

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 857**

51 Int. Cl.:

C12N 5/095 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2006 E 06802407 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.08.2014 EP 1924685**

54 Título: **Modelo de carcinogénesis por fusión de células madre**

30 Prioridad:

25.08.2005 US 711249 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.12.2014

73 Titular/es:

**THE ARIZONA BOARD OF REGENTS ON BEHALF
OF THE UNIVERSITY OF ARIZONA (100.0%)
P.O. BOX 210158
TUCSON AZ 85721-0158, US**

72 Inventor/es:

**HARRIS, DAVID, T.;
TSANG, TOM, C.;
HE, XIANGHUI;
PIPES, BRIAN, L. y
MEADE-TOLLIN, LINDA, C.**

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 523 857 T3

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

Descripción

Modelo de carcinogénesis por fusión de células madre

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el derecho de prioridad de la solicitud provisional U.S. nº 60/711,249, titulada "Stem Cell Fusion Model of Carcinogenesis", presentada el 25 de agosto de 2005, cuyo contenido completo se incorpora aquí por referencia.

Campo de la invención

- 10 La invención se refiere a un sistema de células y a un método para modelizar, cribar fármacos contra células cancerosas e inhibir la migración de células cancerosas.

Descripción de la técnica relacionada

- 15 El cáncer ha sido difícil de tratar debido a la heterogeneidad y la inestabilidad genética. Como enfermedad humana, el cáncer ya fue descrito el año 1600 a.C. en antiguas escrituras egipcias. Hipócrates, el médico griego, reconoció la diferencia entre tumores benignos y malignos y llamó "carcinomas" a los tumores malignos. Actualmente, el cáncer es la segunda causa más importante de muerte en los países desarrollados.

- 20 Desde que el Presidente de los Estados Unidos Richard Nixon declarara una "guerra al cáncer" en la década de los 70, se ha acumulado un conocimiento enorme sobre el cáncer. En los dos últimos siglos se han propuesto muchas hipótesis sobre el desarrollo del cáncer. Las primeras hipótesis incluían las hipótesis irritativas, embrionarias y parasitarias. Más tarde, con el establecimiento de la oncología experimental, se identificaron carcinógenos químicos. Se descubrieron docenas de oncogenes y genes supresores de tumores mediante análisis molecular de tumores humanos y animales experimentales. Estos estudios condujeron al establecimiento de la hipótesis de mutación genética, que ha predominado en las tres últimas décadas.

- 25 A pesar de su elegancia intrínseca, la hipótesis actual de mutación genética no ha podido explicar muchas características importantes del cáncer. De hecho, muchos investigadores han estudiado a fondo la hipótesis de la mutación genética.

- 30 Recientemente, la "teoría de carcinogénesis de células madre" ha ganado impulso, gracias al mejor entendimiento de los investigadores de las células madre y al descubrimiento de las "células madre cancerosas". La teoría de carcinogénesis de células madre sugiere que las células madre acumulan mutaciones genéticas y se convierten en células malignas. Sin embargo, dado que sigue dependiendo por completo de la hipótesis de mutación genética, la teoría de las células madre no puede revelar por completo qué provoca las características distintivas del cáncer, como la invasión y la metástasis.

- 35 Las mutaciones son eventos extraños. Los modelos matemáticos sugieren que se requiere un evento más frecuente para una transformación maligna. Ya se ha indicado que la inestabilidad genómica puede ser la característica que posibilita las características del cáncer. Como fenotipo de la inestabilidad genómica, prácticamente en todos los cánceres humanos sólidos se ha observado aneuploidía, que es difícil de explicar mediante hipótesis de mutación genética. Se ha sugerido que la aneuploidía explica el cáncer como un mutágeno autónomo, pero el mecanismo que subyace a la aneuploidía sigue siendo poco claro.

- 40 Así, a pesar del progreso esencial realizado, el origen del cáncer sigue siendo enigmático. Dado que los modelos actuales de la carcinogénesis basados en la hipótesis de la mutación genética tienen limitaciones para explicar muchos aspectos del cáncer, los inventores han presentado un nuevo modelo de

carcinogénesis multietapa en el que se sugiere que el desarrollo del cáncer implica mutaciones genéticas y fusiones celulares. Específicamente, el cáncer puede resultar de una fusión entre una célula premaligna "alterada" y una célula madre derivada de médula ósea (*bone marrow-derived stem cell* - BMDSC). La "aneuploidía", que es una característica de malignidad, es una consecuencia directa de esta fusión celular. El modelo de "fusión de células madre" explica las notables similitudes entre las células malignas y las BMDSC. Este modelo también explica por qué no-mutágenos pueden ser carcinógenos y por qué procesos no mutágenos, como la cicatrización y la inflamación crónica, pueden promover la transformación maligna.

SUMARIO DE LA INVENCION

En una realización de la invención, se proporciona un método para modelizar la migración de células cancerosas, que incluye los pasos de: (a) proporcionar una célula madre derivada de médula ósea; (b) proporcionar una célula premaligna iniciada que es una célula con cambios genéticos o epigenéticos, incluyendo los cambios genéticos mutaciones genéticas, translocaciones, deleciones o amplificaciones, incluyendo los cambios epigenéticos cualquier cambio más allá de las secuencias de ADN que conduzca a una desregulación del crecimiento y la función celular, como metilación de ADN, modificación de cromatina o señalización de células alteradas, y siendo los cambios genéticos o epigenéticos suficientes para provocar una autorrenovación, invasión tisular o migración; (c) fusionar la célula madre derivada de médula ósea con la célula iniciada, creando así una célula fusionada; y (d) medir un indicador de migración para la célula fusionada. La célula fusionada se puede obtener o cultivar a partir de una fusión previa de la célula madre derivada de médula ósea con la célula iniciada.

En otra realización de la invención, se proporciona un método para examinar un efecto de un agente biológico o químico en células tumorales, que incluye los pasos de: (a) proporcionar una célula fusionada derivada de la fusión de una célula madre derivada de médula ósea con una célula premaligna iniciada, siendo dicha célula iniciada una célula con cambios genéticos o epigenéticos, incluyendo los cambios genéticos mutaciones genéticas, translocaciones, deleciones o amplificaciones, incluyendo los cambios epigenéticos cualquier cambio más allá de las secuencias de ADN que conduzca a una desregulación del crecimiento y la función celular, como metilación de ADN, modificación de cromatina o señalización de células alteradas, y siendo los cambios genéticos o epigenéticos suficientes para provocar una autorrenovación, invasión tisular o migración; (b) poner en contacto la célula fusionada con un agente biológico o químico; y (c) determinar si la migración de células tumorales se ha promovido, inhibido o ha permanecido inalterada.

Los métodos de la invención representan un modelo de carcinogénesis nuevo y mejorado para estudios *in vitro* de migración de células tumorales y estudios *in vivo* utilizando animales trasplantados con médula ósea modificada con un gen marcador, por ejemplo transgénicos eGFP. Otras características y ventajas de la invención se desprenderán de la siguiente descripción detallada de determinadas realizaciones específicas junto con las figuras adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: es una ilustración esquemática de una transformación maligna mediada por fusión entre células madre derivadas de médula ósea y células tisulares "alteradas".

DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES PREFERENTES

Tal como se utiliza aquí, "metástasis" significa la propagación de cáncer desde una parte del cuerpo a otra. Un tumor formado por células que se han propagado se denomina "tumor metastásico" o "metástasis".

El término "maligno" se refiere a células cancerosas, es decir anómalas, que se dividen sin control y que pueden invadir tejidos cercanos y propagarse a través de la corriente sanguínea y el sistema linfático a otras partes del cuerpo.

Los términos "célula alterada" o "célula genéticamente alterada" se definen aquí como cualquier célula con cambios genéticos o epigenéticos suficientes para desviarse de la vía de diferenciación normal de una célula madre derivada de médula ósea después de fusión con una BMDSC. Las células "alteradas" incluyen las llamadas "células premalignas iniciadas" en el modelo de carcinogénesis de múltiples pasos.

- 5 El término "célula de fusión" significa una célula formada por la fusión de una célula alterada y una célula madre derivada de médula ósea.

El origen de la malignidad sigue siendo controvertido, en especial en lo que respecta a los carcinomas, que representan más de un 90% de la malignidad en humanos. El modelo de carcinogénesis presentado por los inventores se centra en el origen del desarrollo de carcinomas altamente malignos. El evento clave en este modelo es un paso de fusión entre células madre derivadas de médula ósea (BMDSC) y células tisulares "alteradas" (Figura 1). Las poblaciones de BMDSC purificadas se obtienen eliminando todas las células derivadas de médula ósea que hayan expresado un marcador de superficie celular diferenciado mediante columnas comercialmente disponibles. Las líneas de células negativas que pasan a través de la columna se pueden enriquecer adicionalmente para las células madre seleccionando positivamente células positivas CD34, positivas CD133 y positivas SCA-1. Esto funciona tanto para BMDSC de ratón como para BMDSC humanas. La invención se refiere en parte al reconocimiento de que la fusión entre células tisulares "alteradas" y BMDSC puede conducir a una transformación maligna de las células híbridas. De este modo se puede conferir la capacidad de migrar a las llamadas "células iniciadas" en el modelo de carcinogénesis de múltiples pasos y a células tumorales benignas.

20 Con la fusión podría verse alterada la vía de diferenciación normal de BMDSC debido al trastorno genético o epigenético existente de las células tisulares "alteradas". Los trastornos genéticos podrían consistir en mutaciones, translocaciones, deleciones o amplificaciones, de acuerdo con la propuesta de la hipótesis de mutación genética. Los trastornos epigenéticos podrían consistir en cualquier cambio más allá de las secuencias de ADN que conduzca a una desregulación del crecimiento y la función celular, como metilación de ADN, modificación de cromatina o señalización celular alterada. La fusión podría dar lugar a células hijas con el fenotipo tanto de las células alteradas como de las BMDSC. Dicho de otro modo, las células hijas podrían adquirir la capacidad de autorrenovación, invasión tisular y migración de las BMDSC, convirtiéndose así en células malignas. Además, el proceso de fusión, la mitosis subsiguiente y la pérdida de copias individuales de cromosomas conducirá a una aneuploidía. La aneuploidía se podría convertir en la fuerza motriz de la inestabilidad genómica y la progresión del cáncer. De acuerdo con el modelo del inventor, un solo evento de fusión podría tener el mismo efecto de transformación (de benigno a maligno) que el de múltiples eventos implicados en el proceso de carcinogénesis multietapa clásico.

En base al modelo del inventor, la mayor parte del fenotipo maligno del cáncer, como invasión y metástasis, procedería de las BMDSC. La fusión es un efecto natural y relativamente frecuente, incluso durante el desarrollo y el mantenimiento de organismos multicelulares. En comparación con la probabilidad relativa de la mutación genética y la fusión de células madre, el desarrollo de una célula normal hasta una malignidad completa puede ser considerado como un proceso evolutivo. Cualquier vía que sustituyera múltiples eventos raros por un evento frecuente haría que dicha vía fuera mayoritariamente preferente en la evolución.

Las BMDSC son altamente plásticas. Muchos estudios demuestran que la médula ósea no solo contiene células madre hematopoyéticas (*hematopoietic stem cells* (HSC)), sino que también contiene células madre mesenquimales (*mesenchymal stem cells* - MSC), progenitores celulares endoteliales y células madre de tejidos epiteliales que se pueden diferenciar en células epiteliales hepáticas, pulmonares, de la piel y tractogastrointestinales. Estas BMDSC migran a tejidos no hematopoyéticos y pueden desempeñar un papel en el mantenimiento y la reparación de tejido dañado. Tal como se resume en la Tabla 1, existen notables similitudes entre las BMDSC y las células cancerosas metastásicas en términos de su actividad biológica, así como de la base molecular de estas actividades.

Tabla 1 Similitud entre células madre derivadas de médula ósea y células cancerosas metastásicas

Células madre derivadas de médula ósea	Células cancerosas metastásicas
Autorrenovación	"Inmortalidad"
Crecimiento en suspensión	Crecimiento independiente del anclaje
Diferenciación multilineal	Da lugar a células cancerosas heterogéneas
Migración	Invasión, metástasis
Extravasación	Extravasación
Marcadores superficiales, c-kit, CD34 y CD133	Algunas células cancerosas expresan c-kit, CD34 y CD133
Receptores de quimiocina, como CXCR4	CXCR4 expresado en tumor metastásico
Sensibles a la radiación	Cáncer poco diferenciado más sensible a la radioterapia
Expresan telomerasa	Mantenimiento de telómeros
Privilegio inmune parcial	Escape inmune
Actividad de señales de <i>Wnt</i> y Hedgehog	Actividad de señales de <i>Wnt</i> y Hedgehog
Median en la angiogénesis	Median en la angiogénesis

5 Las BMDSC y las células cancerosas metastásicas tienen capacidad de autorrenovación, migración e invasión tisular. Determinadas células cancerosas expresan marcadores de células madre pretendidos. Por ejemplo, el c-kit es expresado claramente en carcinoma ovárico seroso, carcinoma testicular, melanoma maligno y carcinoma de pulmón de células pequeñas. El CD34 es expresado en dermatofibrosarcoma, sarcoma epitelioides y tumores fibrosos solitarios. Además, todos los tipos de células cancerosas adquieren una capacidad de mantenimiento de telómeros similar a las células madre, que son positivas para telomerasa. Las BMDSC expresan receptores de quimioquina particulares y alcanzan su destino mediante interacciones quimioquina-ligando.

15 De forma interesante, las mismas parejas quimioquina-ligando intervienen en el guiado a BMDSC y metástasis de células malignas. Un fenómeno bien conocido es que, en general, un cáncer poco diferenciado es altamente metastásico, pero más sensible a la radioterapia. Este fenómeno no ha sido tratado a fondo en la literatura, pero tiene una notable semejanza con las BMDSC, que son altamente sensibles a la radiación. De hecho, esta sensibilidad a la radiación es la base de la mieloablación clínica. En conjunto, las células cancerosas pueden adquirir estas características de las BMDSC. De hecho, los datos recientes han demostrado que las células derivadas de médula ósea pueden provocar cáncer gástrico en ratones con infecciones crónicas por *Helicobacter*. Además, existe un informe de acuerdo con el cual en un receptor de trasplante de riñón se han observado carcinomas de piel humanos derivados de células del donante.

25 En el pasado, los inventores propusieron que un evento de fusión entre BMDSC y células "alteradas" da lugar a una migración de células cancerosas. Tal como se menciona más arriba, la fusión es un fenómeno fundamental en la vida de muchos organismos. La fusión vesicular intracelular es esencial para la función celular básica. Los virus con envoltura introducen cápsidas virales en el citosol a través de fusión de membrana. Desde las levaduras hasta los seres humanos, la vida comienza con la fusión. La fusión célula-célula es una parte de los procesos biológicos normales durante el desarrollo de músculos, huesos y placenta. Ya en 1911 se sugirió que la malignidad podría ser consecuencia de una hibridación entre leucocitos y células somáticas. Otros estudios también demostraron que se producía una transformación oncogénica cuando las células somáticas de mamífero absorbían espermatozoides cultivados conjuntamente y/o a través de la penetración inducida experimentalmente de espermatozoides *in situ*. Una antigua hipótesis es que la hibridación de células tumorales con linfocitos conduce a células metastásicas. Sin embargo, antes de

la invención no se conocía a nadie que hubiera descrito o sugerido que la transformación maligna es un resultado de la fusión entre una BMDSC y células tisulares premalignas "alteradas".

Las células madre son capaces de adoptar el fenotipo de otras células mediante fusión celular espontánea. Algunos estudios han demostrado que las BMDSC se fusionan con diversas células diana. Utilizando un método basado en la recombinación Cre/lox para detectar eventos de fusión nuclear, Alvarez-Dolado y col. (Nature 425, 968-973 [2003]) demostraron que células derivadas de médula ósea se fusionan *in vivo* con hepatocitos hepáticos, neuronas de Purkinje en el cerebro y músculo cardíaco en el corazón, resultando en la formación de células multinucleadas. Mediante un trasplante en serie de hepatocitos derivados de médula ósea, Wang y col. (Nature 422, 897-901 [2003]) demostraron que la fusión celular es la fuente principal de hepatocitos derivados de médula ósea. El análisis citogénico de hepatocitos trasplantados de ratones donantes hembra en receptores macho demostró cariotipos de fusión diploide con diploide (80, XXXY) y fusión diploide con tetraploide (120, XXXYY). En teoría, la fusión puede tener lugar múltiples veces entre células normales, premalignas y malignas; sin embargo, la invención implica específicamente la fusión entre una célula tisular premaligna "alterada" y BMDSC como paso crucial en la carcinogénesis. Puede haber múltiples fusiones con las BMDSC, conduciendo así a un cariotipo al menos tetraploide después de que se produzca la fusión.

Después de la fusión con células tisulares alteradas, se cree que la autorrenovación y la diferenciación normal de células madre se ve alterada por la señal anómala derivada de las células alteradas. A diferencia de otros modelos de carcinogénesis por células madre, que proponen que las células madre acumulan mutaciones y se transforman, la invención es consecuente con los estudios que demuestran que las células madre son menos tolerantes a lesiones del ADN que las células diferenciadas. Las células madre deberían ser más sensibles a las lesiones del ADN para mantener el potencial de diferenciación multipotente. No existe ninguna duda de que las BMDSC son más sensibles a la radiación que las células maduras. Este hecho es la base de la mieloablación clínica. También está la observación de que las células madre tisulares son más sensibles a la destrucción por agentes nocivos para el ADN. Los niveles de apoptosis de células madre de las criptas intestinales se incrementan notablemente por la exposición a radiación o a agentes citotóxicos. Por ello es más probable que las células tisulares, más que las células madre, acumulen trastornos genéticos y epigenéticos. Después de la fusión con BMDSC, las células hijas se transforman y dan lugar a tumores malignos.

Durante más de 100 años se han venido identificado anomalías cromosómicas como una de las características patológicas distintivas del cáncer. Prácticamente en todos los cánceres humanos sólidos se ha observado aneuploidía. Además, existen datos clínicos que sugieren que el grado de aneuploidía está en correlación con la gravedad de las enfermedades. Una hipótesis de aneuploidía de cáncer subraya la importancia de la aneuploidía en la carcinogénesis, pero sigue sin aclararse el mecanismo que subyace a la aneuploidía. En el modelo de carcinogénesis por fusión de células madre aquí descrito, la aneuploidía es una consecuencia inevitable de la fusión celular que conduce a pérdida de copias cromosómicas individuales. En una aplicación directa anterior del modelo de carcinogénesis por fusión de células madre propuesto, los estudios demostraron que un hiper cromatismo en células de cáncer de próstata podría ser consecuencia de una presunta fusión de espermatozoides inyectados con células epiteliales prostáticas normales. Además, determinadas lesiones precancerosas humanas han mostrado un aumento de la frecuencia de células tetraploides, como células escamosas de esófago de Barrett, colitis ulcerativa y células escamosas cervicales atípicas positivas de VPH. El análisis de la ploidía de ADN demuestra que la mayoría de los cánceres de próstata humanos aneuploides son tetraploides. Esta evidencia sugiere que la aneuploidía del cáncer se origina en un evento de tetraploidación (es decir, fusión).

Durante mucho tiempo se ha observado la asociación entre lesión tisular crónica, inflamación y cáncer. Existen muchos estudios y análisis elegantes de los mecanismos moleculares y celulares que subyacen a esta asociación. La interpretación de los inventores de la relación entre la reparación tisular y la carcinogénesis es tal como se describe a continuación. La lesión tisular crónica, la inflamación y la posterior

reparación tisular agotan la capacidad de regeneración de las células madre tisulares locales. El microentorno inflamatorio local favorece entonces el guiado de BMDSC y su intervención en la reparación tisular. Las BMDSC a veces se fusionan con células tisulares "alteradas" y dan lugar a una transformación maligna.

5 Se supone que los tejidos que normalmente experimentan una renovación rápida sufren de una mayor incidencia del cáncer, ya que una alta tasa de renovación debería conducir a un agotamiento de las células madre tisulares locales y a la infiltración de BMDSC. De hecho, el epitelio de la piel, los pulmones y el tracto gastrointestinal, que están expuestos continuamente a ataques ambientales y se encuentran en un estado de renovación constante, son los tejidos con mayor proporción de cánceres. Se ha demostrado un incremento del injerto de queratinocitos derivados de médula ósea durante la cicatrización en ratones trasplantados con
10 médula ósea de sexos opuestos, aunque el mismo estudio descartó la presencia de fusión entre células derivadas de médula ósea y células epiteliales de la piel en lesiones agudas. La infección por *Helicobacter* es uno de los principales factores atribuibles en el desarrollo del cáncer gástrico. El daño tisular crónico y la reparación tisular en curso provocan un desequilibrio entre la proliferación celular epitelial y la apoptosis en el estómago. De hecho, recientemente se ha informado de que las células derivadas de médula ósea son el
15 origen de cáncer gástrico en ratones infectados por *Helicobacter*.

El envejecimiento es uno de los principales factores de riesgo en el cáncer. El análisis de la distribución por edades del cáncer resultó en la teoría de multietapa temprana de la carcinogénesis. Posteriormente, la hipótesis de mutación genética supuso que la distribución por edades del cáncer reflejaba el tiempo necesario para acumular las suficientes mutaciones múltiples como para desarrollar el cáncer. Sin embargo, una explicación alternativa podría consistir en que el mecanismo responsable del envejecimiento también influye
20 en la función de las células madre. Las lesiones por oxidación y la senescencia celular podrían aumentar la frecuencia de la fusión celular indebida e incrementar la incidencia de la malignidad. Por ejemplo, las células senescentes comprometen la renovación o reparación tisular, segregan factores que pueden alterar el microentorno tisular y podrían alterar a su vez la actividad de las células madre. Además, las propias células madre son también un objetivo directo para las lesiones relacionadas con el envejecimiento. Se ha demostrado que el encanecimiento del pelo está causado por un automantenimiento deficiente de las células madre de los melanocitos. Se ha comprobado que las células madre epiteliales intestinales experimentan un importante deterioro funcional con el envejecimiento. La senescencia y un fallo funcional de HSC pueden crear condiciones que permiten el desarrollo de leucemia. Por ello, la cinética cronológica de la
25 carcinogénesis puede reflejar las interacciones célula-célula durante el envejecimiento.
30

Otras condiciones pueden promover la fusión célula-célula y, en consecuencia, aumentar la incidencia del cáncer, incluyendo la remodelación tisular y la infección viral. La alta incidencia del cáncer de mama y ovario en mujeres y el carcinoma hepatocelular después de una hepatitis crónica pueden ser ejemplos donde la remodelación tisular promueve la transformación maligna. Se ha demostrado que el virus de Epstein-Barr
35 (VEB) está asociado con una amplia gama de cánceres, incluyendo el linfoma de Burkitt, el linfoma no Hodgkin, la enfermedad de Hodgkin, el carcinoma nasofaríngeo, el adenocarcinoma gástrico y el cáncer de mama. Estudios anteriores han demostrado que el VEB induce la fusión célula-célula, en especial por virus aislados de tumores. De acuerdo con estos datos, el modelo de carcinogénesis por fusión de células madre del inventor podría explicar por qué la infección por el VEB está asociada con tantos cánceres.

40 El modelo de carcinogénesis por fusión de células madre aquí presentado es fácilmente comprobable. Por ello, los inventores han realizado varios experimentos. La fusión entre células tumorales benignas y BMDSC ha sido realizada *in vitro*. Después de la fusión, la morfología y la capacidad de metástasis e invasión se determinan *in vitro* e *in vivo*. La evidencia de fusión también podría demostrarse mediante examen de los tumores sólidos espontáneos desarrollados en ratones receptores de médula ósea de sexo opuesto o médula
45 ósea transgénica. Sin embargo, dado que el cromosoma sexual redundante con frecuencia se pierde en las células hijas cuando se produce la fusión, la tecnología ampliamente utilizada, como la hibridación *in situ* por fluorescencia (*fluorescence in situ hybridization* - FISH), para detectar el cromosoma sexual puede no ser apropiada. De hecho, una cantidad considerable de tumores malignos que se desarrollan en hembras

normales se vuelven negativos a la cromatina sexual, lo que sugiere la pérdida del segundo cromosoma X redundante. Los métodos para detectar la presencia de especies de ADN transducido o ADN mitocondrial derivado de donantes pueden ser adecuados. Por último se podría realizar un estudio retrospectivo de muestras recogidas de receptores previos de médula ósea que desarrollaron posteriormente carcinomas.

5 Técnicas tales como la detección de la presencia de ADN mitocondrial derivado de donantes, más que la FISH que detecta el cromosoma sexual, pueden ser más informativas.

El modelo de cáncer, en especial carcinoma, por fusión de células madre tiene implicaciones significativas en la investigación del cáncer y en el desarrollo de fármacos, así como para la aplicación terapéutica de las células madre. Las células malignas pueden ser susceptibles a terapias que inducen diferenciación. La diferenciación podría detener la actividad de autorrenovación y disminuir la capacidad de las células malignas para metastatizar e invadir tejidos. De hecho, se han utilizado varios agentes inductores de la diferenciación, como el ácido retinoico o agonistas de receptor gamma activado por proliferadores de peroxisoma (*peroxisome proliferators-activated receptor-gamma* - PPAR γ) para el tratamiento con éxito de la leucemia mieloides o liposarcoma, respectivamente. La introducción de una señal de diferenciación en células malignas por transferencia genética puede ser un nuevo planteamiento viable para la terapia del cáncer. Además, las células metastásicas pueden tener un patrón de guiado similar a las BMDSC; por tanto, para inhibir la metástasis del cáncer se podrían utilizar métodos para bloquear el guiado de BMDSC. De acuerdo con esto, un estudio reciente ha demostrado que el receptor de quimioquina CXCR4 bloquea la metástasis de cáncer de mama en ratones mediante una interferencia de ARN. El cáncer es difícil de controlar porque su genética es muy caótica. Sin embargo, las características malignas derivadas de las BMDSC de las células cancerosas podrían presentar un objetivo conservado para el diseño de nuevas terapias.

Por consiguiente, la metástasis de cáncer utilizaría los mismos mecanismos moleculares conservados que las BMDSC y su progenie, que incluye neutrófilos, linfocitos y otros leucocitos. Así, los inventores han examinado si anticuerpos para la ubiquitina, que pueden bloquear la movilidad y extravasación *in vivo* de neutrófilos, linfocitos y otros leucocitos, bloquearán la movilidad y extravasación de células cancerosas y, en consecuencia, si bloquearán la metástasis. Además, la determinación de la presencia de fusiones BMDSC/células alteradas en tumores podría llamar la atención de los investigadores con respecto a una posible consecuencia no intencionada de la terapia basada en células madre (es decir, la administración indebida de células madre podría aumentar en realidad la incidencia de la malignidad).

30 La lesión tisular crónica y la posterior reparación agotan las células madre tisulares locales y después utilizan BMDSC, aumentando así las posibilidades de fusión de las BMDSC con las células tisulares. Otros factores, como el envejecimiento, las infecciones virales y la remodelación tisular, también aumentan la incidencia de la fusión celular. Un aspecto importante es un paso de fusión que podría dar múltiples características "malignas" para transformar una célula "alterada" sin requerir múltiples mutaciones.

35 Aunque se han realizado cientos de estudios que incluyen la fusión de células tumorales y células no tumorales y su efecto en la tumorigenicidad, en la literatura científica previa a la invención no se ha encontrado ningún estudio sobre la fusión de células madre derivadas de médula ósea y células tumorales.

Por consiguiente, en una primera realización de la invención, se proporciona un método para modelizar la migración de células cancerosas que incluye los pasos de: (a) proporcionar una célula madre derivada de médula ósea; (b) proporcionar una célula premaligna iniciada consistente en una célula con cambios genéticos o epigenéticos, incluyendo los cambios genéticos mutaciones genéticas, translocaciones, deleciones o amplificaciones, incluyendo los cambios epigenéticos cualquier cambio más allá de las secuencias de ADN que conduzca a una desregulación del crecimiento y la función celular, como metilación de ADN, modificación de cromatina o señalización de células alteradas, y siendo los cambios genéticos o epigenéticos suficientes para provocar una autorrenovación, invasión tisular o migración; (c) fusionar la célula madre derivada de médula ósea con la célula iniciada, creando así una célula fusionada; y (d) medir un indicador de migración para la célula fusionada. Tanto las BMDSC como las células iniciadas se pueden

obtener fácilmente de cultivos tisulares comerciales y académicos y de fuentes vivas. Del mismo modo, la fusión celular se lleva a cabo de forma rutinaria, de modo que existen muchos protocolos disponibles (véanse, por ejemplo, los protocolos de hibridoma en protocol-online.org). La medida de un indicador de migración para la célula fusionada (y su progenie) se puede realizar mediante un "ensayo de rascado" ("scratch assay") (por ejemplo Lal A, Glazer CA, Martinson HM y col. *Cancer Res* 2002, 62:3335-3340) o mediante estudios animales *in vivo* (por ejemplo inyección de células tumorales incluyendo una o más células fusionadas y control de metástasis tal como se describe más abajo en los ejemplos).

La invención también proporciona un método para examinar un efecto de un agente biológico o químico en la migración de células tumorales *in vitro* o *in vivo*. El método incluye los pasos de: (a) proporcionar una célula fusionada derivada de una fusión de una célula madre derivada de médula ósea con una célula premaligna iniciada, consistiendo ésta en una célula con cambios genéticos o epigenéticos, incluyendo los cambios genéticos mutaciones genéticas, translocaciones, deleciones o amplificaciones, incluyendo los cambios epigenéticos cualquier cambio más allá de las secuencias de ADN que conduzca a una desregulación del crecimiento y la función celular, como metilación de ADN, modificación de cromatina o señalización de células alteradas, y siendo los cambios genéticos o epigenéticos suficientes para provocar una autorrenovación, invasión tisular o migración; (b) poner en contacto la célula fusionada con un agente biológico o químico; y (c) determinar si la migración de células tumorales se ha promovido, inhibido o ha permanecido inalterada. Las proteínas conservadas serían un objetivo especialmente adecuado para examinar los efectos de los agentes en la migración.

La ubiquitina (ub) es la proteína más conservada hallada en la naturaleza. Entre su secuencia de 76 aminoácidos existe una homología completa entre especies evolutivamente tan divergentes como insectos, truchas y humanos. La ubiquitina forma parte de los dominios de superficie exterior de otros receptores de membrana diversos. En el caso de los receptores de guiado de linfocitos (*lymphocyte homing receptors* - LHR), la presencia de la ub está en correlación estrecha con la función de los LHR para facilitar la unión y migración de linfocitos a través de los ganglios linfáticos. Todos los receptores que se ha comprobado se unen a ub también han demostrado mediar en la movilidad celular. Una explicación posible de estas observaciones es que la ub interviene en la mediación de la movilidad celular a través de la matriz extracelular. Esta función potencial de la ub tiene importantes implicaciones en los estudios de muchos procesos eucariotas, tales como diferenciación celular, infección parasitaria, invasión tumoral y metástasis de células tumorales.

Por consiguiente, el agente biológico o químico es, ejemplo, un anticuerpo contra la ubiquitina, como MEL-14 (CD62L) (disponible de Abeam Plc, Zymed Laboratories y col.; véanse 21 anticuerpos de ubiquitina diferentes en abcam.com). Las células con las que ha entrado en contacto este anticuerpo han sido sometidas a un ensayo de rascado o utilizadas en experimentos animales para determinar el efecto del anticuerpo en la migración celular tal como se describe más abajo.

Ejemplos no limitativos

Las técnicas experimentales a utilizar en estas investigaciones están bien establecidas y tienen una amplia aceptación.

El objetivo de este primer estudio es analizar una hipótesis previamente propuesta para la carcinogénesis, en la que la interacción entre células madre derivadas de médula ósea y células transformadas puede alterar la progresión tumoral. Se pueden llevar a cabo dos tipos de experimentos. En el primer grupo de experimentos, se aíslan células derivadas de médula ósea de ratón de ratones que expresan transgénicamente eGFP y se combinan con células humanas o de ratón transformadas, transfectadas transitoriamente, marcadas con proteína fluorescente roja de Clontech bajo condiciones que facilitan la formación de células híbridas. Después, estas células híbridas se inyectan en ratones de una raza apropiada para la línea celular analizada.

La alteración del crecimiento tumoral primario o metastásico se controla en función el tiempo. Dos cuestiones básicas planteadas por este estudio son si la progresión tumoral es modulada por la fusión de células madre derivadas de médula ósea con células tumorales en diversos estadios de transformación, y si el tratamiento de xenoinjertos humanos o de ratón con anticuerpos para receptores alterará los fenotipos metastásicos de los tumores de xenoinjerto. Un receptor representativo que sirve como modelo para analizar estas hipótesis es el CXCR4, que es expresado por células tumorales metastásicas.

Deben utilizarse modelos de xenoinjerto bien establecidos de crecimiento y progresión tumoral en ratones atímicos desnudos Balb/c o SCID de modo que la respuesta inmunitaria del huésped a la administración de líneas celulares transformadas de ratón (308, 308 10Gy5 o 4T1) y humanas (DU145 o PC-3 M), sistemas de modelos bien establecidos para el cáncer de mama, piel y próstata, sea mínima. Para administrar líneas celulares de ratón a ratones desnudos atímicos se utiliza una inoculación subcutánea o una inyección en la vena caudal. Las líneas celulares humanas se administran a ratones SCID. Una parte alícuota que contiene líneas celulares, individualmente o en combinación, se inyecta el día 0 y el crecimiento tumoral se sigue durante un máximo de 40 días. Después, los ratones son sacrificados, se retiran los tejidos y se cuantifican el volumen tumoral y los niveles relativos de metástasis de pulmón.

Experimento 1

Grupo A: 8 ratones transgénicos

Como fuente de células de médula ósea marcadas con GFP se utilizan ratones eGFP transgénicos heterocigóticos [C57BL/6-TgN (ACTbEGFP)10sb] (Jackson Laboratory). Los ratones GFP se identifican por expresión de fluorescencia verde bajo luz UV. Como donantes para el BMT se utilizan heterocigotos hembra de 2 a 4 meses de edad. El sexo del donante es diferente del sexo del huésped receptor.

Las células derivadas de médula ósea se obtienen de ratones GFP heterocigóticos lavando el fémur y la tibia con solución equilibrada de Hank. Para generar híbridos de células somáticas, se disponen 10^6 células derivadas de médula ósea y 106 células tumorales sobre placas de 60 mm 24 horas antes de su tratamiento con polietilenglicol (PEG). Además se preparan 5 gramos de PEG con un peso molecular de 3.000-3.700 mediante tratamiento en autoclave durante 5 minutos a 121°C. Después, el PEG tratado en autoclave se combina con 5 ml de 2x medio estéril libre de suero, precalentado a 37°C, para preparar una solución al 50%. Luego se añade lentamente 1 ml de la solución de PEG al 50% por placa a las células cultivadas conjuntamente y las células se incuban durante 1 minutos a 37°C.

Después se añade 1 ml del medio libre de suero y la incubación continúa durante 1 minuto más. Luego se añaden 2 ml del medio y la incubación continúa durante otros 2 minutos. Cuatro ml de medio libre de suero y la incubación continúa durante 4 minutos. Después se añade medio con contenido de suero a cada placa y la incubación continúa durante 48 horas a 37°C. Dos días después, cada placa se pasa con tripsina y el producto se dispone de nuevo sobre cuatro placas de 100 ml para la selección. Las células que expresan marcadores característicos de los dos tipos de células cultivados conjuntamente se seleccionan, se cultivan hasta un 90% de confluencia y se utilizan en experimentos posteriores.

Experimento 2: Tumorigenicidad alterada y progresión de células tumorales benignas de ratón y humanas

A los ratones se les inoculan células de médula ósea marcadas con GFP, individualmente o en combinación con células benignas transformadas humanas o de ratón.

Grupo A: 72 ratones. Cepas: ratones desnudos atímicos para células 308; SCID para tumores DUI45 o PC-3 M (categoría de dolor D). Cantidad total de ratones necesarios: (4 ratones/tratamiento) (6 tratamientos) (3 experimentos) = 72 ratones.

A los ratones se les inoculan células derivadas de médula ósea (*bone marrow* - BM) marcadas con GFP y/o con células benignas transformadas humanas o de ratón. Las inoculaciones de tumores se realizan en ratones anestesiados con isofluorano en una campana. Los ratones se disponen en la campana que contiene bolas de algodón tratadas con isofluorano dentro de un tubo centrífugo de polipropileno. Durante el procedimiento, los ratones son vigilados, observando su tasa respiratoria, movimiento, relajación muscular y falta de movimiento dirigido. Después de la inoculación, los ratones son devueltos a sus jaulas y vigilados hasta que recuperan la conciencia normal.

A cada ratón se le administran 100 µl de PBS incluyendo 5×10^5 células. Los ratones desnudos atímicos reciben células 308, células BM o una mezcla de células BM y células 308 tratada con PEG. Los ratones SCID reciben DU145, células BM o una mezcla de células BM y células DU145 tratada con PEG. Las inoculaciones se administran vía subcutánea o por inyección en la vena caudal. Los ratones que reciben infecciones por la vena caudal son encerrados en cajas de retención. Después de desinfectar la vena caudal con alcohol, se aplica xilacaína al 2% como anestésico tópico. A cada ratón se le inyectan no más de 200 µl de solución utilizando una aguja de calibre 25-30. Si las inyecciones provocan necrosis, las colas se rocían con cloruro de etilo, se sumergen en betadine y se extirpan con tijeras estériles justo por encima del área necrótica. Después, la cola se cauteriza con nitrato de plata para detener la hemorragia.

El crecimiento tumoral se controla mediante la medida con calibre de las dimensiones del tumor dos veces por semana y cálculo del volumen utilizando la fórmula: $\text{volumen} = 1/2(\text{longitud})(\text{longitud}^2)$. Los animales se sacrifican a las 2, 3 y 4 semanas para controlar la extensión de la metástasis y el volumen del tumor alcanzado.

Los animales se sacrifican por asfixia con dióxido de carbono en una cámara hermética para recoger tumores y órganos. Este es un procedimiento utilizado rutinariamente para la eutanasia de ratones que reduce al mínimo su sufrimiento y está recomendado por el AVMA Panel on Euthanasia.

Perfil Resumen del Procedimiento

1. Administración de una mezcla de células transformadas benignas y células madre para establecer xenoinjertos de 308 y DU145 mediante inyección subcutánea o en la vena caudal.
2. Grupos de tratamiento para cada método de inyección - (6): células 308; células BM; mezcla de células BM + células 308 tratada con PEG; DU145; células BM; mezcla de células DU145 y BM tratada con PEG.
3. Los tumores primarios y los órganos con metástasis desarrollados se extirpan después de sacrificar los ratones mediante asfixia con CO₂.
4. Las muestras de tumor se someten a análisis histopatológico para detectar alteraciones en la progresión o la capacidad de metástasis asociadas con un evento de fusión. El análisis histopatológico debería incluir la comparación del crecimiento tumoral con el tiempo, el número y el tamaño relativo de las metástasis, la caracterización histológica del tumor.

Experimento 3: Inhibición de la tumorigenicidad o progresión

A los ratones se les inoculan células humanas (PC3-M) o de ratón (308 10Gy5 o 4T1) transformadas metastásicas, e inhibidores del receptor CRCX4. Cantidad total de ratones necesarios: (4 ratones/tratamiento) (3 tratamientos) (3 momentos de administración) (3 experimentos) = 108 ratones.

Las inoculaciones de tumores se realizan en ratones anestesiados con isofluorano en una campana. Los ratones se disponen en la campana que contiene bolas de algodón tratadas con isofluorano dentro de un tubo centrífugo de polipropileno. Durante el procedimiento, los ratones son vigilados, observando su tasa respiratoria, movimiento, relajación muscular y falta de movimiento dirigido. Después de la inoculación, los ratones son devueltos a sus jaulas y vigilados hasta que recuperan la conciencia normal.

5 A 4 ratones Balb/c se les administran 100 µl de PBS incluyendo 10⁴ células 4T1 por inyección en la almohadilla adiposa mamaria. Los ratones desnudos atímicos reciben 100 µl de PBS que contiene 1 x 10⁶ células 308 10Gy5. Los ratones SCID reciben 100 µl de PBS que contiene 1 x 10⁶ células PC-3M. El experimento se realiza con administración del anticuerpo para el receptor CDCX4 antes, simultáneamente y después de la inoculación de las células tumorales. Las células 4T1 se inyectan en las almohadillas adiposas mamarias de Balb/c. Las células 308 10Gy5 se inyectan en la vena caudal de ratones desnudos y las células PC-3 M se inyectan en las venas caudales de ratones SCID. Los ratones que reciben inyecciones en la vena caudal se encierran en una caja de retención durante la inyección. Después de desinfectar la cola con alcohol y aplicar xilacaína al 2% como anestésico tópico, a cada ratón se le inyectan no más de 200 µl de solución utilizando una aguja de calibre 25-30. Si las inyecciones provocan necrosis, las colas se rocían con cloruro de etilo, se sumergen en betadine y se extirpan con tijeras estériles justo por encima del área necrótica. Después, la cola se cauteriza con nitrato de plata para detener la hemorragia.

15 El crecimiento tumoral se controla mediante la medida con calibre de las dimensiones del tumor dos veces por semana y cálculo del volumen utilizando la fórmula: volumen = 1/2(longitud)(longitud²). Los animales se sacrifican a los 10, 15 y 20 días para controlar la metástasis de pulmón y el volumen del tumor.

Los animales se controlan para preinoculación o postinoculación con un inhibidor potencial de la metástasis y se ensayan en cuanto a alteraciones en la apoptosis de células tumorales, diferenciación, inhibición de metástasis.

20 Los tumores primarios y las metástasis que se desarrollan en los ratones huésped se extirpan después de sacrificar los ratones por asfixia con CO₂.

Las muestras de tejido se someten a análisis histopatológico para detectar alteraciones en la progresión o en las metástasis asociadas con el tratamiento. El análisis histopatológico debería incluir la comparación del crecimiento tumoral con el tiempo, el número y el tamaño relativo de las metástasis, la caracterización histológica del tejido tumoral.

25 Ensayo *in vitro* de inhibición de migración de células de cáncer/células fusionadas:

Células: Para analizar la capacidad de los anticuerpos de ubiquitina para inhibir la movilidad celular se utilizaron dos líneas de células de cáncer metastásico. La PC-3M es una línea celular de carcinoma de próstata humano. La 4T1 es una línea celular de carcinoma de mama de ratón. Las dos líneas se mantuvieron en medio DMEM complementado con FBS al 10% y Glutamax 1 (medio DMEM).

30 Anticuerpos: Se utilizaron tres anticuerpos de ubiquitina. El 14372 es un anticuerpo policlonal para la ubiquitina. Tanto el 10C2-2 como el Mel-14 son anticuerpos monoclonales para la ubiquitina.

Procedimiento (1): Una placa de 6 pocillos que incluía un cubreobjetos estéril en cada pocillo se sembró con 1x10⁶ células/pocillo en medio DMEM y se incubó durante una noche a 37°C y 5% CO₂, en una incubadora humidificada (condiciones estándar).

35 El día siguiente, la monocapa confluyente sobre el cubreobjetos se rascó una vez con la punta de una pipeta. El medio se aspiró y los pocillos se lavaron con 1 ml de medio DMEM. Cada línea celular se trató con tres concentraciones diferentes de cada anticuerpo: 5 µg/ml/10⁶ células, 25 µg/ml/10⁶ células y 100 µg/ml/10⁶ células. Las placas se incubaron durante 11 horas con las células. Las células control se trataron con DPBS.

40 Los cubreobjetos se evaluaron después de la incubación en lo que respecta al cierre de las partes rascadas como resultado de la migración celular. Después, los cubreobjetos se fijaron y tiñeron con metanol:acetona 1:1 durante 5 minutos a -20°C y luego se lavaron con DPBS. Los cubreobjetos se montaron sobre un cubreobjetos de vidrio. Se capturaron imágenes con *software* Metacam utilizando una estación de trabajo compuesta por un microscopio Nikon TE2000 con un aumento 4X.

Ensayo *in vivo* de inhibición de metástasis de células de cáncer/células fusionadas:

Células: Para analizar la capacidad de un anticuerpo de ubiquitina para inhibir la metástasis se utilizó una línea celular de carcinoma metastásico de mama de ratón, 4T1. Las células se mantuvieron en medio DMEM bajo las condiciones de cultivo descritas en el protocolo anterior.

- 5 Anticuerpos: Se utilizó el anticuerpo de ubiquitina monoclonal Mel-14.

Procedimiento: se transfectaron células 4T1 transitoriamente con un vector de expresión para la proteína de fluorescencia verde incrementada (*enhanced green fluorescence protein* - EGFP). Las células se cosecharon 48 horas después de la transfección y se incubaron con el anticuerpo de ubiquitina Mel-14 o con el anticuerpo de control Rat IgG2A, en concentraciones de 180 µg por 10⁶ células, en DPBS, durante una hora. Después de la incubación, se inyectaron 250.000 células en la vena caudal de ratones SCID en un volumen total de 50 µl. Una semana después, los ratones fueron sacrificados y se les extirparon los pulmones, que se fijaron en formalina al 4%. El examen de la presencia de colonias metastásicas se llevó a cabo en pulmones enteros aplastados con un microscopio Nikon Eclipse 600 con un aumento 10X. La presencia de células positivas de EGFP en el pulmón indicaba que se había producido metástasis.

- 15 Resultados:

Tabla 2 Grado de inhibición de la migración de células PC3M *in vitro* mediante anticuerpos de ubiquitina en diferentes concentraciones.

(++++ = inhibición completa; - = ninguna inhibición)

<u>Conc.</u>	<u>5 µg/ml/10⁶</u>	<u>25 µg/ml/10⁶</u>	<u>100 µg/ml/10⁶</u>
<u>anticuerpos</u>			
14372	++++	++++	++++
10C2-2	++++	++++	++++
Mel-14	++++	++++	++++
Solo DPBS	-	-	-

20

Tabla 3 Grado de inhibición de la migración de células 4T1 *in vitro* mediante anticuerpos de ubiquitina en diferentes concentraciones.

(++++ = inhibición completa; - = ninguna inhibición)

<u>Conc.</u>	<u>5 µg/ml/millón</u>	<u>25 µg/ml/millón</u>	<u>100 µg/ml/millón</u>
<u>anticuerpos</u>			
14372	++++	++++	++++
10C2-2	++++	++++	++++
Mel-14	++++	++++	++++
Solo DPBS	-	-	-

- 25 Tabla 4 Grado de inhibición **de metástasis *in vivo* de células 4T1** mediante el anticuerpo de ubiquitina Mel-14

(++++ = inhibición completa; - = ninguna inhibición)

<u>Conc.</u>	<u>180 µg/10⁶</u>
<u>anticuerpos</u>	
Mel-14	++++
anticuerpo de control	-

Referencia:

1. Auerbach R, Lewis R, Shinnars B, Kubal L, Akhtar N. "Angiogenesis Assays: A Critical Overview" *Clinical Chemistry* 49 (1), 1 de enero de 2003: 32-40.

Tal como muestran estas tablas, los anticuerpos contra ubiquitina inhibían la migración de células tumorales.

5 Métodos terapéuticos

Los métodos de esta invención pueden utilizarse para inhibir la migración tumoral en un sujeto. A un sujeto vertebrado, preferentemente un mamífero, de forma especialmente preferente un humano, se le administra una cantidad del compuesto eficaz para inhibir la migración de células tumorales. El compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo se administran preferentemente en forma de una composición farmacéutica.

10

Las dosis de los compuestos incluyen preferentemente unidades de dosificación farmacéutica que comprenden una cantidad eficaz del anticuerpo u otro agente. Por el concepto "cantidad eficaz" se entiende una cantidad suficiente para alcanzar una concentración permanente *in vivo* que conduce a una reducción mensurable de cualquier parámetro relevante de la enfermedad.

15

Actualmente se utilizan de forma rutinaria anticuerpos monoclonales para la terapia mediante infusión directa en el paciente. El anticuerpo puede ser liofilizado y almacenado hasta su reconstitución con agua o con solución salina. Una dosis de 4 mg/kg de peso corporal es una dosis humana típica y segura para terapias basadas en anticuerpos. Por ejemplo, es una dosis eficaz de la terapia de cáncer de mama por anticuerpos Herceptin. Por consiguiente, en una realización de la invención, a un paciente humano se le administra vía

20

intravenosa una dosis de 4 mg de un anticuerpo antiubiquitina por kg de peso corporal.

La cantidad de principio activo a administrar depende del agente biológico o químico concreto, la enfermedad o el estado, la vía de administración, la salud y el peso del receptor, la existencia de otros tratamientos concurrente, si hay alguno, la frecuencia del tratamiento, la naturaleza del efecto deseado, por ejemplo inhibición de metástasis tumoral, y el criterio del médico cualificado.

25

Las composiciones y los métodos de tratamiento arriba descritos son útiles para inhibir la migración celular (por ejemplo, invasión o metástasis) en un sujeto que padece una enfermedad o un estado asociado con una invasión celular no deseada, proliferación, metástasis.

Dentro del significado y el rango de equivalencia de las reivindicaciones adjuntas son posibles varias modificaciones.

30

REIVINDICACIONES

1. Método para modelizar la migración de células cancerosas que incluye los pasos de:
 - a) proporcionar una célula madre derivada de médula ósea;
 - b) proporcionar una célula premaligna iniciada consistente en una célula con cambios genéticos o epigenéticos, incluyendo los cambios genéticos mutaciones genéticas, translocaciones, deleciones o amplificaciones, incluyendo los cambios epigenéticos cualquier cambio más allá de las secuencias de ADN que conduzca a una desregulación del crecimiento y la función celular, como metilación de ADN, modificación de cromatina o señalización de células alteradas, y siendo los cambios genéticos o epigenéticos suficientes para provocar una autorrenovación, invasión tisular o migración;
 - c) fusionar la célula madre derivada de médula ósea con la célula iniciada, creando así una célula fusionada; y
 - d) medir un indicador de migración para la célula fusionada.

2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque los pasos (a) y (b) incluyen obtener o cultivar la célula fusionada a partir de una fusión previa de la célula madre derivada de médula ósea con la célula iniciada.

3. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el paso (d) incluye un ensayo de rascado *in vitro*.

4. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque el paso (d) se lleva a cabo *in vivo* en un animal no humano.

5. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicha célula del paso (b) es de origen epitelial.

6. Método para examinar un efecto de un agente biológico o químico en la migración de células tumorales, que incluye los pasos de:
 - a) proporcionar una célula fusionada derivada de una fusión de una célula madre derivada de médula ósea con una célula premaligna iniciada, siendo dicha célula iniciada una célula con cambios genéticos o epigenéticos, incluyendo los cambios genéticos mutaciones genéticas, translocaciones, deleciones o amplificaciones, incluyendo los cambios epigenéticos cualquier cambio más allá de las secuencias de ADN que conduzca a una desregulación del crecimiento y la función celular, como metilación de ADN, modificación de cromatina o señalización de células alteradas, y siendo los cambios genéticos o epigenéticos suficientes para provocar una autorrenovación, invasión tisular o migración;
 - b) poner en contacto dicha célula fusionada con un agente biológico o químico; y
 - c) determinar si la migración de células tumorales se ha promovido, inhibido o ha permanecido inalterada.

7. Método según la reivindicación 6, caracterizado porque el paso (a) incluye proporcionar una célula iniciada de piel, mama o próstata.

8. Método según la reivindicación 6, caracterizado porque el paso (b) tiene lugar *in vivo* en un animal no humano.

9. Método según la reivindicación 6, caracterizado porque dicho agente biológico o químico es un anticuerpo contra ubiquitina.

10. Método según la reivindicación 9, caracterizado porque dicho anticuerpo es MEL-14.
11. Método según la reivindicación 10, caracterizado porque dicho anticuerpo se selecciona de entre el grupo consistente en los anticuerpos 14372 y 10C2-2.

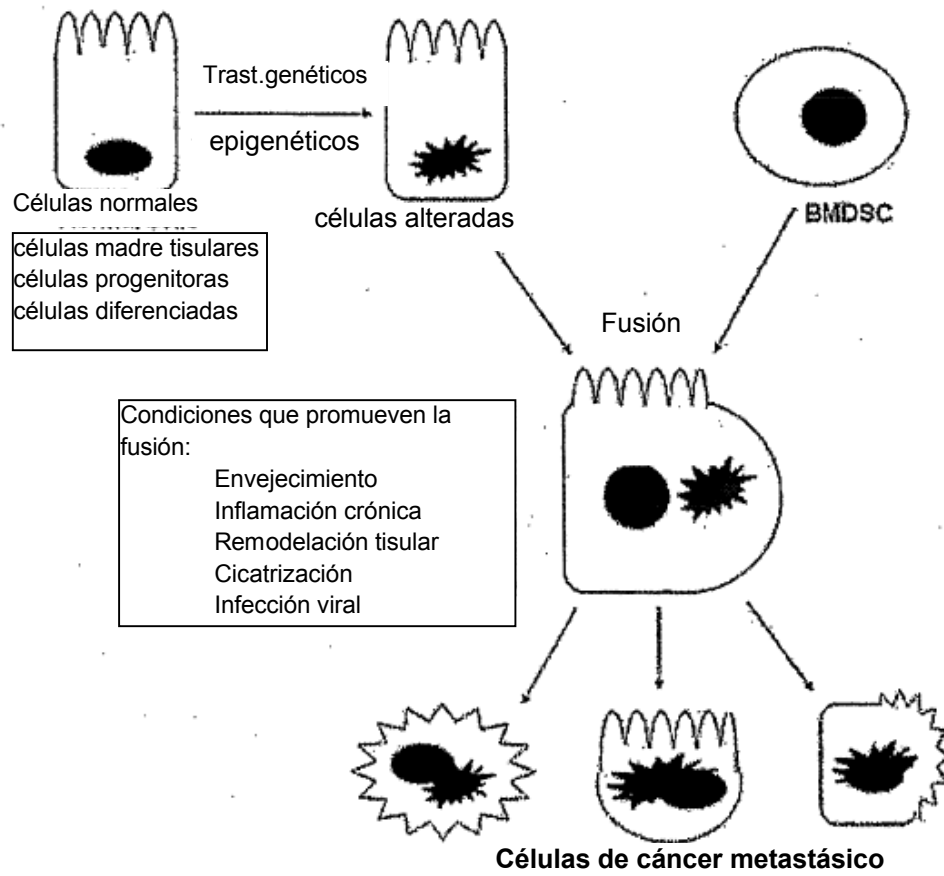


FIG. 1