



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 293 967**

51 Int. Cl.:

C12N 5/06 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01305230 .3**

86 Fecha de presentación : **15.06.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1172435**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **16.01.2002**

54 Título: **Líneas de tumor mamario en ratón que expresan receptores de estrógeno y progesterona.**

30 Prioridad: **11.07.2000 US 613707**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2008

73 Titular/es: **Claudia Lanari**
Combate de San Lorenzo 266
1617 General Pacheco, Buenos Aires, AR
Alfredo Molinolo y
Isabel Luthy

72 Inventor/es: **Lanari, Claudia;**
Molinolo, Alfredo y
Luthy, Isabel

74 Agente: **Zuazo Araluze, Alexander**

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

DESCRIPCIÓN

Líneas de tumor mamario en ratón que expresan receptores de estrógeno y progesterona.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a las líneas de células de adenocarcinoma mamario de los ratones que expresan los receptores de progesterona y estrógeno como una herramienta para estudiar el efecto de las hormonas, los compuestos farmacológicos y los agentes ambientales. La presente invención también se refiere a los métodos *in vitro* e *in vivo* para probar las hormonas u otras moléculas relacionadas para la proliferación de la célula o la proliferación del tumor.

Antecedentes de la invención

Los neoplasmas malignos mamarios epiteliales de la glándula mamaria son una de las formas más comunes de cáncer entre las mujeres de América del Norte, América del Sur, Europa y Australia y cuenta con el 15-18% de las muertes en esta población (Lynn y Relss 1995 J. Natl Cáncer Inst. 87: 867; Moller Jensen y colaboradores 1990 Eur. J. Cancer 26: 1167-1256; Boring y colaboradores 1993 Cancer J. Clin. 43: 7-26). A pesar del desarrollo de los diferentes enfoques terapéuticos, la mortalidad ha continuado subiendo en los últimos treinta años: la incidencia del cáncer mamario está incrementándose por alrededor del 1% por año en casi todas las poblaciones tanto en los países industrializados y los en vía de desarrollo (Miller y colaboradores 1991 Cancer Causes Control 2:67-74; Levi F. 1993 Eur J Cancer 29:2315-2319) y se estima que la enfermedad afectará 5 millones de mujeres en la próxima década (Corry JF. y Lonning PE. 1994 Pharmacol. Econom 5: 198-212). Obviamente con el envejecimiento, la población femenina, la prevención y el tratamiento del cáncer mamario va a continuar representando un desafío importante.

La etiología del cáncer mamario continúa en gran parte desconocida y el dilema del desarrollo del tumor mamario y los mecanismos relacionados con el tumor han sido estudiados con diferentes enfoques experimentales. El modelo del tumor mamario del ratón inducido por el virus (MMTV) tiene diferentes inconvenientes; la mayor parte de los tumores inducidos por MMTV no son sensibles a la hormona o sensibles al embarazo (Welsch CW y Nagasawa H. 1977 Cancer Res 37:951-963; Sluyser M. y Van Nie R. 1974 Cancer Res 34:3253-3257), y no se demostró una involucración definitiva por un virus en la etiología de los tumores mamarios en los seres humanos (Michalides R. y colaboradores Current Topics in Microbiology and Immunology, Vol. 106, Eds: PK Vogt y H Koprowski, Springer Verlag, Berlín, páginas 57-78; Pogo BG. y colaboradores 1997 Medicina (Buenos Aires). 57 Suppl 2: 75-80). Los modelos de carcinógeno químico permitieron la disección de los iniciadores y promotores, y los tumores originados en los modelos de ratas MNU y los modelos de rata DMBA, fueron sensibles a la hormona y expresaron los receptores de estrógeno (ER) (Gullino P. y colaboradores 1975 J Natl Cancer Inst. 54:401-404; Russo IH. y colaboradores 1982 Breast Cancer Res and Treat 2:5-73). No dieron lugar, sin embargo, a la metástasis y alojaron mutaciones de puntos en ciertos oncogenes no descubiertos en la enfermedad humana, que están probablemente relacionados con el carcinógeno químico (Ip C. 1996 J. Mammary Gland Biol Neopl 1: 37-47).

Otro método implica el establecimiento de las líneas de célula humanas. Las líneas de células del cáncer mamario humanas más ampliamente usadas son las MCF-7 (Soule HD. y colaboradores 1973 J Natl Cancer Inst 51:1409-1416), la T-47-D (Engel LW. y colaboradores 1978 Cancer Res. 38: 3352-3364), y la ZR-75-31 (Keydar I. y colaboradores 1979 Cancer 51: 659-670). Estas líneas expresan ER y los receptores de progesterona (PR) y son hormonas sensibles. En los últimos años se han establecido otras líneas de célula: PMC42 (Whitehead RH. y colaboradores 1984 J National Cancer Institute 73:643-648), YMB-1 (Yamane M. y colaboradores 1984 Hiroshima J Med Sci 33:715-720), VHB (Vandewalle B. y colaboradores 1987 J Cancer Res Clin Oncol 1113: 550-558), IBEP-1, IBEP-2 y IBEP-3 (Siwek B. y colaboradores 1998 Int J Cancer 76:677-683), BrCa-MZ-01 y BrCa-MZ-02 (Mobus VJ. y colaboradores 1998 Int J Cancer 77:415-423). Parte de nuestro conocimiento en la regulación de la hormona del crecimiento de la célula se ha deducido de los experimentos realizados utilizando estas líneas. Alrededor de veinte líneas de célula que no expresan los receptores de la hormona están disponibles y se han utilizado en otro tipo de experimentos. Aunque la información inicial valiosa pueda ser reunida de los estudios *in vitro*, ya que el cáncer ocurre en el contexto de una interacción compleja con su ambiente circundante: los tejidos vecinos, el sistema inmunológico, las hormonas, y los factores ambientales, existe una tendencia para estudiar los xeno-injertos en los ratones inmuno-suprimidos (Clarke R. 1996 Breast Cancer Res and Treat 39: 69-86) o los ratones transgénicos o Knock-out (Amundaddottir LT y colaboradores 1996 Breast Cancer Res and Treat 39: 119-135). El problema principal es que la mayoría de las líneas de célula no son metastáticas, al menos que sean transfectadas con los factores de crecimiento diferentes, y también los altos costos de los ratones inmuno-suprimidos. En los ratones hay unos pocos modelos que se han utilizado para estudiar la regulación de la hormona en el crecimiento del tumor, entre los cuales está el modelo de los ratones MXT y el GR. El primero es un tumor mamario que se mantiene por trasplante singéico y expresa los altos niveles de ER y PR (Kiss R. y colaboradores 1989 Cancer Res 49:2945-2951) y el último es una cepa de ratones que desarrolla tumores dependientes del embarazo (Sluyser M. y Van Nie R. 1974 Cancer Res 34:3253-3257). No se han desarrollado líneas de célula aún de los tumores de los ratones que mantienen la expresión del receptor esteroide excepto para un tumor inducido en los ratones transgénicos c-erbB2 (Sacco MG y colaboradores 1998 Breast Cancer Res and Treat 47:171-180).

Los inventores han desarrollado un modelo experimental en el cual los adenocarcinomas mamarios (PD) dependientes de progestina, metastáticos ductales están inducidos por la administración continua de MPA a las ratas hembras BALB/c; estos tumores expresan altos niveles de ER y PR (Lanari C. y colaboradores 1986 Cancer Letters 33: 215-223; Molinolo AA. y colaboradores 1987 JNCI 79: 1341-1350), y se mantienen por pasajes seriales singéicos en

los ratones tratados con MPA. Por el trasplante en los ratones no tratados, los inventores han sido capaces de generar líneas de tumor (PI) independientes de progestina que retienen la expresión de ER y PR. Por los estudios *in vitro*, que utilizan cultivos primarios y secundarios de una de estas líneas de tumor PD (C4-HO), los inventores pudieron demostrar que MPA estimula directamente la proliferación de la célula y que las antiprogestinas inhiben el crecimiento de la célula aún en concentraciones muy bajas (Dran G. y colaboradores 1995 Breast Cancer Res y Treat. 35: 173-186).

Más temprano en la caracterización del modelo experimental, con el objetivo estudiar aún más ciertos aspectos de la respuesta hormonal, los inventores desarrollaron una técnica para obtener los cultivos epiteliales purificados o primarios fibroblásticos de estos tumores (Dran G. y colaboradores 1995 Breast Cancer Res y Treat. 35: 173-186). Aunque los cultivos primarios estén, es una herramienta excelente para estudiar el efecto directo de las hormonas en la proliferación de la célula, el enfoque es consumidor de tiempo; muchos controles diferentes necesitan ser corridos en paralelo para poder evitar la heterogeneidad inherente de cada cultivo primario, y estandarizar las conclusiones.

Vencer estos defectos, en el establecimiento de la caracterización de los diferentes isoformas de PR expresado por los tumores, los inventores decidieron procurar desarrollar las líneas de células continuas en las que los parámetros diferentes con respecto a la dependencia de la hormona podrían ser estudiados. Los inventores pudieron desarrollar cuatro líneas de células derivadas de un tumor de PD y de un tumor de PI. Esta es la primera descripción de las líneas de células de adenocarcinoma mamario de ratones obtenida en los animales no transgénicos que expresan los receptores de estrógeno y progesterona.

Los inventores proporcionaron una línea de célula para filtrar hormonas y moléculas relacionadas.

La técnica anterior relevante incluye a Montecchia MF y colaboradores, "Progesterone receptor involvement, in independent tumor growth in MPA-induced murine mammary adenocarcinomas", J Steroid Biochem Mol Biol. 1999 Enero; 68(1-2): 11-21; PMID: 10215033.

Resumen de la invención

De acuerdo con la invención presente, se proporcionan las líneas de célula y los métodos para filtrar las hormonas.

Según un primer aspecto de la invención presente, se proporciona una línea de célula MC4-L2 de adenocarcinoma mamario de ratón no transgénico, que tiene el número de Acceso de ATCC PTA-892, la línea de célula obtenida subclonando la línea de célula MC4-L1 que deriva de un tumor de ratón dependiente de progestina CC4-HD.

Un objeto adicional de la invención es el de proporcionar un sistema de cultivo de célula que facilitará el filtrado e identificación de agentes que pueden ser clínicamente importantes en el tratamiento del cáncer. Este sistema de línea de la célula encontrará también utilidad en la identificación de los compuestos que tienen el valor terapéutico para otras enfermedades tales como los desórdenes endocrinos y en otra terapia del reemplazo de la hormona. Se proporciona un sistema de línea de célula para identificar, detectar o cuantificar las sustancias sospechadas de unir los receptores de estrógeno y progesterona.

El sistema de cultivo de la célula de la invención presente será útil como una herramienta de investigación y facilitará la elucidación de la acción mecanicista de sustancias novedosas que unen a los receptores de estrógeno y progesterona.

Así, según un segundo aspecto de la invención presente, se proporciona un sistema de línea de célula para probar la actividad de la hormona, los compuestos anti-hormona, farmacológicos y los agentes ambientales en donde el sistema comprende por lo menos una línea de célula MC4-L2 de la invención presente.

Preferiblemente, el sistema de línea de célula además comprende una o más de las líneas de células escogidas del grupo que consiste en:

i) una línea de célula MC4-L1 de adenocarcinoma mamario de ratón no transgénico, que deriva de un tumor de ratón CC4-HD dependiente de progestina, en donde la línea de célula expresa los receptores de progesterona y se deposita con el ATCC como número de Acceso PTA-889;

ii) una línea de célula MC4-L3 de adenocarcinoma mamario de ratón no transgénico, que deriva de un tumor de ratón CC4-HD dependiente de progestina, donde la línea de célula expresa los receptores de estrógeno y progesterona y se deposita con el ATCC como número de Acceso PTA-891;

iii) una línea de célula MC7 -L1 de adenocarcinoma mamario de ratón no transgénico que deriva de un tumor de ratón C7-HI independiente de progestina, en donde la línea de célula expresa los receptores de estrógeno y progesterona y es depositada con el ATCC como número de Acceso PTA-890.

Se proporciona también de acuerdo con la presente invención un método *in vitro* para probar la actividad de la hormona, los compuestos anti-hormona, farmacológicos o agentes ambientales, comprendiendo los pasos de cultivar una línea de célula, en donde la línea de célula comprende la línea de célula MC4-L2 de la invención presente.

ES 2 293 967 T3

Preferiblemente, la línea de célula comprende además una o más de las líneas de células escogidas del grupo que consiste de:

i) una línea de célula de las líneas de célula MC7-L1 de adenocarcinoma mamario de ratón no transgénico que deriva de un tumor de ratón C7-HI independiente de progestina en donde la línea de célula expresa los receptores de estrógeno y progesterona y se deposita con el ATCC como número de Acceso PTA-890;

ii) una línea de célula MC4-L3 de adenocarcinoma mamario de ratón no transgénico que deriva de un tumor de ratón CC4-HD dependiente de progestina, en donde la línea de célula expresa los receptores de estrógeno y progesterona y se deposita con el ATCC como número de Acceso PTA-891;

iii) un línea de célula de las líneas de célula MC4-L1 de adenocarcinoma mamario de ratón no transgénico, que deriva de un tumor de ratón CC4-HD dependiente de progestina, en donde la línea de célula expresa los receptores de estrógeno y progesterona y se deposita con el ATCC como número de Acceso PTA-889.

La línea de células y los métodos de la invención presente proporcionaron un sistema para el análisis de las hormonas y las moléculas relacionadas sin la necesidad de cultivos de tejido primario.

También proporcionado de acuerdo con la presente invención se encuentra un equipo de prueba para determinar el efecto de la hormona, los compuestos anti- hormona, farmacológicos y los agentes ambientales, en donde el equipo comprende una alícuota de la línea de célula MC4-L2 de la invención presente y los medios para evaluar la proliferación de la línea de célula.

Preferiblemente, el equipo comprende aún más una alícuota de cada una una o más líneas de células escogidas del grupo que consiste:

i) un línea de célula MC4-L1 de adenocarcinoma mamario de ratón no transgénico que deriva de un tumor de ratón CC4-HD independiente de progestina en donde la línea de célula expresa los receptores de estrógeno y progesterona y se deposita con el ATCC como número de Acceso PTA-890;

ii) una línea de célula MC4-L3 de adenocarcinoma mamario de ratón no transgénico que deriva de un tumor de ratón CC4-HD dependiente de progestina, en donde la línea de célula expresa los receptores de estrógeno y progesterona y se deposita con el ATCC como número de Acceso PTA-891;

iii) una línea de célula MC7-L1 de las líneas de célula de adenocarcinoma mamario de ratón no transgénico, que deriva de un tumor de ratón CC4-HI independiente de progestina, en donde la línea de célula expresa los receptores de estrógeno y progesterona y se deposita con el ATCC como número de Acceso PTA-889.

Como se describe en la presente, el término “agentes que pueden ser clínicamente relevantes en el tratamiento del cáncer” comprende los compuestos o las moléculas que eliciten una respuesta proliferativa para la unión de los receptores de progesterona o estrógeno, tal como el acetato de medroxiprogesterona o R5020, dietildilbestrol.

Como se describe en la presente, “anti-hormona” comprende las moléculas o los compuestos que actúan para inhibir la actividad proliferativa de los compuestos arriba mencionados, por ejemplo la mifepristona, ZK o tamoxifen, raloxifen.

Como se describe en la presente, la línea de célula” comprende las células que derivaron inicialmente de un tumor. Tales células tienen el crecimiento indefinido en el cultivo; a diferencia de los cultivos primarios, que pueden ser mantenidos solamente por un espacio de tiempo finito. Además, tales células pueden formar preferiblemente los tumores después de que sean inyectados en los animales singeneicos.

De acuerdo con la invención “Cáncer” incluye los cánceres, en particular, el cáncer mamario.

Como se describe en la presente, “proliferación celular” significa un aumento en el número de células analizado por cualquier método conocido en el arte, por ejemplo, la toma de la timidina ³H, el ensayo de MTT, el ensayo de MTS, relativo a un control sin tratamiento.

Como se describe en la presente, “el crecimiento del tumor” incluye un aumento en el tamaño del tumor y “el retroceso del tumor” incluye una reducción en la masa del tumor.

Como se describe en la presente, “la línea de tumor” incluye los tumores que expresan los niveles altos de ER y PR, y se mantienen a través de los pasajes de serie singéneos en los ratones tratados con MPA o en los ratones no tratados.

Como se describe en la presente, RU es mifepristona o RU38486; ZK es onapristona o ZK 98299.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 ilustra el efecto de MPA en la proliferación de la línea de célula MC4-L1. El índice de la toma de ^3H Timidina representa la proporción entre el cpm del grupo experimental contra el grupo de control. Se muestra el valor medio de los experimentos 3-15.

La Figura 2 ilustra el efecto del estradiol (E_2) en la proliferación de la línea de célula MC4-L1. El índice de la toma de la ^3H Timidina representa la proporción entre el cpm del grupo experimental contra el grupo de control. Se muestra el valor medio de los experimentos 3-15.

La Figura 3 ilustra el efecto de la mifepristona en la proliferación de la línea de célula MC4-L1. El índice de la toma de la ^3H Timidina representa la proporción entre el cpm del grupo experimental contra el grupo de control. Se muestra el valor medio de los experimentos 3-15.

La Figura 4 ilustra el efecto de ZK en la proliferación de la línea de célula MC4-L1. El índice de la toma de la ^3H Timidina representa la proporción entre el cpm del grupo experimental contra el grupo de control. Se muestra el valor medio de los experimentos 3-15.

La Figura 5 ilustra el efecto de $\text{TGF}\beta 1$ (ng/ml) en la proliferación de la línea de célula MC4-L1. El índice de la toma de la ^3H Timidina representa la proporción entre el cpm del grupo experimental contra el grupo de control. Se muestra el valor medio de los experimentos 3-15.

La Figura 6 ilustra el efecto de ICI en la proliferación de la línea de célula MC4-L1. El índice de la toma de la ^3H Timidina representa la proporción entre el cpm del grupo experimental contra el grupo de control. Se muestra el valor medio de los experimentos 3-15.

La Figura 7 ilustra el efecto de MPA en la proliferación de la línea de célula MC4-L2. El índice de la toma de la ^3H Timidina representa la proporción entre el cpm del grupo experimental contra el grupo de control. Se muestra el valor medio de los experimentos 3-15.

La Figura 8 ilustra el efecto de estradiol (E_2) en la proliferación de la línea de célula MC4-L2. El índice de la toma de la ^3H Timidina representa la proporción entre el cpm del grupo experimental contra el grupo de control. Se muestra el valor medio de los experimentos 3-15.

La Figura 9 ilustra el efecto de RU en la proliferación de la línea de célula MC4-L2. El índice de la toma de la ^3H Timidina representa la proporción entre el cpm del grupo experimental contra el grupo de control. Se muestra el valor medio de los experimentos 3-15.

La Figura 10 ilustra el efecto de ZK en la proliferación de la línea de célula MC4-L2. El índice de la toma de la ^3H Timidina representa la proporción entre el cpm del grupo experimental contra el grupo de control. Se muestra el valor medio de los experimentos.

La Figura 11 ilustra el efecto de ICI en la proliferación de la línea de célula MC4-L2. El índice de la toma de la ^3H Timidina representa la proporción entre el cpm del grupo experimental contra el grupo de control. Se muestra el valor medio de los experimentos 3-15.

La Figura 12 ilustra el efecto de $\text{TGF}\beta 1$ en la proliferación de la línea de célula MC4-L2. El índice de la toma de la ^3H Timidina representa la proporción entre el cpm del grupo experimental contra el grupo de control. Se muestra el valor medio de los experimentos 3-15.

La Figura 13 ilustra el efecto de MPA en la proliferación de la línea de célula MC7-L1. El índice de la toma de la ^3H Timidina representa la proporción entre el cpm del grupo experimental contra el grupo de control. Se muestra el valor medio de los experimentos 3-15.

La Figura 14 ilustra el efecto del estradiol (E_2) en la proliferación de la línea de célula MC7-L1. El índice de la toma de la ^3H Timidina representa la proporción entre el cpm del grupo experimental contra el grupo de control. Se muestra el valor medio de los experimentos 3-15.

La Figura 15 ilustra el efecto de RU en la proliferación de la línea de célula MC7-L1. El índice de la toma de la ^3H - timidina representa la proporción entre el cpm del grupo experimental contra el grupo de control. Se muestra el valor medio de los experimentos 3-15.

La Figura 16 ilustra el efecto de ICI en la proliferación de la línea de célula MC7-L1. El índice de la toma de la ^3H - timidina representa la proporción entre el cpm del grupo experimental contra el grupo de control. Se muestra el valor medio de los experimentos 3-15.

La Figura 17 ilustra el tamaño del tumor (mm^2) de la línea de célula MC4-L1 inoculada sc en los ratones hembras BALB/c tratados o no con depósito sc MPA de 40 mg contralateral a la inoculación del tumor.

La Figura 18 ilustra el efecto de RU, E₂ y ZK en el tamaño del tumor (mm²). Los ratones que sufren de los tumores MC4-L1, de alrededor de 50 mm² fueron tratados diariamente con ZK (10 mg/Kg peso) o RU (6,4 mg/Kg peso) o implantado con pastillas de moldeo silástica de 5 mg E₂.

La Figura 19 ilustra el efecto de RU en el tamaño del tumor (mm²). Los ratones que sufren tumores MC4-L2 de alrededor de 50 mm² fueron tratados diariamente con RU (6,4 mg/kg).

La Figura 20 ilustra el efecto de RU, E₂ y ZK en el tamaño del tumor (mm²). Los ratones que soportan los tumores MC4-L3 de alrededor de 50 mm² fueron tratados diariamente con ZK (10 mg/Kg) o RU (6,4 mg/Kg) o implantados con 5 mg de pastillas de moldeo silástica E₂.

Descripción detallada de la invención

La invención se refiere a la generación de las líneas de célula de adenocarcinoma mamario de los ratones que expresan los receptores de estrógeno y progesterona como una herramienta para estudiar el efecto de las hormonas, los compuestos farmacológicos y los agentes ambientales. La presente invención también se refiere a los métodos *in vitro* e *in vivo* para probar las hormonas u otras moléculas relacionadas para la proliferación de las células o la proliferación del tumor.

Los tejidos usados para establecer la línea de células se obtuvieron de los adenocarcinomas (CC4-HD) inducidos por MPA ductales dependientes de progesterona: en el pasaje 60 se mantuvieron por el trasplante singeneico en los ratones tratados con MPA y también se obtuvo un tumor PI (C7-HI) de un ratón tratado con MPA que se mantuvo para el trasplante singeneico en los ratones no tratados hembras (Lanari y colaboradores, 1986; Molinolo y colaboradores, 1987). La diferencia principal entre ambas líneas de tumor puede observarse en la Tabla 1. Los CC4-HD se originaron del cultivo primario de C4-HD transplantados sc en un ratón tratado con MPA.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA 1

Características de la línea de tumor parental CC4-HD y C7-HI		
Característica	CC4-HD	C7-HI
Origen	Originado en 1985 en los ratones BALB/C tratados con depósito MPA de 40 mg cada tres meses (JNCI1986;77:157-164). El grupo C, la jaula 4 para CC4-HD y jaula 7 para C7-HI. La primer C significa el cultivo primario re-inoculado. La terminación de HD y HI se agregó de acuerdo con la capacidad para crecer en los animales tratados con progestina o los animales no tratados.	
Histología	Carcinomas ductales	mamarios
Dependencia de hormona	Dependiente de progestina (PD)	Independiente de Progestina (PI)
Metástasis	Pulmón después de 4-5 meses	Nódulos linfáticos homolaterales auxiliares en los pulmones antes de los dos meses
ER (fmol/mg prot; X + SD)	63 ± 20 (n=6)	34 ± 8 (n=6)
PR (fmol/mg prot; X + SD)	171 ± 54 (n=6)	160 ± 48 (n=6)
Características de la línea de tumor parental CC4-HD y C7-HI		
Característica	CC4-HD	C7-HI
Receptores de Glucocorticoides	Negativo	
Receptores de andrógeno	Negativo	
Receptores de EGF	Negativo	
amplificación c-erbB2	Si	No

El cultivo primario fue un cultivo enriquecido epitelial. El medio es DMEM/F12 sin Fenol Rojo. Diez días después de sembrar, las células llegaron a ser vacuadas y algunas de ellas empezaron a separarse; los fibroblastos que eran muy escasos en el comienzo aumentaron en proporción. Durante los próximos 2-3 meses la presencia de células gigantes multi-nucleadas fue la característica más visible.

Algunas fuentes fueron subcultivadas desde las fuentes grandes a las fuentes más pequeñas. Las células que no se unían durante la primera hora fueron transferidas a otra fuente, y las células que no se unían en esta segunda fuente durante dos horas fueron transferidas a otra fuente. Esto fue realizado para quitar los fibroblastos. Curiosamente, las líneas de células surgieron de los clusters epiteliales presentes en estas poblaciones de célula de conexión rápida. Cinco o seis subcultivos fueron realizados durante 3-4 meses, y en cada subcultivo menos células fueron cosechadas. De 2 cultivos primarios diferentes realizados de las líneas de tumor CC4-HD, 3 líneas de células fueron desarrolladas, una de ellas, MC4-L2, es un sublínea derivada de MC4-L1. Un pequeño grupo de células del pasaje 7 MC4-L1 quedó conectada después de la tripsinización; con el tiempo, estas células empezaron a crecer con un modelo completamente diferente que aquel de las células parentales.

Un fenómeno semejante ocurrió con MC7-L1. Las colonias de células gigantes pudieron ser vistas también pero en este caso hubo una clase diferentes de células inter-mezcladas con las células gigantes "tipo fibroblastos" y la línea de célula surgió de las fuentes donde el aspecto morfológico general fue de escasas células epiteliales inter-mezcladas con una masa de células tipo fibroblasto.

En resumen, 3 líneas surgieron de CC4-HD y una de C7-HI.

Varias pruebas fueron usadas para caracterizar las líneas de células resultantes. El origen de las cuatro líneas de células fue evaluado por la inmunocitoquímica de los filamentos intermedios y el manchado de la citoqueratina; y la expresión de los receptores de la hormona por los ensayos inmuncitoquímicos y bioquímicos.

Los medios y los componentes de los medios están fácilmente disponibles y pueden ser obtenidos, por ejemplo de los proveedores comerciales. Tales proveedores comerciales incluyen, pero no están limitados a Gibco BRL (Gaitherberg, MD), Sigma Bioscience (St. Louis, MO.), Gen S.A. (Buenos Aires) y otros proveedores que fabrican los productos semejantes.

Las líneas de células de tumor pueden ser usadas, por ejemplo, para controlar las hormonas y las moléculas relacionadas tanto *in vitro* como *in vivo*.

Aspectos morfológicos de las líneas de células

In vitro

La MC4-L1 fue la primera línea obtenida de un tumor parental CC4-HD que presenta un modelo PD del crecimiento del tumor. Las células varían en medida y tienen forma epitelial, poligonal, típica. Las células gigantes están siempre presentes aún después de 70 subcultivos. La MC4-L2 se originó en una de las fuentes del pasaje del subcultivo octavo de MC4-L1. Después de la tripsinización, las pocas células que permanecieron sin desconectarse fueron dejadas con el medio como un back up en el caso de contaminación. Después de un mes sin cambios del medio, surgió una población morfológicamente diferente de célula. Estas células con forma de eje, ahora nombradas como MC4-L2, crecen como células aisladas, pero van eventualmente a mancomunarse en acumulación cuando el cultivo está sobre crecido. La NC4-L3 surgió de un cultivo primario diferente realizado dos semanas después de uno que originara dos líneas previas. Aunque su morfología se parezca a aquella de MC4-L1, las células son más homogéneas en la medida.

El MC7-L1 surgió de una línea de tumor diferente *in vivo*, con un modelo PI del crecimiento del tumor como el explicado previamente. Estas células son semejantes a las células NC4-L2, con la morfología de la forma de eje, aún más alargada que MC4-L2, y crecen también como células únicas.

Tumores

Cuando estas células fueron inoculadas en los ratones hembras BALB/c dieron origen a los carcinomas metastáticos. La NC4-L1 origina carcinomas de infiltración ductal con diferenciación cribiforme tubular. Las células proliferantes chatas o poligonales muestran un núcleo pálido con una cromatina floja y uno o dos núcleos pequeños. Las figuras mitóticas y apoptóticas se detectan frecuentemente. La necrosis se encuentra frecuentemente en el centro de las masas del tumor. El estroma es escaso, denso y bien vascularizado. La metástasis pulmonar fue discernida tres meses después de la inoculación del tumor, invadiendo y destruyendo el tejido normal pulmonar.

Un cuadro completamente diferente es observado con MC4-L2. Estas células ocasionan tumores sarcomatoides que revelan la invasión local y la metástasis del nódulo linfático y del pulmón. Se encuentran a menudo, células fusiformes que infiltran el tejido muscular. Aunque ellas están bien vascularizadas, el estroma es escaso y los grupos de células tipo mastocito se encuentran en forma frecuente. Las células de proliferación atípica muestran un núcleo gigante o son multinucleadas. El foco de las células tipo epiteliales puede verse. El manchado de citoqueratina confirmó su origen epitelial.

La NC4-L3 no mostró los signos de la diferenciación glandular. La proliferación de las células revela los núcleos ovoides con uno o con ningún nucléolo y citoplasmas pálidos de tamaño variables. El estroma es abundante, flojo, y fibroblástico. Las áreas de necrosis y trombosis pueden ser observadas también.

El crecimiento de MC7-L1 *in vivo* se parece a un carcinoma indiferenciado, con las células poligonales que muestran citoplasmas eosinofílicos y densos, ordenados en masas sólidas sin diferenciación estructural. Se observaron células multinucleadas que muestran núcleos hipercromáticos u ovoides atípicos. Un índice alto mitótico (más grande que 20/ espacio 40 x) fue registrado. Estos tumores infiltran también los tejidos vecinos y ocasionan metástasis lejanas. Las metástasis pulmonares muestran una apariencia más epiteloide que el tumor primario.

Manchado de citoqueratina

Todas las líneas de células, inclusive MC4-L2 y MC7-L1 que mostraron una morfología tipo fibroblástica, mostraron un manchado positivo cuando reaccionaron con los anticuerpos de anticitoqueratina.

La morfología epitelial fue valorada también en los tumores. Las cuatro líneas de células ocasionaron los tumores que fueron positivos para la citoqueratina. Otra vez puede advertirse que MC4-L2 ocasionó tumores sarcomatoides, tumores que son positivos para las citoqueratinas, confirmando su origen epitelial.

Las líneas de célula de tumor de la invención presente demuestran el manchado de citoqueratina sobre el manchado histoquímico que usa un anticuerpo dirigido contra la citoqueratina. Por consiguiente, la presente invención proporciona las líneas de células preferidas incluyendo MC4L1, MC4-L2, MC4-L3 y MC7-L1.

Expresión del receptor del estrógeno y la progesterona

ER y PR fueron detectadas por los métodos inmunocitoquímicos y bioquímicos. Todas las líneas de célula mostraron un manchado nuclear intenso confirmado utilizando los métodos bioquímicos por los puntos de saturación únicos.

Resultados similares se obtuvieron cuando se estudiaron los tumores. Tanto los tumores primarios y sus metástasis muestran el manchado nuclear intenso para ER y PR.

Expresión c-erbB2

Las NC4-L1, MC4-L2 y MC4-L3 mostraron un manchado c-erbB2 intenso. Estos resultados están de acuerdo con los resultados previos que muestran la amplificación de c-erbB2 en la línea del tumor C4-HD parental (Balaña, MI y colaboradores 1999 *Oncogene* 18: 6370-6379).

Separación

Las células NC4-L1 y las células NC4-L3 muestran una adhesión fuerte al plástico, desde que toma más de 10 minutos la separación después del tratamiento de tripsina. Por contraste, las NC4-L2 y MC7-L1 se separan fácilmente sólo unos pocos segundos después del tratamiento de tripsina o aún sin solución enzimática, simplemente sacudiendo.

Respuesta de la hormona in vitro

En una realización de la invención la respuesta de las células a una progestina: MPA, un estrógeno: E₂, 2 antiprogestinas: RU, ZK, un antiestrógeno: ICI y TGFβ1 fueron estudiados usando el actual protocolo. Estos métodos son bien conocidos por aquellas personas de habilidad común en el arte.

MC4-L1

En pasajes tempranos un efecto estimulador de MPA, RU y E₂ se observó para la MC4-L1. En los pasajes posteriores el efecto estimulador de MPA fue sólo evidente (P<0,05) con concentraciones de uM de MPA (Figura 1). En los pasajes tempranos (antes del número de pasaje 16) la célula E₂ estimuló la proliferación mientras que en los pasajes posteriores no se detectó ningún efecto importante (Figura 2). RU tuvo un efecto agonista en los pasajes tempranos y en los pasajes tardíos fue similar a aquel de MPA (Figura 3).

ZK estimuló también la proliferación de la célula a concentraciones μM (Figura 4).

ICI y TGFβ1 se ensayaron sólo usando los pasajes posteriores. TGFβ1 mostró una inhibición significativa del crecimiento de la célula (Figura 5) mientras que ICI no tuvo efecto o ejerció ocasionalmente un efecto proliferativo (Figura 6).

MC4-L2

En esta línea un efecto significativo estimulador fue observado con la oscilación de la concentración de MPA desde 0,1 nM a acerca de 10 nM (Figura 7). E₂ estimuló la proliferación de la célula en concentraciones que oscilan desde cerca de 0,1 nM a cerca de 10 nM (Figura 8).

RU no indujo ningún cambio (Figura 9) y ZK en algunos experimentos mostró un efecto inhibitorio cuando se usó en concentraciones de cerca de 0,1 a cerca de 1 μ M (Figura 10). ICI fue inhibitorio en las concentraciones de μ M (Figura 11) y TGF β 1 mostró un efecto inhibitorio semejante como el observado usando la línea de célula MC4-L1 (Figura 12).

MC4-L3

Ningún efecto regulatorio de hormonas ni anti hormonas usadas se observaron en las condiciones experimentales en las que las otras línea de células mostraron los efectos informados.

MC7-L1

Esta fue la línea más interesante considerando la respuesta de la hormona *in vitro*. MPA estimula apreciablemente el crecimiento de la célula usando alrededor de 1 nM a cerca de concentraciones de 1 μ M (Figura 13). E₂ también estimuló la proliferación de la célula a 100 nM hasta 1 μ M pero los valores más altos fueron preferentemente obtenidos alrededor de las concentraciones de 1 nM (Figura 14). RU ejerció también un efecto estimulador, que fue importante en concentraciones de cerca de 0,1 a cerca de 1 μ M (Figura 15). Por otro lado, ZK no modificó la toma de timidina. ICI ejerció un efecto inhibitorio en concentraciones de cerca de 0,1 a acerca de 1 μ M (Figura 16) y TGF β 1 no tuvo ningún efecto.

En resumen, las líneas de célula de forma de eje MC4-L2 y MC7-L1 fueron aquellas que mostraron la respuesta mayor proliferativa a ambos MPA como a E₂, y la respuesta inhibitoria a ICI, fue luego más sensible. Por otro lado, MC4L2 es sensible a TGF β 1-mientras MC7-L1 no es sensible. Esta es la diferencia más significativa encontrada entre ambas líneas. Las líneas de célula de forma poligonal fueron menos sensibles a todas las hormonas y anti hormonas en las mismas condiciones experimentales aunque ambas líneas de células (LMC4-1 y MC4-L3) fueron inhibidas con TGF β 1.

Para los fines de la presente invención la proliferación de las líneas de células puede ser interpretada y medida por la toma de las líneas de células de los nucleótidos modificados, tales como y no limitados a ³H-timidina, ¹²⁵IUDR (iododeoxiuridinea); y tinturas tales como bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) que mancha las células vivas.

Respuesta de la hormona *in vivo*

Dependencia de MPA

La MC4-L1 fue inoculada en los animales tratados con MPA y los animales no tratados. Como se muestra en la Figura 17, el mismo modelo de crecimiento que se observó en la línea de tumor parental se observó aquí. Cuando se inoculó un subcultivo posterior (subcultivo 70), los tumores crecieron con un modelo similar en los animales tratados y los animales no tratados, aunque en el próximo pasaje el crecimiento estuvo favorecido en los animales tratados con MPA, y en el tercer pasaje, los tumores fueron otra vez dependientes de MPA. Un modelo de PI de crecimiento se observó con las líneas de NC4-L2 y MC7-L1, mientras un modelo de PD caracterizó la línea MC4-L3.

Respuesta de estrógeno y antiprogestina

Los animales que soportan los tumores MC4-L1, que crecen muy lentamente debido a la ausencia de MPA, fueron tratados con E₂, RU y ZK como se menciona en el ejemplo 8. Solamente los animales tratados con ZK mostraron el retroceso del tumor (Figura 18).

En MC4-L2, una completa regresión fue observada en animales tratados con RU (Figura 19). El retroceso completo fue observado en la línea de tumor MC4-L3 usando cualquiera de los tres agentes RU, ZK o E₂. Como se puede observar en la Figura 20, la línea del tumor MC7-L1 no fue inhibida por RU, ni tampoco por ZK, ni por E₂.

En resumen, las células con forma de eje (MC4-L2 y MC7-L1), cuando se transplantaron en los ratones singe-neicos, ocasionaron los tumores PI, mientras las líneas de células poligonales (LMC4- 1 y MC4-L3) ocasionaron los tumores PD. Las células con forma de eje respondieron en forma diferente al tratamiento de la hormona; mientras la MC4-L2 fue inhibida por RU, MC7-L1 fue resistente a todos los tratamientos. Además, las células poligonales mostraron un modelo diferente de respuesta: mientras MC4-L1 retrocedió solo con el tratamiento de ZK, las células MC4-L3 retrocedieron con ZK, RU y E₂.

Una persona experta en la técnica también está enterada de los medios para monitorear una respuesta terapéutica sobre la administración de la hormona o las moléculas relacionadas. En particular, la respuesta terapéutica puede ser calculada por el monitoreo parcial o completo de la regresión del tumor y/o la cantidad de metastasis y/o supervivencia. La atenuación del crecimiento del tumor o el retroceso del tumor en respuesta al tratamiento puede ser monitoreada usando varios puntos terminales conocidos por aquellas personas expertas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, la masa o la medida del tumor, la reducción/prevención de la metástasis o la prolongación de la supervivencia. Estos métodos descriptos no están por ningún medio todos incluidos, y otros métodos para adecuarse a la aplicación específica serán evidentes para la persona de conocimiento común en la técnica.

Cariotipo

El número modal de cada línea se muestra en la Tabla 2. Estos fueron evaluados en los pasajes 18-22 de cada línea de célula. MC4-L2 muestra dos números modales. Los marcadores citogenéticos semejantes han sido detectados en todas las líneas y están siendo caracterizados.

TABLA 2

Características principales de las líneas de células desarrolladas				
Línea de células	MC4-L1	MC4-L2	MC4-L3	MC7-L1
Tumor Parental	CC4-HD	CC4-HD	CC4-HD	C7-HI
Morfología in vitro	poligonal	Forma de eje	poligonal	Forma de eje
Separación	>10 min.	<1 min.	> 10 min.	<1 min.
Tiempo de duplicación (hs)	24	19	25	20
Número modal	65	68-83	60	74
RE (fmoles/mg prot)	1,27	20,8-9,6	2,69	13,8
RE (IMH)	+++	+++	+++	+++
RP (fmoles/mg prot)	3,65-13,48	164-145	6	141
RP (IMH)	+++	++	+++	++
Citoqueratina in vitro	+++	++	++	++
c-erbB2 in vitro (IMH)	++++	++++	++++	+
Cadherin E	+	+	+	+
Respuesta proliferativa de MPA in vitro	+	++	-	++++
Respuesta Proliferaiva in vitro E ₂	+	+	-	++
Respuesta antiestrógeno in vitro	Ninguna inhibición o ligera-mente prolifera-tiva	Inhibitoria	No	Inhibitoria
Respuesta inhibitoria TGFβ1	+++	+++	+++	-
Progestinas dependencia vivo	PD	PI	PD	PI
RE RP en las secciones del tumor (IMH)	+++	+++	+++	+++

	Citoqueratinas en las secciones del tumor	++	+	++	+
5	Morfología del tumor	Carcinoma de infiltración ductal	Carcinoma fusocelular	Carcinoma de infiltración ductal	Carcinoma indiferencia do
	Invasión local	pobre	Alto	pobre	Muy alto
10	metástasis	pulmón	Axilar pulmón	y pulmón	Axilar, pulmón y otros

15 Los inventores han desarrollado cuatro diferentes líneas de células mamarias de ratón originadas en dos diferentes líneas de tumor *in vivo* que expresan ER y PR. Estas son las primeras líneas de células de adenocarcinoma mamario de ratón expresan ER y PR y son sensibles a la hormona, excluyendo las líneas originadas en los ratones transgénicos (Sacco MG y colaboradores 1998 *Breast Cancer Res y Trat.* 47:171-180).

20 Tres entre cuatro líneas derivadas de la misma línea de tumor *in vivo* y dos entre tres del mismo cultivo primario. Estas líneas han sido descritas independientemente porque tienen propiedades diferentes con respecto a la morfología, la dependencia de la hormona y el análisis cariotípico. Dos líneas tienen la morfología poligonal (LMC4- 1 y MC4-L3) y las otras dos son células con forma de eje (MC4-L2 y MC7-L1). Un modelo diferente de invasión y metástasis fue observado asociado a estos tipos de morfología. Esto puede hacer que las líneas sean útiles para evaluar la relación
25 entre la sensibilidad de la hormona, la invasión y las metástasis.

Las líneas formadas poligonales mostraron un modelo de crecimiento sensible a MPA cuando se inocularon en los ratones singeneicos, mientras que las células con forma de eje crecieron en forma similar en los ratones tratados o sin
30 tratamiento. El efecto contrario fue observado en los estudios *in vitro*. Las células con forma de eje fueron estimuladas con MPA y con E₂; en las células poligonales el efecto estimulatorio fue encontrado sólo en los pasajes tempranos.

El tratamiento con antiprogesterina *in vitro* produjo resultados inesperados: RU actuó como un agonista en altas concentraciones (de acerca de 100 nM a acerca de 1 µM), en los experimentos donde MPA fue proliferativa mientras ZK no tuvo efectos ni fue ligeramente inhibitoria en altas concentraciones (1 µM). El ICI antiestrógeno fue inhibitorio
35 en las líneas de células con forma de eje en las concentraciones de µM.

El tratamiento *in vivo* con antiprogesterinas dio respuestas diferentes a aquellas obtenidas en los estudios *in vitro*: una diferencia entre MC7-L1 y MC4-L2 fue evidente: mientras MC7-L1 fue insensible a RU, ZK y E₂, MC4-L2 fue inhibida por RU. Los tumores MC4-L1 retrocedieron sólo con ZK mientras en RU MC4-L3, ZK y E₂ indujeron el
40 retroceso del tumor. TGFβ1 indujo inhibición en todas las líneas de células menos en MC7-L1.

Todos estos datos referentes a la receptividad de hormona indican que este panel de líneas de células son particularmente interesantes para estudiar la acción de la hormona y así evaluar el papel de los compuestos farmacológicos nuevos, o para probar la presencia de xeno-estrógenos y otros agentes ambientales. Todas las líneas comparten la
45 misma propiedad: su origen semejante y la presencia de tanto los receptores de estrógeno como de progesterona. A pesar de esto, cada una tiene características individuales que pueden considerarlas apropiadas para diferentes líneas de investigación.

La acción de las hormonas esteroides ha sido simplificada demasiado durante muchos años. En los últimos años, los efectos no clásicos diferentes de las hormonas está siendo considerado y estos efectos incluyen, por ejemplo, acciones en el nivel de la membrana. El hecho de que en los estudios *in vitro* las antiprogesterinas puedan actuar como agonistas en vez de ser antagonistas, y que los efectos contrarios se obtienen cuando se administra *in vivo*, esto hace de este panel de líneas de célula una herramienta excelente para estudiar los efectos *in vivo* de las hormonas contra los efectos
50 *in vitros*. Esta es una de las mejores ventajas de este panel de líneas de células. Los experimentos *in vivo* pueden ser fácilmente llevados a cabo. Generalmente, las líneas de células humanas deben ser inoculadas en los animales inmuno-deficientes para evitar el rechazo. Esta es la mejor aproximación a la situación clínica aunque hay diferencias obvias entre esta situación experimental y la inoculación de las células de la presente invención en los ratones singeneicos.

60 Ejemplos

Esta invención es adicionalmente ilustrada por los ejemplos siguientes, que no deben ser interpretados de ninguna manera como que imponen limitaciones sobre el alcance de los mismos. Por el contrario se debe entender claramente que se debe tener el recurso para varias otras realizaciones, modificaciones y equivalentes de las mismas, que luego de leer la descripción del presente, se le pueden sugerir a aquellos expertos en la técnica sin alejarse del espíritu de la
65 presente invención y/o del alcance de las reivindicaciones del apéndice.

Ejemplo 1

Cultivos Primarios

5 Los tumores fueron quitados asépticamente, fueron picados y fueron lavados con DMEM/F12 (medio de Tagle modificado de Dulbecco: F12 de Ham, 1:1, sin fenol rojo, 100 U/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomicina). El tejido fue suspendido en 5 ml de solución enzimática (Trypsina: 2,5 mg/ml, albúmina: 5 mg/ml y colagenasa Tipo II 850 U/ml en fosfato salino amortiguado (PBS) y se incubaron a 37°C por 20 min., bajo batido continuo. La fase líquida de la suspensión entonces fue quitada y el tejido no digerido se incubó por unos 20 min. adicionales, con solución nueva enzimática. La acción de la enzima fue detenida agregando medio de lavado (WM) (DM EM/F12 +5% de FCS (Gen S.A. Buenos Aires). Las células epiteliales y las células fibroblásticas fueron separadas por una modificación de la técnica de sedimentación descrita previamente (Dran y colaboradores, 1995). Brevemente, la suspensión de la célula obtenida fue resuspendida en 15 ml de medio de fibroblasto (FM) (DM EM/F12 + 10% de calor desactivado FCS) y se permitió sedimentar durante 20 min. Los 5 ml superiores, correspondientes a la fracción fibroblástica, se sembraron en frascos y se permitió que las células se unieran durante 1-2 horas después de que el medio que contenía las células no unidas se quitara y se reemplazara por FM nuevo. Las células sedimentadas corresponden a la fracción epitelial enriquecida, que fue resuspendida otra vez en 15 ml de WM y permitió que sedimente durante otros 20 minutos. Los 15 ml superiores se descartaron y este procedimiento se repitió 10 veces más o menos hasta que los fibroblastos fueron detectados en el superviviente. Las células fueron plaqueadas en frascos de cultivo con medio epitelial (EM (DMEM/F12 + 5% chFCS) y se permitió que se unieran durante 24-48 horas. El medio fue luego quitado y reemplazado por medio nuevo conteniendo 10-8 M MPA. El medio fue cambiado durante 2-3 días. En la confluencia, o cuando los clusters de la célula parecieron superpoblados las células fueron separadas con 0,25% de tripsina, se lavaron y se resuspendieron en EM fresco. La suspensión resultante fue usada en diferentes ensayos.

25 Ejemplo 2

Establecimiento de las líneas de células y las condiciones del cultivo

30 El tejido usado para establecer las líneas de células se obtuvo del tumor inducido por MPA, un carcinoma PD (CC4-HD) en el pasaje 60, mantenido por trasplante singeneico en los ratones tratados con MPA y un tumor PI (C7-HI) se mantuvo por el trasplante singeneico en los ratones hembras no tratados.

35 Los cultivos enriquecidos epiteliales que crecen en la presencia de DMEM/7F12 (Sigma Chemicals Co, S. Louis MO) y 5% de chFCS (Gen S.A. Buenos Aires) y 10 nM MPA (Sigma Chemical Co, St. Louis MO) ahora se hicieron crecer en el mismo medio con el agregado del 10% de FCS (Life Technologies, Inc, Grand Island, NY), glutamina 2 mM (Life Technologies), insulina bovina (2 μ g/ml) (Life Technologies, Inc, Grand Island, Grand Island, NY) penicilina 100 U/ml estreptomicina 100 μ g/ml Amfotericina B (Life Technologies, Inc Grand Island, NY) Tiroxina (10 nM) (Sigma Chemical Co, St. Louis MO), cortisol (0,3 μ M)(Sigma Chemical Co, St. Louis MO), transferrin (10 ng/ml) (Sigma Chemical Co, St. Louis MO) y 10 nM MPA (Sigma Chemical Co, St. Louis MO). Después de 10 días del sembrado, las células se volvieron vacuadas y algunas de ellas comenzaron a separarse; los fibroblastos, que fueron muy escasos al comienzo, aumentaron en proporción.

45 Algunas fuentes fueron subcultivadas de las fuentes grandes a las más pequeñas. Esto significa de una fuente de una placa de 6 fuentes a una fuente de una placa de 24 fuentes. Las células que no se unieron para la primera hora fueron luego transferidas a otra fuente, y las células que no se conectaron en esta segunda fuente durante dos horas fueron luego transferidas a otra fuente. Esto fue realizado para quitar los fibroblastos. Curiosamente, las líneas de células se levantaron de los clusters epiteliales presentes en estas poblaciones de célula rápidamente conectadas. Cinco o seis sub cultivos se llevaron a cabo durante 3-4 meses, y en cada sub-cultivo menos células fueron cosechadas. De 2 diferentes cultivos primarios llevados a cabo en las líneas del tumor CC4-HD, 3 líneas de células se desarrollaron, una de ellas 50 MC4-L2 es una sub-línea derivada de MC4-L1. Un pequeño grupo de células del pasaje 7 de MC4-L1 permaneció conectado después de la tripsinización, y con el tiempo estas células comenzaron a crecer con modelos completamente diferentes que aquel de las células parentales.

55 Un fenómeno semejante fue observado con MC7-L1. Las colonias de células gigantes pueden también ser vistas pero en este caso, existe una clase diferente de células, entremezcladas con las células tipo fibroblásticas gigantes y la línea de célula surgieron de las fuentes donde el aspecto general morfológico fue de células epiteliales escasas intermezcladas con una masa de células tipo fibroblastos.

60 Las líneas de células han sido por más de 27 meses y mantienen las mismas características.

Ejemplo 3

Ensayo de tiempo multiplicado

65 El duplicado del tiempo de las líneas de células se determinó por el plaqueado de las células en placas de 6 fuentes a 20.000 células/fuente y contando fuentes duplicadas a las 9 am y a las 5 pm durante una semana. Duplicar los tiempos fue calculado de las fases log de las curvas del crecimiento.

Ejemplo 4

Ensayo de inmunohistoquímica

5 Las líneas de célula fueron crecidas en deslizadores de cámara de 8 fuentes. Los deslizadores fueron preparados para manchar enjuagando tres veces en PBS, fijando durante 45 min. en formalina amortiguada al 15% y secando hasta usarlo. El tejido del tumor fue fijado en formalina amortiguada por ER, PR y c-erbB2, o por etanol para citoqueratinas en dilución 1:1000 y embebida en parafina por métodos estándar. Las secciones de 4 μ m fueron cortadas y manchadas con H&E por los métodos estándar. El inmuno-manchado por la citoqueratina fue llevado a cabo utilizando anticuerpo policlonal de conejo Z0622 (Dako Corp., Carpinteria, CA). Los anticuerpos de conejo policlonales ER (1:50 en tejidos y 1:100 deslizador de cámara) y PR (1:100 en el tejido y 1: 200 deslizador de cámara) fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz CA y el anticuerpo monoclonal PR (1: 250 deslizador de cámara) fue obtenido de Neomarkers. El manchado se visualizó usando el sistema inmunoperoxidasa Vectastin Elite ABC (Vector Laboratories, Burlingame, CA) y equipo de sustrato 3,3' de peroxidasa diaminobenzidina (Vector Laboratories Burlingame CA). Las células fueron contra manchadas con tinte hematoxilina débil. El anticuerpo primario fue reemplazado con suero de conejo normal para controles negativos.

Ejemplo 5

20 *Ensayo de línea de célula de tumorigenicidad*

Las células fueron tripsinizadas y resuspendidas en un exceso de 10 dobleces de medio de cultivo y 10% FCS. Después de que las células de la centrifugación fueran resuspendidas en el medio libre de suero y las células 10^6 fueron inyectadas sc en un volumen final de 0,1 ml usando una aguja de calibre 21 en el flanco inguinal derecho de los ratones BALB/c que habían sido inoculados centrolateralmente con depósito de MPA de 40 mg (Dador Laboratories, Buenos Aires). Los ratones fueron examinados cada tres días por el desarrollo de tumores palpables. A fines del experimento se mataron los animales y los tumores se extirparon. Se realizaron autopsias completas para discernir la presencia de metástasis. El cuidado animal fue de acuerdo con las pautas institucionales.

Ejemplo 6

35 *Análisis cariotípico*

Las células semi confluentes fueron expuestas a 1 μ g/ml colcemid durante 2 hs a 37°C, y entonces se separaron con tripsina. El tratamiento hipotónico se llevó a cabo en cloruro de potasio 0,075 M durante 10 minutos y se fijaron las células con ácido acético metanol-glacial de 3:1. Los deslizadores fueron manchados con 3% de Giemsa para el examen morfológico y el conteo de los cromosomas. El agrupamiento G fue llevado a cabo calentando a 60°C durante toda la noche y manchando con tinte Wright nuevamente diluida en fosfato amortiguado 1:3, pH 6,8.

Ejemplo 7

45 *Ensayo para la presencia de los receptores de estrógeno y progesterona*

La presencia de ER y PR fue evaluada por inmunocitoquímica tal como se describió anteriormente, y por la unión de ligando usando toda la técnica de la célula en los puntos de saturación única (Dran y colaboradores, 1995 *supra*).

Ejemplo 8

Evaluación de la dependencia de la hormona

55 *Ensayo in vitro*

Se evaluaron las respuestas de diferentes líneas de células a MPA, E₂, RU, ZK o TGF β 1.

La ingesta de ³H-timidina: en una microplaca de 96 fuentes, se sembraron 0,1 ml/fuente de una suspensión de célula en EM a una concentración de 10^5 cel/ml. Después de la fijación (24 hs), las células fueron incubadas durante 72 hs con las soluciones experimentales a ser probadas, La mitad de los medios se cambió cada 24 horas. Las células fueron incubadas con 0,4 μ Ci de timidina ³H-timidina (actividad específica: 20 Ci/mmol) durante 24 horas, tripsinizadas y cosechadas en un cosechador de célula. Se contaron los filtros en un contador de centelleo líquido. Se llevaron a cabo los ensayos en octuplicados y el medio y la desviación estándar fueron calculados para cada solución probada, La diferencia entre los controles y los grupos experimentales fue analizada por ANOVA seguido por la prueba de Dunnett entre los grupos.

Ensayos in vivo

Las células de diferentes líneas fueron inoculadas en los ratones hembras BALB/c tratados o no con MPA como se describió previamente. Si los tumores crecían en forma similar en los animales tratados y en los animales no tratados, los tumores que crecían en los ratones no tratados se utilizaron para el pasaje siguiente. Los tumores fueron trasplantados por trocar sc en el flanco inguinal derecho de los ratones BALB/c hembras de dos meses de vida. Los tratamientos hormonales se iniciaron cuando los tumores alcanzaron alrededor de 50 mm². RU (6,5 mg/kg peso corporal) y ZK (10 mg/kg peso corporal) fueron inoculados diariamente con inyecciones sc. Se administró E₂ como pastillas de moldeo silásticas de 5 mg implantadas sc. El crecimiento del tumor se midió cada 2-3 días.

Varias modificaciones de la invención además de aquellas mostradas y descritas en el presente serán evidentes para aquellas personas expertas en la técnica de la descripción que antecede. Tales modificaciones se intentan también que caigan dentro del alcance de las reivindicaciones del apéndice.

REIVINDICACIONES

1. Una línea de célula MC4-L2 de adenocarcinoma mamario de ratón no transgénico, que tiene el número de Acceso de ATCC PTA-892, la línea de célula para ser obtenida subclonando la línea de célula MC4-L1 que deriva de un tumor de ratón CC4-HD dependiente de progestina.

2. Un sistema de línea de célula para probar la actividad de las hormonas, los compuestos antihormonas, farmacológicos y los agentes ambientales, en donde el sistema comprende por lo menos las líneas de células de la Reivindicación 1.

3. El sistema de línea de célula de la Reivindicación 2, donde el sistema comprende una o más de las líneas de células escogidas del grupo que consiste en:

- i) una línea de célula de adenocarcinoma mamario de ratón no transgénico MC4-L1, que deriva de un tumor de ratón CC4-HD dependiente de progestina, en donde la línea de célula expresa los receptores de progesterona y se deposita con el ATCC como número de Acceso PTA-889;
- ii) una línea de célula MC4-L3 de adenocarcinoma mamario de ratón no transgénico, que deriva de un tumor de ratón CC4-HD dependiente de progestina, donde la línea de célula expresa los receptores de estrógeno y progesterona y se deposita con el ATCC como número de Acceso PTA-891;
- iii) una línea de célula MC7-L1 de adenocarcinoma mamario de ratón no transgénico que deriva de un tumor de ratón C7-HI independiente de progestina, en donde la línea de célula expresa los receptores de estrógeno y progesterona y es depositada con el ATCC como número de Acceso PTA-890.

4. Un método *in vitro* para probar la actividad de la hormona, los compuestos anti-hormona, farmacológicos o los agentes ambientales, que comprende los pasos de cultivar una línea de célula, en donde la línea de célula comprende la línea de célula de la Reivindicación 1.

5. El método *in vitro* de la reivindicación 4, en donde la línea de célula comprende una o más de las líneas de células escogidas del grupo que consiste de:

- i) una línea de célula de las líneas de célula MC7-L1 de adenocarcinoma mamario de ratón no transgénico que deriva de un tumor de ratón C7-HI independiente de progestina en donde la línea de célula expresa los receptores de estrógeno y progesterona y se deposita con el ATCC como número de Acceso PTA-890;
- ii) una línea de célula MC4-L3 de adenocarcinoma mamario de ratón no transgénico que deriva de un tumor de ratón CC4-HD dependiente de progestina, en donde la línea de célula expresa los receptores de estrógeno y progesterona y se deposita con el ATCC como número de Acceso PTA-891;
- iii) una línea de célula de las líneas de célula MC4-L1 de adenocarcinoma mamario de ratón no transgénico, que deriva de un tumor de ratón CC4-HD dependiente de progestina, en donde la línea de célula expresa los receptores de estrógeno y progesterona y se deposita con el ATCC como número de Acceso PTA-889.

6. Un equipo de prueba para determinar el efecto de la hormona, los compuestos anti-hormona, farmacológicos y los agentes ambientales, en donde el equipo comprende una alícuota de la línea de célula de la reivindicación 1 y los medios para evaluar la proliferación de la línea de célula.

7. El equipo de prueba de la reivindicación 6, en donde el equipo comprende una alícuota de cada una o más de las líneas de células escogidas del grupo que consiste de:

- i) una línea de célula MC4-L1 de adenocarcinoma mamario de ratón no transgénico que deriva de un tumor de ratón CC4-HD independiente de progestina en donde la línea de célula expresa los receptores de estrógeno y progesterona y se deposita con el ATCC como número de Acceso PTA-890;
- ii) una línea de célula MC4-L3 de adenocarcinoma mamario de ratón no transgénico que deriva de un tumor de ratón CC4-HD dependiente de progestina, en donde la línea de célula expresa los receptores de estrógeno y progesterona y se deposita con el ATCC como número de Acceso PTA-891;
- iii) una línea de célula de las líneas de célula MC7-L1 de adenocarcinoma mamario de ratón no transgénico, que deriva de un tumor de ratón CC4-HI independiente de progestina, en donde la línea de célula expresa los receptores de estrógeno y progesterona y se deposita con el ATCC como número de Acceso PTA-889.

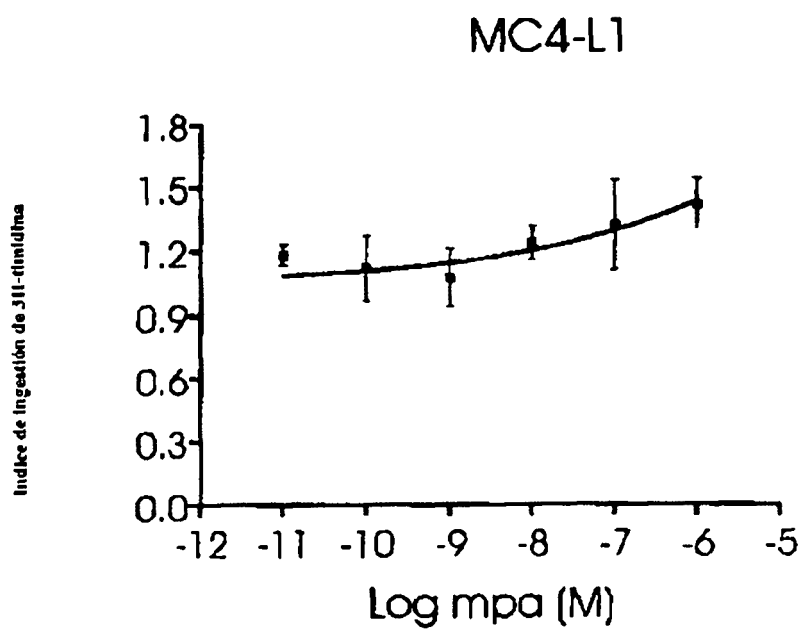


FIGURA 1

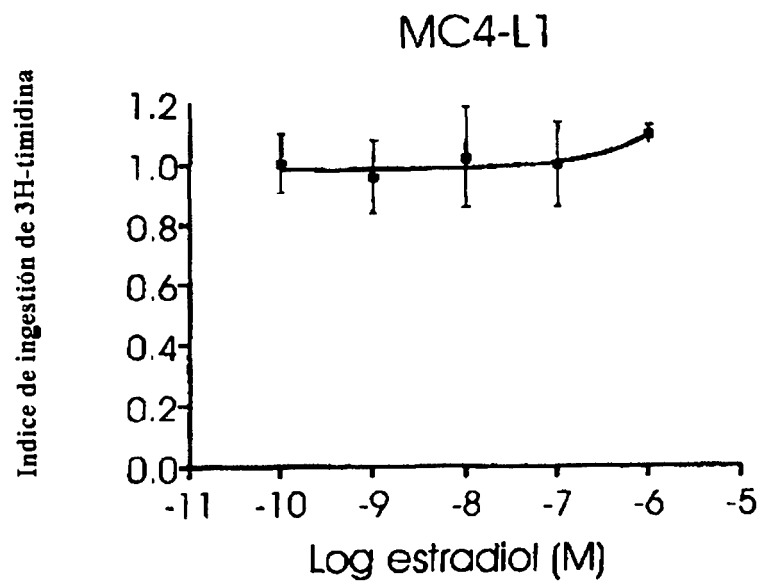


FIGURA 2

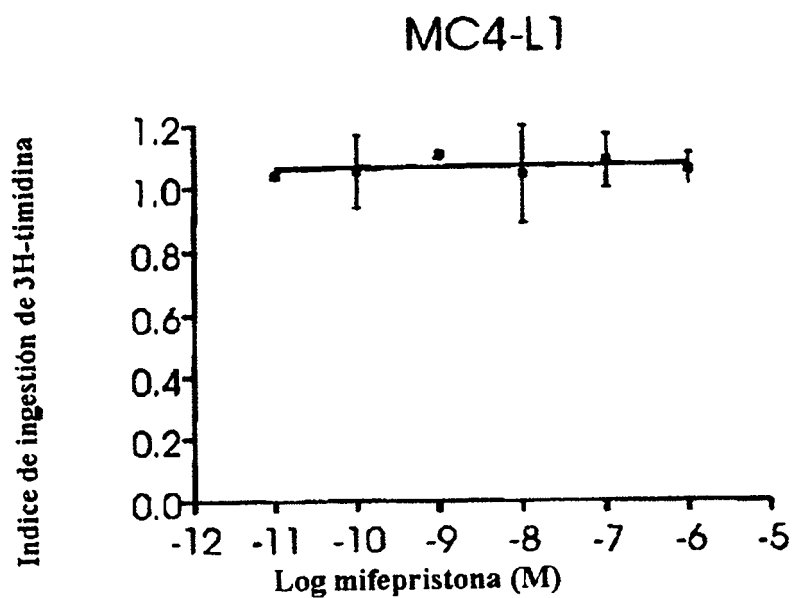


FIGURA 3

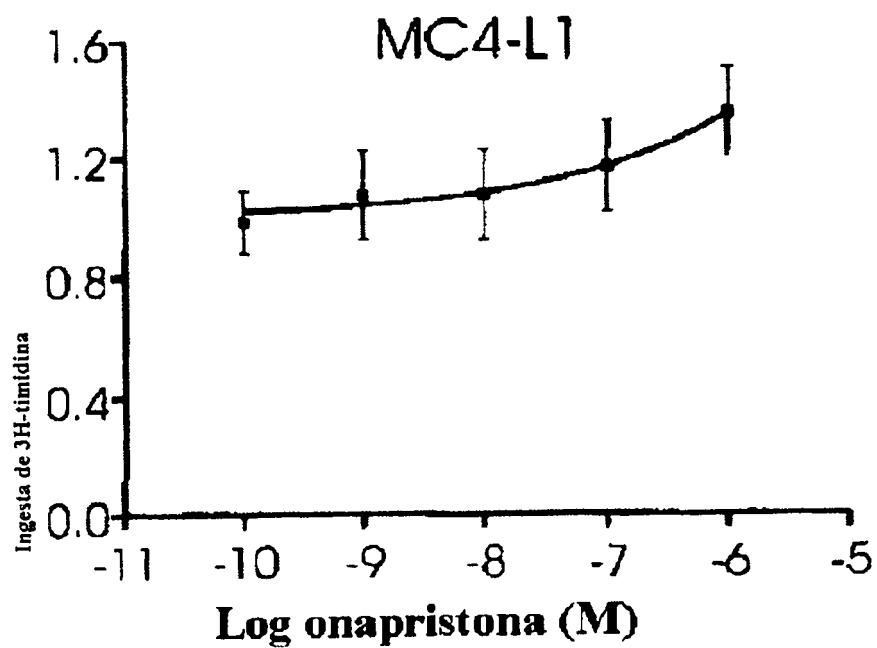


FIGURA 4

MC4-L1

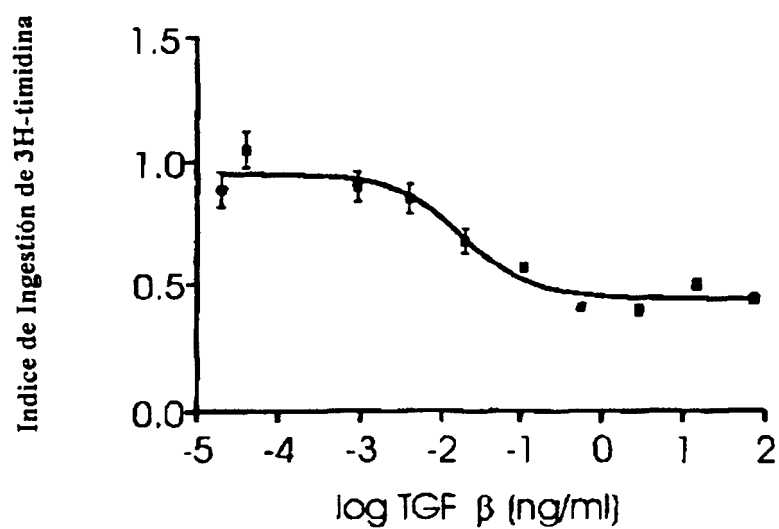


FIGURA 5

MC4-L1

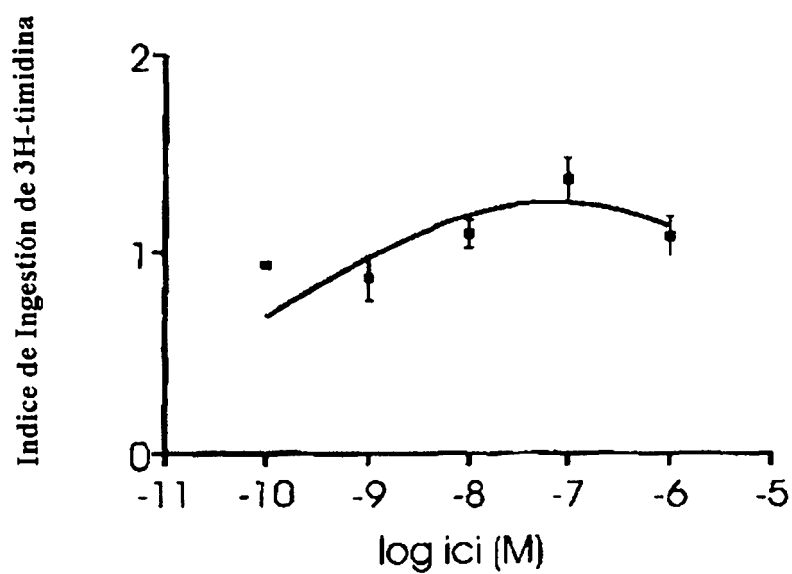


FIGURA 6

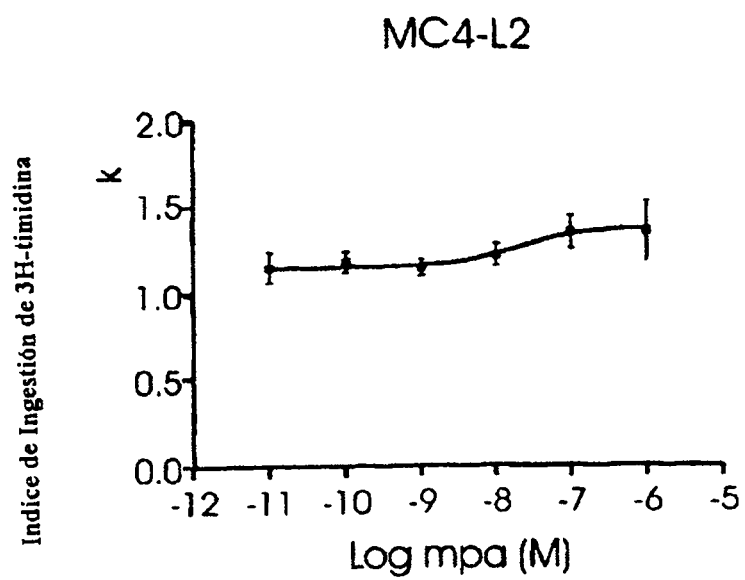


FIGURA 7

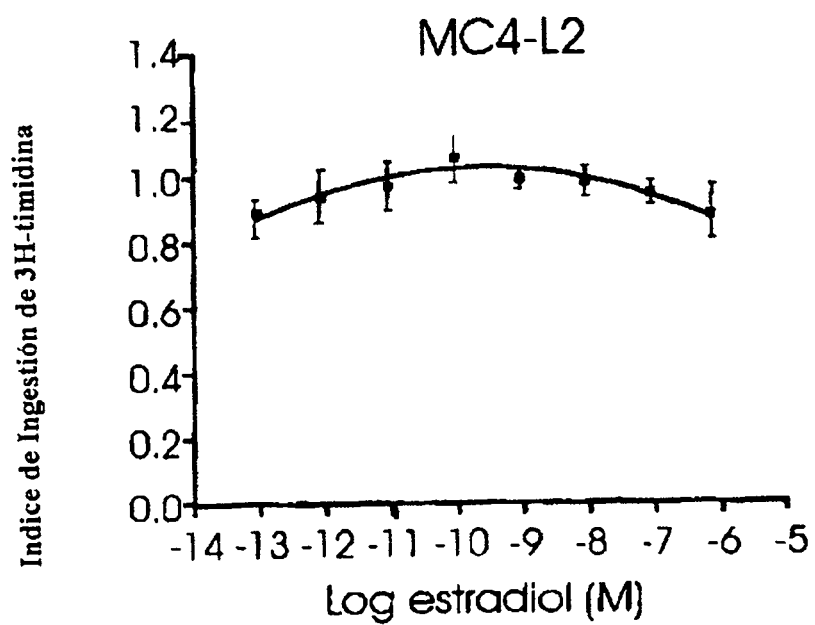


FIGURA 8

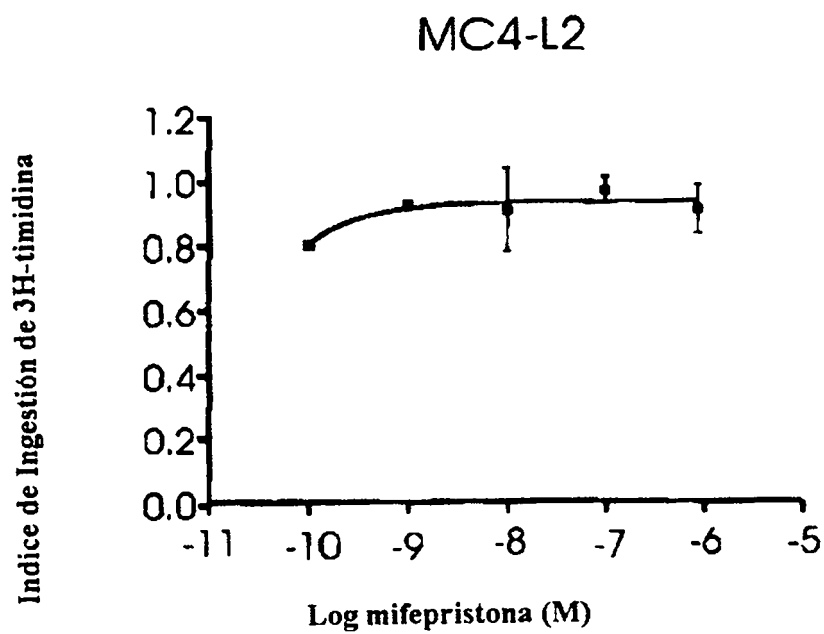


FIGURA 9

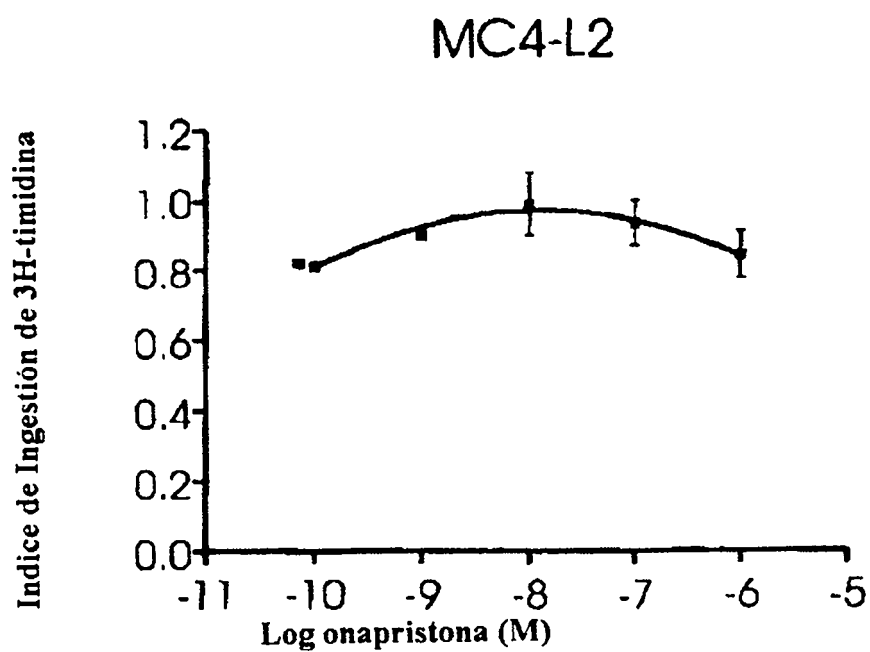


FIGURA 10

MC4-L2

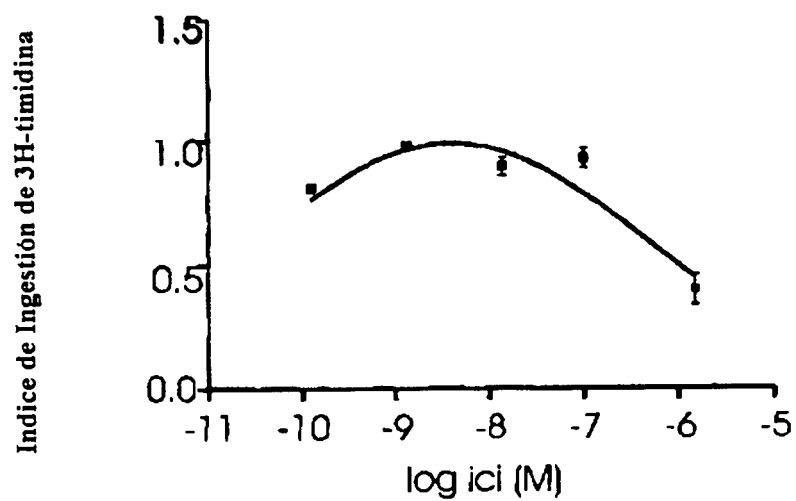


FIGURA 11

MC4-L2

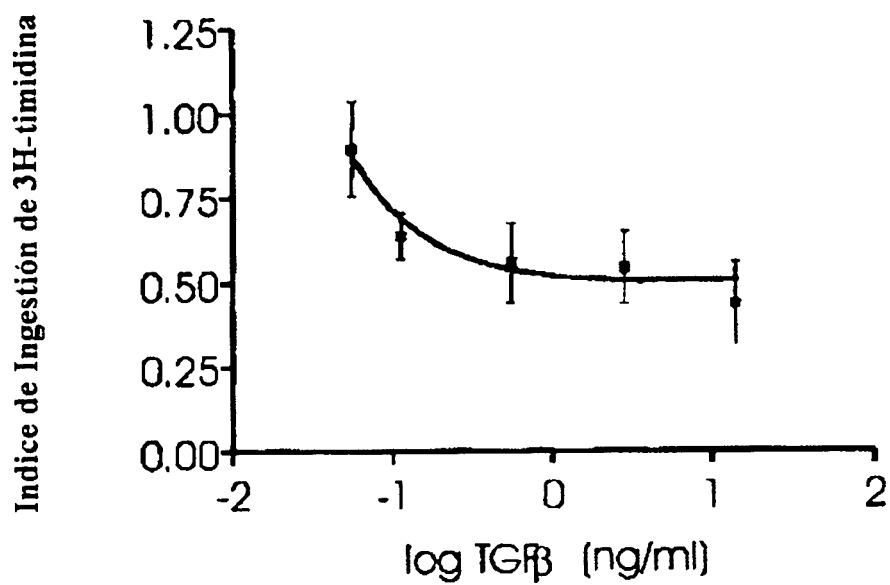


FIGURA 12

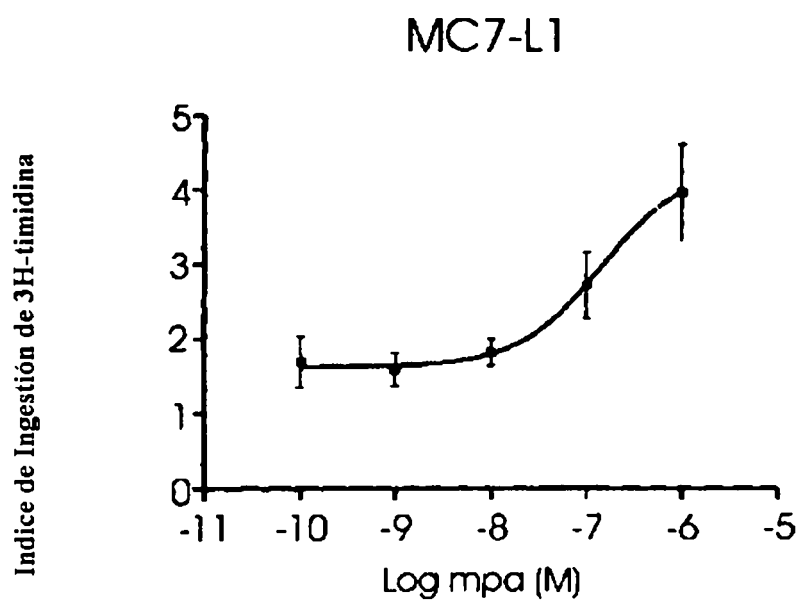


FIGURA 13

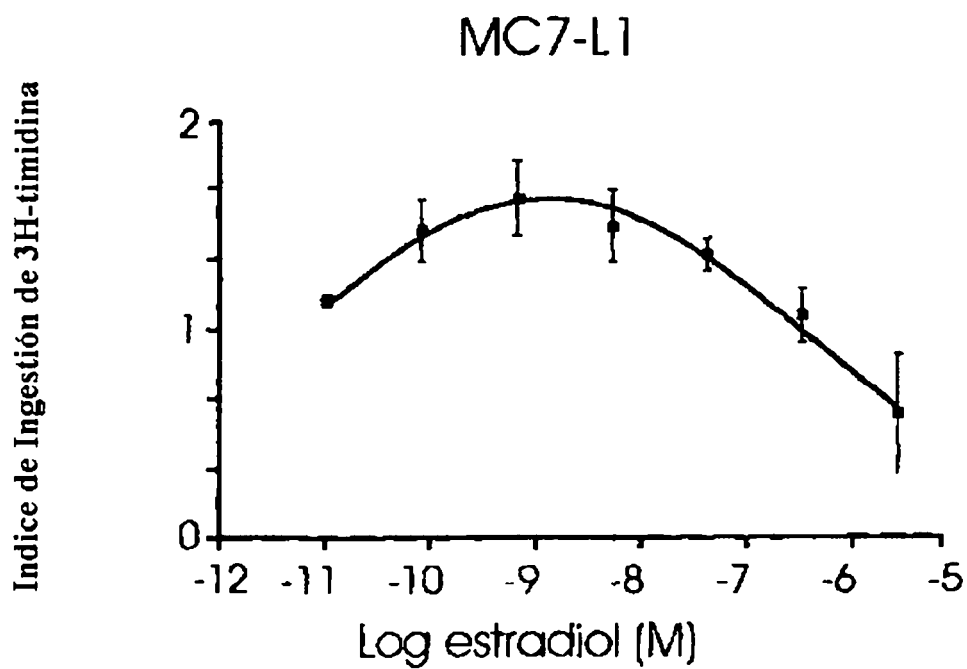


FIGURA 14

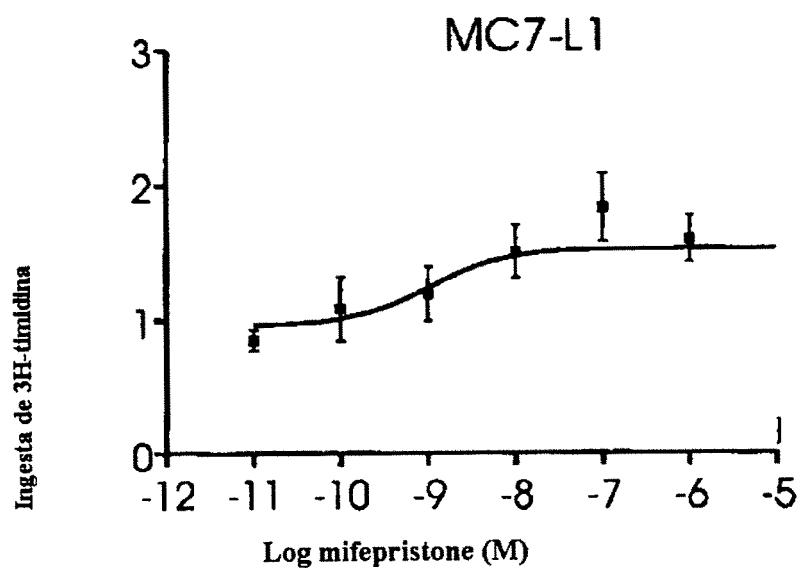


FIGURA 15

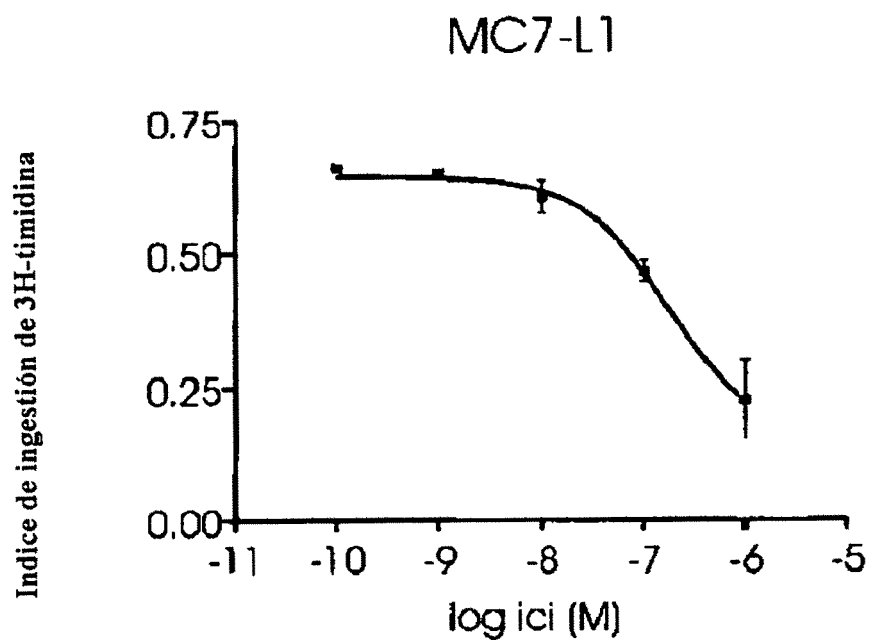


FIGURA 16

MC4-L1

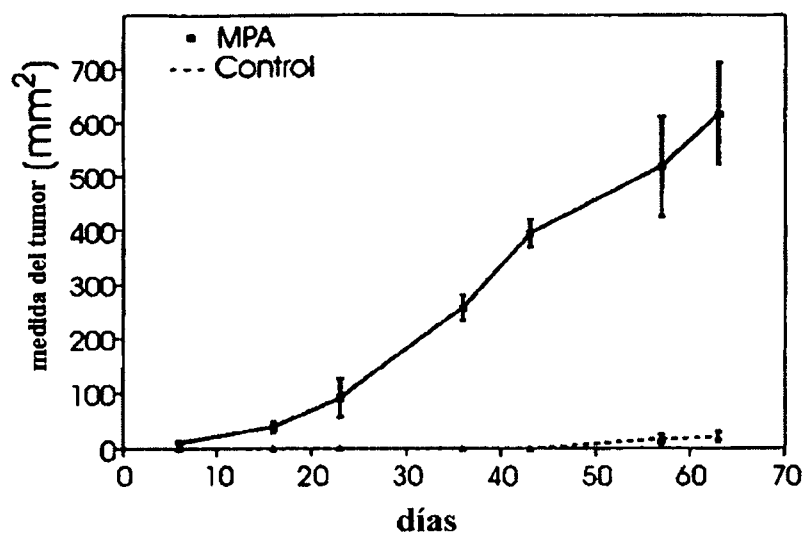


FIGURA 17

MC4-L1

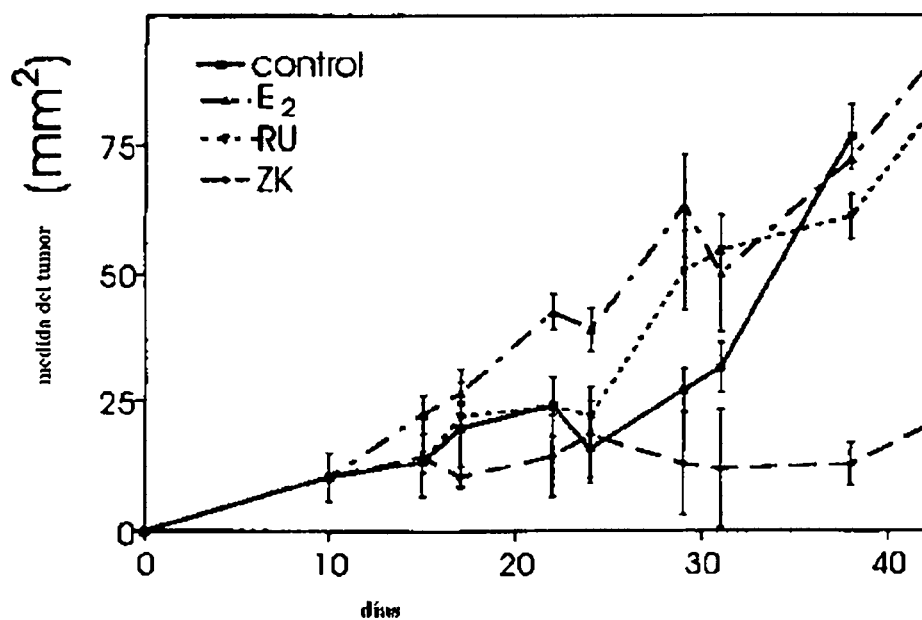


FIGURA 18

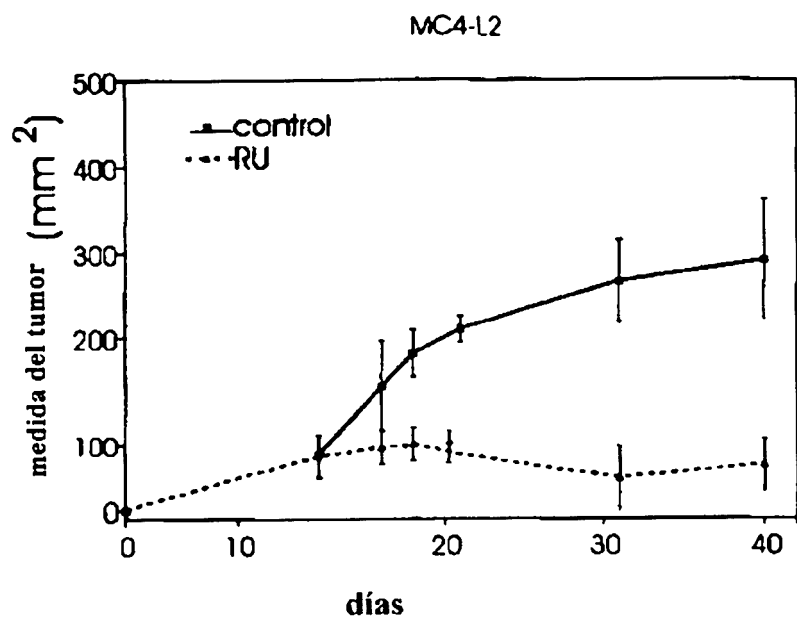


FIGURA 19

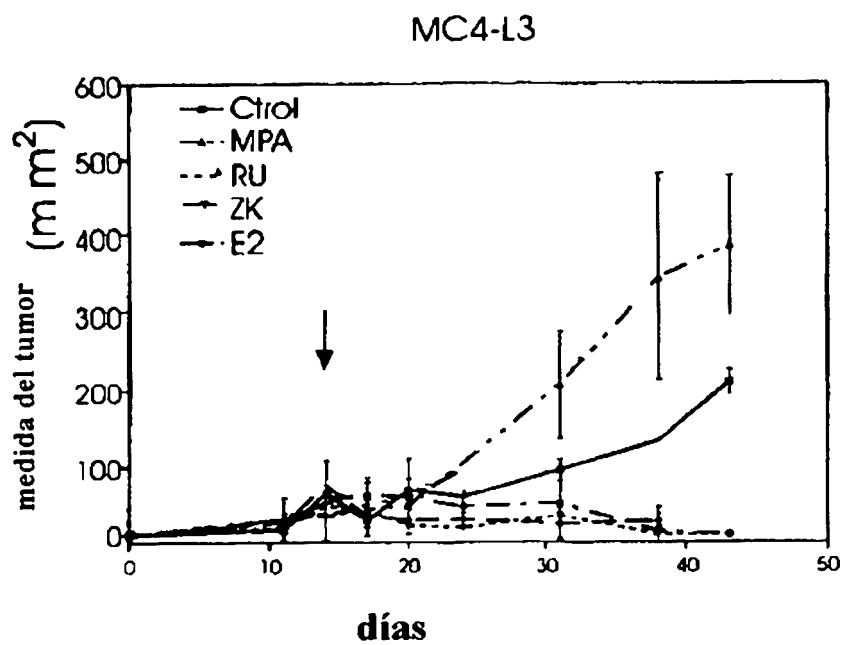


FIGURA 20