

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2015/197884 A1

(43) Fecha de publicación internacional
30 de diciembre de 2015 (30.12.2015) **WIPO | PCT**

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 5/09 (2010.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2015/000080

(22) Fecha de presentación internacional:
19 de junio de 2015 (19.06.2015)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201400512 27 de junio de 2014 (27.06.2014) ES

(71) Solicitante: **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID** [ES/ES]; Avenida de Séneca 2, Ciudad Universitaria, E-28040 Madrid (ES).

(72) Inventores: **ILLERA DEL PORTAL, Juan Carlos**; Dpto. de Fisiología (Fisiología Animal), Facultad de Veterinaria, Avenida Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid (ES). **PEÑA FERNÁNDEZ, Laura**; Dpto. de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Avenida Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid (ES). **CÁCERES RAMOS, Sara**; Dpto. de Fisiología (Fisiología Animal), Facultad de Veterinaria, Avenida Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid (ES).

(74) Mandatario: **TERMIÑO CENICEROS, Ignacio**; c/Amador de los Ríos, 1-1º, E-28010 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: CELL LINE OF CANINE INFLAMMATORY MAMMARY CARCINOMA

(54) Título : LÍNEA CELULAR DE CARCINOMA INFLAMATORIO MAMARIO CANINO

(57) Abstract: The invention relates to an established cell line of canine inflammatory mammary carcinoma, of triple-negative basal epithelial cells. The invention also relates to a method for achieving stable xenotransplants of canine inflammatory mammary carcinoma in animals for testing, and to the use of the cell line and xenotransplants in the study of both canine inflammatory mammary carcinoma and human inflammatory breast carcinoma and to the use thereof for the *in vitro* identification of therapeutically useful compounds for the treatment of human inflammatory breast cancer. The invention further relates to a kit for the *in vitro* study of canine IMC and/or human IBC, of pharmaceuticals that are potentially useful against human IBC, including the cell line of the invention.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a una línea celular establecida de carcinoma inflamatorio mamario canino, de células epiteliales basales triple negativas. La invención también se refiere a un método para la obtención de xenotransplantes estables de carcinoma inflamatorio mamario canino en animales de experimentación, y al uso de la línea celular y de los xenotransplantes en el estudio del carcinoma inflamatorio mamario canino así como del carcinoma inflamatorio mamario humano y su uso para identificar *in vitro* compuestos terapéuticamente útiles para el tratamiento del cáncer inflamatorio mamario humano. También se refiere a un kit para el estudio *in vitro* de IMC canino y/o IBC humano y de fármacos potencialmente utilizables frente al IBC humano, que incluye la línea celular de la invención.

WO 2015/197884 A1

Título

Línea celular de carcinoma inflamatorio mamario canino

Sector de la Técnica

- 5 La invención se encuadra dentro del campo de las líneas celulares animales, más concretamente en el de líneas celulares tumorales de alta malignidad. Particularmente, se relaciona con el establecimiento de líneas celulares de carcinoma inflamatorio mamario para su uso como biomodelos específicos para este tipo tumoral, para la evaluación y desarrollo de futuros sistemas de
- 10 pronóstico y tratamientos.

Estado de la técnica

- El cáncer inflamatorio mamario, conocido por sus siglas en inglés IBC ("Inflammatory Breast Cancer") es la neoplasia mamaria más agresiva y de
- 15 peor pronóstico en la mujer. Afortunadamente, es una enfermedad de baja prevalencia, aunque de elevada mortalidad. Clínicamente, es un tumor que presenta un curso clínico fulminante. Los signos clínicos iniciales aparecen en la piel que recubre el tejido mamario que se presenta con edema, eritema, aumento de la temperatura, "piel de naranja" y sensación de dolor en la piel
- 20 que recubre la glándula mamaria. Todos estos síntomas, característicos de inflamación, unidos al hecho de que frecuentemente no se observan nódulos mamarios, provocan que el diagnóstico inicial de cáncer sea difícil en muchas ocasiones, ya que se puede confundir con una dermatitis o mastitis. Es, sin embargo, un proceso tumoral muy agresivo y de difícil tratamiento.
- 25 Actualmente, el IBC se considera un tipo especial de cáncer mamario con características diferenciales desde el punto de vista genético, biológico, patológico y de comportamiento clínico. La histopatología revela un tumor de elevada malignidad que no está representado por un tipo histológico concreto. La única característica microscópica histológica diferencial del IBC respecto a
- 30 otros tumores mamarios malignos, es la presencia de una invasión tumoral masiva de los vasos linfáticos de la dermis que son los causantes, en último extremo, del edema y de otros signos de aparente inflamación. El tratamiento

actual "multimodal" que incluye quimioterapia agresiva y radioterapia, normalmente antes de emplear la cirugía, ha mejorado ligeramente el periodo libre de enfermedad y la supervivencia total. A pesar de todo, la supervivencia de las mujeres con IBC es muy baja. En los últimos años se han realizado

5 varios estudios sobre la caracterización inmunohistoquímica del IBC humano (receptores hormonales, proliferación tumoral, etc.) que proporcionan pronósticos y tratamientos más acertados para cada caso. Actualmente se siguen probando nuevos tratamientos que mejoren la supervivencia y tiempo libre de enfermedad de las pacientes con IBC y se buscan nuevos factores

10 pronóstico. Así mismo, es necesario encontrar biomodelos específicos para este tipo tumoral, especialmente para los casos que son triple negativos (negativos al receptor de estrógenos -RE-, al receptor de progesterona -RP- y al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano -HER-2-), ya que su tratamiento es aún más difícil. Hay pocos modelos disponibles que

15 permitan estudiar la peculiar biología de IBC, especialmente del IBC triple negativo. La mayoría de estudios se ha llevado a cabo usando las líneas celulares humanas SUM149 y SUM190. Las células SUM149 son triple negativas y las células SUM190 son negativas a RE/RP y positivas a HER-2. Otras líneas celulares IBC menos estudiadas son: MDA-IBC3, KPL4 y WIBC-

20 9 (todas RE/RP negativas y HER-2 positivas). En el último año, se ha descrito y caracterizado la nueva línea celular FC-IBC02, también triple negativa.

La posible utilización del modelo espontáneo canino es una opción muy interesante sobre todo para la evaluación y desarrollo de futuros tratamientos

25 y para el estudio del proceso metastásico. Los tumores mamarios caninos (TMC) son las neoplasias más frecuentes en la perra, especialmente en países mediterráneos, como España, donde la ovariectomía a edad temprana no se suele practicar, aumentándose de forma drástica el riesgo de padecer tumores mamarios en esta especie animal. Aproximadamente el 50%

30 de los TMC son malignos y de éstos, el carcinoma inflamatorio mamario canino, conocido por sus siglas en inglés IMC (*Inflammatory Mammary Cancer*) es el de mayor gravedad. Hasta que comenzaron nuestros trabajos

en este tipo tumoral, muy poco se conocía sobre su existencia en la perra, ya que sólo se había publicado una breve descripción que recogía las características clínicas más evidentes de diez animales afectados por IMC. La utilización del IMC canino como modelo comparativo animal viene avalada por su mayor prevalencia respecto a la mujer, por la menor duración de los estudios en esta especie animal (lo que permite obtener resultados de tratamientos y supervivencia en un tiempo relativamente corto) y por ser de carácter espontáneo, aunque quedan aspectos importantes de la enfermedad que merecen ser comparados entre ambas especies para poder validar los estudios en el modelo canino. Además, al ser la especie canina un animal de compañía, ambas especies están sometidas, en gran medida, a los mismos efectos ambientales, incluyendo algunos carcinógenos.

Aún así, existen varios problemas en el modelo canino de IMC espontáneo: su baja prevalencia, aunque ésta sea mayor que la del carcinoma inflamatorio humano, y que la evolución del tumor es tan rápida que no se pueden estudiar las fases iniciales de la enfermedad, ni es posible la predicción de la metástasis tumoral temprana.

En la investigación del carcinoma inflamatorio mamario canino, los inventores desarrollaron un biomodelo de xenotransplante en ratón obtenido directamente a partir de muestras de una perra con carcinoma inflamatorio (Camacho, L. *Res Vet Sci* (2013) 95(3): 1068-75). Los xenotransplantes descritos en este documento reproducían las características histológicas del tumor primario y eran positivos a los receptores hormonales y negativos al receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano. Podían, por lo tanto, utilizarse como modelo canino para el estudio del IBC.

Sin embargo, es necesario reducir la experimentación con animales vivos, para no causarles innecesariamente dolor, sufrimiento, angustia o lesión prolongados. Es fundamental, por lo tanto, encontrar métodos alternativos

que faciliten y mejoren el estudio de esta enfermedad que, a su vez, se puede utilizar como modelo para el estudio del cáncer inflamatorio mamario humano.

Descripción detallada de la invención

5 Línea celular de carcinoma inflamatorio mamario canino.

La presente invención se refiere a una línea celular establecida de carcinoma inflamatorio mamario canino. Al analizar la morfología celular de la línea se comprobó que se trata de células redondeadas o poligonales de grandes a
10 muy grandes (pueden alcanzar valores cercanos a los 600µm), con una alta malignidad citológica. El pleomorfismo celular y nuclear son muy marcados, con núcleos muy grandes y numerosos nucléolos, siendo también frecuentes las células multinucleadas. Se caracteriza, por lo tanto, por anisocitosis, anisocariosis y células multinucleadas. Además, se observa mimetismo
15 vascular en el cultivo, es decir, células que se asemejan a las células endoteliales de los capilares por presentar huecos vacíos de citoplasma pequeños y numerosos o grandes y en menor número.

Por otro lado, la caracterización inmunohistoquímica de la línea celular reveló
20 que se trata de células epiteliales basales y, además, resultó negativa en cuanto a la expresión del receptor de estrógeno (RE), el receptor de progesterona (RP) y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (tanto C-ERBb2 como HER-2).

25 Las células negativas a estos tres receptores se denominan triples negativas, tanto en el caso de los cánceres de mama en mujeres como en las perras, y son objeto de interés para la comunidad médica y científica desde hace varios años debido a la elevada agresividad de los cánceres de mama llamados triple negativos, al mal pronóstico que tienen y a las pocas herramientas
30 terapéuticas de las que se dispone para combatirlos, a lo que hay que sumar el hecho de que afectan frecuentemente a mujeres jóvenes y presentan un riesgo de metástasis muy elevado. Además, por el momento, no se ha podido

establecer una clasificación clara de los tumores triple negativos, tal vez debido a su elevada heterogeneidad.

En concreto, la invención se refiere a una línea celular procedente de una perra de raza mestiza de 10 años de edad. Internamente se ha denominado IPC-366, y se ha realizado su depósito, con fecha 22/05/2014, en el *National Bank for Industrial Microorganisms and Cell Cultures*, de Sofía (Bulgaria), obteniendo el número de acceso 8815.

El desarrollo de una línea celular triple negativa a partir de IMC canino permite el estudio del crecimiento tumoral y de sus mecanismos patogénicos *in vitro*, incluyendo las fases iniciales en las que los análisis son más difíciles de realizar debido a la rápida evolución del tumor. La línea celular de IMC canino IPC-366 es la única existente hasta el momento, su empleo sirve para realizar estudios comparativos de mecanismos patogénicos y terapéuticos (angiogénesis, motilidad, metástasis, respuesta a tratamientos, a factores de crecimiento) de esta enfermedad entre ambas especies (canina y humana) y, potencialmente, probar fármacos previamente a su administración en el modelo espontáneo canino, que tiene la ventaja de presentar un menor tiempo de espera ante los resultados, en comparación con la especie humana. El IMC canino es una neoplasia muy agresiva y sus células presentan una malignidad muy elevada, por lo que el desarrollo de una línea celular de IMC sirve también para estudiar los mecanismos de malignidad tumoral en general y metástasis con un modelo privilegiado, ya que tanto IBC como IMC se caracterizan por ser altamente linfangioinvasivos y linfangiogénicos.

Una vez establecida la línea celular, se ha comprobado que inoculándola directamente en ratones Balb-c/SCID se reproduce el tumor, con lo que se puede establecer un modelo de xenotransplante estable *in vivo*. Otro aspecto de la invención, por lo tanto, se refiere a un método para la obtención de xenotransplantes estables en ratón a partir de células de IMC canino triple

negativo, concretamente, a partir de la línea celular IPC-366. El desarrollo del xenotrasplante en ratón a partir de IPC-366 se produce rápidamente (a las 3 semanas aproximadamente), lo que da una idea de su elevada tumorigenicidad.

5

El uso de estos modelos, tanto el xenotrasplante como la línea celular, permite estudiar fases tempranas de la enfermedad y, en el caso de la línea celular, permite conocer los procesos patogénicos celulares directamente; además, una línea celular es fácil de transportar y es susceptible de ser utilizada en distintos laboratorios, por lo que se pueden unificar experimentaciones y resultados.

10

Otro aspecto de la invención se refiere a un kit para el estudio *in vitro* de IMC canino y/o IBC humano y de fármacos potencialmente utilizables frente al IBC humano que incluye la línea celular de la invención.

15

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Curva de crecimiento de la línea celular IPC-366. Se representa el número de células ($\times 10^5$) frente al tiempo en días (t). Se aprecia una fase de latencia (primeras 24 horas), una fase de crecimiento exponencial (siguientes 5 días) y una fase de meseta (séptimo día).

20

Figura 2: Morfología de la línea celular IPC-366. A: citología teñida con Diff-Quick (x4). B y C: corte en parafina de un pellet, teñido con Hematoxilina/Eosina (B, x10; C x40)

25

Figura 3: Pellet de la línea celular IPC-366, teñido con Hematoxilina/Eosina. A: morfología celular redondeada, tamaño variable. Medición mediante analizador de imágenes. La célula con la línea negra mide $26,03\mu\text{m}$. B: Espacio vacío citoplasmático que confiere a la célula aspecto de célula endotelial (flecha), fenómeno que se conoce como mimetismo vascular.

30

Figura 4: Células multinucleadas de alta malignidad citológica. Agregado basófilo redondeado en el citoplasma (flecha). Citología de IPC-366 teñida con Diff-Quick.

Figura 5: Morfología de la línea celular IPC-366 en un corte semifino teñido con azul de metileno. Marcada anisocitosis, anisocariosis, células multinucleadas y mimetismo vascular (flecha).

Figura 6: A: Células de núcleos grandes y nucléolos evidentes; mitosis. B: Célula de núcleo grande y nucléolo evidente con abundantes organelas, vacuolas y secreción proteica. C: Célula tumoral con secreción proteica. D: detalle de B. E: Célula tumoral con huecos vacíos citoplasmáticos recubiertos por membrana citoplásmica. F: Célula binucleada con hueco vacío en interior asemejándose morfológicamente a un capilar (mimetismo vascular).

Figura 7: Desarrollo de tumor 4 semanas después de ser trasplantadas las células de la línea celular IPC-366 en ratón BALB/c-SCID.

Figura 8: Xenotrasplante de IPC-366 en ratón BALB/c-SCID. Hematoxilina/ Eosina. A: tumor sólido que infiltra en dermis. B: émbolo tumoral en dermis (flecha), característica histológica del carcinoma inflamatorio mamario. C: Tumor a más aumentos (x40) mostrando las características citológicas de malignidad.

Figura 9: Xenotrasplante de IPC-366 en ratón BALB/c-SCID. Hematoxilina/ Eosina. A: Neovascularización tumoral. B: Mimetismo vascular. Nótese la diferencia entre las células que tapizan el espacio vascular en A y en B. En A los capilares están tapizados por células endoteliales normales. En B los espacios vasculares están tapizados por células tumorales de elevada malignidad.

Figura 10: Línea celular IPC-366. Técnica inmunohistoquímica de Streptavidina Biotina Peroxidasa anti-citoqueratinas de amplio espectro (AE1-AE3) como marcadores de células epiteliales en general. Células positivas. A: citología. B: pellet.

Figura 11: Línea celular IPC-366. Técnica inmunohistoquímica de Streptavidina Biotina Peroxidasa anti-vimentina como marcador de células mesenquimatosas y células en cultivo. La mayoría de las células son positivas. A: citología. B: pellet.

Figura 12: Pellet de línea celular IPC-366. Técnica inmunohistoquímica de Streptavidina Biotina Peroxidasa anti-citoqueratina de células epiteliales basales (CK 14). Células positivas.

Figura 13: Línea celular IPC-366. Técnica inmunohistoquímica de Streptavidina Biotina Peroxidasa anti-p63 como marcador de células mioepiteliales. Células negativas. A: citología. B: pellet.

Figura 14: Línea celular IPC-366. Técnica inmunohistoquímica de Streptavidina Biotina Peroxidasa anti-actina de músculo liso como marcador de células mioepiteliales. Células negativas. A: citología. B: pellet.

Figura 15: Pellet de línea celular IPC-366. Técnica inmunohistoquímica de Streptavidina Biotina Peroxidasa. A: anti-receptor de estrógenos. B: anti-receptor de progesterona. C: anti-HER-2 Dako. D: anti-HER-2 P4. Células negativas.

Figura 16: Línea celular IPC-366. Técnica inmunohistoquímica de Streptavidina Biotina Peroxidasa anti-Ki-67 como marcador de proliferación celular. Numerosos núcleos positivos, es decir, alto índice de Ki-67.

Modo de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

1. Cultivo primario de carcinoma inflamatorio mamario canino

La línea celular IPC-366 se consiguió a partir de muestras de un carcinoma mamario inflamatorio canino tomadas inmediatamente después del sacrificio humanitario del animal (una perra hembra de raza mestiza de 10 años de edad) para la realización del cultivo primario como se detalla a continuación. El tumor se recogió en condiciones de esterilidad y se mantuvo en una solución HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) + 1% de antibiótico penicilina-streptomycin. Se lavó bien el tumor con la misma solución HBSS y se cortó en pequeños fragmentos.

Para realizar la digestión de los fragmentos tumorales, se introdujeron en un tubo Falcon con colagenasa III y se dejaron en agitación continua a 37°C durante 2 horas. En ese tiempo se ayudó a la digestión del tejido realizando una disgregación mecánica con la pipeta.

5

Una vez realizada la digestión del tejido, se filtraron los fragmentos con un *cell Strainer* y se inactivó la colagenasa añadiendo medio DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* / mezcla de nutrientes F12) con 10% suero fetal bovino (SFB). Posteriormente, se procedió a centrifugar el contenido (1000 rpm, 2 min, 4°C).

10

El sedimento o pellet resultante se resuspendió en medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con 10% SFB; 1% de L-glutamina (Sigma); 1% antibiótico penicilina-streptomycin. Por último, el contenido se transfirió a frascos de cultivo T-75 cm² (en concreto, 3 frascos) los cuales se mantuvieron en estufa a 37°C con un 5% de CO₂.

15

Cada 7 días se cambió el medio de cultivo por medio de cultivo fresco para limpiar el cultivo y nutrir a las células. Las células tardaron en adherirse 24 horas, aproximadamente. A la semana de cultivar las células, se empezó a ver proliferación celular. El progreso del cultivo se monitorizó mediante su observación al microscopio. Cuando la confluencia celular alcanzó, aproximadamente, un 75%, las células fueron despegadas con tripsina y transferidas a otro frasco de cultivo.

20

25

2. Establecimiento de la línea celular IPC-366

A partir del cultivo primario obtenido según se describe en el ejemplo 1, se estableció la línea celular IPC-366. Tal y como se ha indicado anteriormente, cuando la confluencia celular en un frasco de cultivo, alcanzó aproximadamente un 75%, las células fueron despegadas con tripsina y transferidas a otro frasco de cultivo (esta acción es lo que se conoce como "pase"). Este hecho se repitió sucesivamente a lo largo de un año y medio.

30

Como se ha comentado, para que una línea celular sea estable debe superar la sucesiva transferencia en nuevos frascos de cultivo. En marzo de 2014, la línea celular IPC-366, superó satisfactoriamente 50 pases, lo que indica su estabilidad y crecimiento ilimitado.

5

3. Criopreservación de la línea celular IPC-366

3.1. Congelación celular

Con el fin de observar si la línea celular resiste la criopreservación, a los 20 pases, se congelaron las células de 3 frascos de cultivo en crioviales de 2ml.

10

Para ello, se extrajo el medio de cultivo de los frascos de cultivo y se lavó con solución HBSS. Se agregaron 3 ml de Trypsin-EDTA Solution al 0,25% y se dejó incubando a 37°C entre 1 y 5 minutos. Al trasluz se puede ver que las células se han despegado, o bien, se observa en el microscopio invertido si las células se van redondeando, lo que indica que se están despegando.

15

Sin desechar la tripsina, se añadió la misma cantidad de medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con 10% de SFB (3 ml) para inactivarla.

20 Se recogió todo el contenido del frasco de cultivo y se depositó en un tubo Falcon. Se centrifugó a 1000 rpm, 5 min a 20°C. Se quitó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1ml de medio de cultivo DMEM/F12 suplementado con 10% SFB; 1% de L-glutamina; 1% antibiótico penicilina-streptomycin. Se congeló un mínimo de 1×10^6 células para que, al descongelar, la viabilidad fuera mayor. Por lo tanto, fue necesario en cada caso el conteo de las células. En un criovial, se añadieron 0,2 ml de DMSO y 0,8 ml de SFB (de esta forma se congeló con un 10% de DMSO y un 40% de SFB).

25

Por último, se enfriaron las células poco a poco hasta congelarlas finalmente siguiendo los siguientes pasos. Primero se dejaron los crioviales 15-20 min en nevera. Luego, se dejaron otros 15-20 minutos en congelador a -20°C. Finalmente, se conservaron en congelador de -80°C, debidamente

30

etiquetados. Pasada una semana, se ultracongelaron en un tanque de nitrógeno líquido.

3.2. Descongelación Celular

- 5 Transcurridas 2, 3, y 4 semanas del proceso de congelación, se procedió a descongelar los crioviales. En primer lugar se pusieron a descongelar a 37°C. Una vez descongelados, se añadió el contenido del criovial en un Falcon con 20ml de medio DMEM/F12 sin suplementar. Se centrifugó el contenido a 1000 rpm, 5 min a 20°C y se resuspendió el pellet en medio de cultivo DMEM/F12
- 10 suplementado con 10% SFB, 1% de L-glutamina, 1% antibiótico penicilina-streptomicina. Se homogeneizó y se cultivó en un frasco de cultivo de 25 cm² que se incubó a 37°C.

- Las células, después de la crioconservación, presentaron buen crecimiento
- 15 en múltiples pases conservando, a priori, las características de la línea celular y con una viabilidad del 95-99%.

4. Crecimiento de la línea IPC-366

- Para saber cuál es el tipo de crecimiento de la línea celular, las células que se
- 20 encontraban en el pasaje 20 (pasaje óptimo para considerar establecida la línea celular) fueron subcultivadas en placas de cultivo en una concentración de 10⁵ células por pocillo. Se incubaron con medio DMEM/F12 suplementado con 10% SFB, 1% de L-glutamina, 1% antibiótico penicilina-streptomicina a 37°C. Cada día, durante una semana, se contaron las células de tres pocillos
- 25 usando un hemocitómetro. Se utilizó la media del conteo de cada día para, posteriormente, representarla y observar la evolución del crecimiento de las células en cultivo (Figura 1). Tras la fase de latencia, de adaptación de las células a las condiciones del cultivo, cuya duración fue de 24 horas, se observó que las células entraron en una fase de crecimiento exponencial
- 30 donde comenzaron a proliferar masivamente. Por último, al séptimo día, las células entraron en la fase de meseta, donde las células cesan de proliferar y comienza su diferenciación.

5. Morfología celular con microscopía óptica

5.1. La observación directa de las células en cultivo mediante el microscopio invertido reveló una morfología epitelioides y marcadas diferencias de tamaño (anisocitosis).

5.2. Observación de las células en citología y en corte de parafina. Tras la separación de las células del frasco de cultivo mediante tripsinización (añadir 3ml de tripsina al frasco de cultivo e incubar 1-2 min; posteriormente, desactivar la tripsina con medio de cultivo completo), se procedió a la centrifugación de todo el contenido del frasco de cultivo (células y medio de cultivo) en una centrífuga a 1000rpm, 5 min, a 20°C; se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento con 0,5 ml de tampón (TBS, *Tris Buffer Sulfate*, pH=7,4). Inmediatamente después se realizaron extensiones en varios portas y se tiñeron con la técnica de Diff Quick (Figura 2A). Para aumentar el número de células observadas se procedió a la inclusión de pellets en parafina. Para la observación de células mediante cortes histológicos en parafina, fue necesaria la obtención de un número suficiente de células. A partir de 1 a 3 frascos de cultivo, y tras tripsinización, se centrifugó a 1000rpm, 5 min, a 20°C, todo el contenido de los frascos de cultivo, eliminándose el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en formol tamponado y se procedió de nuevo a su centrifugado, obteniéndose el pellet. El pellet se incluyó en parafina siguiendo procedimientos rutinarios del laboratorio de anatomía patológica y se cortaron secciones de 3-4 micras que se tiñeron, también de forma rutinaria, con la técnica de hematoxilina-eosina. La morfología de las células en citología y cortes de parafina fue semejante (Figura 2).

Se comprobó que se trata de unas células redondeadas o poligonales de grandes a muy grandes con una alta malignidad citológica. El pleomorfismo celular y nuclear son muy marcados. Los núcleos son muy grandes y

presentan evidentes y numerosos nucléolos; son frecuentes las células multinucleadas (Figuras 2, 3 y 4).

Se midieron los diámetros celulares, nucleares y nucleolares en 12 campos de un pellet, con el objetivo de 40 aumentos y mediante el analizador de imágenes Image J (Tabla 1), siendo el tamaño celular entre 7,35 y 583,33 μm , el tamaño nuclear entre 5,255 y 13,385 μm (anisocariosis) y el tamaño de los nucléolos más evidentes entre 3,744 y 8,245 μm .

10 Tabla 1: Medidas celulares

Campo x40	Diámetro celular (μm)	Diámetro núcleos (μm)	Diámetro nucléolos (μm)
1	33,467	12,145	4,836
2	26,975	7,204	5,143
3	436,130	12,423	8,229
4	24,499	8,103	8,245
5	26,263	7,145	3,917
6	9,021	5,864	4,095
7	8,103	5,681	8,132
8	31,397	11,041	7,810
9	7,350	13,385	3,744
10	9,531	5,255	6,020
11	9,575	5,755	3,910
12	583,33	11,041	5,530

El conteaje de células multinucleadas en 4 campos a 20 aumentos reveló una media de 8,72% de células multinucleadas por campo (Tabla 2).

15 Tabla 2: Porcentaje de células multinucleadas

Campo x20	células multinucleadas	células no multinucleadas	total células/campo	% células multinucleadas/campo
1	26	168	194	13,40
2	12	235	247	4,85
3	23	214	237	9,70
4	15	254	269	5,57
Total	76	871		

Las células presentan frecuentemente en el citoplasma espacios blancos “vacíos” y en ocasiones se asemejan a las células endoteliales de un capilar, fenómeno conocido como mimetismo vascular (Figura 3), y que se ha descrito en cáncer inflamatorio mamario humano y canino, así como agregados
5 citoplasmáticos basófilos de forma redondeada más teñidos con la hematoxilina (Figura 4).

6. Morfología con microscopía electrónica

A partir de un pellet de células tripsinizadas y fijadas en glutaraldehído se
10 siguió el método de procesamiento rutinario para microscopía electrónica que se lleva a cabo en el Centro Nacional de Microscopía Electrónica (UCM), donde se procesaron las muestras. La observación de cortes semifinos (1 μm) previos a los cortes ultrafinos permitió confirmar la morfología ya descrita: marcada anisocitosis, anisocariosis, células multinucleadas y mimetismo
15 vascular (Figura 5). Las células son de alta malignidad, presentan una superficie cubierta por prolongaciones cortas citoplasmáticas, presentan numerosas organelas y productos de secreción, y con frecuencia se ven células con huecos vacíos citoplasmáticos pequeños y numerosos, o más grandes y en menor número, asemejándose a células endoteliales de
20 capilares (mimetismo vascular) (Figura 6).

7. Tumorigenicidad

La línea celular IPC-366 (10^7 células/animal) se inoculó a dos ratones macho y dos hembras BALB/c-SCID, previamente anestesiados, en el flanco ventral
25 derecho, a la altura de la segunda mama y de forma subcutánea. La implantación y desarrollo de la línea celular IPC-366 en los ratones demuestra su tumorigenicidad (Figura 7). A las tres semanas de la inoculación se observó por palpación la presencia de una masa tumoral, y cuatro semanas después, cuando el tumor superó los 2cm^3 , se procedió al sacrificio de los
30 animales, y extracción de los tumores y sus metástasis (en pulmón e hígado). La existencia de metástasis a distancia reveló la capacidad metastásica de la línea celular en xenotrasplante. Las muestras se fijaron en formol tamponado

y se incluyeron en parafina para estudio histológico. Histológicamente se observaron tumores muy infiltrantes en dermis, que en ocasiones ulceraban epidermis, formados por células agrupadas de forma sólida, con semejante morfología a la descrita en los ejemplos 5 y 6, y elevado índice mitótico. Se encontraron émbolos en los capilares de la dermis, lo que reproduce el patrón característico del cáncer inflamatorio mamario (Figura 8). Así mismo, se evidenciaron imágenes de mimetismo vascular (Figura 9).

8. Caracterización del fenotipo inmunohistoquímico de la línea celular IPC-366

Mediante técnicas inmunocitoquímicas sobre citologías fijadas en acetona y en cortes de parafina procedentes de pellets, se analizaron diversos marcadores de caracterización tumoral utilizados para identificar líneas celulares epiteliales en general y células neoplásicas mamarias en particular. Se empleó la técnica inmunocitoquímica (citologías) e inmunohistoquímica (pellets) de streptavidina biotina peroxidasa. Los resultados se recogen en la Tabla 3. Las células fueron positivas a citoqueratinas de amplio espectro (AE1/AE3), lo que indicó su origen epitelial (Figura 10), y a vimentina (marcador de células mesenquimatosas) (Figura 11), lo que es habitual en células epiteliales de alta malignidad y en células en cultivo. La mayoría expresaron CK14 (marcador de células epiteliales basales), indicando que se trataba de epiteliales basales (Figura 12). Por el contrario, las células fueron negativas a p63 (Figura 13) y actina (Figura 14), lo que indicó que no se trataba de células mioepiteliales. Los receptores hormonales receptor de estrógenos α (RE) y receptor de progesterona (RP) fueron también negativos, así como el marcador *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2* (C-ERBb2, también conocido como HER-2), de dos casa comerciales (Dako y Novocastra) que resultó negativo siguiendo las recomendaciones internacionales de evaluación de este marcador (ASCO: *American Society of Clinical Oncology*) (Figura 15). Los resultados recogidos en este ejemplo 8 indican que IPC-366 está formada por células epiteliales basales triple negativas que sobreexpresan COX-2. Según la información de que disponen

los inventores, IPC-366 es la única línea celular establecida de carcinoma inflamatorio canino triple negativo.

La proliferación celular medida con Ki-67 mediante técnica
5 inmunohistoquímica es muy alta (índice de Ki-67 de 87,15%) (Tabla 3).

Tabla 3. Resultados de marcadores inmunohistoquímicos en pellet.

Marcador tumoral	Células positivas	Células negativas	Total	% positividad	
AE1/AE3	331	17	348	95,11%	positivo
CK14	362	29	391	92,58%	positivo
Vimentina	215	50	265	81,14%	positivo
Actina	0	234	234	0	negativo
p63	0	210	210	0	negativo
COX-2	340	18	358	94,97%	positivo
RE	0	235	235	0	negativo
RP	1	285	286	0,34%	negativo
HER2 DAKO	15	263	278	5,39%	negativo
HER2 P4	1	204	205	0,48%	negativo
Ki67	95	14	109	87,15%	índice de Ki-67

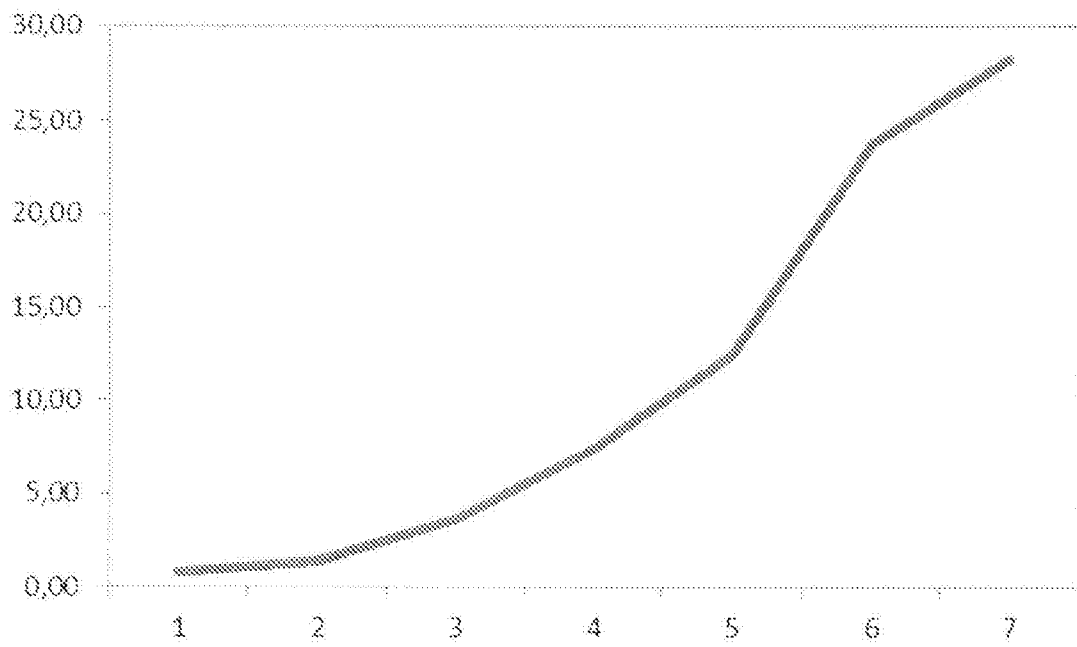
REIVINDICACIONES

1. Línea celular establecida de carcinoma inflamatorio mamario (IMC) canino constituida por células basales que son negativas en cuanto a la expresión del receptor de estrógeno, el receptor de progesterona y el receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano.
2. Línea celular establecida, según la reivindicación 1, caracterizada por anisocitosis, anisocariosis, células multinucleadas y mimetismo vascular.
3. Línea celular establecida de IMC canino depositada en el *National Bank for Industrial Microorganisms and Cell Cultures*, de Sofía (Bulgaria), con número de acceso 8815.
4. Uso de una línea celular según cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en la elaboración de una composición para la obtención de xenotrasplantes estables de IMC canino en animales de experimentación.
5. Xenotrasplante estable en animales de experimentación constituido por células de IMC canino triple negativo definidas en cualquiera de las reivindicaciones 1-3.
6. Uso de una línea celular según reivindicaciones 1-3 en el estudio del IMC canino y/o del carcinoma inflamatorio mamario humano (IBC).
7. Uso de un xenotrasplante según reivindicación 5 en el estudio del IMC canino y/o del IBC humano.
8. Uso de una línea celular según reivindicaciones 1-3 en la identificación *in vitro* de compuestos terapéuticamente útiles para el tratamiento de IBC humano.

9. Kit para el estudio *in vitro* de IMC canino y/o IBC humano y de fármacos potencialmente utilizables frente al IBC humano, que incluye una línea celular definida según cualquiera de las reivindicaciones 1-3.

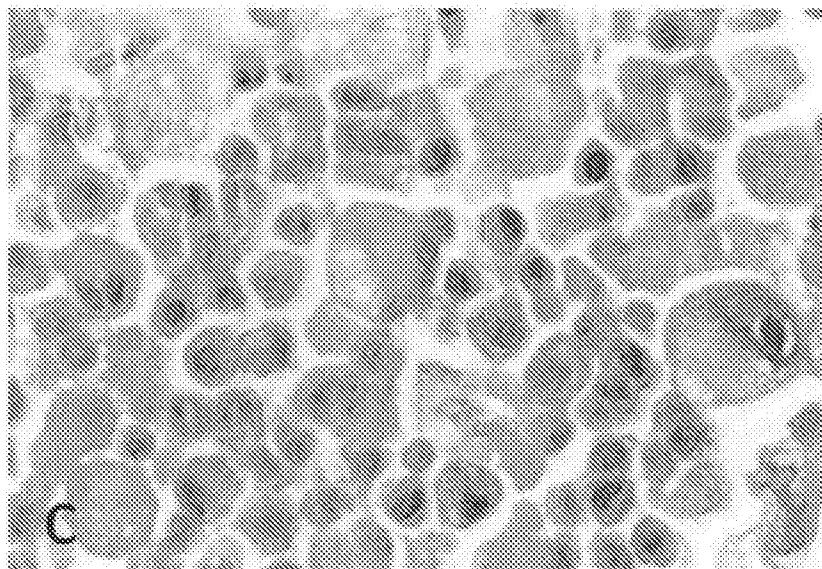
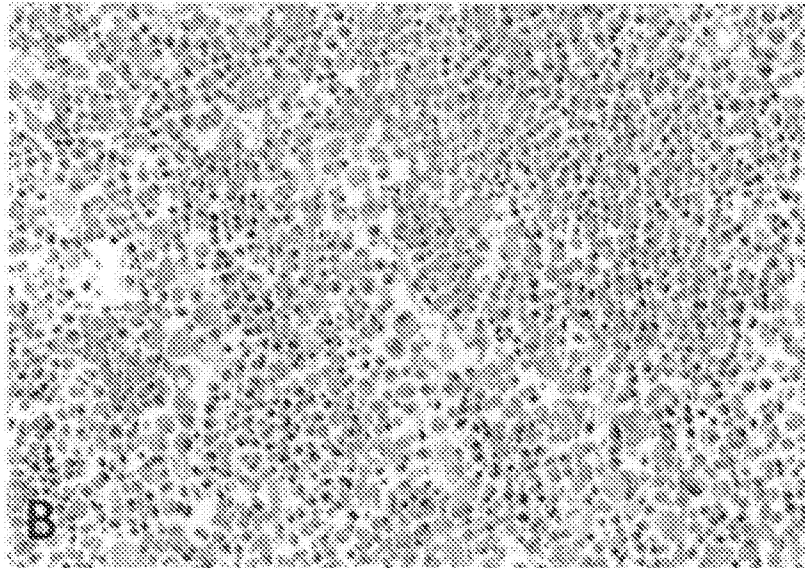
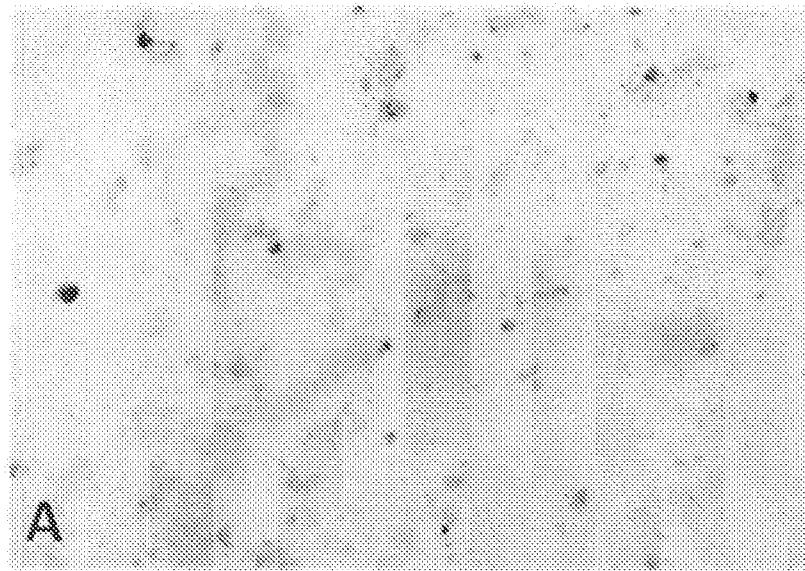
1/10

Fig. 1



2/10

Fig. 2



3/10

Fig. 3

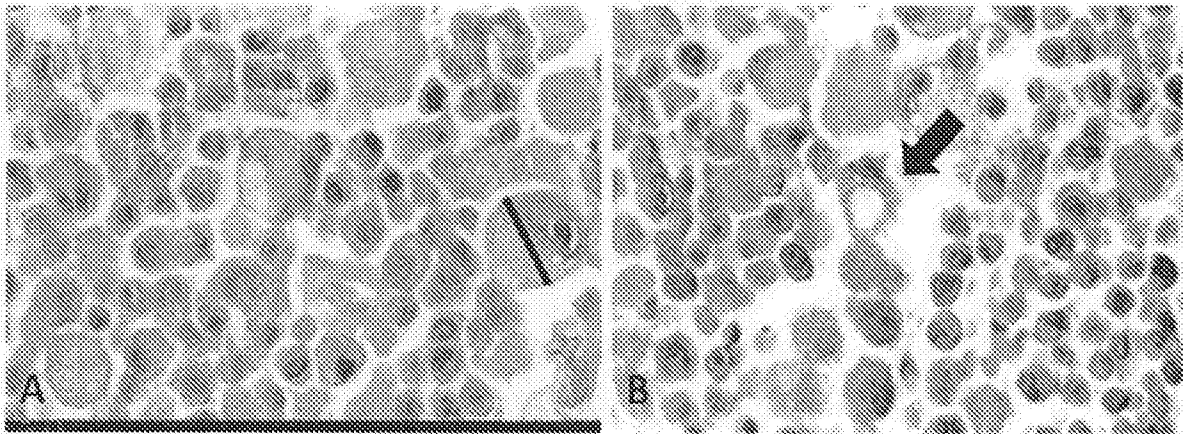


Fig. 4

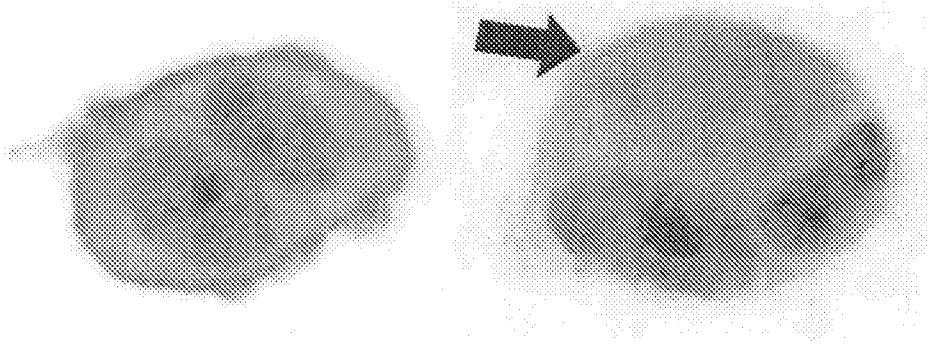


Fig. 5

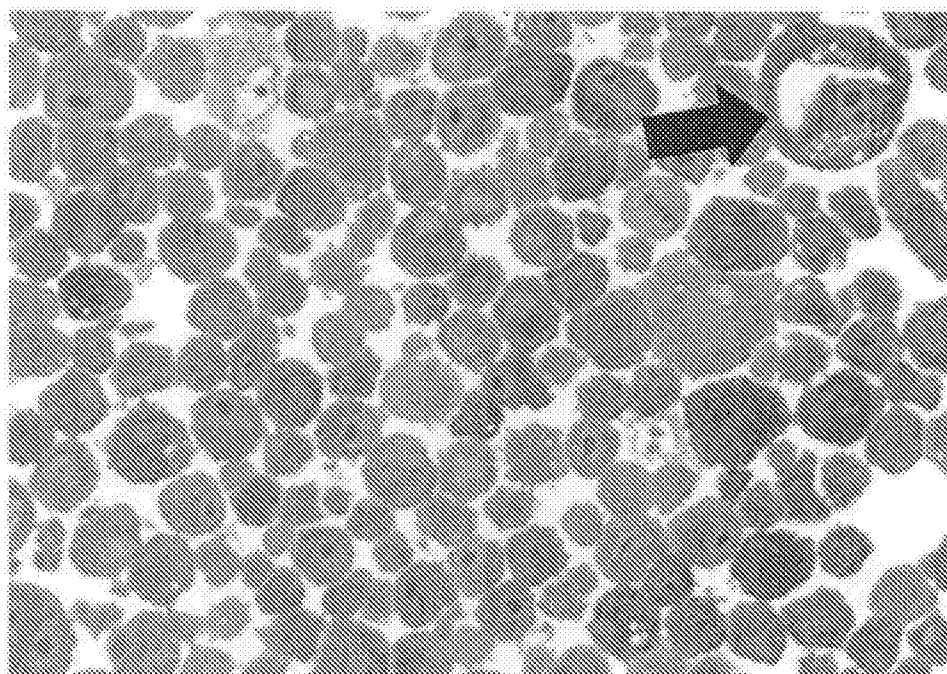


Fig. 6

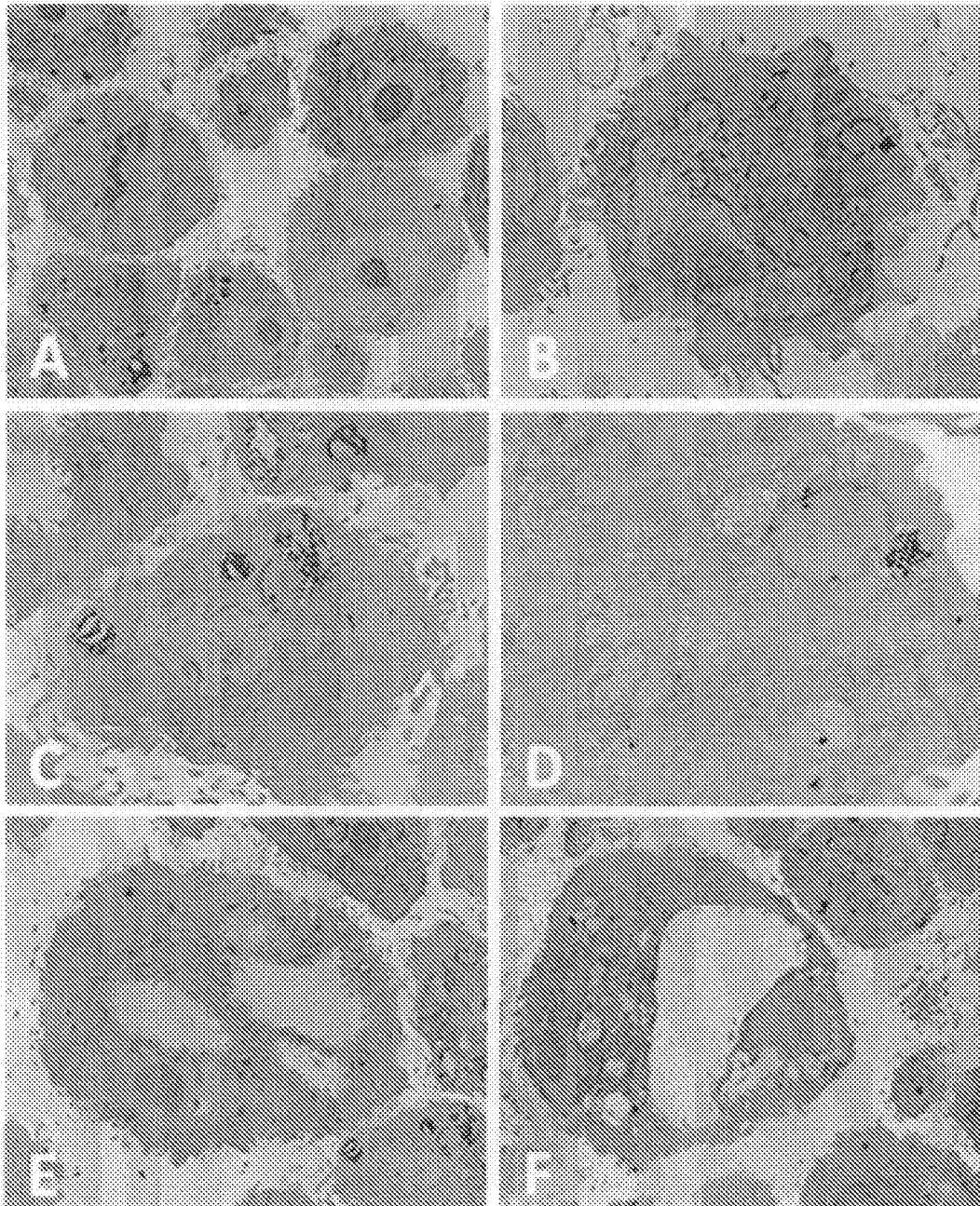


Fig. 7

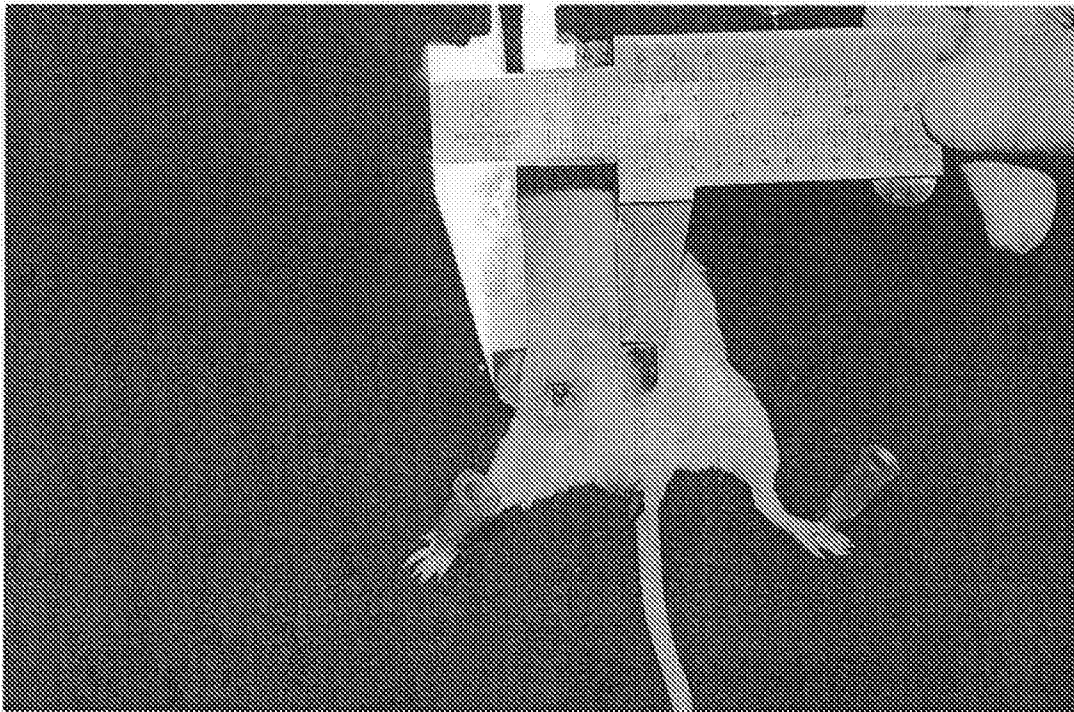


Fig. 8

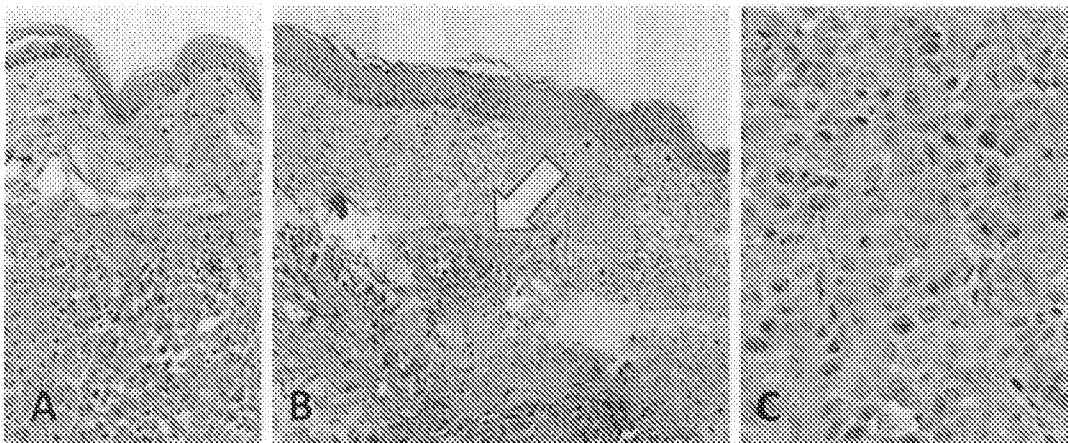
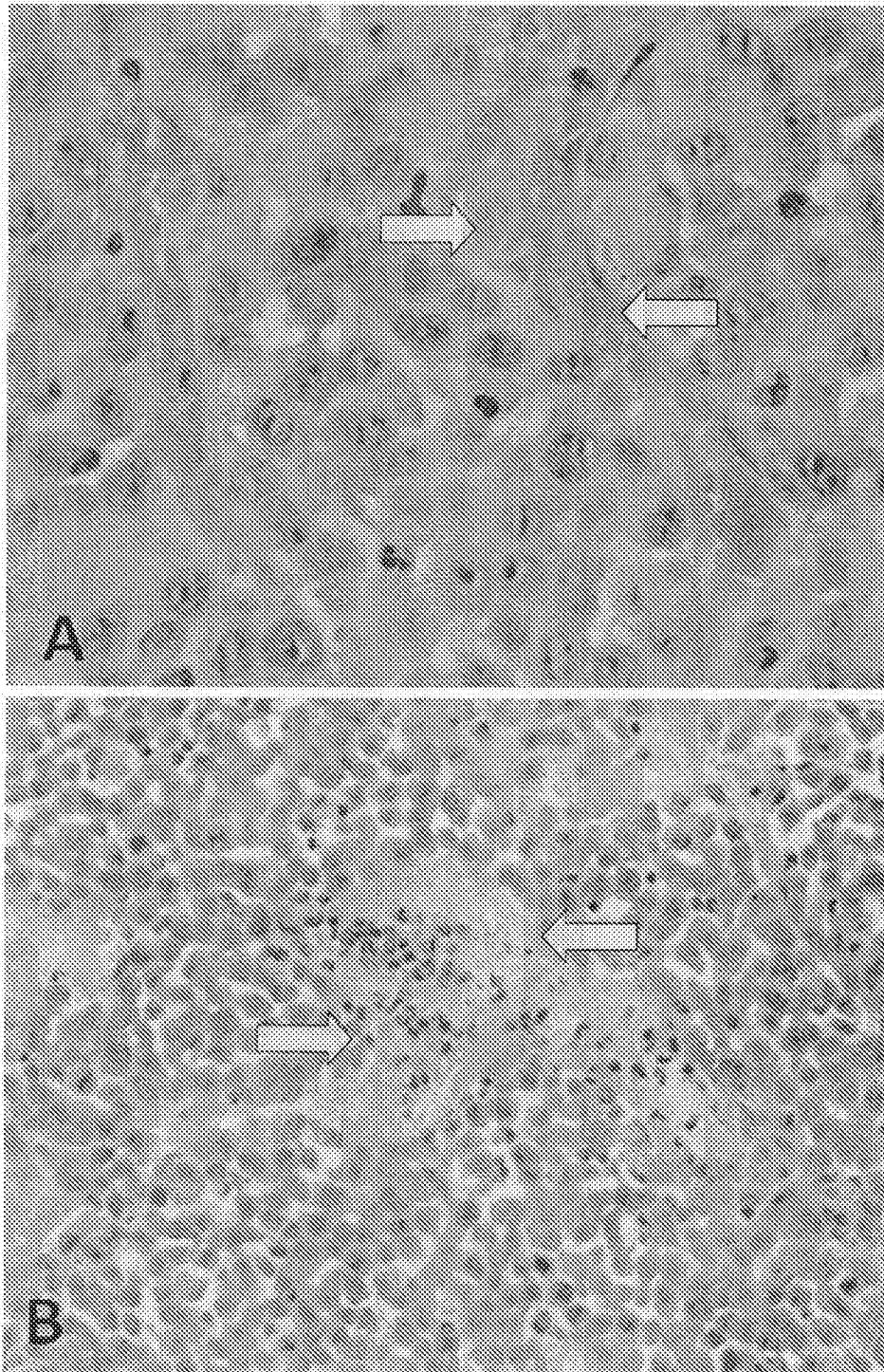


Fig. 9



7/10

Fig. 10

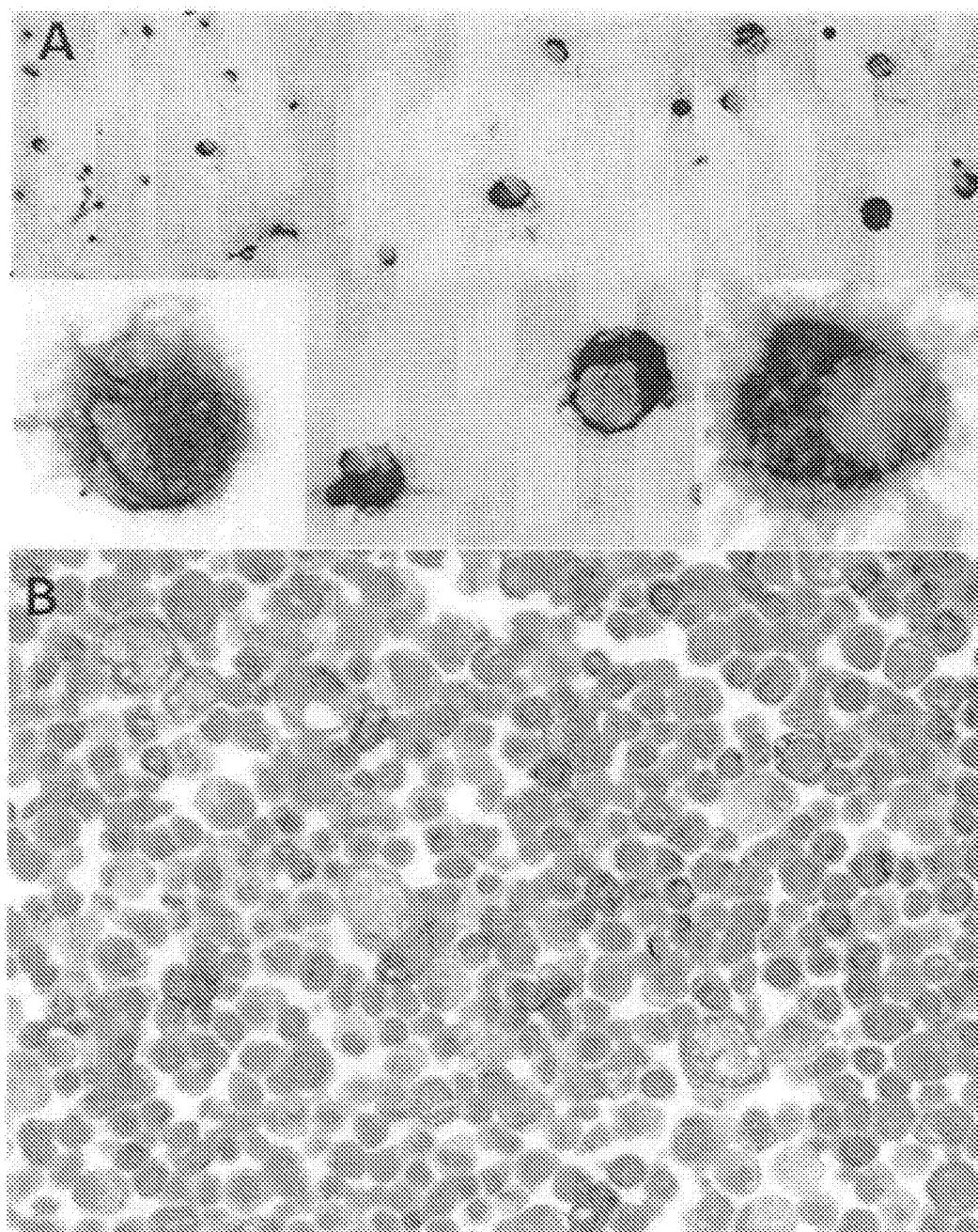


Fig. 11

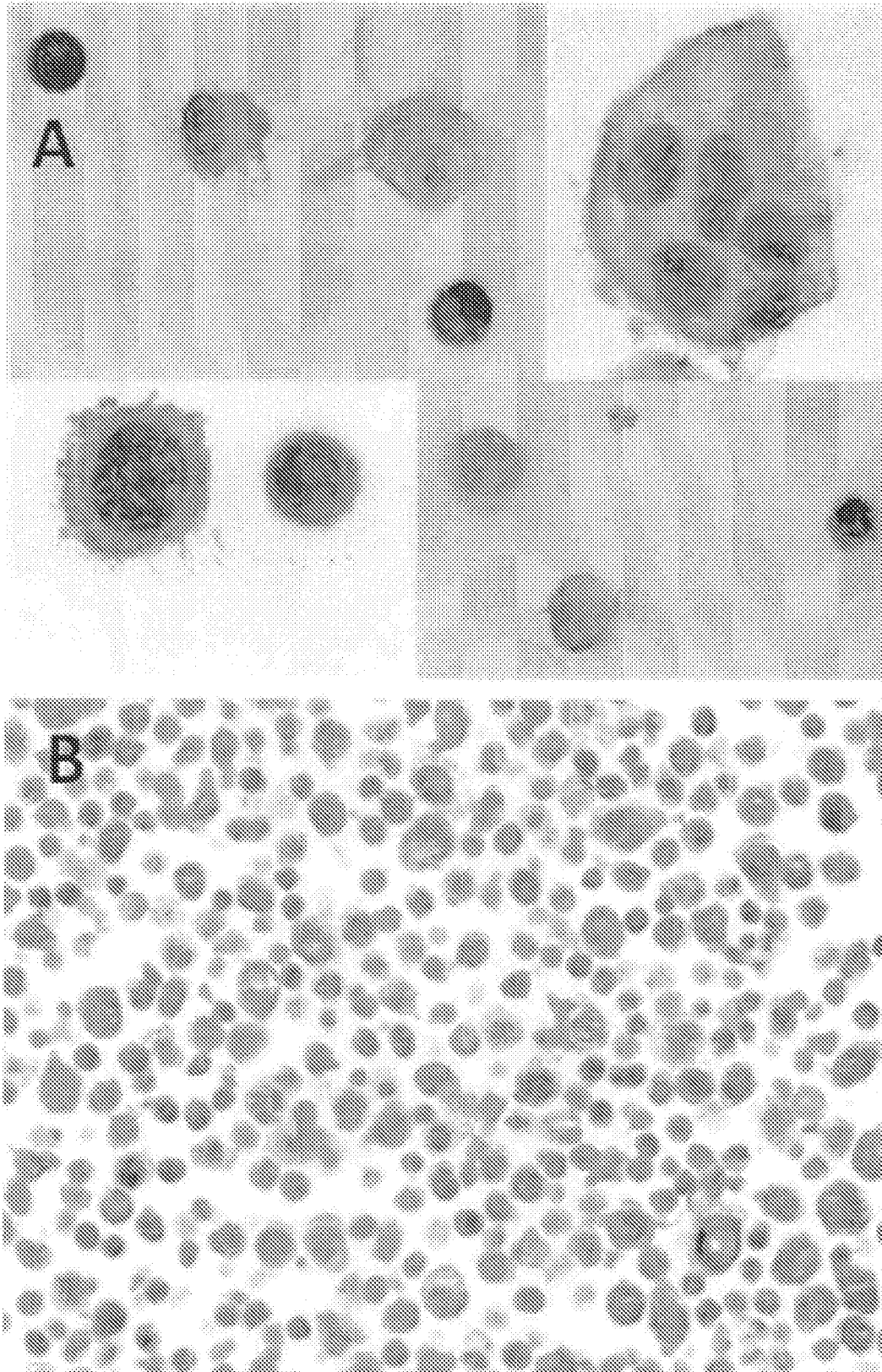


Fig. 12

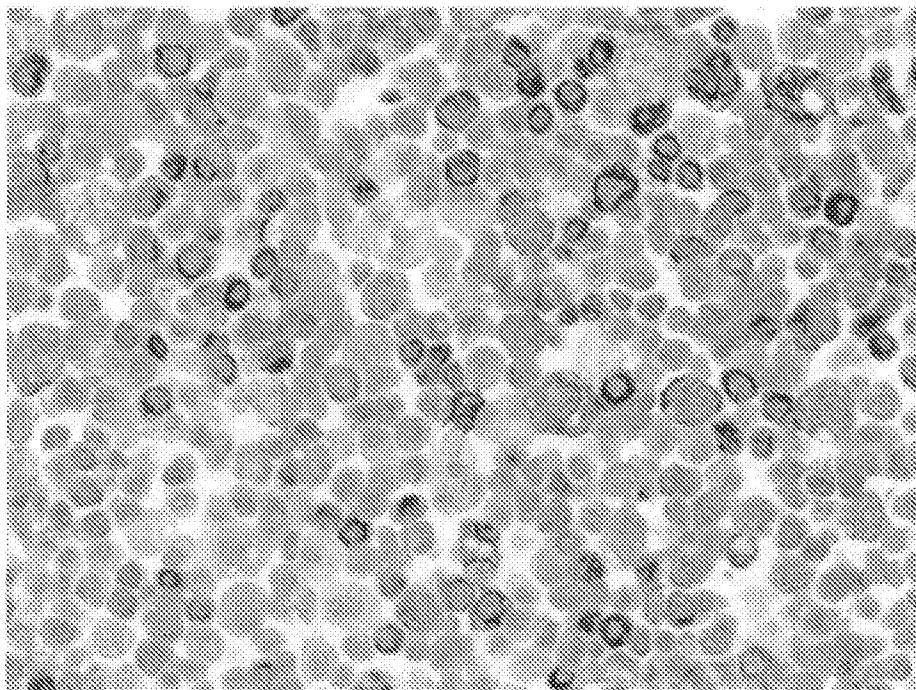


Fig. 13

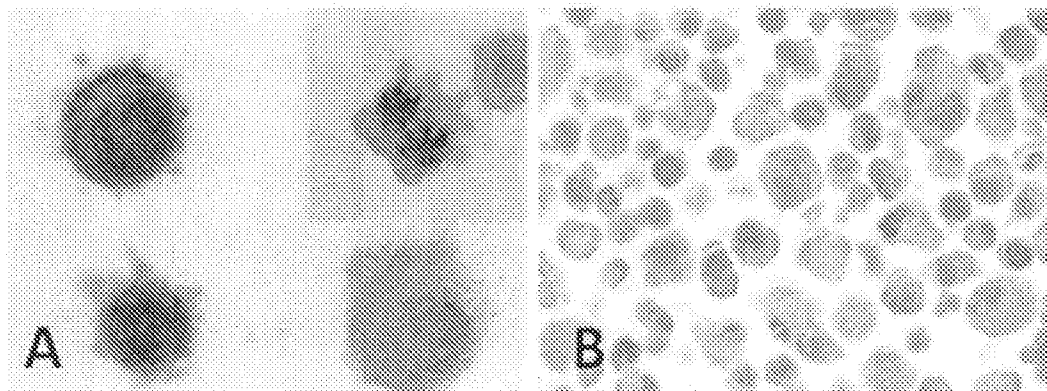
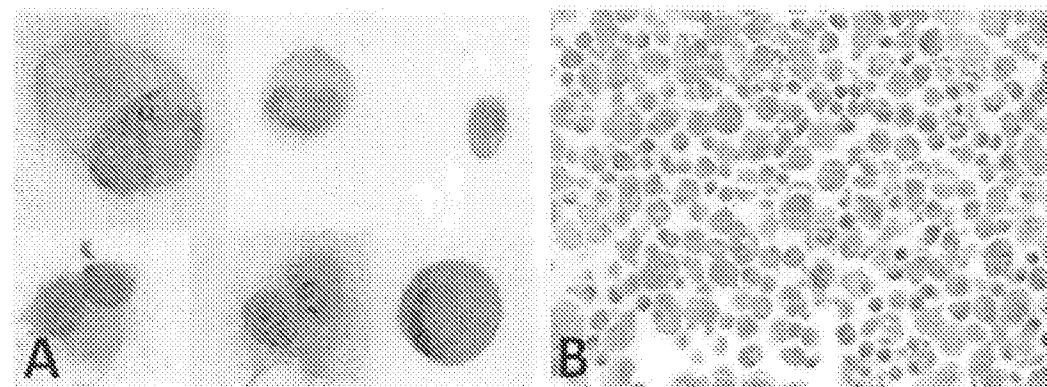


Fig. 14



10/10

Fig. 15

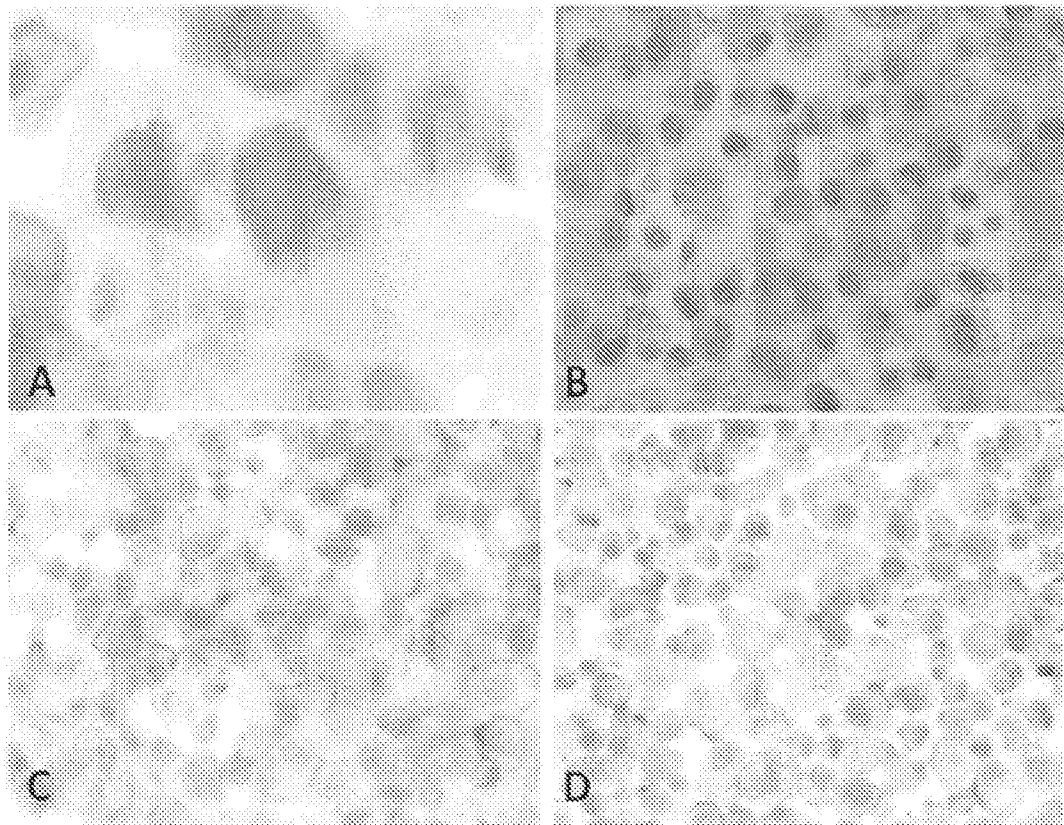
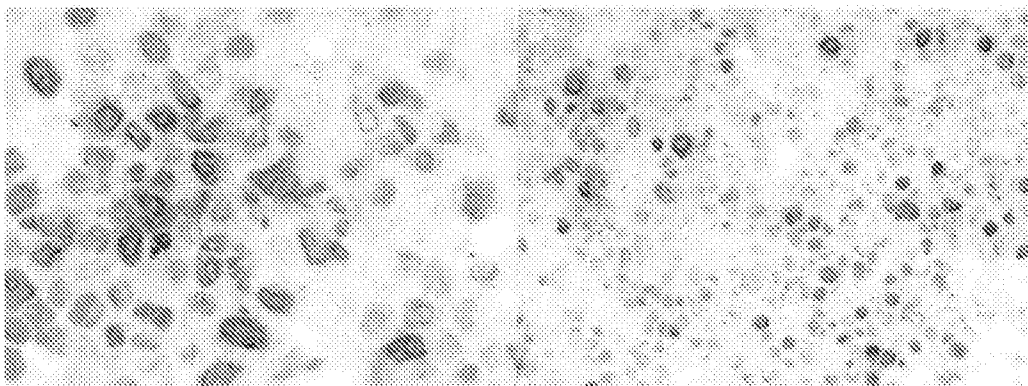


Fig. 16



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2015/000080

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N5/09 (2010.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

INVENES, EPODOC, WPIAP, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTUS4, TXTUS5, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, TXTAU1, TXTCA1, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KIM N. H., et al. Identification of triple-negative and basal-like canine mammary carcinomas using four basal markers. Journal of comparative pathology. England May 2013 VOL: 148 No: 4 Pags: 298 - 306 ISSN 1532-3129 (Electrónico) Doi: doi:10.1016/j.jcpa.2012.08.009pubmed:23079102. See the whole document.	1-9
A	US 2011085982 A1 (SEEWALDT VICTORIA L ET AL.) 14/04/2011, see paragraphs [0010- 0025]; examples 12 and 13; table 3 and claims.	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents , such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09/09/2015

Date of mailing of the international search report
(10/09/2015)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
B. Pérez Esteban

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3498484

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2015/000080

C (continuation).

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FERNANDEZ S. V., et al. Inflammatory breast cancer (IBC): clues for targeted therapies. Breast cancer research and treatment Netherlands Jul 2013 VOL: 140 No: 1 Pags: 23 - 33 ISSN 1573-7217 (Electrónico) Doi: doi:10.1007/s10549-013-2600-4 pubmed:23784380. See the whole document.	1-9
A	PINHO S. S., et al. Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis. Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine United States Mar 2012 VOL:159 No: 3 Pags: 165 - 172 ISSN 1878-1810 (Electrónico) Doi: doi:10.1016/j.trsl.2011.11.005 pubmed:22340765. See the whole document.	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2015/000080

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US2011085982 A1	14.04.2011	NONE	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES2015/000080

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD **C12N5/09** (2010.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
C12N

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

INVENES, EPODOC, WPIAP, TXTUS0, TXTUS1, TXTUS2, TXTUS3, TXTUS4, TXTUS5, TXTEP1, TXTGB1, TXTWO1, TXTAU1, TXTCA1, MEDLINE, BIOSIS, NPL, EMBASE, XPESP.

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	KIM N. H., et al. Identification of triple-negative and basal-like canine mammary carcinomas using four basal markers. Journal of comparative pathology. England May 2013 VOL: 148 No: 4 Pags: 298 - 306 ISSN 1532-3129 (Electrónico) Doi: doi:10.1016/j.jcpa.2012.08.009pubmed:23079102. Ver todo el documento.	1-9
A	US 2011085982 A1 (SEEWALDT VICTORIA L ET AL.) 14/04/2011, Ver párrafos [0010- 0025]; ejemplos 12 y 13; tabla 3 y reivindicaciones.	1-9

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
09/09/2015

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
10 de septiembre de 2015 (10/09/2015)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
B. Pérez Esteban
Nº de teléfono 91 3498484

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES2015/000080

C (Continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	FERNANDEZ S. V., et al. Inflammatory breast cancer (IBC): clues for targeted therapies. Breast cancer research and treatment Netherlands Jul 2013 VOL: 140 No: 1 Pags: 23 - 33 ISSN 1573-7217 (Electrónico) Doi: doi:10.1007/s10549-013-2600-4 pubmed:23784380.Ver todo el documento.	1-9
A	PINHO S. S., et al. Canine tumors: a spontaneous animal model of human carcinogenesis.Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine United States Mar 2012 VOL:159 No: 3 Pags: 165 - 172 ISSN 1878-1810 (Electrónico) Doi: doi:10.1016/j.trsl.2011.11.005 pubmed:22340765. Ver todo el documento.	1-9

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional nº

PCT/ES2015/000080

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
US2011085982 A1 -----	14.04.2011 -----	NINGUNO -----	-----