



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 291 744**

(51) Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **03799634 .5**
(86) Fecha de presentación : **18.12.2003**
(87) Número de publicación de la solicitud: **1573334**
(87) Fecha de publicación de la solicitud: **14.09.2005**

(54) Título: **Método de análisis de la agresividad tumoral que comprende la medida de actina polimerizada.**

(30) Prioridad: **19.12.2002 FR 02 16188**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2008

(73) Titular/es: **Bioalliance Pharma**
59, boulevard du Général Martial Valin
75015 Paris, FR
ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE CACHAN y
Centre National de la Recherche
Scientifique-CNRS

(72) Inventor/es: **Pragnon, Christelle;**
Polard, Valérie;
Subra, Frédéric y
Auclair, Christian

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

Método de análisis de la agresividad tumoral que comprende la medida de actina polimerizada.

5 La presente invención tiene como objeto un ensayo diagnóstico o predictivo en el campo del cáncer. Más particularmente, la invención se refiere a un método basado en la medida directa de la cantidad de actina polimerizada en estado estacionario en un lisado celular no purificado como indicador simultáneo de la agresividad tumoral y de la sensibilidad al tratamiento antitumoral.

10 Según una forma de realización preferida, el método de la invención es notable porque, aparte del extracto celular y la actina fluorescente, no es necesaria ninguna adición proteica purificada suplementaria para poner en evidencia una discriminación simultánea entre células sensibles o resistentes y células de potencial agresivo o no.

15 El citoesqueleto de actina es una estructura proteica esencial para la supervivencia celular. Permite especialmente a la célula mantener su forma y su adhesión, migrar y comunicarse con las células adyacentes. El citoesqueleto es una estructura extremadamente dinámica en perpetua reorganización.

Las propiedades dinámicas del citoesqueleto permiten a la célula comunicarse con el entorno exterior y migrar para formar metástasis, por ejemplo. Estas dos propiedades están en el origen de la cohesión tisular.

20 Las propiedades dinámicas del citoesqueleto hacen su estudio extremadamente difícil.

Se han descrito en la técnica anterior varios mecanismos de regulación de la polimerización de actina, entre los cuales se pueden citar los mecanismos dependientes o bien del complejo Arp2/3 o bien que hacen intervenir a la familia de proteínas ligadas a Ena/VASP.

Así, el complejo Arp2/3, constituido por al menos siete subunidades proteicas, está regulado por los miembros de la familia de proteínas del síndrome de Wiskott-Aldrich (WASP) para activar la nucleación de los filamentos de actina en estructuras en Y (Machesky, Mullins *et al.*, 1999).

30 Para Ena/VASP, se trata de la familia de proteínas cuyo prototipo es la zixina, entre las cuales se puede citar LPP (asociado preferido de lipoma que contiene LIM) y TRIP6 (proteína de interacción con receptor tiroideo 6), caracterizadas porque poseen un dominio rico en prolina seguido de tres dominios LIM. Las proteínas que pertenecen a esta familia interactúan con las proteínas de la familia Ena/VASP, entre las cuales pueden citarse VASP (fosfoproteína estimulada por vasodilatador), Ena (en *Drosophila*), Mena (equivalente a la proteína Ena en mamíferos) y Evl. Aunque estas dos últimas familias de proteínas están claramente implicadas en la regulación de este mecanismo de polimerización de actina, la secuencia de eventos responsables no está completamente esclarecida (Fradelizi, Noireaux *et al.*, 2001).

40 Parece que una misma célula puede contener varios sistemas de polimerización de actina, siendo cada uno responsable de un tipo particular de estructura de actina.

Las propiedades dinámicas del citoesqueleto hacen su análisis extremadamente complejo, teniendo en cuenta los sistemas proteicos diferentes que intervienen en los procesos de regulación de la polimerización y de la despolimerización de actina. Si las propiedades de adhesión y de resistencia están ligadas (Damiano, Hazlehurst *et al.*, 2001; dit Faute, Laurend *et al.*, 2002), las propiedades invasivas de las células cancerosas difieren según su resistencia a los tratamientos anticancerosos (Lopes, Ernst *et al.*, 2002). *In vivo*, las células resistentes parecen tener un poder invasivo mayor (Mitumoto, Kamura *et al.*, 1998).

50 Así, el estudio de uno solo de los dos mecanismos en un sistema purificado *in vitro* puede ser incompleto para juzgar el potencial celular de polimerización de actina de un extracto de una estirpe celular o de una extracción biológica.

Los trabajos de investigación realizados en el marco de la presente invención han puesto ahora en evidencia una correlación neta entre por un lado la medida de la cantidad de actina polimerizada en estado estacionario, y por otro lado la agresividad tumoral.

La presente invención tiene por tanto como objetivo ofrecer un método sencillo y eficaz de diagnóstico o de predicción de la agresividad tumoral y de la sensibilidad al tratamiento anticanceroso en un sujeto. Este objetivo se consigue gracias a un método consistente en medir la cantidad de actina polimerizada en estado estacionario en un extracto celular de una extracción de un sujeto.

Más particularmente, la invención tiene como objeto un método de análisis de la agresividad tumoral de células cancerosas en un sujeto que comprende la medida de la cantidad de actina polimerizada en estado estacionario en un extracto celular del sujeto.

65 Ventajosamente, el extracto celular es un lisado de dichas células cancerosas.

Se entiende por agresividad tumoral el carácter invasivo de un cáncer o de una estirpe celular cancerosa, es decir, tanto el potencial metastásico de estos como la rapidez con la que un tumor primitivo se desarrolla y crece. Se entiende igualmente por agresividad tumoral la tumorigenicidad, es decir, la capacidad de una estirpe celular de ocasionar más o menos eficazmente la aparición de un tumor después de inyección subcutánea en un modelo de múrido capaz de recibir esta estirpe. Se entiende también por agresividad tumoral la ausencia de sensibilidad al tratamiento anticanceroso.

La medida realizada en el extracto celular del sujeto se compara con uno o varios valores de referencia específicos del tejido analizado en el caso de extracciones biológicas, o específicos de fenotipo en el caso de estirpes celulares.

La cantidad de actina polimerizada corresponde a la suma de toda la actina en forma F. Esta suma depende de la cantidad total de actina cualquiera que sea su forma, forma F o forma G, pero sobre todo del conjunto de mecanismos de regulación de la polimerización y de la despolimerización.

Se entiende por actina F los polímeros más o menos largos de actina globular (actina G). La formación de actina F es un fenómeno dinámico regulado muy precisamente por varios mecanismos diferentes. La actina F puede sufrir de manera concomitante un fenómeno de polimerización de actina globular en un extremo del filamento y un fenómeno de despolimerización en el otro extremo.

Es un objetivo de la presente invención liberarse de las diferentes vías de regulación de la polimerización de actina utilizado un sistema integrado.

Este objetivo se consigue según la invención gracias a la medida de la cantidad de actina polimerizada en estado estacionario, la cual tiene en cuenta la resultante de todos los mecanismos de regulación de la polimerización y de la despolimerización de filamentos de actina, y más precisamente, tanto los mecanismos de estimulación como los mecanismos de inhibición de la polimerización y de la despolimerización. El estado estacionario es el resultado del equilibrio entre todos estos mecanismos de regulación de la polimerización de actina en un extremo del filamento de actina y de la despolimerización en el otro extremo.

Ventajosamente, la medida de la actina polimerizada en estado estacionario no necesita una medida de expresión de una proteína (por ejemplo la zixina o una de las proteínas del complejo Arp2/3 o una de las proteínas de la familia Ena/VASP) y no necesita una etapa de purificación proteica ni la adición de reactivos sólidos (por ejemplo de bolas).

La presente invención permite medir la cantidad de actina polimerizada en estado estacionario de un extracto celular no purificado, en la que se integran todas las vías de activación/inhibición de los procesos de polimerización y despolimerización de actina.

Así, se entiende por cantidad de actina polimerizada en estado estacionario, la cantidad de actina polimerizada cuando se consigue el equilibrio entre la polimerización de actina en un extremo de los filamentos y la despolimerización en el otro extremo. Como se indica anteriormente, el estado estacionario es la resultante de todas las vías de regulación de la polimerización de actina.

La medida de la cantidad de actina en estado estacionario puede realizarse mediante cualquier técnica conocida por el experto en la técnica como, por ejemplo, la técnica de polimerización estática de fluorescencia, denominada también anisotropía estática de fluorescencia.

La anisotropía y la polarización son dos valores ligados matemáticamente y por tanto fácilmente intercambiables. Describen el mismo fenómeno. La polarización de fluorescencia permite estudiar las interacciones entre moléculas midiendo los cambios de tamaño de moléculas fluorescentes en disolución. Esta medida está correlacionada con el tamaño de la molécula fluorescente o del complejo molecular fluorescente. En este caso, la molécula fluorescente es un monómero de actina (o actina G) ligado a un fluorocromo, en este caso Alexa 488, que se incorpora a los filamentos de actina (actina F) en el transcurso de la polimerización.

Así, según una forma muy preferida de realización, la medida de la cantidad de actina en estado estacionario del método de análisis de la invención se realiza mediante polarización estática de fluorescencia en presencia de monómeros de actina ligados a un fluorocromo, los cuales se incorporan a filamentos de actina (actina F) formados en el transcurso de la polimerización de la actina endógena del lisado.

En esta forma de realización, se añaden los monómeros de actina ligados a un fluorocromo al lisado celular a una relación comprendida entre 1/80 y 1/1.600 con respecto a la cantidad de actina endógena.

El resultado del ensayo es un valor de anisotropía de fluorescencia de meseta ("STAFF") correspondiente a la cantidad de actina polimerizada en estado estacionario y una constante de polimerización aparente (K_{obs}) de actina resultante de la incorporación progresiva de monómeros de actina marcados en el transcurso del tiempo hasta conseguir el estado estacionario, es decir, la meseta de la curva.

ES 2 291 744 T3

Gracias al software GraphPad Prism® versión 3 (GraphPad Software Inc.), los datos experimentales permiten generar una curva ajustada a una ecuación de 1º orden tal como:

$$Y = \Delta m A \text{ máx}(1 - e^{-K \cdot t})$$

en la que

Y= el valor de anisotropía medido a un tiempo t,

$\Delta m A \text{ máx}$ = “STAFI”, el valor máximo de ordenadas en el equilibrio,

K= la constante k_{obs} ,

t= el tiempo en segundos.

Para predecir el nivel de agresividad tumoral y de sensibilidad a un tratamiento anticanceroso, deben compararse estos dos valores con valores de referencia o bien específicos del tejido analizado, en el caso de extracciones biológicas, o bien específicos del fenotipo, en el caso de estirpes celulares.

Una muestra procedente de una extracción de cáncer muy agresivo, es decir, que presenta o bien un carácter invasivo o bien un carácter tumorigénico o bien incluso que ha perdido el carácter de sensibilidad a los tratamientos anticancerosos, presentará un STAFI y una K_{obs} más bajos que el valor de referencia, es decir, el valor obtenido a partir de extracciones similares menos o no agresivas.

Por ejemplo, el valor normal de anisotropía de fluorescencia de meseta (“STAFI”= delta mA máx) de una estirpe poco invasiva de melanoma (B16F0) es 47 mA (K_{obs} = 0,07). Una estirpe derivada de ésta, descrita por otro lado como muy invasiva (B16F10) (Nakamura, Yoshikawa *et al.*, 2002), presenta un valor de STAFI de 37 mA (K_{obs} = 0,02), netamente inferior al valor de B16F0. Los valores de STAFI y K_{obs} obtenidos a partir de lisados de células invasivas son netamente inferiores a los valores de la estirpe de referencia (figura 3).

Es otro ejemplo la comparación del valor de STAFI de estirpes tumorigénicas con el valor obtenido a partir de estirpes celulares originales no tumorigénicas tomadas como referencia. El valor de STAFI de las estirpes tumorigénicas es netamente inferior a los valores de las estirpes de referencia no tumorigénicas.

En el ejemplo de estirpes derivadas de NIH 3T3, el STAFI de la estirpe tumorigénica (NIH 3T3 EF) es igual a 35 mA comparado con las estirpes de referencia no tumorigénicas (NIH 3T3 y NIH 3T3 EF zixina), para las que el STAFI es igual a 65 y 57 mA respectivamente (figura 1).

La estirpe tumorigénica BAF3 bcr-abl y la estirpe no tumorigénica BAF3 presentan valores de STAFI de 40 mA y 58 mA respectivamente. La represión de la expresión del oncogén de fusión, responsable de la tumorigenicidad de la estirpe BAF3 bcr-abl, induce el restablecimiento del valor de STAFI a un valor próximo al STAFI de la estirpe de referencia, es decir 52 mA y 58 mA, respectivamente (figura 2).

Es un último ejemplo la comparación del valor de STAFI de estirpes celulares de cáncer de mama más o menos sensibles a los tratamientos anticancerosos. Los valores de STAFI de las dos estirpes resistentes (MCF7-MDR y MCF7-dox) son netamente inferiores al valor de la estirpe sensible (MCF7) tomada como referencia, es decir 35 mA y 52 mA frente a 71 mA (figura 4).

Un ejemplo preferido de realización del método según la invención comprende las etapas siguientes:

- la lisis de células cancerosas en condiciones no desnaturizantes para las proteínas y la eliminación de los desechos celulares,
- la dosificación de las proteínas totales del lisado,
- la adición de monómeros de actina ligados a un fluorocromo,
- la adición de las sustancias necesarias para la polimerización de la actina endógena y para la protección de las proteínas del lisado,
- la medida de la cantidad de actina polimerizada en estado estacionario en el lisado.

La presente invención se dirige también a ofrecer un método de identificación de moléculas susceptibles de presentar una actividad anticancerosa. Uno de dichos métodos comprende la realización del método de análisis de la agresividad tumoral descrito anteriormente según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en presencia de una cantidad adecuada de una o varias moléculas para ensayar, y la determinación de la capacidad de dicha molécula de restablecer una cantidad de actina polimerizada en estado estacionario correspondiente a la de células no agresivas.

ES 2 291 744 T3

Los trabajos realizados en el marco de la presente invención han permitido la identificación de moléculas capaces de restablecer el valor de STAFI de células agresivas al nivel del de células no agresivas. Estas moléculas son susceptibles de presentar una actividad anticancerosa.

Por ejemplo, la jasplaquinolida, añadida al lisado de células agresivas (NIH 3T3 EF) justo en el momento del ensayo, permite el restablecimiento del valor de STAFI de estas células a un valor próximo al STAFI de células de referencia no tumorigénicas (NIH 3T3) (figura 5). La tabla 1 siguiente se refiere al restablecimiento del valor de delta mA máx (STAFI, correspondiente a la cantidad de actina polimerizada en estado estacionario) de células tumorigénicas (NIH 3T3 EF, indicadas EF) al nivel del valor de células no tumorigénicas (NIH 3T3) mediante la adición de jasplaquinolida (indicada jaspla).

TABLA 1

Estirpes celulares	Δ mA máx
NIH 3T3 EF	30
NIH 3T3	62
NIH 3T3 EF + jasplaquinolida	65

La invención se refiere también a la aplicación del método de análisis de la agresividad tumoral descrito anteriormente a:

- la evaluación del carácter invasivo de dichas células;
- la evaluación de la tumorigenicidad de las células;
- la predicción de la sensibilidad de dichas células a un tratamiento anticanceroso; el tratamiento anticanceroso consiste, por ejemplo, en una radioterapia o una quimioterapia.

Se entiende por sensibilidad al tratamiento anticanceroso tanto la ausencia de resistencia a los medicamentos dependiente del sistema MDR (multirresistencia) ligada a mecanismos de bombas de la familia de proteínas P-gp, como a la capacidad de las células cancerosas de entrar en apoptosis. Estos dos fenómenos pueden ser la respuesta a un tratamiento anticanceroso constituido por una radioterapia o una quimioterapia.

La invención se dirige igualmente a un kit para un ensayo diagnóstico o predictivo de la agresividad tumoral, y más especialmente para la medida de la cantidad de actina polimerizada en estado estacionario para la evaluación de la agresividad tumoral en una extracción biológica.

Uno de dichos kits comprende:

- un medio de resuspensión de células para la lisis de las células;
- las sustancias necesarias para la polimerización de la actina endógena y para la protección de las proteínas del lisado,
- los monómeros de actina ligados a un fluorocromo,
- un tampón de polimerización de actina,
- un tampón general de actina,
- eventualmente extractos de referencia de células agresivas y no agresivas.

Aparecerán otras ventajas y características de la invención a partir de los ejemplos siguientes, en los que se hará referencia a los dibujos adjuntos en los que:

- la figura 1 ilustra la medida de la polimerización de actina en estado estacionario (STAFI= delta mA máx) en estirpes celulares originales adherentes de murido no tumorigénicas (NIH 3T3 y NIH 3T3 EF zixina) y tumorigénicas (NIH 3T3 EF).

- La figura 2 ilustra la medida de la polimerización de actina en estado estacionario (STAFI= delta mA máx) en estirpes celulares originales no adherentes (células hematopoyéticas de murido), no tumorales (BAF3 y BAF3 Bcr-Abl⁻) y tumorales (BAF3 Bcr-Abl⁺).

- La figura 3 ilustra la medida de la polimerización de actina en estado estacionario (STAFI= delta mA máx) en estirpes celulares originales de carcinoma de mama sensibles (MCF7) y resistentes (MCF7-doxorubicina y MCF7-MDR).

- La figura 4 ilustra la medida de la polimerización de actina en estado estacionario (STAFI= delta mA máx) en estirpes celulares originales de melanoma que tienen un potencial más o menos metastásico (B16F0< B16F10).

- La figura 5 ilustra la identificación de una molécula (la jasplaquinolida) capaz de restablecer la cantidad de actina en estado estacionario (STAFI= delta mA máx) de una estirpe tumorigénica al nivel de la cantidad de una estirpe no tumorigénica.

I- Métodos

La técnica de polarización de fluorescencia, denominada también anisotropía estática de fluorescencia, permite obtener un valor dependiente del tamaño de la molécula fluorescente y del número de complejos moleculares fluorescentes. Es decir, que añadiendo una baja proporción de actina monomérica fluorescente a un extracto celular, estos monómeros van a incorporarse al filamento de actina en el transcurso de la polimerización, lo que va a ocasionar un aumento del valor de anisotropía hasta una meseta aparente, correspondiente al equilibrio entre la polimerización y la despolimerización de filamentos de actina que contienen monómeros fluorescentes. El nivel de esta meseta, denominado "STAFI", refleja la cantidad de actina F en estado estacionario, es decir, el potencial adhesivo de la célula, y la velocidad de obtención de la meseta depende de la rapidez con que se formen estos filamentos. Estos dos parámetros son índices de la agresividad tumoral.

Método de lisis de las células: Para las células en cultivo, las células pueden deber tripsinizarse antes de lavar (tampón de lavado: NaCl 135 mM, KCl 2,7 mM, NaHCO₃ 11,9 mM, NaH₂PO₄ 0,36 mM, MgCl₂ 2 mM, EGTA 0,2 mM, glucosa 5,5 mM, 0,3% de albúmina, pH= 6,5). Se ponen en suspensión las células en un tampón de sonicación (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, EGTA 10 mM y MgCl₂ 2 mM + inhibidores de proteasas Roche) a razón de 50 x 10⁶ células/ml, después se someten a sonicación en hielo a razón de 10 rondas de 10 segundos separadas por tiempos de pausa de 30 segundos. Se centrifuga el lisado durante 30 min a 8.000 rpm a 4°C, después se filtra por 0,45 µm. Se mide la concentración de proteínas totales del lisado mediante el método de Bradford para ajustarla a 2 mg/ml con tampón de sonicación. Se añaden 0,4 mM finales de ATP y DTT para constituir el lisado celular para ensayar.

Se prepara la disolución de monómeros de actina ligados a un fluorocromo de la manera siguiente: se diluye la disolución madre de actina-Alexa 488 (Molecular Probes) (7,3 mg/ml) a 1:200 en tampón G (Tris 5 mM, pH 8,1, CaCl₂ 0,2 mM, DTT 0,2 mM, ATP 0,2 mM) suplementado con 10% de sacarosa, y después se ultracentrifuga a 35.000 rpm durante 120 min a 4°C con el fin de eliminar los eventuales filamentos de actina. Esta disolución de monómeros de actina marcados se conserva a -80°C en alícuotas.

En el momento del ensayo, se diluye la disolución de monómeros de actina marcados 1/3 en tampón G. El aparato utilizado es un Beacon 2000. Se introducen en un tubo para Beacon 167 µl de tampón G y 3 µl de disolución de monómeros de actina marcados previamente diluida. Después de la estabilización del valor de anisotropía de los monómeros de actina aproximadamente a 110 mA, se añaden 4 µl de tampón de polimerización (KCl 2,5 M, MgCl₂ 50 mM, ATP 25 mM) y 20 µl de extracto celular para ensayar a 2 mg/ml. Se registra el valor de anisotropía de fluorescencia durante un periodo de aproximadamente 200 segundos. Se tratan los datos con el software GraphPad Prism versión 3.0 (Ed. GraphPad Software). Se resta el valor de anisotropía de fluorescencia de los monómeros de actina marcados solos (aproximadamente 110 mA) de los valores siguientes.

Se cultiva el conjunto de estirpes celulares a 37°C en atmósfera húmeda que contiene 5% de CO₂. Se mantienen en medio DMEM o RPMI (Gibco) suplementado con 10% de suero de ternero recién nacido o suero fetal de ternero (Gibco) y antibióticos (penicilina a 100 UI/ml y estreptomycin a 100 µg/ml).

La estirpe NIH-3T3 es una estirpe de fibroblastos de murino no tumorigénicos.

La estirpe NIH-3T3-EF es una estirpe tumoral derivada de la precedente y contiene un ADNc que codifica el oncogén de fusión EWS-FLI en su genoma. La expresión de esta proteína se selecciona con la ayuda de 2,5 µg/ml de puomicina.

La estirpe NIH-3T3-EF-zixina es una estirpe derivada de la precedente, que ha perdido su carácter tumorigénico después de la transformación por un ADNc que codifica la proteína zixina humana. Se selecciona la expresión de esta proteína con la ayuda de la genética.

La estirpe BAF3 es una estirpe prelinfocítica de murino. Se mantiene en presencia de IL3.

La estirpe BAF3 Bcr-Abl es una estirpe derivada de la precedente, que contiene un ADNc que codifica el oncogén de fusión Bcr-Abl, cuya expresión puede reprimirse con la doxiciclina. Cuando se cultiva esta estirpe en ausencia de doxiciclina y de IL3, se expresa el oncogén y se denomina entonces BAF3 bcr-abl⁺. Cuando esta estirpe se cultiva en presencia de doxiciclina e IL3, el oncogén de fusión no se expresa ya y se denomina BAF3 bcr-abl⁻ (Dugray, Geay *et al.*, 2001).

ES 2 291 744 T3

La estirpe B16F0 es una estirpe de melanoma de múrido que tiene un bajo potencial metastásico (Nakamura, Yoshikawa *et al.*, 2002).

La estirpe B16F10 es una estirpe derivada de la precedente, que ha adquirido un alto potencial metastásico después de 10 selecciones sucesivas en un modelo de múrido singénico de metástasis pulmonares (Nakamura, Yoshikawa *et al.*, 2002).

La estirpe MCF7 es una estirpe de carcinoma de mama humano poco tumorigénica.

La estirpe MCF7-Dox es una estirpe derivada de la precedente, vuelta resistente a la doxorubicina mediante la adición regular de doxorubicina 10 μ M en el medio de cultivo.

La estirpe MCF7-MDR es una estirpe derivada de la estirpe MCF7, que contiene un ADNc que codifica la P-gp, responsable de la pérdida de sensibilidad a la quimioterapia de las células cancerosas.

II- Resultados

1) *Correlación entre la tumorigenicidad de las estirpes celulares adherentes de fibroblastos de mridos y los valores medidos de STAFI y K_{obs}*

La figura 1 representa la determinación del valor de delta mA máx (STAFI, correspondiente a la cantidad de actina polimerizada en estado estacionario) en tres estirpes celulares originales de múrido adherentes no tumorigénicas (NIH 3T3 y NIH 3T3 EF zixina) y tumorigénicas (NIH 3T3 EF). La tabla 2 siguiente se refiere a la cinética de polimerización de la actina en presencia de extractos celulares mediante polarización esttica de fluorescencia.

TABLA 2

Estirpes celulares	Delta mA máx	K_{obs}
NIH 3T3	65	0,086
NIH 3T3 EF	35	0,04
NIH 3T3 zixina	57	0,033

Se compara la cantidad de actina polimerizada en estado estacionario ("STAFI": valor de anisotropía de fluorescencia de meseta) de la estirpe tumorigénica (NIH 3T3 EF) con la de la estirpe original no tumorigénica (NIH 3T3) (figura 1). El delta mA máx (STAFI) de la estirpe tumorigénica (NIH 3T3 EF) es netamente inferior al delta mA máx de la estirpe no tumorigénica (NIH 3T3), es decir 35 y 65 respectivamente.

La expresión de la zixina en la estirpe tumorigénica NIH 3T3 EF conduce a una reducción importante de la tumorigenicidad de esta estirpe (NIH 3T3 EF zixina). La reducción de la tumorigenicidad de esta estirpe está correlacionada con el restablecimiento de delta mA máx a un valor próximo al de la estirpe de referencia, en este caso la estirpe NIH 3T3, es decir 57 y 65 respectivamente.

2) *Correlación entre la tumorigenicidad de estirpes celulares prelinfocticas de múrido no adherentes y los valores medidos de STAFI y K_{obs}*

La figura 2 representa la determinación del valor de delta mA máx (STAFI, correspondiente a la cantidad de actina polimerizada en estado estacionario) en diferentes estirpes celulares no adherentes no tumorigénicas (BAF3 originales, BAF3 Bcr-Abl⁻) y tumorigénicas (BAF3 Bcr-Abl⁺). La tabla 3 se refiere a la cinética de polimerización de actina en presencia de extractos celulares mediante polarización esttica de fluorescencia.

TABLA 3

Estirpes celulares	Delta mA máx	K_{obs}
BAF3 originales	58	0,12
BAF3 Bcr-Abl ⁺	40	0,05
Bcr-Abl ⁻	52	0,101

ES 2 291 744 T3

Se compara la cantidad de actina polimerizada en estado estacionario ("STAFI": valor de anisotropía de fluorescencia de meseta, es decir, el valor de delta mA máximo) de la estirpe tumorigénica BAF3 Bcr-Abl⁺ transformada por el oncogén de fusión Bcr-Abl, con la de la estirpe original no tumorigénica (BAF3) (figura 2) (Dugray, Geay *et al.*, 2001). Para la estirpe tumorigénica (BAF3 Bcr-Abl⁺), el delta mA máx es netamente inferior al delta mA máx de la estirpe no tumorigénica (BAF3), es decir 40 y 58 respectivamente.

Se hace la misma observación para la velocidad de polimerización de actina, representada por la constante K_{obs} . Para la estirpe tumorigénica (BAF3 Bcr-Abl⁺), la K_{obs} es netamente inferior a la K_{obs} de la estirpe no tumorigénica (BAF3), es decir 0,05 y 0,12 respectivamente.

La represión de la expresión del oncogén de fusión por la doxíciclina en la estirpe BAF3 Bcr-Abl conduce a la pérdida de la tumorigenicidad de esta estirpe (Dugray, Geay *et al.* 2001). La represión de la expresión del oncogén restablece el delta mA máx de esta estirpe tumorigénica a un valor próximo al de la estirpe no tumorigénica de referencia, es decir 52 y 58 respectivamente.

3) *Correlación entre la sensibilidad a un tratamiento anticanceroso de estirpes de carcinoma de mama humano y los valores medidos de STAFI y K_{obs}*

La figura 3 representa la determinación del valor de delta mA máx (STAFI, correspondiente a la cantidad de actina polimerizada en estado estacionario) en dos estirpes celulares de melanomas originales, que tienen un potencial más o menos metastásico (BF16F0 < BF16F10). La tabla 4 siguiente se refiere a la cinética de polimerización de la actina en presencia de extractos celulares mediante polarización estática de fluorescencia.

TABLA 4

Estirpes celulares	Delta mA máx	K_{obs}
B16F0	47	0,071
B16F10	37	0,028

Se compara la cantidad de actina polimerizada en estado estacionario ("STAFI": valor de anisotropía de fluorescencia de meseta, es decir, el valor de delta mA máximo) de la estirpe MCF7-Dox, resistente a doxorubicina, con la de la estirpe original sensible (MCF7) (figura 3). Para la estirpe resistente (MCF7-Dox), el delta mA máx es netamente inferior al delta mA máx de la estirpe sensible (MCF7), es decir 52 mA y 71 mA respectivamente.

Además, se compara igualmente el valor de delta mA máx de la estirpe resistente MCF7-MDR, transfectada por el gen que codifica la P-gp, con el valor de la estirpe sensible (MCF7). Para la estirpe resistente (MCF7-MDR), el delta mA máx es igualmente netamente inferior al delta mA máx de la estirpe sensible (MCF7), es decir 35 y 71 respectivamente.

4) *Correlación entre el potencial metastásico de las estirpes celulares de melanoma de murido (BF16F0 y B16F10) y los valores medidos de STAFI y K_{obs}*

La figura 4 representa la determinación del valor de delta mA máx (STAFI, correspondiente a la cantidad de actina polimerizada en estado estacionario) en diferentes estirpes celulares adherentes sensibles (MCF7) y resistentes (MCF7 Dox y MCF7 MDR) a un tratamiento anticanceroso. La tabla 5 siguiente se refiere a la cinética de polimerización de la actina en presencia de extractos celulares mediante polarización estática de fluorescencia.

TABLA 5

Estirpes celulares	Delta mA máx	K_{obs}
MCF7	71	0,0034
MCF7-doxorubicina	52	0,0034
MCF7 MDR	35	0,071

Se compara la cantidad de actina polimerizada en estado estacionario ("STAFI": valor de anisotropía de fluorescencia de meseta, es decir, el valor de delta mA máximo) de la estirpe B16F10, seleccionada por su potencial metastásico a partir de la estirpe B16F0 (Nakamura, Yoshikawa *et al.* 2002), con la de la estirpe original menos metastásica (B16F0)

(figura 4). Para la estirpe más agresiva (B16F10), el delta mA máx es netamente inferior al delta A máx de la estirpe no tumorigénica (B16F0), es decir 37 y 47 respectivamente.

Se hace la misma observación para la velocidad de polimerización de la actina, representada por la constante K_{obs} . Para la estirpe más agresiva (B16F10), la K_{obs} es netamente inferior a la K_{obs} de la estirpe menos agresiva (B16F0), es decir 0,028 y 0,071 respectivamente.

5) Identificación de la jasplakinolida como molécula restablecedora del potencial de polimerización de la actina en estado estacionario

La figura 5 representa el restablecimiento del valor de delta mA máx (STAFI, correspondiente a la cantidad de actina polimerizada en estado estacionario) de células tumorigénicas (NIH 3T3 EF, indicadas EF) al nivel del valor de células no tumorigénicas (NIH 3T3) mediante la adición de jasplakinolida (indicada jaspla).

Se ha medido la cantidad de actina polimerizada en estado estacionario ("STAFI": valor de anisotropía de fluorescencia de meseta, es decir, el valor de delta mA máximo) de células tumorigénicas (NIH 3T3 EF, indicadas EF) después de la adición de jasplakinolida 10 μ M en el medio de polimerización. Se restablece el delta mA máx de las células tumorales determinado a un valor inicial de 35 mA mediante la adición de jasplakinolida a un valor próximo al de la estirpe no tumorigénica (NIH 3T3), 66 mA y 65 mA respectivamente.

Se hace la misma observación para la velocidad de polimerización de la actina, representada por la constante. La jasplakinolida restablece la K_{obs} desde un valor igual a 0,04 frente a un valor que está próximo al valor obtenido con las células no tumorigénicas, es decir 0,15 y 0,086 respectivamente.

Referencias bibliográficas

- 1) **Damiano, J.S., L.A. Hazlehurst, et al. (2001).** "Cell adhesion-mediated drug resistance (CAM-DR) protects the K562 chronic myelogenous leukemia cell line from apoptosis induced by BCR/ABL inhibition, cytotoxic drugs, and gamma-irradiation", *Leukemia* 15(8): 1232-1239.
- 2) **dit Faute, M.A, L. Laurent, et al. (2002).** "Distinctive alterations of invasiveness, drug resistance and cell-cell organization in 3D-cultures of MCF-7, a human breast cancer cell line, and its multidrug resistant variant", *Clin. Exp. Metastasis* 19(2): 161-168.
- 3) **Dugray, A., J.F. Geay, et al. (2001).** "Rapid generation of a tetracycline-inducible BCL-ABL defective retrovirus using a single autoregulatory retroviral cassette", *Leukemia* 15: 1658-1662.
- 4) **Fradelizi, J., V. Noireaux, et al. (2001).** "ActA and human zyxin harbour Arp2/3-independent actin-polymerization activity", *Nat. Cell Biol.* 3(8): 699-707.
- 5) **Lopes, E.C., G. Ernst, et al. (2002).** "Dissimilar invasive and metastatic behavior of vincristine and doxorubicin-resistant cell lines derived from a murine T cell lymphoid leukemia", *Clin. Exp. Metastasis* 19(4): 283-290.
- 6) **Machesky, L.M., R.D. Mullins et al. (1999).** "Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(7): 3739-3744.
- 7) **Mitsumoto, M., T. Kamura et al., (1998).** "Emergence of higher levels of invasive and metastatic properties in the drug resistant cancer cell lines after the repeated administration of cisplatin in tumor-bearing mice", *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 124 (11): 607-614.
- 8) **Nakamura, K., N. Yoshikawa, et al., (2002).** "Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model", *Life Sci.* 70(7): 791-798.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de análisis de la agresividad tumoral de células cancerosas que comprende la medida de la cantidad de actina polimerizada en estado estacionario en un lisado de dichas células.
2. Método según la reivindicación 1, **caracterizado** porque se compara la medida realizada sobre el lisado con uno o varios valores de referencia de la cantidad de actina polimerizada en estado estacionario o bien en células de cultivo específicas de un fenotipo, o bien en tejidos que proceden de extracciones biológicas.
- 10 3. Método según una de las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizado** porque la cantidad de actina polimerizada corresponde a la suma de toda la actina en forma F.
- 15 4. Método según una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque la medida de la cantidad de actina polimerizada en estado estacionario se realiza mediante polarización estática de fluorescencia en presencia de monómeros de actina ligados a un fluorocromo, los cuales se incorporan a los filamentos de actina (actina F) formados en el transcurso de la polimerización de la actina endógena del lisado.
- 20 5. Método según la reivindicación 4, **caracterizado** porque se añaden monómeros de actina ligados a un fluorocromo al lisado celular a una relación comprendida entre 1/80 y 1/1.600 con respecto a la cantidad de actina endógena.
6. Método según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, **caracterizado** porque comprende:
 - 25 - la lisis de células cancerosas en condiciones no desnaturalizantes para las proteínas y la eliminación de los desechos celulares,
 - la dosificación de las proteínas totales del lisado,
 - la adición de monómeros de actina ligados a un fluorocromo,
 - 30 - la adición de las sustancias necesarias para la polimerización de la actina endógena y para la protección de las proteínas del lisado,
 - la medida de la cantidad de actina polimerizada en estado estacionario en el lisado.
- 35 7. Método de identificación de moléculas susceptibles de presentar una actividad anticancerosa, **caracterizado** porque comprende la realización de un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en presencia de una cantidad adecuada de dicha molécula, y porque se determina la capacidad de dicha sustancia de restablecer una cantidad de actina polimerizada en estado estacionario correspondiente a la de células no agresivas.
- 40 8. Aplicación del método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 a la evaluación del carácter invasivo de dichas células.
9. Aplicación del método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 a la evaluación de la tumorigenicidad de dichas células.
- 45 10. Aplicación del método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 a la predicción de la sensibilidad de dichas células a un tratamiento anticanceroso.
- 50 11. Aplicación según la reivindicación 10, **caracterizada** porque dicho tratamiento anticanceroso consiste en una radioterapia o una quimioterapia.
12. Un kit para la realización de un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque comprende:
 - 55 - un medio de resuspensión de células para la lisis de las células;
 - las sustancias necesarias para la polimerización de la actina endógena y para la protección de las proteínas del lisado,
 - 60 - una disolución de monómeros de actina ligados a un fluorocromo,
 - un tampón de polimerización de actina,
 - 65 - un tampón general de actina,
 - eventualmente extractos de referencia de células agresivas y no agresivas.

Figura 1

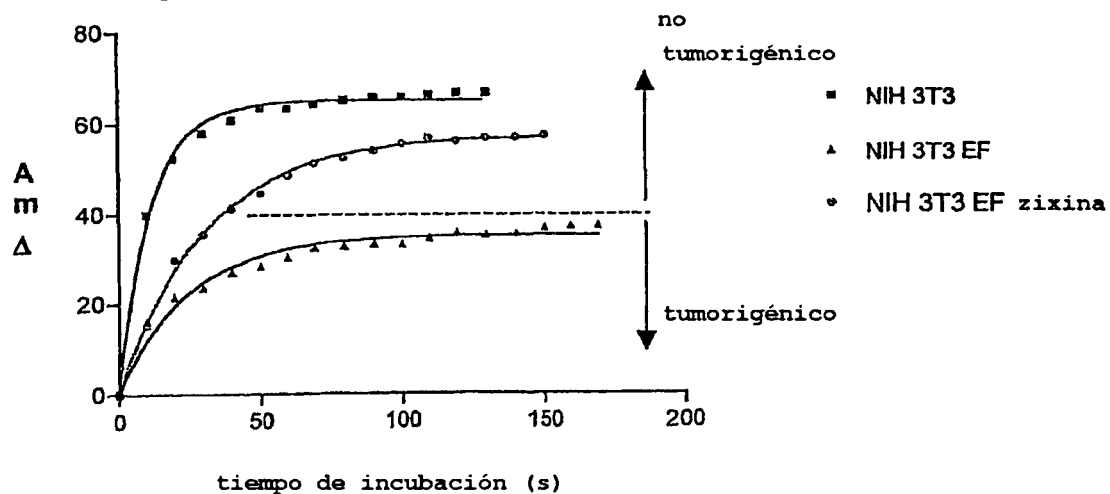


Figura 2

