

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

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
20 de Marzo de 2008 (20.03.2008)

PCT

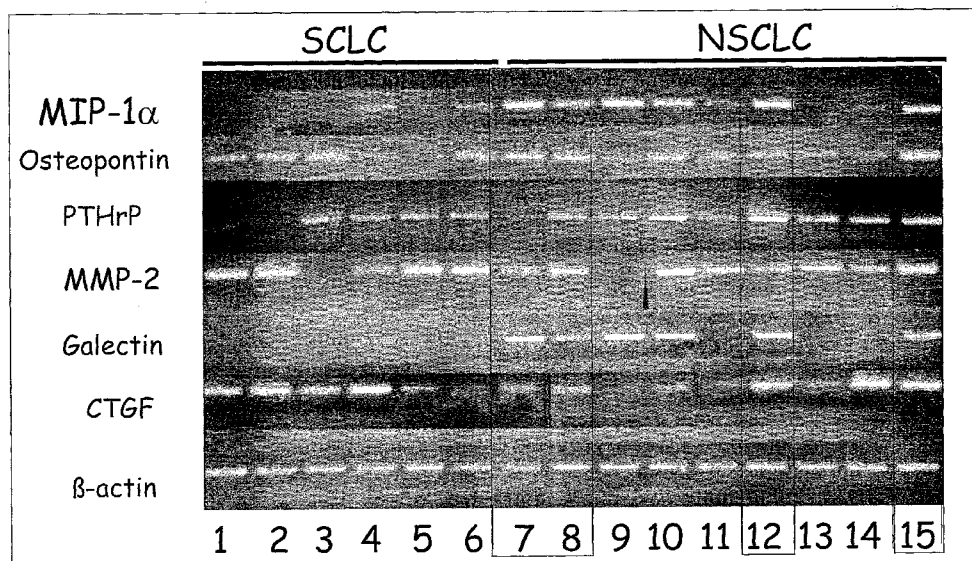
(10) Número de Publicación Internacional
WO 2008/031910 A2

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 5/08 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2007/000519
- (22) Fecha de presentación internacional:
14 de Septiembre de 2007 (14.09.2007)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
P200602349
15 de Septiembre de 2006 (15.09.2006) ES
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):
PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S.L. [ES/ES];
Etxesakan 28, Oficina 5, (Pta. Baja), E-31180 CIZUR
MAYOR (Navarra) (ES).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente):
LECANDA CORDERO, Fernando [ES/ES]; Fun-
dación para la Investigación Médica Aplicada, FIMA,
Avda. Pío XII, 55, E-31008 Pamplona (Navarra) (ES).
VICENT CAMBRA, Silvestre [ES/ES]; Fundación para
la Investigación Médica Aplicada, FIMA, Avda. Pío XII,
55, E-31008 Pamplona (Navarra) (ES). DE LAS RIVAS
SANZ, Francisco Javier [ES/ES]; Fundación para la
Investigación Médica Aplicada, FIMA, Avda. Pío XII, 55,
E-31008 Pamplona (Navarra) (ES).
- (74) Mandatario: UNGRÍA LÓPEZ, Javier; Avda. Ramón y
Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW,
BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,

[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: EXPERIMENTAL MODELS FOR NON-MICROCYTIC LUNG CANCER METASTASIS TO BONE

(54) Título: MODELOS EXPERIMENTALES PARA LA METÁSTASIS A HUESO DE CÁNCER DE PULMÓN NO MICRO-
CÍTICO



(57) Abstract: The invention relates to several cell lines of non-microcytic lung cancer which can metastasize to bone with great efficiency. The invention also relates to the method for obtaining said cell lines, the corresponding animal models and the use of same.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a varias líneas celulares de cáncer de pulmón no microcítico con capacidad de metastatizar a hueso con elevada eficiencia. Asimismo, la presente invención se refiere al procedimiento de obtención de dichas líneas celulares, a los modelos animales correspondientes y al uso de los anteriores.

WO 2008/031910 A2



HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(84) Estados designados (*a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ,

Publicada:

— *sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe*

**MODELOS EXPERIMENTALES PARA LA METÁSTASIS A HUESO DE
CÁNCER DE PULMÓN NO MICROCÍTICO**

CAMPO DE LA TÉCNICA

5 La presente invención se engloba dentro del estudio del cáncer, en concreto del desarrollo de modelos experimentales de cáncer de pulmón.

ESTADO DE LA TÉCNICA

10 El cáncer de pulmón representa la principal causa de mortalidad en los países occidentales con más de 500.000 muertes anuales en Estados Unidos y más de un millón en el mundo entero, con una tasa de supervivencia a los 5 años situada en torno al 10-15%. Más del 90% de los cánceres de
15 pulmón se han asociado con el consumo de tabaco. A pesar del uso de terapias combinadas y de los esfuerzos realizados por los políticos y organizaciones de la salud dirigidos a prevenir este hábito, la incidencia y mortalidad no han mejorado sustancialmente en el mundo. La
20 mayoría de los esfuerzos actuales están destinados a mejorar tanto el diagnóstico temprano, como la terapia, pero hasta el momento hay pocos estudios dedicados a la metástasis, la complicación más devastadora del cáncer de pulmón, responsable de casi todas las muertes.

25 El adenocarcinoma, una forma de cáncer de pulmón no microcítico, representa aproximadamente el 80% de los casos de cáncer de pulmón no microcítico. A pesar de que el estadio I de la enfermedad está asociado con un pronóstico favorable, el 30-40% de los pacientes diagnosticados con el
30 estadio I de cáncer de pulmón no microcítico, recayeron con metástasis después de una extirpación tumoral completa. Tal y como se ha demostrado para otros tumores, las células de cáncer de pulmón a menudo se escapan del foco primario y tienden a diseminarse bien localmente en la cavidad

torácica o bien hasta órganos distantes como el cerebro, hueso, glándula adrenal, pericardio e hígado.

El hueso representa una diana frecuente para las metástasis pulmonares, que aparecen en hasta un 40% de los
5 pacientes con cáncer de pulmón. La mediana de supervivencia de estos pacientes es ≤ 6 meses, la menor de todos los tipos de cáncer que metastatizan a hueso, por tanto es con mucho el de peor pronóstico. La metástasis de cáncer pulmonar a hueso está asociada clínicamente con dolor, frecuentemente
10 refractario a terapias convencionales, y con compresión y fractura de la médula ósea, con desenlace fatal en todos los casos.

Este proceso de varias etapas implica la acción coordinada de múltiples genes que permite la invasión e
15 intravasación, supervivencia en los capilares, detención y crecimiento o finalmente extravasación y multiplicación en el órgano diana. La capacidad metastásica de las células tumorales está muy influenciada por su interacción con el microambiente óseo. Las interacciones heterotípicas tumor-
20 estroma, las interacciones célula-matriz, y la estimulación paracrina por parte de factores solubles, pueden modular el comportamiento tumoral.

A pesar de que los mecanismos de inducción, progresión y dispersión de metástasis no se conocen bien, se acepta
25 que el microambiente óseo ejerce un fuerte efecto modulando la atracción celular, el crecimiento y la invasión.

En un trabajo reciente [Kang et al. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. Cancer Cell, 3: 537-549; 2003] se demostró que la actividad
30 prometastásica estaba gobernada por un grupo pequeño de genes, los cuales cuando son sobreexpresados en una fracción de células procedentes de tumores primarios les conferían una fuerte proclividad metastásica. La identificación de perfiles de expresión de subpoblaciones de células
35 metastásicas con tropismo hacia pulmón, frente a las que

presentan tropismo hacia hueso, reveló que un grupo concreto de genes confiere especificidad para cada órgano diana y coopera para adquirir diversas funciones complementarias necesarias para desarrollar una metástasis agresiva. Adicionalmente, el grupo de genes que mediaba exclusivamente la metástasis pulmonar fue validado clínicamente y permitía predecir pacientes de mal pronóstico con riesgo de desarrollar metástasis pulmonar.

Los esfuerzos dirigidos a bloquear estos procesos metastásicos se han visto dificultados por la falta de modelos consistentes en los que se pudiera identificar dianas moleculares clave. Estos modelos facilitan el análisis de nuevos protocolos terapéuticos antimetastásicos.

En el documento [*Animal models of bone metastasis* Cancer 2003; 97:748-757], se describe una técnica que consiste en realizar xenotransplantes o inoculación/inyección de células o tejidos derivados de tumores humanos en ratones inmunodeficientes para seleccionar subpoblaciones de células tumorales con una capacidad elevada de generar metástasis. La capacidad de formar metástasis a uno u otro órgano depende de las características fenotípicas de cada tipo celular, es decir, de la expresión de un perfil de genes prometastásicos que confieren capacidad de formar metástasis en unos u otros órganos. Hasta el momento no se conoce cuales son los genes cuya expresión define el tropismo y metastaticidad hacia uno u otro órgano.

El documento más cercano del estado de la técnica lo constituye la solicitud de patente US 2002/0199212. En este documento se describe un modelo animal de metástasis ósea de células tumorales. Dichas células tumorales proceden de cáncer de pulmón o de mama y se caracterizan por expresar niveles elevados de PTHrP (péptido relacionado con la paratohormona). Se describe un modelo de metástasis ósea

obtenido mediante la inyección periférica de células de carcinoma pulmonar microcítico humano en ratones inmunodeficientes SCID, en el que además se forman metástasis multiorgánicas en uno o más de los siguientes
5 órganos: pulmón, hígado, riñón y ganglios linfáticos.

El objeto de la presente invención se refiere a un modelo animal no humano de metástasis a hueso de cáncer de pulmón no microcítico. El cáncer de pulmón no microcítico es el más frecuente y representa alrededor de un 70-80% del
10 total de todos los casos de cáncer de pulmón. En este modelo se obtienen metástasis a hueso con una eficiencia de al menos 90%, y de forma reproducible y extraordinariamente rápida con un tiempo de latencia de 9-12 días, diferenciándose de la solicitud estadounidense
15 anteriormente citada en que adicionalmente, no se producen metástasis multiorgánicas, sino casi exclusivamente con tropismo a hueso.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

20 Para facilitar la comprensión de la presente invención se definen a continuación una serie de conceptos tal y como se entienden en el presente contexto.

El término "metástasis" según se utiliza en la presente descripción se refiere a un cáncer o tumor (tumor
25 secundario) que se desarrolla en un órgano o parte del cuerpo por diseminación a partir de células tumorales procedentes de un tumor iniciado en otro órgano o parte del cuerpo (tumor primario). Así, células tumorales que se han propagado al hueso desde otro órgano (por ejemplo desde un
30 cáncer de mama) no son un cáncer de hueso, sino metástasis óseas de un cáncer de mama. Estas células tumorales seguirán siendo células tumorales de mama, independientemente de su localización en el hueso.

El "cáncer de pulmón no microcítico" agrupa diversos
35 subtipos histológicos de pulmón que se caracterizan porque

5 tienen un crecimiento y diseminación lentos y porque pueden ser tratados de la misma manera (resección quirúrgica como primera opción, radioterapia y quimioterapia). A diferencia del cáncer de pulmón microcítico, que se caracteriza por ser muy agresivo y de rápida diseminación, y porque una vez ha metastatizado no es candidato para la resección quirúrgica y no responde a la quimioterapia convencional. Desde el punto de vista epidemiológico, los subtipos de cáncer de pulmón no microcítico más relevantes son:

10 adenocarcinoma mixto (mixed cell adenocarcinoma o adenocarcinoma with mixed subtypes), carcinoma escamoso y carcinoma broncoalveolar (*bronchioloalveolar carcinoma*), este último incluido entre los adenocarcinomas. [Brambilla E et al. The World Health Organization classification of lung tumours. *Eur. Respir. J.* 2001; 18:1059-1068]. Entre

15 los subtipos de cáncer de pulmón no microcítico se incluye también el carcinoma de células grandes y otros subtipos histológicos más raros.

20 La "inyección por vía intracardiaca" se refiere a la inyección en el ventrículo izquierdo del corazón del animal en cuestión.

El hecho de que una línea celular posea capacidad de metastatizar a hueso con una "eficiencia de al menos el 90%", se refiere a que en al menos 9 de cada 10 ratones que han recibido una inyección intracardiaca de dichas células se han formado masas tumorales en tejido óseo.

25

El término "sobrexpresión" de un gen, se refiere a que su nivel de expresión es de al menos 1,5 veces mayor al nivel de expresión de las células empleadas como control.

30 La "actividad antimetastásica" de un compuesto se refiere a su capacidad de reducir la migración de células desde el foco primario, o su alojamiento en un foco secundario o su crecimiento y desarrollo en ese foco

secundario. Dentro del contexto de la presente invención el foco secundario es un hueso.

Así, la presente invención se refiere en primer lugar a una línea celular de cáncer de pulmón caracterizada porque
5 es un cáncer de pulmón no microcítico y posee capacidad de metastatizar a hueso con una eficiencia de al menos 90% con un tiempo de latencia de entre 9 a 12 días. Preferentemente dicha línea celular de cáncer de pulmón no microcítico está
10 caracterizada porque dicho cáncer se ha seleccionado entre una línea derivada de un carcinoma de células grandes (LCC), carcinoide y carcinoma broncoalveolar.

En una realización concreta, la presente invención se refiere a una línea celular de cáncer de pulmón no microcítico según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizada
15 porque dicha línea celular está seleccionada entre: NCI-H460 subpoblación M5 (ECACC 06091547): LCC, H727 subpoblación M5/M2 (ECACC 06091545): carcinoide y A549 subpoblación M1/M1 (ECACC 06091546): adenocarcinoma broncoalveolar.

20 En una realización particular, la línea celular de cáncer de pulmón no microcítico objeto de la presente invención es una línea celular de carcinoma de células grandes que sobreexpresa al menos 3, 4 ó 5 genes seleccionados entre: TCF4, PKD3 (conocido también como
25 PRKD3), MCAM, SUSD5 y KIAA0960. En una realización más preferente dicha línea celular de carcinoma de células grandes de pulmón sobreexpresa los genes TCF4, PKD3, MCAM, SUSD5 y KIAA0960. En una realización más particular, la
30 línea celular se obtiene mediante la transducción de células parentales con al menos 3, 4 ó 5 de los genes TCF4, PKD3, MCAM, SUSD5 y KIAA0960, es decir transfectadas con vectores que expresan las proteínas que dichos genes codifican.

- 7 -

En una realización concreta, dicha línea celular de carcinoma de pulmón se deriva de la línea NCI-H460, por ejemplo de la subpoblación M5 (ECACC 06091547).

5 En otra realización particular, la línea celular de cáncer de pulmón no microcítico objeto de la presente invención es una línea celular de carcinoide que sobrepresa al menos 3, 4 ó 5 genes seleccionados entre: GAL, SPOCK2, CRIP2, ELF5 y EPCR. En una realización más particular, la línea celular se obtiene mediante la
10 transducción de células parentales con al menos 3, 4 ó 5 de los genes GAL, SPOCK2, CRIP2, ELF5 y EPCR.

En una realización concreta, dicha línea celular de carcinoide se deriva de la línea H727, por ejemplo de la subpoblación M5/M2 (ECACC 06091545).

15 En otra realización particular adicional, la línea celular de cáncer de pulmón no microcítico objeto de la presente invención es una línea celular de adenocarcinoma broncoalveolar que sobrepresa al menos 3, 4, 5 ó 6 genes seleccionados entre: IL11, PITX1, HDAC4, RHOB, ROBO1 y
20 SLC26A2. En una realización más particular, la línea celular se obtiene mediante la transducción de células parentales con al menos 3, 4, 5 ó 6 de los genes IL11, PITX1, HDAC4, RHOB, ROBO1 y SLC26A2.

En una realización concreta, dicha línea celular de
25 adenocarcinoma broncoalveolar se deriva de la línea A549, por ejemplo de la subpoblación M1/M1 (ECACC 06091546).

Por otro lado, la presente invención se refiere a un procedimiento para obtener una línea celular anteriormente descrita, caracterizado porque comprende:

30 a) inyectar por vía intracardiaca en un animal no humano células derivadas de una línea parental procedente de dicho cáncer de pulmón, previamente transfectada con un gen de selección; y

b) aislar, expandir en cultivo y seleccionar las células tumorales de las metástasis óseas generadas en dicho animal.

Adicionalmente, dicho procedimiento preferentemente
5 comprende:

a) inyectar por vía intracardiaca las células obtenidas en el paso b en un animal no humano; y

b) aislar, expandir en cultivo y seleccionar las células tumorales de las metástasis óseas generadas en
10 dicho animal.

En una realización preferente de este procedimiento dicho gen de selección es un gen de resistencia a antibiótico y un gen que codifica luciferasa.

En una realización concreta del procedimiento
15 descrito, la línea celular a inyectar en el animal no humano se deriva de un carcinoma de células grandes, y dicho procedimiento comprende seleccionar las células que sobreexpresan al menos 3, 4 ó 5 genes seleccionados entre: TCF4, PKD3, MCAM, SUSP5 y KIAA0960. En una realización
20 preferente, dicho procedimiento comprende seleccionar las células que sobreexpresan los 5 genes. En otra realización la línea celular a inyectar se deriva de un carcinoide, y dicho procedimiento comprende seleccionar las células que sobre expresan al menos 3, 4 ó 5 genes seleccionados entre:
25 GAL, SPOCK2, CRIP2, ELF5 y EPCR. En una realización preferente, dicho procedimiento comprende seleccionar las células que sobreexpresan los 5 genes. En otra realización adicional la línea celular a inyectar se deriva de un adenocarcinoma broncoalveolar, y dicho procedimiento
30 comprende seleccionar las células que sobre expresan al menos 3, 4, 5 ó 6 genes seleccionados entre: IL11, PITX1, HDAC4, RHOB, ROBO1 y SLC26A2. En una realización preferente, dicho procedimiento comprende seleccionar las células que sobreexpresan los 6 genes.

En una realización preferente del procedimiento objeto de la presente invención se caracteriza porque dichas células derivadas de una línea parental de cáncer de pulmón no microcítico está seleccionada entre: NCI-H460, A549 y
5 H727.

Adicionalmente, la presente invención se refiere a un modelo animal no humano de cáncer de pulmón no microcítico con metástasis a hueso caracterizado porque comprende
10 inyectar por vía intracardiaca en el animal células tumorales procedentes de una línea celular anteriormente descrita. Preferentemente, el animal no humano objeto del presente modelo es un animal inmunodeprimido, más preferentemente es un roedor. En una realización concreta
15 del modelo animal objeto de la presente invención dicho animal es un ratón atímico desnudo (athymic nude).

Por otro lado, la presente invención se refiere a un procedimiento para la obtención de dicho modelo animal no humano de cáncer de pulmón no microcítico con metástasis a
20 hueso caracterizado porque comprende inyectar por vía intracardiaca en el animal células tumorales procedentes de una línea celular definida en los párrafos precedentes.

Por otro lado, la presente invención se refiere al uso
25 de la línea celular o del modelo animal anteriormente descritos y objeto de la presente invención, para ensayar la actividad antimetastásica de un compuesto.

En una realización preferente dicho se caracteriza porque dicho ensayo de actividad metastásica comprende:
30 a) cultivar células de dicha línea celular con el compuesto a ensayar; y
b) comparar el efecto antimetastásico producido sobre dichas células con respecto a células control tratadas con otro compuesto de referencia o que no han sido tratadas.

En otra realización preferente, dicho ensayo de actividad antimetastásica comprende:

- a) administrar el compuesto a ensayar a dicho animal modelo, y;
- 5 b) comparar el efecto de dicho compuesto sobre los tumores de dicho animal, con los tumores de animales control tratados con otro compuesto de referencia o que no han sido tratados.

En una realización concreta dicha actividad antimetastásica a ensayar está seleccionada entre: 10 prevención de la metástasis, amortiguación de los efectos deletéreos de la metástasis, y una acción bloqueante del tropismo tejido-específico.

Adicionalmente, la presente invención se refiere al uso 15 de una línea celular anteriormente descrita, en un método para identificar marcadores asociados a cáncer de pulmón no microcítico caracterizado porque comprende comparar la presencia, ausencia, o el nivel de expresión génica en muestras de tejido tumoral de dicha línea celular, con la 20 expresión génica en células control.

Por otro lado, la presente invención también se refiere al uso de un modelo animal anteriormente descrito, en un método para identificar marcadores asociados a cáncer de pulmón no microcítico caracterizado porque comprende 25 comparar la presencia, ausencia, o el nivel de expresión génica en muestras de tejido tumoral dicho animal modelo, con la expresión génica en el tejido de un segundo animal que no ha recibido inyección de células.

30 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Análisis mediante RT-PCR de un panel de líneas de cáncer de pulmón microcítico (SCLC) y no microcítico (NSCLC). Los genes implicados en metástasis en otros modelos incluyen MIP-1 α , osteopontina, PTHrP, MMP-2, 35 Galectina-3, CTGF se compararon con un gen control,

β -actina. Las células utilizadas incluyeron SCLC: 1. H69; 2. H82; 3. H187; 4. H345; 5. H446; 6. H510 y NSCLC: 7. H460; 8. A549; 9. H441; 10. HTB58; 11. H676; 12. H727; 13. H720; 14. H1299.

5 **Figura 2:** Ensayo de quimiotaxis. Células inducidas o no inducidas con 10% de suero (FCS) en el compartimento inferior de una cámara de Boyden durante 6 horas. Las células que migraron al compartimento inferior se tiñeron con tinción fluorescente. La fluorescencia total se midió
10 utilizando un filtro 480/520 nm.

Figura 3: Curva Kaplan-Meier de varios grupos de ratones atímicos inoculados con diferentes líneas celulares tumorales humanas: H460, H157, H1299 y A549.

Figura 4: Imagen de bioluminiscencia *in vivo*. Células
15 establemente transfectadas con CMV-Luc, fueron seleccionadas e inoculadas en el ventrículo izquierdo del corazón de ratones atímicos. Dos semanas después se visualizaron. **A.** Células H1299. **B.** Células A549. Los ratones control están en la parte inferior. **C.** Células
20 H460. El ratón control está en el centro de la parte inferior.

Figura 5: Análisis mediante rayos-X de las vértebras dorsales de un ratón control y de un ratón inoculado con la línea tumoral **A.** A549. Como se muestra, las lesiones
25 osteolíticas aparecen de forma concomitante con una osteogénesis perióstica reactiva (panel de la derecha, flechas). **B.** H460. Las lesiones osteolíticas se observaron en las epífisis distales y proximales de fémur y tibia.

Figura 6: Imágenes de bioluminiscencia *in vivo*. Las células
30 fueron transfectadas con ON-Luc (promotor de osteonectina con luciferasa). Tras la selección, las células fueron inoculadas en el ventrículo izquierdo de ratones atímicos desnudos. Dos meses después de la inyección las células fueron visualizadas. **A.** Células H727. **B.** Células HTB58. Los

ratones control son los primeros de la izquierda en ambos paneles.

Figura 7: Estrategia *in vivo* para averiguar los tejidos diana de metástasis.

5 **Figura 8:** Curva de Kaplan-Meier de H460 parental (CMV) y subpoblaciones metastásicas (M1, M4 y M5).

Figura 9: Número de SCC (colonias derivadas de una única célula) derivadas de la inoculación de 10 ratones con H460 parental (CMV) y subpoblaciones metastásicas (M1, M4 y M5).

10 **Figura 10:** Área metastásica en los huesos largos de los ratones inoculados con H460 parental (CMV) y subpoblaciones metastásicas (M1, M4 y M5).

Figura 11: Curva de Kaplan-Meier de A549 parental (CMV) y subpoblaciones metastásicas (M1, M1/M1, M1/M3 y M1/M4).

15 **Figura 12:** Área metastásica en los huesos largos de los ratones inoculados con A549 parental (CMV) y subpoblaciones metastásicas (M1, M1/M1 y M1/M3).

Figura 13: Número total de subpoblaciones metastásicas aisladas de fémures y tibias de 7 de los 8 ratones
20 inoculados con líneas celulares altamente metastásicas (M1/M4 y M1/M1) y células parentales (A549 CMV-Luc). Veinticinco días post-inoculación, los ratones fueron sacrificados y las células de la médula ósea fueron cultivadas en medio de selección conteniendo G-418, durante
25 5 días. Tras ese tiempo se contaron las SCC (colonias derivadas de una única célula).

Figura 14: A. Número de subpoblaciones aisladas de huesos largos de 8 ratones inoculados con células H727, 59 días después de la inoculación (panel superior) y en 7 ratones
30 inoculados con células A549, 29 días tras la inoculación (panel inferior). **B.** Radiografía de la extremidad inferior de un ratón inoculado con células H727 y A549, mostrando lesiones metastásicas. El número total de subpoblaciones aisladas después de "flushing" de la médula ósea fue de 192
35 para H727 y de 3190 para A549. Obsérvese las lesiones

prominentes inducidas por H727 y el número tan pequeño de subpoblaciones aisladas con comparación en A549.

Figura 15: **A.** Hematoxilina-Eosina de cortes de fémures de ratones tratados con vehículo e inoculados con células H460 por vía intracardiaca. **B.** Recuento del número de osteoclastos inducido por la línea H460.

Figura 16: Recuento del porcentaje del área metastásica de osteolisis total con respecto al área ósea total en las radiografías, obtenido mediante análisis de imagen de los huesos largos (fémures y tibias) de ratones inoculados con células H460 control, o H460 transducidas con **A.** TCF4, PRKD3, MCAM y SUSD5. **B.** H460 transducidas con tres genes, PRKD3, SUSD5, TCF4 o bien, PRKD3, MCAM y TCF4.

Figura 17: **A.** Curva de Kaplan-Meier de células H727 transfectada parental (ON-LUC) y subpoblaciones metastásicas (M4/M2, M4/M3, M5/M2 y M5/M4) derivados de la línea parental. **B.** Área metastásica de osteolisis total en las radiografías mediante análisis de imagen de los huesos largos (fémures y tibias) de ratones inoculados con células H727 parental y transfectadas (con el plásmido ON-LUC), y subpoblaciones altamente metastásicas derivadas de ésta, M4/M2, M4/M5, M5/M2 y M5/M4. **p<0,001 y ***p<0,0001 con respecto a ON-LUC y parental.

25

MODOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION

A continuación se describen una serie de ejemplos para ilustrar la realización de la presente invención, sin poseer en modo alguno carácter limitativo del alcance de la misma.

30

EJEMPLO 1: Desarrollo de líneas celulares altamente metastásicas con tropismo a hueso.

Material y métodos

Las líneas celulares empleadas fueron:

- 5 H460 (ATCC N° HTB-177): procedente de un cáncer pulmonar no microcítico mixto obtenido a partir de una biopsia pulmonar de un hombre de raza negra de 54 años, con tumor de estadio 3A en el momento de diagnóstico.
- H727 (ATCC N° CRL-5815): procedente de un tumor carcinoide obtenido de una biopsia pulmonar de una mujer caucasoide de 65 años, con tumor de estadio 3A en el momento de diagnóstico.
- 10 H157 (ATCC N° CRL-5802): procedente de un carcinoma de células escamosas obtenido de la efusión pleural de un hombre caucasoide de 59 años, con un tumor de estadio 3A en el momento de diagnóstico.
- H1299 (ATCC N° CRL-5803): procedente de un carcinoma pulmonar obtenido de la biopsia de un ganglio linfático procedente de un hombre caucasoide de 43 años, con un tumor de estadio 3A en el momento de diagnóstico.
- 15 A549 (ATCC N° CCL-185): procedente de un carcinoma pulmonar obtenido de la biopsia de un tumor de un hombre caucasoide de 58 años.
- HTB58 (ATCC): procedente de un carcinoma de células escamosas obtenido de la efusión pleural de un hombre caucasoide de 65 años.

25 La inyección intracardiaca se realizó de acuerdo con los protocolos conocidos por un experto en la materia. Un total de 200.000 células en las que previamente se ha insertado un gen de selección, con una viabilidad superior al 95% en 100 µl de PBS fueron inyectadas.

30 La invasión celular fue determinada empleando un ensayo de migración en dos cámaras modificado (diámetro de poro de 8 µm, Chemicon International, Inc) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las células fueron sembradas en la cámara superior en un medio que contenía un 0,4% de suero y migraron hacia un 10% de suero bovino de

35

ternero (FCS) en la cámara inferior durante 8 horas. Las células del inferior de la membrana fueron despegadas, lisadas y teñidas con CyQuant GR Dye. La fluorescencia fue analizada en un lector de placas empleando los filtros de
5 480/520 nm.

El aislamiento de células metastásicas de la médula ósea de las extremidades inferiores se realizó mediante protocolos de sobra conocidos por un experto en la materia. En resumen, los ratones fueron sacrificados de acuerdo con
10 los protocolos aprobados por el Comité de Experimentación Animal de la institución donde se realizaron los ensayos. Los huesos largos fueron extirpados y limpiados de todos los tejidos blandos. Las células de la médula fueron liberadas mediante arrastre, introduciendo 5 ml de α -MEM
15 con una aguja de diámetro 27G en la epífisis distal a través de la médula ósea. Las células fueron plaqueadas en placas p-100 y p-150 y expandidas durante 5 días en medio suplementado con G-418. Este procedimiento se realizó por separado para cada fémur y tibia. Las subpoblaciones fueron
20 cuantificadas bajo el microscopio tras su tinción con cristal violeta.

El análisis mediante rayos X se realizó empleando un Faxitron MX-20 con una película de elevada sensibilidad MNR-2000 (Kodak), empleando una exposición de 20kW y 20
25 segundos y 2 x aumentos.

Estas películas fueron escaneadas y el análisis de la imagen se realizó empleando ScanAnalys®, determinando el % de área metastásica de hueso/área total de hueso.

30 Resultados

Se desarrolló una estrategia sistemática para desarrollar un modelo nuevo de células de cáncer de pulmón no microcítico con un tropismo específico a hueso. En primer lugar se analizó la expresión de diversos genes
35 previamente relacionados con fenómenos de metástasis en

otros modelos, incluyendo galectina-3, PTHrP, MIP-1 α , MMP-2, CTGF y osteopontina (FIGURA 1). Por otro lado se comprobó la capacidad de migración hacia un 10% o 0,4% de suero (FCS) en una cámara de Boyden (FIGURA 2).

- 5 En función de estos dos criterios se seleccionaron cuatro líneas celulares de cáncer de pulmón no microcítico: A549, H157, HTB58 y H460, para analizar su capacidad de metastatizar en un modelo *in vivo*.

En primer lugar se realizó una transfección estable
10 con el gen reportero de la luciferasa (CMV-luc) para poder monitorizar el tropismo mediante la obtención de imágenes por bioluminiscencia *in vivo*. Estas células fueron inoculadas en el ventrículo izquierdo del corazón de ratones atímicos desnudos. Cada dos semanas la
15 bioluminiscencia fue monitorizada *in vivo* mediante la inyección de D-luciferina (3 mg/100 μ l, Xenogen Inc.). El desarrollo de las metástasis fue diferente para cada línea celular, en términos de especificidad de tejidos, incidencia y periodo de latencia (FIGURA 3). Las curvas
20 Kaplan-Meier de monitorización de supervivencia libre de metástasis mostraron un patrón diferente de progresión de las metástasis entre las diferentes líneas celulares.

A pesar de poseer patrones de expresión de genes relacionados con metástasis semejantes, las metástasis
25 alcanzaron diferentes órganos específicos. La línea parental A549 produjo lesiones metastásicas significativas en los huesos largos en 4 de 8 de los animales estudiados, y en las vértebras (Figura 4). También fue detectada una bioluminiscencia difusa que sugiere una potencial
30 colonización de otros huesos. 4 de los 8 animales mostraron una reducción dramática de la movilidad de las extremidades, sugiriendo un defecto en la médula espinal. Mediante un examen de rayos X, se observó una osteolisis intensa en combinación con una osteogénesis *de novo* en la
35 columna vertebral (Figura 5A). Por el contrario, la

inyección de células H460 en ratones desnudos desencadenó la aparición de luz intensa en las extremidades inferiores de 2 de 8 animales (Figura 4). El análisis mediante rayos X mostró la presencia de lesiones osteolíticas dramáticas
5 frecuentemente localizadas en las metáfisis tibiales proximales y femorales distales (Figura 5B).

La línea parental H727 mostró bioluminiscencia en sitios compatibles con una localización ósea en 7 de 8 animales (Figura 6).

10 La inoculación intracardiaca de células HTB58 induce la formación de tumores en la región dorsal de la escápula en 5 de los 7 animales estudiados (Figura 6).

Para monitorizar señales de caquexia, el peso fue examinado durante todo el periodo. Curiosamente, en la
15 línea parental H460, la detección de bioluminiscencia en huesos largos y una manifiesta metástasis detectada mediante rayos X, se correlacionan con caquexia. Sin embargo, HTB58 y H1299 incluso con una masa tumoral prominente no presentaban alteraciones en su masa corporal.
20 Adicionalmente, animales inoculados con células H727, una línea parental que mostró un elevado tropismo a hueso, no presentaban señales de caquexia en el momento en que se detectaban profundas lesiones osteolíticas mediante rayos X.

25 Para establecer líneas celulares con capacidad metastásica, las células parentales fueron transfectadas de forma estable con un gen de resistencia a la geneticina. Estas células fueron inoculadas por vía intracardiaca en ratones desnudos atímicos (Figura 7).

30 Tras lavar la médula de los huesos largos de dichos animales, las células de médula se expandieron en cultivo, y se obtuvieron diversas colonias de células de cáncer de pulmón no microcítico resistentes a la geneticina en cultivo.

Células procedentes de las colonias resistentes obtenidas en el paso anterior fueron reinoculadas en ratones atímicos desnudos. Este procedimiento permitió el aislamiento de subpoblaciones altamente metastásicas en comparación con la línea celular parental. Así se seleccionaron subpoblaciones con un periodo de latencia menor, una elevada incidencia y una mayor capacidad de formar lesiones óseas con mayor carga tumoral (Figura 7).

Esta estrategia se siguió con las líneas parentales H727, H460 y A549. En la Figura 8 se muestran las curvas Kaplan-Meier para diferentes subpoblaciones de H460. Tal y como se esperaba, el aislamiento de diversas subpoblaciones tras la reinoculación intracardiaca, dio lugar a la selección de subpoblaciones altamente metastásicas con un periodo de latencia menor, y una incidencia y especificidad a hueso mayores en comparación con la línea parental. Como puede verse en la figura 9 la subpoblación M5 procedente de la línea H460 muestra una elevada carga tumoral tras el aislamiento y recuento *in vitro* de las células de la médula ósea formadoras de colonias (SCC, single cell colonies) metastaticidad y capacidad de crecimiento al estudiar el número de subpoblaciones aisladas *in vitro* en comparación con la línea parental o transfectada con CMV-Luc. El área de lesión osteolítica metastásica en las subpoblaciones M1, M4 y M5 fue también mayor que la población parental (Figura 10).

Con la subpoblación M1 procedente de la línea parental A549 se obtuvieron resultados comparables (Figura 11). De forma semejante se muestran los resultados obtenidos para la línea A549 (Figura 11, 12 y 13). Para todas las líneas parentales, se obtuvo al menos una subpoblación que mostraba tropismo a hueso de elevada especificidad, un periodo de latencia corto que variaba entre 9 y 20 días, y una elevada reproducibilidad.

Curiosamente, el área metastásica determinada mediante rayos X no siempre correlaciona con el número de subpoblaciones aisladas después del lavado de médula. Por ejemplo, las células A549 desarrollan lesiones óseas en 29 días, mientras que la línea H727 muestra metástasis prominentes determinadas por rayos X en 59 días, como puede verse en la Figura 14. El número de subpoblaciones aisladas a partir de un grupo de 7 animales inoculados con H727 era extremadamente bajo, comparado con los animales inoculados con células A549.

También se realizó el experimento descrito anteriormente con la línea H727 correspondiente a un tumor carcinoide, y se obtuvieron subpoblaciones más metastásicas que la población parental. Como se observa en la figura 17 A, las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier realizadas 42 días tras la inoculación de las células mostraron una disminución significativa en la supervivencia de los ratones inoculados con las subpoblaciones altamente metastásicas M4/M2, M4/M5, M5/M2 y M5/M4 con respecto a la población parental y la población transfectada con el plásmido de luciferasa (ON-Luc). Asimismo, el área de lesión osteolítica fue superior muy significativamente en las lesiones inducidas en los huesos largos de las extremidades de los ratones inoculados con las subpoblaciones altamente metastásicas (Figura 17 B). Estos resultados sustentan de forma fidedigna la mayor capacidad metastásica a hueso de las subpoblaciones M4/M2, M4/M5, M5/M2 y M5/M4 derivadas de H727.

Mediante un examen histológico se detectaron diferencias sutiles entre las tres líneas parentales H460, H727 y A549. Aunque la localización era similar, el examen histológico reveló patrones específicos de invasión y colonización. Las lesiones de las tres líneas parentales se encontraban en las extremidades inferiores. Las lesiones causadas por H460 siempre aparecían en las metáfisis

tibiales proximales y femorales distales. La superficie subperióstica es una diana frecuente de metástasis, especialmente alrededor de la región epifisial. El crecimiento de los tumores periostios progresa entre el
5 periostio y el hueso cortical, frecuentemente induciendo una osteogénesis reactiva en el hueso cortical. Tanto la línea A549 como H460 inducen una nueva formación osteoide desde el periostio de la región epifisio-metafisiaria. En la médula ósea, la progresión de las lesiones está dirigida
10 por el crecimiento tumoral colonizando la médula y destruyendo la esponjosa primaria. En contraste con H460, la línea A549 posee la capacidad de dirigirse a las vértebras además de a las extremidades inferiores. En las regiones tibiales proximales y femorales distales, las
15 lesiones osteolíticas macroscópicas podían detectarse en el hueso cortical, surgiendo del periosteo y progresando hacia la médula. Mediante tinción TRAP se detectó una fuerte actividad osteoclástica en el endostio (Figura 15).

Por último, se realizó el mismo procedimiento con las
20 líneas celulares H157 y H1299, dos líneas celulares de cáncer de pulmón no microcítico que expresaban el perfil metastásico descrito al principio de este ejemplo y que poseen capacidad de migración a suero en cámaras de Boyden. Sin embargo, estas dos líneas celulares no dieron lugar a
25 metástasis óseas tras su inoculación intracardiaca en animales modelo. Poniendo así de manifiesto que la especificidad del tropismo a hueso es lo que representa la actividad inventiva necesaria para desarrollar el modelo objeto de la presente invención.

30

EJEMPLO 2: Desarrollo de un modelo animal de metástasis a hueso de cáncer de pulmón no microcítico.

Material y métodos

Como líneas celulares se han empleado las líneas H460
35 subpoblación M5, A549 subpoblación M1/M1 y H727

- 21 -

subpoblación M5/M2, las cuales fueron crecidas en RPMI al 10% FBS, suplementado con 0,4 mg/ml de G418.

Se emplearon hembras de ratones nu/nu de 4 semanas de edad, que fueron anestesiados con ketamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg) previamente a la inyección intracardiaca.

Resultados

Para desarrollar un nuevo modelo animal de metástasis a hueso con tropismo específico a hueso, se emplearon aquellas líneas celulares obtenidas en el ejemplo 1.

El procedimiento consistió en inyectar 200.000 células de una de las líneas celulares H460 subpoblación M5 (ECACC 06091547), A549 subpoblación M1/M1 (ECACC 06091546) y H727 subpoblación M5/M2 (ECACC 06091545), en 100 µl de PBS, con una viabilidad superior al 95%, en el ventrículo izquierdo de un ratón atímico nu/nu.

Tras un periodo de latencia de 7 días, este animal puede considerarse un modelo de metástasis ósea de cáncer de pulmón que puede emplearse para estudiar el desarrollo de dichas metástasis, para ensayar el efecto de potenciales agentes antimetastásicos, etc.

EJEMPLO 3: Perfil de expresión genética asociada con la metástasis ósea.

Se realizaron análisis de la expresión genética en células de subpoblaciones derivadas de las líneas celulares H460, H727 y A459 seleccionadas por su capacidad de generar metástasis óseas. En todos los casos se realizó un análisis de expresión diferencial frente a la línea parental de la que se derivaron.

Para cada subpoblación celular se realizaron 3 extracciones de mRNA independientes y se formó un "pool" para posteriormente realizar una hibridación en un Chip

- 22 -

comercial (Genechip U133A 2.0, affymetrix, CA, USA). Posteriormente, se aplicó el algoritmo RMA (Robust microarray análisis) (Irizarry et al. Nucleic Acids Res., 2003, 31: e15) para la corrección del fondo, normalización y cálculo de la expresión para cada juego de sondas, utilizando la herramienta informática R y bioconductor (www.bioconductor.org). Tras el cálculo de la expresión para cada juego de sondas se empleó otro algoritmo para emplear aquellas sondas que mostraban una expresión diferencial significativa entre muestras metastásicas y control. Se empleó SAM (Significance Analysis of Microarrays) (<http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/>) que emplea permutaciones para chequear la estabilidad de las variables que cumplen la hipótesis alternativa, es decir, la hipótesis que indica la existencia de una diferencia significativa en la expresión de un gen dado entre las muestras a analizar y las muestras control. Al mismo tiempo, este método calcula el error tipo I o número de falsos positivos esperados empleando el cálculo del parámetro FDR (False Discovery Rate). Se estableció un valor de corte de FDR <0.2 calculado para el grupo de significantes junto con un valor $p < 0,0006$ para cada gen individual. De este modo, la matriz de valores de expresión correspondiente a las sondas que mostraban una expresión diferencial, fue analizada mediante el algoritmo hclust insertado en el programa R (www.bioconductor.org) Este algoritmo realiza un análisis de grupo aglomerativo jerárquico para encontrar la similaridad entre juegos de sondas basado en sus valores de expresión. Este algoritmo se emplea para clasificar los juegos de sondas en grupos con perfiles de expresión similares.

Resultados

Con el objeto de identificar genes implicados en el comportamiento metastásico de las líneas celulares

altamente metastásicas en comparación con células parentales, se emplearon "microarrays" humanos.

Para la línea H460 se analizó la expresión génica de las subpoblaciones M1, M4 y M5. Los genes expresados
5 diferencialmente fueron seleccionados realizando un contraste en condiciones altamente restrictivas mediante el algoritmo descrito previamente (Irizarry, 2003) y $FDR < 0.02$. Las subpoblaciones altamente metastásicas mostraron un patrón transcripcional único de 43 genes. La mayoría de
10 estos genes se encontraban sobreexpresados más de 1,5 veces. Estas proteínas incluyen MCAM, una molécula de adhesión transmembrana previamente asociada con metástasis de melanoma. Dos componentes intracelulares también fueron identificados: TCF4, un factor de transcripción, y PKD3,
15 una serín/treonín quinasa poco caracterizada. Adicionalmente se determinaron dos proteínas putativas transmembrana relacionadas con las interacciones célula/matriz, incluyendo SUSD5, una proteína perteneciente a la superfamilia de "dominios de unión" que contiene
20 dominios de unión a ácido hialurónico, y KIAA0960 una proteína desconocida que contiene un dominio GON-1 y diversas repeticiones de trombospondina. Algunos genes poseían una expresión significativamente inferior, entre ellos CSF2RA, GDF15, STC2, NID, EXT, TGF- β , y NF κ B2.

25 Para estudiar la contribución de estos genes a la capacidad metastásica de las subpoblaciones celulares altamente metastásicas, se seleccionaron los 5 genes que mostraban mayor sobreexpresión y mayor significación estadística.

30 A continuación, se generaron grupos de células transducidas con uno de esos genes y diferentes combinaciones de transducidos dobles y triples. Aquellas células que sólo sobreexpresaban MCAM no mostraron un incremento significativo de su capacidad de formar
35 metástasis a hueso en comparación con la línea celular

parental, aunque el análisis por rayos X dio un valor al límite de la significancia. Por el contrario, los animales inoculados con células que sobreexpresaban PKC, TCF4 y SUSP5 mostraron un incremento significativo moderado en su capacidad prometastásica en comparación con la línea celular parental. Sin embargo, las combinaciones génicas triples sobreexpresadas en la línea celular parental H460 mostraron un incremento dramático en la incidencia y agresividad de las lesiones metastásicas (Figura 16). Las actividades combinadas de estos genes incrementaron la metástasis ósea.

Se comprobó que estas células transfectantes crecían a un ritmo similar a la línea celular parental en cultivo e *in vivo* tras su inyección subcutánea. Lo que quiere decir que su mayor actividad destructora de hueso no se debe simplemente a la re proliferación más rápida de células, sino a su efecto específico en el hueso.

En el caso de la línea A549, se analizó la expresión génica de las subpoblaciones M1, M1/M1 y M1/M3, de manera similar a como se realizó para las subpoblaciones de la línea H460. Las subpoblaciones altamente metastásicas mostraron 6 genes que se encontraban sobreexpresados más de 1,5 veces. Estos genes incluyen IL11 que codifica una citocina de la familia gp130, PITX1 codificante de un factor que actúa como regulador transcripcional, HDAC4 que codifica la histona deacetilasa 4 implicada en el ciclo celular, el encogen RHOB, ROBO1 un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas y SLC26A2 codificante de una proteína de membrana.

Del mismo modo, en el caso de la línea H727 se analizó la expresión génica de las subpoblaciones M4/M2, M4/M3,

M2/M5 y M5/M4. Las subpoblaciones altamente metastásicas mostraron 5 genes diferencialmente sobreexpresados: GAL que codifica la proteína Galanina (neuropéptido), SPOCK2 una proteína de la familia de proteoglicanos que se une al Ca(2+), CRIP2 codificante de la proteína rica en cisteína 2, ELF5 un factor de transcripción y EPCR codificante del receptor endotelial de proteína C.

EJEMPLO 4: Ensayo de potenciales agentes antimetastásicos en las líneas celulares y/o modelo animal descrito en los ejemplos anteriores.

Se inyectaron 200.000 células de una de las líneas H460 subpoblación M5 (ECACC 06091547), A549 subpoblación M1/M1 (ECACC 06091546) o H727 subpoblación M5/M2 (ECACC 06091545), en 100 µl de PBS, con una viabilidad superior al 95%, en el ventrículo izquierdo de un ratón nu/nu.

Tras un periodo de latencia de 7 días, este animal puede considerarse un modelo de metástasis ósea de cáncer de pulmón.

Una vez transcurridos estos 7 días se administra el agente antimetastásico a estudiar, siguiendo un régimen de administración previamente diseñado. A los 21 días después de la inoculación se sacrifica el animal. Mediante el estudio comparado de los fémures de animales que han recibido el antimetastásico y animales control (que han desarrollado la metástasis sin ningún tratamiento adicional o habiendo recibido dosis de vehículo) puede determinarse la actividad antimetastásica del agente en cuestión.

REIVINDICACIONES

1. Una línea celular de cáncer de pulmón no microcítico caracterizada porque posee la capacidad de metastatizar a hueso con una eficiencia de al menos el 90% y porque ha sido obtenida mediante administración por vía intracardiaca de células tumorales en un animal no humano.
2. Una línea celular de cáncer de pulmón no microcítico según la reivindicación 1, caracterizada porque posee un periodo de latencia entre 9 a 12 días y porque ha sido obtenida mediante administración por vía intracardiaca de células tumorales en un animal no humano.
3. Una línea celular de cáncer de pulmón no microcítico según una de las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizada porque dicho cáncer se ha seleccionado entre una línea de carcinoma de células grandes, carcinoide y carcinoma broncoalveolar.
4. Una línea celular de cáncer de pulmón no microcítico según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque es una línea de carcinoma de células grandes que sobreexpresa al menos 3 genes seleccionados entre TCF4, PKD3, MCAM, SUSDS5 y KIAA0960.
5. Una línea celular de cáncer de pulmón no microcítico según la reivindicación 4, caracterizada porque sobreexpresa los genes TCF4, PKD3, MCAM, SUSDS5 y KIAA0960.
6. Una línea celular de carcinoma de células grandes de pulmón, caracterizada porque dicha línea celular se ha obtenido mediante la transducción de células parentales

con al menos 3 de los genes TCF4, PKD3, MCAM, SUSP5 y KIAA0960.

7. Una línea celular de cáncer de pulmón no microcítico según la reivindicación 4, caracterizada porque es la
5 línea NCI-H460 subpoblación M5 (ECACC 06091547).
8. Una línea celular de cáncer de pulmón no microcítico según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque es una línea de carcinoide que sobreexpresa al menos 3 genes seleccionados entre GAL, SPOCK2, CRIP2,
10 ELF5 y EPCR.
9. Una línea celular de cáncer de pulmón no microcítico según la reivindicación 8, caracterizada porque sobreexpresa los genes GAL, SPOCK2, CRIP2, ELF5 y EPCR.
10. Una línea celular de carcinoide, caracterizada porque
15 dicha línea celular se ha obtenido mediante la transducción de células parentales con al menos 3 de los genes GAL, SPOCK2, CRIP2, ELF5 y EPCR.
11. Una línea celular de cáncer de pulmón no microcítico según la reivindicación 8, caracterizada porque es la
20 línea H727 subpoblación M5/M2 (ECACC 06091545).
12. Una línea celular de cáncer de pulmón no microcítico según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque es una línea de adenocarcinoma broncoalveolar que sobreexpresa al menos 3 genes seleccionados entre
25 IL11, PITX1, HDAC4, RHOB, ROBO1 y SLC26A2.
13. Una línea celular de cáncer de pulmón no microcítico según la reivindicación 12, caracterizada porque sobreexpresa los genes IL11, PITX1, HDAC4, RHOB, ROBO1 y SLC26A2.
- 30 14. Una línea celular de adenocarcinoma broncoalveolar, caracterizada porque dicha línea celular se ha obtenido

mediante la transducción de células parentales con al menos 3 de los genes IL11, PITX1, HDAC4, RHOB, ROBO1 y SLC26A2.

15. Una línea celular de cáncer de pulmón no microcítico según la reivindicación 12, caracterizada porque es la línea A549 subpoblación M1/M1 (ECACC 06091546).
16. Una línea celular de cáncer de pulmón no microcítico según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizada porque dicha línea celular está seleccionada entre: NCI-H460 subpoblación M5 (ECACC 06091547), H727 subpoblación M5/M2 (ECACC 06091545) y A549 subpoblación M1/M1 (ECACC 06091546).
17. Procedimiento para obtener una línea celular descrita en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, caracterizado porque comprende:
- a) inyectar por vía intracardiaca en un animal no humano células derivadas de una línea parental procedente de dicho cáncer de pulmón previamente transfectada con un gen de selección; y
 - b) aislar, expandir en cultivo y seleccionar las células tumorales de las metástasis óseas generadas en dicho animal.
18. Procedimiento según la reivindicación 17, caracterizado porque además comprende:
- a) inyectar por vía intracardiaca las células obtenidas en el paso b en un animal no humano, y
 - b) aislar, expandir en cultivo y seleccionar las células tumorales de las metástasis óseas generadas en dicho animal.
19. Procedimiento según la reivindicación 17, caracterizado porque dicho gen de selección es un gen de resistencia a antibiótico, y un gen que codifica luciferasa.

20. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, caracterizado porque la línea celular a inyectar en el animal no humano se deriva de un carcinoma de células grandes, y porque dicho procedimiento comprende seleccionar las células que sobreexpresan al menos 3 genes seleccionados entre: TCF4, PKD3, MCAM, SUSP5 y KIAA0960.
21. Procedimiento según la reivindicación 20, caracterizado porque comprende seleccionar las células que sobreexpresan los genes TCF4, PKD3, MCAM, SUSP5 y KIAA0960.
22. Procedimiento según una de las reivindicaciones 20 ó 21, caracterizado porque la línea celular a inyectar en el animal no humano se ha obtenido mediante la transducción de células parentales de carcinoma de células grandes con al menos 3 de los genes TCF4, PKD3, MCAM, SUSP5 y KIAA0960.
23. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, caracterizado porque la línea celular a inyectar en el animal no humano se deriva de un carcinoide, y porque dicho procedimiento comprende seleccionar las células que sobreexpresan al menos 3 genes seleccionados entre: GAL, SPOCK2, CRIP2, ELF5 y EPCR.
24. Procedimiento según la reivindicación 23, caracterizado porque comprende seleccionar las células que sobreexpresan los genes GAL, SPOCK2, CRIP2, ELF5 y EPCR.
25. Procedimiento según una de las reivindicaciones 23 ó 24, caracterizado porque la línea celular a inyectar en el animal no humano se ha obtenido mediante la transducción de células parentales de un carcinoide con

al menos 3 de los genes GAL, SPOCK2, CRIP2, ELF5 y EPCR.

26. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 17 a 19, caracterizado porque la línea celular a inyectar en el animal no humano se deriva de un adenocarcinoma broncoalveolar, y porque dicho procedimiento comprende seleccionar las células que sobreexpresan al menos 3 genes seleccionados entre: IL11, PITX1, HDAC4, RHOB, ROBO1 y SLC26A2.
27. Procedimiento según la reivindicación 26, caracterizado porque comprende seleccionar las células que sobreexpresan los genes IL11, PITX1, HDAC4, RHOB, ROBO1 y SLC26A2.
28. Procedimiento según una de las reivindicaciones 26 ó 27, caracterizado porque la línea celular a inyectar en el animal no humano se ha obtenido mediante la transducción de células parentales de adenocarcinoma broncoalveolar con al menos 3 de los genes IL11, PITX1, HDAC4, RHOB, ROBO1 y SLC26A2.
29. Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 16, caracterizado porque dichas células se derivan de una línea parental de cáncer de pulmón no microcítico seleccionado entre: NCI-H460, H727 y A549.
30. Un modelo animal no humano de cáncer de pulmón no microcítico con metástasis a hueso caracterizado porque ha sido obtenido mediante administración por vía intracardiaca de células tumorales procedentes de una línea celular definida en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.

31. Modelo animal no humano según la reivindicación 30, caracterizado porque dicho animal es un animal inmunodeprimido.
32. Modelo animal no humano según una de las
5 reivindicaciones 30 ó 31, caracterizado porque dicho animal no humano es un roedor.
33. Modelo animal no humano según la reivindicación 32, caracterizado porque dicho roedor es un ratón atímico desnudo (athymic nude).
- 10 34. Un procedimiento para la obtención de un modelo animal no humano de cáncer de pulmón no microcítico con metástasis a hueso caracterizado porque ha sido obtenido mediante administración por vía intracardiaca de células tumorales procedentes de una línea celular
15 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.
35. Uso de una línea celular descrita en una de las reivindicaciones 1 a 16, o de un modelo animal descrito en una de las reivindicaciones 30 a 33, para ensayar la actividad antimetastásica de un compuesto.
- 20 36. Uso según la reivindicación 35, caracterizado porque dicho ensayo de actividad metastásica comprende:
- a) cultivar células de dicha línea celular con el compuesto a ensayar, y
 - b) comparar el efecto antimetastásico producido
25 sobre dichas células con respecto a células control tratadas con otro compuesto de referencia o que no han sido tratadas.
37. Uso según la reivindicación 35, caracterizado porque dicho ensayo de actividad antimetastásica comprende:
- a) administrar el compuesto a ensayar a dicho
30 animal modelo, y

b) comparar el efecto de dicho compuesto sobre los tumores de dicho animal, con los tumores de animales control tratados con otro compuesto de referencia o que no han sido tratados.

- 5 38. Uso según una de las reivindicaciones 35 a 37, caracterizado porque dicha actividad antimetastásica a ensayar está seleccionada entre: prevención de la metástasis, amortiguación de los efectos deletéreos de la metástasis, y una acción bloqueante del tropismo
10 tejido-específico.
39. Uso de una línea celular descrita en una de las reivindicaciones 1 a 16, en un método para identificar marcadores asociados a cáncer de pulmón no microcítico caracterizado porque comprende comparar la presencia,
15 ausencia, o el nivel de expresión génica en muestras de tejido tumoral de dicha línea celular, con la expresión génica en células control.
40. Uso de un modelo animal descrito en una de las reivindicaciones 30 a 33, en un método para identificar marcadores asociados a cáncer de pulmón no microcítico
20 caracterizado porque comprende comparar la presencia, ausencia, o el nivel de expresión génica en muestras de tejido tumoral de dicho animal modelo, con la expresión génica en el tejido de un segundo animal que no ha
25 recibido inyección de células.

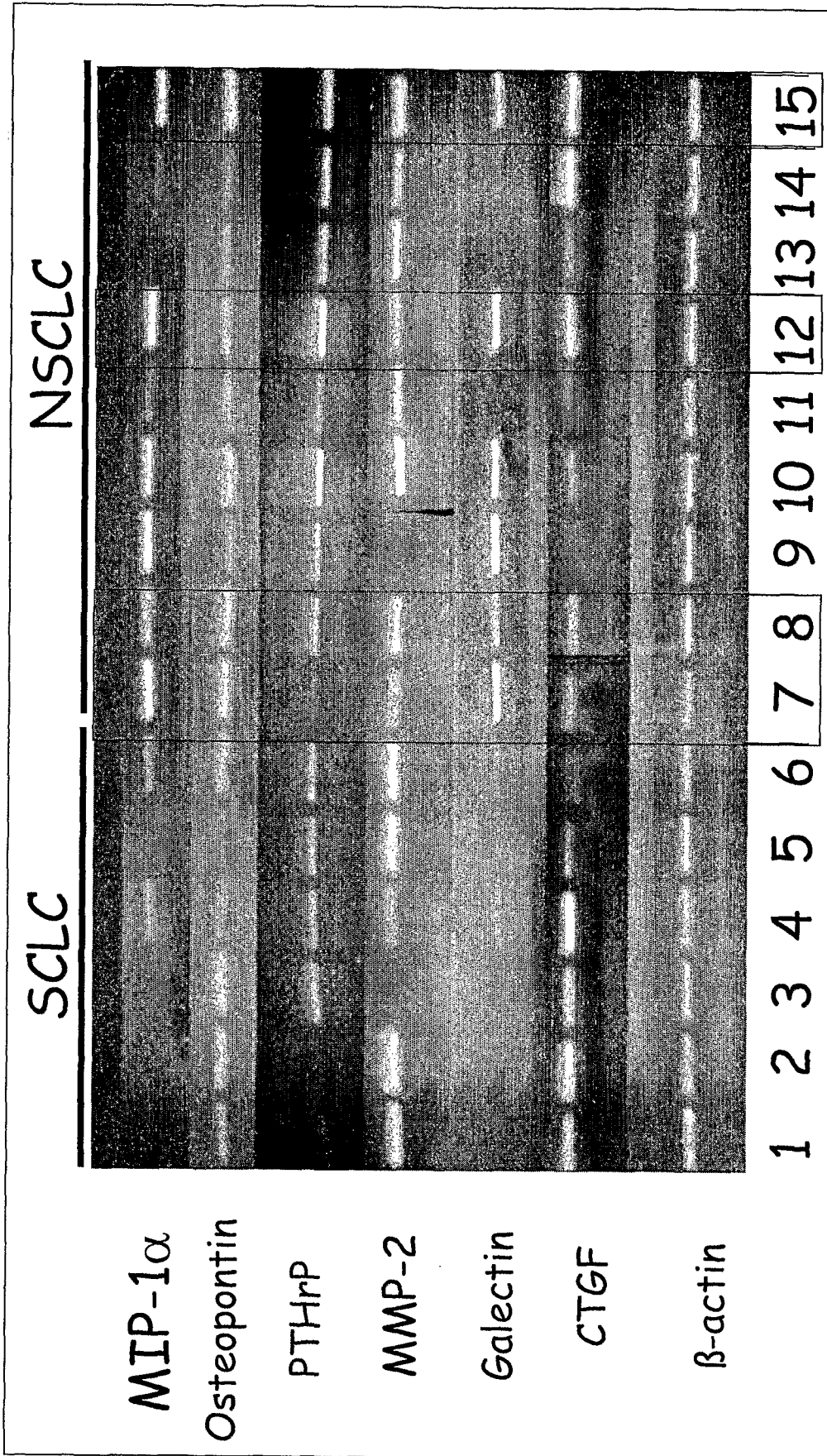


Figura 1

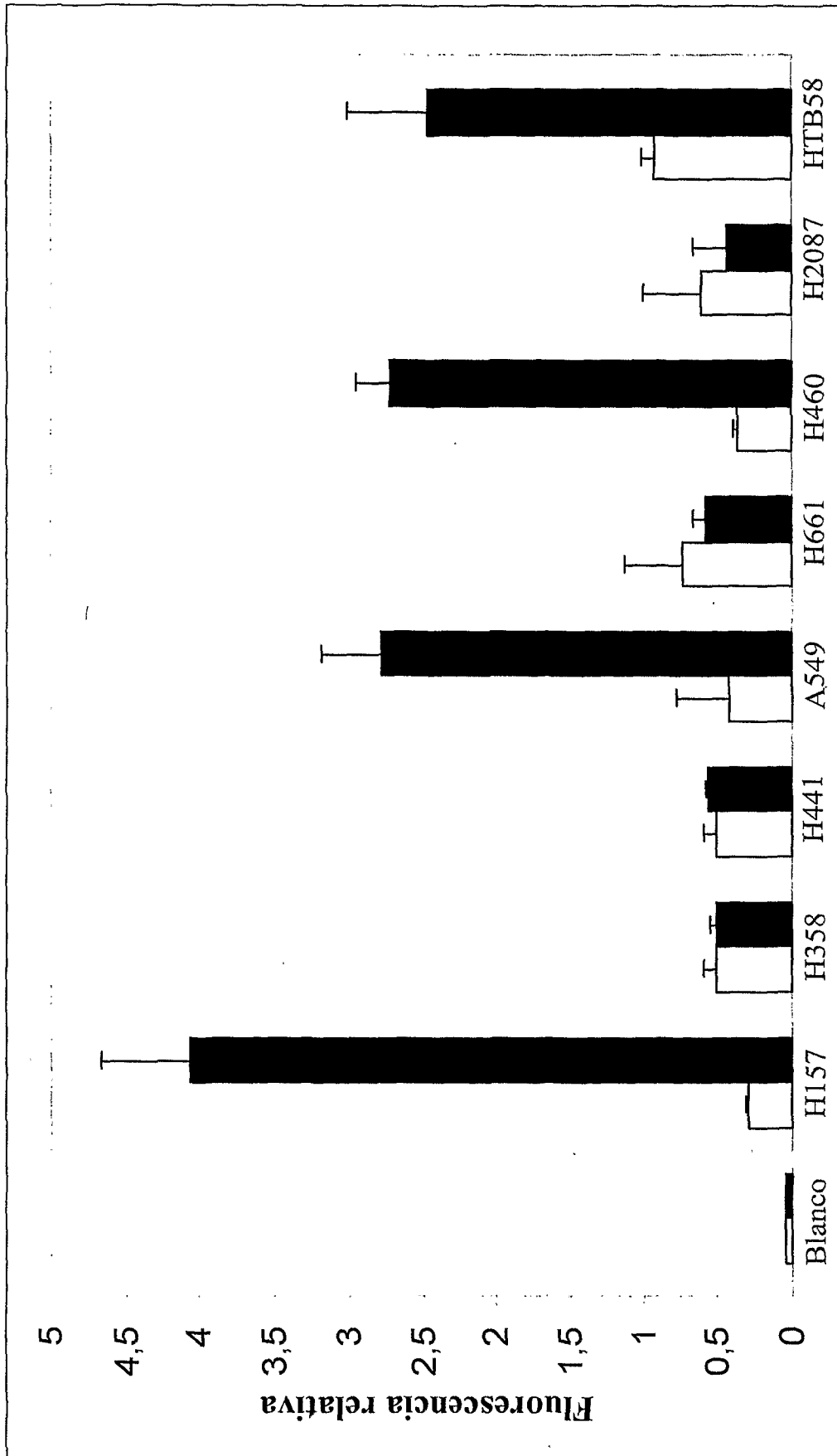


Figura 2

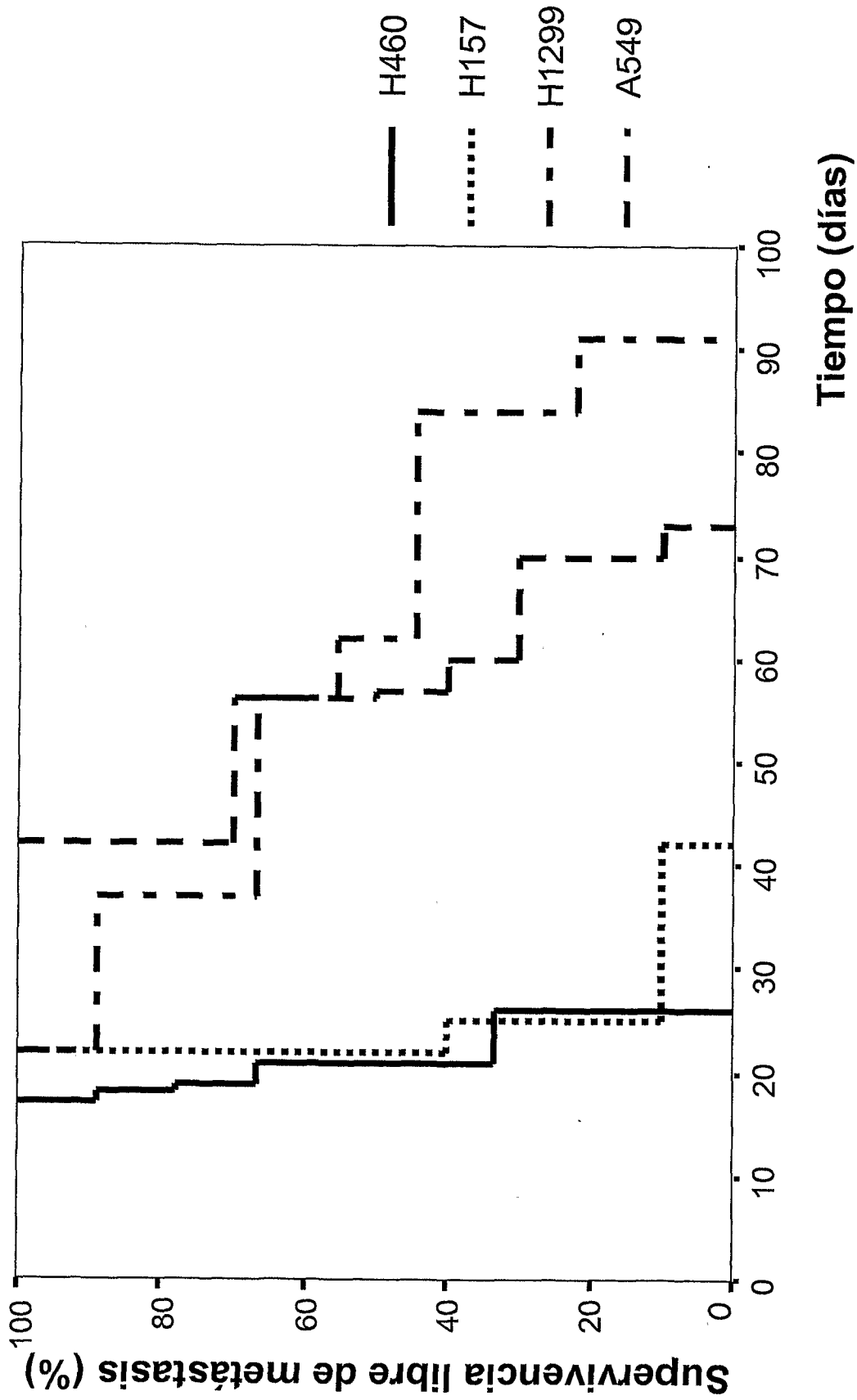


Figura 3

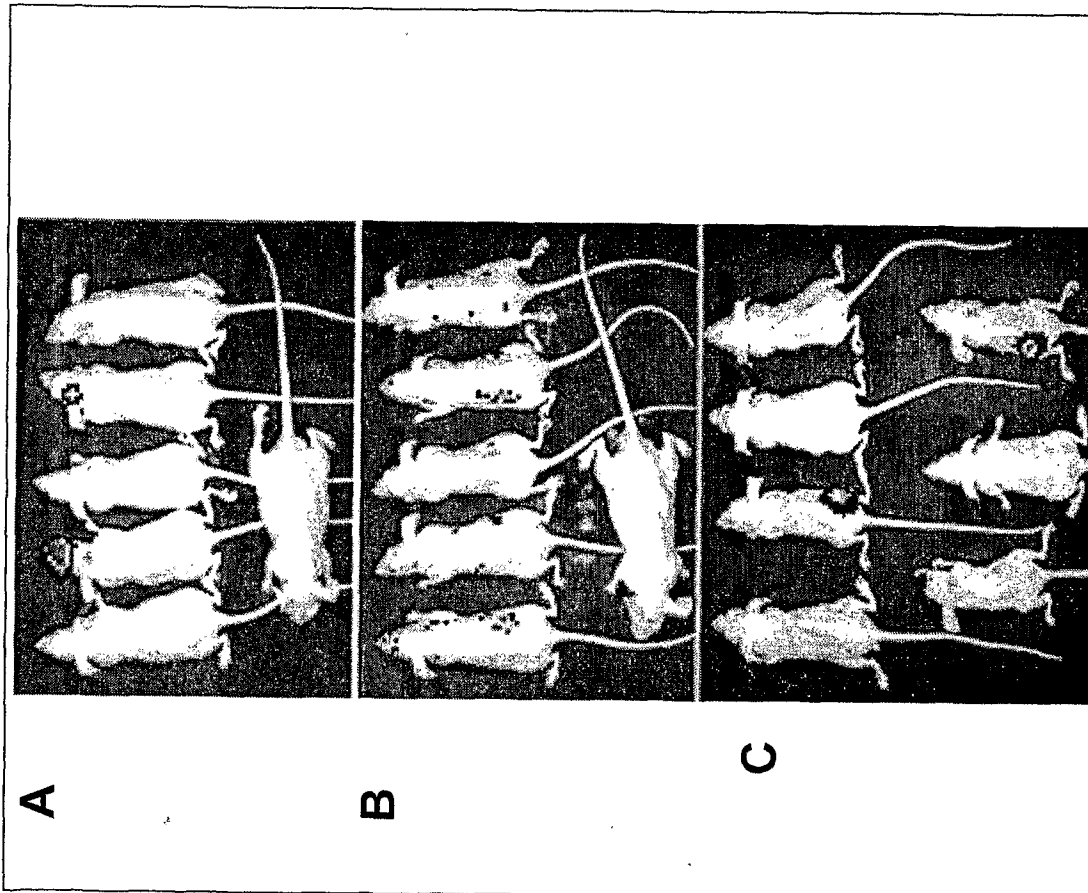


Figura 4

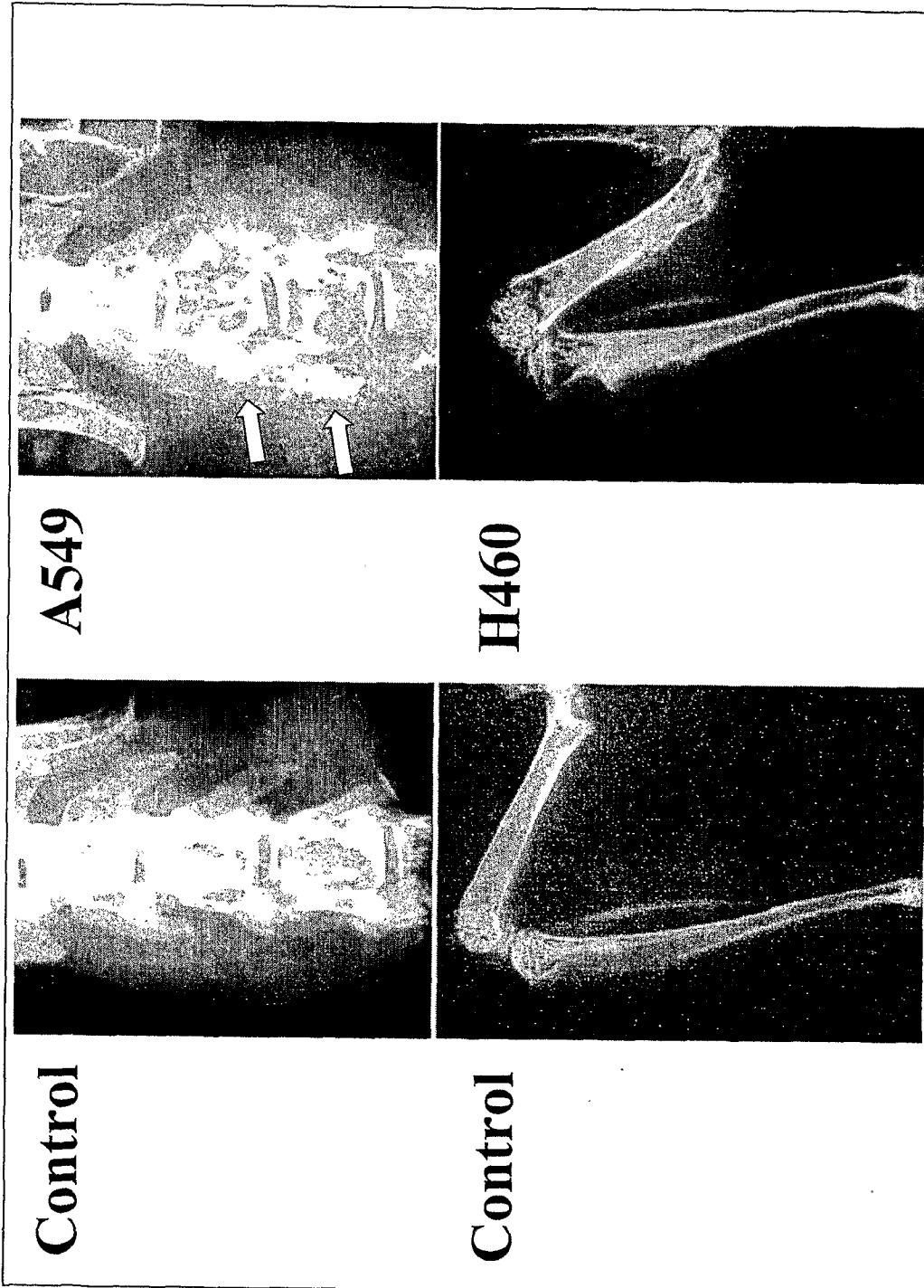


Figura 5

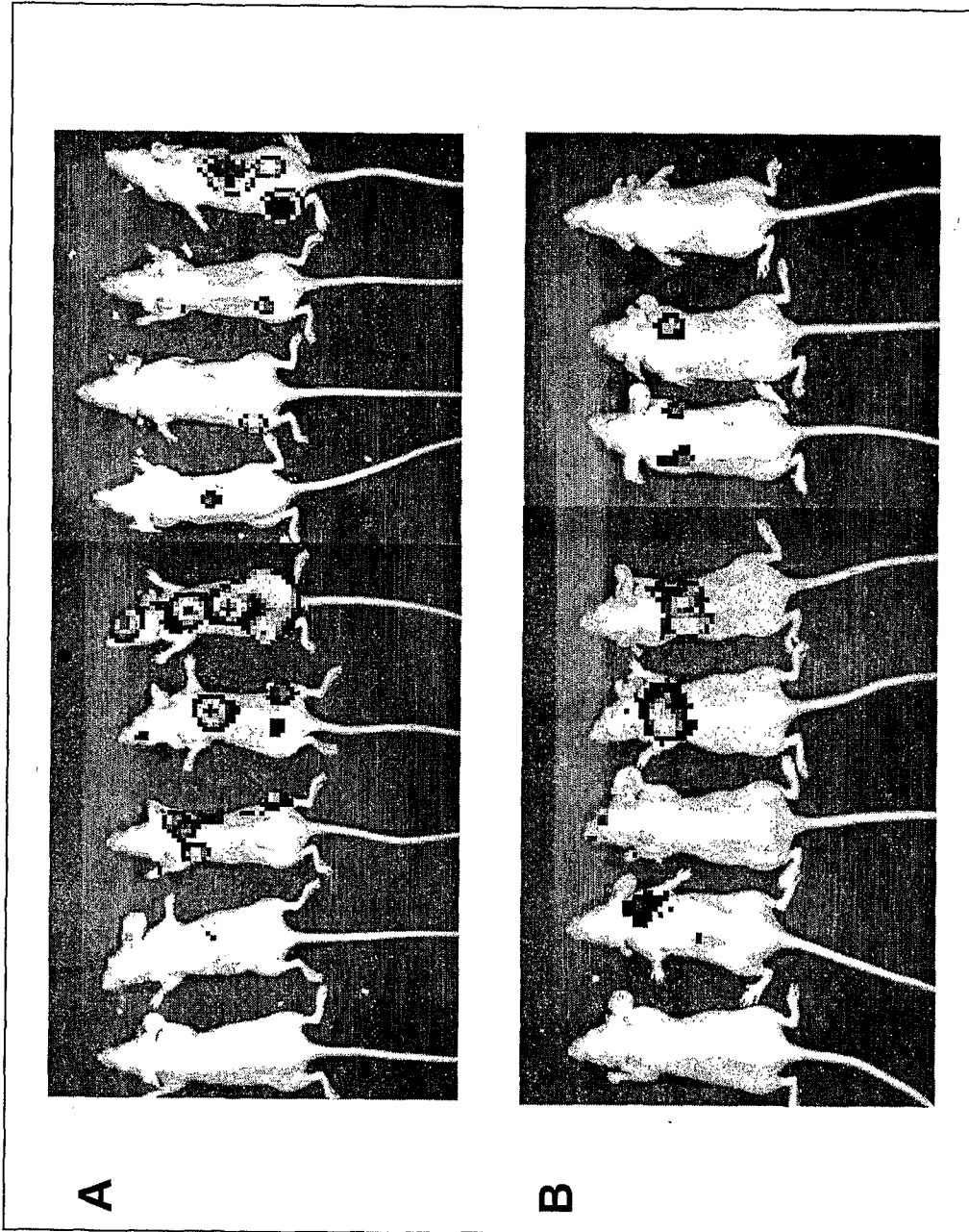


Figura 6

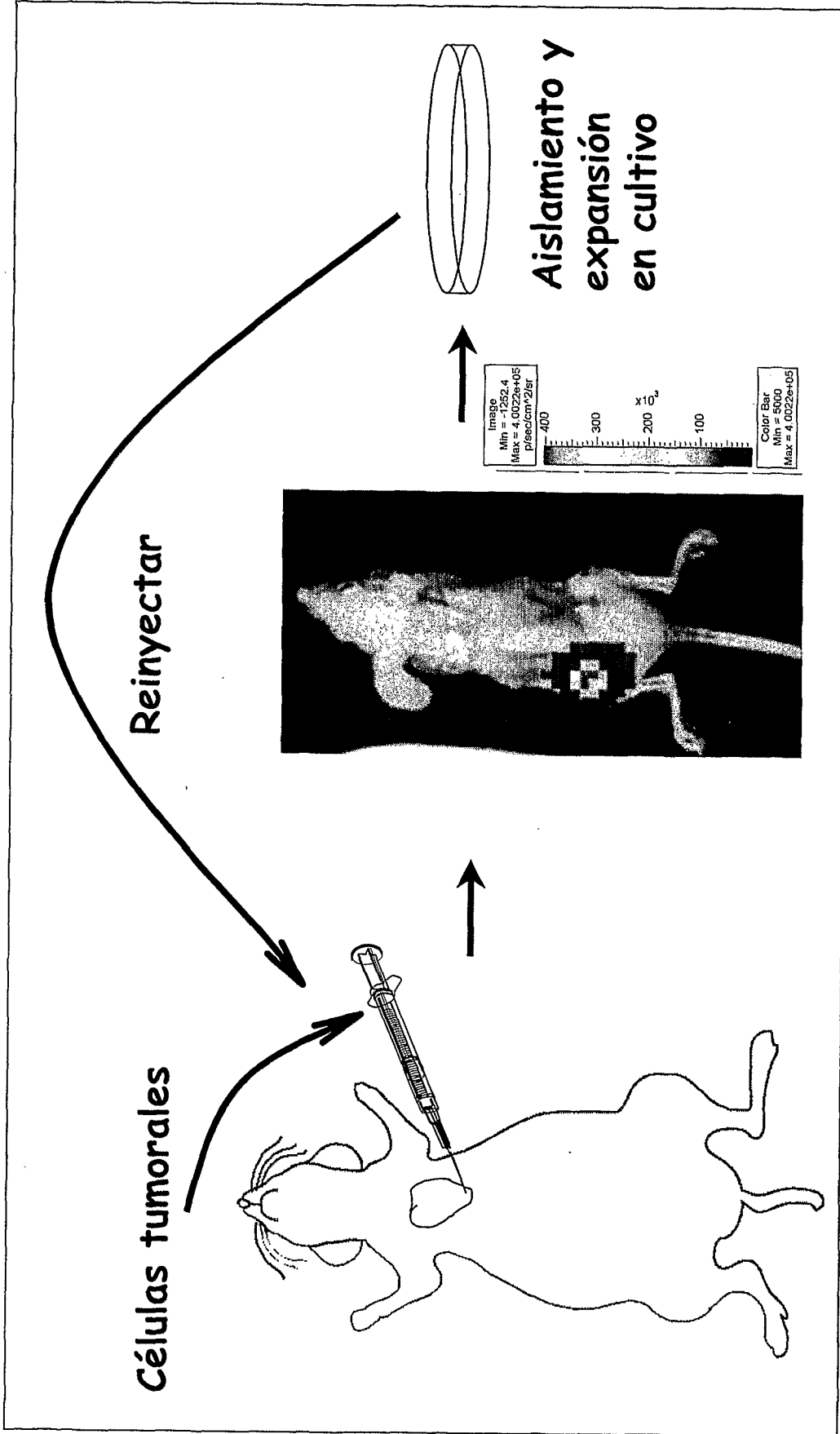


Figura 7

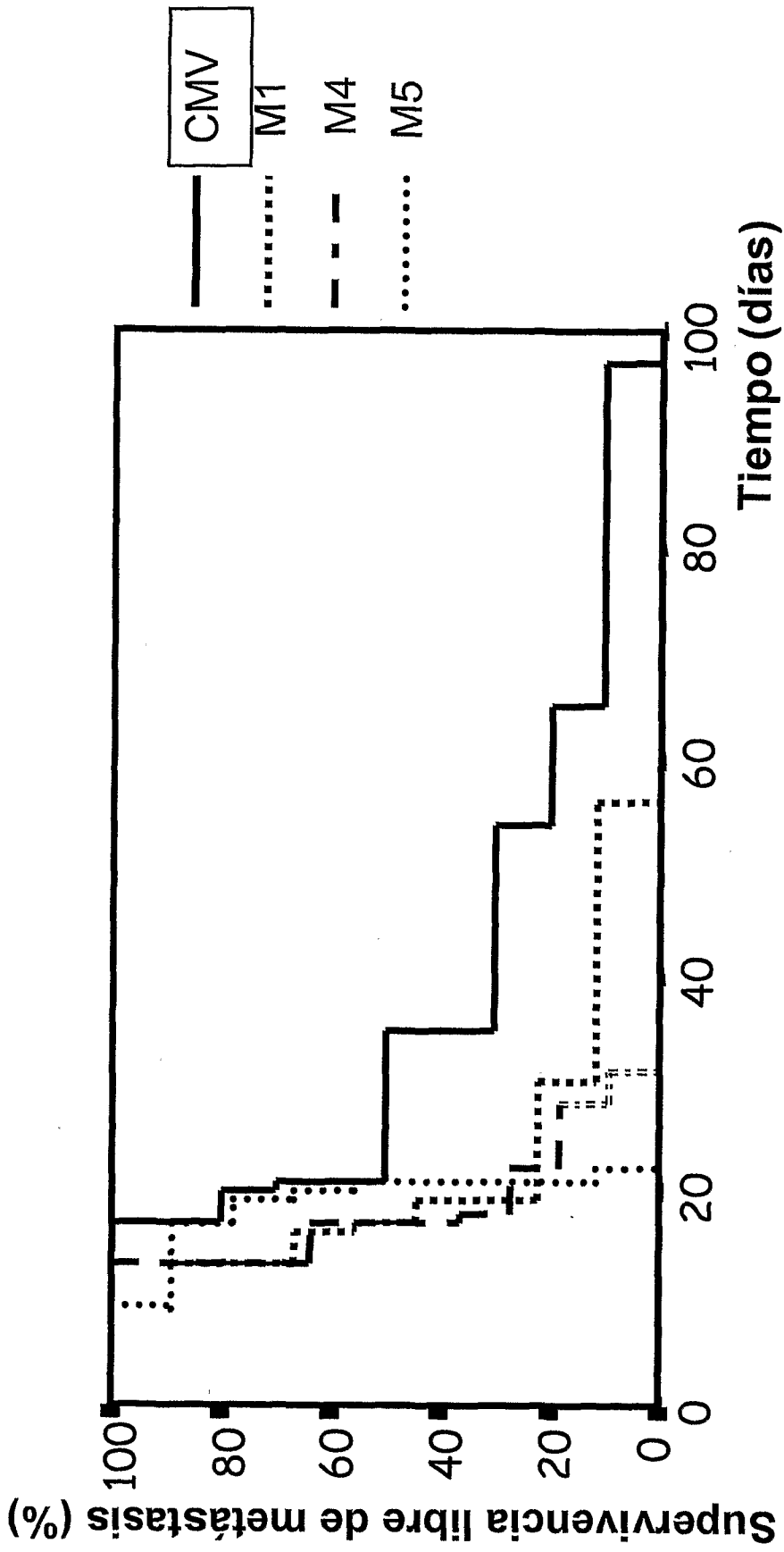


Figura 8

9/18

Número total de clones metastásicos

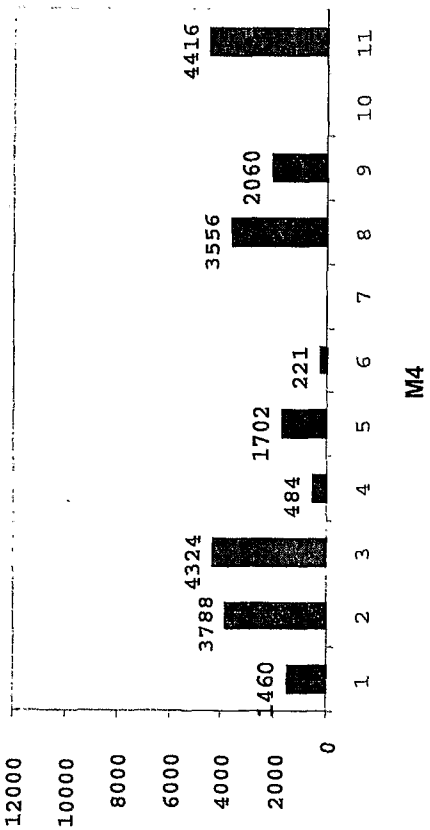
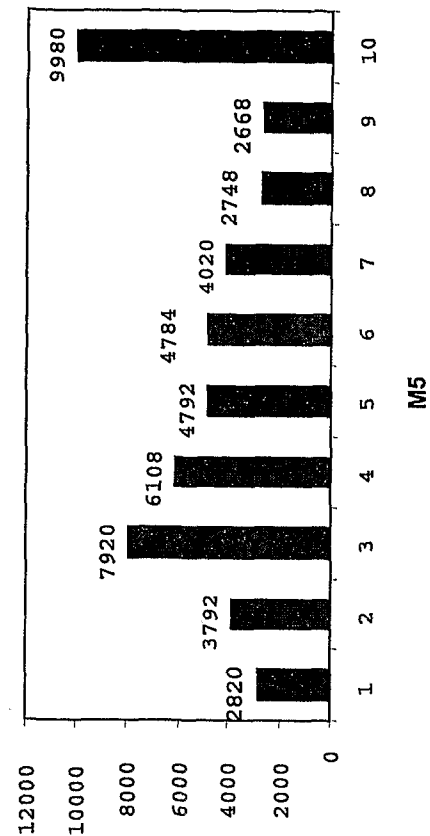
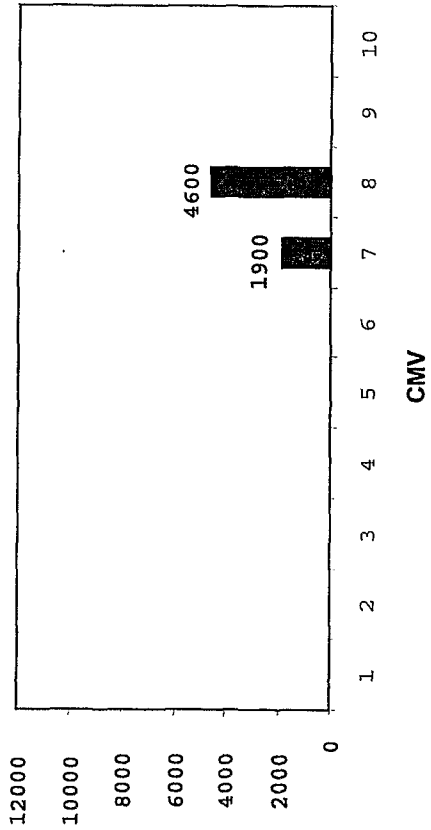
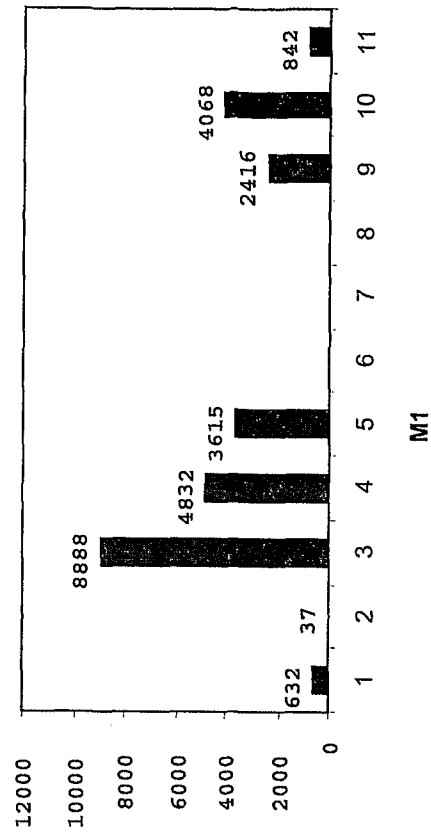


Figura 9

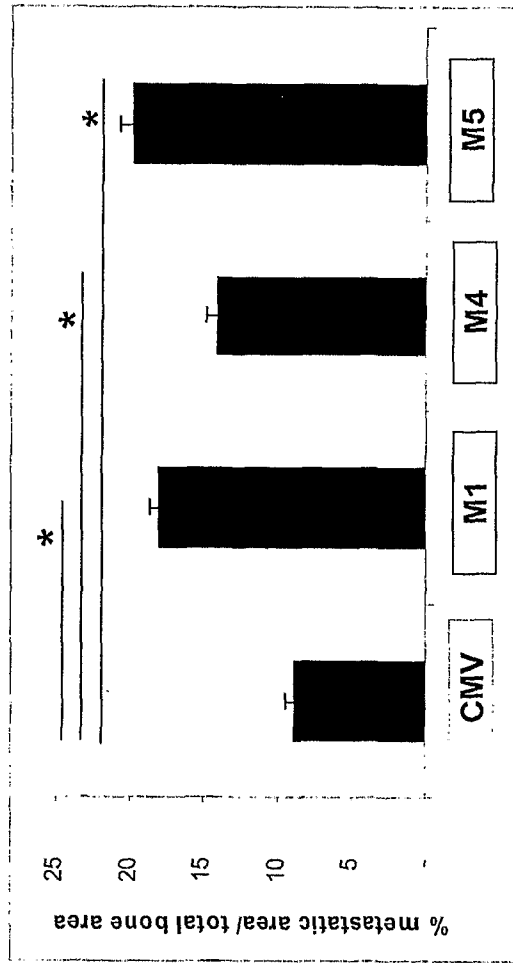
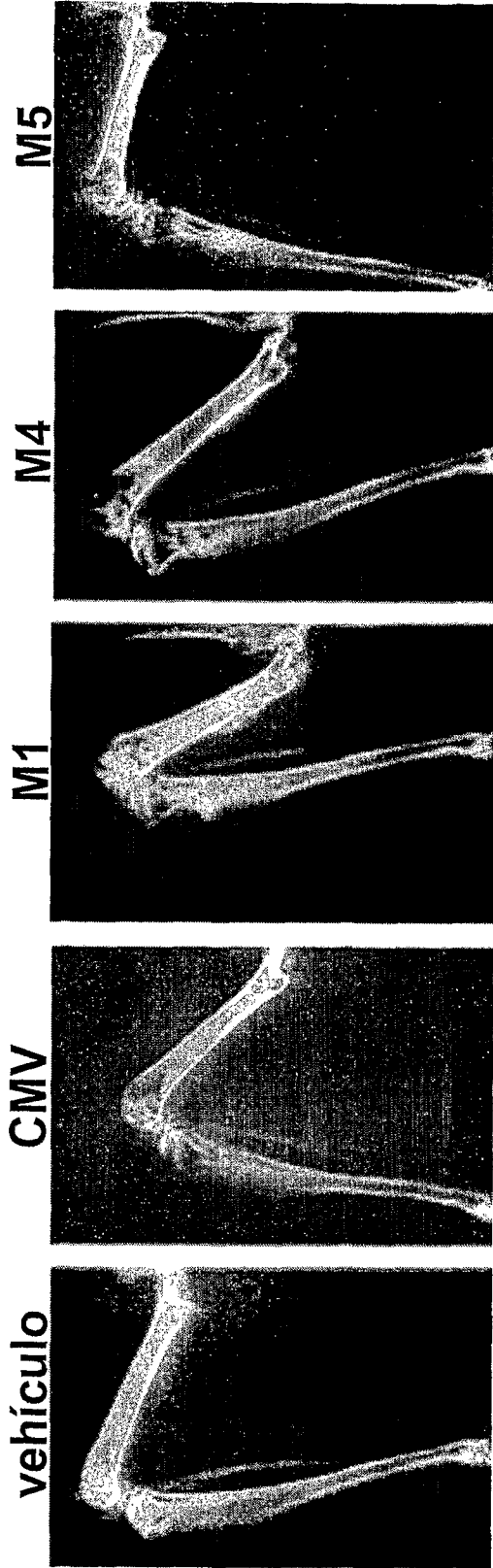
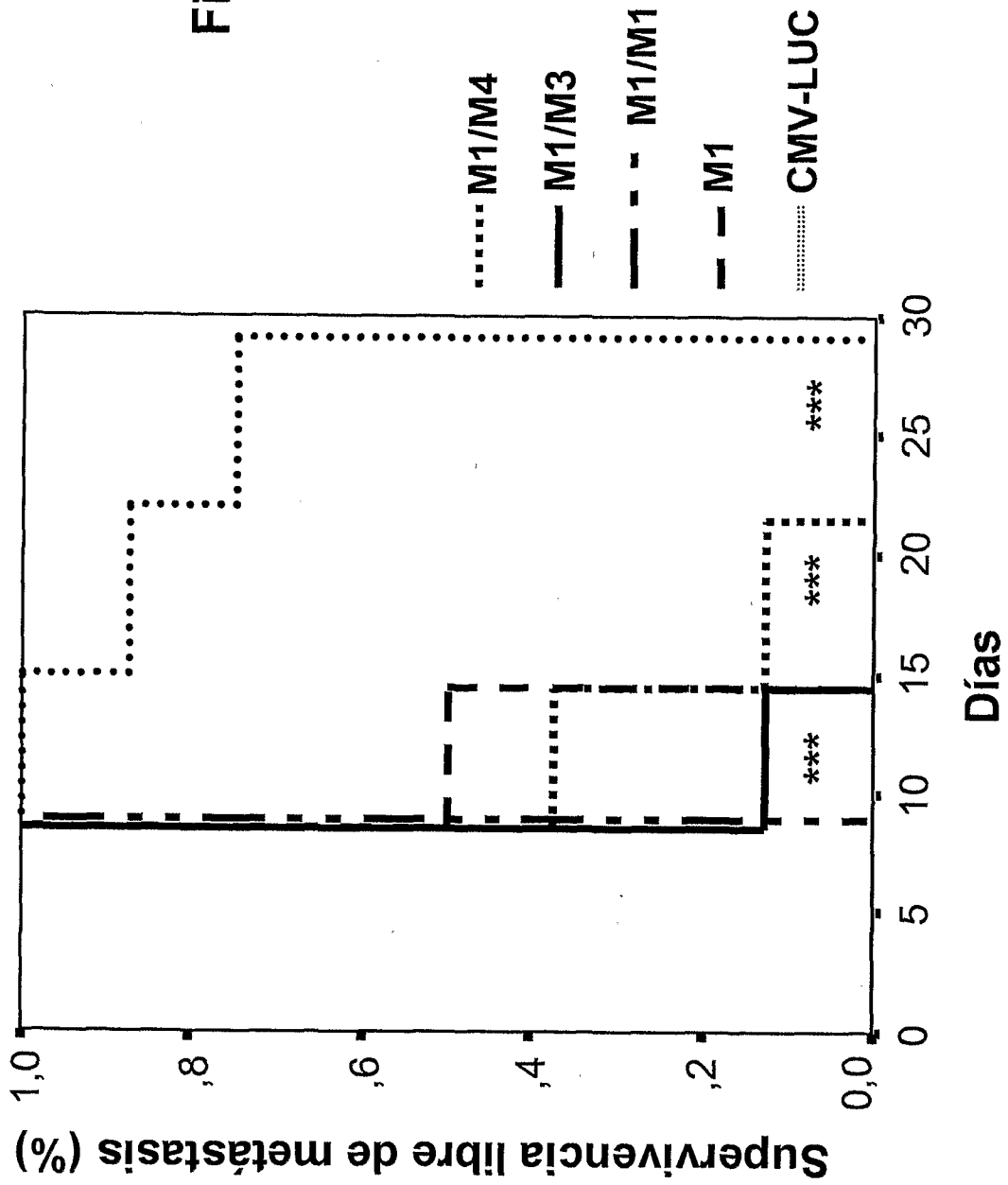


Figura 10

Figura 11



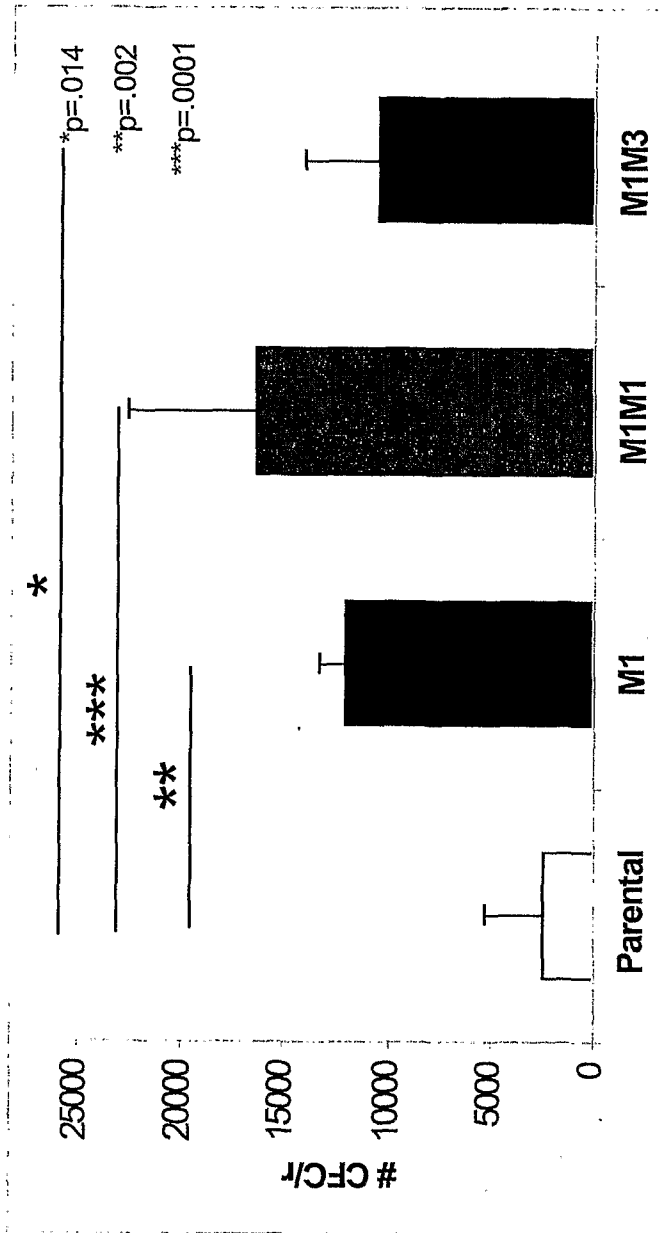


Figura 12

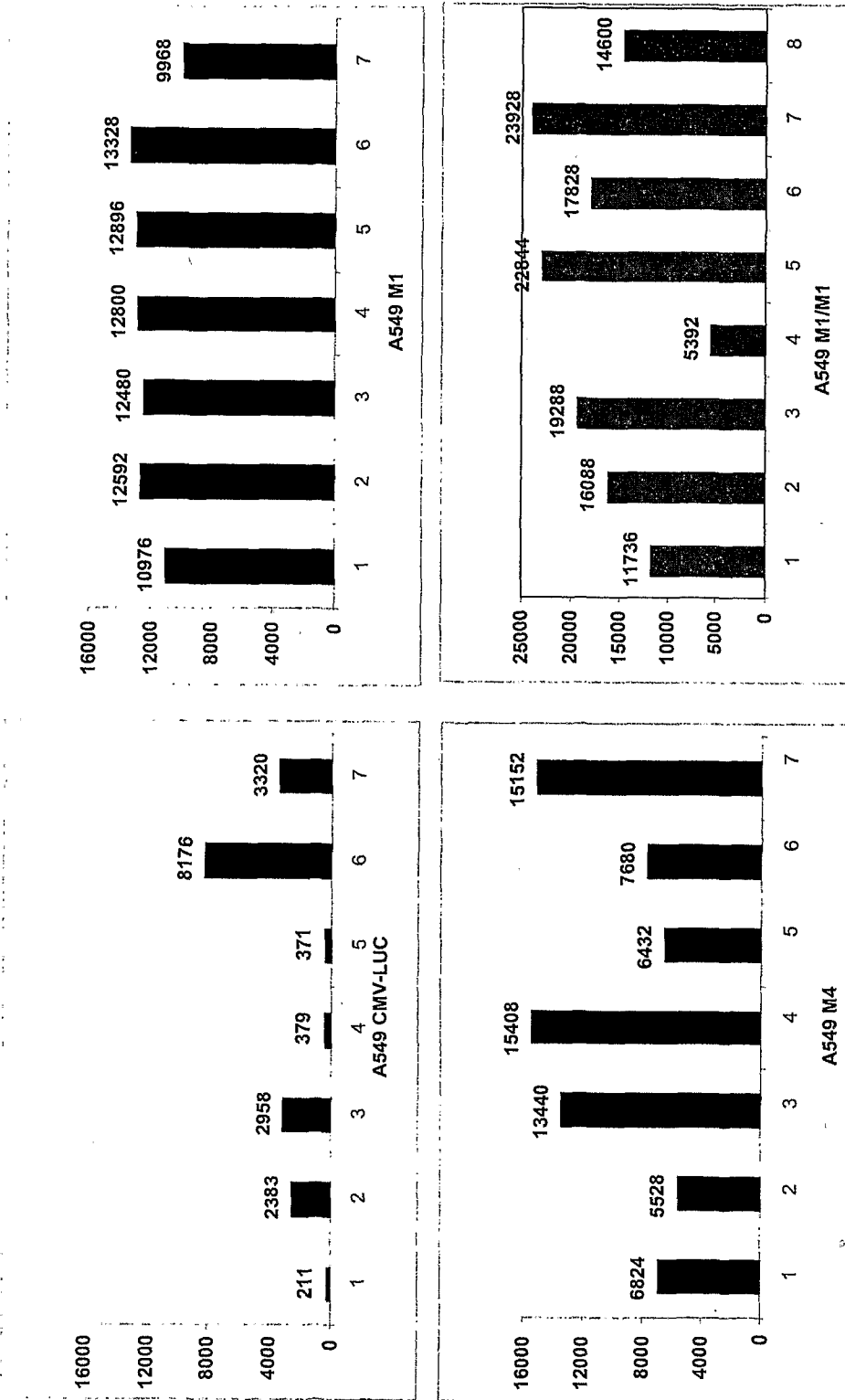


Figura 13

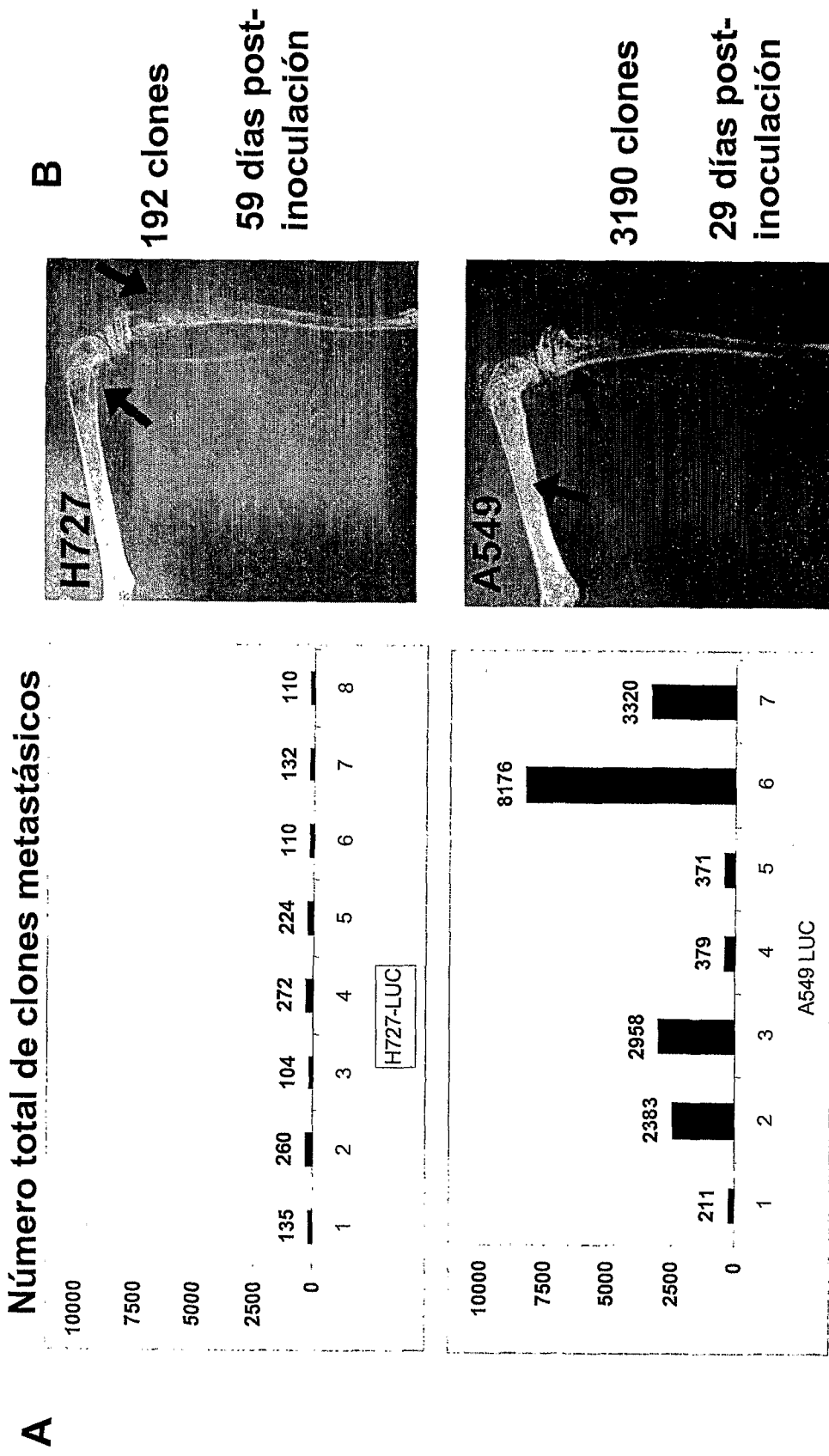


Figura 14

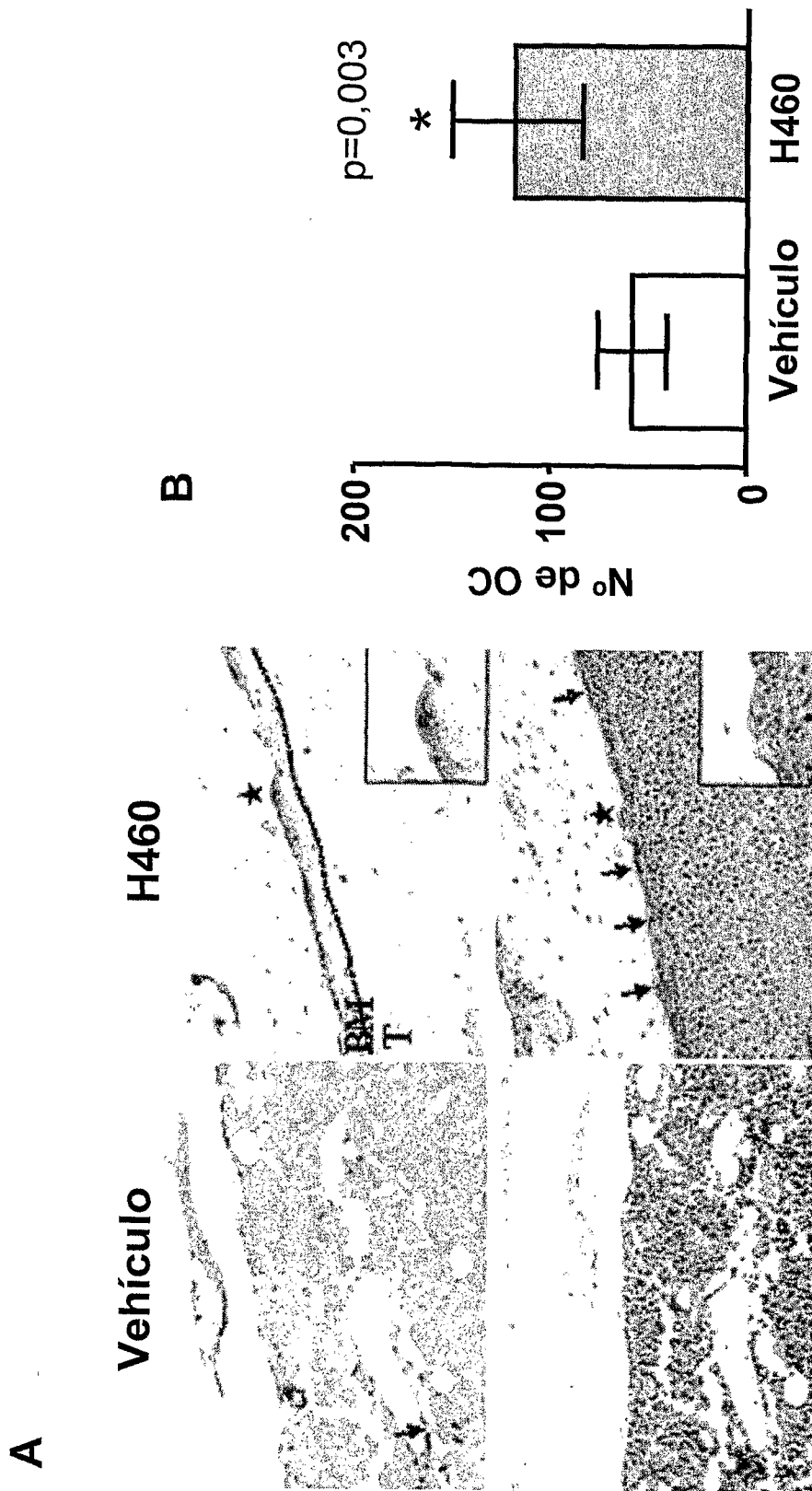


Figura 15

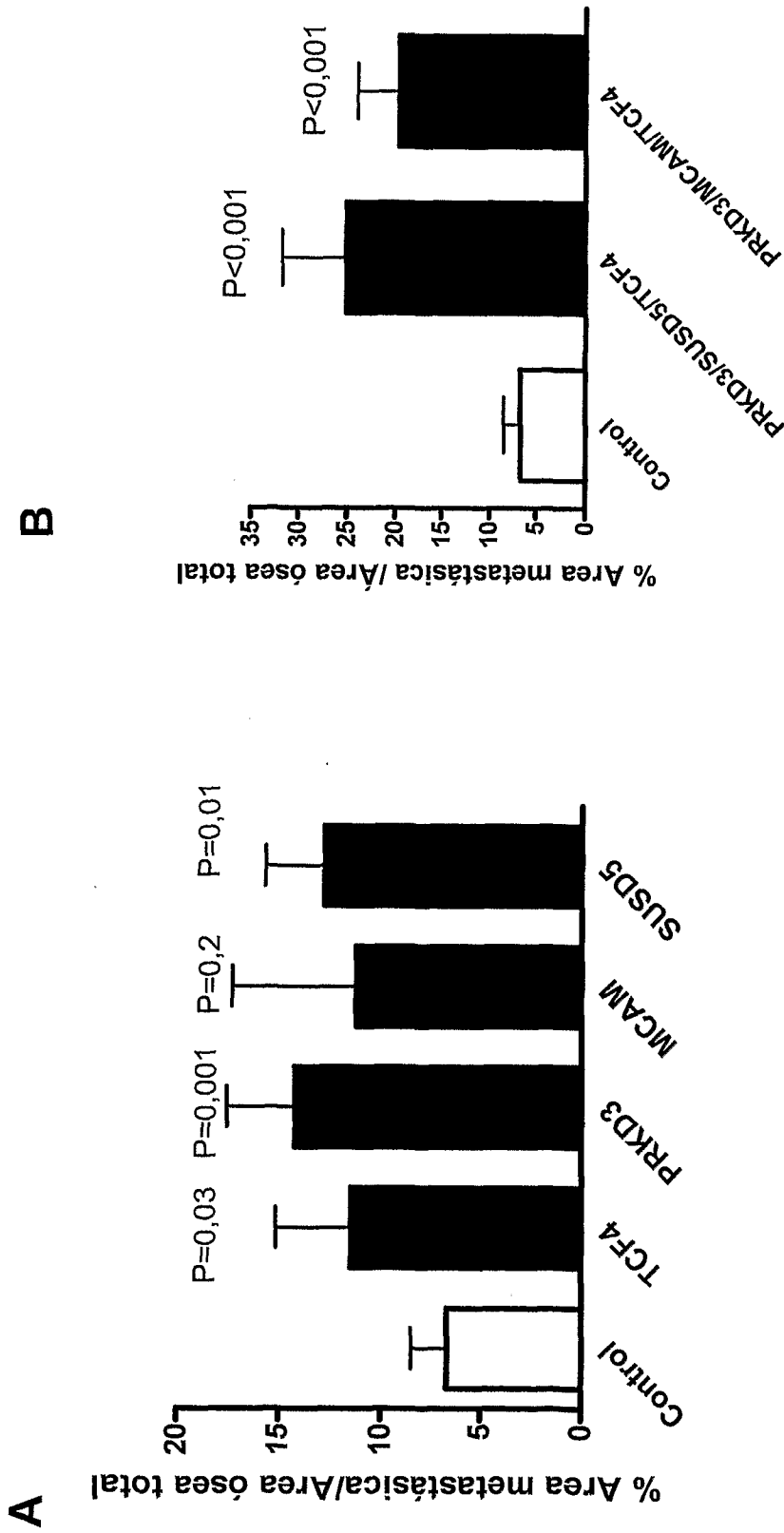


Figura 16

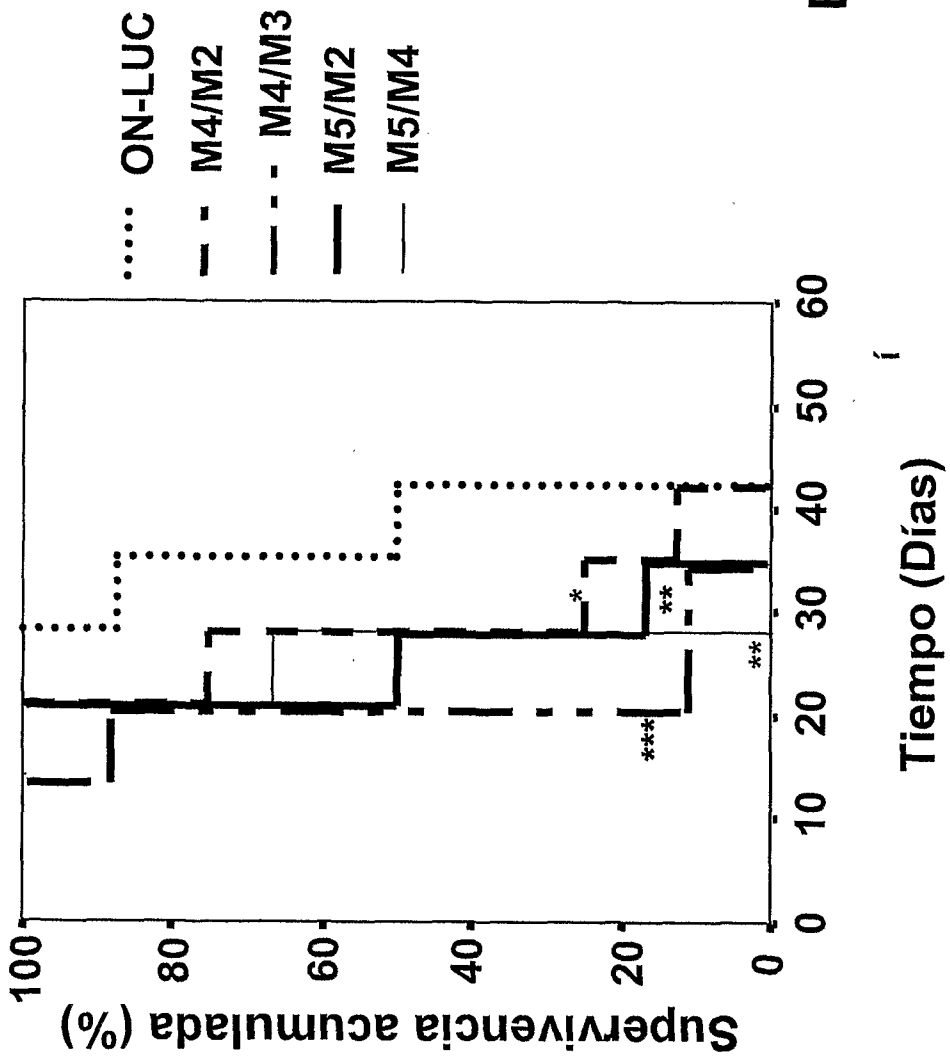


Figura 17A

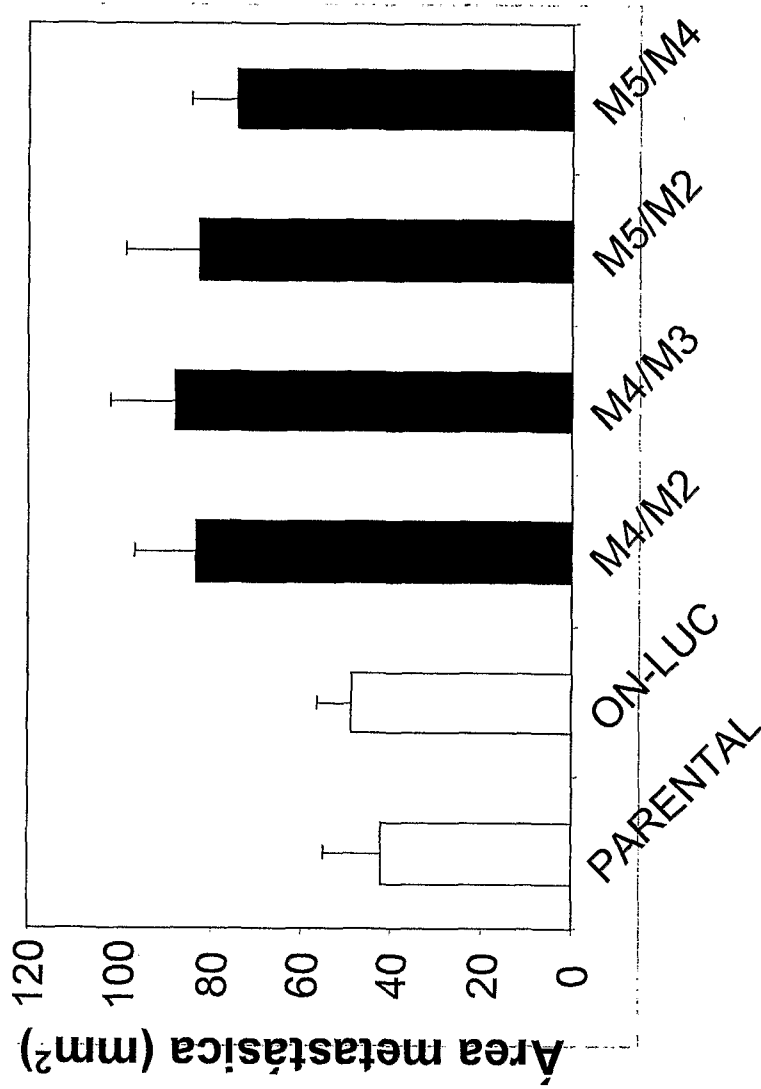


Figura 17B