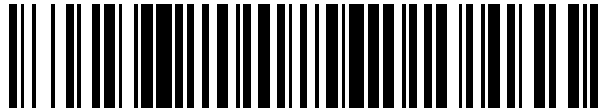


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 528 209**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2009 E 09728315 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.11.2014 EP 2268318**

54 Título: **Sistema modelo de tumor útil para estudiar el cáncer polietápico**

30 Prioridad:

31.03.2008 IN DE08452008

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.02.2015

73 Titular/es:

**COUNCIL OF SCIENTIFIC & INDUSTRIAL
RESEARCH (100.0%)**

**(An Indian registered body incorporated under
Registration of Societies Act (Act XXI of 1860))
Anusandhan Bhawan 2 Rafi Marg.
New Delhi 110 001, IN**

72 Inventor/es:

**JINKA, RAJESWARI y
PANDE, GOPAL**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 528 209 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

Sistema modelo de tumor útil para estudiar el cáncer polietápico

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método de desarrollo de un Sistema Modelo de Tumor. La invención se refiere a un sistema modelo de tumor con células privadas de adhesión. Esta invención proporciona la detección primaria de la transformación de células privadas de adhesión y tumorigenicidad. Las células privadas de adhesión son susceptibles de metastatizarse en sitios distantes y el sistema modelo incluye tanto la formación de tumor como la metástasis.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las interacciones célula-matriz y célula-célula son determinantes fisiológicos importantes del crecimiento, la supervivencia y la transformación de las células. La adhesión de las células a la matriz extracelular (ECM) por la vía de integrinas influye también crucialmente en la organización del citoesqueleto. La fijación de ligandos a integrinas conduce a la aglomeración de las integrinas y el reclutamiento de filamentos de actina y proteínas de señalización al dominio citoplásmico de la integrina (Hynes, R.O., 2002. Integrins: Bidirectional, allosteric signaling machines. Cell. 110, 673-687). Estos complejos proporcionan señalización de fuera adentro para regular diversas funciones celulares que equilibran los caminos de supervivencia y muerte tanto en las células normales como en las tumorigenas (Assoian RK, Schwartz MA. 2001. Coordinate signaling by integrins and receptor tyrosine kinases in the regulation of G1 phase cell-cycle progression. Curr Opin Genet Dev. 11(1): 48-53). La mayoría de las células dependientes de adhesión sufren apoptosis después de la privación de sustrato. La ligación de integrinas puede salvar estas células, lo que demuestra que las integrinas están involucradas en la estimulación de los mecanismos resistentes a la apoptosis y permiten que las células sufran transformación (Rajeswari, J y Pande. G. 2002. The significance of $\alpha 5 \beta 1$ integrin dependent and independent cytoskeleton organization in cell transformation and survival. Cell Biol. Int. 26, 1043-1055). Las integrinas proporcionan también señales para desprenderse de los tumores primarios, invadir y colonizar en sitios secundarios durante la metástasis (Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., and Darnell, J. 2002. Molecular Cell Biology, 4ª edición, W.H. Freeman and Company, Nueva York, pp. 751-792, 817-822, 970-988, 1056-1082 y Seiki, M., Koshikawa, N., Yana, I., 2003. Role of pericellular proteolysis by membranetype 1 matrix metalloproteinase in cancer invasion and angiogenesis. Cancer and Metastasis Reviews. 22 (2), 129-143, Ledezma, 2004) y la angiogénesis (Stupack DG, Cheresh DA. Integrins and angiogenesis. [2004 Curr Top Dev. Biol. 4, 207-38.). En contraste, algunas células cancerosas mueren en lugar de colonizar en sitios distantes (Rust et al., 2002). De ahí que los cambios en los perfiles de expresión de integrinas puedan influir espectacularmente en la progresión de tumores malignos por inducción de diversas moléculas de señalización tales como las quinasas Jun (JNKs), la quinasa P38, Bad y diversas caspasas.

Varios estudios recientes han demostrado la eficacia de las integrinas como indicadores de enfermedades tales como cáncer y angiogénesis. Tanto la regulación creciente como la regulación decreciente de la expresión de integrinas podrían servir como marcadores eficaces en la detección del cáncer. Por ejemplo, la regulación decreciente de $\alpha 6$ y $\beta 4$ puede contribuir a una mayor tumorigénesis en las células del cáncer de próstata (Bonaccorsi L, Carloni V, Muratori M, Salvadori A, Giannini A, Carini M, Serio M, Forti G, Baldi E. 2000 Endocrinology. 141(9), 3172-82). La expresión de receptores de andrógenos en las células del carcinoma prostático suprime el fenotipo invasivo mediado por la integrina alfa6beta4. Las correlaciones clínicas de biopsias de pacientes con la expresión de integrinas se recapitulan en cierto grado en análisis de roedores y análisis *in vitro*. Por ejemplo, un estudio de hepatocarcinogénesis en la rata demostró que las integrinas $\alpha 1$ y $\alpha 5$ estaban reguladas en sentido creciente en metástasis de pulmón y diafragma, mientras que las integrinas $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, y $\alpha 5$ estaban reducidas en el carcinoma primario y los nódulos preneoplásticos (Rust WL, Carper RS y Plopper GE. 2002. The promise of integrins as effective targets for anticancer agents. J Biomed Biotechnol.2002; 124-130).

Los mecanismos reguladores de la supervivencia celular y la apoptosis son de naturaleza muy compleja, implicando numerosos factores y caminos de señalización no solo en el proceso de toma de decisiones de supervivencia (o muerte), sino también en la ejecución de la apoptosis propiamente dicha. La misma naturaleza compleja es aplicable en lo que respecta a la anoikis, una forma de apoptosis que está regulada en gran parte por interacciones célula-matriz extracelular mediadas por integrinas.

La mayoría de las muertes relacionadas con el cáncer están asociadas con metástasis. La cascada metastásica es un proceso complejo constituido por varios pasos importantes que incluyen pérdida de arquitectura del tejido, invasión local, invasión en la sangre y los vasos linfáticos, extravasación, establecimiento de los focos secundarios y angiogénesis. La invasión de la matriz extracelular y la propagación metastásica del cáncer a otros tejidos es probable también que refleje la capacidad de las células tumorales para digerir su andamiaje de matriz circundante por secreción de enzimas degradantes de la matriz tales como las metaloproteinasas de la matriz (MMPs). La invasión de la matriz extracelular y la propagación metastásica del cáncer de colon refleja también probablemente la capacidad de las células tumorales para digerir su andamiaje de matriz circundante por secreción de enzimas degradantes de la matriz tales como las metaloproteinasas de la matriz (MMPs). Los mecanismos por los cuales las

células del cáncer de colon humano escapan a las limitaciones de crecimiento impuestas a las células normales por aglomeración celular y matrices pericelulares densas no están claros. Sin embargo, los mecanismos por los cuales las células tumorígenas escapan a las limitaciones de crecimiento impuestas a las células normales por aglomeración celular y matrices pericelulares densas no están claros (Un método de modulación de la actividad celular mediada por integrinas y agentes útiles para el mismo. 2001. WO/2001/000677).

DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA ANTERIOR

El cáncer es una enfermedad grave y muy letal. Aunque se han logrado avances en la diagnosis y el tratamiento de ciertos cánceres en los últimos años, hay todavía necesidad del desarrollo de un sistema modelo, que ayude a comprender la naturaleza del cáncer y sea útil en la evaluación de diferentes tipos de fármacos. La presente invención se refiere a la transformación y en particular al cáncer.

Muchos informes han demostrado que las integrinas juegan un papel crucial en el tratamiento del cáncer. Las integrinas que se fijan a los péptidos RGD están generalmente sobreexpresadas en los vasos angiogénicos, con inclusión de los de tumores y en lesiones inflamatorias, tales como la artritis reumatoide. En algunos tumores, las células tumorales expresan también integrinas de fijación a RGD. Existe un vasto cuerpo de bibliografía preclínica y clínica acerca del uso de antagonistas de las integrinas basadas en RGD en la enfermedad cardiovascular y el cáncer. (Ruoslahti, E. 2003. RGD story: A personal account. A Landmark Essay. Matrix Biology. 22: 459-465).

A lo largo de la última década, se han publicado y expedido numerosas patentes de utilización de antagonistas $\alpha\beta 3$ para la prevención y/o el tratamiento del cáncer, demostrando muchos antagonistas resultados positivos preclínicos antiangiogénicos y antitumorales, que utilizan anticuerpos, péptidos RGD, péptidos distintos de RGD, peptidomiméticos. (Hsu et.al. 2007. Integrin $\alpha\beta 3$ antagonists for Anti-angiogenic cancer treatment. Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery, 2, 143-158)

La invención descrita en WO/2003/075957 proporciona métodos para identificación de antagonistas de la integrina α y $\beta 3$, particularmente para anticuerpos que se fijan específicamente al mismo epítipo que Vitaxina (E y/o LM609), como Vitaxina (E y/o LM609) (Patente núm. (WO/2003/075957). La prevención y/o el tratamiento del cáncer utilizando antagonistas de la integrina alfa $\beta 3$ en combinación con otros agentes).

Sin embargo, muy pocos sistemas modelo se han mostrado en la bibliografía en los que la progresión del cáncer de próstata se demuestre en ratones inmunodeficientes con xenoinjerto de próstata humano (Sawyers et. al., 2006. Mouse models of human prostate cancer progression. Patente de los Estados Unidos 7053263).

Un modelo de ratón autóctono de cáncer de vejiga que se origina en el urotelio y progresa finalmente hasta enfermedad invasiva. Esto se realizó utilizando un sistema de descarga de adenovirus-Cre para lograr la delección esporádica de la función supresora de tumores (*Cory Abate-Shen, 06-38 UMDNJ*) Research Tool).

WO 9101760 se refiere a la preparación de modelos de tumores animales en los que se inyectan en el animal células/tejido tumoral. Estos modelos animales se utilizan para investigación del proceso de la tumorigénesis.

WO 2006074186A describe un método para construir un modelo de cáncer hepático por alteración de los hepatocitos a fin de aumentar la expresión de oncogenes, reducir la expresión de genes supresores de tumores o ambas cosas, y trasplantar dichos hepatocitos a un animal receptor en el que los hepatocitos se injertan en el hígado de dicho animal y se desarrolla un tumor de cáncer hepático a partir de al menos uno de los hepatocitos alterados.

La presente invención incluye la detección primaria de la transformación por formación de colonias en agar blando y su eficiencia en la formación de tumores indicada por tumorigenicidad en ratones lampiños.

OBJETOS DE LA INVENCION

El objeto principal de la presente invención es obtener un sistema modelo de tumor en un ratón inmunodeficiente.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método de preparación del sistema modelo.

Otro objeto adicional de la presente invención es el desarrollo de tumores en sarcomas particulares, derivados de células privadas de adhesión.

Otro objeto adicional de la presente invención es la detección de metástasis en el sistema modelo. Otro objeto adicional de la presente invención es el uso del sistema modelo para el desarrollo de terapias antitumorales.

Otro objeto adicional de la presente invención es el uso del sistema modelo para estudiar la progresión del cáncer en su etapa múltiple.

DEFINICIONES

La metástasis (Griego: *desplazamiento*, *μετά* = *próximo* + *στάσις* = *emplazamiento*, plural: *metastases*), abreviada a veces mets, es la propagación de una enfermedad desde un órgano o una parte a otro órgano o parte no adyacente. Únicamente las células de tumores malignos y las infecciones tienen la capacidad de metastatizarse. Enfermedad metastásica es un sinónimo de metástasis.

5 Las células del cáncer pueden "desprenderse", "fugarse" o "esparcirse" de un tumor primario, entrar en los vasos linfáticos y sanguíneos, circular por el torrente sanguíneo, y depositarse para crecer en los tejidos normales de otros puntos del cuerpo. La metástasis es uno de los tres sellos de la malignidad (contraste con los tumores benignos). La mayoría de los tumores y otros neoplasmas pueden metastatizarse, aunque en grados variables (v.g., el glioma y el carcinoma de células basales se metastatizan raras veces).

10 Cuando las células tumorales se metastatizan, el nuevo tumor se conoce como tumor secundario o metastásico, y sus células son iguales que las del tumor original. Esto significa, por ejemplo, que, si un cáncer de mama se metastatiza en el pulmón, el tumor secundario está formado por células de mama anormales, no por células anormales de pulmón. El tumor en el pulmón se denomina entonces *cáncer de mama metastásico*, no *cáncer de pulmón*.

20 El anoikis es una forma de muerte celular programada que es inducida por células dependientes de anclaje que se desprenden de la matriz extracelular circundante (ECM). Usualmente las células permanecen próximas al tejido al que pertenecen, dado que la comunicación entre las células proximales así como entre células y ECM proporciona señales esenciales para crecimiento o supervivencia. Cuando las células se desprenden de la ECM, es decir cuando se produce una pérdida de interacciones células-matriz normales, pueden sufrir anoikis. Sin embargo, las células de los tumores metastásicos pueden escapar de la anoikis e invadir otros órganos.

25 El término "célula neoplástica" debe entenderse que significa una célula que exhibe crecimiento anormal y puede ser o no una célula maligna. El "crecimiento" debe considerarse en su sentido más amplio e incluye proliferación de la célula. A este respecto, un ejemplo de crecimiento anormal de células es la proliferación incontrolada de una célula.

30 El término angiogénesis es un proceso de desarrollo de nuevos vasos sanguíneos. La angiogénesis es importante en el desarrollo formal del embrión y el feto. La misma es importante también para la formación de los tumores. Ciertas proteínas, con inclusión de angiostatina y endostatina, secretadas por tumores actúan (al menos en los ratones), interfiriendo el suministro de sangre que requieren los tumores.

35 El término péptido significa una pequeña pieza de proteína constituida por una molécula lineal formada por dos o más *aminoácidos* (los bloques de construcción de las proteínas) unidos por enlaces peptídicos.

SUMARIO DE LA INVENCION

40 Conforme a lo anterior, la presente invención se refiere a un método de desarrollo de un sistema modelo de tumor para estudiar la eficiencia de crecimiento y tratamiento con fármacos en la etapa múltiple del cáncer. Las interacciones célula-matriz y célula-célula son determinantes fisiológicos importantes de crecimiento, supervivencia y transformación celulares. Las células adherentes normales pierden rápidamente su viabilidad cuando se privan de la adhesión celular. Las células privadas de adhesión son diferentes fisiológica y morfológicamente cuando se las compara con las células adherentes normales y exhiben las características de transformación (Rajeswari, J. y Pande, (G. 2002). The significance of $\alpha 5\beta 1$ integrin dependent and independent cytoskeleton organization in cell transformation and survival. Cell Biol. Int. 26, 1043-1055 & J. Rajeswari, y Gopal Pande, 2006. Direct association of $\alpha 5\beta 1$ integrins with caspase 3. (Cell. Biol. Int., 30, 963-969).

50 En la presente invención, las células que cambian su morfología fenotípica y fisiológicamente exhiben variación en la eficiencia de transformación con los diferentes momentos de privación de la adhesión. Esto se confirmó por crecimiento de las células en colonias en agar blando y por formación de tumores cuando se inyectaban en ratones inmunodeficientes lampiños. Adicionalmente, las células privadas de adhesión tienen capacidad de metastatizarse en órganos distantes del sitio de inyección.

55 En una realización de la presente invención, un método de preparación de un sistema modelo de tumor en un ratón inmunodeficiente, en cuyo sistema se han administrado por vía subcutánea células transformadas privadas de adhesión a un ratón inmunodeficiente y se ha dejado que se metastaticen en el ratón inmunodeficiente durante un periodo de aproximadamente 4 semanas a aproximadamente 6 semanas después de transformación *in vivo*; habiéndose preparado dichas células privadas de adhesión transformadas por:

- 60
- a. preparación de células privadas de adhesión por tripsinización de células fibroblastos de rata adherentes normales, F111; y
 - b. suspensión de dichas células fibroblastos de rata privadas de adhesión (F111) del paso 'a' en la superficie recubierta con 0,8 a 1% de agarosa en medio de Eagle Modificado por Dulbecco que contiene 8 a
- 65 10% de Suero de Ternero Fetal (FCS) para obtener células fibroblastos transformadas privadas de adhesión.

En una realización de la presente invención, la transformación *in vitro* de células no adherentes del paso se confirma por un ensayo de formación de colonias en agar blando.

5 En una realización de la presente invención, la detección de la localización de la metástasis en el método de preparación de un sistema modelo de tumor animal comprende:

- i. incrustación en parafina de secciones de muestras de tejido recogidas de órganos seleccionados de un grupo constituido por tumor, pulmón, bazo y riñón del sistema modelo por proceso conocido;
- 10 ii. tinción de las secciones en parafina del paso (i) con Hematoxilina y Eosina;
- iii. detección de la metástasis en las secciones de parafina teñidas del paso (ii) por un patrón de tinción diferencial de las células neoplásticas y su penetración en el tejido localizado.

15 La recolección de células privadas de adhesión en superficies recubiertas con agarosa al 0,8% y la viabilidad celular de las células disminuyen a medida que aumenta el período de privación de la adhesión. En la presente invención, se utiliza aproximadamente 8 a 10% de FCS.

En una realización de la presente invención, las células NA se mezclan con 0,2-0,3% de agarosa en suero que contiene medio DMEM y se extienden sobre una superficie recubierta con agar al 0,8% a 1%.

20 En una realización de la presente invención, el mamífero utilizado es un ratón lampiño inmunodeficiente.

En una realización de la presente invención, el modelo es útil en la estimulación de la progresión de la formación de un tumor primario.

25 En una realización de la presente invención, el modelo es útil para evaluación de la metástasis.

En una realización de la presente invención, el modelo es útil para evaluación de la tumorigénesis.

30 En la presente invención, la célula privada de adhesión se inyecta subcutáneamente.

La detección de la transformación y tumorigenicidad se realiza utilizando las células privadas de adhesión.

35 En otra realización adicional de la presente invención, la detección se efectúa en la sangre periférica del ratón inmunodeficiente.

En otra realización adicional de la presente invención, la detección se efectúa en la médula ósea del ratón inmunodeficiente.

40 En otra realización adicional de la presente invención, el sistema modelo de tumor es útil para la detección del cáncer polietápico.

Se describe también un ensayo para evaluación del efecto de un tratamiento para el cáncer que comprende:

- 45 a. aplicación del tratamiento a un ratón inmunodeficiente portador de un tumor generado por implantación de un tejido localmente avanzado o metastásico o una suspensión de células del mismo procedente de un humano en el ratón inmunodeficiente;
- b. determinación del efecto del tratamiento sobre el crecimiento del tumor en dicho ratón.

50 En otra realización adicional de la presente invención, el uso del sistema modelo en la identificación de la progresión del cáncer en su estado polietápico.

Se describe también el uso del sistema modelo en el desarrollo de terapias antitumorales y diversos fármacos del cáncer en diferentes etapas del cáncer.

55 Se describe también el uso del sistema modelo para identificación de células metastásicas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS Y TABLAS:

60 Figura 1a. La figura incluye la fotografía de líneas de células Fibroblastos de Rata (F111). Las células fusiformes están bien esparcidas y fijadas al sustrato.

Figura 1b. La fotografía incluye las células no adherentes. Las células F111 normales se tripsinizan y extienden en placas sobre una superficie recubierta con agarosa al 0,8%.

Figura 2. La gráfica muestra el porcentaje de viabilidad celular de las células tanto adherentes como no adherentes.

65 La viabilidad de las células se comprueba por ensayo MTT en diferentes momentos.

Figura 3a. La fotografía muestra la formación de colonias de células adherentes en agar blando.

Figura 3b. La fotografía incluye la formación de colonias de células no adherentes en agar blando en el ensayo de colonias en agar blando.

5 Figura 4a. Formación de tumores con células adherentes cuando se inyectan subcutáneamente en ratones lampiños.

Figura 4b. Formación de tumor con células no adherentes/células privadas de adhesión, cuando se inyectan subcutáneamente en ratones lampiños. El tumor se indica con una flecha.

Figura 4c. La gráfica incluye el crecimiento del tumor en diferentes momentos, después de inyección en ratones lampiños.

10 Figura 5a. La figura incluye la tinción con Hematoxilina y Eosina de una sección de tumor. Las células tumorales se indican con flecha y se dejan crecer como células neoplásticas y pleomórficas fusiformes. El núcleo de estas células está teñido en color oscuro.

Figura 5b. Patrón de tinción con Hematoxilina y Eosina de una sección de tejido pulmonar. Las células fusiformes, indicadas con flecha, están invadiendo el pulmón por ocupación de la región alveolar.

15

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención lleva a cabo un método para desarrollar células transformadas a partir de células adherentes normales por privación de adhesión. Las células transformadas pueden crecer como colonias de agar blando en el ensayo de formación de colonias en agar blando y tumores en ratones lampiños. Estas células tienen la capacidad de metastatizarse por localización en órganos distantes. El sistema modelo es muy útil para estudiar la progresión del cáncer en etapas múltiples y para evaluar los fármacos anticancerígenos en diferentes etapas.

EJEMPLOS

25

Los ejemplos que siguen se proporcionan a modo de ilustración de la presente invención y por consiguiente no deben interpretarse como limitantes del alcance de la presente invención.

Ejemplo 1

30

Preparación de células privadas de adhesión

Se tripsinizaron células F111 y se suspendieron en DMEM que contenía 1% de FCS, y se extendieron en placas sobre plástico o sobre superficies recubiertas de agarosa al 1% a una concentración de $2-3 \times 10^6$ células en 5 ml y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante periodos de tiempo diferentes. Las células sobre plástico son capaces de adherirse y las células sobre agar se mantienen privadas de adhesión y se encuentran en suspensión debido a la no disponibilidad de sustrato.

Ensayo de viabilidad celular

40

Células adherentes y privadas de adhesión recogidas en diferentes momentos se comprobaron en cuanto a su viabilidad mediante el ensayo MTT.

Propiedades semejantes a las de los tumores

45

Formación de colonias en agar blando

Se suspendieron 1×10^5 células adherentes y privadas de adhesión en diferentes momentos en agarosa al 0,3% en medio DMEM completo y se extendieron sobre superficies recubiertas al 0,8%. Las células se dejaron crecer durante una semana y se contaron las colonias formadas.

50

Formación de tumores en los ratones

Se inyectaron 5×10^6 células adherentes y privadas de adhesión en 100 µl de PBS por vía subcutánea en un ratón lampiño de 6 semanas de edad, y se midió el tamaño del tumor en diferentes momentos.

55

Identificación de células metastásicas

Los tumores desarrollados después de la inyección de células privadas de adhesión se dejaron crecer durante un periodo de tres meses y secciones de tejido recogidas del tumor y el pulmón se tiñeron histopatológicamente.

60

Preparación de células privadas de adhesión

Los resultados demostraron que las células sobre plástico son adherentes al sustrato y están bien esparcidas. En cambio, sobre agar, las células se mantienen privadas de adhesión debido al bloqueo de la superficie y se mantienen redondeadas por pérdida de su forma. (Fig. 1a, 1b).

65

Ejemplo 2

Medida de la viabilidad celular

- 5 Los resultados obtenidos por el ensayo MTT para la viabilidad celular de las células adherentes y privadas de adhesión en momentos diferentes demostraron que existía una pérdida continua de viabilidad celular en el caso de las células privadas de adhesión debido a la no disponibilidad de sustrato. En cambio, las células adherentes podían retener la tasa de supervivencia dado que están bien esparcidas y son adherentes a un sustrato. (Fig. 2).

10 Ejemplo 3

Formación de colonias en agar blando

- 15 Los resultados de la fotografía indican que las células privadas de adhesión podrían formar las colonias en agar blando a medida que están sufriendo transformación durante el periodo de falta de adhesión (Figura 3a y 3b).

Ejemplo 4

Formación de tumores

- 20 La fotografía siguiente muestra que las células privadas de adhesión tienen potencial para formar tumores pero no con células adherentes. La tumorigenicidad aumenta con el aumento en los momentos de periodo de privación de adhesión y disminuye después. La formación de tumores es muy agresiva hasta cierto momento y disminuía ulteriormente en momentos posteriores (Figura 4a, 4b, 4c).

25

Ejemplo 5

Metástasis

- 30 Las secciones de tejido de tumor y pulmón teñidas con Eosina y Hematoxilina demostraban que las células privadas de adhesión podían metastatizarse en órganos distantes.

- 35 Los resultados del patrón de tinción indican que las células privadas de adhesión podían migrar a órganos distantes, y colonizar por metástasis (Figura 5a y 5b).

VENTAJAS

- 40 Las razones no son específicas para numerosas y diversas alteraciones genéticas que acompañan a la tumorigénesis y suscita interrogantes en cuanto a si los factores experimentales promotores de cáncer siguen siendo relevantes para el mantenimiento del tumor. Se ha demostrado que la privación de adhesión es uno de los factores causantes implicados en el proceso de transformación en condiciones *in vivo* e *in vitro*. Aunque existen varios sistemas modelo de cáncer en diversas patentes y bibliografía, las observaciones actuales de los presentes inventores han demostrado un sistema modelo de tumor con células privadas de adhesión. Esta observación proporciona un nuevo método para detección primaria de la transformación de las células privadas de adhesión y la tumorigenicidad.

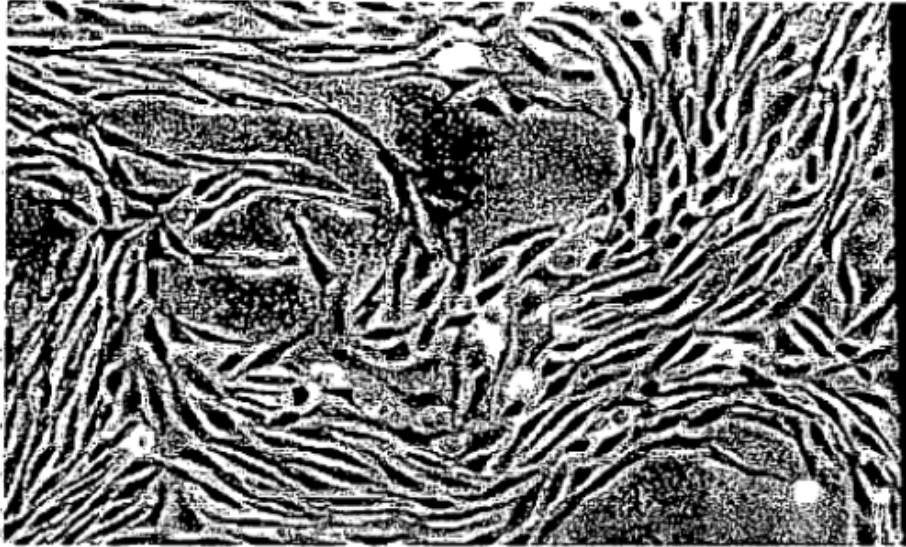
45

Otra ventaja del sistema modelo es que las células privadas de adhesión son capaces de metastatizarse en sitios distantes.

- 50 Dado que el sistema modelo incluye tanto la formación de tumor como la metástasis, es muy importante con relación a los otros modelos en el tratamiento del cáncer con diversos fármacos en diferentes etapas de cáncer.

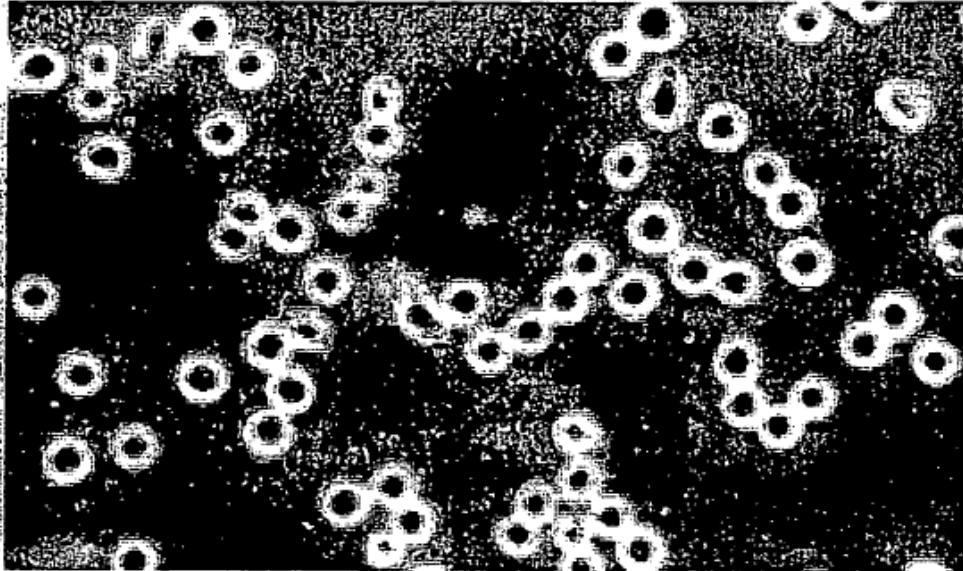
REIVINDICACIONES

1. Un método de preparación de un sistema modelo de tumor en un ratón inmunodeficiente, en cuyo sistema células transformadas privadas de adhesión se han administrado por vía subcutánea a un ratón inmunodeficiente y se ha dejado que se metastaticen en el ratón inmunodeficiente durante un periodo de aproximadamente 4 semanas a aproximadamente 6 semanas después de transformación *in vivo*; habiéndose preparado dichas células transformadas privadas de adhesión por:
- a. preparación de las células privadas de adhesión por tripsinización de células fibroblastos de rata adherentes normales, F111; y
- b. suspensión de dichas células fibroblastos de rata privadas de adhesión (F111) del paso 'a' sobre una superficie recubierta de agarosa al 0,8 a 1% en medio de Eagle Modificado por Dulbecco que contiene 8 a 10% de Suero de Ternero Fetal (FCS) para obtener células fibroblastos transformadas privadas de adhesión.
2. El método conforme a la reivindicación 1, en el cual la transformación *in vitro* de células no adherentes del paso b se confirma por el ensayo de formación de colonias en agar blando.
3. El método conforme a la reivindicación 1, en el cual la detección de la localización de la metástasis comprende:
- i. Incrustación en parafina de secciones de muestras de tejido recogidas de órganos seleccionados de un grupo constituido por tumor, pulmón, bazo y riñón del sistema modelo por proceso conocido;
- ii. tinción de secciones en parafina del paso (i) con Hematoxilina y Eosina;
- iii. detección de metástasis en las secciones de parafina teñidas del paso (ii) por el patrón de tinción diferencial de las células neoplásticas y su penetración en el tejido localizado.
4. El método conforme a la reivindicación 1, que comprende mezclar células privadas de adhesión con medio DMEM que contiene 0,2-0,3% de agarosa en suero y extensión de las mismas sobre una superficie recubierta con agar al 0,8% a 1%.
5. Un método conforme a la reivindicación 1, en el que el ratón utilizado es un ratón lampiño inmunodeficiente.
6. Un método conforme a la reivindicación 1, en el que el mismo es útil para simular la progresión de la formación de tumor primario, evaluar metástasis o evaluar tumorigénesis.
7. Un método conforme a la reivindicación 1, en el que la detección se efectúa en la sangre periférica del ratón inmunodeficiente o en la médula ósea del ratón inmunodeficiente.
8. Un sistema modelo de tumor con células privadas de adhesión, preparado por el método que se reivindica en la reivindicación 1.
9. Un sistema modelo de tumor conforme a la reivindicación 8, útil para la detección de cáncer polietápico.
10. Un sistema modelo de tumor conforme a la reivindicación 8 para uso en la evaluación del efecto de un tratamiento para el cáncer por determinación del efecto del tratamiento sobre el crecimiento del tumor en el sistema modelo de tumor.
11. Uso de un sistema modelo de tumor conforme a la reivindicación 8 para identificación de diferentes etapas de progresión del cáncer.
12. Uso de un sistema modelo de tumor conforme a la reivindicación 8 para desarrollo de terapias antitumorales y diversos fármacos del cáncer en diferentes etapas de cáncer.
13. Uso de un sistema modelo de tumor conforme a la reivindicación 8 para identificación de células metastásicas.



Células adherentes

Figura 1 a



Células privadas de adhesión

Figura 1 b

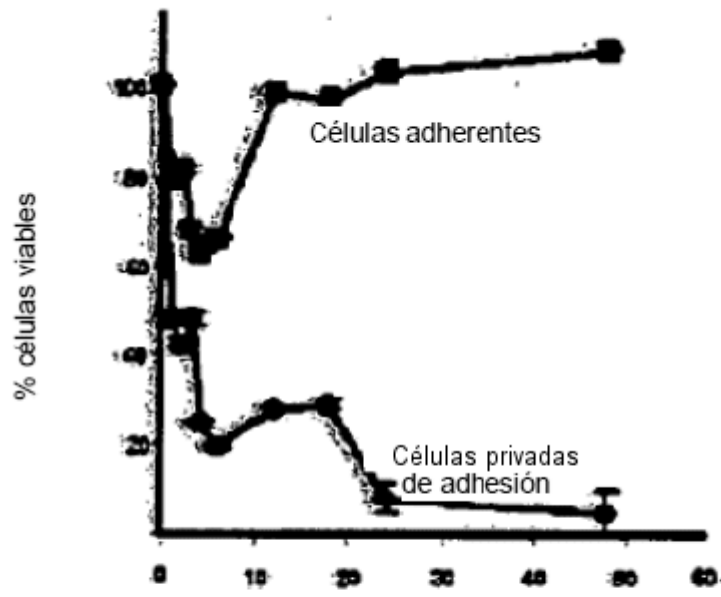
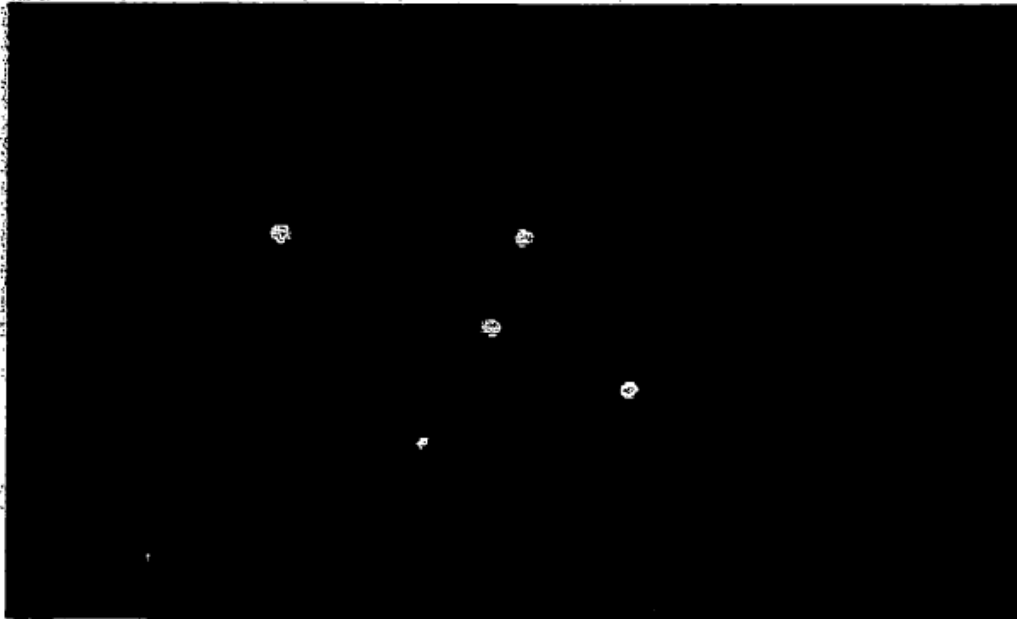


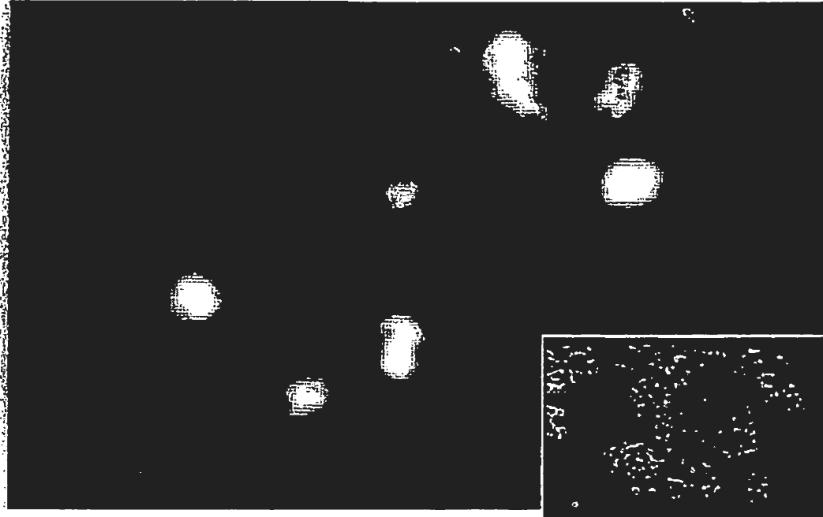
Figura 2

Formación de colonias en agar blando y formación de tumor en ratones lampiños



Células adherentes

Figura 3 a



Células privadas de adhesión

Figura 3b



Células adherentes

Figura 4 a



Células privadas de adhesión

Figura 4 b

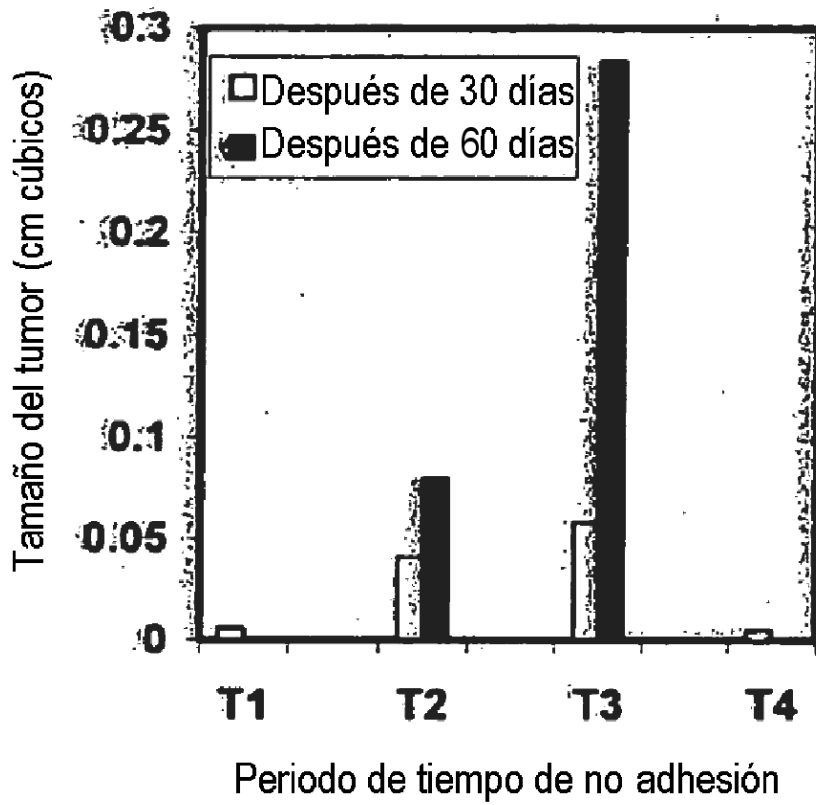
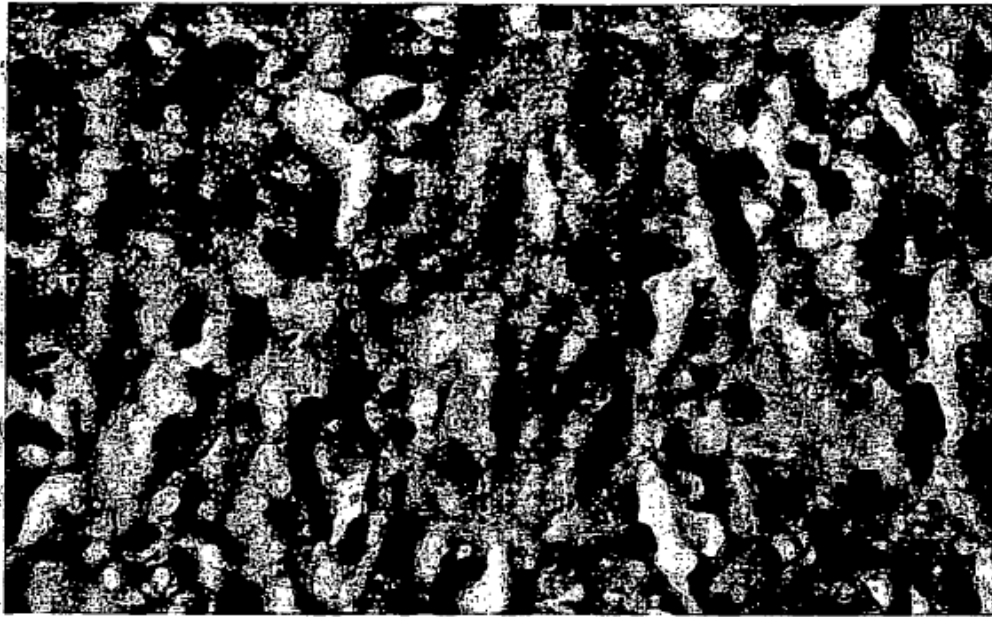
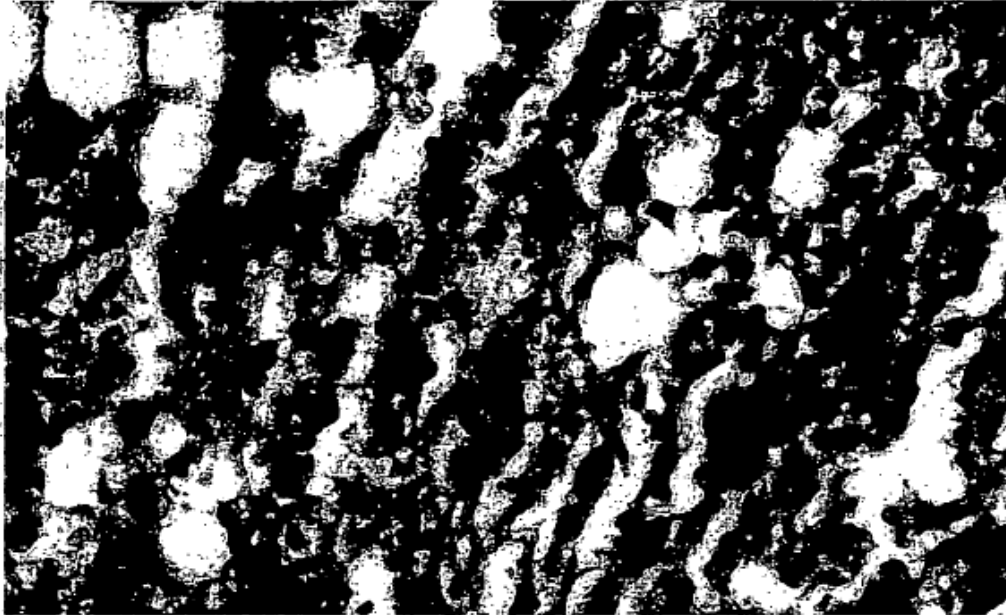


Figura 4c



Tumor

Figura 5 a



Pulmón

Figura 5 b