquilla (shRNA, del inglés "*short hairpin RNA*"), capaz de inhibir la expresión del gen TNIP2 en estas células, respectivamente.

10 Un segundo aspecto de la invención se refiere a una línea celular de carcinoma tiroideo, caracterizada por expresar niveles inferiores de TNIP2 respecto de los niveles control.

15 La línea celular del segundo aspecto de la invención expresa niveles inferiores del ARN mensajero de TNIP2 que la línea sin transformar, es decir, que la línea control. Los niveles control son los niveles de expresión de TNIP2, es decir, del ARN mensajero y de la proteína TNIP2, en dicha línea celular control. Por tanto, el ARN de transferencia de TNIP2 es capaz de inhibir la expresión de TNIP2 en la línea celular de carcinoma tiroideo humano.

20 En una realización preferida, la inhibición de la expresión de TNIP2 se realiza mediante: (a) una molécula de ARN; (b) un oligonucleótido antisentido; o (c) una ribozima.

25 El término "oligonucleótidos antisentido" se refiere a cadenas de ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos que pueden inhibir la expresión de TNIP2 por uno de estos tres mecanismos: (a) interfiriendo la transcripción, al hibridar en el gen o en una región reguladora del gen que codifica para TNIP2; (b) interfiriendo la traducción del ARN mensajero de TNIP2 a proteína, al unirse el oligonucleótido antisentido en el citoplasma con dicho ARN mensajero; o (c) provocando la rápida degradación del ARN mensajero de TNIP2 por ARNasas (como ARNasa H), al formar un dúplex con dicha molécula de ARN mensajero.

30 El término "ribozima", tal y como se emplea en la presente memoria, se refiere a un polinucleótido catalítico (típicamente de ARN), que puede construirse para reconocer específicamente, por hibridación, un ARN mensajero, provocando así su fragmentación y la inhibición de su expresión. Las ribozimas pueden introducirse en la célula como moléculas de ARN catalíticas o como construcciones genéticas de ADN que, cuando se expresan, dan lugar a moléculas catalíticas de ARN.

35 En una realización preferida, la línea celular está caracterizada porque expresa un ARN de interferencia de TNIP2. En una realización más preferida, el ARN de interferencia es SEQ ID NO: 1.

40 La línea del segundo aspecto de la invención ha sido obtenida por los inventores mediante la introducción en la línea celular original de carcinoma tiroideo papilar (T-PC2) de un ADN que comprende al menos un promotor y una secuencia que codifica para un ARN de interferencia específico de TNIP2. Este ARN de interferencia es capaz de hibridar específicamente con el ARN mensajero de TNIP2 endógeno y promover su destrucción, reduciendo así los niveles de ARN mensajero y de proteína de TNIP2 en las células. El ARN de interferencia empleado por los inventores para reducir específicamente la expresión de TNIP2 es un shRNA cuya secuencia es SEQ ID NO: 1. Como está descrito en los ejemplos de la presente memoria, la línea control empleada por los inventores fue generada introduciendo, en la misma línea original T-PC2, un ARN de interferencia inespecífico, también un shRNA, que se denomina "*scramble*" (shS) y que no está dirigido específicamente a ningún gen.

45 Un tercer aspecto de la invención se refiere a un kit que comprende una línea celular del segundo aspecto de la invención (a partir de ahora llamado kit de la invención). En una realización preferida, el kit de la invención además comprende una línea celular de carcinoma tiroideo control.

50 Una línea celular de carcinoma tiroideo control puede ser la línea celular de carcinoma tiroideo original, de la que derivan las líneas transformadas, como está descrito en la presente memoria, para expresar p27Kip1 exógeno o para expresar niveles inferiores de TNIP2 respecto de los niveles control. Esta línea celular control puede estar transformada, sin embargo, para expresar algún ARN sin sentido o que no afecte el contexto molecular de la célula, o para expresar algún marcador, como por ejemplo, pero sin limitarse, una proteína fluorescente, un antígeno o una enzima, que permitan identificar fácilmente las células mediante técnicas de fluorescencia, colorimétricas o técnicas inmunológicas. Los marcadores y las técnicas de detección son bien conocidas por el experto en la materia y descritas en el estado de la técnica.

55 En otra realización preferida, el kit de la invención además comprende una línea celular de carcinoma tiroideo caracterizada por expresar p27Kip1 exógeno en niveles estables.

60 El kit de la invención puede comprender también otros componentes, como medios de cultivo, suplementos de medios de cultivo, entre los que pueden incluirse, pero sin limitarse, antibióticos, aminoácidos, hormonas o antioxidantes, placas o frascos de cultivo celular, y otros reactivos para el cultivo celular bien conocidos por un experto en la materia.

Un cuarto aspecto de la invención se refiere al uso del kit de la invención para la identificación de fármacos eficaces para el tratamiento del carcinoma tiroideo.

Las líneas celulares de la invención pueden emplearse en ensayos *in vitro* para el cribado de fármacos antitumorales. Preferiblemente, para la identificación de fármacos antitumorales eficaces para el tratamiento del carcinoma tiroideo. Los ensayos de cribado de fármacos permiten ensayar la eficacia de librerías de miles de compuestos de manera muy eficiente, lo que amplía las probabilidades de encontrar una nueva molécula que dé resultados positivos, es decir, que elimine selectivamente aquellas células que presenten un fenotipo tumoral más agresivo.

Un quinto aspecto de la invención se refiere al uso del kit de la invención para la obtención de un animal no humano. Un sexto aspecto de la invención se refiere al uso de una línea celular de carcinoma tiroideo caracterizada por expresar p27Kip1 exógeno en niveles estables, de una línea celular de carcinoma tiroideo del segundo aspecto de la invención, o de ambas, para la obtención de un animal no humano, útil para la identificación de fármacos eficaces para el tratamiento del carcinoma tiroideo. Dicho animal no humano constituye un modelo animal para el ensayo de fármacos antitumorales *in vivo*.

Un séptimo aspecto de la invención se refiere a un animal no humano que comprende una línea de carcinoma tiroideo caracterizada por expresar p27Kip1 exógeno en niveles estables, una línea de carcinoma tiroideo caracterizada por expresar niveles inferiores de TNIP2 respecto de los niveles control o ambas. En una realización preferida, el animal no humano además comprende la línea de carcinoma tiroideo control.

Un octavo aspecto de la presente invención se refiere al uso del animal no humano del séptimo aspecto de la invención como modelo animal de cáncer, especialmente para el cribado de fármacos. En una realización preferida, se usa como modelo animal de carcinoma tiroideo.

Preferiblemente, el animal no humano pertenece a la Subfamilia *Murinae*. Más preferiblemente, es una rata o un ratón.

El animal no humano del séptimo aspecto de la invención puede ser un modelo animal para el cribado de fármacos antitumorales. Las líneas celulares de carcinoma tiroideo pueden ser introducidas en el animal en forma de xenoimplantes o "*xenografts*", por ejemplo, pero sin limitarse, subcutáneamente. Como han demostrado los inventores, estos xenoimplantes van a invadir el tejido adiposo y muscular adyacente, puesto que su fenotipo es altamente agresivo. Un fármaco capaz de disminuir o eliminar la capacidad invasiva de las células de los xenoimplantes, sería un candidato muy prometedor para el tratamiento del cáncer, preferiblemente del carcinoma tiroideo.

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

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Selección de los clones que han incorporado el vector de expresión exógena de p27Kip1. A. Se midió el número de células tras el tratamiento con TGF- β . Únicamente Rc-p27_{4, 5 y 6}, presentan crecimiento celular con TGF- β , es decir, sólo estos clones expresan p27Kip1 exógeno de forma estable en niveles que permiten que TGF- β no induzca apoptosis pero sí proliferación. **B.** Se cuantificó el número de células apoptóticas y se calculó el porcentaje de apoptosis en cada clon, observándose que en todos los clones que han incorporado el p27Kip1 exógeno disminuye la apoptosis inducida por TGF- β . **C. Immunoblot** donde se observa que los niveles de p27Kip1 disminuyen en presencia de TGF- β en la línea control Rc, pero se mantienen estables en las líneas que expresan p27Kip1 exógeno Rc-p27_{4, 5 y 6}.

Fig. 2. Silenciamiento de TNIP2: niveles de la proteína TNIP2 analizados por immunoblot. El lentivirus con la secuencia 144348 de pequeño ARN en horquilla (shRNA) de TNIP2 (shTNIP2) reduce de manera efectiva los niveles de proteína.

Fig. 3. La expresión exógena de p27Kip1 y la disminución de la expresión de TNIP2 inducen un fenotipo similar de carcinoma pobremente diferenciado. A. Los xenoimplantes procedentes de poblaciones celulares control (T-PC2-Rc, vector vacío), de líneas que expresan p27Kip1 exógeno (T-PC2-Rc-p27_{4, 5 y 6}) y de líneas T-PC2-shS y T-PC2-shTNIP2, crecieron durante 5 semanas. Los xenoimplantes que expresan p27Kip1 exógeno tienen un volumen menor que los controles, mientras que no se observan diferencias en aquellos que tienen disminuida la expresión de TNIP2. Sin embargo, tanto los que expresan p27Kip1 exógeno, a pesar de su pequeño volumen, como los que tienen TNIP2 reducido son frecuentemente multinodulares e invasivos con infiltración en el tejido adiposo adyacente y músculo esquelético. **B.** Todos los xenoimplantes expresan TTF-1, un factor de transcripción

característico de las células foliculares tiroideas y mantienen algunas de las características nucleares peculiares de carcinoma papilar, como son alargamiento, forma ovalada y solapamiento nuclear, al igual que contorno irregular del núcleo con surcos. Además, muestran un alto índice mitótico.

5 **Fig. 4. Un modelo murino de carcinoma de tiroides humanos reproduce lo encontrado en cultivo e *in vivo*.** Se introdujeron 10^7 células subcutáneamente en el ratón y tras 5 semanas se analizaron los tumores resultantes. Los tumores conservaban la expresión de TTF-1, el factor de transcripción característico de las células foliculares de tiroides y conservado en los carcinomas diferenciados, y algunas de las características nucleares diferenciales de carcinoma papilar (ver Fig. 3B). Se detecta además un mayor índice mitótico. La inmunohistoquímica se realizó en paralelo en los xenoinplantos controles (Rc y shS) y los xenoinplantos con las líneas que expresaban p27Kip1 exógeno o shTNIP2 (Rc-p27_{4, 5 y 6} y shTNIP2). La expresión de TGF- β es abundante en todos los tumores sin diferencias entre los dos grupos. La localización de p27Kip1 es principalmente nuclear y, aunque se expresa abundantemente, es mucho mayor en el caso de los tumores que expresan p27Kip1 exógeno en niveles estables (Rc-p27_{4, 5 y 6}). p65 y Ciclina D1 se encuentran en todas las células y se distribuyen en el núcleo y en el citoplasma. Ciclina D1 tiende a ser más intensa en los tumores que expresan p27Kip1 exógeno.

EJEMPLOS

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto el efecto de la expresión exógena de p27Kip1 y de la inhibición de TNIP2 en la agresividad del fenotipo tumoral de líneas de carcinoma tiroideo.

EJEMPLO 1: Obtención de la línea celular Rc-p27.

25 A partir de tejido humano de carcinoma tiroideo se establecieron cultivos de carcinoma tiroideo papilar como se describe en Bravo *et al.* 2003. Oncogene 49, 7819-7830. De las líneas obtenidas, se empleó la T-PC2, de “*thyroid papillary carcinoma*” para generar distintos clones de líneas que expresan p27Kip1 exógeno. El objetivo es conseguir líneas celulares que expresen niveles estables de p27Kip1, de forma que ante estímulos proapoptóticos como por ejemplo TGF- β , no decrezcan los niveles de p27Kip1 y la célula no entre en apoptosis y pueda seguir dividiéndose (Fig. 1 A y B). No se trata de sobreexpresar p27Kip1 en niveles tan elevados que la célula, además de no entrar en apoptosis, no pueda proliferar por el bloqueo de la quinasa CDK4 (del inglés “*cyclin-dependent kinase*” 4). Para obtener las líneas de carcinoma tiroideo y las líneas de tejido tiroideo control (tirocitos foliculares normales), se disecciona la porción apropiada del tiroides con un bisturí inmerso en medio de crecimiento completo (Ham’s F-12 modificado por Coon suplementado con 5% de suero de ternera recién nacida (NCS, del inglés “*newborn calf serum*”), 2 mM glutamina, una mezcla de 5 hormonas: 1 mIU/ml de TSH (hormona estimuladora del tiroides, del inglés “*thyroid stimulating hormone*”), 10 ng/ml de somatostatina, 10 mg/ml de insulina, 1 nM de hidrocortisona y 5 mg/ml de transferrina, y 100 IU/ml de penicilina/estreptomicina y 2,5 ng/ml de anfotericina B. El tejido diseccionado se digiere con colagenasa iV 1 mg/ml (Sigma) y 2,5 mg/ml de tripsina en PBS (tampón salino de fosfato, del inglés “*Phosphate buffer saline*”), durante 1 hora, y se filtra por una malla de 41 micrometros de tamaño de poro para retirar los fragmentos de tejido no digeridos. Las células se lavan varias veces y se siembran en medio completo, en placas de poliestireno. Todos los cultivos expresan el marcador de fenotipo tiroideo TTF1 y tiroglobulina en distintos pases, es decir, mantienen el fenotipo tiroideo *in vitro*.

45 La secuencia que codifica para p27Kip1 de ratón se encuentra insertada en un plásmido vector Rc/CMV. Se realizó una transfección con AMAXA en el cultivo de carcinoma papilar T-PC2 (ver Bravo *et al.* 2010. Anal. Biochem. 219-228). Para ello se transfectaron 2 μ g de Rc/CMVp27, linealizado mediante la enzima Scal_I en 1×10^6 células y se sembraron en una placa de 60 mm en medio completo. Como control se utilizaron 1×10^6 células de T-PC2 sin transfectar sembradas en una placa de 60 mm. Las células se incubaron durante 2 días. Dado que el plásmido tiene resistencia al antibiótico Neomicina, se añadió Neomicina 500 μ g/ml (G418 *Disulphate SALT Solution* G8108, SIGMA) y se esperó hasta que en la placa control se murieran todas las células, lo que ocurrió en aproximadamente 2 días. Las células transfectadas se mantuvieron en medio con Neomicina durante dos semanas cambiándoles el medio cada 2 días. Para asegurarse de que no quedase ninguna célula que sin transfectar, se dejó de tratar las células con Neomicina, se aspiró el medio, se lavaron 2 veces con tampón salino de fosfato (PBS, del inglés “*Phosphate Buffer Saline*”) estéril y se trataron durante una semana con TGF- β (2 ng/ml) para eliminar cualquier residuo de células que no hubieran integrado el plásmido, pero hubieran conseguido ser resistentes a la Neomicina.

60 Las células tratadas con TGF- β en medio deprivado (con sólo 0,1% de NCS y sin la mezcla de 5 hormonas) murieron a las 24 horas tras el tratamiento, lo cual está relacionado con un descenso en los niveles de p27Kip1. Si se mantienen los niveles de p27Kip1 mediante transfección, las células no sólo no se mueren sino que además proliferan, con lo que al tratar estas células (en las que se ha introducido de manera estable p27Kip1 exógeno) con TGF- β , es seguro que las que no hayan integrado el p27Kip1 exógeno de manera estable, entran en apoptosis.

Una vez transcurrido ese tiempo, las células se mantuvieron con una dosis muy baja de neomicina (400 ng/ml) en medio completo.

A partir de este cultivo, se obtuvieron tres clones que habían incorporado de manera estable el vector: Rc-p27₄, Rc-p27₅, Rc-p27₆. Estos tres clones presentan niveles estables de p27Kip1 en presencia de TGF-β, al contrario del control (Rc) en el que los niveles de p27Kip1 disminuyen en presencia de TGF-β. Esto se comprobó por *immunoblot* o *western blot* (WB) (Fig. 1C). El número de células vivas y apoptóticas se cuantificó con el marcador de células vivas Hoescht (Fig. 1 A y B). Los cultivos fueron fotografiados y se contaron las células. Los resultados obtenidos con esta técnica fueron similares a los obtenidos por citometría de flujo y por tinción con anexina V (Bravo *et al.* 2003. *Oncogene* 49, 7819-7830.).

EJEMPLO 2: Obtención de las líneas shS y shTNIP2.

Para inhibir en las células la expresión de TNIP2 se empleó un plásmido lentiviral que lleva un ARN de interferencia de TNIP2 (shTNIP2, SEQ ID NO: 1), y otro plásmido que lleva como control un ARN inespecífico (shScramble, SHC002V (Sigma)).

En estudios de inhibición transitoria de TNIP2 se emplearon secuencias de pequeños ARN de interferencia (siRNA, del inglés “*small interfering RNA*”) diseñadas por los inventores y transcritas usando el *Silencer siRNA Constructor kit*, de Ambion, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se probaron dos pares de oligonucleótidos (S: sentido y AS: antisentido) para silenciar la expresión de TNIP2, que se detallan en la tabla 2.

Las infecciones para la introducción del plásmido en las células se realizaron con lentivirus comerciales (MISSION Lentiviral Transduccion Particles, SHVRS, SIGMA) como se describe en Bravo *et al.* 2010. *Anal. Biochem.* 219-228. La casa comercial ofrece varios clones con distintas secuencias de ARN de horquilla pequeña o shRNA (del inglés “*short hairpin ARN*”) dirigidas al ARN mensajero diana, llamadas shTNIP2. El clon más efectivo resultó ser el TRCN0000144348, cuya secuencia es SEQ ID NO: 1 (Fig. 2).

Tabla 2. Oligonucleótidos para el silenciamiento de TNIP2 por siRNA.

siTNIP2	13	S	5'AACGACAGCATGCACAAAGGACCTGTCTC3' (SEQ ID NO: 2)
		AS	5'AATCCTTTGTGCATGCTGTGCGCCTGTCTC3' (SEQ ID NO: 3)
	34	S	5'AATAAATGACTGTGCCGAAGTCCTGTCTC3' (SEQ ID NO: 4)
		AS	5'AAACTTCGGCACAGTCATTTACCTGTCTC3' (SEQ ID NO: 5)

Los extractos de proteínas celulares totales se obtuvieron por lisis con un tampón con Triton y los *immunoblots* se realizaron en membranas de PVDF (fluoruro de polivinilideno) como está descrito en Bravo *et al.* 2003. *Oncogene* 49, 7819-7830. Los anticuerpos empleados se detallan en la tabla 3.

Tabla 3. Anticuerpos primarios y secundarios empleados para *immunoblot* (WB), inmunofluorescencia (IF) e inmunohistoquímica (IH).

Anticuerpo	Proveedor	Generado en	Dilución		
			WB	IF	IH
Tubulina	Sigma, T5168	ratón	1:2.500		
p27Kip1	BD, 610241	ratón	1:10.000	1:500	
p27Kip1	DAKO, SX53G8	ratón			1:500
Ciclina D1 SP4	Master Diagnostica	ratón			prediluido
NFkB p65 (A)	Sta Cruz, sc-109	conejo	1:1.000		1:1.000
TTF-1, 8G7G3/1	DAKO	ratón			1:20
TGF-β	Sta Cruz, sc-146	conejo			1:50
anti-ratón- peroxidasa	DAKO, P0260	conejo			1:5.000
anti-conejo- peroxidasa	GE Healthcare NA934V	burro			1:5.000

EJEMPLO 3: Los xenoimplantes procedentes de células que expresan p27Kip1 exógeno o shTNIP2 se comportan como carcinomas pobremente diferenciados con un patrón multinodular e infiltrante.

5 Para observar la contribución de p27Kip1 y la ventana temporal de la expresión de TNIP2 en el crecimiento *in vivo* de un tumor tiroideo, se inyectaron subcutáneamente en un ratón desnudo 10^6 células provenientes de una población transfectada con el vector vacío (Rc) o tres poblaciones independientes transfectadas con p27Kip1, y además aquellas infectadas con shTNIP2 o su control shS. Las masas celulares inyectadas reciben el nombre de xenoimplantes o “*xenografts*”.

10 Cinco semanas después se analizaron los xenoimplantes (Fig. 3A-B y 4). Los xenoimplantes crecían como tumores con un patrón sólido que aún mantenía las características de tiroides, demostrando que se comportaba como un carcinoma diferenciado de tiroides. Mantenían el solapamiento nuclear y la forma de los núcleos con surcos, característicos del carcinoma tiroideo papilar (PTC). Sin embargo, ninguno de los xenoimplantes presentaba las típicas pseudoinclusiones nucleares con forma de grano de café del PTC y mostraban una elevada actividad mitótica, indicando un cambio a carcinoma tiroideo pobremente diferenciado (PDTC).

15 Los tumores procedentes de las poblaciones celulares que expresaban de manera exógena p27Kip1 eran más pequeños que aquellos con las células control T-PC2-Rc. No se encontraron diferencias en el volumen global de los tumores que expresaban shTNIP2 en comparación con los shS, aunque sí parecía que había una tendencia a aumentar su volumen.

20 Sorprendentemente, se detectó un patrón reproducible en los xenoimplantes que expresaban p27Kip1 exógeno y en aquellos con niveles bajos de TNIP2. Dicho patrón consiste en que los xenoimplantes eran frecuentemente multinodulares y capaces de invadir el tejido adyacente, como el tejido adiposo o el músculo esquelético, a pesar del pequeño tamaño de los xenoimplantes con p27Kip1 exógeno (Fig. 3A).

25 La clasificación histopatológica llevada a cabo por un experto en cáncer de tiroides humano, realizada con un sistema de doble ciego, resultó en la evaluación de los tumores multifocales e infiltrantes como carcinomas pobremente indiferenciados con mal pronóstico.

30 A nivel inmunohistoquímico, todos los tumores expresaban TGF- β , p65 nuclear y Ciclina D1 sin diferencias significativas. Además, como era de esperar, se encontraron mayores niveles de expresión de p27Kip1 en los tumores pequeños infiltrantes que expresaban p27Kip1 exógeno en niveles estables, junto con una tinción más intensa para Ciclina D1 (Fig. 4). En resumen, los resultados obtenidos *in vivo* fueron similares tanto cuando se mantenían estables los niveles de p27Kip1 como cuando se reducían los de TNIP2.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una línea celular de carcinoma tiroideo caracterizada por expresar niveles inferiores de TNIP2 respecto de los niveles control o de dicha línea celular y una línea celular de carcinoma tiroideo que comprende p27Kip1 exógeno y expresa niveles estables de p27Kip1, para la identificación de fármacos eficaces para el tratamiento del carcinoma tiroideo.
- 10 2. Una línea celular de carcinoma tiroideo caracterizada por expresar niveles inferiores de TNIP2 respecto de los niveles control.
- 15 3. La línea celular según la reivindicación anterior, caracterizada porque expresa un ARN de interferencia de TNIP2.
- 15 4. La línea celular según la reivindicación anterior, donde el ARN de interferencia es SEQ ID NO: 1.
- 20 5. Un kit que comprende una línea celular según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4.
- 20 6. El kit según la reivindicación anterior, que además comprende una línea celular de carcinoma tiroideo control.
- 25 7. El kit según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores, que además comprende una línea celular de carcinoma tiroideo que comprende p27Kip1 exógeno y expresa niveles estables de p27Kip1.
- 25 8. Uso del kit según cualquiera de las tres reivindicaciones anteriores para la identificación de fármacos eficaces para el tratamiento del carcinoma tiroideo.
- 30 9. Uso del kit según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 para la obtención de un animal no humano.
- 30 10. Uso de una línea celular según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, o de dicha línea celular y una línea celular de carcinoma tiroideo que comprende p27Kip1 exógeno y expresa niveles estables de p27Kip1, para la obtención de un animal no humano útil para la identificación de fármacos eficaces para el tratamiento del carcinoma tiroideo.
- 35 11. Un animal no humano que comprende una línea de carcinoma tiroideo según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4 o que comprende dicha línea celular y una línea celular de carcinoma tiroideo que comprende p27Kip1 exógeno y expresa niveles estables de p27Kip1.
- 40 12. El animal no humano según la reivindicación anterior, que además comprende una línea de carcinoma tiroideo control.
- 40 13. Uso del animal no humano según cualquiera de las dos reivindicaciones anteriores como modelo animal de cáncer, especialmente para el cribado de fármacos.
- 40 14. Uso según la reivindicación anterior, donde el animal se usa como modelo animal de carcinoma tiroideo.

FIG. 1 A

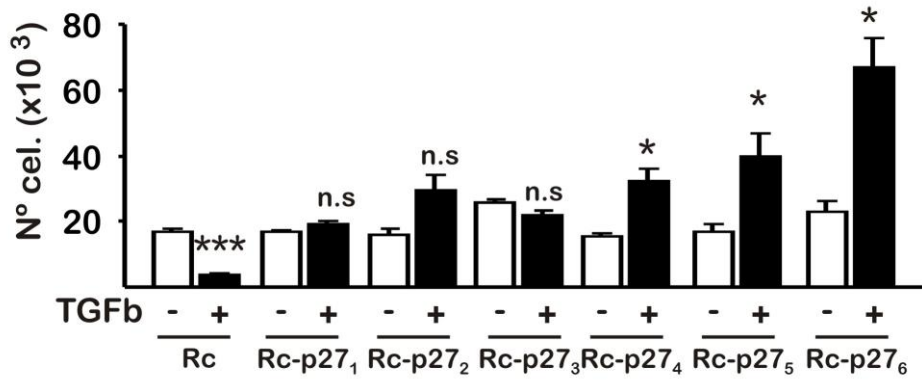


FIG. 1 B

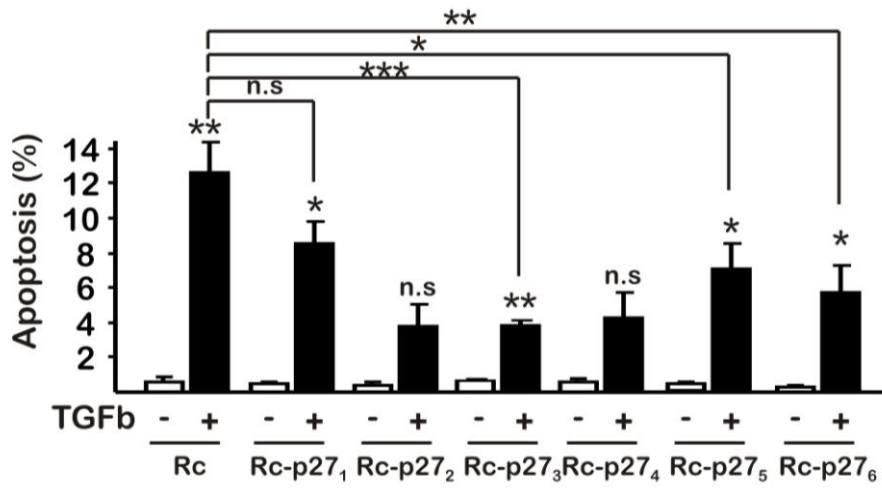


FIG. 1 C

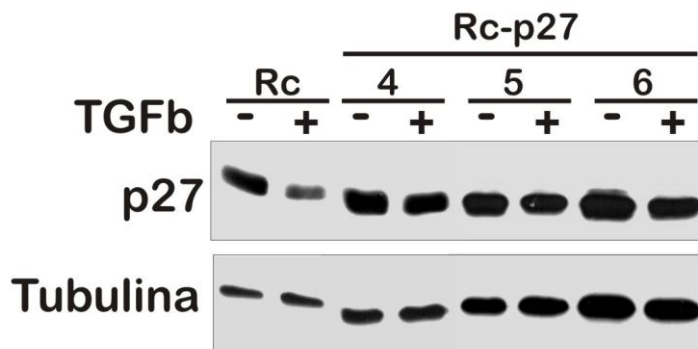


FIG. 2

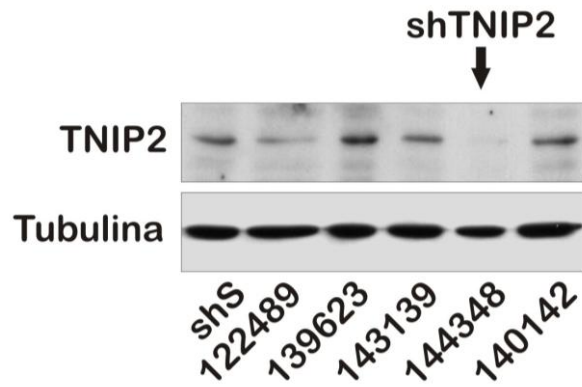


FIG. 3 A

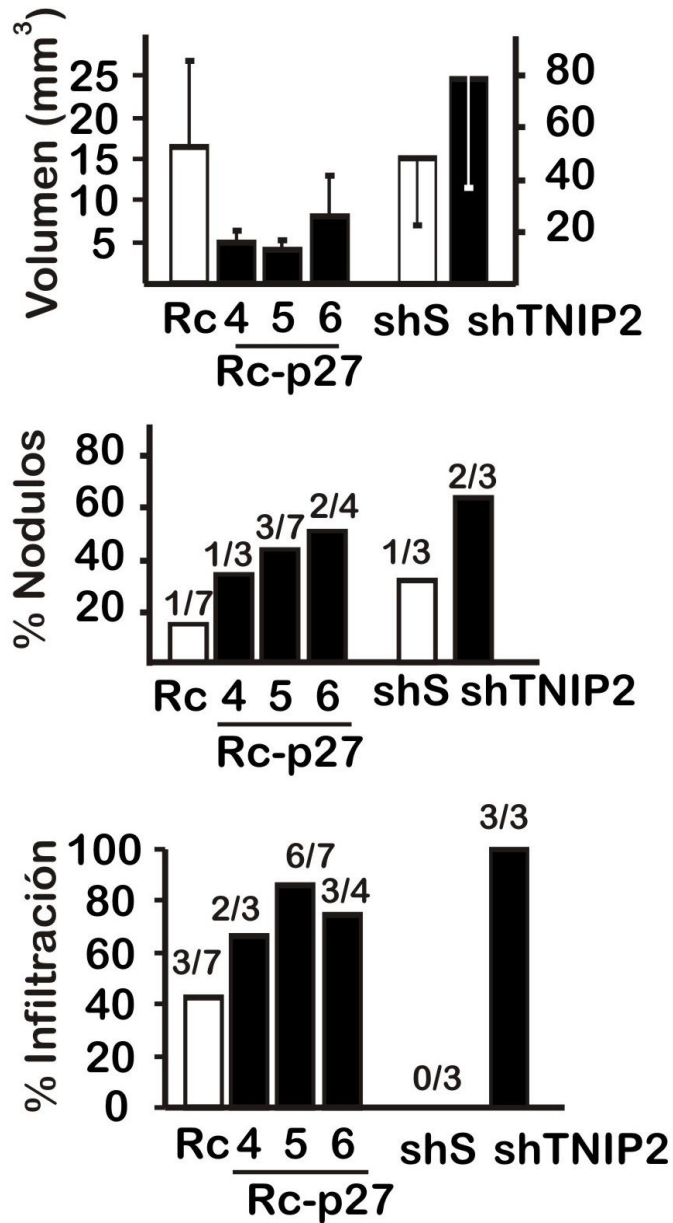


FIG. 3 B

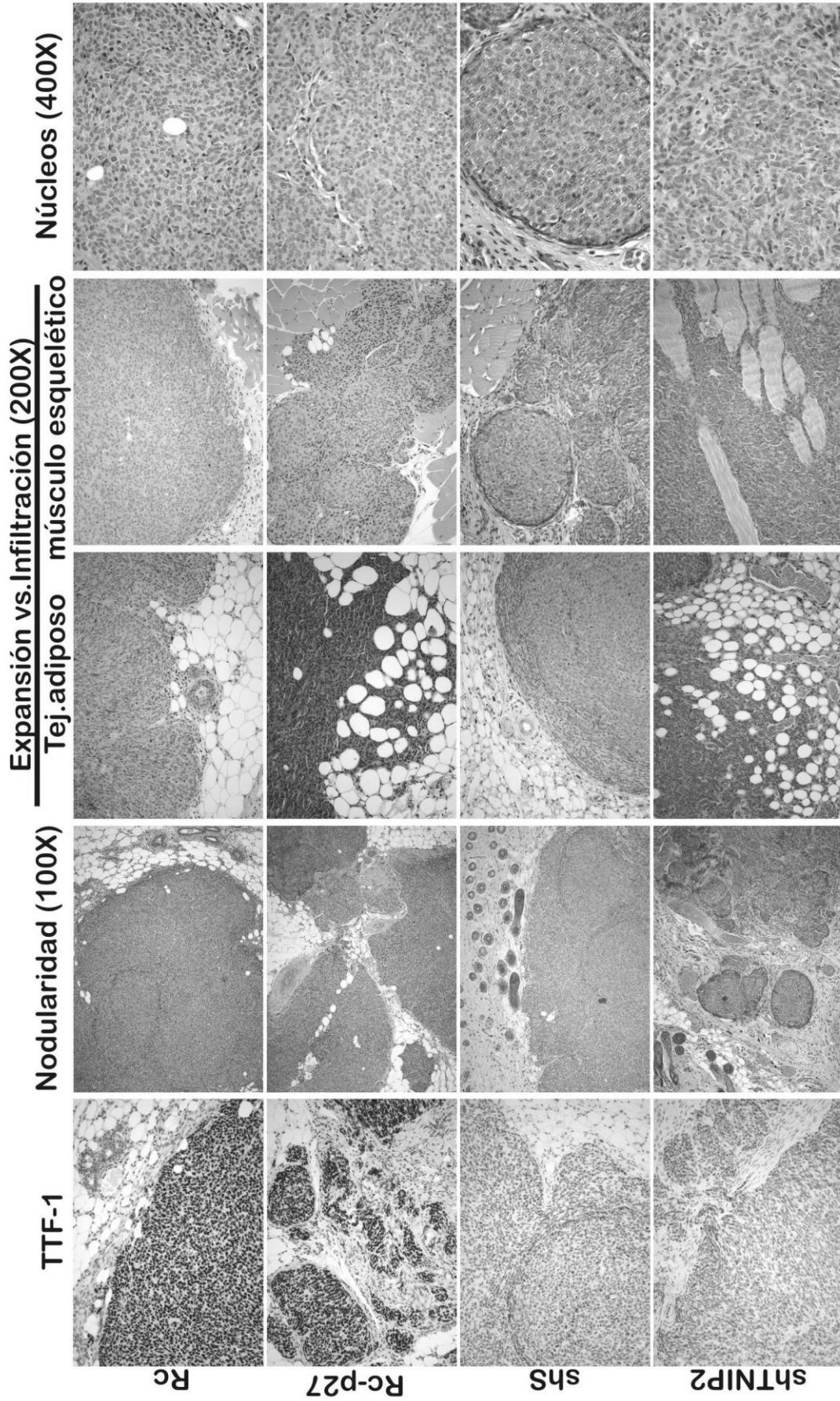
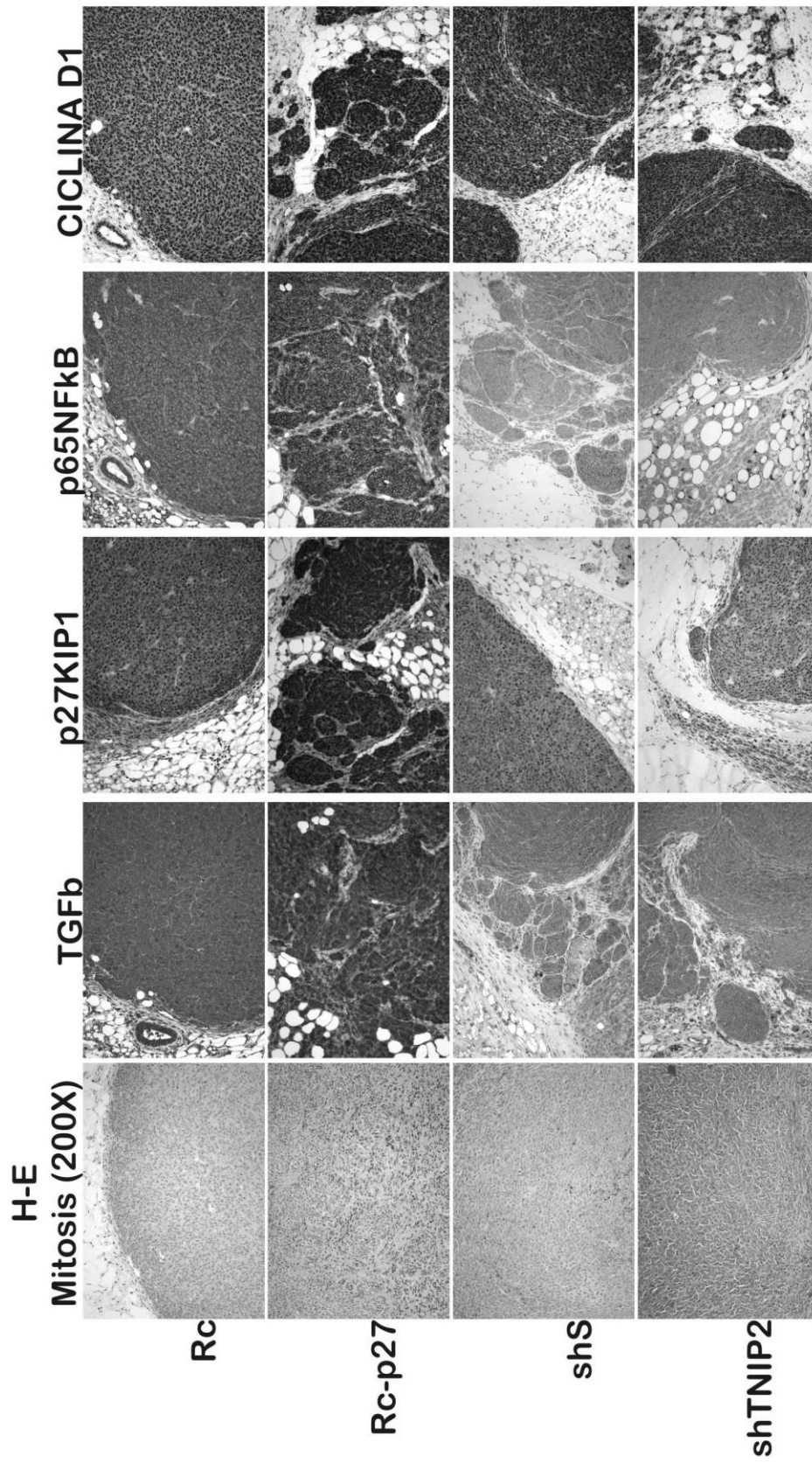


FIG. 4



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidade de Santiago de Compostela
 <120> Líneas celulares y su uso para la identificación de fármacos para el carcinoma tiroideo
 <130> 1596.36
 <160> 7
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 59
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 ccggccagag uguuauugag aaguucucga gaacuucuca auaacacucu gguuuuuug 59
 <210> 2
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 aacgacagca tgacaaaagg acctgtctc 29
 <210> 3
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 aatcctttgt gcatgctgtc gcctgtctc 29
 <210> 4
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 aataaatgac tgtgccgaag tcctgtctc 29
 <210> 5
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 aaacttcggc acagtcattt acctgtctc 29
 <210> 6
 <211> 594
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 6
 atgtcaaacg tgagagtgtc taacgggagc ccgagcctgg agcggatgga cgccagacaa 60
 gcggagcacc ccaagccttc cgctgcaga aatctcttcg gcccggtcaa tcatgaagaa 120

ES 2 397 874 A1

ctaaccggg acttgagaa gactgccgg gatatggaag aagcgagtca gcgcaagtgg 180
aatttcgact ttcagaatca taagcccctg gagggcagat acgagtgga gagggtggag 240
aggggcagct tgcccagatt ctactacagg cccccgcgc cccccaagag cgcttgaag 300
gtgctggcgc aggagagcca ggatgtcagc gggagccgcc aggcggtgcc ttttaattggg 360
tctcaggcaa actctgagga ccggcatttg gtggaccaa tgcctgactc gtcagacaat 420
ccggctgggt tagcggagca gtgtccagg atgaggaagc gacctgctgc agaagattct 480
tcttcgcaaa acaaaagggc caacagaaca gaagaaaatg tttcagacgg tccccgaac 540
gctggcactg tggagcagac gcccaagaag cccggccttc gacgccagac gtaa 594

<210> 7
<211> 197
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 7

Met Ser Asn Val Arg Val Ser Asn Gly Ser Pro Ser Leu Glu Arg Met
1 5 10 15

Asp Ala Arg Gln Ala Glu His Pro Lys Pro Ser Ala Cys Arg Asn Leu
20 25 30

Phe Gly Pro Val Asn His Glu Glu Leu Thr Arg Asp Leu Glu Lys His
35 40 45

Cys Arg Asp Met Glu Glu Ala Ser Gln Arg Lys Trp Asn Phe Asp Phe
50 55 60

Gln Asn His Lys Pro Leu Glu Gly Arg Tyr Glu Trp Gln Glu Val Glu
65 70 75 80

Arg Gly Ser Leu Pro Glu Phe Tyr Tyr Arg Pro Pro Arg Pro Pro Lys
85 90 95

Ser Ala Cys Lys Val Leu Ala Gln Glu Ser Gln Asp Val Ser Gly Ser
100 105 110

Arg Gln Ala Val Pro Leu Ile Gly Ser Gln Ala Asn Ser Glu Asp Arg
115 120 125

His Leu Val Asp Gln Met Pro Asp Ser Ser Asp Asn Pro Ala Gly Leu
130 135 140

Ala Glu Gln Cys Pro Gly Met Arg Lys Arg Pro Ala Ala Glu Asp Ser
145 150 155 160

Ser Ser Gln Asn Lys Arg Ala Asn Arg Thr Glu Glu Asn Val Ser Asp
165 170 175

ES 2 397 874 A1

Gly Ser Pro Asn Ala Gly Thr Val Glu Gln Thr Pro Lys Lys Pro Gly
180 185 190

Leu Arg Arg Gln Thr
195



- ②① N.º solicitud: 201031322
 ②② Fecha de presentación de la solicitud: 03.09.2010
 ③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	HUANG L <i>et al.</i> ABINs inhibit EGF receptor-mediated NF-kappaB activation and growth of EGF receptor-overexpressing tumour cells. <i>Oncogene</i> 16.10.2008 VOL: 27 No: 47 Pags: 6131-6140 ISSN 1476-5594 (Electrónico). Ver todo el documento.	1-14
A	US 2009023650 A1 (BEYAERT RUDI <i>et al.</i>) 22.01.2009, todo el documento, especialmente ejemplos 2,3,4.	1-14
A	PAPOUTSOPOULOU S <i>et al.</i> ABIN-2 is required for optimal activation of Erk MAP kinase in innateimmune responses. <i>Nature Immunology</i> 06.2006 VOL: 7 No: 6 Pags: 606-615 ISSN 1529-2908 (impreso)-ISSN 1529-2916 (electrónico) Doi: doi:10.1038/ni1334. Ver todo el documento.	1-14
A	US 2008199469 A1 (LEY STEVEN) 21.08.2008, todo el documento, especialmente ejemplos 2,4.	1-14
A	BRAVO, S.B., <i>et al.</i> Expression of exogenous proteins and short hairpin RNAs inhuman primary thyrocytes. <i>Analytical Biochemistry</i> . 15.05.2010. Vol. 400, nº 2, páginas 219-228. ISSN 0003-2697. Ver todo el documento, especialmente página 225, columna 2, página 226, página 227, columna 1, párrafo 1 y figura 4.	1,7-14

Categoría de los documentos citados

- X: de particular relevancia
 Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
 A: refleja el estado de la técnica

- O: referido a divulgación no escrita
 P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
 E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

- para todas las reivindicaciones para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 25.02.2013	Examinador B. Pérez Esteban	Página 1/4
---	---------------------------------------	----------------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N15/12 (2006.01)

A61K48/00 (2006.01)

C12R1/91 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

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

C12N, A61K, C12R, A61P

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

INVENES, EPODOC, WPI, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTUS4, TXTUS5, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, TXTAU1, TXTCA1, TCPAT, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP, XPESP2, EBI, GeneCards.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 25.02.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SI
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	HUANG L <i>et al.</i> Oncogene 16.10.2008 VOL: 27 No: 47 Pags: 6131-6140 ISSN 1476-5594 (Electrónico).	16.10.2008
D02	US 2009023650 A1 (BEYAERT RUDI <i>et al.</i>)	22.01.2009
D03	PAPOUTSOPOULOU S <i>et al.</i> Nature Immunology 06.2006 VOL: 7 No: 6 Pags: 606-615 ISSN 1529-2908 (impreso)-ISSN1529-2916 (electrónico). Doi: doi:10.1038/ni1334.	31.05.2006
D04	US 2008199469 A1 (LEY STEVEN)	21.08.2008
D05	BRAVO, S.B., <i>et al.</i> Analytical Biochemistry. 15.05.2010. Vol. 400, nº 2, páginas 219-228. ISSN 0003-2697.	15.05.2010

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

La presente solicitud internacional describe el uso de una línea celular de carcinoma tiroideo que expresa niveles inferiores del gen TNIP2 respecto de los niveles control (porque expresa un ARN de interferencia de este gen), o de esa línea celular y una línea celular que comprende el gen p27Kip1 exógeno y lo expresa a niveles estables, para la identificación de fármacos eficaces como inhibidores metastásicos útiles en el tratamiento de carcinomas tiroideos altamente invasivos. La solicitud reivindica también un kit que comprende la línea celular; el uso del kit y de la línea celular para la obtención de un animal no humano útil para la identificación de fármacos eficaces para el tratamiento del carcinoma tiroideo; el animal no humano que comprende la línea celular reivindicada; el animal que comprende, además, una línea de carcinoma tiroideo control; y el uso del animal como modelo de cáncer tiroideo.

No se ha encontrado en el estado de la técnica ningún documento que, sólo o en combinación con otros, divulgue el uso reivindicado de estas líneas celulares, ni del kit y del animal derivados de la misma, ni documentos que puedan inducir al experto en la materia a deducir los usos, kit o animal reivindicados, por lo que las reivindicaciones 1 a 14 de la solicitud se consideran nuevas y con actividad inventiva según los artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes.

A continuación se comentan los documentos citados en este informe, que, si bien son cercanos a la solicitud, no afectan su novedad ni su actividad inventiva, como se ha indicado anteriormente.

Los documentos D01 y D02 divulgan el uso potencial de ABIN-2 (=TNIP2) y de otras proteínas que se unen a A20, en terapia génica para el tratamiento de tumores de origen epitelial que dependen de ErbB, dado que las proteínas ABIN 1, 2 y 3 inhiben la activación mediada por EGFR del factor nuclear NF- κ B, (un inductor de proliferación celular) en líneas celulares de tumores humanos. En estos ensayos, la introducción de los genes ABIN en las células reduce la actividad NF- κ B, y con ella, la velocidad de proliferación celular. Esto convierte a los genes ABIN en potenciales agentes para el tratamiento antitumoral.

Los documentos D03 y D04 describen el efecto de la proteína ABIN-2 (TNIP2) sobre la estabilidad de TPL-2, una proteína-quinasa implicada en procesos inflamatorios, pero los documentos no mencionan la relación de ABIN-2 con procesos cancerígenos.

En resumen, ninguno de estos cuatro documentos describe la posible relación entre el gen TNIP2 y el carcinoma tiroideo, ni la generación de líneas celulares que expresen este gen a niveles inferiores a los controles, como tampoco menciona la utilidad de este gen para la búsqueda de compuestos útiles en el tratamiento de carcinoma tiroideo, por lo que estos documentos no afectan la novedad ni la actividad inventiva de las reivindicaciones 1 a 14 de la solicitud.

Finalmente, en el documento D05 se describe la introducción del gen p27KIP1 en líneas celulares de carcinoma tiroideo y un método para disminuir la expresión del gen mediante shRNAs, pero no se indica si los niveles de expresión del gen tienen algún efecto en la agresividad del tumor, ni se menciona el gen TNIP2, por lo que el documento D05 no afecta la novedad ni la actividad inventiva de las reivindicaciones 1 a 14 de la solicitud, sino que se trata de un mero documento del estado de la técnica cercano a las reivindicaciones 1 y 7 a 14.