

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 740 399**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/6886 (2008.01)

C12N 5/09 (2010.01)

A01K 67/027 (2006.01)

A61K 31/46 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.03.2012 PCT/US2012/028546**

87 Fecha y número de publicación internacional: **13.09.2012 WO12122499**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.03.2012 E 12755544 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2683643**

54 Título: **Líneas de células de cáncer de próstata, firmas genéticas y usos de estas**

30 Prioridad:

09.03.2011 US 201161450767 P

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

05.02.2020

73 Titular/es:

**PESTELL, RICHARD G. (100.0%)
Jefferson Kimmel Cancer Center, 233 South 10th
Street Suite 1050
Philadelphia, PA 19107, US**

72 Inventor/es:

PESTELL, RICHARD G.

74 Agente/Representante:

RIZZO , Sergio

ES 2 740 399 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

Líneas de células de cáncer de próstata, firmas genéticas y usos de estas

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 **[0001]** Se proporcionan métodos y composiciones para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer, incluido el cáncer de próstata. En particular, se proporcionan métodos y composiciones útiles para el diagnóstico, la investigación, la estratificación del tratamiento y el tratamiento del cáncer de próstata. También se proporcionan células y mamíferos transgénicos no humanos que se pueden utilizar en esos métodos.

DECLARACIÓN SOBRE I+D FINANCIADO POR EL GOBIERNO FEDERAL

10 **[0002]** La presente invención se llevó a cabo con apoyo gubernamental con las subvenciones n.º RQ1CA70896, R01CA75503, R01 CA86072, P30CA56036 y R01CA132115-02 concedidas por el National Institutes of Health (NIH, por sus siglas en inglés). El gobierno posee ciertos derechos sobre la invención.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15 **[0003]** El cáncer es un problema de salud importante en todo el mundo. Aunque se han realizado avances en la detección y el tratamiento del cáncer, actualmente no se dispone de ninguna vacuna u otro método universalmente satisfactorio para su prevención y/o tratamiento. Los tratamientos actuales, que se basan en general en una combinación de quimioterapia o cirugía y radiación, continúan siendo inadecuados en muchos pacientes.

20 **[0004]** El cáncer de próstata, por ejemplo, es un problema de salud importante para los hombres en los Estados Unidos de América y en todo el mundo. Aunque se han realizado avances en la detección y el tratamiento de la enfermedad, el cáncer de próstata sigue siendo una causa importante de muerte por cáncer en los hombres, que afecta a más de 221 000 hombres en los Estados Unidos de América cada año. Para los hombres de América del Norte, las probabilidades de contraer cáncer de próstata a lo largo de la vida son ahora del 19,6 %, con un riesgo de muerte del 4,6 %. El cáncer de próstata fue la causa de aproximadamente 250 000 muertes en todo el mundo en 2009.

25 **[0005]** Actualmente no se dispone de ninguna vacuna u otro método universalmente satisfactorio para la prevención o el tratamiento del cáncer de próstata. El control de la enfermedad se basa en la actualidad en una combinación de diagnóstico precoz (mediante pruebas rutinarias de antígeno prostático específico («PSA», por sus siglas en inglés)) y tratamiento agresivo, que puede incluir uno o más de entre una variedad de tratamientos tales como cirugía, radioterapia, quimioterapia y terapia con hormonas. El curso del tratamiento de un cáncer de próstata particular a menudo se selecciona en función de una variedad de parámetros de pronóstico, entre los que se incluye un análisis de histología y propagación de la enfermedad. Sin embargo, el uso de PSA, que es el estándar actual de detección, da lugar a decisiones de tratamiento poco satisfactorias, puesto que la prueba de PSA presenta índices altos de falsos positivos y falsos negativos. En 2009 se realizaron en Estados Unidos aproximadamente 45 millones de PSA, con una especificidad de aproximadamente el 27 %. El año pasado se llevaron a cabo en Estados Unidos aproximadamente 1 millón de biopsias de próstata, en función de un PSA elevado, a partir de las que se identificaron 250 000 tumores. La elevada mortalidad observada en los pacientes de cáncer de próstata indica que se necesitan mejoras en el tratamiento, el diagnóstico y la prevención de la enfermedad.

30

35

40 **[0006]** Otro factor que complica el uso de la prueba de PSA es que las recomendaciones de los médicos para la detección del PSA varían. Algunos defienden una revisión anual en hombres mayores de 50 años, y otros aconsejan a los hombres con un mayor riesgo de contraer cáncer de próstata que empiecen las revisiones a los 40 o 45 años. Sin embargo, otros alertan sobre las revisiones rutinarias. Normalmente, un nivel de PSA por debajo de 4,0 ng/ml se considera normal. Sin embargo, el nivel de PSA referenciado parece arbitrario e inútil según dos informes, uno de Thompson IM *et al.* ("Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or = 4.0 ng per milliliter," *New England Journal of Medicine* 2004, 350(22), 2239-2246) y otro de Smith DS *et al.* ("The early detection of prostate carcinoma with prostate specific antigen: The Washington University experience," *Cancer* 1997, 80(9), 1853-1856). Según Thompson IM *et al.* se diagnosticó cáncer de próstata en un 15,2 % de los hombres con un nivel de PSA inferior o igual a 4,0 ng/ml. El quince por ciento de esos hombres, o aproximadamente el 2,3 por ciento del total, tuvo cánceres de grado alto. Según Smith DS *et al.*, del 25 al 35 por ciento de los hombres con un nivel de PSA entre 4,1 y 9,9 ng/ml y que se sometieron a una biopsia de próstata tuvieron cáncer de próstata, mientras que del 65 al 75 por ciento restante no tuvo cáncer de próstata. Por tanto, no existe un nivel de PSA normal o anormal específico.

45

50

55 **[0007]** Además, los mecanismos moleculares que contribuyen a la recurrencia y la resistencia a la terapia del cáncer de próstata no se entienden bien. La terapia de ablación androgénica da lugar a un índice de respuesta inicial del 60 % al 80 % (véase Scher, H. I., y Sawyers, C. L., *J Clin Oncol* 2005, 23, 8253-8261). No obstante, la mayoría de los pacientes que se someten a una terapia antagonista de andrógeno recaen posteriormente. El diagnóstico precoz puede proporcionar una oportunidad para la cirugía curativa. Sin embargo, ~ 30 % de los

hombres que reciben una prostatectomía radical recaen, debido a una enfermedad micrometastática. Por lo tanto, se necesitan intervenciones médicas que puedan detectar y/o prevenir los impulsores moleculares de malignidad metastásica en estadios tempranos de la enfermedad.

SUMARIO DE LA INVENCION

5 **[0008]** Se proporciona una línea de células de cáncer de próstata de mamífero que comprende al menos una o más de entre un conjunto de células epiteliales primarias de mamífero que han sido infectadas con un vector retroviral que porta un oncogén. El oncogén puede seleccionarse de entre el grupo consistente en c-Myc, Ha-Ras, NeuT, c-Src y combinaciones de estos y en el que se expresa dicho oncogén o combinación de genes. La línea de células de cáncer de próstata de mamífero puede incluir cualquier célula de mamífero adecuada, incluyendo células epiteliales murinas primarias. Las células epiteliales primarias de mamífero pueden derivarse de cualquier mamífero inmune competente, incluidos roedores inmunes competentes, incluidos ratas y ratones.

[0009] También se proporciona un modelo animal de cáncer que comprende un mamífero inmune competente al que se le implantó una línea de células cancerosas transformada con uno o más de entre un conjunto de oncogenes seleccionados de entre el grupo consistente en c-Myc, Ha-Ras, NeuT, c-Src y combinaciones de estos.

15 **[0010]** Un ratón transgénico inmunocompetente creado utilizando la línea de células de cáncer de próstata de mamífero puede desarrollar un tumor de próstata capaz de producir una firma genética molecular detectable en función de un nivel de expresión de uno o más de un conjunto de oncogenes seleccionados de entre el grupo consistente en c-Myc, Ha-Ras, NeuT, c-Src y combinaciones de estos.

20 **[0011]** También se proporciona un método para la producción *in vitro* de células epiteliales primarias de mamífero inmortalizadas, comprendiendo el método la infección de células epiteliales primarias de mamífero con un vector retroviral que porta un oncogén seleccionado de entre el grupo consistente en c-Myc, Ha-Ras, NeuT, c-Src y combinaciones de estos para proporcionar células infectadas, donde dichas células epiteliales primarias de mamífero pueden infectarse por dicho vector retroviral y en condiciones por las que los c-Myc, Ha-Ras, NeuT, c-Src y combinaciones de estos se expresan en dichas células infectadas.

25 **[0012]** También se proporciona un método para el diagnóstico de un cáncer de próstata, comprendiendo el método: (a) proporcionar una muestra de prueba biológica de un sujeto aquejado de un cáncer de próstata o que se sospecha que tiene cáncer de próstata o que está en riesgo de desarrollar cáncer de próstata; (b) determinar un nivel de al menos un marcador biológico o una firma genética molecular en función de una actividad o patrón de expresión génica de uno o más de un conjunto de genes en la muestra de prueba, donde el uno o más conjuntos de genes se seleccionan de entre el grupo consistente en c-Myc, Ha-Ras, NeuT, c-Src y combinaciones de estos; (c) comparar el nivel de dicho al menos un marcador biológico o dicha firma genética molecular en dicha muestra de prueba con el nivel del marcador biológico o el nivel de la firma genética molecular en una muestra control, donde un nivel elevado del marcador biológico o de la firma genética molecular en dicha muestra de prueba con respecto al nivel del marcador biológico o de la firma genética molecular en dicha muestra control es un indicador de diagnóstico de la presencia de cáncer de próstata en dicho sujeto.

35 **[0013]** Un método para la clasificación de un tumor cancerígeno, incluido un tumor de próstata, puede comprender: (a) proporcionar una muestra de tumor cancerígeno o de tumor de próstata; (b) detectar una firma genética molecular derivada de la actividad o patrón de expresión génica de uno o más de un conjunto de genes en la muestra, donde los genes se seleccionan de entre el grupo consistente en c-Myc, Ha-Ras, NeuT, c-Src y combinaciones de estos; y (c) clasificar el tumor de próstata como perteneciente a una subclase de tumores en función de los resultados de la etapa de detección (b).

40 **[0014]** Se proporciona, además, un método de estratificación de un sujeto que presenta un tumor cancerígeno, incluido un tumor de próstata, para un ensayo clínico, comprendiendo el método: (a) proporcionar una muestra derivada de un sujeto que presenta el tumor cancerígeno o el tumor de próstata; (b) detectar una firma genética molecular derivada de la actividad o patrón de expresión génica de uno o más de un conjunto de genes en la muestra, donde los genes se seleccionan de entre el grupo consistente en c-Myc, Ha-Ras, NeuT, c-Src, ErbB2 y combinaciones de estos; y (c) estratificar el sujeto para un ensayo clínico en función de los resultados de la etapa de detección.

45 **[0015]** Un método para la selección de un tratamiento para un sujeto que presenta un tumor de próstata puede comprender: (a) proporcionar una muestra derivada de un sujeto que presenta un tumor de próstata; (b) detectar una firma genética molecular derivada de una actividad o patrón de expresión génica de uno o más de un conjunto de genes en la muestra, donde los genes se seleccionan de entre el grupo consistente en c-Myc, Ha-Ras, NeuT, c-Src y combinaciones de estos; y (c) seleccionar un tratamiento en función de los resultados de la etapa de detección.

50 **[0016]** También se proporciona una célula no natural producida por la transformación de un célula con uno o más oncogenes exógenos, permitiendo que la célula se divida al menos una vez, donde la célula es una célula de mamífero transformada por un vector que contiene el uno o más oncogenes exógenos, donde el uno o más

oncogenes exógenos se seleccionan de entre el grupo consistente en c-Myc, Ha-Ras, NeuT, c-Src y combinaciones de estos.

5 **[0017]** Se ha descubierto que la transformación con oncogén de las células epiteliales de la próstata induce células metastásicas asociadas a una expresión aumentada de receptor de quimioquina tipo 5 ("CCR5") y sus ligandos (CCL5, CCL8, CCL7). El receptor CCR5 es funcionalmente relevante para la metástasis ósea, como lo demuestra la reducción de metástasis con el antagonista de CCR5 Maraviroc oral diario.

[0018] Según un primer aspecto de la invención, se proporciona un antagonista de CCR5 para utilizarse en la inhibición de la metástasis de un cáncer susceptible de tratamiento en un sujeto inmunocompetente con riesgo de desarrollar metástasis de cáncer, donde el antagonista de CCR5 es maraviroc o viciviroc.

10 **[0019]** Los modos de realización de la invención se describen mediante las reivindicaciones dependientes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0020]

La figura 1 ilustra líneas de PEC transducidas por oncogén que forman colonias en agar disuelto;

15 La figura 2 ilustra las aberraciones del número de copias en las cuatro líneas celulares de oncogén evaluadas por matriz CGH;

La figura 3 ilustra líneas de células epiteliales de próstata que crecen en ratones inmunes competentes;

La figura 4 ilustra tumores de células epiteliales de la próstata transformadas con oncogén con metástasis al pulmón;

La figura 5 ilustra un agrupamiento jerárquico de expresión génica de micromatriz;

20 La figura 6 ilustra firmas de oncogén específico de c-Myc- y Ha-Ras en tumores de próstata que se conservan en otros tejidos;

La figura 7 ilustra correlatos de expresión génica de línea de células de cáncer de próstata transformadas con oncogén con supervivencia sin recurrencia; y

25 La figura 8 ilustra correlatos de expresión génica de líneas de células de cáncer de próstata transformadas con oncogén con supervivencia sin recurrencia;

La figura 9 ilustra características histológicas de adenocarcinoma de próstata poco diferenciado;

La figura 10 ilustra la mejora con Src de la invasión de Matrigel en 3D de líneas de células de cáncer de próstata isogénicas, donde:

30 La figura 10A ilustra un ensayo de heridas de migración celular que muestra heridas,
La figura 10B ilustra la cuantificación de cierre para N=3 experimentos separados,
La figura 10C ilustra el ensayo de invasión en 3D utilizando líneas de células de cáncer de próstata en matrigel, y
La figura 10D ilustra distancias medias de invasión \pm EEM de 3 experimentos independientes para las líneas de PEC (PEC-NeuT, PEC-Ras y PEC-Src);

35 La figura 11 ilustra tumores de línea de células de cáncer de próstata isogénica que son vasculares, donde:

La figura 11A ilustra el crecimiento tumoral subcutáneo en ratones desnudos NCR, cuantificado durante 3 semanas después de la inoculación subcutánea de 1×10^5 células para cada una de las 3 líneas utilizando flujo de fotones normalizado para cuantificar el volumen del tumor,

40 La figura 11B ilustra tinción inmunohistoquímica para el factor von Willebrand (WF) que muestra la vascularidad de las líneas con tinción de VWF mejorada de la línea Ras;

La figura 12 ilustra líneas de cáncer de próstata que desarrollan metástasis. Los resultados de un experimento en el que se inyectaron líneas de PEC transducidas con vectores que expresan la proteína de fusión Luc2-rojo tomate en el ventrículo de ratones FVB y se cuantificó la señal bioluminiscente *in vivo* semanalmente, se presentan de la siguiente manera:

45 La figura 12A ilustra imágenes de bioluminiscencia representativas del cuerpo total de dos semanas después de la inyección intracardíaca de células epiteliales de la próstata,
La figura 12B ilustra imágenes representativas de metástasis cerebral en ratones después de la inyección intracardíaca de las líneas de cáncer de próstata isogénicas,

La figura 12C ilustra la cuantificación (media \pm EEM, n=6) de imágenes de bioluminiscencia (BLI, por sus siglas en inglés) mostrada como proporción de ratones con tumores,

La figura 12D ilustra el flujo de protones total medio como medida de carga de tumor cerebral metastásico para cada una de las líneas isogénicas,

5 La figura 12E ilustra la tinción de hematoxilina eosina («H&E») de la metástasis cerebral formada después de 2 semanas de inyección intracardiaca de PEC-Src y PEC-NeuT y la tinción de citoqueratina 14 («CK14») que corrobora la presencia de células epiteliales de próstata dentro del cerebro;

La figura 13 ilustra metástasis hepática de líneas celulares de tumor de próstata. Los resultados de un experimento en el que se inyectaron líneas de PEC isogénicas que expresan la proteína de fusión Luc2-rojo tomate en el ventrículo de los ratones FVB y la señal bioluminiscente *in vivo* se presentan de la siguiente manera:

La figura 13A ilustra el porcentaje de ratones con tumores hepáticos,

La figura 13B ilustra el tamaño del tumor determinado por flujo de fotones,

La figura 13C ilustra imágenes representativas de ratones que muestran metástasis hepática,

La figura 13D ilustra el porcentaje de ratones con tumores renales,

La figura 13E ilustra el tamaño de los tumores renales mediante flujo de fotones, y

La figura 13F ilustra imágenes representativas de metástasis renal;

La figura 14 ilustra líneas de células de cáncer de próstata isogénicas que desarrollan metástasis ósea osteolítica:

La figura 14A ilustra imágenes representativas *in vivo* de ratones FVB que se sometieron a una inyección intracardiaca de líneas de PEC que expresan proteína de fusión Luc2-rojo tomate y se cuantificó la señal bioluminiscente *in vivo*,

La figura 14B ilustra la cuantificación (media \pm EEM, n=6) de imágenes de bioluminiscencia (BLI, por sus siglas en inglés) como proporción de ratones con tumores, y

La figura 14C ilustra el tamaño de la masa de los tumores en flujo de fotones;

La figura 15 ilustra que el Src mejora la metástasis ósea del cáncer próstata osteolítico. Los resultados de un experimento en el que ratones FVB desarrollaron lesiones óseas osteolíticas 2 semanas después de la inyección intracardiaca de PEC-Src se presentan de la siguiente manera:

La figura 15A ilustra que la zona tumoral en los huesos aumentó considerablemente en el grupo PEC-Src, en comparación con PEC-Ras y PEC-NeuT,

La figura 15B ilustra rayos X representativos antes (t0) y 14 días (t14) después de la inyección intracardiaca de células,

La figura 15C ilustra tinción de fosfatasa ácida tartrato-resistente («TRAP», por sus siglas en inglés), que corrobora la presencia de osteoblastos (flechas) en la interfaz hueso-tumor,

La figura 15D ilustra tinción de H&E de metástasis ósea formada con posterioridad,

La figura 15E ilustra tinción CK14 y la figura 15F ilustra tinción CK8, y ambas corroboran la presencia de células epiteliales dentro del hueso;

La figura 16 ilustra líneas de células de cáncer de próstata osteolíticas que expresan la función de los receptores CCL5 y osteopontina («OPN»):

Las figuras 16A-16D ilustran un análisis de clasificador de células activadas por fluorescencia («FACS», por sus siglas en inglés) de expresión de CCR5 en líneas de PEC,

Las figuras 16E y 16F ilustran ensayos de invasión de Matrigel de la línea de PEC-Src llevados a cabo utilizando OPN como ligando de CD44 y CCL5 como ligando de CCR5, y

La figura 16G ilustra invasión de Matrigel de la línea de PEC-Src cuantificada como media + EEM,

y La figura 16F ilustra la expresión génica del ligando y el receptor de quimioquina de las líneas de células de tumor de próstata en cultivo de tejidos, y

La figura 16G ilustra una abundancia relativa de ligandos y receptores de citoquina después de la implantación subcutánea, en comparación con la expresión en cultivo de tejidos;

La figura 17 ilustra antagonistas de CCR5 que bloquean la metástasis de cáncer de próstata osteolítico espinal. Los resultados de un experimento en el que se inyectaron líneas de PEC transducidas con vectores que expresan la proteína de fusión Luc2-rojo tomate en el ventrículo de ratones FVB y se cuantificó la señal bioluminiscente *in vivo* después de 2 semanas, se muestran en las figuras 16A-16D:

La figura 17A ilustra ejemplos representativos de ratones de cada grupo (los ratones se trataron con maraviroc oral (8 mg/kg) o control),

La figura 17B ilustra flujo de fotones como un análisis volumétrico de masa tumoral total,

La figura 17C ilustra la masa ósea de las extremidades inferiores de los ratones (Los datos son media + EEM para N=8 ratones independientes en cada grupo, P < 0,05); y

La figura 17D muestra imágenes de rayos X representativas de la masa ósea de las extremidades inferiores de los ratones.

5 Las figuras 18A-18H ilustran imágenes de flurina- 18, fluoruro de sodio («F- 18-NaF») correlacionadas con un análisis de rayos X que demostró la presencia de metástasis espinal;

Las figuras 19A y 19B muestran que un tratamiento oral diario con Maraviroc redujo la metástasis espinal en > 90 %; y

La figura 20 ilustra datos de la micromatriz de la línea de células de tPEC.

10 DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0021] A continuación, se describirá el presente objeto de forma más completa con referencia a las figuras y ejemplos adjuntos, en los que se muestran modos de realización representativos. Sin embargo, el presente objeto puede implementarse de diferentes formas y no debe interpretarse como limitado a los modos de realización expuestos en el presente documento. En su lugar, estos modos de realización se proporcionan para describir y
15 capacitar a un experto en la materia. A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto en la materia a la que pertenece el objeto.

I. Modelos animales y líneas celulares:

[0022] Los nuevos tratamientos para enfermedades, tales como el cáncer y, en particular, el cáncer de próstata, requieren nuevos regímenes de pruebas en animales. Estos regímenes de pruebas han estado limitados por la
20 carencia de líneas de células de cáncer de próstata que puedan implantarse en animales inmunes competentes (o «inmunocompetentes»). Esto resulta importante puesto que el sistema inmunitario desempeña un papel importante en la aparición y la progresión del cáncer de próstata humano. Para detectar nuevos fármacos útiles para el tratamiento de pacientes con cáncer de próstata, es necesario desarrollar líneas de células de cáncer de próstata
25 que puedan estudiarse en animales inmunes competentes, que reflejen la enfermedad humana mediante histología, y experimenten el mismo tipo de comportamiento *in vivo*, incluida la metástasis a los pulmones y a los huesos, como sucede en la enfermedad humana.

[0023] Se dan a conocer las líneas de células cancerosas que pueden implantarse en animales inmunes competentes, o inmunocompetentes, incluidos los animales humanos y no humanos, incluidos los mamíferos.
30 Algunos mamíferos no humanos incluyen, por ejemplo, roedores, como ratas, cobayas y ratones, y animales de granja como cerdos, ovejas, cabras, caballos y ganado.

[0024] Puesto que cualquier tipo de célula en el cuerpo puede ser una fuente de cáncer, se puede utilizar cualquier tipo de línea de célula cancerosa adecuada. Un tipo adecuado de cáncer incluye carcinoma (cáncer de las células
35 epiteliales), sarcoma (cáncer de los huesos, músculos u otros tejidos conjuntivos), linfoma (cáncer del sistema linfático), leucemia (cáncer de las células sanguíneas o de las células precursoras de la sangre) y melanoma (cáncer de las células que proporcionan pigmentos).

[0025] Se proporciona una línea de células de cáncer de próstata, en la que la línea de células de próstata comprende al menos uno o más de un conjunto de células epiteliales primarias de mamífero que han sido
40 infectadas con un vector retroviral que porta un oncogén seleccionado de entre el grupo consistente en c-Myc, Ha-Ras, NeuT, c-Src y combinaciones de estos, y donde se expresan dicho oncogén o combinación de genes.

[0026] En un modo de realización, se proporciona una línea de células de cáncer de próstata de ratón, donde las células de próstata murinas se transducen con un oncogén se seleccionan de entre el grupo consistente en c-Myc,
45 Ha-Ras, NeuT, c-Src y combinaciones de estos. Se puede obtener una línea de células de próstata de ratón adecuada infectando las células epiteliales murinas primarias con un vector retroviral que porta el oncogén en condiciones que permiten que el oncogén se exprese en las células epiteliales primarias murinas.

[0027] Los modelos de ratón inmunocompetentes transgénicos de cánceres humanos, por ejemplo, presentan el potencial de reflejar mejor los cánceres humanos que los modelos de xenoinjertos, puesto que, entre otras cosas,
50 los ratones transgénicos forman tumores *in situ*, (es decir, en un entorno más similar al tumor humano y en el establecimiento de un sistema inmunitario normal). Por tanto, los mamíferos inmunocompetentes no humanos pueden modificarse para expresar uno o más de los oncogenes descritos en el presente documento, incluidos c-Myc, Ha-Ras, NeuT, c-Src o combinaciones de estos, y para desarrollar cáncer.

[0028] Existen diversas ventajas para utilizar modelos de ratón transgénicos de cáncer humano en la investigación. Por ejemplo, la tomografía computarizada de rayos X de animales pequeños (microCT) podría utilizarse para
55 monitorizar la progresión del tumor de manera relativamente económica y también como un método tridimensional muy cuantitativo para visualizar vasos sanguíneos y angiogénesis preclínicamente. Es posible utilizar este método

para conseguir una evaluación rápida y precisa de la vascularidad durante los ensayos terapéuticos preclínicos en ratones vivos. La evaluación de tumores con microCT permite una representación visual cualitativa rápida de los datos, así como un análisis cuantitativo del volumen sanguíneo del tumor, la densidad de los vasos, el calibre de los vasos, el grado de ramificación y la tortuosidad utilizando el análisis de segmentación.

5 **[0029]** Ejemplos de ratones inmunocompetentes adecuados incluyen (exogámicos CD1, Charles River Laboratories, St. Constant, PQ), C57Bl/6J (B6), C57Bl/6x 129/J Fl (Fl, Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME), FVB/N, C57BV6, BALB/c y ND4.

10 **[0030]** Se pueden utilizar los ratones FVB/N para modificar los modelos de ratón transgénicos. Los ratones FVB/N son adecuados para la mayoría de los experimentos transgénicos y los análisis genéticos contemplados y/o descritos en el presente documento. La línea endogámica FVB/N se caracteriza por un rendimiento reproductivo vigoroso y camadas muy grandes y los óvulos de FVB/N fecundados contienen pronúcleos grandes y prominentes, que facilitan la microinyección de ADN.

15 **[0031]** Un ratón transgénico inmunocompetente creado utilizando la línea de células de cáncer de próstata de mamífero descrita en el presente documento desarrolla un tumor de próstata capaz de producir una firma genética molecular detectable en función de un nivel de expresión de uno o más de un conjunto de oncogenes seleccionados de entre el grupo consistente en c-Myc, Ha-Ras, NeuT, c-Src y combinaciones de estos.

20 **[0032]** La metástasis es la principal causa de muerte en los pacientes de cáncer. Los tratamientos anticáncer quimioterapéuticos actuales utilizan fármacos citotóxicos, hormonales o inmunomoduladores destinados a disminuir el número de células cancerosas en el cuerpo del paciente. Sin embargo, hay cada vez más pruebas que sugieren que la mayoría de las células metastásicas son resistentes a los fármacos anticáncer y, por tanto, los fármacos actualmente disponibles no detienen de forma efectiva la propagación de las células cancerosas a otros tejidos u órganos. En la actualidad, no existe un método efectivo para tratar la mayoría de los tumores metastásicos, a pesar de las numerosas y diversas innovaciones terapéuticas en el campo terapéutico del cáncer.

25 **[0033]** Un «vector» o «constructo» se refiere a una macromolécula o complejo de moléculas que comprenden un polinucleótido que se ha de suministrar a una célula huésped, ya sea *in vitro* o *in vivo*. El polinucleótido que se ha de suministrar puede comprender una secuencia de interés para la terapia génica. Los vectores incluyen, por ejemplo, transposones y otros elementos móviles de sitio específico, vectores virales, p. ej., adenovirus, virus adenoasociado (AAV), poxvirus, papilomavirus, lentivirus, virus herpes, vectores de retrovirus y foamivirus, e incluyen virus pseudotipados, liposomas y otros complejos que contienen lípidos, y otros complejos macromoleculares capaces de mediar el suministro de un polinucleótido a una célula huésped, por ejemplo, partículas de oro recubiertas de ADN, complejos de polímero-ADN, complejos de liposoma-ADN, complejos de liposoma-polímero-ADN, complejos de virus-polímero-ADN, por ejemplo, complejos de adenovirus-polisina-ADN, y complejos de anticuerpo-ADN. Los vectores también pueden comprender otros componentes o funcionalidades que modulan de forma adicional el suministro de genes y/o la expresión de genes, o que proporcionan de otro modo propiedades beneficiosas a las células a las que se introducirán los vectores. Estos otros componentes incluyen, por ejemplo, componentes que influyen en la unión o el direccionamiento a las células (incluidos los componentes que median en la unión del tipo celular o tejido específico); componentes que influyen en la absorción del ácido nucleico del vector por la célula; componentes que influyen en la localización de polinucleótido dentro de la célula después de la absorción (como los agentes que median en la localización nuclear); y componentes que influyen en la expresión del polinucleótido. Estos componentes también podrían incluir marcadores, como marcadores detectables y/o seleccionables que se pueden utilizar para detectar o seleccionar células que han absorbido y están expresando el ácido nucleico suministrado por el vector. Estos componentes se pueden proporcionar como una característica natural del vector (como el uso de determinados vectores virales que presentan componentes o funcionalidades que median en la unión y la absorción), o se pueden modificar los vectores para proporcionar estas funcionalidades. En la técnica se conoce una gran variedad de estos vectores y se encuentran generalmente disponibles. Cuando se mantiene un vector en una célula huésped, las células pueden replicar el vector de forma estable durante la mitosis como una estructura autónoma, incorporada dentro del genoma de la célula huésped, o mantenida en el núcleo o el citoplasma de la célula huésped.

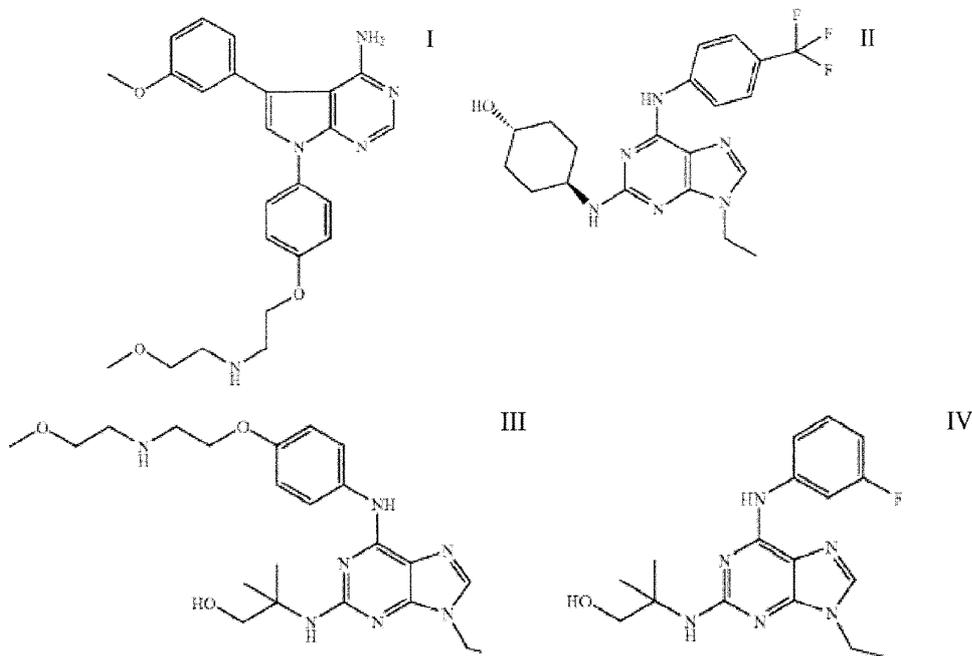
50 **[0034]** El cáncer de próstata humano se ha incorporado a la composición genética y las firmas que reflejan la señalización oncogénica. Las líneas celulares descritas en el presente documento reflejan de forma ventajosa uno o más de estos sistemas de señalización oncogénicos, facilitando de esta manera, por ejemplo, la prueba de compuestos de oncogén específicos o terapias basadas en ácidos nucleicos. En particular, las líneas de células de cáncer de próstata según se proporcionan en el presente documento son útiles para la prueba y/o la detección de compuestos de oncogén específicos o terapias basadas en ácidos nucleicos.

55 **[0035]** Los ejemplos de inhibidores de oncogén específicos incluyen inhibidores para oncogenes c-Myc, Ha-Ras c-Src y ErbB2. Varios agentes anticancerígenos adecuados dirigidos a los ErbB, que se encuentran en desarrollo o uso clínico, incluidos los que pertenecen a las categorías de anticuerpos monoclonales quiméricos o humanizados contra la familia de ErbB y los inhibidores de tirosina quinasa de ErbB de molécula pequeña. Los anticuerpos monoclonales quiméricos o humanizados incluyen anticuerpos que impiden la activación del receptor

dependiente del ligando y de unión al ligando (p. ej., Cetuximab que se dirige al subdominio III de unión al ligando de ErbB1), anticuerpos que interfieren con la activación del receptor independiente del ligando (p. ej., Trastuzumab que se dirige al subdominio IV de ErbB2), y los anticuerpos que evitan la heterodimerización del receptor (p. ej., el anticuerpo Pertuzumab anti-ErbB2 que se dirige a un área alrededor del bucle de dimerización en el subdominio II de ErbB2). Algunos ejemplos de inhibidores de la tirosina quinasa ErbB de molécula pequeña incluyen dos inhibidores de la tirosina quinasa específicos de ErbB 1, Gefitinib/Iressa y Erlotinib, que han sido aprobados para el tratamiento del cáncer de pulmón de células no pequeñas, y el inhibidor Lapatinib dual de ErbB1/ErbB2, que se comercializa como TYKERB® y está indicado en combinación con capecitabina para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama avanzado o metastásico; y en combinación con letrozol para el tratamiento de mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama metastásico con receptores hormonales positivos que sobreexpresan el HER2.

[0036] Otros inhibidores del receptor ErbB2 incluyen GW-282974 (Glaxo Wellcome PLC), y los anticuerpos monoclonales AR-209 (Aronex Pharmaceuticals Inc. de The Woodlands, Texas, EE. UU.) y 2B-1 (Chiron). Ejemplos de inhibidores de ErbB2 incluyen también los descritos en WO 1998/02434 (publicada el 22 de enero de 1998), WO 1999/35146 (publicada el 15 de julio de 1999), WO 1999/35132 (publicada el 15 de julio de 1999), WO 1998/02437 (publicada el 22 de enero de 1998), WO 1997/13760 (publicada el 17 de abril de 1997), WO 1995/19970 (publicada el 27 de julio de 1995), la patente estadounidense n.º 5,587,458 (concedida el 24 de diciembre de 1996), y la patente estadounidense n.º 5,877,305 (concedida el 2 de marzo de 1999). Los inhibidores del receptor ErbB2 también se describen en la solicitud provisional estadounidense n.º 60/117,341, presentada el 27 de enero de 1999, y en la solicitud provisional estadounidense n.º 60/117,346, presentada el 27 de enero de 1999.

[0037] Algunos ejemplos de inhibidores de proteínas tirosina quinasa c-Src útiles incluyen, pero sin carácter limitativo, los compuestos dados a conocer de forma genérica y específica en WO 1996/10028, WO 1997/28161, WO 1997/32879 y WO1997/49706, incluidos los pertenecientes a las clases de estructura de pirrolopirimidinas, especialmente pirrolo[2,3-d]pirimidinas, purinas, pirazopirimidinas, especialmente pirazo[3,4-d]pirimidinas, pirazopirimidinas, especialmente pirazo[3,4-d]pirimidinas y piridopirimidinas, especialmente pirido[2,3-d]pirimidinas. Ejemplos de compuestos incluyen compuestos de las fórmulas I-IV a continuación.



[0038] Los compuestos anteriores se pueden preparar y administrar como se describe en los documentos citados. El compuesto de fórmula I puede prepararse y formularse como se describe en WO 1996/10028. El compuesto de fórmula II y su preparación se dan a conocer en el ejemplo 11 lc3 de WO 1997/16452. El compuesto de fórmula IV puede prepararse en analogía de estos. Los dos últimos compuestos pueden formularse como se describe en WO 1997/16452. El compuesto de fórmula III se analiza en R. Gamse *et al* en J. Bone Miner. Res. 14 (Supl. 1), 1999, S487.

[0039] Se describen compuestos útiles adicionales (p. ej., PP1) en T. Schindler, F. Sicheri *et al*. en Molecular Cell, 1999 (3), 639, 647; J. M. Hamby *et al*, J. Med. Chem. 40, 1997, 2296- 2303; R. L. Panek *et al*, J. Pharmacol. Exp. Ther. 283, 1997, 1433-1444; y S. R. Klutchko *et al*, J. Med. Chem. 41, 1998, 3276-3292.

[0040] Otros inhibidores de src incluyen S I606, también conocido como bosutinib (de Wyeth) y el compuesto dasatinib, también conocido como Spyrzel (de Bristol-Myers Squibb) que se da a conocer en WO 2000/62778 y la patente estadounidense n.º 6,596,746.

5 **[0041]** Los inhibidores de c-Myc de molécula pequeña incluyen 10074-G5, también conocido como bifenil-2-il-(7-nitrobenzo[1,2,5]oxadiazol-4-ilamina; quarfloxina (también conocida como CX-3543); y 10074-G5, también conocida como bifenil-2-il-(7-nitrobenzo[1,2,5]oxadiazol-4-ilamina. CX-3543 supuestamente suprime la actividad de c-Myc mediante la unión a las estructuras secundarias de cuatro cadenas de ADN cuádruples que regulan la transcripción de oncogenes específicos, incluido el c-Myc.

10 **[0042]** Otros inhibidores de c-Myc incluyen los compuestos dados a conocer en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2007/0203188 (publicada el 30 de agosto de 2007).

15 **[0043]** También se proporciona un método para la producción *in vitro* de células epiteliales de mamífero primarias inmortalizadas, comprendiendo el método la infección de células epiteliales primarias de mamífero con un vector retroviral que porta un oncogén seleccionado de entre el grupo consistente en c-Myc, Ha-Ras, NeuT, c-Src y combinaciones de estos para proporcionar células infectadas, donde dichas células epiteliales primarias de mamífero pueden infectarse por dicho vector retroviral y en condiciones por las que los c-Myc, Ha-Ras, NeuT, c-Src y combinaciones de estos se expresan en dichas células infectadas.

20 **[0044]** Puede utilizarse cualquier sistema de suministro de genes adecuado. Ejemplos particulares de sistemas de suministro de genes adecuados incluyen sistemas de expresión retrovirales y adenovirales. La transferencia genética mediada por retrovirus se utiliza ampliamente para expresar proteínas en una variedad de líneas celulares, incluidas las células hematopoyéticas por una variedad de razones, entre las que se incluyen análisis de sus efectos en la proliferación celular sanguínea, la diferenciación y la función biológica. En particular, el sistema de expresión retroviral (de Clontech Laboratories, Inc) del virus de células madre murinas («MSCV», por sus siglas en inglés) contiene vectores que se optimizan para introducir y expresar genes diana en líneas celulares pluripotentes, incluidas las células hematopoyéticas murinas o humanas, las células madre embrionarias (ES, por sus siglas en inglés) y las células de carcinoma embrionario (EC, por sus siglas en inglés). Ejemplos particulares de sistemas de expresión adenovirales incluyen el sistema de expresión adenoviral ViraPower™ (de Life Technologies), que resulta útil, por ejemplo, para la creación de un adenovirus incapaz de replicarse, que puede utilizarse para suministrar y expresar transitoriamente gen(es) diana de interés en células de mamífero que se dividen o que no se dividen.

30 II. Métodos de uso:

[0045] También se proporciona un método para el diagnóstico de un cáncer de próstata, comprendiendo el método: (a) proporcionar una muestra de prueba biológica de un sujeto aquejado de un cáncer de próstata o que se sospecha que tiene cáncer de próstata o que está en riesgo de desarrollar cáncer de próstata; (b) determinar un nivel de al menos un marcador biológico o una firma genética molecular en función de un patrón de expresión génica en la muestra de prueba que se asocia al diagnóstico del cáncer de próstata; (c) comparar el nivel de dicho al menos un marcador biológico o dicha firma genética molecular en dicha muestra de prueba con el nivel del marcador biológico o el nivel de la firma genética molecular en una muestra control, donde un nivel elevado del marcador biológico o de la firma genética molecular en dicha muestra de prueba con respecto al nivel del marcador biológico o de la firma genética molecular en dicha muestra control es un indicador de diagnóstico de la presencia de cáncer de próstata en dicho sujeto.

[0046] Los especímenes biológicos pueden incluir ácido nucleico derivado del tumor obtenido del paciente. El ácido nucleico puede derivarse del tumor mediante biopsia o de células derivadas del tumor en la orina o proteínas producidas como consecuencia de la firma genética secretada en la sangre de los pacientes.

45 **[0047]** También se proporciona un método para la clasificación de un tumor de próstata, comprendiendo el método: (a) proporcionar una muestra de tumor de próstata; (b) detectar una firma genética molecular derivada de la actividad o patrón de expresión génica de uno o más de un conjunto de genes en la muestra, donde los genes se seleccionan de entre el grupo consistente en c-Myc, Ha-Ras, NeuT, c-Src y combinaciones de estos; y (c) clasificar el tumor de próstata como perteneciente a una subclase de tumores en función de los resultados de la etapa de detección.

50 **[0048]** Se da a conocer, además, un método de estratificación de un sujeto que presenta un tumor cancerígeno, incluido un tumor de próstata, para un ensayo clínico, comprendiendo el método: (a) proporcionar una muestra derivada de un sujeto que presenta el tumor cancerígeno o el tumor de próstata; (b) detectar una firma genética molecular derivada de la actividad o patrón de expresión génica de uno o más de un conjunto de genes en la muestra, donde los genes se seleccionan de entre el grupo consistente en c-Myc, Ha-Ras, NeuT, c-Src, ErbB2 y combinaciones de estos; y (c) estratificar el sujeto para un ensayo clínico en función de los resultados de la etapa de detección.

[0049] Los sujetos pueden estratificarse en subcategorías que se basan en la presencia de una firma genética molecular y/o las vías funcionales unidas a la firma genética molecular.

5 **[0050]** La firma genética molecular puede basarse en una actividad o patrón de expresión génica de uno o más de un conjunto de genes en una muestra de prueba derivada de un sujeto que presenta un tumor cancerígeno, en particular un tumor de cáncer de próstata, donde el uno o más conjunto de genes se seleccionan de entre el grupo consistente en c-Myc, Ha-Ras, NeuT, c-Src y combinaciones de estos.

10 **[0051]** También se proporciona un método para la selección de un tratamiento para un sujeto que presenta un tumor de próstata, comprendiendo el método: (a) proporcionar una muestra derivada de un sujeto que presenta un tumor de próstata; (b) detectar una firma genética molecular derivada de una actividad o patrón de expresión génica de uno o más de un conjunto de genes en la muestra, donde los genes se seleccionan de entre el grupo consistente en c-Myc, Ha-Ras, NeuT, c-Src y combinaciones de estos; y (c) seleccionar un tratamiento en función de los resultados de la etapa de detección (b). (es decir, las terapias basadas en oncogén se proporcionarían en función de la oncofirma en el tumor del paciente)

15 **[0052]** También se da a conocer un célula no natural producida por la transformación de un célula con uno o más oncogenes exógenos, permitiendo que la célula se divida al menos una vez, donde la célula es una célula humana transformada por un vector que contiene el uno o más oncogenes exógenos, donde el uno o más oncogenes exógenos se seleccionan de entre el grupo consistente en c-Myc, Ha-Ras, NeuT, c-Src y combinaciones de estos. La firma podría aplicarse al material genético derivado del cáncer de próstata, es decir, en fluidos biológicos relacionados con la próstata, incluidas la próstata, la orina, la sangre u otras muestras biológicas. La firma también puede aplicarse a otros tipos de cáncer, en particular como se muestra para el cáncer de mama. En el caso de la firma c-Myc, la firma se observa tanto en los tumores de próstata como en los tumores de mama derivados de la expresión transgénica de c-Myc en la glándula mamaria de los ratones transgénicos (figura 7C).

20

25 **[0053]** Se puede identificar un cáncer obteniendo una muestra biológica de un sujeto aquejado de un cáncer de próstata o que se sospecha que tiene cáncer de próstata o que está en riesgo de desarrollar cáncer de próstata y determinando si el material genético de la muestra biológica presenta una firma genética según se describe en el presente documento. La muestra biológica puede derivarse de una biopsia de próstata. De forma alternativa, la muestra biológica se deriva de fluidos biológicos relacionados con la próstata, incluidas la próstata, la orina, la sangre u otras muestras biológicas. El método puede incluir masajear una próstata antes de la obtención de una muestra de orina para la identificación de la firma genética. El método puede incluir otros fluidos según se describe anteriormente.

30

[0054] Los nuevos tratamientos requieren nuevos regímenes de prueba en animales. Estos estudios han estado limitados por la carencia de líneas de células de cáncer de próstata que puedan implantarse en animales inmunes competentes. El sistema inmunitario desempeña un papel importante en la aparición y la progresión del cáncer de próstata humano. Para posibilitar la detección de nuevos fármacos para el tratamiento de pacientes con cáncer de próstata, es necesario desarrollar líneas de células de cáncer de próstata que puedan estudiarse en animales inmunes competentes, que reflejen la enfermedad humana mediante histología, y el mismo tipo de comportamiento *in vivo*, incluida la metástasis a los pulmones y a los huesos, como sucede en la enfermedad humana. Los métodos relacionados con la creación de estas líneas celulares que pueden utilizarse en ratones inmunes competentes se describen en el suplemento 3.

35

40 **[0055]** Las secuencias de oligonucleótidos pueden introducirse en las células como se conoce en la técnica. Se puede utilizar transfección, electroporación, fusión, liposomas, partículas poliméricas coloidales y vectores virales y no virales, así como otros medios conocidos en la técnica, para suministrar las secuencias de oligonucleótidos a la célula. El método de suministro seleccionado dependerá al menos de las células que se han de tratar y de la localización de las células y será conocido por los expertos en la materia. La localización puede conseguirse mediante liposomas, que presentan marcadores específicos en la superficie para dirigir el liposoma, inyectándose directamente en el tejido que contiene las células diana, asociando el depósito en proximidad espacial a las células diana, absorción mediada por receptor específico, vectores virales, o similares. Los oncogenes se pueden introducir en las células mediante transducción o transfección. La transducción puede llevarse a cabo utilizando sistemas de suministro retrovirales y otros sistemas de suministro virales.

45

50 EJEMPLOS

Ratones, cultivo celular, sustancias químicas y reactivos

55 **[0056]** El comité de ética de la Universidad Thomas Jefferson aprobó procedimientos experimentales con ratones transgénicos. Los ratones eran de la cepa FVB. Cultivos de células epiteliales de próstata de ratón se aislaron de glándulas de próstata de ratones macho de 12 semanas y se mantuvieron como se ha descrito previamente [42] y se analizaron después de 25 pases con al menos tres líneas de cada genotipo. La transducción de células mediante vector de expresión retroviral que codifica c-Myc, Ha-Ras, v-Src, NeuT, en el vector pBABE-IRES-GFP, se ha descrito previamente [43, 44].

Ensayos de crecimiento celular.

5 **[0057]** Se sembraron células en placas de 24 pocillos a una concentración de 1×10^4 células/pocillo, cada muestra por triplicado x 7 días. Se cultivaron las células transformadas en medio DMEM con FBS al 10 %, mientras que las células PEC de control se cultivaron en medio de cultivo primario epitelial de próstata. Se recogieron células cada 24 horas, se suspendieron células en 100 μ l de PBS, se agregó un volumen igual de azul de tripán al 0,4 %, tras 5 minutos se contaron las células con el contador de células de recuento automático Countess™ (C10227, Invitrogen Carlsbad, CA).

Formación de colonias en agar disuelto.

10 **[0058]** Se sembraron células (3×10^3 /ml) en agar disuelto al 0,3 % Sigma) en una placa de suspensión (Nalgene Nunc International, Rochester, NY). Se tiñeron las colonias mediante acetato violeta cristal al 0,04 % y se contaron bajo microscopio vertical después de 2 semanas de incubación.

Ensayo I de formación de tumores

15 **[0059]** Se inyectaron subcutáneamente 1×10^6 células en un volumen de 100 μ l en ratones FVB macho de 7~8 semanas. Se mezcló la suspensión de células con Matrigel BD al 20% por volumen (BD Biosciences, Bedford, MA), dando lugar a una concentración de células final de 10^{-7} células/ml. Se midió el crecimiento tumoral con un pie de rey dos veces por semana. Se recogieron las muestras tumorales después de 30 días (salvo los tumores inducidos por NeuT, que se recogieron después de 16 días).

Cultivo celular, transfección, transducción, vectores de expresión

20 **[0060]** Las líneas de PEC (células epiteliales de próstata) transformadas con oncogenes Ha-Ras, v-Src y NeuT se generaron y se transfectaron con un vector lentiviral que contenía el gen luc2 para generar líneas de células cancerosas bioluminiscentes estables. El vector de expresión Luc2-rojo tomate se describió anteriormente (Liu, H., *et al.*, Proc Natl Acad Sci EE.UU. 2010, 107, 18115-18120). Las líneas de PEC isogénicas se mantuvieron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés) complementado con suero bovino fetal (FBS, por sus siglas en inglés) al 10 % y penicilina-estreptomicina al 1 % y se cultivaron en CO2 al 5 % a 37 °C.

Ensayo de cicatrización de heridas

30 **[0061]** Las células se hicieron crecer hasta la confluencia en placas de 12 pocillos en medio DMEM que contenía FBS al 10 %. Se hirieron las monocapas con una punta de micropipeta P10. Se lavaron las células inmediatamente después del marcado con PBS y se añadió DMEM sin suero (16). Se monitorizó la migración celular durante 20 h y se tomaron fotografías a las 9 h, 12 h, 15 h y 20 h utilizando un sistema de microscopio Axiovert 200 Zeiss. Las imágenes se analizaron utilizando el *software* ImageJ.

Análisis de matriz de citoquina

35 **[0062]** Las matrices de citoquinas de ratón moteadas sobre la membrana de nitrocelulosa se obtuvieron de Raybiotech. Se preparó un medio acondicionado cultivando células en DMEM sin suero durante 48 horas. A continuación, se procesaron las membranas según las instrucciones del fabricante para la evaluación de las citoquinas secretadas en el medio acondicionado (véase Katiyar, S. *et al.*, Mol Cell Biol 2007, 27, 1356-1369).

Ensayo II de formación de tumores

40 **[0063]** Se anestesiaron ratones nu/nu macho de 12 semanas mediante exposición a isoflurano al 3 %. Los ratones anestesiados recibieron 1×10^6 células suspendidas en 50 μ l de solución salina fosfatada de Dulbecco sin calcio y magnesio (DPBS) y 50 μ l de membrana basal BD Matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA) por inyección subcutánea debajo de un costado dorsal. La inyección se realizó utilizando una aguja de 27G½. Se siguió la progresión tumoral mediante medición por bioluminiscencia una vez por semana hasta la escisión del tumor según se ha descrito anteriormente (18). Se monitorizaron dorsalmente tres ratones a la vez. Las regiones de interés (ROI, por sus siglas en inglés) de las imágenes visualizadas se dibujaron alrededor de los sitios de tumor o la lesión metastásica y se cuantificaron utilizando el *software* Living Image 3.0. (Caliper Life Sciences). Se recogieron muestras de tumores después de 3 semanas. Todos los experimentos con ratones se llevaron a cabo con la aprobación de la IACUC de la Universidad Thomas Jefferson.

Ensayo de metástasis experimental

50 **[0064]** Se anestesiaron ratones FVB macho de 8 semanas mediante exposición a isoflurano al 3 %. Se inyectaron 2×10^5 células cancerosas suspendidas en 100 μ l de DPBS en el ventrículo izquierdo del corazón del ratón. Las inyecciones se realizaron utilizando una aguja de 30G½ y una jeringa de 1 ml. Para confirmar la presencia de células en la circulación sistémica, se diagnosticó por imágenes a los animales utilizando el sistema IVIS LUMINA XR (Caliper Life Sciences, Hopkinton MA). Se indicó una inyección intracardíaca satisfactoria mediante bioluminiscencia sistémica distribuida por el cuerpo del animal. Los ratones no inyectados correctamente se

retiraron del estudio. Para diagnosticar por imágenes *in vivo* a los ratones, los animales recibieron el sustrato de luciferasa, DLuciferina (Gold Biotechnology), a 15 mg/ml en PBS mediante inyección intraperitoneal de 10 µl de solución madre de luciferina por gramo de peso corporal (recomendación del fabricante) y se anestesiaron mediante exposición a isoflurano al 3 %. A los 10-15 minutos después de la inyección de D-luciferina, se colocó a los animales dentro de la cámara del IVIS Lumina XR (Caliper Life Sciences, Hopkinton MA) y estos recibieron una exposición continua a isoflurano al 2,5 %. Los tiempos de las imágenes van desde 5 segundos (para puntos de tiempo posteriores) hasta 5 minutos (para puntos de tiempo anteriores), dependiendo de la bioluminiscencia de la lesión metastásica. Sólo un ratón se diagnosticó por imágenes ventralmente. Los resultados se analizaron utilizando el *software* Living Image 3.0. Para la BLI *ex vivo*, se diluyó la D-Luciferina en PBS a una concentración final de 300 µg/ml y se utilizó para remojar los órganos recién aislados durante 2 a 3 minutos antes del diagnóstico por imágenes. La IACUC de la Universidad Thomas Jefferson aprobó los experimentos con animales.

Análisis radiográfico de metástasis ósea y CT

[0065] Se monitorizó el desarrollo de la metástasis ósea mediante radiografía con rayos X utilizando IVIS Lumina XR (Caliper Life Sciences). Se anestesió a los ratones, se les dispuso en decúbito prono y se les expuso a rayos X durante 5 min. Se les administró Maraviroc (antagonista de CCR5). Los ratones FVB macho recibieron una dosis oral de Maraviroc (Selleck Chemicals LLC) de 8 mg/kg cada 12 horas desde 5 días antes de la inoculación de las células cancerosas, así como después de la inyección ic hasta la eutanasia. El fármaco se disolvió en agua que contenía DMSO al 5 % e IN HCl al 0,5 %. Se mantuvo a los ratones control con la misma pauta posológica y recibieron la misma inyección de volumen de vehículo.

Ensayo de invasión

[0066] El ensayo de invasión tridimensional se llevó a cabo como se ha citado anteriormente. En resumen, se pipetearon 100 µl de 1,67 mg/ml de colágeno de cola de rata tipo I (BD Biosciences) en la cámara superior de una placa transwell de 24 pocillos con orificios de 8 mm (Corning, Lowell, MA). La placa transwell se incubó a 37 °C durante toda la noche para permitir que el colágeno se solidificara. A continuación, se sembraron 30 000 células en la parte inferior de la membrana transwell y se dejó que se unieran. Se colocó medio de crecimiento sin suero en la parte inferior de la cámara, mientras que se utilizaron 10 µg/ml de osteopontina (R&D System), o 15 ng/ml de CCL5 (R&D System), o FBS al 10 % como atrayente químico en el medio de la cámara superior. Las células se atrajeron entonces químicamente por el filtro a través del colágeno de la parte superior durante tres días. Las células se fijaron en formaldehído al 4 %, se permeabilizaron con Triton-X al 0,2 % en PBS y, a continuación, se tiñeron con 40 mg/ml de yoduro de propidio (PI, por sus siglas en inglés) durante 2 h. Se analizó la fluorescencia mediante secciones confocales (una sección cada 20 µm) a una ampliación de 10x de la parte inferior del filtro utilizando un microscopio confocal invertido Zeiss LSM 510 Meta en las instalaciones de bioimágenes del Kimmel Cancer Center.

Análisis histológico

[0067] Las muestras tumorales y los tejidos blandos se fijaron en paraformaldehído (PFA, Fisher) al 4 % y se procesaron para lecho de parafina, seccionamiento, H&E e inmunohistoquímica (IHC). Los huesos se fijaron en PFA al 4 % a 4 °C durante 72 h, se descalcificaron en EDTA 0,5 M (pH 8) durante 7 días a 4 °C, y se insertaron en parafina (19). La tinción vWF en secciones de tumores la llevó a cabo las instalaciones del centro de patología del KCC. Se llevó a cabo una tinción con CK14 (Covance) PRB-155P y CK8 (clone1E8, Covance) MMS-162P después del desparafinado y la rehidratación sin realizar el tratamiento de recuperación de antígenos en las muestras óseas y cerebrales para distinguir las células epiteliales de próstata basales de las luminales. Se realizó una tinción TRAP (fosfatasa ácida tartrato-resistente) después del desparafinado y la rehidratación tal y como indicaba el fabricante (Sigma-Aldrich) para identificar osteoclastos activos en la superficie entre la lesión metastásica y el hueso compacto (5) (20). Se llevó a cabo el método tetracromo en los huesos para identificar huesos reticulares en las zonas de lesión osteoblástica (5,21). Se realizó una tinción (RV202, Santa Cruz Biotechnology) solo en las muestras cerebrales para distinguir el sarcoma del carcinoma.

Microdissección por captura láser y extracción de ARN

[0068] Se ultracongelaron los cerebros y las piernas completos después de retirar la piel y los músculos en medios de temperatura de corte óptima (compuesto OCT de Tissue Tek) y se almacenaron a -80 °C. Se seccionaron los tejidos en un criostato () y se montaron sobre portaobjetos de membrana NF 1.0 PEN. Se llevó a cabo una LCM utilizando el sistema PALM Microbeam (Carl Zeiss) y el *software* PALM Robo v4.2. Las secciones congeladas se tiñeron con violeta cresil (kit de tinción de LCM, Ambion). La captura se completó en 2 horas desde la etapa de tinción para asegurar la calidad del ARN. El tejido recogido en las tapas adhesivas (Carl Zeiss) se almacenó directamente a -80 °C con la tapa hacia abajo. Las células capturadas se lisaron y se extrajo el ARN según las recomendaciones del fabricante (RNeasy Micro Kit Qiagen). (Véase Bos, P. D. *et al.* Nature 2009, 459, 1005-1009; y Wang, W. Z. *et al.* BMC molecular biology 2009, 10, 69). Se comprobó la integridad del ARN utilizando el bioanalizador 2100 (Agilent) en las instalaciones de ácidos nucleicos del KCC. La evaluación de la calidad del ARN se basa en el número de integridad del ARN (RIN, por sus siglas en inglés).

Métodos de análisis de micromatriz

[0069] Procesamiento previo y análisis de expresión diferencial. Los datos de las micromatrices se procesaron previamente mediante la corrección del fondo, la normalización de los cuantiles y el resumen se llevaron a cabo sobre las micromatrices de expresión génica Mouse Gene 1.0 ST utilizando el flujo de trabajo del análisis robusto de múltiples chips (RMA, por sus siglas en inglés) en la Affymetrix Expression Console versión 1.1 [Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA]. Se identificaron los genes expresados diferencialmente para cada una de las cuatro líneas celulares de sobreexpresión, realizando comparaciones por pares con la línea celular de Pec de control. Estas comparaciones se realizaron mediante análisis de significación de las micromatrices (SAM, por sus siglas en inglés) con un corte de tasa de descubrimiento falso de 1% y corte de cambio doble.

5

10

Transferencia Western

[0070] Los ensayos de transferencia Western se realizaron en células de PEC como se indica. Las células se granularon y se lisaron en tampón (50 mM de HEPES, pH 7.2, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 1 mM de DTT, Tween 20 al 0,1 %) se complementaron con un cóctel de inhibidor de proteasas (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania). Los anticuerpos utilizados para la transferencia Western son: AR (H-280, Santa Cruz Biotechnology).

15

Resumen de datos de CGH

[0071] De los datos de CGH, se determinaron las ganancias y pérdidas de copias para las células metastásicas transformadas con Src recuperadas de los cerebros y los huesos en relación con las líneas celulares transformadas con oncogenes. Las regiones de variación de copias genómicas se identificaron como segmentos genómicos en los que las tres muestras replicadas de la línea celular metastásica transformada con Src demostraron una ganancia o pérdida con respecto a la línea celular transformada con Src. Los datos del número de copias se resumieron trazando la frecuencia de ganancias y pérdidas en el genoma del ratón.

20

Diagnóstico por PET:

[0072] El diagnóstico por imágenes de los animales se llevó a cabo según el Comité Institucional estadounidense de cuidado y uso de los animales. La flurina-18, fluoruro de sodio (F-18-NaF) en solución isotónica se obtuvo de IBA Molecular (Ashburn, VA). Se inyectó $210 \pm 9,54 \mu\text{Ci}$ de F-18-NaF en 150 μl a través de la vena lateral de la cola a los ratones no anestesiados. Una hora después, se anestesió a los animales con sulfuración al 1,5 % en O₂ al 98,5 % y se les diagnosticó por imágenes con el escáner microPET de Inveon (Siemens Hoffman estate, IL). Se obtuvo un escáner PET de alta resolución espacial (1 mm de anchura a media altura) y sensibilidad (> 10 %) con un promedio de 1,5 millones de recuentos en un diagnóstico por imágenes de 10 minutos. Para la demostración se utilizó un algoritmo tridimensional (3D) de maximización de expectativa de subconjunto ordenado con 5 iteraciones y 8 subconjuntos.

25

30

Análisis estadístico.

[0073] Se analizaron las comparaciones entre grupos mediante una prueba t bilateral. Una diferencia de $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativa. Todos los análisis se realizaron con el *software* SPSS 11,5. Los datos se expresan como media \pm EEM.

35

Métodos de análisis de micromatriz. Procesamiento previo y análisis de expresión diferencial.

[0074] Los datos de las micromatrices se procesaron previamente mediante la corrección del fondo, la normalización de los cuantiles y el resumen se llevaron a cabo sobre las micromatrices de expresión génica Mouse Gene 1.0 ST utilizando el flujo de trabajo del análisis robusto de múltiples chips (RMA, por sus siglas en inglés) [45] en la Affymetrix Expression Console versión 1.1 [Affymetrix, Inc., Santa Clara, CA]. Se identificaron los genes expresados diferencialmente para cada una de las cuatro líneas celulares de sobreexpresión, c-Myc, NeuT, Ha-Ras, y v-Src, realizando comparaciones por pares con la línea celular de PEC de control. Estas comparaciones se realizaron mediante análisis de significación de las micromatrices (SAM, por sus siglas en inglés) con un corte de tasa de descubrimiento falso de 1% y corte de cambio doble.

40

45

Comparación con fibroblastos y líneas celulares de tumores mamarios de cáncer de mama.

[0075] Los patrones de expresión diferencial de las cuatro líneas celulares de sobreexpresión de oncogenes se compararon con un conjunto de datos previamente publicado que incluía fibroblastos transducidos por oncogenes y tumores mamarios inducidos [46]. Este conjunto de datos se generó en el conjunto de micromatrices A y B Affymetrix Murine 11K y contiene muestras de sobreexpresión de Ha-Ras, muestras de sobreexpresión de c-Myc, así como controles normales. Los datos brutos (archivos .CEL de Affymetrix) se obtuvieron de Huang *et al.* [46] a partir de las publicaciones del sitio web. Los archivos .CEL se procesaron utilizando RMA con definición actualizada de grupos de sondas del sitio web CDF personalizado de la Universidad de Michigan (Entrez probesets versión 12, de 30 de julio de 2009) [47]. Un total de 6143 genes de este conjunto de datos se mapearon a símbolos génicos y se utilizaron para análisis comparativos. Se realizó un análisis de expresión diferencial para identificar los genes

50

55

regulados diferencialmente específicos a las líneas celulares de Ras y Myc frente a los controles utilizando SAM con un corte FDR de 10 %. Los genes expresados diferencialmente identificados en este conjunto de datos se compararon con las cuatro líneas celulares de sobreexpresión de oncogenes.

5 [0076] Se utilizó una curva de característica operativa de receptor (ROC, por sus siglas en inglés) para trazar la sensibilidad y la especificidad sobre el rango de valores discriminatorios para PSA en el diagnóstico y la correlación con la firma de c-Myc [29-31]. Para la evaluación de PSA, las muestra con PSA anormal y un caso de metástasis clínica se consideraron verdaderos positivos, y las muestras con PSA anormal y ningún caso de metástasis clínica se consideraron falsos positivos. Para la evaluación de la firma de c-Myc, las muestras con una alta correlación con la firma y metástasis clínica se consideraron verdaderos positivos, y las muestras con una correlación baja o
10 negativa y un caso de metástasis clínica se consideraron falsos positivos.

[0077] Las firmas génicas exclusivas de cada una de las cuatro líneas de células de cáncer de próstata transformadas con oncogén se compararon con dos conjuntos de datos de próstata previamente publicados. El primer conjunto de datos comprende 185 muestras los datos de expresión de ARNm normalizado log2 que se
15 descargaron del sitio web de la base de datos del cáncer de próstata del MSKCC (<http://cbio.mskcc.org/cancergenomics/prostate/data/>) [20]. Los perfiles génicos de este conjunto de datos del MSKCC eran centrados a la media y se computó la correlación de Pearson entre cada muestra del MSKCC y el perfil de cambio doble del log2 para cada firma específica de oncogén. El segundo conjunto de datos de cáncer de próstata, incluidas muestras de metástasis distantes, se obtuvo previamente del laboratorio MSKCC Gerald y se procesaron las muestras como se describe en [33]. En resumen, las muestras de las micromatrices se procesaron
20 utilizando el procedimiento Robust Multichip Average (RMA, por sus siglas en inglés) [45] con CDF personalizado de fecha 30 de julio de 2009 (versión 12) [47].

Comparación con las características clínicas del cáncer de próstata.

[0078] Los patrones de expresión de las cuatro líneas celulares de sobreexpresión de oncogenes se compararon con los datos de expresión para las características clínicas, incluyendo el estadio de la enfermedad, el grado y la
25 recurrencia, anteriormente publicados por Lapointe *et al.* [3]. El conjunto de datos se descargó del sitio web de las publicaciones. Este conjunto de datos contiene 5153 grupos de sondas y 112 muestras de cáncer de próstata con anotaciones que incluyen el grado del tumor, el estadio del tumor y la recurrencia de la enfermedad. Las anotaciones del grupo de sondas se actualizaron utilizando el archivo de anotación GPL3044 del Array Information Library Universal Navigator de fecha 7/9/2009 [48]. Se eliminaron los grupos de sondas con carencia de
30 anotaciones de símbolo genético, así como los grupos de sondas con al menos 25 % de valores perdidos, dando lugar a un total de 4232 características para 3327 genes únicos. El análisis de expresión diferencial se llevó a cabo para la enfermedad en estadio avanzado frente a en estadio temprano, en grado alto frente a en grado bajo, y recurrente frente a no recurrente, utilizando SAM con un corte de FDR de 25 %. Los genes expresados diferencialmente identificados en este conjunto de datos se compararon con las cuatro líneas celulares de cáncer de próstata de sobreexpresión de oncogenes. La significación en la superposición entre los genes expresados
35 diferencialmente del considerable de LaPointe y los genes de nuestros datos se evaluó utilizando la prueba hipergeométrica.

[0079] De todos los genes regulados por incremento que cumplían al menos un corte de cambio doble de las
40 cuatro líneas celulares de sobreexpresión de oncogenes se investigó su relación con la recurrencia de la enfermedad utilizando un conjunto de datos de micromatrices previamente publicado con datos clínicos para la supervivencia sin recurrencia [11]. Los datos de las micromatrices se procesaron con el Microarray Suite v.5.0 Affymetrix, como se describe en [11], y se descargaron los datos clínicos para cada muestra de próstata de la sección de información complementaria del sitio web del autor (<http://www.ordwayresearch.org/Glinsky-Supplemental2.htm1>). Los datos se transformaron con log2 y para cada una de las cuatro líneas celulares, y los genes con múltiples grupos de sondas se manejaron promediándolos y ordenándolos al grupo de sondas con la
45 variante más grande. Los genes con varianza en el percentil 50 más bajo se filtraron fuera del análisis. La expresión media para cada una de las cuatro firmas de sobreexpresión en el conjunto de datos de recurrencia se utilizó para dividir la población en grupo de expresión alta (percentil superior a 25) y grupo de expresión baja (percentil inferior a 75). Se trazaron curvas de supervivencia sin recurrencia para las poblaciones de expresión alta y baja, y se
50 calcularon valores p significativos utilizando la prueba de log-rango.

Las líneas de células de próstata transformadas con oncogén transmiten un crecimiento independiente del contacto.

[0080] Se establecieron cultivos de células epiteliales de próstata primarias a partir de las próstatas ventrales de
55 ratones FVB (Fig. 1A). Las células se transdujeron con vectores de expresión retrovirales que codificaban un único oncogén distinto (c-Myc, Ha-Ras (V-12), v-Src y NeuT, un mutante activador de ErbB2). La morfología celular de las células epiteliales de próstata se alteró a lo largo del periodo de cuatro semanas (Fig. 1B). Se seleccionaron y se caracterizaron colonias individuales de células transducidas por oncogenes. Se realizaron ensayos de crecimiento celular mediante recuento celular (Fig. 1C). Se observó una ventaja de crecimiento sustancial en cada línea celular transducida con oncogén en comparación con las células epiteliales de próstata primarias.

[0081] Se realizó un análisis de transferencia Western para examinar la expresión relativa de cada uno de los oncogenes utilizados para transducir la PEC. Se identificó la presencia de c-Myc, Ha-Ras, ErbB2 y v-Src oncogénico mediante transferencia Western. El aumento de abundancia de cada oncogén fue específico de cada línea celular (Fig. 2A). La abundancia relativa de Src aumentó en cada una de las líneas en comparación con la PEC primaria y fue aproximadamente 2 veces mayor en la PEC transformada con v-Src en comparación con las otras líneas de células tumorales (exposición más corta, Fig. 2A). La transformación con oncogén de fibroblastos o células epiteliales murinas transmite un crecimiento independiente del contacto en agar sólido. Se examinó el crecimiento de las líneas de PEC transducidas con oncogén en agar disuelto. Se caracterizó el número y el tamaño de la colonia para cada oncogén (Fig. 2B) [27]. Las PEC no transformadas no crecieron en agar disuelto como se ha descrito anteriormente [27]. La transducción con oncogén aumentó el número y el tamaño de las colonias (Fig. 2C, D).

Metástasis pulmonar de líneas de células de cáncer de próstata.

[0082] Los estudios de formación de tumores se llevaron a cabo en ratones FVB. Una inyección subcutánea de 1×10^6 células provocó crecimiento tumoral. Se realizaron mediciones en serie mediante el pie de rey. Cada una de las líneas de tumor de próstata creció subcutáneamente en los ratones inmunes competentes. El crecimiento fue sostenido para las PEC transformadas con c-Myc, Ha-Ras y v-Src (Fig. 3A). Los tumores extirpados fueron hemorrágicos (Fig. 3B) con características histológicas de adenocarcinoma de próstata poco diferenciado (Fig. 3C, suplemento 1). La inmunotinción de tumores para el factor de Von Willebrand (VWF) confirmó angiogénesis y demostró una tinción de VWF significativamente mayor en los tumores inducidos por Ha-Ras (suplemento 2A, B). El tumor se tiñó para CK5, AR, MUC1 y MGK (el homólogo murino de PSA) (suplemento 2C). Las metástasis pulmonares se caracterizaron en autopsia mediante evaluación histopatológica según se describe en los materiales y los métodos (Fig. 4A). El número de metástasis pulmonar derivada de las PEC primarias aumentó en las sublíneas de Ha-Ras, v-Src y c-Myc (Fig. 4B).

Firmas moleculares específicas de oncogén en las líneas de células de cáncer de próstata.

[0083] Con el fin de caracterizar de forma adicional las vías de señalización genética molecular reguladas por oncogenes específicos en las células epiteliales de la próstata, se preparó ARNm de las líneas celulares de PEC transformadas con oncogén. El análisis de micromatrices identificó un total de 2635 de 22115 genes que alteraron su expresión significativamente (al menos un cambio doble) en las líneas celulares de sobreexpresión con oncogén al compararse con muestras control de células epiteliales de próstata no transformadas (Fig. 5). El mapa de calor de genes identificado como significativamente diferente en su expresión (al menos un cambio doble) se muestra en la figura 5. Las filas del mapa de calor representan genes únicos y se visualizan por su patrón de regulación por incremento y por disminución para las cuatro líneas celulares inducidas por oncogenes. Se compartió un número considerable de genes regulados por incremento y por disminución entre las cuatro líneas celulares (grupo 1; 251 genes). Por ejemplo, el grupo 1 contiene genes que comparten patrones de expresión diferencial en las cuatro líneas celulares, mientras que el grupo 15 contiene genes cuya expresión diferencial es específica de las líneas de células de Src. Los genes con regulación por incremento y por disminución específicos de Ha-Ras fueron los más prevalentes (grupo 14; 584 genes), seguido de los genes específicos de c-Myc (grupo 8; 332 genes), los genes específicos de NeuT (grupo 12; 277 genes), y los genes específicos de v-Src (grupo 15; 215 genes).

La firma de expresión de oncogenes de próstata murina en cáncer de próstata humano de grado alto y estadio avanzado.

[0084] La «firma de expresión de oncogenes» de próstata se definió como genes con un nivel de expresión considerablemente alterado y que presentaron alteración de expresión únicamente por un oncogén específico, en comparación con las células epiteliales de próstata primarias (Fig. 5). La firma de expresión de oncogenes identificada de esta manera se comparó con las firmas génicas obtenidas de otras bases de datos publicadas para identificar similitudes con otros fenotipos y líneas celulares de la enfermedad muy estudiados. Las comparaciones se realizaron con firmas génicas representativas de expresión diferencial en cáncer de próstata en estadio avanzado frente a en estadio temprano, cáncer de próstata de alto grado frente a de bajo grado, cáncer de próstata recurrente frente a no recurrente [3]. Los mapas de calor de las firmas génicas que representan fenotipos de cáncer de próstata en un estadio avanzado/temprano, grado alto/bajo y recurrente/no recurrente [3] (figura 6A,B) se muestran a la izquierda y los mapas de calor de la derecha representan genes expresados diferencialmente en la firma de expresión de oncogén de próstata. Los mapas de calor de las figuras 6-8 están marcados con el porcentaje de genes dentro de la «firma de expresión de oncogenes» que se expresan de forma diferencial. Se muestran los valores P para la relevancia estadística de la similitud entre los genes expresados en las líneas de células de cáncer de próstata y la firma génica del fenotipo de la enfermedad. Los valores P se basan en la distribución hipergeométrica y representan la probabilidad de que estos genes se expresaran diferencialmente en el fenotipo de la enfermedad si se seleccionasen al azar. Los valores p bajos indican un grado de similitud entre una línea celular de oncogén y un fenotipo de la enfermedad que es improbable que suceda por mera casualidad.

[0085] Se determinó previamente una firma génica de cáncer de próstata de «alto grado» a partir de 61 tumores de próstata primarios [3]. La figura 6A muestra que 34 genes de la firma de expresión de oncogenes de próstata

eran comunes a la firma genética de alto grado ($p = 2,97 \times 10^{-5}$). Para cada línea de células de cáncer de próstata inducida por oncogén, se muestra la proporción de genes significativos que contribuyen a esa línea celular. Por ejemplo, la superposición entre la firma de expresión de oncogenes de próstata y la enfermedad de alto grado incluye una combinación de genes que son genes significativos en c-Myc (47 %), NeuT (53 %), Ha-Ras (71 %) y v-Src (62 %). La figura 6B representa los 72 genes que eran comunes entre la firma de oncogén de próstata y la firma genética de estadio avanzado ($p = 4,13 \times 10^{-8}$). Estos resultados indican un grado significativo de similitud entre la firma de expresión de oncogenes de próstata y la enfermedad de alto grado ($p = 2,97 \times 10^{-5}$) y entre la firma de expresión de oncogenes y el fenotipo de la enfermedad en estadio avanzado ($p = 4,13 \times 10^{-8}$).

[0086] No se identificó una superposición significativa entre la firma de expresión de oncogenes de próstata y la firma de la enfermedad recurrente/no recurrente identificada por Lapointe *et al.* [3]. Cuando se comparó la firma de expresión de oncogenes de próstata con los datos de Lapointe, la línea celular Ha-Ras capturó el nivel más elevado de similitud con la enfermedad de alto grado (71 %), mientras que la línea celular v-Src mostró la mayor similitud con la enfermedad en estadio avanzado (67 %).

La firma de expresión genética específica de c-Myc en las células epiteliales de cáncer de próstata se parece a la firma de c-Myc en fibroblastos y tumores mamarios.

[0087] En estudios anteriores se identificaron firmas de expresión genética específicas del oncogén utilizado para transformar fibroblastos (células 3T3) que se recapitulaban en tumores mamarios inducidos por c-Myc o Ha-Ras [28]. La firma molecular inducida por c-Myc y Ha-Ras anteriormente definida se comparó con la firma de expresión genética inducida por estos oncogenes en las células epiteliales de cáncer de próstata. Los mapas de calor en la fig. 7A representan los genes compartidos entre los fibroblastos transducidos por c-Myc (fig. 7A), los tumores mamarios inducidos por c-Myc (fig. 7C) (mapas de calor de la izquierda) y la firma de expresión de oncogenes de próstata inducida por c-Myc (mapas de calor de la derecha). Se identificó una superposición significativa entre la firma de expresión de oncogenes de próstata y los genes regulados diferencialmente por transducción de c-Myc en fibroblastos de ratón (108 genes, p hipergeométrica = $5,84 \times 10^{-12}$) o tumores mamarios (363 genes; p hipergeométrica = $7,5916 \times 10^{-12}$). En la firma de expresión de oncogenes de próstata, las líneas celulares de c-Myc demostraron la mayor proporción de similitud con los fibroblastos transducidos por Myc (92 %) (fig. 7A) y los tumores mamarios inducidos por c-Myc (85 %) (fig. 7C).

[0088] Comparaciones de la firma de expresión de oncogenes de próstata con los fibroblastos transducidos por Ha-Ras (Fig. 7B). Se identificó una superposición significativa entre la firma de expresión de oncogenes de próstata y los genes expresados diferencialmente tras la transducción con el oncogén Ras en los fibroblastos de ratón (64 genes, p hipergeométrica = $5,65 \times 10^{-9}$). Sorprendentemente, las líneas de células epiteliales de próstata transformadas con Ha-Ras mostraron menos cosas en común con la firma de fibroblastos transducida por Ha-Ras (52 %) (fig. 7C) que las líneas celulares de v-Src, c-Myc y NeuT.

Se utilizó una curva de característica operativa de receptor (ROC, por sus siglas en inglés) (fig. 7D) para evaluar el potencial discriminatorio de PSA y la firma de c-Myc con el fin de identificar la enfermedad metastásica.

[0089] Las curvas ROC se han utilizado anteriormente para evaluar la capacidad de diagnóstico del PSA [29, 30], así como su capacidad para identificar la enfermedad metastásica [31]. En las muestras de cáncer de próstata del MSKCC, la curva ROC de la firma de c-Myc mostró mejores características de sensibilidad/especificidad que el PSA, como resulta evidente en la zona debajo de las curvas ROC. La zona debajo de la curva ROC representa el potencial de una variable para discriminar entre dos condiciones [32], indicando que la firma de c-Myc resulta un mejor discriminador de la enfermedad metastásica que los niveles séricos de PSA.

La firma de c-Myc se correlaciona con el cáncer de próstata metastásico.

[0090] Todas las muestras se obtuvieron de conjuntos de datos de cáncer de próstata disponibles públicamente [11, 20, 33]. Esta comparación mostró que la firma de c-Myc muestra una correlación positiva en un subconjunto de muestras de tumores que resulta más evidente en tumores en estadio avanzado y no está correlacionado con el tejido de próstata normal (figura 7E). En contraste, las firmas de Ha-Ras y v-Src están correlacionadas de la forma más consistente con los perfiles de expresión dentro del tejido de próstata normal, y su correlación entre las muestras de tumores es más heterogénea.

Expresión genética inducida por oncogenes de próstata y supervivencia sin recurrencia en cáncer de próstata humano.

[0091] Con el fin de examinar la relación entre los genes expresados en las líneas celulares transformadas con oncogén y las tasas de supervivencia del cáncer de próstata humano, se utilizó un conjunto de datos previamente publicado de micromatrices de muestras de tumores de próstata humanos con tiempo de supervivencia sin recurrencia clínica conocidos [11]. Los genes en este conjunto de datos publicado que se corresponden con los regulados por incremento en cada una de las cuatro líneas de células de cáncer de próstata transformadas con oncogén se utilizaron para asignar las muestras como altas (percentil superior a 25) o bajas (percentil inferior a

75). Se utilizó el análisis de Kaplan Meier para evaluar la diferencia en la supervivencia sin recurrencia asociada a la expresión alta frente a la expresión baja de estos genes. La figura 8A proporciona un mapa de calor que muestra los perfiles de expresión de genes en las muestras de cáncer de próstata humano del conjunto de datos de Glinsky, que se reguló por incremento en las líneas de células de cáncer de próstata transformadas con oncogén. Los genes que se expresaron en gran medida en cada una de las cuatro líneas celulares de oncogén de próstata presentaron una asociación significativa con un mal resultado ($p < 0,005$) (fig. 8B,E).

Leyendas de las figuras

Figura 1: Establecimiento de líneas de células de cáncer de próstata transformadas con oncogén.

[0092] (A) (I) ratones FVB, (II) se utilizaron próstatas para establecer células epiteliales de próstata primarias (PEC) como se muestra en el microscopio de contraste de fase (próstatas ventrales de ratones FVB macho de 12 semanas de edad). (B) Representación esquemática de los métodos implementados y microscopio de contraste de fase de líneas celulares inducidas por oncogén derivadas de PEC transducida por distintos oncogenes (c-Myc, NeuT, Ha-Ras, v-Src). Foto de colonias individuales derivadas de PEC transducido por oncogén que se seleccionaron y se caracterizaron. (C) Curvas de crecimiento de las líneas de PEC determinadas por recuento celular. Los datos son media \pm EEM de $N > 3$ experimentos independientes.

Figura 2: Líneas de PEC transducidas por oncogén que forman colonias en agar disuelto.

[0093] (A) El análisis de transferencia Western de 3 clones independientes de cada PEC inducida por oncogén muestra que se utilizaron anticuerpos para la detección de c-Myc, NeuT, Ha-Ras y v-Src como se muestra. Se utiliza GDI como control de carga de proteína. (B) Ensayos en agar disuelto de PEC transducidas por oncogén. Las PEC no transformadas no crecieron en agar disuelto. (C), (D) El tamaño (C) y el número (D) de colonias de las líneas de PEC transducidas por oncogén se muestran como media \pm EEM de $N > 5$ experimentos independientes.

Figura 3: Las líneas de células epiteliales de próstata crecen en ratones inmunes competentes.

[0094] (A) El diámetro del tumor de PEC, determinado por medición con pie de rey, se muestra como días después de la inoculación en ratones FVB. Los datos son media \pm EEM para $N > 5$ experimentos independientes. Los tumores de NeuT crecieron durante 2 semanas y después disminuyeron de tamaño. (B) Fotografía de tumor representativo derivado de líneas inducidas por oncogén. Se recogieron tumores inducidos de NeuT a los 15 días después de la inyección de células. (C) La tinción de hematoxilina y eosina y (D) la tinción de VWF de PEC demuestran adenocarcinoma de próstata poco diferenciado con vascularidad local.

Figura 4: Metástasis pulmonar de tumores de células epiteliales de la próstata transformadas con oncogén.

[0095] (A) La tinción de hematoxilina y eosina de pulmón murino después de la implantación del tumor demuestra un ejemplo representativo de metástasis pulmonar. (B) Se detectó la frecuencia de metástasis pulmonar en ratones de los grupos de PEC de c-Myc, NeuT y v-Src 5 semanas después de la inyección subcutánea. Los índices fueron de una frecuencia del 100 % en los grupos de Ha-Ras y v-Src.

Figura 5: Agrupamiento jerárquico de expresión génica de micromatriz.

[0096] (A) Resumen del agrupamiento jerárquico de dos vías de los tres clones independientes de cuatro líneas celulares transformadas con oncogén distintas. Se muestra la comparación con PEC primarias (no transformadas). Gráficos medios móviles para la estadística de la prueba T. A los ratones FVB se les inyectó de forma intravenosa un número igual de PEC. Los genes expresados diferencialmente se organizan en patrones de regulación por incremento y por disminución en cada una de las cuatro líneas celulares de sobreexpresión de oncogén. Los datos son media \pm EEM de $N > 3$ experimentos independientes para un total de $N = 30$ ratones.

Figura 6: Genes asociados al cáncer de próstata humano de alto grado y estadio avanzado.

[0097] Mapas de calor de genes que se expresan diferencialmente en las cuatro líneas de PEC transformadas con oncogén y genes que se expresan diferencialmente en cáncer de próstata de (A) alto grado frente a bajo grado y de (B) estadio avanzado frente a estadio temprano [3]. Los mapas de calor de la izquierda representan las firmas del cáncer de próstata de alto grado y estadio avanzado, mientras que los mapas de calor de la derecha representan genes que se expresan diferencialmente en cada línea de células de cáncer de próstata individual. El porcentaje de estos genes que se expresan diferencialmente en cada línea de células de cáncer de próstata individual se muestra en las respectivas columnas junto con el valor p para el grado de similitud con los fenotipos de alto grado y estadio avanzado.

Figura 7: la firma de oncogén específico de c-Myc- y Ha-Ras en tumores de próstata se conserva en fibroblastos.

[0098] Los mapas de calor de (A) y (B) muestran los genes que se expresan diferencialmente en las líneas de células de cáncer de próstata inducido por oncogén y en fibroblastos transducidos por c-Myc y Ha-Ras (línea celular 3T3) [46]. Los mapas de calor de la izquierda representan las firmas de los genes de fibroblastos transducidos, mientras que los mapas de calor de la derecha representan genes que se expresan diferencialmente en al menos una de las cuatro líneas de células de cáncer de próstata. El mapa de calor de (C) muestra la intersección de genes que se expresan diferencialmente en la línea de células de cáncer de próstata c-Myc y en las respectivas muestras de tumor mamario de ratón inducido por c-Myc [46]. Los mapas de calor de la izquierda representan las firmas de los genes de las muestras tumorales, mientras que los mapas de calor de la derecha representan genes que se expresan diferencialmente en las líneas de células de cáncer de próstata. Los valores p mostrados debajo de cada mapa de calor de línea de células de próstata representan la significación de la superposición entre los conjuntos de datos de cáncer mamario y de próstata. (D) Curva ROC para la utilidad del PSA (naranja) y la firma c-Myc (verde) para identificar la enfermedad metastásica. El eje x representa el índice de falsos positivos (1-especificidad) y el eje y representa el índice de verdaderos positivos (sensibilidad). La línea discontinua no representa ninguna capacidad discriminativa. (E) Un mapa de calor representa la consistencia entre cada una de las cuatro firmas y muestras de líneas de células de cáncer de próstata en conjuntos de datos de cáncer de próstata del MSKCC. El rojo indica correlación de Pearson positiva, mientras que el azul indica correlación de Pearson negativa.

Figura 8: Correlatos de expresión génica de las líneas de células de cáncer de próstata transformadas con oncogén con supervivencia sin recurrencia.

[0099] (A) Perfil de expresión de muestras de cáncer de próstata humano [11] que se regularon por incremento en las líneas de células de cáncer de próstata transferidas por oncogén. Las barras a lo largo de la parte inferior del mapa de calor indican si una muestra presenta una expresión alta (percentil superior a 25) o baja (percentil inferior a 75) en función de los genes regulados por incremento en cada una de las cuatro líneas celulares transformadas con oncogén. Se muestran las curvas de Kaplan Meier para poblaciones de alta y baja expresión para (B) genes regulados por incremento de c-Myc, (C) genes regulados por incremento de NeuT, (D) genes regulados por incremento de Ha-Ras, (E) genes regulados por incremento de v- Src.

Suplemento 2: Tinción de VWF.

[0100] (A) Tinción inmunohistoquímica (IHC, por sus siglas en inglés) de tumores de PEC para VWF como marcador de neoangiogénesis. Ejemplo representativo de IHC para VWF para cada línea celular. (B) Se muestra la concentración relativa de vasos sanguíneos para los cuatro tumores de próstata de ratón inducidos por oncogén. Cuantificación de tinción de VWF de tumores de próstata inducidos por oncogén. Los datos son media \pm EEM de N>3 tumores independientes. En el grupo NeuT, la concentración de vasos sanguíneos es inferior y la vascularidad de Ha-Ras es superior ($p < 0,01$).

Suplemento 3: Método para la realización de líneas de células de cáncer de próstata transformadas con oncogén:

(A) Cultivo de células epiteliales de próstata de ratón

[0101] El medio para el cultivo primario comprendía F-12 500 ml, FBS al 10 %, insulina 5 ug/ml, EGF 10 ng/ml, hidrocortisona 1 ug/ml, transferrina 5 ng/ml, extracción pituitaria bovina 30 ug/ml, pen-strep IX, y gentamicina 1 X. Se retiró la próstata de ratones derivada de ratones FVB de 12 semanas, próstata ventral, se lavó en PBS, se cortaron los tejidos de la próstata en una placa de 6 cm durante varios minutos utilizando cuchillas. Los tejidos cortados se añadieron a una solución de colagenasa 0,5 mg/ml y las placas se colocaron en una incubadora de CO₂ al 5 % a 37 °C durante 16 h. Los tejidos digeridos se lavaron con PBS y los gránulos (*pellet*) de las células resultantes se volvieron a suspender utilizando el medio, y después se colocaron en placas de células de 10 cm.

(B) Transformación de las células epiteliales de próstata de ratón con plásmidos de pBABE-IRES-cMyc, pBABE-IRES-NeuT, pBABE-IRES-h-RAS, pBABE-IRES-vSrc

[0102] El gen diana pBABE-IRES se transfectó en células 293T mediante precipitación de fosfato de calcio. Se mezcló ADN y CaCl₂ en tampón de HBS, y la mezcla formó un volumen final de 1 ml, que se dejó reposar durante 20 min a temperatura ambiente. Esta mezcla se mezcló entonces en células 293T y las células se pusieron en una incubadora durante 5 horas y después se retiró el medio de incubación y se sustituyó por medio fresco. Después de 48 horas, se recogió el sobrenadante de las células 293T, se mezcló con un volumen igual de medio fresco y la mezcla resultante se filtró a través de un filtro de 0,45 μ m. A continuación, se añadió polibreno (concentración final de 8 ug/ml) en la mezcla, que se añadió entonces en las células epiteliales de próstata que se encontraban en el primer pase. Tras otras 48 horas de infección, se retiró el medio y se sustituyó por medio fresco (DMEM, FBS al 10 %).

(C) Clones positivos seleccionados

[0103] A un medio de cultivo que comprendía DMEM, FBS al 10 %, y pen-strep IX se le añadió puromisina, y la concentración final se realizó hasta 1~2 ug/ml. Las células se trataron repetidamente con puromisina durante al menos 1 mes, hasta que las células negativas murieron y se dejaron los clones positivos con expresión de oncogén. Cuando los clones fueron lo suficientemente grandes, se recogieron los clones mediante cilindros de clonación (Specialty Media, cat# TR-1004), y se marcaron las células de forma apropiada. Después se hicieron crecer las células durante al menos 25 pases. Se caracterizaron en ensayos de crecimiento en agar disuelto de cultivo de tejidos, implantación *in vivo*, metástasis, micromatriz e histopatología.

[0104] La figura 1 ilustra líneas de PEC transducidas por oncogén que forman colonias en agar disuelto. La figura 1A ilustra microscopio de contraste de fase de líneas celulares inducidas por oncogén transducidas por distintos oncogenes (c-Myc, NeuT, Ha-Ras, v-Src). Foto de colonias individuales derivadas de PEC transducido por oncogenes que se seleccionaron y se caracterizaron. La figura 1B ilustra curvas de crecimiento de las líneas de PEC determinadas por recuento celular. Los datos son media \pm EEM de N>3 experimentos independientes. Las figuras 1C y 1D describen análisis de transferencia Western de 3 clones independientes de cada PEC inducida por oncogenes con anticuerpos como se muestra para la detección de c-Myc, NeuT, Ha-Ras y v-Src y la figura 1D describe marcadores de cáncer de próstata basal (CK5) frente a luminal (CK8). Se utiliza GDI como control de carga de proteína. La figura 1E describe ensayos en agar disuelto de PEC transducidas por oncogén. Las PEC no transformadas no crecieron en agar disuelto. El tamaño (figura 1E) y el número (figura 1F) de las colonias de las líneas de PEC transducidas por oncogén se muestran como media \pm EEM de N>5 experimentos independientes.

[0105] La figura 2 representa las aberraciones del número de copias en las cuatro líneas celulares de oncogén evaluadas por la matriz CGH. La figura 2A ilustra el porcentaje de las cuatro líneas celulares que comparten regiones de ganancia o pérdida de copias, que se muestra como una función de posición genómica. La figura 2B ilustra regiones de ganancia de copias (rojo) o pérdida de copias (azul) para cada una de las cuatro líneas celulares, que se muestran como una función de posición genómica. En la figura 2C se identifican oncogenes con sobreexpresión de ARNm (rojo), amplificación de ADN (amarillo), o ambas (morado) entre las cuatro líneas celulares de oncogén, con la correspondiente amplificación en la base de datos de cáncer de próstata del MKSCC (enumerada en el lateral derecho). En la figura 2D se identifican genes supresores de tumores con subexpresión de ARNm (azul), pérdida de copias de ADN (rosa), o ambas (naranja) entre las cuatro líneas celulares de oncogén, con la correspondiente pérdida de copias en la base de datos de cáncer de próstata del MKSCC (enumerada en el lateral derecho). La figura 3 ilustra líneas de células epiteliales de próstata que crecen en ratones competentes inmunes.

[0106] En la figura 3A, el diámetro del tumor de PEC, determinado por medición con pie de rey, se muestra como días después de la inoculación en ratones FVB 30. El diámetro es media \pm EEM para N>5 experimentos independientes. En la figura 3B se muestra una fotografía de un tumor representativo derivado de líneas inducidas por oncogén. Se recogieron tumores inducidos por NeuT a los 15 días después de la inyección de células. La figura 3C muestra tinción de hematoxilina y eosina con ampliación baja y alta (véanse también los datos suplementarios 1-4).

[0107] La figura 4 muestra tumores de células epiteliales de la próstata transformadas con oncogén con metástasis al pulmón; La figura 4A muestra la tinción de hematoxilina y eosina del pulmón murino después de la implantación del tumor, que demuestra un ejemplo representativo de metástasis pulmonar. La figura 4B muestra que se detectó la frecuencia de metástasis pulmonar en ratones de los grupos de PEC de c-Myc, NeuT y v-Src 5 semanas después de la inyección subcutánea. Los índices fueron de una frecuencia del 100 % en los grupos de Ha-Ras y v-Src.

[0108] La figura 5 muestra un agrupamiento jerárquico de expresión génica de micromatriz. La figura 5A muestra un resumen del agrupamiento jerárquico de dos vías de los tres clones independientes de cuatro líneas celulares transformadas con oncogén distintas. Se muestra la comparación con PEC primarias (no transformadas). Los genes expresados diferencialmente se organizan en patrones de regulación por incremento y por disminución en cada una de las cuatro líneas celulares de sobreexpresión de oncogén. Los datos son media \pm EEM de N>3 experimentos independientes para un total de N=30 ratones. Mapas de calor de genes que se expresan diferencialmente en las cuatro líneas de PEC transformadas con oncogén y genes que se expresan diferencialmente en (figura 5B) cáncer de próstata de alto grado frente a bajo grado y (figura 5C) de estadio avanzado frente a estadio temprano (8). Los mapas de calor de la izquierda representan las firmas del cáncer de próstata de alto grado y estadio avanzado, mientras que los mapas de calor de la derecha representan genes que se expresan diferencialmente en las cuatro líneas de células de cáncer de próstata. El porcentaje de estos genes que se expresan diferencialmente en cada línea de células de cáncer de próstata individual se muestra en las respectivas columnas junto con el valor p para el grado de similitud con los fenotipos de alto grado y estadio avanzado.

[0109] La figura 6 muestra firmas de oncogén específico de c-Myc- y Ha-Ras en tumores de próstata que se conservan en otros tejidos. Los mapas de calor muestran los genes que se expresan diferencialmente en las líneas de células de cáncer de próstata inducidas por oncogén y en los fibroblastos de Ha-Ras de la figura 6A y en los fibroblastos de c-Myc de la figura 6B (línea celular 3T3). En la figura 6C, un mapa de calor muestra la intersección de genes que se expresan diferencialmente en la línea de células de cáncer de próstata c-Myc y en las muestras

de tumor mamario de ratón. Los valores p mostrados debajo de cada mapa de calor de línea de células de próstata representan la significación de la superposición entre las firmas de tumor de próstata y mamario/fibroblastos. La figura 6D muestra un clasificador basado en un análisis canónico de firma de c-Myc que distingue el tumor humano (rojo) del tejido normal (azul claro), a lo largo del eje x, en el conjunto de datos de Lapointe 2004. Las curvas ROC para el rendimiento del clasificador se muestran para E) el conjunto de datos de Lapointe 2004 y F) el conjunto de datos de Taylor 2010 del MSKCC, con valores AUC de 0,990 y 0,977, respectivamente.

[0110] La figura 7 muestra correlatos de expresión génica de líneas de células de cáncer de próstata transformadas con oncogén con supervivencia sin recurrencia. La figura 7A muestra un perfil de expresión de muestras de cáncer de próstata humano (13) que se regularon por incremento en las líneas de células de cáncer de próstata transferidas por oncogén. Las barras a lo largo de la parte inferior del mapa de calor indican si una muestra presenta una expresión alta (percentil superior a 25) o baja (percentil inferior a 75) en función de los genes regulados por incremento en cada una de las cuatro líneas celulares transformadas con oncogén. Se muestran las curvas de Kaplan Meier para poblaciones de expresión alta y baja para (figura 7B) genes de c-Myc regulados por incremento.

[0111] La figura 8 ilustra correlatos de expresión génica de línea de células de cáncer de próstata transformadas con oncogén con supervivencia sin recurrencia.

[0112] La figura 9 ilustra características histológicas de adenocarcinoma de próstata poco diferenciado.

[0113] Las figuras 10A-10D demuestran que el Src mejora la invasión de Matrigel en 3D de líneas de células de cáncer de próstata isogénicas. Las líneas de células de cáncer de próstata isogénicas se derivaron a partir de transducción de células epiteliales de próstata y células epiteliales murinas en retrovirus que codificaban NeuT, Ha-Ras o c-Src oncogénico. Como se muestra en la figura 10A, estas células transmitieron la capacidad de migrar a una herida con la línea NeuT, transmitiendo el cierre de herida más rápido. Aunque la figura 10A ilustra un ensayo de heridas de migración celular que muestra herida, la figura 10B ilustra la cuantificación de cierre para N=3 experimentos separados. La figura 10C ilustra el ensayo de invasión en 3D utilizando líneas de células de cáncer de próstata en matrigel. La figura 10D muestra distancias medias de invasión \pm EEM de 3 experimentos independientes para líneas de PEC (PEC-NeuT, PEC-Ras y PEC-Src). Como se muestra en las figuras 10C y 10D, la invasión en matrigel fue más eficiente para la línea transducida por c-Src. Se llevó a cabo un análisis estadístico de los resultados mostrados utilizando la prueba t de Student.

[0114] Las figuras 11A y 11B demuestran que los tumores de línea de células de cáncer de próstata isogénicas son vasculares. En la figura 11A se cuantificó el crecimiento tumoral subcutáneo en ratones desnudos NCR durante 3 semanas después de la inoculación subcutánea de 1×10^5 células para cada una de las 3 líneas (PEC-NeuT, PEC-Ras y PEC-Src) utilizando flujo de fotones normalizado para cuantificar el volumen del tumor. Se muestran tamaños medios \pm EEM de 3 experimentos independientes para líneas de PEC. Asociadas a una actividad de quinasa mejorada por Src, las líneas crecieron como tumores subcutáneos en ratones NCR desnudos; el tamaño relativo determinado por flujo de fotones sugirió un crecimiento más rápido entre las líneas derivadas de Ras. Se realizó un análisis estadístico de los datos utilizando la prueba t de Student.

[0115] En la figura 11B, la tinción inmunohistoquímica para el factor von Willebrand (WF) mostró la vascularidad de las líneas con tinción de VWF mejorada de la línea Ras. En otras palabras, el índice de crecimiento tumoral mejorado de la línea Ras se asoció a angiogénesis aumentada, como lo demuestra la tinción de factor de von Willebrand (VWF) aumentada.

[0116] Las figuras 12A-12E demuestran líneas de cáncer de próstata que desarrollan metástasis. Se inyectaron células rojo tomate en el ventrículo cardíaco izquierdo de 16 ratones para cada línea celular. Se adquirieron imágenes de bioluminiscencia y se cuantificaron 14 días después de realizar los xenoinjertos. En la figura 12A se muestran imágenes representativas *in vivo* de ratones. Como se muestra, tras la introducción de los tumores en la circulación arterial mediante el ventrículo izquierdo del corazón (inyección I.C.), se desarrollaron tumores rápidamente en múltiples órganos, incluyendo el hígado, el cerebro, la vejiga, la glándula suprarrenal y el riñón, a las dos semanas de la inyección.

[0117] La figura 12B muestra imágenes representativas de metástasis cerebral en ratones después de la inyección intracardíaca de las líneas de cáncer de próstata isogénicas. La figura 12C muestra la cuantificación (media \pm EEM, n=6) de imágenes de bioluminiscencia (BLI, por sus siglas en inglés) como proporción de ratones con tumores. (Se llevó a cabo una comparación estadística utilizando la prueba t de Student con corrección de Welch para varianzas heterogéneas)

[0118] La figura 12D muestra el flujo de protones total medio como medida de carga de tumor cerebral metastásico para cada una de las líneas isogénicas (los datos son media \pm EEM, n=5).

[0119] La figura 12E muestra tinción de H&E de metástasis cerebral formada después de 2 semanas de inyección intracardíaca de PEC-Src y PEC-NeuT. Además, la tinción de CK14 corroboró la presencia de células epiteliales de próstata en el cerebro (flecha).

- 5 **[0120]** La emisión fotónica evidenció metástasis en los cerebros de los ratones a los que se les inyectaron líneas de células de cáncer de próstata de Ras y Src. Se produjo una metástasis menos frecuente en los cerebros de los ratones inyectados con las líneas NeuT. La frecuencia relativa de metástasis entre los ratones demostró que el 100 % de las líneas de Ha-Ras y Src desarrollaron tumores en los ratones, y la carga tumoral relativa fue de 1×10^9 para Ras, 5×10^8 en c-Src, con 1×10^4 para NeuT. Como se muestra en la figura 3E, el análisis histológico de la metástasis cerebral de los ratones a los que se les inyectaron líneas de PEC de Ras o Src mostró que la histología primaria fue adenocarcinoma.
- 10 **[0121]** Las figuras 13A-13C demuestran metástasis hepática de líneas celulares de tumor de próstata. Se inyectaron líneas de PEC isogénicas que expresaban la proteína de fusión Luc2-rojo tomate en el ventrículo de los ratones FVB y se cuantificó la señal bioluminiscente *in vivo*. La figura 12A ilustra el porcentaje de ratones con tumores hepáticos. La metástasis hepática en los ratones a los que se les inyectaron líneas de PEC de Ras y Src desarrolló metástasis hepática (~100 % de los animales). Aunque los tumores de NeuT crecieron subcutáneamente, ninguno desarrolló metástasis hepática. La figura 12B ilustra el tamaño del tumor determinado por flujo de fotones y la figura 13C ilustra imágenes representativas de ratones que muestran metástasis hepática.
- 15 **[0122]** Se identificó metástasis renal en los ratones a los que se les inyectaron líneas derivadas de Ras y Src. La figura 13D ilustra el porcentaje de ratones con tumores renales. La figura 13E ilustra el tamaño de los tumores renales mediante flujo de fotones y la figura 13F ilustra imágenes representativas de metástasis renal.
- 20 **[0123]** Las figuras 14A-14C demuestran que las líneas de células de cáncer de próstata isogénicas desarrollan metástasis ósea osteolítica. La figura 14A ilustra imágenes representativas *in vivo* de ratones FVB que se sometieron a una inyección intracardíaca de líneas de PEC que expresan proteína de fusión Luc2-rojo tomate y se cuantificó la señal bioluminiscente *in vivo*.
- 25 **[0124]** Como se muestra en la figura 14A, la metástasis ósea de los ratones fue de naturaleza osteolítica. La figura 14B muestra la cuantificación (media \pm EEM, n=6) de BLI como proporción de ratones con tumores. Como se ilustra, el 100 % de los ratones a los que se les inyectaron tumores de c-Src desarrollaron metástasis ósea, el 65 % entre los Ha-Ras, y el 15 % entre los NeuT. El flujo de fotones óseo mejoró considerablemente en los tumores de c-Src, con un flujo de fotones total de 5×10^7 frente a 1×10^6 de Ha-Ras y 1×10^4 de NeuT. La figura 14C ilustra el tamaño de la masa de los tumores en flujo de fotones. El análisis histológico de las lesiones óseas osteolíticas de los tumores de próstata evidenció adenocarcinoma que se parecía al tumor primario.
- 30 **[0125]** Las figuras 15A-15F demuestran que el Src mejora la metástasis ósea del cáncer de próstata osteolítico. Los ratones FVB desarrollaron lesiones óseas osteolíticas 2 semanas después de la inyección intracardíaca de PEC-Src. La figura 15A muestra que la zona tumoral en los huesos aumentó considerablemente en el grupo PEC-Src, en comparación con PEC-Ras y PEC-NeuT. La zona del tumor era 6 veces mayor en c-Src, en comparación con los tumores provocados por Ras.
- 35 **[0126]** La figura 15B ilustra rayos X representativos antes (t0) y 14 días (t14) después de la inyección intracardíaca de células. Las zonas de baja densidad colocalizadas con los tumores metastásicos (punta de flecha) indican lesiones osteolíticas. Las lesiones óseas se encontraron principalmente en la unión epifisaria como lesiones osteolíticas en dos semanas.
- 40 **[0127]** El análisis histológico confirmó adenocarcinoma en el sitio de metástasis ósea. La tinción de fosfatasa ácida tartrato-resistente («TRAP», por sus siglas en inglés), mostrada en la figura 15C, corroboró la presencia de osteoblastos (flechas) en la interfaz hueso-tumor. La figura 15D muestra tinción de hematoxilina eosina («H&E») de metástasis ósea formada con posterioridad. Las figuras 15E y 15F muestran tinción de citoqueratina (CK) 14 y tinción CK8 respectivamente, ambas corroborando la presencia de células epiteliales dentro del hueso.
- 45 **[0128]** Las figuras 16A-16G demuestran que las líneas de células de cáncer de próstata osteolíticas expresan los receptores de osteopontina («OPN») y la función CCL5. Las figuras 16A-16D muestran un análisis de clasificador de células activadas por fluorescencia («FACS», por sus siglas en inglés) de expresión de CCR5 en líneas de PEC. Como se muestra, el análisis de FACS utilizando un anticuerpo específico de CCR5 confirmó la presencia de receptor CCR5 en las líneas de PEC.
- 50 **[0129]** Las figuras 16E y 16F muestran los resultados de los ensayos de invasión de Matrigel de la línea de PEC-Src llevados a cabo utilizando OPN como ligando de CD44 y CCL5 como ligando de CCR5, y se cuantificaron como media \pm EEM (figura 16 G). Como se muestra en las figuras 16D y 16E, la adición de OPN o CCR5 mejoró la capacidad de invasión de PEC en matrigel. Para la comparación con el tejido, la expresión del gen tumoral *in vivo* en la PEC transformada con oncogén se comparó con la expresión *in vivo* en la próstata ventral dorsolateral de ratones con la misma cepa. La figura 16F muestra la expresión génica del ligando y el receptor de quimioquina de las líneas de células de tumor de próstata en cultivo de tejidos. La figura 16G muestra la expresión génica del ligando y el receptor de quimioquina de las líneas de células de tumor de próstata después de la implantación subcutánea. La expresión génica mostró una regulación por incremento notable *in vivo* de la citoquina y las quimioquinas. Específicamente, la regulación por incremento de CCR5 y CCR2 se observó en las líneas de PEC de c-Myc, NeuT y Src. Se observó la regulación por incremento de los ligandos de receptor CCL2, CCL7, y CCL8
- 55

(de 2 a 3 veces). CCL7, CCL8 y CL5 son ligandos para CCR5, CCL8 y CCL5 para CCR1 (figura 15H). Estos estudios indican la inducción de expresión de ligando y receptor de citoquina en tumores de PEC *in vivo* en comparación con el cultivo de tejido marcado con un cuadrado rojo.

5 **[0130]** Por lo tanto, la caracterización de expresión de genes basada en micromatrices mostró la activación de un módulo de señalización de CCR5 cuando las líneas de PEC crecieron *in vivo* frente a cultivo de tejido.

[0131] CCL2 se une a CCR2 y CCR4. Dado que CCR5 y sus ligandos CCL5, CCL7 y CCL8 se indujeron en la PEC *in vivo*, se examinó el efecto del antagonista de CCR5 en el crecimiento del tumor de próstata.

10 **[0132]** Las figuras 17A-17D demuestran que los antagonistas de CCR5 bloquean la metástasis de cáncer de próstata osteolítica espinal. Se inyectaron líneas de PEC transducidas con vectores que expresan la proteína de fusión Luc2-rojo tomate en el ventrículo de los ratones FVB y se cuantificó la señal bioluminiscente *in vivo* después de 2 semanas. Se trató a los ratones con maraviroc oral (8 mg/kg) o control. La figura 17A ilustra ejemplos representativos de ratones de cada grupo. La figura 17B ilustra flujo de fotones como un análisis volumétrico de masa tumoral total y la figura 17C ilustra masa ósea de las extremidades inferiores de los ratones. Los datos mostrados son media + EEM para N=8 ratones independientes en cada grupo, P < 0,05.

15 **[0133]** Como se muestra en las figuras 17A y 17B, el antagonista de CCR5 maraviroc (8 mg/kg oral) redujo la carga metastásica corporal total en > 50 % y redujo la metástasis ósea en > 50 % (véanse las figuras 17C y 17D). Además, las imágenes de flurina-18, fluoruro de sodio («F-18-NaF») correlacionadas con un análisis de rayos X demostraron la presencia de metástasis espinal (figuras 18A-18H). El tratamiento oral diario con Maraviroc redujo la metástasis espinal en > 90 % (figuras 19A-19B).

20 **REFERENCIAS**

[0134]

1. Jemal, A., *et al.*, Cancer statistics, 2003. CA Cancer J Clin, 2003. 53(1): p. 5-26.
2. Singh, D., *et al.*, Gene expression correlates of clinical prostate cancer behavior. Cancer Cell, 2002. 1(2): p. 203-9.
- 25 3. Lapointe, J., *et al.*, Gene expression profiling identifies clinically relevant subtypes of prostate cancer. Proc Natl Acad Sci EE. UU., 2004. 101(3): p. 811-6.
4. Kattan, M.W., T.M. Wheeler, y P.T. Scardino, Postoperative nomogram for disease recurrence after radical prostatectomy for prostate cancer. J Clin Oncol, 1999. 17(5): p. 1499-507.
5. Kattan, M.W., *et al.*, A preoperative nomogram for disease recurrence following radical prostatectomy for prostate cancer. J Natl Cancer Inst, 1998. 90(10): p. 766-71.
- 30 6. Graefen, M., *et al.*, Early prostate-specific antigen relapse after radical retropubic prostatectomy: prediction on the basis of preoperative and postoperative tumor characteristics. Eur Urol, 1999. 36(1): p. 21-30.
7. Dhanasekaran, S.M., *et al.*, Delineation of prognostic biomarkers in prostate cancer. Nature, 2001. 412(6849): p. 822-6.
- 35 8. Varambally, S., *et al.*, The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. Nature, 2002. 419(6907): p. 624-9.
9. Henshall, S.M., *et al.*, Survival analysis of genome-wide gene expression profiles of prostate cancers identifies new prognostic targets of disease relapse. Cancer Res, 2003. 63(14): p. 4196-203.
10. LaTulippe, E., *et al.*, Comprehensive gene expression analysis of prostate cancer reveals distinct transcriptional programs associated with metastatic disease. Cancer Res, 2002. 62(15): p. 4499-506.
- 40 11. Glinisky, G.V., *et al.*, Gene expression profiling predicts clinical outcome of prostate cancer. J Clin Invest, 2004. 113(6): p. 913-23.
12. Jenkins, R.B., *et al.*, Detection of c-Myc oncogene amplification and chromosomal anomalies in metastatic prostatic carcinoma by fluorescence in situ hybridization. Cancer Res., 1997. 57(3): p. 524-31.
- 45 13. Qian, J., R.B. Jenkins, y D.G. Bostwick, Detection of chromosomal anomalies and c-myc gene amplification in the cribriform pattern of prostatic intraepithelial neoplasia and carcinoma by fluorescence in situ hybridization. Mod Pathol, 1997. 10(11): p. 1113-9.
14. Ellwood-Yen, K., *et al.*, Myc-driven murine prostate cancer shares molecular features with human prostate tumors. Cancer Cell, 2003. 4(3): p. 223-38.

15. Creighton, C.J., Multiple oncogenic pathway signatures show coordinate expression patterns in human prostate tumors. *PLoS One*, 2008. 3(3): p. e1816.
16. Gumerlock, P.H., *et al.*, Activated ras alleles in human carcinoma of the prostate are rare. *Cancer Res*, 1991. 51(6): p. 1632-7.
- 5 17. Carter, B.S., J.I. Epstein, y W.B. Isaacs, ras gene mutations in human prostate cancer. *Cancer Res*, 1990. 50(21): p. 6830-2.
18. Uzgare, A.R., P.J. Kaplan, y N.M. Greenberg, Differential expression and/or activation of P38MAPK, erk1/2, and jnk during the initiation and progression of prostate cancer. *Prostate*, 2003. 55(2): p. 128-39.
- 10 19. Le Page, C., *et al.*, Expression and localisation of Akt-1, Akt-2 and Akt-3 correlate with clinical outcome of prostate cancer patients. *Br J Cancer*, 2006. 94(12): p. 1906-12.
20. Taylor, B.S., *et al.*, Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell*, 2010. 18(1): p. 11-22.
21. Weber, M.J. Y D. Gioeli, Ras signaling in prostate cancer progression. *J Cell Biochem*, 2004. 91(1): p. 13-25.
- 15 22. Ware, J.L., *et al.*, Differential reactivity with anti-c-erbB-2 antiserum among human malignant and benign prostatic tissue [abstract]. *Proc Am Assoc Cancer Res*, 1989. 30: p. 1737.
23. Hughes, C., *et al.*, Molecular pathology of prostate cancer. *J Clin Pathol*, 2005. 58(7): p. 673-84.
24. Paronetto, M.P., *et al.*, Expression of a truncated form of the c-Kit tyrosine kinase receptor and activation of Src kinase in human prostatic cancer. *Am J Pathol*, 2004. 164(4): p. 1243-51.
- 20 25. Bull, J.H., *et al.*, Identification of potential diagnostic markers of prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia using cDNA microarray. *Br J Cancer*, 2001. 84(11): p. 1512-9.
26. Cohen, S. y B.S. Rabin, Psychologic stress, immunity, and cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1998. 90(1): p. 3-4.
27. Lawson, D.A., *et al.*, Isolation and functional characterization of murine prostate stem cells. *Proc Natl Acad Sci EE. UU.*, 2007. 104(1): p. 181-6.
- 25 28. Huang, E.S., *et al.*, Gene expression phenotypes of oncogenic signaling pathways. *Cell Cycle*, 2003. 2(5): p. 415-7.
29. Catalona, W.J., *et al.*, Selection of optimal prostate specific antigen cutoffs for early detection of prostate cancer: receiver operating characteristic curves. *J Urol*, 1994. 152(6 Pt 1): p. 2037-42.
- 30 30. Thompson, I.M., *et al.*, Effect of finasteride on the sensitivity of PSA for detecting prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2006. 98(16): p. 1128-33.
31. Akimoto, S., *et al.*, Relationship between prostate-specific antigen, clinical stage, and degree of bone metastasis in patients with prostate cancer: comparison with prostatic acid phosphatase and alkaline phosphatase. *Int J Urol*, 1997. 4(6): p. 572-5.
- 35 32. Hanley, J.A. y B.J. McNeil, The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. *Radiology*, 1982. 143(1): p. 29-36.
33. Sharma, A., *et al.*, Novel functions of the retinoblastoma tumor suppressor in controlling lethal tumor phenotypes. (En prensa). *J Clin Invest*, 2010: p. (En prensa).
34. Neve, R.M., *et al.*, A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*, 2006. 10(6): p. 515-27.
- 40 35. Chin, K., *et al.*, Genomic and transcriptional aberrations linked to breast cancer pathophysiology. *Cancer Cell*, 2006. 10(6): p. 529-41.
36. Welsh, J.B., *et al.*, Analysis of gene expression identifies candidate markers and pharmacological targets in prostate cancer. *Cancer Res*, 2001. 61(16): p. 5974-8.
- 45 37. Mori, S., *et al.*, Utilization of genomic signatures to identify phenotype-specific drugs. *PLoS One*, 2009. 4(8): p. e6772.
38. Sato, K., *et al.*, Clinical significance of alterations of chromosome 8 in high-grade, advanced, nonmetastatic prostate carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 1999. 91(18): p. 1574-80.

39. Casimiro, M., *et al.*, ErbB-2 induces the cyclin D1 gene in prostate epithelial cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 2007. 67(9): p. 4364-72.
- 5 40. Gioeli, D., S. Kraus, y M.J. Weber, Signal Transduction by the Ras-MAP Kinase Pathway in Prostate Cancer Progression, in *Prostate cancer : signaling networks, genetics, and new treatment strategies*, R.G. Pestell y M.T. Nevalainen, Editors. 2008, Humana Press: Totowa, NJ. p. 223-256.
41. Scherl, A., *et al.*, Prostatic intraepithelial neoplasia and intestinal metaplasia in prostates of probasin-RAS transgenic mice. *Prostate*, 2004. 59(4): p. 448-59.
42. Ilio, K.Y., *et al.*, The primary culture of rat prostate basal cells. *J Androl*, 1998. 19(6): p. 718-24.
- 10 43. Li, Z., *et al.*, Cyclin D1 regulates cellular migration through the inhibition of thrombospondin 1 and ROCK signaling. *Mol Cell Biol*, 2006. 26(11): p. 4240-56.
44. Liu, M., *et al.*, p21CIP1 attenuates Ras- and c-Myc-dependent breast tumor epithelial mesenchymal transition and cancer stem cell-like gene expression in vivo. *Proc Natl Acad Sci EE. UU.*, 2009. 106(45): p. 19035-9.
- 15 45. Irizarry, R.A., *et al.*, Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res*, 2003. 31(4): p. e15.
46. Huang, E., *et al.*, Gene expression phenotypic models that predict the activity of oncogenic pathways. *Nat Genet*, 2003. 34(2): p. 226 - 230.
47. Dai, M., *et al.*, Evolving gene/transcript definitions significantly alter the interpretation of GeneChip data. *Nucleic Acids Res*, 2005. 33(20): p. e175.
- 20 48. Chen, R., L. Li, y A.J. Butte, AILUN: reannotating gene expression data automatically. *Nat Methods*, 2007. 4(11): p. 879.

REIVINDICACIONES

1. Antagonista de CCR5 para utilizarse en la inhibición de la metástasis de un cáncer susceptible de tratamiento en un sujeto inmunocompetente con riesgo de desarrollar metástasis de cáncer, donde el antagonista de CCR5 es maraviroc o vicriviroc.
- 5 2. Antagonista de CCR5 para utilizarse en la inhibición de la metástasis de un cáncer según la reivindicación 1, donde el antagonista de CCR5 inhibe la metástasis tumoral en uno o más órganos seleccionados de entre el grupo consistente en hígado, cerebro, vejiga, pulmón, glándula suprarrenal, riñón, huesos y combinaciones de estos.
3. Antagonista de CCR5 para utilizarse en la inhibición de la metástasis de un cáncer según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el cáncer es cáncer de próstata.
- 10 4. Antagonista de CCR5 para utilizarse en la inhibición de la metástasis de un cáncer según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el antagonista de CCR5 es maraviroc.
5. Antagonista de CCR5 para utilizarse en la inhibición de la metástasis de un cáncer según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el antagonista de CCR5 es vicriviroc.
- 15 6. Antagonista de CCR5 para utilizarse en la inhibición de la metástasis de un cáncer según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicho uso comprende la administración oral diaria de maraviroc y donde dicha metástasis es metástasis ósea.

Figura 1

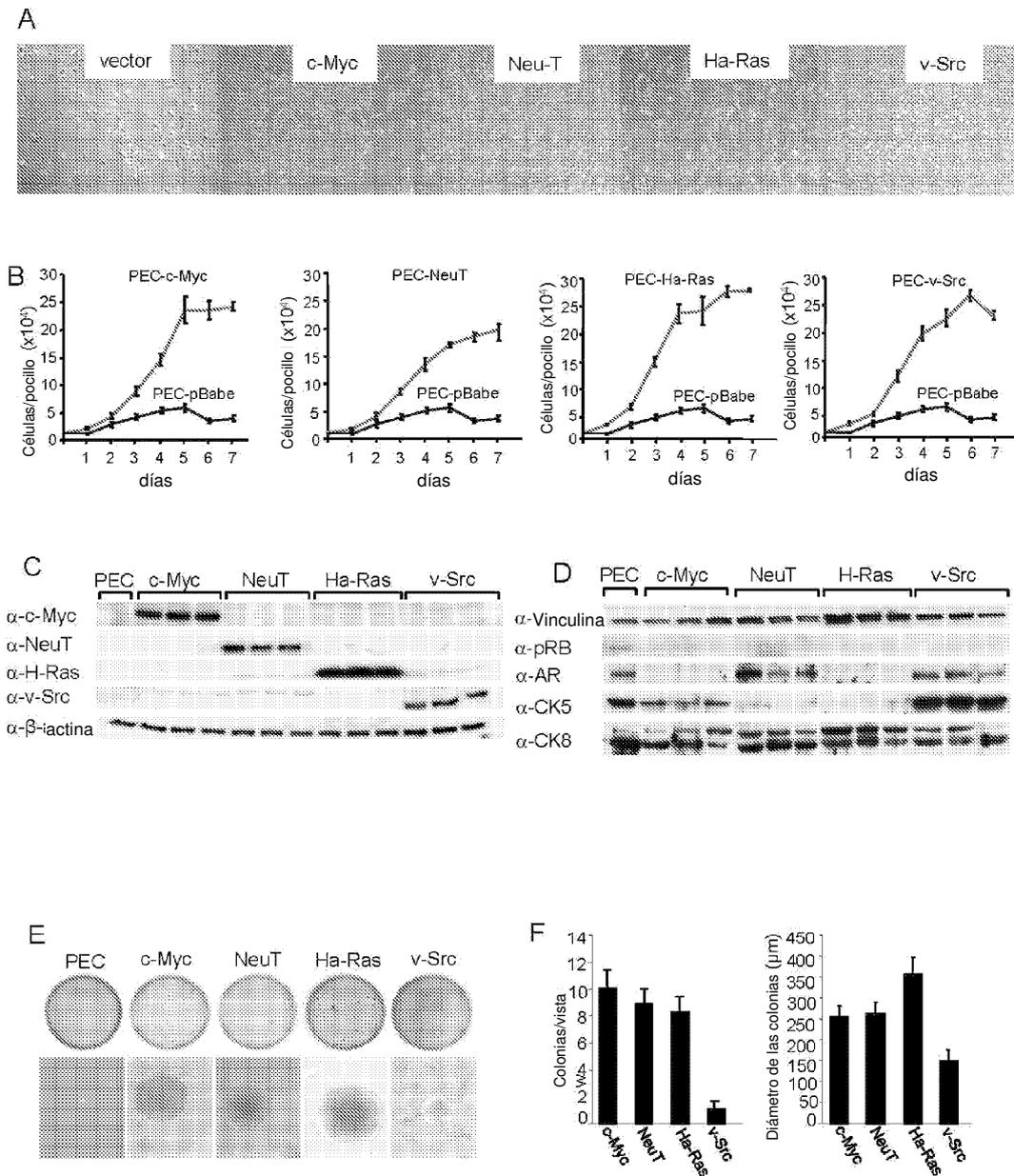


Figura 2

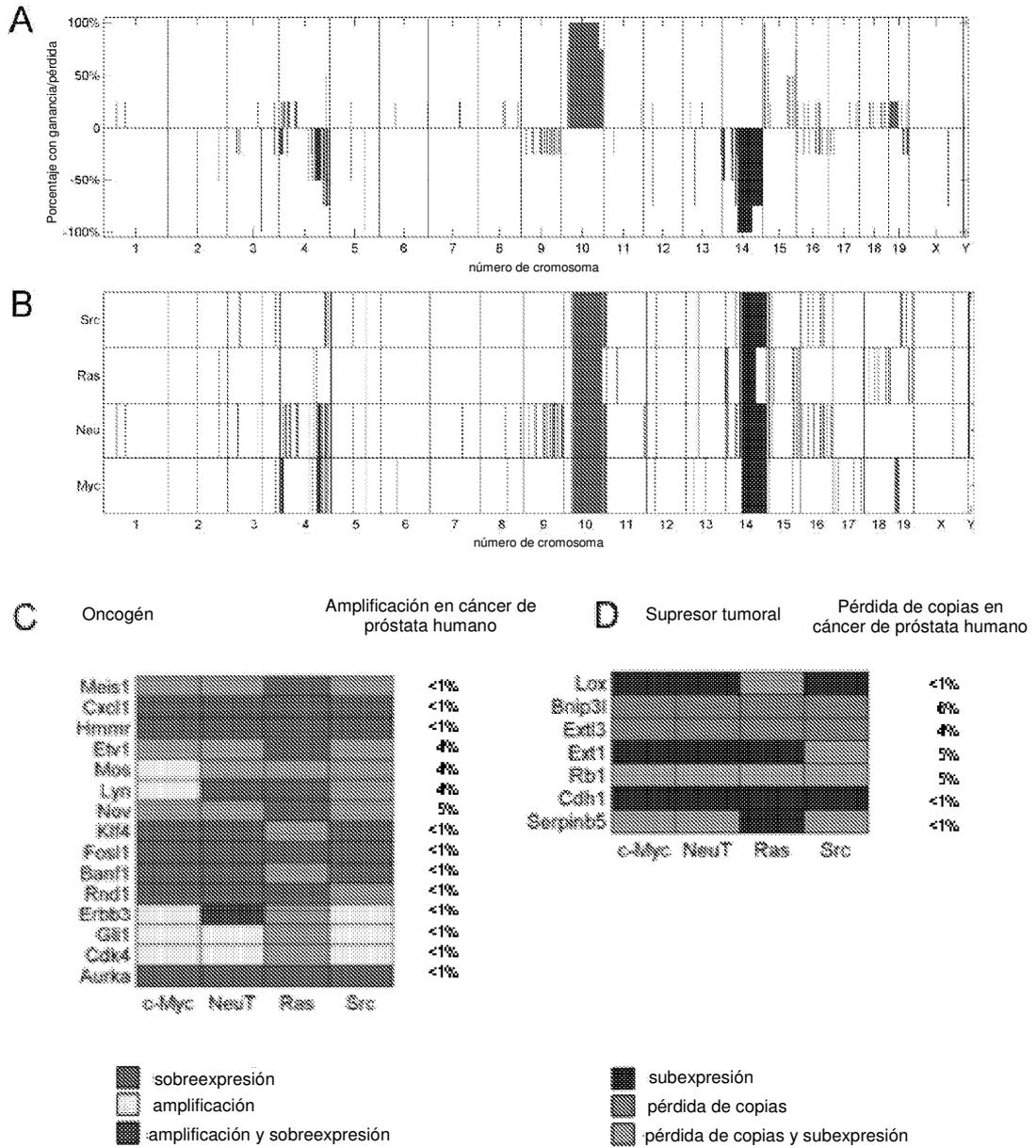


Figura 3

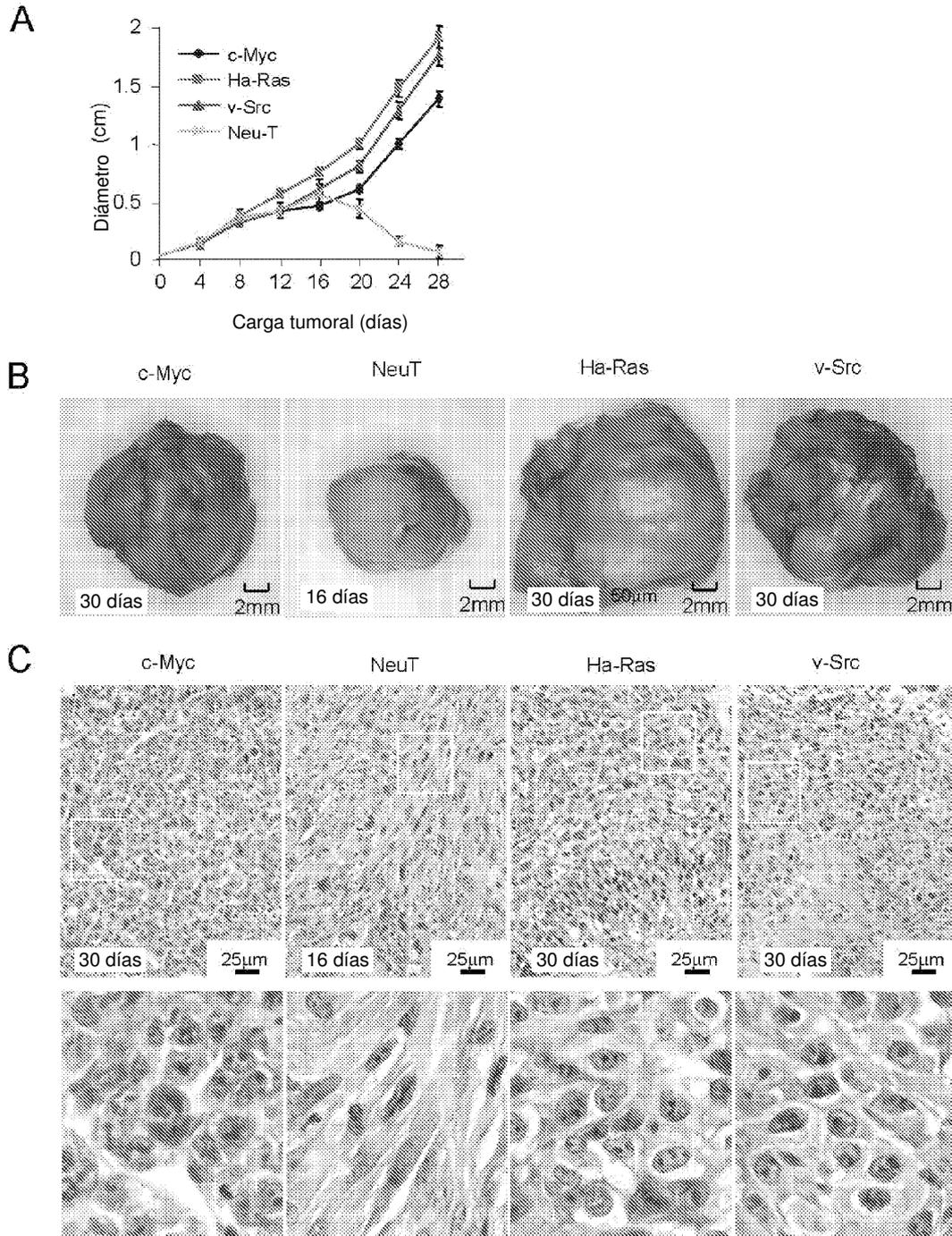


Figura 4

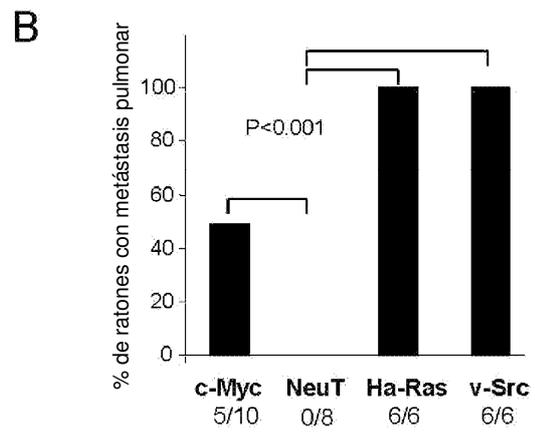
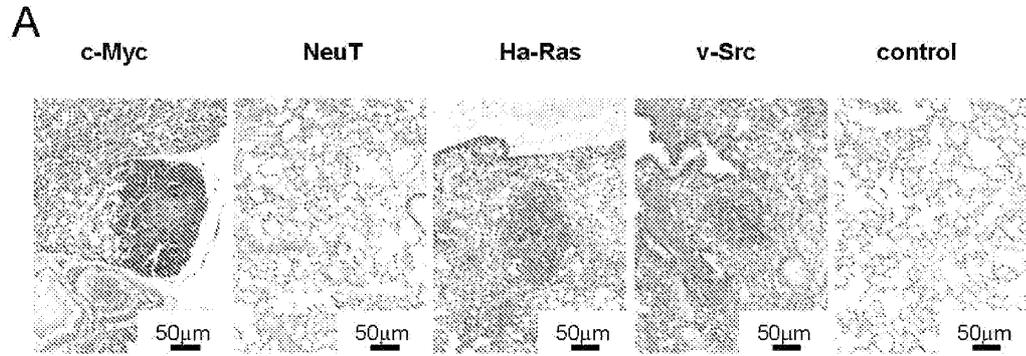


Figura 5

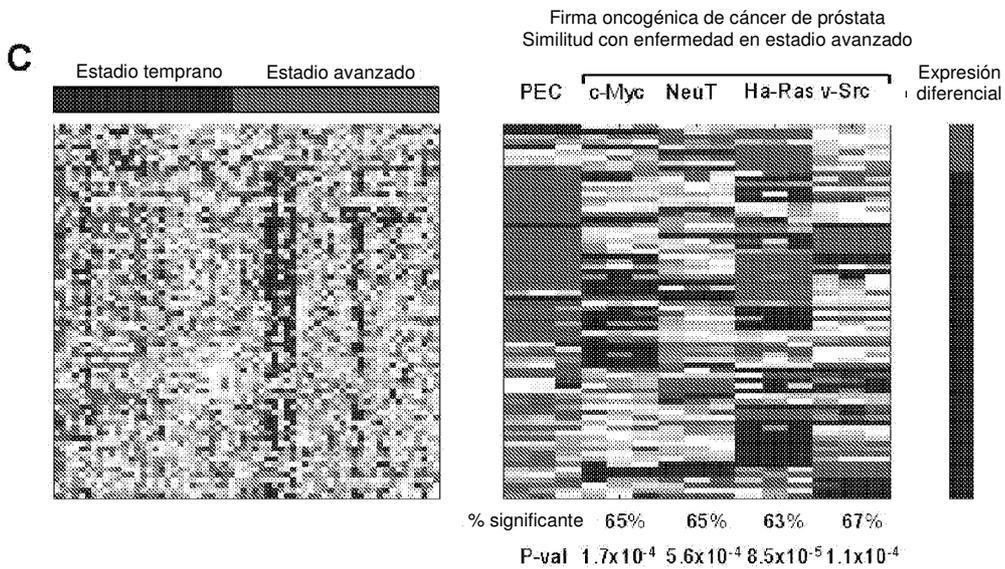
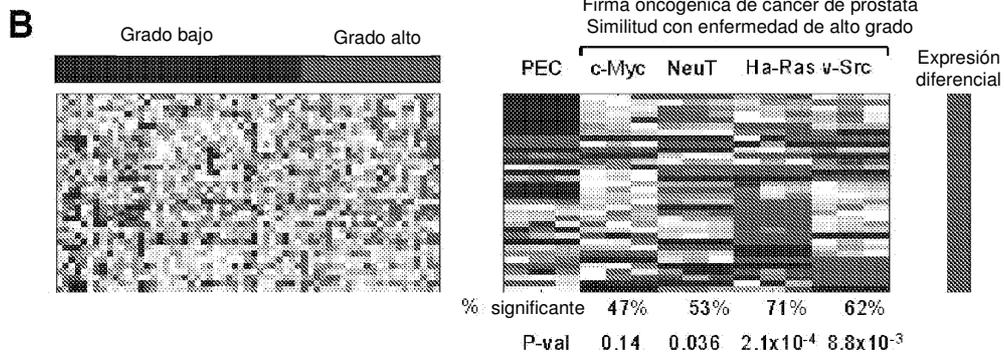
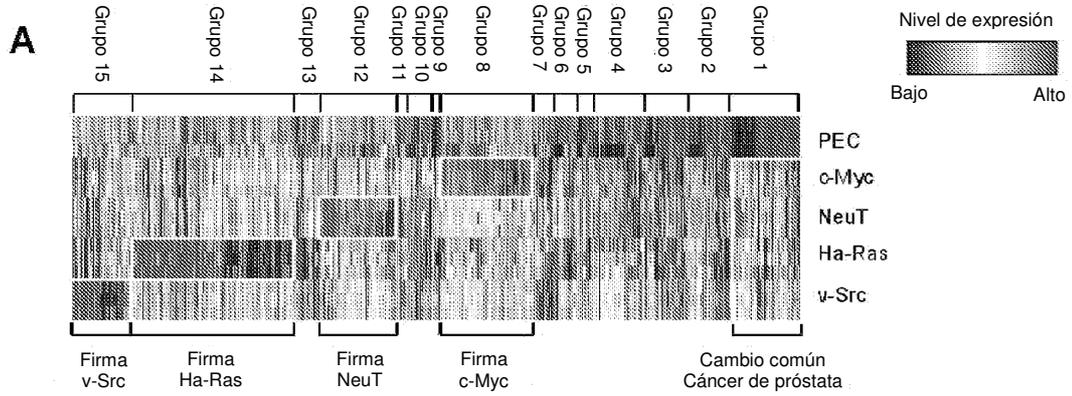


Figura 6

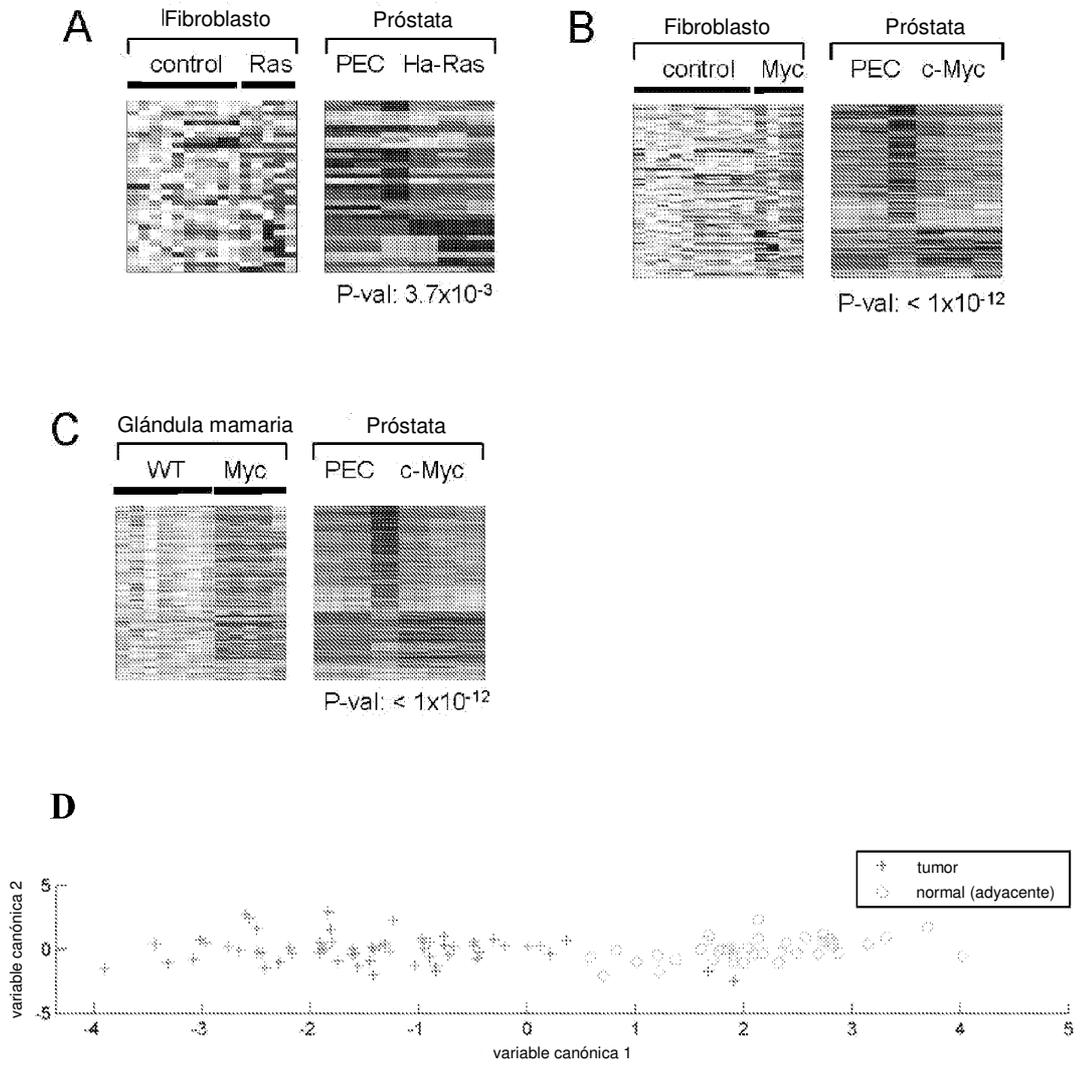


Figura 6

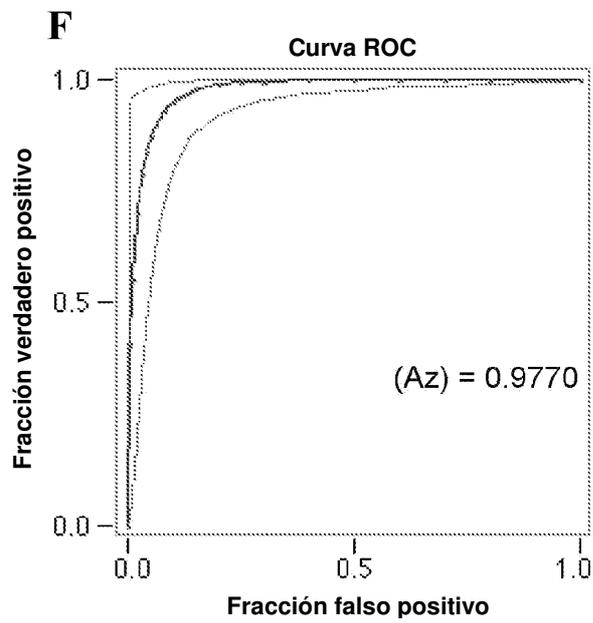
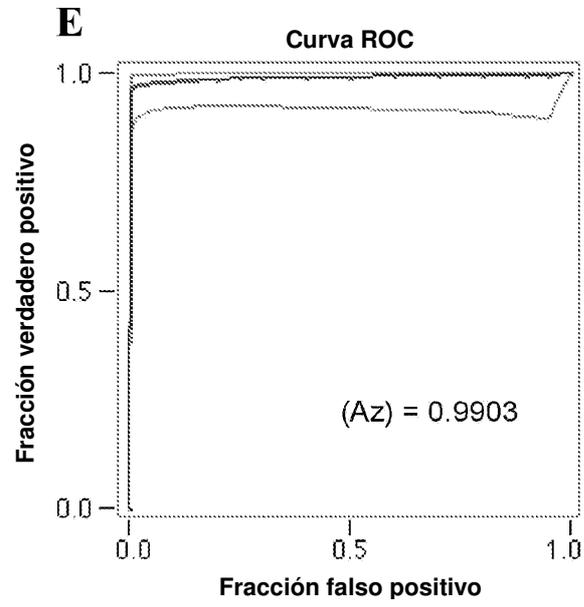
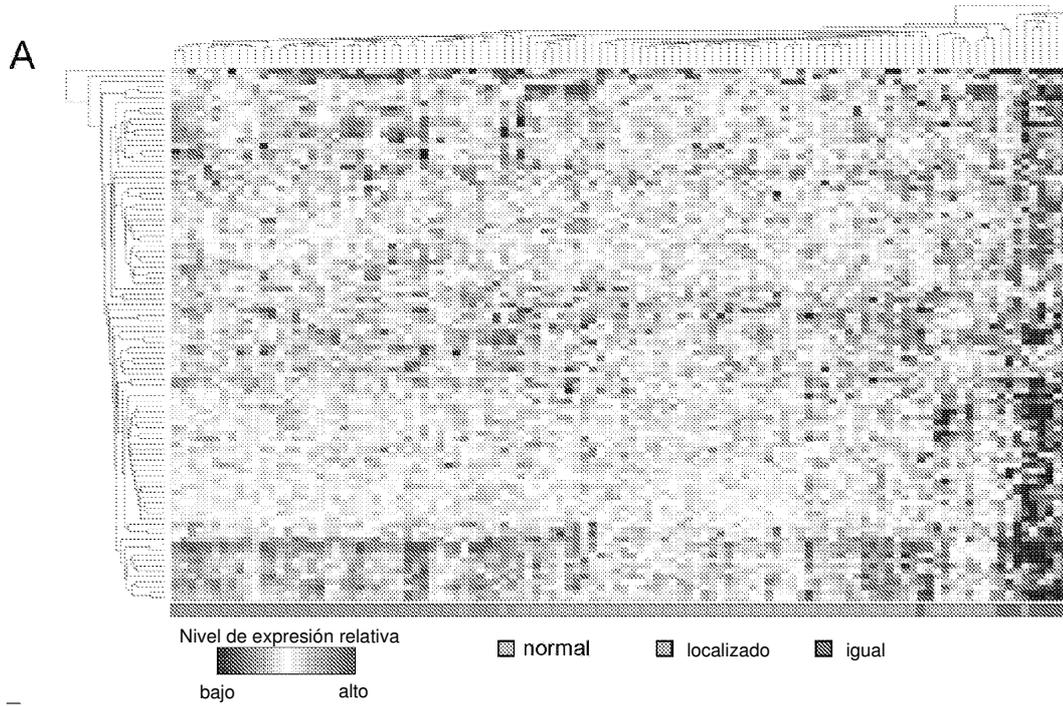


Figura 7



B

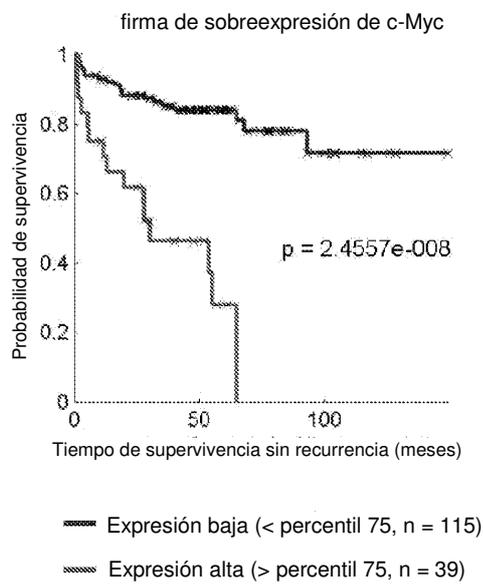
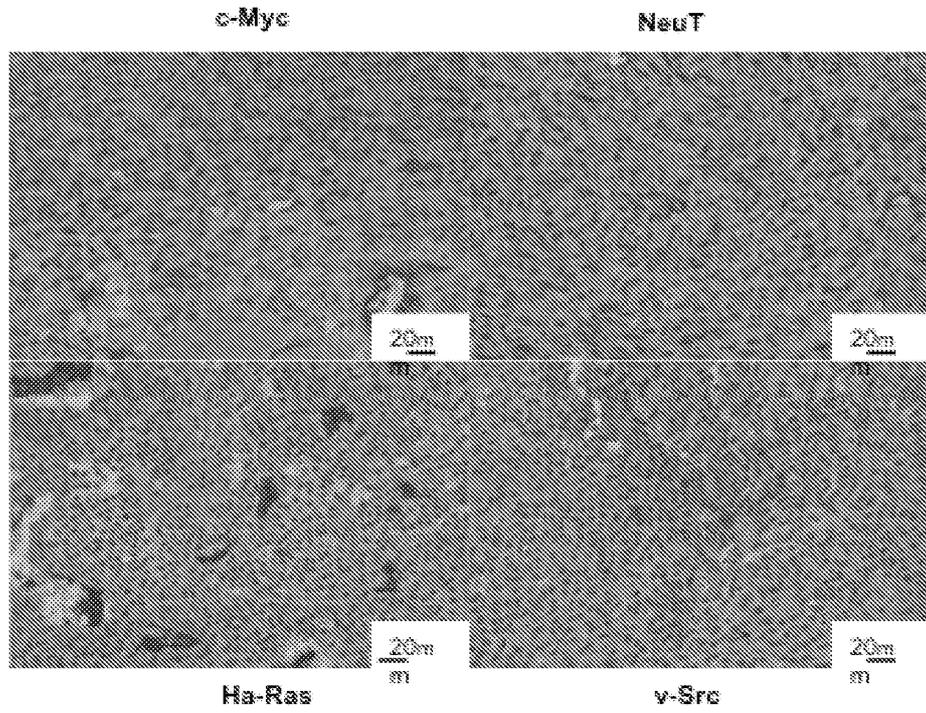
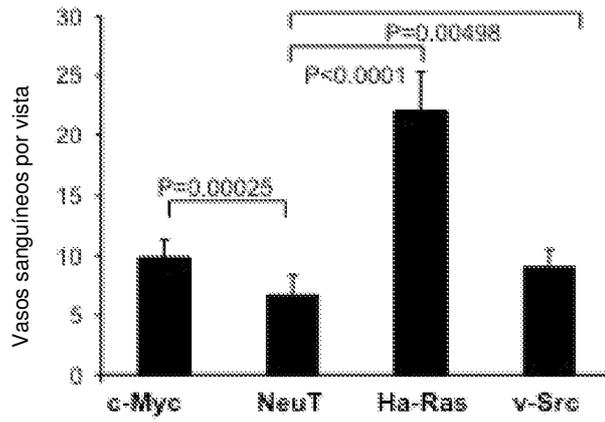


Figura 9
vWF

A



B



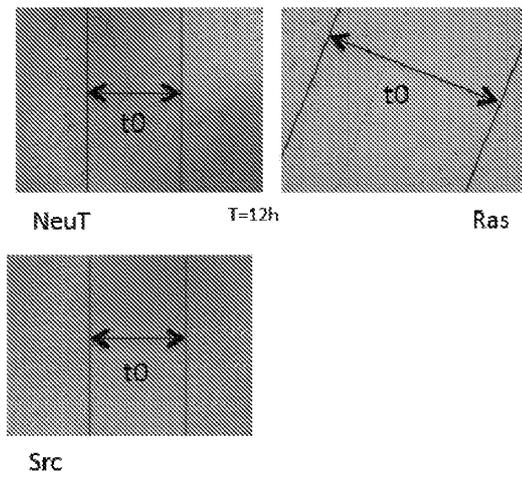


Figura 10A

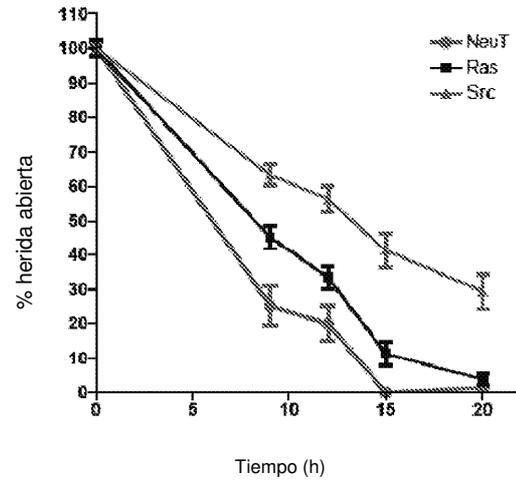


Figura 10B

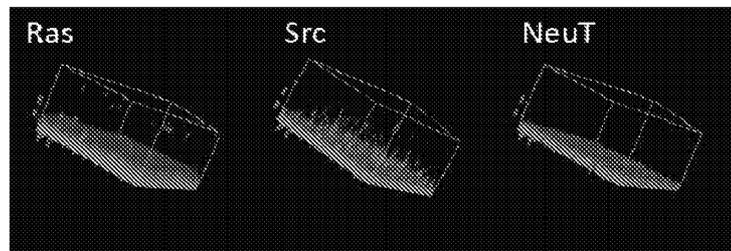


Figura 10C

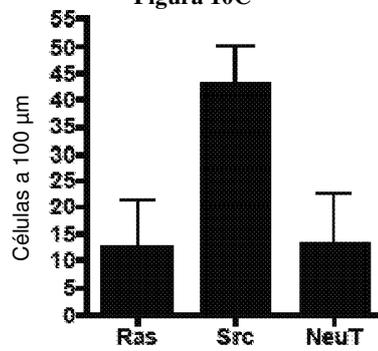


Figura 10D

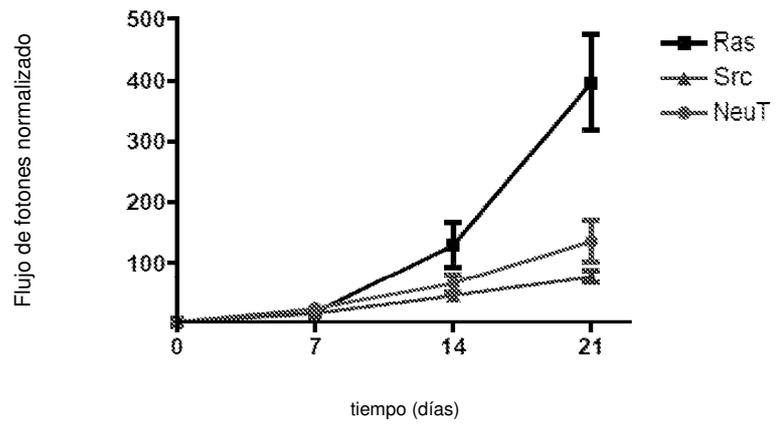


Figura 11A

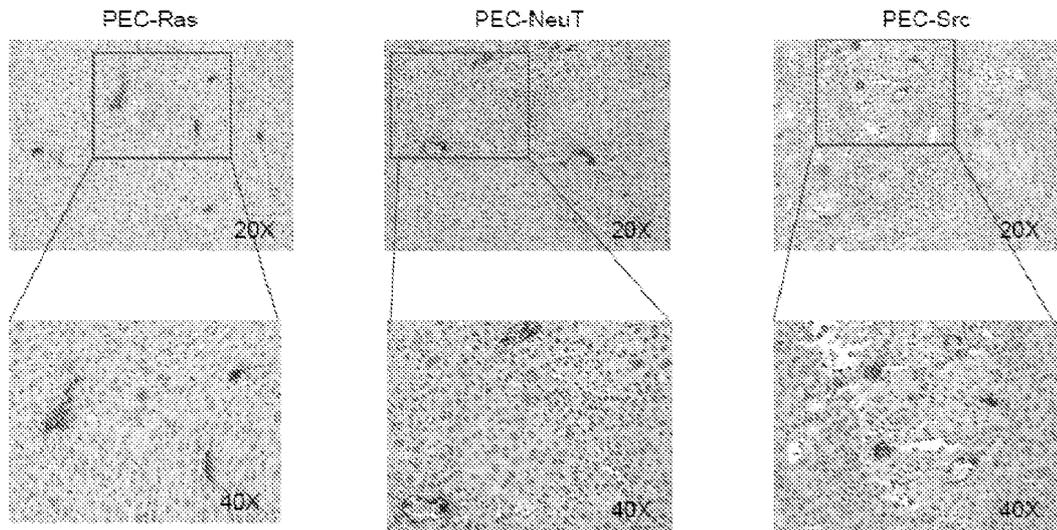


Figura 11B

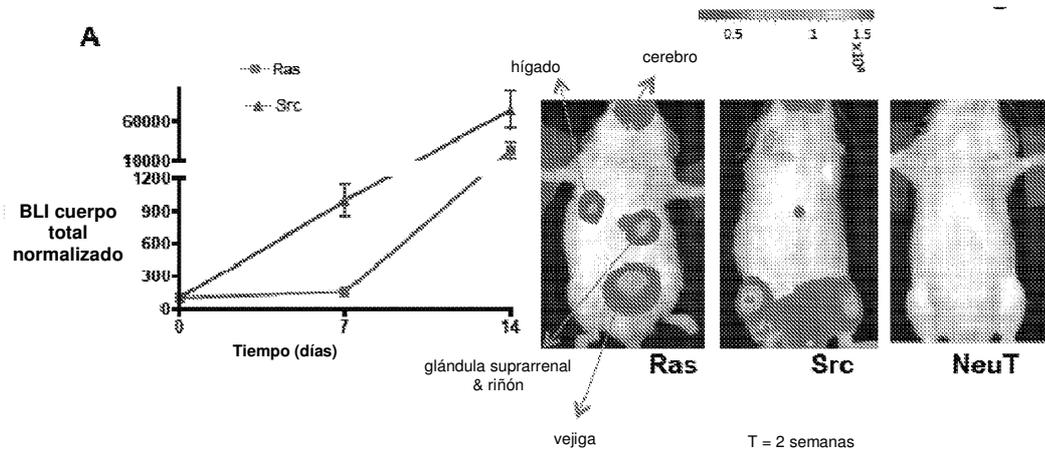
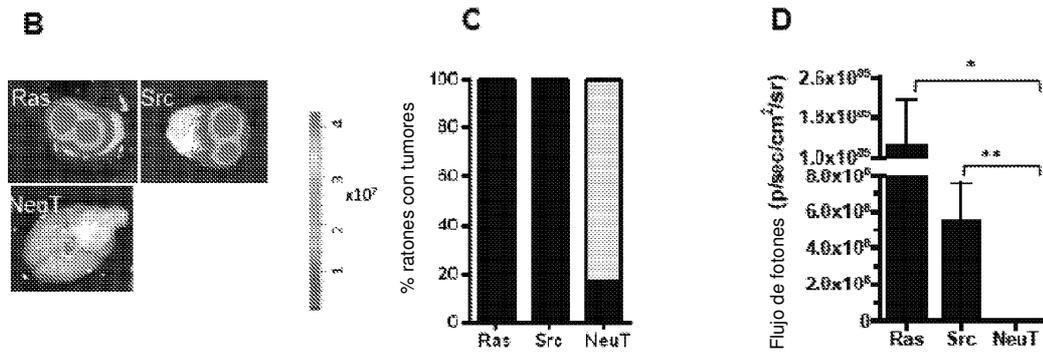


Figura 12A



Figuras 12B-12D

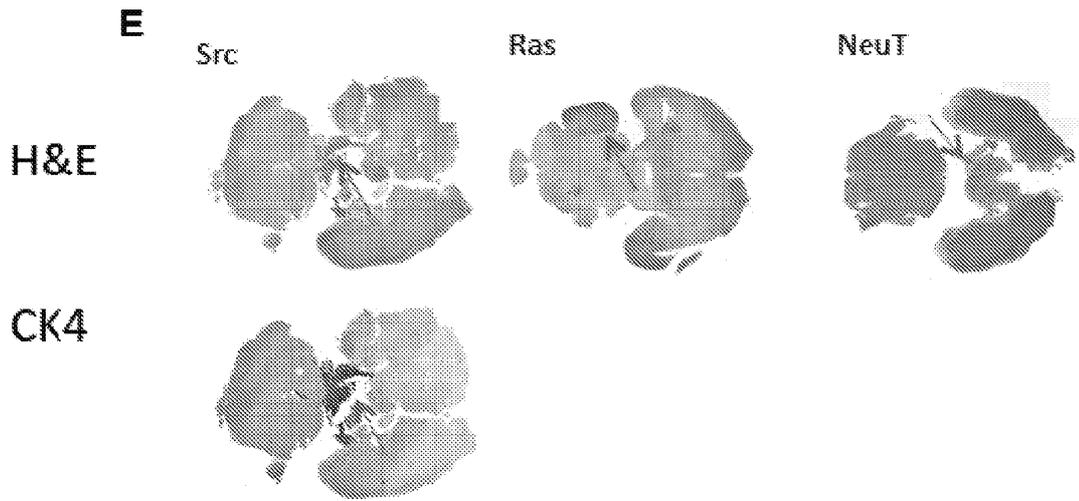


Figura 12E

HÍGADO

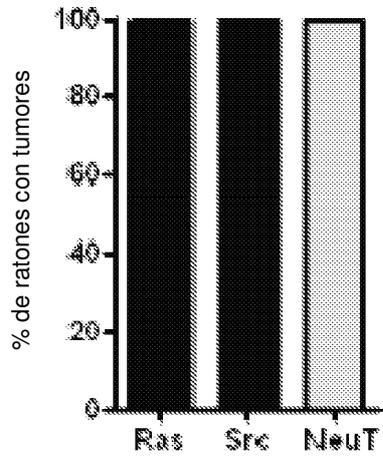


Figura 13A

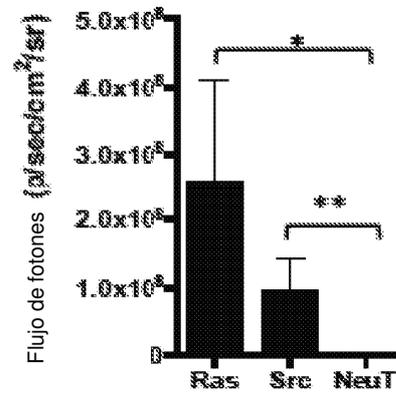


Figura 13B

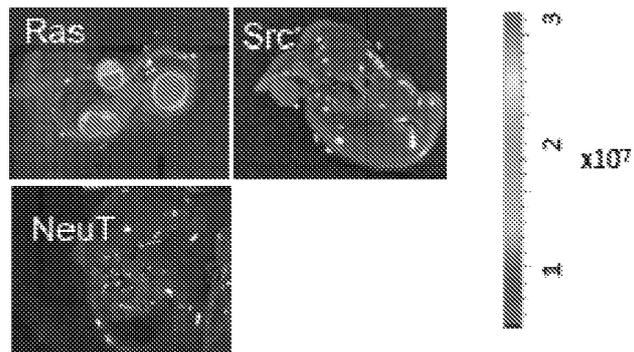


Figura 13C

RIÑÓN

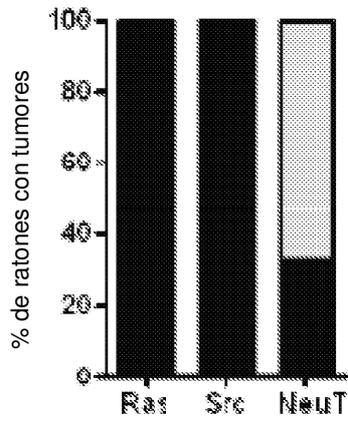


Figura 13D

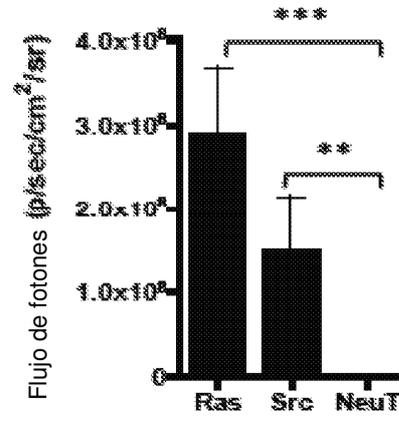


Figura 13E

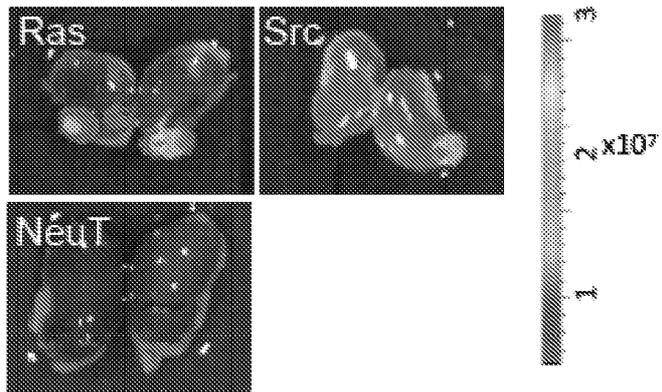


Figura 13F

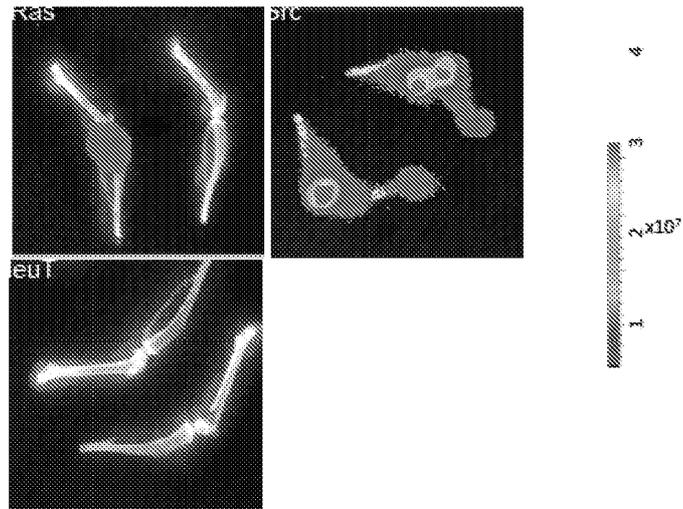


Figura 14A

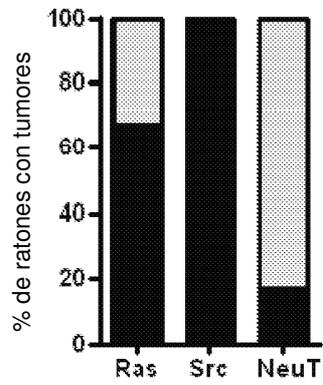


Figura 14B

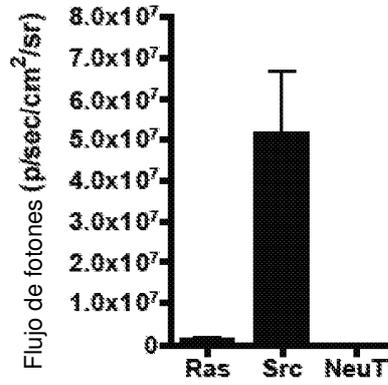


Figura 14C

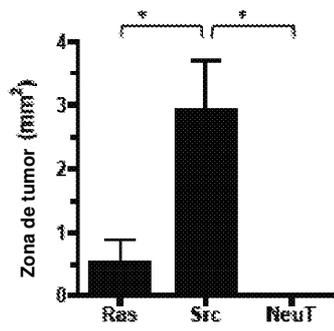


Figura 15A

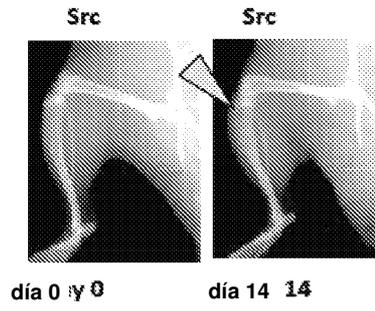


Figura 15B

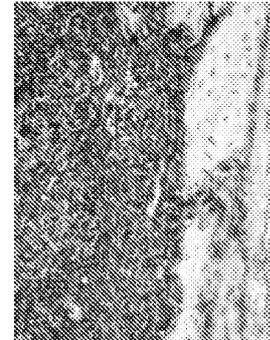


Figura 15C

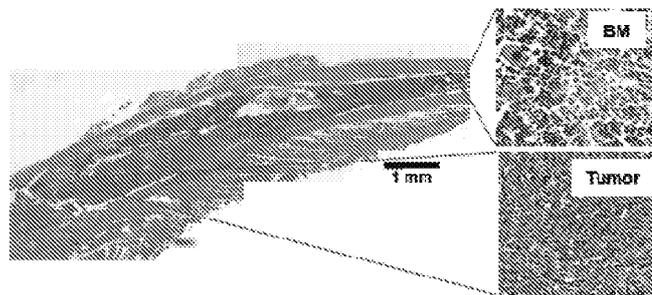


Figura 15D



Figura 15E

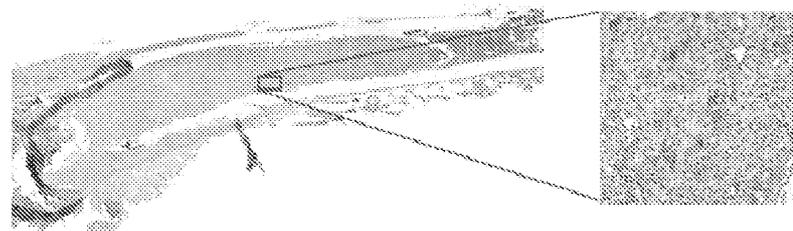
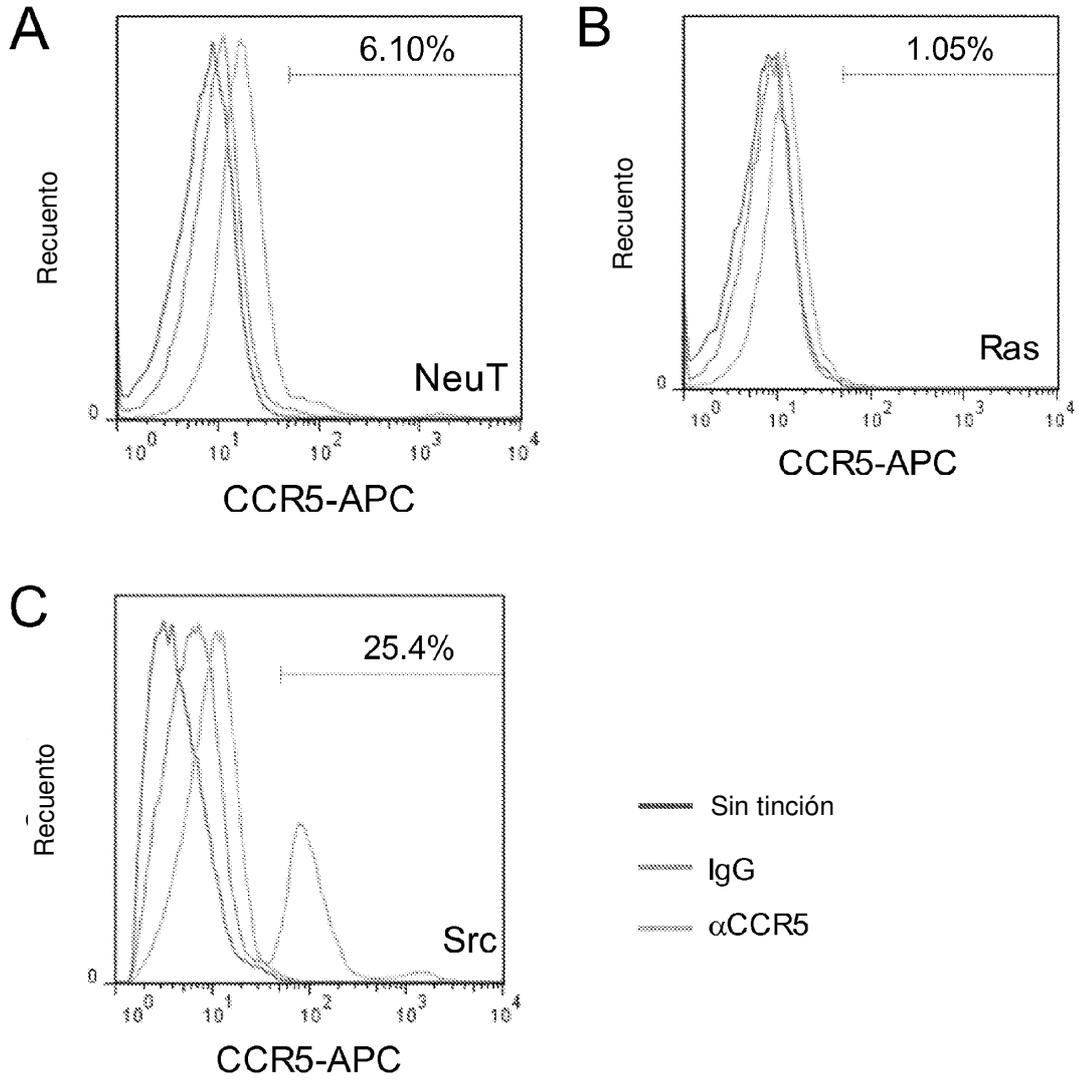


Figura 15

Figuras 16A-16C



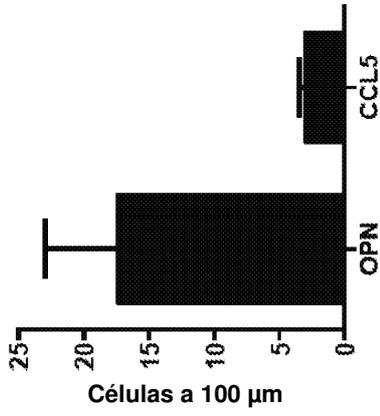


Figura 16E

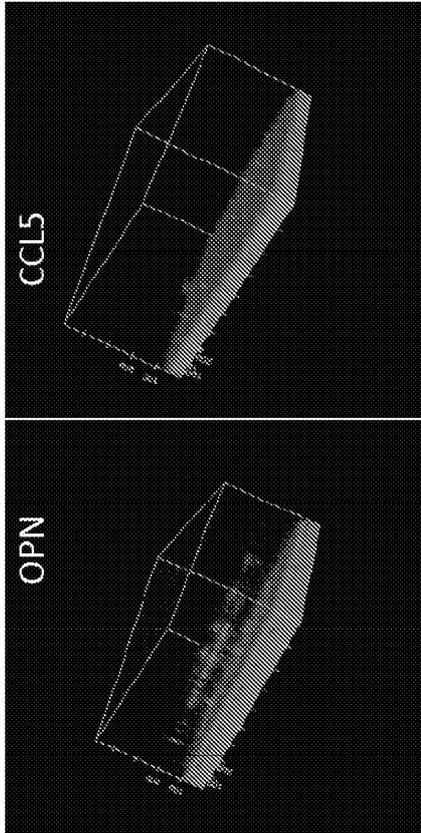


Figura 16D

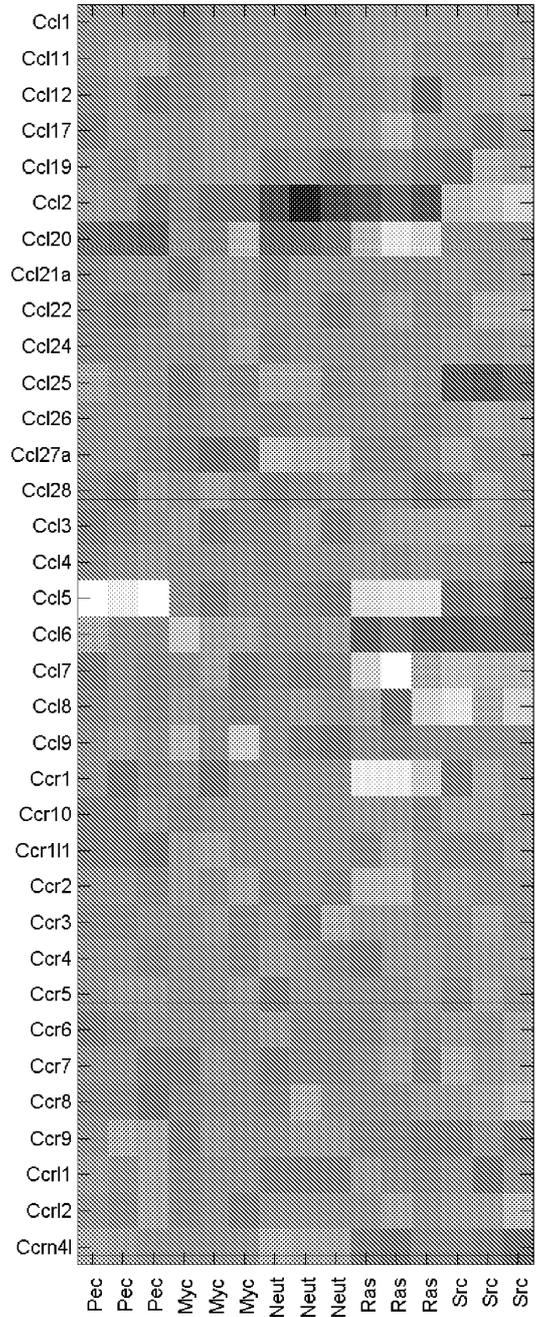


Figura 16F

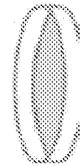




Figura 16G

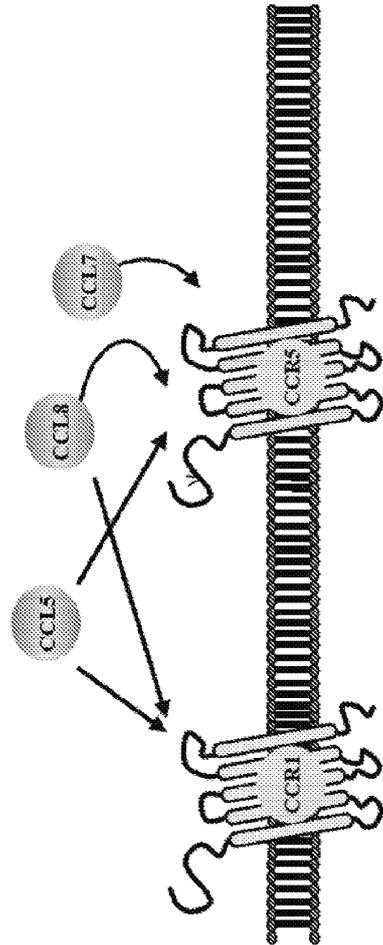


Figura 16H



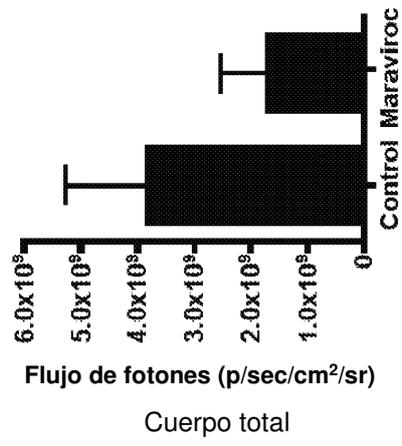


Figura 17B

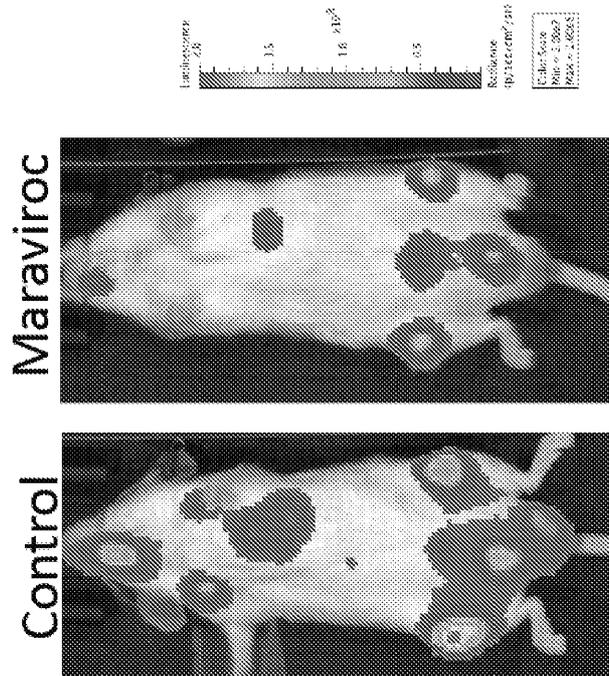
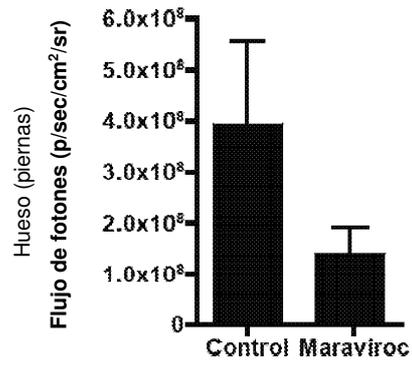


Figura 17A



Figuras 16C

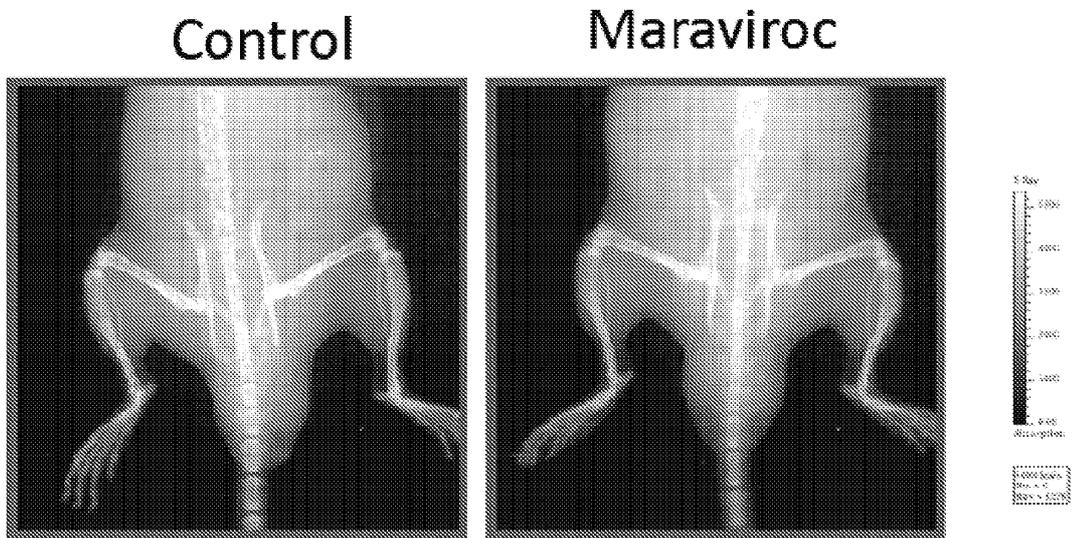


Figura 17D

RATONES NO TRATADOS

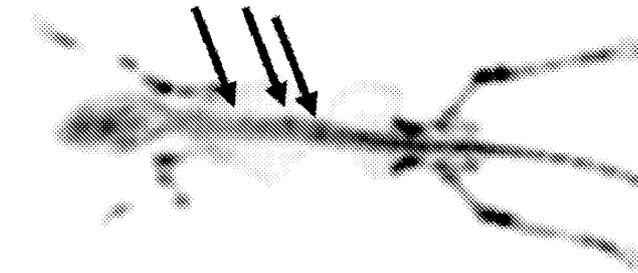


Figura 18A

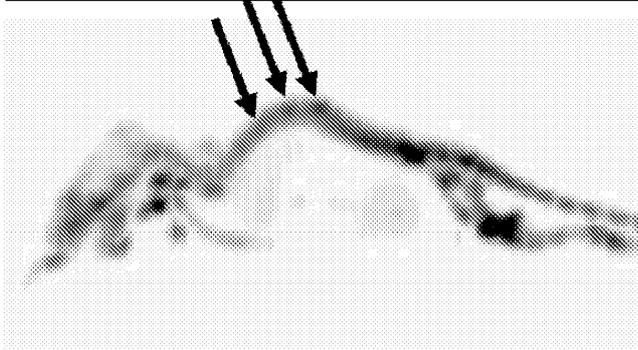


Figura 18B

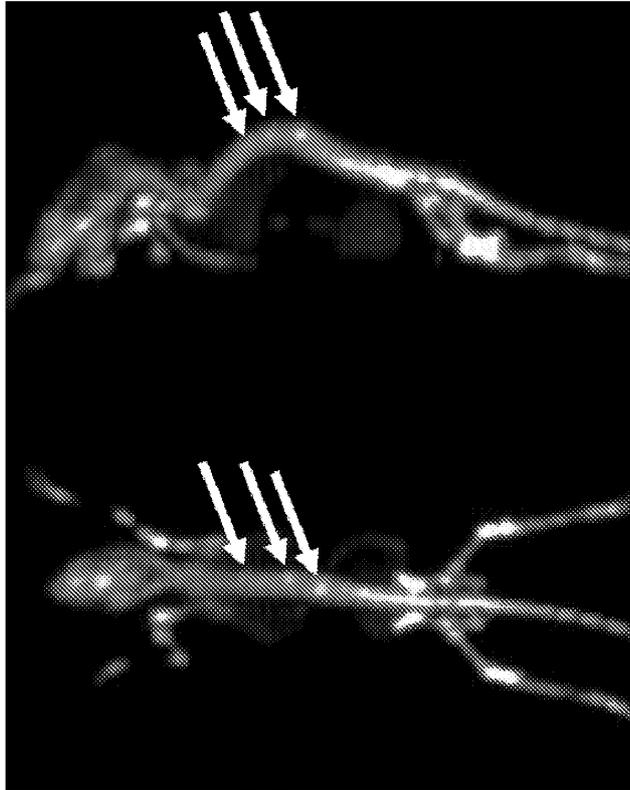


Figura 18C

Figura 18D

RATONES TRATADOS

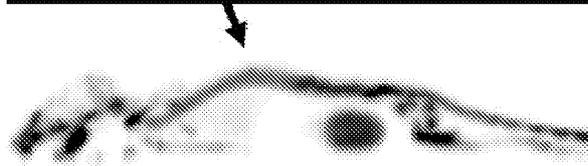


Figura 18E

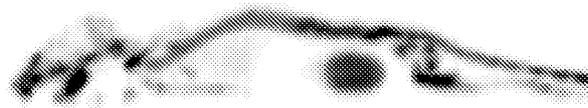


Figura 18F

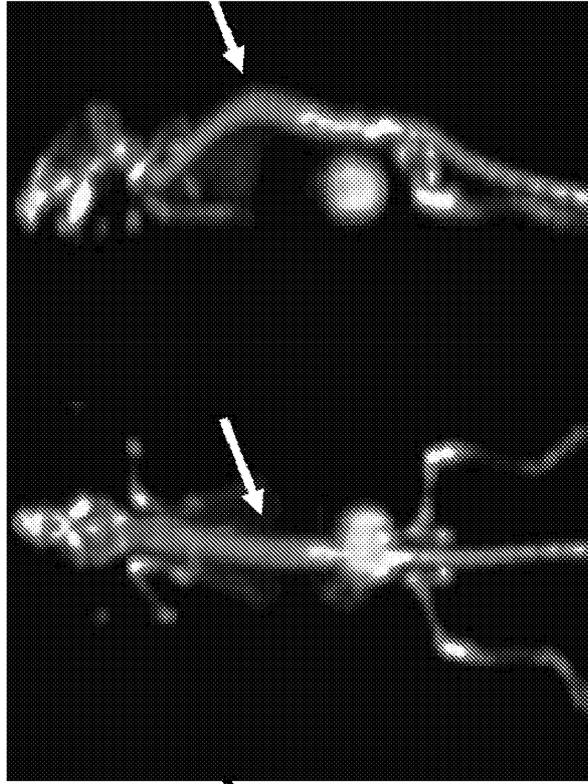


Figura 18G

Figura 18H

RATONES NO TRATADOS

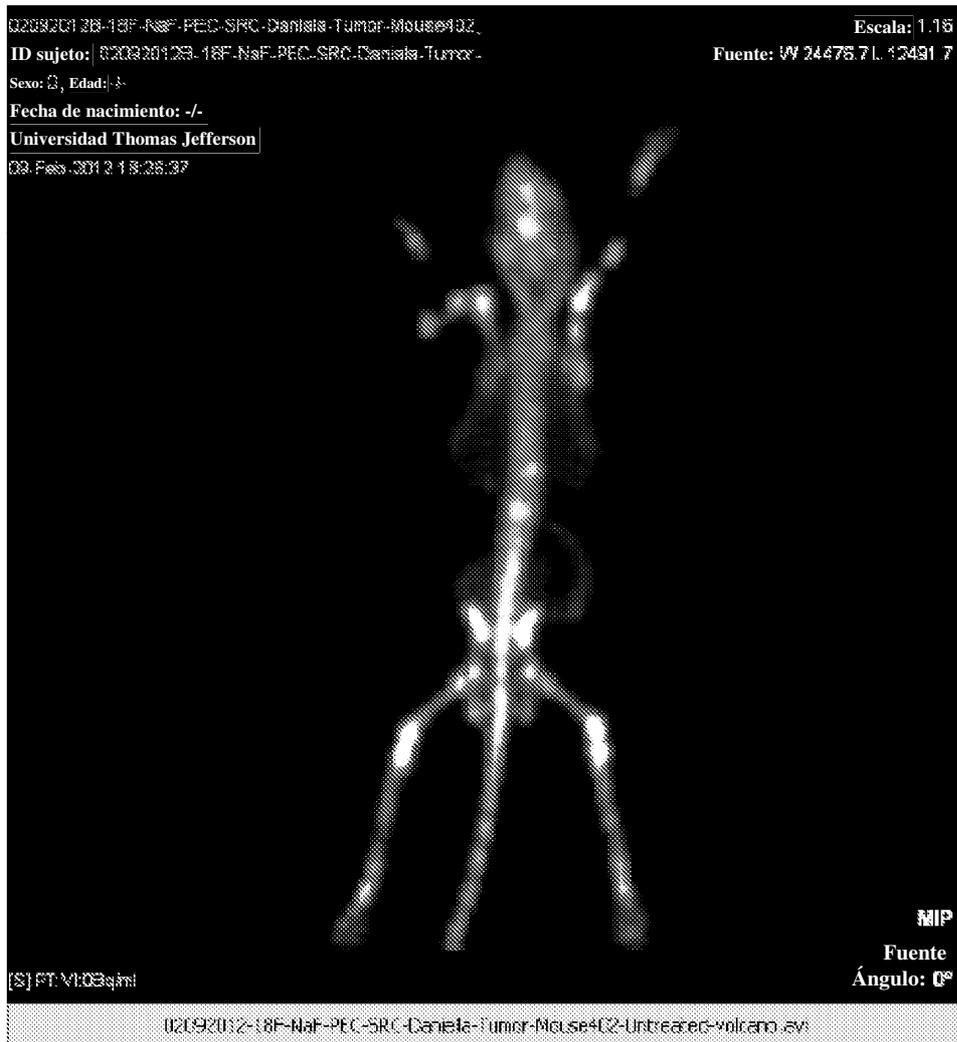


Figura 19A