



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 301 268**

⑫ Número de solicitud: 200402559

⑬ Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **25.10.2004**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2008**

Fecha de la concesión: **08.04.2009**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **01.05.2009**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

⑲ Titular/es: **Centro de Investigación Biomolecular
Aplicada Salamanca, S.L.
Edificio España - Plaza España, 5-6
37004 Salamanca, ES**

⑳ Inventor/es: **Voces Sánchez, Felipe y
Sánchez García, Isidro**

㉑ Agente: **Arias Sanz, Juan**

㉒ Título: **Empleo del gen *Slug*, o de sus productos de replicación, transcripción o expresión, en la identificación, diagnóstico, prevención o tratamiento de la diseminación del cáncer y/o desarrollo de metástasis.**

㉓ Resumen:

Empleo del gen *Slug*, o de sus productos de replicación, transcripción o expresión, en la identificación, diagnóstico, prevención o tratamiento de la diseminación del cáncer y/o desarrollo de metástasis.

El gen *Slug*, sus productos de replicación, transcripción o expresión, así como productos relacionados con la regulación de dicho gen *Slug* o con la regulación, eliminación o degradación de sus productos de expresión o traducción, puede ser utilizado en la identificación, prevención o tratamiento de la diseminación o el desarrollo de metástasis en sujetos con cáncer, tal como un sujeto que padece un cáncer cuyas células cancerosas expresan el gen *Slug*.

ES 2 301 268 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Empleo del gen *Slug*, o de sus productos de replicación, transcripción o expresión, en la identificación, diagnóstico, prevención o tratamiento de la diseminación del cáncer y/o desarrollo de metástasis.

Campo de la invención

La invención se relaciona con el empleo del gen *Slug*, sus productos de replicación, transcripción o expresión, así como de productos relacionados con la regulación de dicho gen *Slug* o con la eliminación o degradación de sus productos de expresión o traducción, en la identificación, diagnóstico, prevención o tratamiento de la diseminación o el desarrollo de metástasis en sujetos con cáncer, tal como un sujeto que padece un cáncer cuyas células cancerosas expresan el gen *Slug*.

Antecedentes de la invención

Los recientes avances en el tratamiento del cáncer han puesto de manifiesto que para planificar un tratamiento adecuado del cáncer y determinar un pronóstico preciso es necesario disponer de métodos sensibles para detectar la existencia de cáncer, el tipo de cáncer y el estadio del mismo con el fin de conocer su localización concreta y su posible extensión a otros tejidos. Un diagnóstico preciso del cáncer puede contribuir a reducir el número de fallecimientos por esta causa y a mejorar la calidad de vida de los pacientes ya que permite seleccionar el tratamiento más adecuado (quimioterapia, resección quirúrgica, etc.) y reducir las incomodidades al paciente al definir el punto final del tratamiento terapéutico.

Los marcadores de pronóstico proporcionan información importante para el tratamiento y desarrollo del cáncer en los pacientes. De hecho, para la aplicación de terapia sistémica adyuvante en el tratamiento de algunos tipos de cánceres primarios, la identificación de los pacientes de alto y bajo riesgo constituye uno de los hitos principales. Se conocen diversos marcadores de pronóstico, tanto clásicos, por ejemplo, tamaño del tumor, estado del nódulo linfático, histopatología, estado del receptor de esteroides, como de segunda generación, por ejemplo, velocidad de proliferación, ploidía del ADN, oncogenes, receptores de los factores de crecimiento y algunas glicoproteínas, que resultan muy útiles para tomar decisiones terapéuticas (McGuire, W.L., Pronostic Factors for Recurrence and Survival, en "Educational Booklet American Society of Clinical Oncology", 25th Annual Meeting, 89-92 (1989); Contesso *et al.*, Eur. J. Clin. Oncol., 25:403-409 (1989)). Aunque ninguno de los marcadores de pronóstico conocidos satisface completamente el objetivo de distinguir entre pacientes de alto y bajo riesgo, la combinación de distintos marcadores puede mejorar la predicción del pronóstico de un paciente, por lo que continúa la búsqueda de nuevos marcadores de pronóstico que puedan añadirse a los existentes actualmente para colaborar en el pronóstico del cáncer, de su progresión y de la enfermedad residual tras tratamiento. No obstante, tan importante es el pronóstico del cáncer como el diagnóstico de la posible metástasis en aquellos pacientes que ya han desarrollado cáncer, determinar el estadio de severidad de la enfermedad de un sujeto con cáncer, ó monitorizar el efecto de la terapia administrada a un sujeto con cáncer.

Los elementos génicos responsables de la invasión y la metástasis del cáncer continúan siendo desconocidos. Sería conveniente, por tanto, identificar marcadores de diagnóstico de invasividad que pudieran ser analizados de forma sencilla.

Compendio de la invención

Ahora se ha encontrado, sorprendentemente, que en diferentes células cancerosas, tanto en células tumorales mesenquimales como carcinomatosas, se expresan niveles significativamente elevados del gen *Slug* y/o de sus productos de replicación, transcripción o traducción (ADNg, ARNm o proteína), cuando se comparan con células normales, lo que proporciona una alternativa a los métodos actuales de diagnóstico, pues posibilita el empleo del gen *Slug* y/o de sus productos relacionados como marcador diagnóstico de invasividad (diseminación del cáncer y/o invasión tumoral) y como diana terapéutica para modular dicha actividad invasora de las células cancerosas. Por tanto, la expresión o represión del gen *Slug*, sus productos de replicación, transcripción o expresión, así como de productos relacionados con la regulación de dicho gen *Slug* o con la eliminación o degradación de sus productos de expresión o traducción, puede ser utilizada para evaluar el riesgo de un sujeto que padece cáncer a desarrollar metástasis.

La expresión o represión del gen *Slug*, sus productos de replicación, transcripción o expresión, así como de productos relacionados con la regulación de dicho gen *Slug* o con la eliminación o degradación de sus productos de expresión o traducción, puede ser utilizada para evaluar la predisposición de un sujeto que padece cáncer, en particular, de un sujeto que padece un cáncer cuyas células cancerosas son *Slug+* (es decir, cuyas células cancerosas expresan el gen *Slug*), a desarrollar metástasis, o para evaluar la malignidad de un tumor, así como para evaluar el estadio de severidad de la enfermedad de un sujeto que padece cáncer y/o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un sujeto que padece cáncer.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* (i) para evaluar la predisposición de un sujeto con cáncer, tal como un sujeto que padece un cáncer cuyas células cancerosas son *Slug+*, a desarrollar metástasis, ó (ii) para determinar el estadio de severidad de la enfermedad de dicho sujeto con cáncer, ó (iii) para monitorizar el efecto de la terapia administrada a dicho sujeto con cáncer, que comprende analizar en una muestra de

sangre, o de un derivado de la misma, de dicho sujeto, al menos, un producto de replicación, transcripción o traducción del gen *Slug* específico de la especie de dicho sujeto y/o un producto relacionado con la regulación de dicho gen *Slug* o con la regulación, eliminación o degradación de sus productos de expresión o traducción.

- 5 En otro aspecto, la invención se relaciona con un inhibidor de *Slug* o de su función, en la elaboración de una composición farmacéutica para tratar, impedir o minimizar el desarrollo de metástasis en un sujeto con cáncer, tal como un sujeto que padece un cáncer cuyas células cancerosas son *Slug*+

Aspectos adicionales resultarán evidentes para el experto en la materia a la vista de la descripción.

10

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra la construcción del transgén CombitTA-*Slug* así como la expresión y efecto de *Slug* en la supervivencia de células Ba/F3 privadas del factor de crecimiento. La Figura 1A es una representación esquemática del vector CombitTA-*Slug*. La Figura 1B muestra el resultado del análisis de la expresión de *Slug* dependiente de tetraciclina, mediante RT-PCR para CombitTA-*Slug* en células Ba/F3 (-tet, +tet en el medio). Los productos de la PCR se transfirieron a una membrana de nylon y se analizaron con una sonda específica para *Slug*. Se usó la actina para asegurar la integridad del ADN y la homogeneidad de carga. La Figura 1C muestra los resultados de la supervivencia de células Ba/F3 que expresan *Slug* en ausencia de IL-3. Células que crecían exponencialmente en medio suplementado con IL-3 se llevaron a 5×10^5 células/ml el día 0, se retiró la IL-3 y se cultivaron. Se indica el número de células viables, de las células Ba/F3+p190, de las células Ba/F3 crecidas en presencia de IL-3 y de las células Ba/F3 transfectadas con *Slug* crecidas en ausencia de IL-3. La Figura 1D pone de manifiesto que la muerte celular cursa con nucleosomas en escalera tras la privación de IL-3. Veinticuatro horas después de la retirada de IL-3 se aisló el ADN de bajo peso molecular procedente de células Ba/F3+ BCR-ABL^{p190} (calle 1), Ba/F3 crecidas en presencia de IL-3 (calle 2), Ba/F3-Combi-*Slug* crecidas en ausencia de IL-3 y doxiciclina (-tet) (calle 3), y Ba/F3-Combi-*Slug* crecidas en ausencia de IL-3 y en presencia de doxiciclina (+tet) (calle 4). El ADN se marcó terminalmente con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP, se resolvió por electroforesis en gel de agarosa al 2% y se visualizó por autoradiografía.

La Figura 2 muestra la expresión del transgén en ratones transgénicos CombitTA-*Slug*. La Figura 2A muestra la identificación de los ratones transgénicos por análisis Southern del ADN de un pequeño fragmento de la cola tras digestión con EcoRI, se utilizó el ADNc de *Slug* de ratón para la detección del transgén. La expresión del transgén se demostró por RT-PCR (Figura 2B); se analizó la expresión de CombitTA-*Slug* y de *Slug* endógeno mediante RT-PCR de muestras tisulares procedentes de ratones CombitTA-*Slug* y control. Los productos de PCR se transfirieron a una membrana de nylon y se analizaron por hibridación con una sonda específica. Se usó actina para asegurar la integridad del ADN y la homogeneidad de carga. La Figura 2C muestra los resultados del análisis de la expresión de *Slug* dependiente de tetraciclina, mediante RT-PCR para CombitTA-*Slug*, de muestras de médula ósea de ratones *Slug* -/- (-tet, +tet en el medio).

La Figura 3 pone de manifiesto la presencia de cáncer mesenquimal en los ratones transgénicos CombitTA-*Slug*. La Figura 3A muestra el aspecto macroscópico de los cortes tisulares teñidos con hematoxilina/eosina del bazo de ratones de la cepa salvaje y CombitTA-*Slug*. El bazo de los ratones CombitTA-*Slug* muestra alteración de la arquitectura esplénica normal. La Figura 3B muestra el aspecto histológico de un tumor sólido desarrollado en ratones CombitTA-*Slug*, tras tinción con hematoxilina/eosina. La Figura 3C muestra el aspecto histológico de diferentes tejidos de los ratones CombitTA-*Slug*; las células que expresan *Slug* (células *Slug*+) desobedecen el orden social de los límites de órgano, migran individualmente y producen metástasis en diferentes zonas. La Figura 3D muestra las características fenotípicas de las leucemias de los ratones CombitTA-*Slug*; las células de la sangre de los ratones CombitTA-*Slug* se analizaron por citometría de flujo; las distintas células fueron identificadas con combinaciones específicas de anticuerpos; se analizaron 10.000 células de cada muestra y las células muertas se excluyeron mediante el análisis de la tinción por yoduro de propidio.

50

La Figura 4 muestra el fenotipo de los ratones CombitTA-*Slug* tras supresión de la expresión de *Slug* mediante tratamiento con tetraciclina. La Figura 4A muestra el resultado del análisis de la expresión de *Slug* dependiente de tetraciclina en sangre de los ratones transgénicos CombitTA-*Slug* (-tet, +tet en el agua), mediante RT-PCR. Se usó actina para asegurar la integridad del ADN y la homogeneidad de carga. La Figura 4B muestra las características fenotípicas (según el estudio de citometría de flujo) de las células de la sangre analizada y cortes de tejido teñidos con hematoxilina/eosina de ratones CombitTA-*Slug* tras la supresión de la expresión de *Slug* mediante tratamiento con tetraciclina (4 g/l) durante 4 semanas.

La Figura 5 ilustra la expresión de *Slug* en células que expresan BCR-ABL. La expresión de *Slug* de humano (h*Slug*) y de *Slug* de ratón (m*Slug*) se analizó por RT-PCR y los productos de la amplificación se transfirieron a una membrana de nylon y se analizaron por hibridación con una sonda específica. Se usó actina o ABL para asegurar la integridad del ADN y la homogeneidad de carga. La Figura 5A muestra el resultado del análisis de la expresión de *Slug* en células Ba/F3 que expresan BCR-ABL, tanto Ba/F3+p190 (calle 1) como Ba/F3+p210 (calle 2), y en células Ba/F3 (calle 3). La Figura 5B muestra los resultados de la expresión de *Slug* en sangre de los ratones transgénicos BCR-ABL^{p190} y BCR-ABL^{p210}; se recogieron los resultados de la sangre de los ratones control (calle 1) y transgénicos BCR-ABL^{p190} (calles 2 a 4) y BCR-ABL^{p210} (calles 5 y 6). La Figura 5C pone de manifiesto que *Slug* está presente en líneas celulares leucémicas humanas y en muestras de pacientes con t(9;22): sangre humana control (calle 1), la línea celular leucémica mieloide U937 (calle 2), las líneas leucémicas T ALL-SIL (calle 3) y KOPTI-KI (calle 4), la línea

65

celular leucémica pre-B 697 (calle 5), sangre de pacientes con t(9;22) (calles 6 a 8; los pacientes 1 y 3 presentaban Ph-B-ALL, y el paciente 2 una crisis mieloblástica), y las líneas celulares leucémicas t(9;22)-positivas K562 (calle 9), TOM-1 (calle 10) y Nalm-1 (calle 11).

La Figura 6 muestra que *Slug* es necesario para la génesis de tumores en ratones que expresan *BCR-ABL*. La Figura 6A muestra el aspecto histológico de frotis sanguíneos (tinción Giemsa) y de tejidos (cortes teñidos con hematoxilina-eosina). La Figura 6B muestra el resultado de un análisis por citometría de flujo de la médula ósea (bm, por sus siglas en inglés) y de la sangre (pb, por sus siglas en inglés) con combinaciones específicas de anticuerpos. Los ratones de los genotipos que se indican se cruzaron y se determinó el genotipo de su descendencia. Cabe destacar que los ratones BCR-ABL^{p190} sufrieron leucemia linfoblástica aguda (B-ALL), característica por la presencia de blastocitos que coexpresan Mac-1 y B220. Este tipo de leucemia se caracteriza también por la infiltración del bazo, hígado y los pulmones, y por la presencia de linfoblastocitos en los frotis sanguíneos. Sin embargo, los ratones BCR-ABL^{p190} no desarrollan leucemia en ausencia de *Slug* (*Slug* ^{-/-}).

La Figura 7 muestra el resultado del análisis de la expresión de h*Slug* en líneas celulares y tejidos de cáncer de mama. La expresión de *Slug* se analizó mediante RT-PCR. Carril 1: control positivo (línea humana que expresa *Slug*, K562); carril 3: control sin ADNc; carriles 4-7: tejidos primarios de cáncer de mama; carril 8: línea celular MCF-7.

La Figura 8 muestra el resultado del análisis de la expresión de h*Slug* en la sangre de individuos (humanos) sanos. Carril 1: control sin cDNA; carriles 2-3: sangre de individuos con cáncer de mama como control positivo; carriles 4-8: sangre de individuos sanos.

La Figura 9 muestra el resultado del análisis de la expresión de h*Slug* en la sangre de individuos (humanos) con cáncer de mama metastatizados. La expresión de h*Slug* se analizó mediante RT-PCR. Carril 1: línea celular K562 como control positivo; carril 3: control sin cDNA; carriles 4-9: pacientes con cáncer de mama metastatizado.

La Figura 10 muestra el resultado del análisis de la expresión de h*Slug* en pacientes (humanos) con cáncer de mama en estadio TNMO. La expresión de h*Slug* se analizó mediante RT-PCR. Carril 1: K562 como control positivo; carril 3: control sin ADNc; carril 4: cáncer de mama metastatizado; carriles 5-6: cáncer de mama estadios TNMO.

Descripción detallada de la invención

La invención se relaciona, en general, con el descubrimiento de que la expresión del gen *Slug* está relacionada con la diseminación del cáncer y/o con la invasión tumoral en un sujeto. Por tanto, la expresión o represión del gen *Slug*, sus productos de replicación, transcripción o expresión, así como de productos relacionados con la regulación de dicho gen *Slug* o con la eliminación o degradación de sus productos de expresión o traducción, puede ser utilizada para evaluar el riesgo de un sujeto que padece cáncer, tal como un sujeto que padece un cáncer cuyas células cancerosas son *Slug*+, a desarrollar metástasis, por lo que dicho gen, sus productos de replicación, transcripción y/o expresión, así como productos relacionados con la regulación de dicho gen *Slug* o con la eliminación o degradación de sus productos de expresión o traducción, son marcadores de la malignidad del cáncer y constituyen una diana muy atractiva para el tratamiento del cáncer.

El gen *Slug* es un gen presente en los vertebrados que codifica un factor de transcripción del tipo “dedos de zinc” (*Slug*) implicado en las transiciones epiteliales-mesenquimales (Nieto *et al.*, Science 264:835-849 (1994)). Previamente se ha descrito el empleo del gen *Slug*, o de sus productos de transcripción o expresión, en la detección y/o tratamiento de células cancerosas [WO 02/059361]. También se ha descrito el empleo del gen *Slug* y de su producto de expresión (*Slug*) en la movilización de células madre hematopoyéticas para trasplante o terapia génica, en la expansión *ex vivo* de células madre hematopoyéticas, y/o en el tratamiento de problemas de esterilidad masculina [W003/046181].

Ahora se ha descubierto, sorprendentemente, que dicho gen *Slug* no se expresa en sangre de individuos sanos, pero sí en células cancerosas o tumorales. Aparentemente, el gen *Slug* inhibe la producción de E-cadherina, impidiendo que la célula cancerosa se adhiera a las células adyacentes. En este proceso la célula maligna invade otros tejidos y órganos, dando lugar a metástasis, por lo que la expresión o represión del gen *Slug*, sus productos de replicación, transcripción o expresión, así como de productos relacionados, con la regulación de dicho gen *Slug* o con la eliminación o degradación de sus productos de expresión o traducción, puede ser utilizada para evaluar la predisposición de un sujeto que padece cáncer, tal como un sujeto que padece un cáncer cuyas células cancerosas son *Slug*+, a desarrollar metástasis, o para evaluar la malignidad de un tumor, así como para evaluar el estadio de severidad de la enfermedad de un sujeto que padece cáncer y/o para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un sujeto que padece cáncer.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* (i) para evaluar la predisposición de un sujeto con cáncer, tal como un sujeto que padece un cáncer cuyas células cancerosas son *Slug*+, a desarrollar metástasis, ó (ii) para determinar el estadio de severidad de la enfermedad de dicho sujeto con cáncer, ó (iii) para monitorizar el efecto de la terapia administrada a dicho sujeto con cáncer, en adelante método de la invención, que comprende analizar en una muestra de sangre, o de un derivado de la misma, de dicho sujeto, al menos, un producto de replicación, transcripción o traducción del gen *Slug* específico de la especie de dicho sujeto y/o un producto relacionado con la regulación de dicho gen *Slug* o con la regulación, eliminación o degradación de sus productos de expresión o traducción.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “analizar” incluye “medir y/o detectar y/o identificar y/o cuantificar”.

Asimismo, el término “sujeto”, tal como se utiliza, el término “sujeto” incluye a cualquier animal vertebrado, tal como un mamífero, incluido el ser humano.

El método de la invención puede ser aplicado a cualquier sujeto con cáncer, es decir, un sujeto que padece cáncer o que se sospecha que padece cáncer cuyas células cancerosas o tumorales expresan el gen *Slug* (células cancerosas *Slug+*). Ejemplos ilustrativos de células cancerosas que expresan el gen *Slug* incluyen, entre otras, células de cánceres mesenquimáticos o epiteliales, tales como células de leucemias y de tumores sólidos, por ejemplo, leucemias mieloides agudas, células leucémicas con la translocación t(17;19), linfomas, sarcomas, por ejemplo, células de rabdomiosarcoma que expresan la traslocación PAX3-FKHR, células que expresan *BCR-ABL*, cáncer de pulmón, por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas, tumores ginecológicos, cáncer de ovario, carcinomas de mama, cáncer de colon, por ejemplo, tumores colónicos derivados de células intersticiales de Cajal (un tipo de células dependiente del SCF), etc.

En una realización particular, dicho sujeto es un ser humano, que padece un cáncer mesenquimático o epitelial, tal como un cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, un sarcoma, un linfoma, una leucemia o cualquier otro cáncer cuyas células sean *Slug+*.

La presencia, en una muestra de sangre, o de un derivado de la misma, procedente de un sujeto con cáncer, de productos de replicación, transcripción o traducción del gen *Slug* específico de la especie de dicho sujeto y/o de productos relacionados con la regulación de dicho gen *Slug* o con la eliminación o degradación de sus productos de expresión o traducción, es indicativa de una predisposición de dicho sujeto con cáncer a desarrollar metástasis. Asimismo, la presencia y cantidad de dichos productos puede ser indicativa del estadio de severidad de la enfermedad de dicho sujeto con cáncer y/o del efecto de la terapia administrada a dicho sujeto con cáncer con el fin de valorar la eficacia del tratamiento aplicado al sujeto y, si este fuera ineficiente, proceder a modificar el régimen terapéutico a aplicar al sujeto y controlar su eficacia.

El método de la invención puede llevarse a cabo a partir de una muestra de sangre, o de un derivado de la misma, de un sujeto a analizar, que contiene, al menos, un producto de replicación, transcripción o traducción del gen *Slug* específico de la especie de dicho sujeto y/o un producto relacionado con la regulación de dicho gen *Slug* o con la eliminación o degradación de sus productos de expresión o traducción. El término “sangre” tal como aquí se utiliza incluye sangre completa o una fracción de la misma. La extracción de la sangre del sujeto se realiza por métodos convencionales. Derivados de la sangre incluyen plasma, suero, fracción celular, etc., los cuales pueden obtenerse por métodos convencionales conocidos por los expertos en la materia. La extracción de la sangre del sujeto se realiza por métodos convencionales.

En una realización particular, el método de la invención comprende el análisis, en dicha muestra de sangre, o de un derivado de la misma, de un sujeto con cáncer, tal como un sujeto con un cáncer cuyas células sean *Slug+*, de un producto de replicación del gen *Slug* específico de la especie de dicho sujeto, tal como, por ejemplo, ADN genómico (ADNg) de dicho gen *Slug* o un fragmento del mismo.

En otra realización particular, el método de la invención comprende el análisis, en dicha muestra de sangre, o de un derivado de la misma, de un sujeto que padece cáncer, tal como un sujeto con un cáncer cuyas células sean *Slug+*, de un producto de transcripción del gen *Slug* específico de la especie de dicho sujeto, tal como, por ejemplo, ARN mensajero (ARNm) del gen *Slug*, un fragmento de dicho ARNm, ADN complementario (ADNc) al ARN que codifica para el producto de transcripción o de expresión de dicho gen *Slug*, un fragmento de dicho ADNc, o mezclas de los mismos.

El análisis de dichos productos de replicación o de transcripción del gen *Slug*, indicativos de la expresión o represión de dicho gen, puede llevarse a cabo mediante cualquier ensayo apropiado para detectar, identificar y/o cuantificar ácidos nucleicos. En general, dichos ensayos se basan en reacciones de mapeo, secuenciación, hibridación, amplificación, etc. y visualización de los productos de la reacción por cualquier técnica apropiada, tanto radiactiva como no radiactiva, por ejemplo, mediante técnicas colorimétricas, fluorimétricas, luminiscentes (por ejemplo, bioluminiscentes, quimioluminiscentes, etc.), etc. Ejemplos ilustrativos de dichos ensayos incluyen secuenciación, mapeo con la nucleasa S1, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), retrotranscripción en combinación con la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), PCR cuantitativa, PCR a tiempo real, hibridación, Southern blot, Northern blot, RNA Protection Assay, etc. A modo ilustrativo, el análisis de dichos productos de replicación o de transcripción del gen *Slug* se lleva a cabo mediante un ensayo que comprende la amplificación enzimática de la totalidad o un fragmento de dicho producto de replicación o transcripción del gen *Slug*, por ejemplo, mediante RT-PCR, e hibridación con una sonda específica de *Slug*, opcionalmente marcada con un marcador apropiado, por ejemplo, nucleótidos radiactivos, haptenos, enzimas, etc.

En una realización particular, la expresión (o represión) del gen *Slug* puede ser evaluada determinando el nivel de ARNm correspondiente al gen *Slug*, o bien determinando el número de copias del gen *Slug* producidas. En el sentido utilizado en esta descripción, “determinar el nivel de ARNm” incluye cualquier método que permite medir o estimar cualitativa o cuantitativamente el nivel de ARNm que se puede traducir en la proteína *Slug* en las células de una muestra de ensayo bien directamente o bien relativamente comparándolo con el nivel de ARNm de *Slug* en las células de una muestra de control. Asimismo, “determinar el número de copias de gen *Slug* producidas” incluye cualquier

método que permite medir o estimar cualitativa o cuantitativamente el número de copias producidas del gen *Slug* en células de una muestra de ensayo bien directamente o bien relativamente comparándolo con el número de copias del gen *Slug* producidas en células de una muestra de control. La determinación del número de copias del gen *Slug* puede realizarse por cualquier método convencional apropiado, por ejemplo, visualizando fragmentos dobles extracromosómicos [extrachromosomal double minutes (dmin)] o regiones de tinción homogéneamente integradas [integrated homogeneously staining regions (hsrs)] (Gebhart *et al.*, Breast Cancer Res. Treat. 8:125 (1986); Dutrillaux *et al.*, Cancer Genet. Cytogenet. 49:203 (1990)), mediante técnicas de hibridación utilizando sondas apropiadas obtenidas por métodos convencionales a la vista de la secuencia de nucleótidos del gen *Slug*, etc. Adicionalmente, el nivel de ARNm de *Slug* puede determinarse por otros métodos convencionales apropiados, por ejemplo, mediante análisis Northern blot, mapeo con la nucleasa S1, PCR, RT-PCR, técnicas de hibridación, arrays, etc.

En otra realización particular, el método de la invención comprende el análisis, en dicha muestra de sangre, o de un derivado de la misma, de un sujeto con cáncer, tal como un sujeto con un cáncer cuyas células sean *Slug*+, de un producto de traducción del gen *Slug* específico de la especie de dicho sujeto, tal como, por ejemplo, la proteína *Slug* o un fragmento de la misma.

El análisis de dicho producto de traducción del gen *Slug* puede llevarse a cabo mediante cualquier ensayo apropiado para detectar, identificar y/o cuantificar proteínas, por ejemplo, mediante técnicas basadas en el empleo de anticuerpos, citometría de flujo, proteómica, etc. A modo ilustrativo, la expresión de la proteína *Slug* puede ser analizada mediante un ensayo Western blot o dot/slot (Jalkanen *et al.*, J. Cell. Biol. 101:976-985 (1985); Jalkanen *et al.*, J. Cell. Biol. 105:3087-3096 (1987)), o bien mediante inmunoensayos basados en la formación de complejos mediante reacciones cruzadas, de tipo antígeno-anticuerpo, en los que el reconocimiento específico es proporcionado por un anticuerpo frente a la proteína *Slug* o frente a un fragmento de la misma, por ejemplo un fragmento antigénico de la misma, y visualización de los complejos formados por cualquier técnica apropiada, tanto radiactiva como no radiactiva, por ejemplo, mediante técnicas colorimétricas, fluorimétricas, luminiscentes (por ejemplo, bioluminiscentes, quimioluminiscentes, etc.), etc., utilizando para ello, en su caso, unos anticuerpos secundarios marcados con marcadores apropiados; ejemplos de dichos inmunoensayos incluyen ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), RIA (radioinmunoensayo), ensayos inmunohistoquímicos, inmunofluorescentes, de inmunoprecipitación, etc. Los anticuerpos a utilizar son anticuerpos frente a la proteína *Slug* o frente a un fragmento de la misma, por ejemplo, un fragmento antigénico de la proteína *Slug*, opcionalmente conjugados a un portador. Los anticuerpos pueden ser policlonales o, preferentemente, monoclonales, los cuales pueden obtenerse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante la tecnología del hibridoma (Kohler *et al.*, Nature 256:495 (1975)). Alternativamente se pueden utilizar fragmentos de anticuerpos, por ejemplo Fab, F(ab')₂, etc.

Otros métodos para determinar la expresión de *Slug* incluyen la citometría de flujo (Ward M.S., Pathology 31:382-392 (1999)), proteómica (Pandey M. & Mann M., Nature 405:837-846 (2000); Chambers *et al.*, J. Pathol. 192:280-288 (2000)), etc.

En una realización particular, el análisis de dicho producto de traducción del gen *Slug* se lleva a cabo mediante un ensayo que comprende el empleo de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo policlonal o, preferentemente, un anticuerpo monoclonal, específico de la proteína *Slug* o de un fragmento de la misma, que reconoce un epítipo de dicha proteína o fragmento, y la visualización del complejo formado por métodos convencionales.

Además, la expresión del producto de traducción del gen *Slug* puede ser detectada *in vivo* mediante técnicas de diagnóstico por imagen *in vivo* basadas en el empleo de anticuerpos anti-*Slug* unidos a marcadores apropiados, por ejemplo, marcadores detectables por rayos X, resonancia magnética nuclear (RMN), etc. Una revisión del diagnóstico por imagen de tumores puede encontrarse en Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer (S.W. Burchiel & B.A. Rhodes, eds., Masson Publishing Inc. (1982)).

En otra realización particular, el método de la invención comprende el análisis, en dicha muestra de sangre, o de un derivado de la misma, de un sujeto con cáncer, tal como un sujeto con un cáncer cuyas células sean *Slug*+, de un producto relacionado con la regulación del gen *Slug* específico de la especie de dicho sujeto. Tal como aquí se utiliza, la expresión “producto relacionado con la regulación del gen *Slug*” se refiere a cualquier producto implicado directa o indirectamente en la regulación del gen *Slug*, tanto a nivel de ácido nucleico como de proteína. En una realización particular, dicho producto relacionado con la regulación del gen *Slug* es un factor de transcripción que interviene en la regulación de dicho gen. Ejemplos ilustrativos de dicho producto relacionado con la regulación del gen *Slug* incluyen el factor de células madre [SCF (stem cell factor)], la citocina c-kit, etc.

En otra realización particular, el método de la invención comprende el análisis, en dicha muestra de sangre, o de un derivado de la misma, de un sujeto con cáncer, tal como un sujeto con un cáncer cuyas células sean *Slug*+, de un producto relacionado con la regulación, eliminación o degradación de sus productos de expresión o traducción del gen *Slug* específico de la especie de dicho sujeto. Tal como aquí se utiliza, la expresión “producto relacionado con la eliminación o degradación de sus productos de expresión o traducción del gen *Slug*” se refiere a cualquier producto implicado directa o indirectamente en la regulación, eliminación o degradación de los productos de expresión o traducción del gen *Slug*, tanto a nivel de ácido nucleico como de proteína. En una realización particular, dicho producto relacionado con la regulación, eliminación o degradación de los productos de expresión o traducción del gen *Slug* es una proteína o un anticuerpo que directa o indirectamente provoca la regulación, eliminación o degradación de los productos de expresión o traducción del gen *Slug*, tanto a nivel de ácido nucleico como de proteína.

Dichos productos relacionados con la regulación del gen *Slug* así como dichos productos relacionados con la regulación, eliminación o degradación de los productos de expresión o traducción del gen *Slug*, dependiendo de su naturaleza (nucleotídica o peptídica), pueden ser analizados por métodos convencionales.

5 En una realización particular, cuando dichos productos relacionados con la regulación del gen *Slug* o dichos productos relacionados con la regulación, eliminación o degradación de los productos de expresión o traducción del gen *Slug* son de naturaleza nucleotídica, dichos productos podrán ser analizados mediante cualquier ensayo apropiado para detectar, identificar y/o cuantificar ácidos nucleicos, tales como los mencionados previamente en relación con dichos productos de replicación o de transcripción del gen *Slug* pero utilizando los reactivos (iniciadores, sondas, etc.) apropiados.

Asimismo, en otra realización particular, cuando dichos productos relacionados con la regulación del gen *Slug* o dichos productos relacionados con la regulación, eliminación o degradación de los productos de expresión o traducción del gen *Slug* son de naturaleza peptídica o proteica, dichos productos podrán ser analizados mediante cualquier ensayo apropiado para detectar, identificar y/o cuantificar proteínas, tales como los mencionados previamente en relación con dichos productos de traducción del gen *Slug*.

Como se ha mencionado previamente, la presencia de productos de replicación, transcripción o traducción del gen *Slug* específico de la especie de dicho sujeto y/o de productos relacionados con la regulación de dicho gen *Slug* o con la regulación, eliminación o degradación de sus productos de expresión o traducción, en una muestra de sangre, o de un derivado de la misma, procedente de un sujeto con cáncer, tal como un sujeto con un cáncer cuyas células sean *Slug*+, es indicativa de una predisposición de dicho sujeto con cáncer a que se produzca la diseminación del cáncer y/o desarrollar metástasis, o del estadio de severidad de la enfermedad de dicho sujeto con cáncer o del efecto de la terapia administrada a dicho sujeto con cáncer con el fin de valorar la eficacia del tratamiento aplicado a dicho sujeto.

Por tanto, la represión, total o parcial, de la expresión del gen *Slug* o de la actividad de la proteína *Slug*, podría ser útil para tratar, impedir o minimizar el riesgo o predisposición de un sujeto con cáncer a desarrollar metástasis.

Consecuentemente, la invención se relaciona, además, con la reducción, inhibición o represión del gen *Slug*, sus productos de replicación, transcripción o traducción, para tratar, impedir o minimizar el desarrollo de metástasis en un sujeto con cáncer, tal como un sujeto con un cáncer cuyas células sean *Slug*+. La reducción, inhibición o represión del gen *Slug*, sus productos de replicación, transcripción o traducción, puede conseguirse mediante el empleo de inhibidores de *Slug* o de su función. El gen *Slug*, sus productos de replicación, transcripción o traducción, así como dichos productos relacionados con la regulación del gen *Slug* o con la regulación, eliminación o degradación de los productos de expresión o traducción del gen *Slug* pueden ser utilizados en la búsqueda de inhibidores de *Slug* o de su función, los cuales pueden ser utilizados en el tratamiento o prevención del desarrollo de metástasis en sujetos con cáncer.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de un inhibidor de *Slug* o de su función, en la elaboración de una composición farmacéutica para tratar, impedir o minimizar el desarrollo de metástasis en un sujeto con cáncer, tal como un sujeto con un cáncer cuyas células sean *Slug*+.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “inhibidor de *Slug* o de su función” incluye a cualquier compuesto que interfiere, reduce, anula o reprime la expresión del gen *Slug* así como a cualquier compuesto capaz de interferir en la función de la proteína *Slug* o del gen *Slug*, o que inhiba o reduzca los efectos regulados por el gen *Slug* y sus productos de replicación, transcripción o traducción, por ejemplo, un compuesto con capacidad para interferir con *Slug* a nivel de ácido nucleico (ADNg, ADNc, ARN) o proteína (*Slug*). Entre los efectos regulados por el gen *Slug* y sus productos de replicación, transcripción o traducción, se encuentran la migración celular, por ejemplo, en las transiciones epiteliales-mesenquimales, el desarrollo y supervivencia de líneas de melanocitos y de líneas hematopoyéticas, la migración y/o supervivencia de células de Leydig, la movilización de células madre hematopoyéticas, la resistencia a daño en el ADN, la resistencia celular a la irradiación, etc. Los efectos regulados por el gen *Slug* y/o sus productos de replicación, transcripción o traducción, podrían ser inhibidos o reducidos por diferentes mecanismos, por ejemplo, inhibiendo la producción endógena de *Slug*. Ejemplos ilustrativos compuestos potencialmente útiles como inhibidores de *Slug* incluyen factores de transcripción del tipo “dedos de zinc” no funcionales.

En general, la interferencia con la función del gen *Slug* se puede hacer a nivel del ADN impidiendo su expresión, inactivando el ARNm que se genera mediante oligonucleótidos antisentido o ribozimas, inactivando la proteína mediante el empleo de anticuerpos o compitiendo el efecto de dicha proteína con dominantes negativos [Choo Y *et al.* J. Mol. Biol., 1997, 273:525-532; Coboleda C and Sánchez-García I. Blood, 2000, 95:731-737] y/o, en general, mediante el empleo de cualquier compuesto que reprima la expresión del gen *Slug* o reprima o inhiba la formación o la actividad de sus productos de transcripción o traducción. A modo ilustrativo, dicho inhibidor de *Slug* o de su función puede ser una proteína, un péptido, un factor de transcripción del tipo “dedos de zinc” no funcional, un oligonucleótido antisentido, una ribozima, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo.

En una realización particular, dicho inhibidor de *Slug* es un oligonucleótido antisentido, es decir, un compuesto que, cuando se administra a una célula que expresa el gen *Slug*, por ejemplo, una célula tumoral que expresa la proteína *Slug*, es capaz de, por ejemplo, reducir, anular, o reprimir la expresión del gen *Slug*, reduciendo de este modo los niveles de la proteína *Slug* o anulándolos completamente, o bien de reprimir o inhibir la formación o la actividad de los

productos de transcripción o traducción del gen *Slug*. Dicho oligonucleótido antisentido podría unirse específicamente, por ejemplo, al ARNm del gen *Slug* evitando de ese modo su traducción en la proteína *Slug*. Información sobre ADNg, ADNc o ARNm del gen *Slug* y/o de la proteína *Slug*, en particular, del gen *Slug* de humanos (h*Slug*) o de la proteína *Slug* de humanos (h*Slug*) puede encontrarse en WO 02/059361 así como en las referencias bibliográficas contenidas en dicho documento; asimismo, información sobre el gen *Slug* de ratón (m*Slug*) o de la proteína *Slug* de ratón (m*Slug*) puede encontrarse en Nieto *et al.* (Nieto *et al.*, Science 264:835-849 (1994)). Dicho oligonucleótido antisentido comprende una secuencia de nucleótidos y una longitud adecuados para su hibridación con la secuencia de nucleótidos del gen *Slug* o de su producto de replicación o transcripción, bajo condiciones de alta astringencia. A modo ilustrativo, dicho oligonucleótido antisentido comprende, al menos 8, nucleótidos consecutivos, preferentemente, al menos, 12, 16 ó 20 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos del gen *Slug* o capaces de hibridar con la secuencia de nucleótidos del gen *Slug* bajo condiciones de alta astringencia, tales como, por ejemplo, SSPE 5x y SDS al 0,5%, a 65°C o condiciones equivalentes. Ejemplos de oligonucleótidos antisentido que pueden utilizarse para evitar la expresión del gen *Slug* pueden encontrarse en WO 02/059361.

En otra realización particular dicho inhibidor de *Slug* o de su función es un anticuerpo anti-*Slug*, tal como un anticuerpo que reconoce a la proteína *Slug* intacta o a un fragmento de la misma, tal como un fragmento antigénico de la misma, opcionalmente conjugado a un portador. Los anticuerpos anti-*Slug* pueden ser policlonales o, preferentemente, monoclonales, los cuales pueden obtenerse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante la tecnología del hibridoma. Alternativamente se pueden utilizar fragmentos de anticuerpos, por ejemplo Fab, F(ab')₂, etc., los cuales pueden obtenerse por métodos convencionales, que reconocen a la proteína *Slug* o un fragmento antigénico de la misma.

La composición farmacéutica proporcionada por esta invención comprende, al menos, un inhibidor de *Slug* o de su función, en una cantidad terapéuticamente eficaz, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. Dicha composición farmacéutica puede contener uno o más inhibidores de *Slug* o de su función, es decir, uno o más compuestos capaces de reducir, anular o reprimir la expresión del gen *Slug* por lo que es útil para prevenir o tratar el desarrollo de metástasis en sujetos con cáncer, en particular, en sujetos que padecen cánceres cuyas células cancerosas son *Slug*+. Ejemplos ilustrativos de células tumorales o cancerosas *Slug*+ incluyen, entre otras, células de cánceres mesenquimáticos o epiteliales, tales como células de leucemias y de tumores sólidos, por ejemplo, leucemias mieloides agudas, células leucémicas con la translocación t(17;19), linfomas, sarcomas, por ejemplo, células de rabdomiosarcoma que expresan la traslocación PAX3-FKHR, células que expresan *BCR-ABL*, cáncer de pulmón, por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas, tumores ginecológicos, cáncer de ovario, carcinomas de mama, cáncer de colon, por ejemplo, tumores colónicos derivados de células intersticiales de Cajal (un tipo de células dependiente del SCF), etc.

Por tanto, dicho inhibidor de *Slug* o de su función podría ser utilizado, además, en el tratamiento, como coadyuvante o tratamiento principal, de dichos tumores y cánceres.

Los excipientes que pueden utilizarse en la elaboración de la composición farmacéutica proporcionada por esta invención dependerán, entre otras cosas, de la forma de administración de dicha composición farmacéutica. Una revisión de las distintas formas de administración de principios activos, de los excipientes a utilizar y de sus procedimientos de fabricación puede encontrarse en el Tratado de Farmacia Galénica, C. Faulí i Trillo, Luzán 5, S.A. de Ediciones, 1993.

En una realización particular, la composición farmacéutica proporcionada por esta invención es una composición destinada a su administración por vía intravenosa (i.v.) o intraperitoneal (i.p.). En otra realización particular, la composición farmacéutica proporcionada por esta invención es una composición destinada para su empleo en terapia génica que comprende un vector, viral o no viral, y un inhibidor de *Slug* o de su función. A modo ilustrativo, dichos vectores pueden ser vectores virales, por ejemplo, basados en retrovirus, adenovirus, etc., o no virales tales como los complejos ADN-liposoma, ADN-polímero, ADN-polímero-liposoma, etc. [véase "Nonviral Vectors for Gene Therapy", editado por Huang, Hung y Wagner, Academic Press (1999)].

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados en sentido limitativo de la misma.

Ejemplo 1

Desarrollo de cáncer por desregulación de la expresión de *Slug*

I. Materiales y métodos

Cultivos celulares. Las líneas celulares utilizadas incluyen la línea celular precursora hematopoyética Ba/F3 [Palacios y Steinmetz, Cell 41:727 (1985)] y células Ba/F3 que expresan las proteínas humanas BCR-ABL^{p190} (Ba/F3 + p190) y BCR-ABL^{p210} (Ba/F3 + p210) [Sánchez-García y Grütz, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:5287-5291 (1995)]. Las células se mantuvieron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (SFB). Cuando fue necesario, se añadió un 10% de medio acondicionado con WEHI-3B como fuente de IL-3 (interleucina-3).

Transfección celular y Ensayo de supervivencia. Las células Ba/F3 se transfectaron por electroporación (960 µF, 220 V) con 20 µg de plásmido CombitA-*Slug*. La población de células resistentes a neomicina (Ba/F3 + CombitA-*Slug*) se analizó por RT-PCR (retrotranscripción-reacción en cadena de la polimerasa) para detectar la expresión de

CombitTA-Slug en presencia y en ausencia de tetraciclina (20 ng/ml). Estas células eran resistentes a la retirada de IL-3 cuando se crecían en ausencia de tetraciclina. Se confirmó la resistencia de las células a la retirada de IL-3 y la viabilidad celular se determinó por exclusión de azul tripano.

RT-PCR. Para analizar la expresión de CombitTA-Slug y de *Slug* endógeno en líneas celulares de ratón y en ratones, se realizó una RT-PCR siguiendo las instrucciones del fabricante en un volumen de reacción de 20 μ l que contenía 50 ng de hexámeros aleatorios, 3 μ g de RNA total, y 200 unidades de transcriptasa inversa Superscript II RNase H- (GIBCO/BRL). Se realizaron 30 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 56°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, utilizando las secuencias de los cebadores específicos que se indican a continuación:

- Combi-polyA-B 1: 5'-TTGAGTGCAATTCTAGTTGTG-3';
- m*Slug* directo: 5'-GTTTCAGTGCAATTTATGCAA-3';
- m*Slug* reverso: 5'-TTATACATACTATTTGGTTG-3'.

La amplificación del ARN de la β -actina sirvió de control para garantizar la calidad de las muestras de ARN.

Asimismo, para analizar la expresión de h*Slug* en las líneas celulares humanas y en muestras de sangre de pacientes Ph¹-positivos, los parámetros de los ciclos usados en las reacciones de PCR, y las secuencias de los cebadores específicos fueron las siguientes:

h*Slug*: 30 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 56°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, cebador directo 5'-GCCTCCAAAAGCCAACTA-3' y cebador inverso 5'-CACAGTGATGGGGCTGTATG-3';

c-ABL: 30 ciclos a 94°C durante 1 minuto, 56°C durante 1 minuto y 72°C durante 2 minutos, cebador directo 5'-GTATCATCTGACTTTGAGCC-3' y cebador inverso 5'-GTACCAGGAGTGTTTCTCCA-3'.

La amplificación del ARNm de *c-ABL* sirvió como control de calidad de las muestras.

Análisis Southern. ADN procedente de fragmentos de las colas de los ratones se digirió con endonucleasas de restricción tal como se ha descrito previamente [García Hernández *et al.*, (1997). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 94, 13239-13244], se separó por electroforesis en un gel de agarosa al 0,8% y se transfirió a un filtro Hybond-N (Amersham). El ADN se fijó a los filtros mediante exposición a radiación ultravioleta. Los filtros se hibridaron con una sonda de ADNc de la secuencia completa de *Slug*, correspondiente al ADNc completo de *Slug* [Pérez Losada *et al.*, (2002). *Blood*, 100(4):1274-1286], marcada radiactivamente con ³²P [García Hernández *et al.*, (1997). citado *supra*].

Generación de ratones transgénicos

Ratones CombitTA-Slug. El ADNc de *Slug* de ratón (m*Slug*) [Nieto *et al.*, *Science* 264:835-849 (1994)] se clonó en el vector Combi-tTA [Schultze *et al.* (1996) *Nature Biotechnology*, 14: 499-503]. El conjunto se cortó para hacerlo lineal por digestión con NotI, y se inyectó en óvulos fecundados de ratonas CBAC57B/J6 [Jackson Laboratory]. Se identificaron los ratones transgénicos mediante análisis Southern del ADN de un pequeño fragmento de la cola, tras digestión con EcoRI. Se usó el ADNc de m*Slug* para la detección del transgén.

*Ratones con la mutación *Slug*^{Δ1}.* Los ratones homo y heterocigóticos para la mutación *Slug*^{Δ1}, generada mediante la supresión de la secuencia génica total que codifica la proteína Slug (ratones mutantes *Slug*^{Δ1} o ratones deficientes de Slug), han sido descritos previamente [Jiang *et al.*, (1998). *Developmental Biology*. 198; 277-285].

*Ratones heterocigóticos *Slug* +/- (ratones *Slug*^{Δ1})* se cruzaron con ratones transgénicos CombitTA-Slug y ratones transgénicos BCR-ABL^{p190} (EP 1354962) para dar lugar a ratones heterocigóticos compuestos. Los animales de la primera generación (F1) se cruzaron para obtener los ratones sin *Slug* (*Slug* -/-), heterocigóticos para Combi-tTA y BCR-ABL^{p190}.

Análisis histológico. Los animales incluidos en este estudio fueron sometidos a necropsia estándar. Todos los órganos mayores se sometieron a examen bajo el microscopio de disección, se incluyeron muestras de cada uno de ellos en parafina, se prepararon cortes y se examinaron histológicamente. Todas las muestras fueron obtenidas de partes viables y homogéneas del tejido disecado y se fijaron en los siguientes 2-5 minutos. Posteriormente se revisaron los cortes de tejido, teñidos con hematoxilina y eosina. Para los estudios comparativos se usaron ratones de la misma edad.

Análisis fenotípico. Para la citometría de flujo se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: CD45R/B220, IgM, Mac1, Gr-1 (Pharmingen). Suspensiones de células únicas procedentes de diferentes muestras titulares obtenidas por técnicas rutinarias, fueron incubadas con un anticuerpo purificado contra CD32/CD16 de ratón para bloquear la unión a los receptores Fc, y con una dilución apropiada de los diferentes anticuerpos, a temperatura ambiente o a 4°C, respectivamente. Las muestras se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se resuspendieron en PBS. Las células muertas de las muestras se excluyeron mediante tinción con yoduro de propidio. Las muestras y los datos se analizaron con un citómetro de flujo FACScan y con el programa informático CellQuest (Becton Dickinson).

Análisis del ADN de bajo peso molecular. El ADN de bajo peso molecular se aisló como se describe a continuación. Se recogieron las células en 1,5 ml de medio de cultivo, se centrifugaron durante 1 minuto a 1.500 rpm (400 x g), y el "pellet" se resuspendió en 300 μ l de tampón de proteinasa K. Tras incubarse durante la noche a 55°C, se precipitó el ADN con etanol, se resuspendió en 200 μ l de tampón TE (Tris-EDTA (ácido etilendiamino-tetraacético)) que contenía 50 μ g/ml de ARNasa A, y se incubó a 37°C durante 2 horas. El ADN se extrajo con fenol/cloroformo y se precipitó con etanol. Se marcaron terminalmente alícuotas de ADN (2 μ g) con α^{32} P-dCTP y se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 2%. Tras la electroforesis, el ADN del gel se transfirió a una membrana Hybond-N (Amersham) y se sometió a autoradiografía durante 2 horas a -70°C.

Ensayo de la capacidad formadora de tumores. Para estudiar la capacidad de formación de tumores de varios cánceres, 10⁶ células suspendidas en 200 μ l de PBS se inyectaron vía subcutánea en cada uno de los dos flancos de ratones macho atímicos (desnudos). Se hizo un seguimiento de los animales y del crecimiento de los tumores durante 3 semanas.

II. Resultados

Generación de los ratones CombitTA-Slug. Para determinar si la desregulación de la expresión de *Slug* es necesaria para el desarrollo de cáncer, se generaron unos ratones transgénicos (CombitTA-Slug) en los que la expresión del gen *Slug* podía ser regulada exógenamente. Para ello se utilizó el sistema Combi-tTA, que posee en un único plásmido el transactivador y el promotor mínimo tet-operador (tetO) para dirigir la expresión génica. Este procedimiento asegura la integración del mismo número de copias del transactivador que del gen reportero en configuración cis directa, en el mismo punto del mismo cromosoma, e impide la segregación genética de los elementos de control durante el cruce. La inserción del gen m*Slug* bajo el control del promotor mínimo tetO produjo el plásmido CombitTA-Slug (Figura 1A), que se probó en la línea celular precursora hematopoyética Ba/F3. La proteína represora tet, fusionada al dominio de transactivación viral de VP16 (dentro de tTA) se une, en ausencia de tetraciclina, a un promotor mínimo tet de diseño genético y activa la transcripción de CombitTA-Slug. En presencia de la molécula efectora, este gen no se expresa y el promotor queda silenciado (Figura 1B). Tras dos días en cultivo, tanto en presencia como en ausencia de tetraciclina, se midió la expresión de CombitTA-Slug. En este sentido, se detectó la presencia de CombitTA-Slug en células Ba/F3 en ausencia, pero no en presencia, de tetraciclina (20 ng/ml). Estos datos indican que la tetraciclina reprime completamente la inducción de CombitTA-Slug. El hecho de que la expresión de *Slug* protege a las células Ba/F3 de la apoptosis inducida por la retirada de IL-3 ya ha sido demostrado [Inukai *et al.* (1999). Molecular Cell. 4:343-352]. Así pues, a continuación se estudió la supervivencia de células Ba/F3 que expresaban CombitTA-Slug, 24 horas después de la retirada de IL-3. La expresión de *Slug* fue suficiente para que todas las células Ba/F3 que expresaban CombitTA-Slug resistiesen la muerte inducida por la retirada de IL-3. El tratamiento con tetraciclina restauró la sensibilidad de las células Ba/F3 a la retirada de IL-3 (Figuras 1C y 1D).

Se crearon dos líneas transgénicas de ratones CombitTA-Slug (Figura 2A). En ambas, la expresión de CombitTA-SLUG se pudo detectar de forma reproducible en todos los tejidos analizados (Figura 2B). La relevancia fisiológica de dichos ratones CombitTA-Slug se analizó mediante el cruce con ratones deficientes de *Slug* (ratones mutantes *Slug*^{Δ1}). La anemia y los defectos de pigmentación característicos de los ratones homocigóticos con *Slug* mutante no se produjeron en ratones de este tipo cruzados con ratones transgénicos CombitTA-Slug. La expresión de CombitTA-Slug se produjo por transactivación, ya que en aquellos ratones a los que se administró tetraciclina (4 mg/mL) en el agua, la transactivación cayó hasta niveles indetectables (Figura 2C).

Desarrollo de cáncer en ratones transgénicos CombitTA-Slug. En humanos, *Slug* está vinculado a células cancerosas mesenquimales que expresan genes de fusión como consecuencia de anomalías cromosómicas (leucemias o sarcomas). Por ese motivo, se estudió si los ratones transgénicos CombitTA-Slug desarrollan cánceres mesenquimales, observándose que todos los ratones transgénicos CombitTA-Slug mostraron signos claros de falta de salud a partir de los 9 meses de edad. El cuadro clínico de estos ratones fue empeorando rápidamente y se convirtió en cánceres mesenquimales (el 90% desarrollaron leucemia y el 10% sarcomas) (Figuras 3A y 3B), que se caracterizaron clínicamente por un descenso de la movilidad en la jaula, aumento del ritmo respiratorio, piloerección, temblor y pérdida de peso sustancial. Esta condición persistió y los animales se sacrificaron. El examen macroscópico mostró esplenomegalias (Figura 3A) o sarcomas (Figura 3B). Los timos, en general, eran normales. Estas observaciones son consistentes con cánceres mesenquimales. Sin embargo, no se observaron ni alteraciones epiteliales ni carcinomas en ninguno de los 77 ratones CombitTA-Slug analizados a pesar de la extensa expresión de CombitTA-SLUG. El examen histológico de estos animales reveló una marcada filtración leucémica de los tejidos hematopoyéticos y no hematopoyéticos (Figura 3C). Las células mononucleares de la sangre de los ratones leucémicos analizados permitieron diagnosticar las leucemias generadas como leucemia linfoblástica aguda en células B o leucemia mieloide aguda (Figura 3D).

Las células transplantadas subcutáneamente en ratones sanos procedentes de ratones transgénicos CombitTA-Slug, desarrollaron el mismo tipo de tumor tal y como se deduce del análisis histológico. Además, se comprobó que las células que formaban el tumor provenían del donante mediante PCR, que reveló la presencia del producto de CombitTA-Slug. Estos datos permiten definir los tumores desarrollados en ratones transgénicos CombitTA-Slug como malignos, demuestran que *Slug* causa cáncer mesenquimal e indican que *Slug* no requiere formación previa de un tumor para que ocurra la diseminación.

*Irreversibilidad de las alteraciones inducidas por *Slug*.* Los resultados anteriores proporcionan evidencia de que la expresión de *Slug* dota a las células con la capacidad de migrar. Como tal, *Slug* (ácido nucleico o producto de

expresión) podría convertirse en una atractiva diana terapéutica para controlar la capacidad invasiva de los cánceres humanos. Si esto es así, cabría esperar que las células que sobreexpresan *Slug* presenten modificaciones en los patrones de crecimiento y diseminación al modificarles el nivel de expresión de *Slug*. Por tanto, se evaluaron las consecuencias de la supresión de *Slug* mediante el examen fenotípico de 10 ratones transgénicos CombitTA-*Slug*, en los que se había confirmado previamente la presencia de leucemia mediante análisis de su sangre I antes del tratamiento con tetraciclina. La administración a los ratones transgénicos CombitTA-*Slug* de tetraciclina (4 g/l) en el agua se llevó a cabo durante 2 semanas provocó la supresión de la expresión de *Slug* (Figura 4A). Sin embargo, no se observó ninguna modificación fenotípica en ninguno de los 10 ratones CombitTA-*Slug* analizados a pesar de la supresión de la expresión de *Slug* tras el tratamiento con tetraciclina. El análisis por citometría de flujo de los animales tratados con tetraciclina puso de manifiesto la persistencia de células leucémicas en la sangre (Figura 4B), y el análisis histológico confirmó la infiltración de los tejidos no hematopoyéticos (Figura 4B).

La supresión de *Slug* bloquea *in vivo* el desarrollo de leucemia BCR-ABL¹⁹⁰. Un paso crítico para el entendimiento de la transformación maligna mediada por oncogenes asociados al cáncer mesenquimal, es la identificación de los genes modulados por estas oncoproteínas, que permiten a las células crecer fuera de su entorno normal. Aunque se ha demostrado que *Slug* es suficiente para generar leucemias y sarcomas, y para que el crecimiento de estas células se haga independiente de la expresión del propio *Slug*, estos resultados no implican que los oncogenes asociados a cánceres mesenquimales necesiten *Slug* para producir transformación maligna. Para estudiar este asunto se utilizaron los oncogenes BCR-ABL [Sánchez-García & Grütz, PNAS (1995), 92:5287-5291] como modelo. Los oncogenes BCR-ABL activan la expresión de *Slug* en células Ba/F3 y en blastocitos procedentes de ratones transgénicos que expresan BCR-ABL (Figuras 5A y 5B). La expresión de *Slug* también se produce en blastocitos procedentes de pacientes con leucemias humanas Ph¹-positivas, mientras que el producto del gen *Slug* estaba ausente en las células de muestras humanas normales (Figura 5C, carril 1). Por el contrario, *Slug* está presente en líneas celulares t(9;22)-positivas derivadas de pacientes con leucemia crónica mieloide (LMC) y con leucemia linfocítica aguda (ALL, por sus siglas en inglés), en células de pacientes Ph¹-positivos, y en otras líneas celulares leucémicas carentes de t(9;22), incluyendo el linaje B temprano 697, la mieloide U937, y las líneas celulares T ALL-SIL y KOPTI-KI (Figura 5C). Estas y otras observaciones previas muestran que la expresión de *Slug* es una característica común en los tumores mesenquimales.

Con objeto de demostrar si *Slug* es necesario para la génesis de la leucemia inducida por BCR-ABL, se estudió la capacidad inductora de leucemia de BCR-ABL^{p190} en presencia y en ausencia de *Slug*. En humanos, este oncogén está vinculado a células B leucémicas que coexpresan marcadores mieloides. Así pues, se generaron ratones transgénicos de BCR-ABL^{p190}. El examen histológico y fenotípico de los ratones transgénicos de BCR-ABL^{p190} de entre 7 y 9 meses de edad confirmó la presencia de blastocitos en tejidos hematopoyéticos y no hematopoyéticos (Figura 6A). De forma muy parecida a lo que ocurre en humanos, estos blastocitos coexpresan marcadores mieloides y de células B (Figura 6B). Seguidamente se procedió al estudio biológico de BCR-ABL^{p190}-B-ALL [ratones transgénicos con leucemia linfoblástica aguda tipo B (EP 1354962)] en ausencia de *Slug*. Se generaron 12 ratones transgénicos BCR-ABL^{p190} homocigóticos para la mutación específica del gen *Slug*. Entre los 6 y los 9 meses de edad, se analizó periódicamente la sangre de esos ratones BCR-ABL^{p190} x *Slug*^{-/-} y no se detectó ningún blastocito. A los 12 meses de edad se sacrificó a los ratones y la autopsia mostró que no existían anomalías morfológicas significativas de los tejidos hematopoyéticos y no hematopoyéticos. A pesar de realizar un análisis extenso tanto histológico como fenotípico, no se observó ningún signo de leucemia en dichos ratones BCR-ABL^{p190} x *Slug*^{-/-} (Figura 6). Estos resultados demuestran que *Slug* desempeña un papel fundamental en la génesis de células cancerosas BCR-ABL^{p190}.

III. Discusión

Se ha estudiado con precisión la importancia de *Slug* en cada uno de los aspectos de los fenotipos generados por los ratones que expresan *Slug*. Para ello se ha utilizado un sistema que, en un único plásmido, contiene los elementos reguladores y de expresión del sistema binario de tetraciclina original, que permite una elevada inducción y un gran control de la expresión génica por tetraciclina en el ratón. En el ratón, *Slug* no está involucrado en las transiciones epitelio-mesenquimales. De acuerdo con esa idea, no se observaron ni alteraciones epiteliales ni carcinomas en ninguno de los ratones transgénicos CombitTA-*Slug* analizados. El análisis de todos los aspectos de los fenotipos humanos relacionados con la expresión de *Slug* en los ratones que expresan *Slug*, puso de manifiesto que estos ratones presentaban cánceres mesenquimales, fundamentalmente leucemias.

En el sistema hematopoyético, las células progenitoras normales no comprometidas se diferencian en células maduras. Durante esta transición, la expresión de *Slug* está inactivada. En situaciones fisiológicas, cuando estas células progenitoras normales no comprometidas migran, *Slug* favorece su supervivencia y les permite llevar a cabo su función. Si esto no se consigue en un periodo concreto de tiempo, estas células sufren apoptosis como respuesta a la ausencia de señales externas específicas. Por ello, los cánceres mesenquimales que se observan en los ratones transgénicos CombitTA-*Slug* suponen una demostración *in vivo* de la idea de que la transformación depende de cambios genéticos que permiten a las células no diferenciadas crecer fuera de su entorno normal (Figura 3). Estos resultados proporcionan evidencia de que la expresión de *Slug* dota a las células con capacidad migratoria. Como tal, *Slug* podría convertirse en una diana terapéutica atractiva para el control de la capacidad invasiva de los cánceres humanos. Sin embargo, aunque la supervivencia conferida por *Slug* es reversible *in vitro* (Figura 1), las alteraciones inducidas por *Slug* se hacen independientes de su propia expresión *in vivo*.

Estos hallazgos también sitúan la función biológica de *Slug* en el contexto de la transformación celular dependiente de los oncogenes BCR-ABL. Los datos que se presentan aquí demuestran que los oncogenes BCR-ABL inducen la

expresión de *Slug*. De hecho, la expresión de *Slug* no es rara en los tumores mesenquimales (tanto leucemias como sarcomas) en los que la transformación se ha producido por otras alteraciones genéticas. Esto sugiere que *Slug* podría participar en la invasión tumoral, no solamente en leucemias *BCR-ABL*-positivas, sino también, posiblemente, en otros cánceres mesenquimales.

Con el fin de demostrar si *Slug* es necesario para la génesis de la leucemia inducida por *BCR-ABL*, se estudió la capacidad inductora de leucemia del oncogén *BCR-ABL*^{p190} en presencia y en ausencia de *Slug*. Los resultados obtenidos demuestran que *Slug* tiene un papel fundamental en la biología de los cánceres *BCR-ABL*. Estos datos son consistentes con un modelo en el que las células tumorales que contienen la proteína de fusión *BCR-ABL* expresan constitutivamente *Slug*, que promueve la supervivencia y la migración aberrantes de las células defectuosas en diferentes entornos (Figura 3). Dado que es frecuente encontrar *Slug* en células de tumores mesenquimales, es posible que *Slug* tenga un papel más general en la biología del cáncer que el específicamente asociado a la transformación por *BCR-ABL*. Así pues, la expresión de *Slug* podría constituir una vía de invasión común de leucemias y sarcomas asociados a otras proteínas. En conclusión, *Slug* podría representar un mecanismo de invasión tumoral ampliamente distribuido en los tumores mesenquimales. Como tal, *Slug* podría ser una diana terapéutica atractiva para el control de la capacidad invasiva tumoral, y puede ser considerado como marcador de malignidad.

Ejemplo 2

Expresión del gen Slug como marcador de la diseminación precoz del cáncer

I. Material y métodos

Selección de pacientes

Se seleccionaron 124 pacientes con diagnóstico de carcinoma de mama (81 pacientes con cáncer de mama metastatizados y 43 pacientes con cáncer de mama en estadio TNM0), a los que se extrajeron 10 ml de sangre antes de administrarles el primer ciclo de quimioterapia y la misma cantidad antes de recibir el último ciclo. Finalizado el tratamiento con quimioterapia adyuvante, se realizó un seguimiento de los pacientes a los 3 meses durante los 2 primeros años, y cada 6 meses los siguientes 3 años hasta un total de 5 años.

Análisis de la expresión de Slug

La metodología utilizada para la determinación de la expresión del gen *Slug* en sangre fue:

- Extracción de ARN de la sangre periférica mediante el uso del kit QIAamp® siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Eliminación del ADN contaminante mediante tratamiento de las muestras con DNasa I siguiendo las instrucciones del fabricante.
- Obtención de ADNc a partir del RNA tratado con DNasa mediante el uso del kit Promega® siguiendo las instrucciones del fabricante.
- La integridad del ADNc se comprobó mediante amplificación de la actina con los oligos apropiados:
 Actin-F: 5'-TAG GAA TCC ATG GCC ACT GCC GCA TCC TCT TCC-3'
 Actin-B: 5'-CAC GAT GGA GGG GCC GGA CTC ATC-3'
 35 ciclos a 95°C durante 1 minuto/55°C durante 1 minuto/72°C durante 1 minuto y 30 segundos.
- RT-PCR para detectar la expresión del gen *Slug*. Se utilizaron oligos con las siguientes características
 h*Slug*-F: 5'-AGC GAA CTG GAC ACA CAT A-3'
 h*Slug*-B: 5'-AAT GCT CTG TTG CAG TGA G-3'
 35 ciclos a 95°C durante 1 minuto/55°C durante 1 minuto/72°C durante 1 minuto y 30 segundos.
- Electroforesis en gel de agarosa al 1%, a 55 v durante 1 hora, para ver el resultado de la RT-PCR [García-Hernández *et al.*, (1997) PNAS, 94:13239-13244].
- Transferencia a membranas de nylon e hibridación con sonda *Slug* [García-Hernández *et al.*, (1997) PNAS, 94:13239-13244].

II. Resultados

Inicialmente se estudió la expresión de *Slug* en líneas celulares y tejidos tumorales de cáncer de mama. Como se muestra en la Figura 7, tanto la línea celular MCF-7 (Figura 7, carril 8) derivada de un adenocarcinoma de mama, como los carcinomas de mama primarios (Figura 7, carriles 4-7) expresan *Slug*.

Tras confirmar la presencia de *Slug* en cánceres de mama, se procedió a estudiar la expresión de *Slug* en la sangre de pacientes con cáncer de mama. Como muestra la Figura 8, *Slug* no se expresa en la sangre de individuos sanos; sin embargo, la expresión de *Slug* se detectó en el 58% de los casos de cáncer de mama metastatizados y que llevaban un tratamiento quimioterapéutico variable (Figura 9).

Una vez detectada la expresión de *Slug* en una amplia mayoría de cánceres de mama metastatizados, se procedió a estudiar pacientes diagnosticados de cáncer de mama en estadio TNM0. Como se muestra en la Figura 10, la presencia de *Slug* se detectó en el 65% de los pacientes con cáncer de mama en estadio TNM0.

III. Discusión

Los resultados obtenidos indican que *Slug* puede servir como un marcador de diseminación temprano de cáncer de mama y de otros tipos de cáncer tanto epitelial como mesenquimal. Por tanto, el estudio de la expresión de *Slug* en sangre puede ser usado para monitorizar el diagnóstico, el beneficio terapéutico y la recaída en pacientes con cáncer.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método *in vitro* (i) para evaluar la predisposición de un sujeto con cáncer a desarrollar metástasis, ó (ii) para determinar el estadio de severidad de la enfermedad de un sujeto con cáncer, ó (iii) para monitorizar el efecto de la terapia administrada a un sujeto con cáncer. que comprende analizar en una muestra de sangre, o de un derivado de la misma, de dicho sujeto, al menos, un producto de replicación, transcripción o traducción del gen *Slug* específico de la especie de dicho sujeto.
- 10 2. Método según la reivindicación 1, en donde dicho producto de replicación del gen *Slug* comprende la totalidad o un fragmento del ADN genómico (ADNg) del gen *Slug*.
- 15 3. Método según la reivindicación 1, en donde dicho producto de transcripción se selecciona entre ARN mensajero (ARNm) del gen *Slug*, un fragmento de dicho ARNm, ADN complementario (ADNc) al ARN que codifica para el producto de transcripción o de expresión de dicho gen *Slug*, un fragmento de dicho ADNc, y sus mezclas.
- 20 4. Método según la reivindicación 2 ó 3 en el que el análisis de dicho producto de replicación o dicho producto de transcripción del gen *Slug* se lleva a cabo mediante un ensayo para detectar, identificar y/o cuantificar ácidos nucleicos.
- 25 5. Método según la reivindicación 1, en donde dicho producto de traducción es la proteína Slug o un fragmento de la misma.
6. Método según la reivindicación 5, que comprende analizar dicha proteína Slug o fragmento de la misma mediante un ensayo para detectar, identificar y/o cuantificar proteínas.
- 30 7. Método según la reivindicación 1, que comprende, además, analizar un producto relacionado con la regulación del dicho gen Slug, o con la regulación, eliminación o degradación de sus productos de expresión o traducción.
8. Método según la reivindicación 7, en el que el análisis de dicho producto relacionado con la regulación del gen *Slug* se lleva a cabo mediante un ensayo para detectar, identificar y/o cuantificar ácidos nucleicos o proteínas, en función de su naturaleza.
- 35 9. Método según la reivindicación 7, en donde dicho producto relacionado con la regulación del gen *Slug* es un factor de transcripción que interviene en la regulación de dicho gen.
- 40 10. Método según la reivindicación 7, en el que el análisis de dicho producto relacionado con la regulación. eliminación o degradación de los productos de expresión o traducción del gen *Slug* se lleva a cabo mediante un ensayo para detectar, identificar y/o cuantificar ácidos nucleicos o proteínas, en función de su naturaleza.
- 45 11. Método según la reivindicación 1, en donde dicho sujeto es un ser humano.
12. Método según la reivindicación 1 ó 11, en donde dicho sujeto padece un cáncer cuyas células cancerosas son *Slug+*.
13. Método según la reivindicación 12, en donde dicho sujeto padece un cáncer mesenquimático o epitelial.
14. Método según la reivindicación 1 ó 12, en donde dicho sujeto padece leucemia, linfoma, sarcoma, cáncer de pulmón, tumores ginecológicos, cáncer de ovario, carcinoma de mama, o cáncer de colon.
- 50 15. Empleo de un inhibidor de Slug o de su función, donde dicho inhibidor se selecciona entre una proteína, un péptido, un factor de transcripción del tipo “dedos de zinc” no funcional, un oligonucleótido antisentido, una ribozima, un anticuerpo y un fragmento de anticuerpo, en la elaboración de una composición farmacéutica para tratar, impedir o minimizar el desarrollo de metástasis en un sujeto con cáncer.
- 55 16. Empleo según la reivindicación 15, en donde dicho inhibidor de Slug o de su función es una proteína, un péptido, un factor de transcripción del tipo “dedos de zinc” no funcional, un oligonucleótido antisentido, una ribozima, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo capaz de interferir en la replicación, transcripción o traducción del gen *Slug*, una proteína, un péptido, un factor de transcripción del tipo “dedos de zinc” no funcional, un oligonucleótido antisentido, una ribozima, un anticuerpo y un fragmento de anticuerpo capaz de interferir en la función de la proteína Slug, o del gen *Slug*, o una proteína, un péptido, un factor de transcripción del tipo “dedos de zinc” no funcional, un oligonucleótido antisentido, una ribozima, un anticuerpo y un fragmento de anticuerpo que inhibe o reduce los efectos regulados por el gen *Slug* o sus productos de replicación. transcripción o traducción.
- 60
- 65

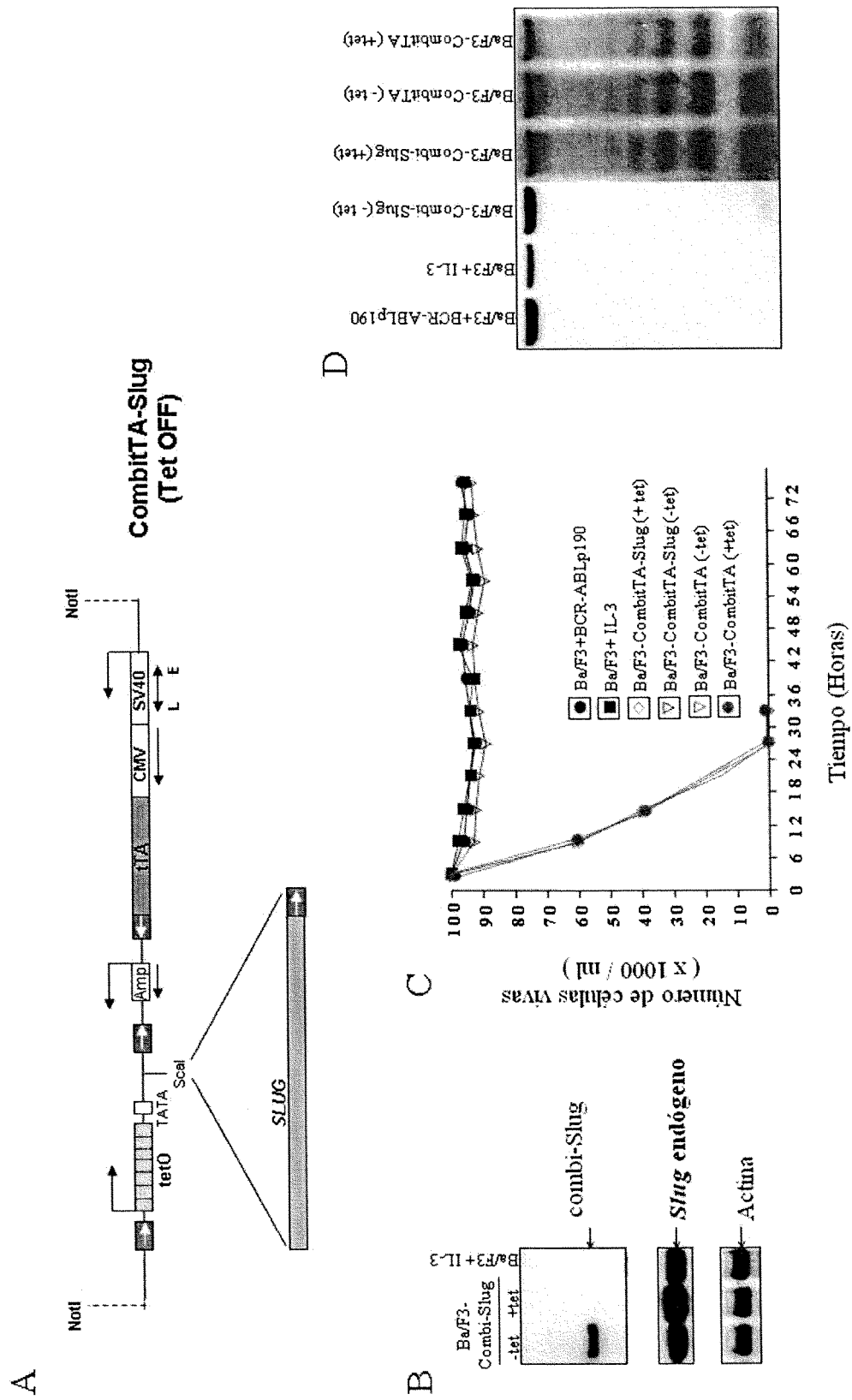


FIGURA 1

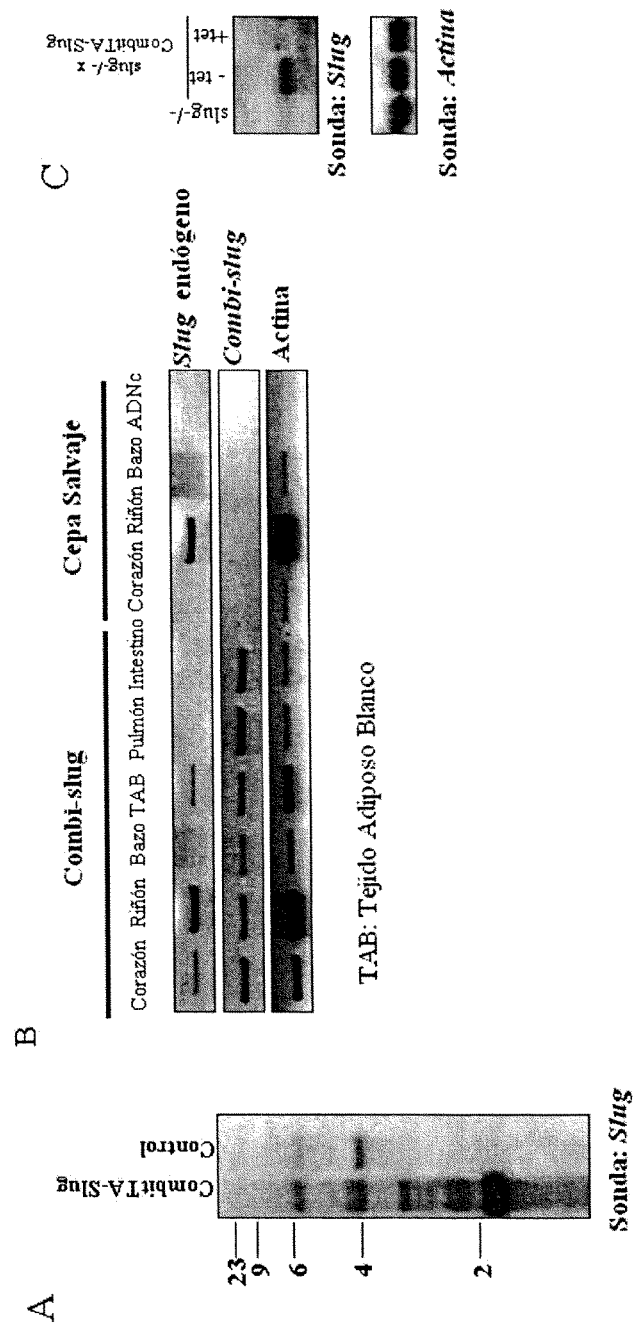


FIGURA 2

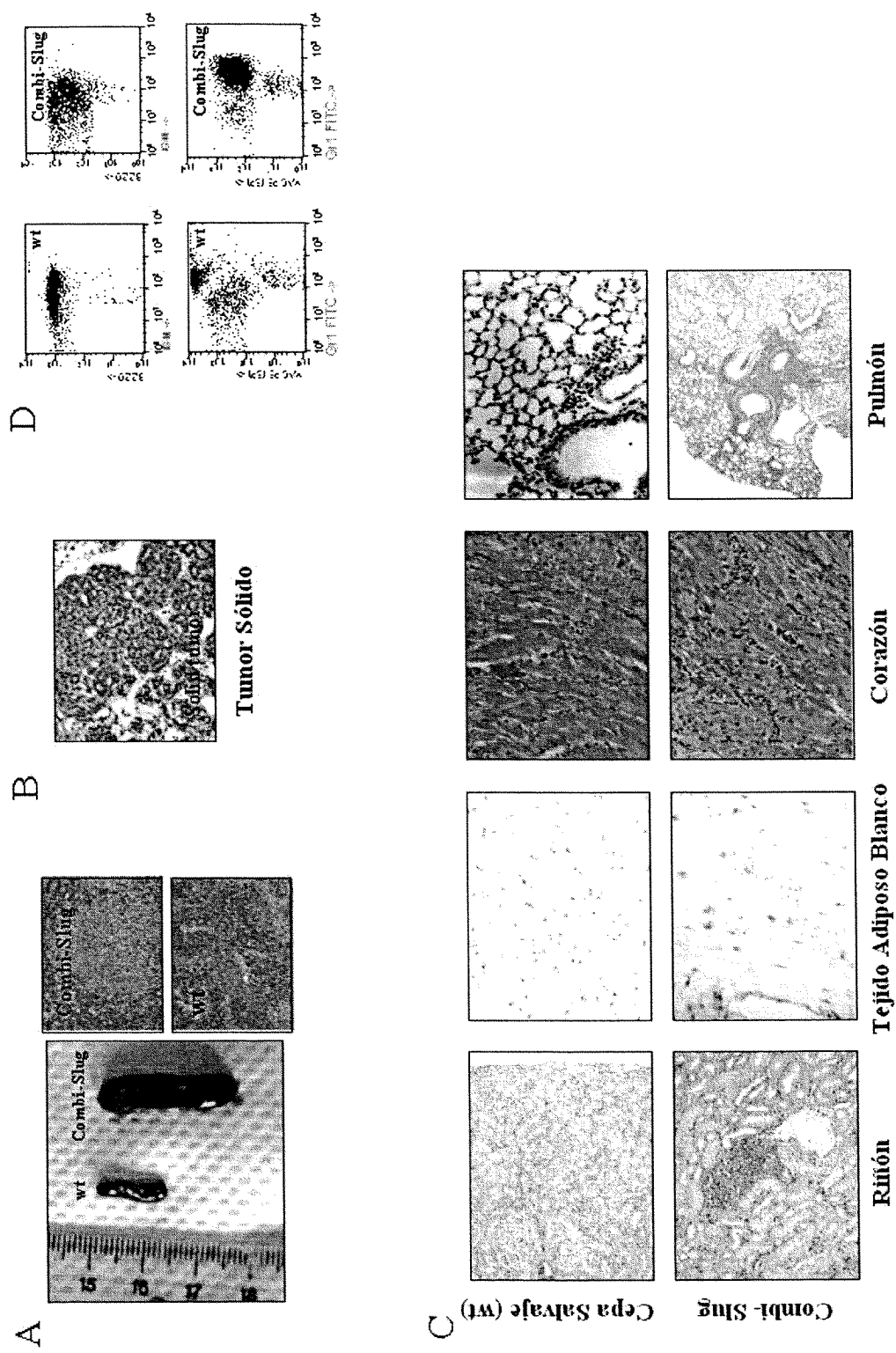


FIGURA 3

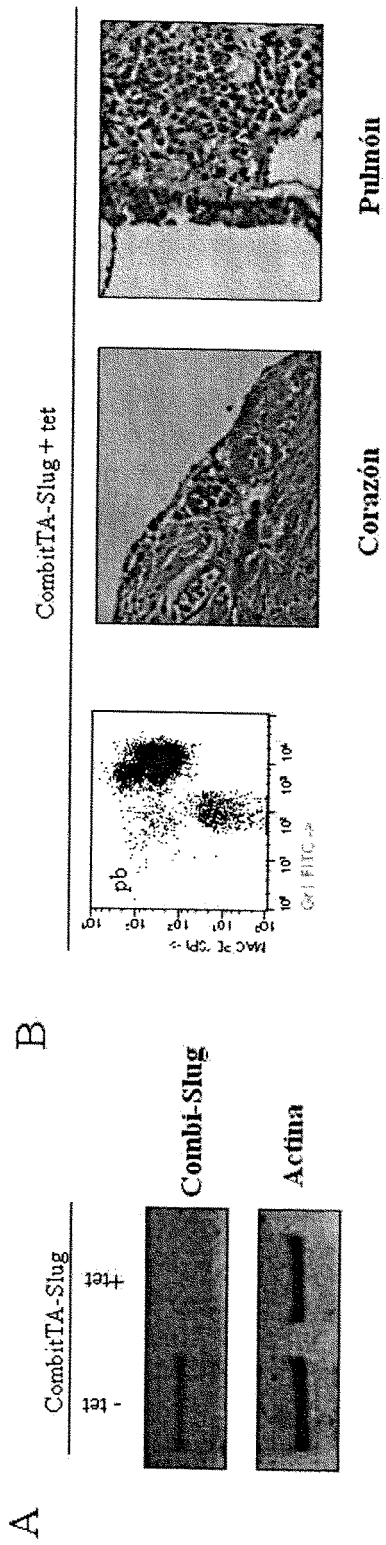


FIGURA 4

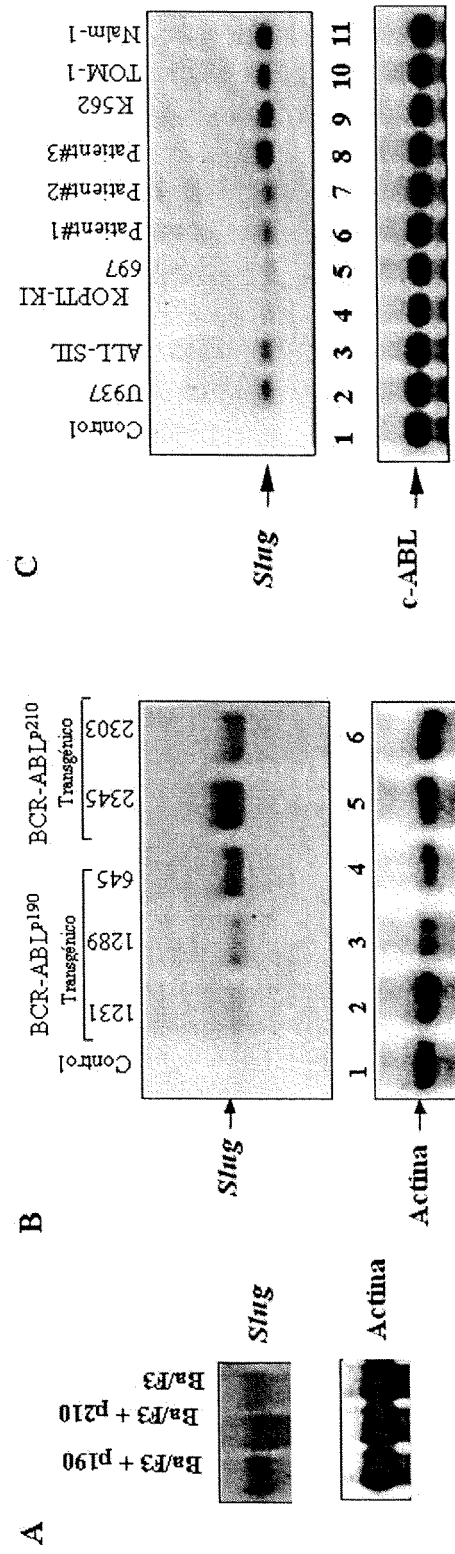


FIGURA 5

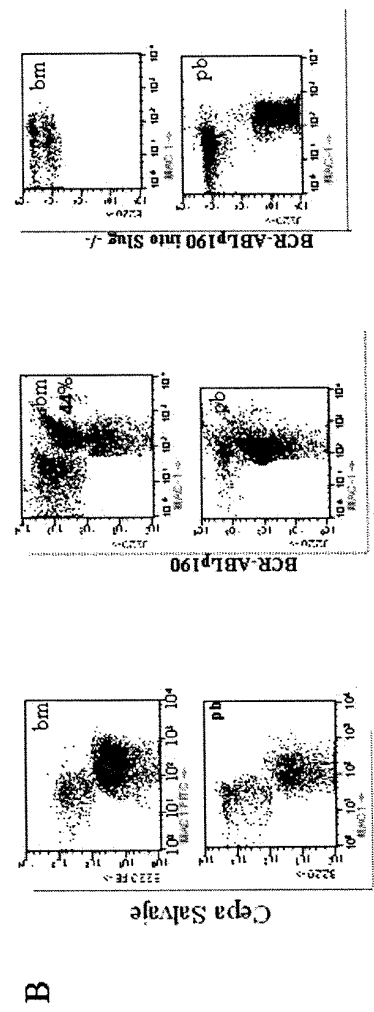
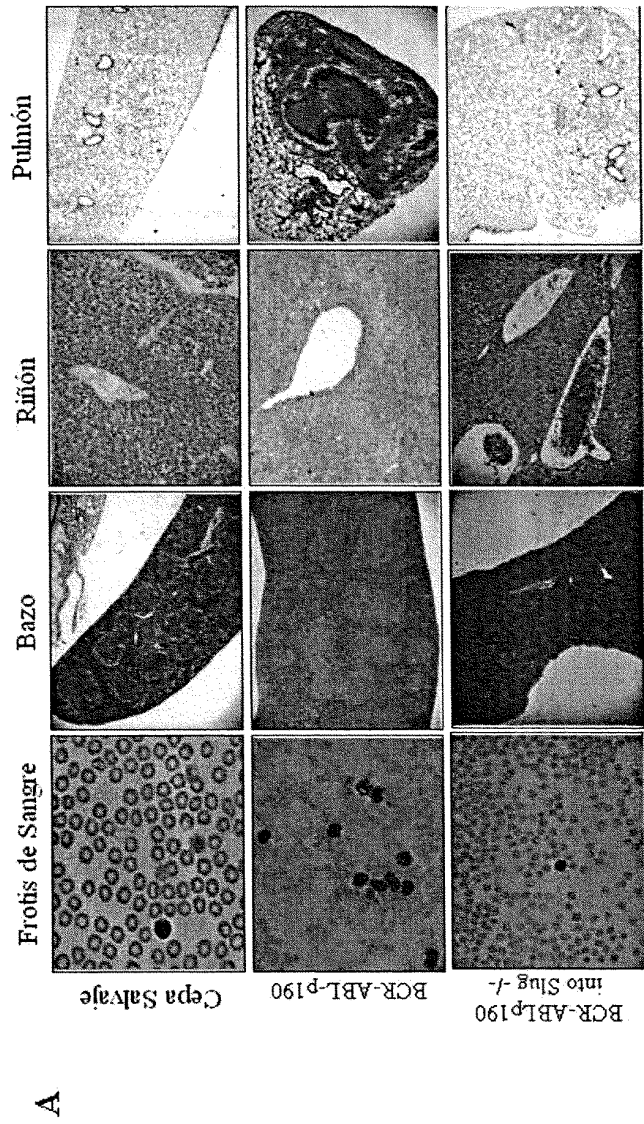
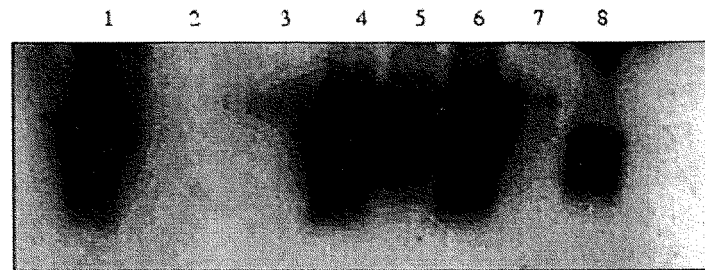


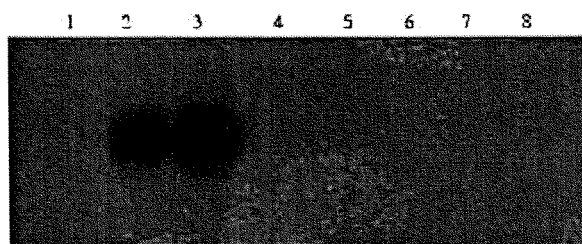
FIGURA 6

ES 2 301 268 B1



Sonda: *Shug*

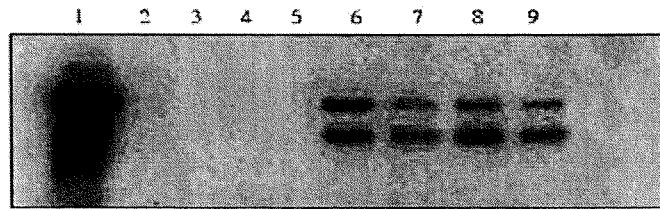
FIGURA 7



Sonda: *Slug*

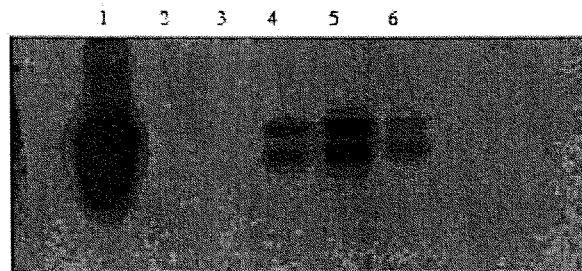
FIGURA 8

ES 2 301 268 B1



Sonda: *Slug*

FIGURA 9



Sonda: *Slug*

FIGURA 10

ES 2 301 268 B1

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Centro de Investigación Biomolecular Aplicada Salamanca, S.L.

5 <120> Empleo del gen Slug, o sus productos de replicación, transcripción, o expresión, en la identificación, diagnóstico o tratamiento de la diseminación del cáncer y/o desarrollo de metástasis

<130> P044360ES

10

<140> P200402559

<141> 2004-10-25

15 <160> 11

<170> SeqWin99, version 1.02

20 <210> 1

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Combi-polyA-B1

30 <400> 1

ttgagtgcac tctagttgtg

20

35 <210> 2

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> mslug directo

45 <400> 2

gtttcagtcg aatttatgca a

21

50 <210> 3

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> mSlug reverso

60

<400> 3

ttatacatatc tatttggttg

20

65 <210> 4

<211> 20

ES 2 301 268 B1

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> hSlug directo	
	<400> 4	
10	gcctccaaaa agccaaacta	20
	<210> 5	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> hSlug reverso	
	<400> 5	
25	cacagtgatg gggctgtatg	20
	<210> 6	
30	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> c-ABL directo	
	<400> 6	
40	gtatcatctg actttgagcc	20
	<210> 7	
45	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	
	<223> c-ABL reverso	
	<400> 7	
55	gtaccaggag tgtttctcca	20
	<210> 8	
60	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> Actina-F	

ES 2 301 268 B1

<400> 8

taggaatcca tggccactgc cgcacacctc tcc

33

5

<210> 9

<211> 24

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Actina-B

15

<400> 9

cacgatggag gggccggact catc

24

20

<210> 10

<211> 19

<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> hSlug-F

30

<400> 10

agcgaactgg acacacata

19

35

<210> 11

<211> 19

<212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> hSlug-B

45

<400> 11

aatgctctgt tgcagtgg

19

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 301 268

⑫ Nº de solicitud: 200402559

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 25.10.2004

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: C12Q 1/68 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 02059361 A1 (UNIV. DE SALAMANCA) 01.08.2002, página 25, línea 22 - página 26, línea 35; página 28, línea 22 - página 31, línea 2; página 32, líneas 13-25; página 33, línea 19 - página 34, línea 4; página 36, línea 13-24.	1-16
X	ELLOUL, S. et al., "Snail-, Slug- and Sip1-E-cadherin ratio as novel parameters of disease aggressiveness in metastatic ovarian and breast carcinoma.". En: "Abstracts of the 10th International Congress of the Metastasis-Research-Society; Genoa, ITALY; Septiembre 17-20, 2004", CLINICAL & EXPERIMENTAL METASTASIS, 2005, Vol. 21, No. 7, páginas, 650-651. Ver todo el documento.	1-16
A	BOLÓS, V. et al., "The transcription factor Slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors.", J. CELL SCI., 2003, Vol. 116, No. 3, páginas 499-511. Ver todo el documento.	1-16
A	HAJRA, K.M. et al., "The SLUG zinc-finger protein represses E-cadherin in breast cancer.", CANCER RES., 2002, Vol. 62; no. 6, páginas 1613-1618. Ver todo el documento.	1-16
A	CONACCI-SORRELL, M. et al., "Autoregulation of E-cadherin expression by cadherin-cadherin interactions: the roles of β -catenin signaling, Slug, and MAPK.", J. CELL BIOL., 2003, Vol. 163; no. 4, páginas 847-857. Ver todo el documento.	1-16
A	US 5766888 A (SOBOL et al.) 16.06.1998, todo el documento.	1-16
A	WO 0102860 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS y otros) 11.01.2001, todo el documento.	1-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

15.04.2008

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

1/2



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 301 268

⑫ Nº de solicitud: 200402559

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 25.10.2004

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.: C12Q 1/68 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	MATSUNAGA, H. et al., "Application of differential display to identify genes for lung cancer detection in peripheral blood", INT. J. CANCER, 2002, Vol. 10, No. 5, páginas 592-599. Ver todo el documento.	1-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe

15.04.2008

Examinador

J.L. Vizán Arroyo

Página

2/2