

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 006 332**

51 Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2018** **E 22152294 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2024** **EP 4057007**

54 Título: **Método para el diagnóstico del cáncer de mama**

30 Prioridad:

20.02.2017 EP 17157020

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.03.2025

73 Titular/es:

PANKA BLOOD TEST GMBH (100.00%)
Forstweg 10
82031 Grünwald, DE

72 Inventor/es:

PANTEL, KLAUS y
BARTKOWIAK, KAI

74 Agente/Representante:

CURELL SUÑOL, S.L.P.

ES 3 006 332 T3

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 para el diagnóstico del cáncer de mama

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a métodos que detectan el cáncer de mama determinando la concentración de Cyr61 soluble en muestras de plasma obtenidas a partir de un sujeto que se sospecha que presenta un cáncer de mama.

10

Antecedentes técnicos

La cascada metastásica en el cáncer, tal como en el cáncer de mama, comprende la liberación de células de tumor de mama primario a la sangre (células tumorales circulantes, o CTC), seguido del establecimiento de dichas células tumorales en órganos secundarios (células tumorales diseminadas, o DTC) y su posterior expansión metastásica (1). En el cáncer de mama, las DTC frecuentemente se infiltran en la médula ósea (MO), sobreviven a la quimioterapia y son predictivas de un mal resultado clínico de los pacientes (2, 3).

15

Sin embargo, numerosos pacientes presentan una recaída a pesar de los resultados negativos en MO en el diagnóstico primario en el cáncer de mama, pulmón y próstata. Recientemente, se han observado resultados similares para las CTC en el cáncer de mama. Dichos resultados podrían apuntar a limitaciones técnicas en los ensayos actuales para la detección de CTC y DTC, que utilizan anticuerpos contra marcadores de diferenciación epitelial tales como las citoqueratinas.

20

La plasticidad de las células tumorales puede conducir a la pérdida de características epiteliales y la adquisición de propiedades mesenquimatosas a través de fenotipos intermedios (EMT). Por lo tanto, debido a la expresión reducida de características epiteliales, las CTC y DTC con atributos mesenquimatosos (mCTC y mDTC) no resultan detectados por el grupo de marcadores de diferenciación epitelial utilizado actualmente. Experimentos recientes han confirmado la presencia de dichos mCTC en pacientes de cáncer de mama (4).

25

30

La biología de las mCTC y mDTC y su contribución a la metástasis no se entienden por completo. Un factor que estimula la adquisición de atributos mesenquimatosos y la diseminación de las células tumorales es la hipoxia. La hipoxia no está restringida al tumor primario, sino que asimismo puede producirse en la médula ósea humana, en la que se han detectado valores de tan solo 1% de O₂ (hipoxia) en las zonas de nichos de células madre hematopoyéticas. En un modelo de ratón de cáncer de próstata, se ha observado que las DTC ocupan dichos nichos, lo que apoya la idea de que las DTC de médula ósea pueden estar sometidas a hipoxia. Los presentes inventores anteriormente han detectado mDTC tolerantes a estrés microambiental en la médula ósea. Debido a que las DTC expresan marcadores de diferenciación epitelial a nivel bajo, aunque son fuertemente positivas para proteínas de respuesta a hipoxia que programan una respuesta a proteínas desplegadas (UPR).

35

40

Aunque las CTC y DTC, de esta manera, presentan algunas características en común con el cáncer del que se originan, se pierden características epiteliales del cáncer original y simultáneamente, se adquieren propiedades mesenquimatosas durante el curso de la transformación de las CTC y DTC (5). Las células madre de cáncer, que son las células precursoras de las células tumorales con diferenciación epitelial (carcinomas), asimismo pueden carecer de características epiteliales y mostrar atributos mesenquimatosos. Por lo tanto, las CTC/DTC pueden presentar propiedades similares a las de las células madre de cáncer. Lo anterior se aplica en particular a la expresión de marcadores de cáncer, es decir, secuencias expresadas diferencialmente por las células de cáncer.

45

La CYR61 es una proteína de señalización que es un miembro de la familia de CCN. La proteína puede ser secretada o estar asociada a la matriz extracelular (MEC). Es conocido que CYR61 contribuye a la regulación de diferentes actividades celulares mediante la interacción con receptores integrina de superficie celular. Se han asociado diferentes actividades de Cyr61 a cáncer. Por ejemplo, (6) da a conocer métodos de prevención o inhibición de la proliferación de las células de cáncer de mama utilizando composiciones que interfieren o bloquean la unión de esteroides sexuales o factores de crecimiento, y que inducen, el gen Cyr61. La publicación menciona además métodos que criban ligandos reguladores de la expresión de la proteína Cyr61. Sin embargo, (6) no muestran que los niveles aumentados de proteína Cyr61 soluble puedan ser detectados en el plasma de pacientes que se diagnostican con cáncer de mama o que los niveles de Cyr61 puedan ser determinados mediante transferencia western. De manera similar, (7) da a conocer la detección de proteína Cyr61 en muestras urinarias como un cribado rápido y fácil para el diagnóstico y el pronóstico del cáncer en un paciente.

50

55

60

Aunque se ha observado la expresión de Cyr61 sobre las células de cáncer y se ha realizado una revisión del papel de la proteína sobre el crecimiento, migración y metástasis celulares de las células de cáncer en numerosas publicaciones científicas, incluyendo (8), (9) y (10), ninguno de los documentos de la técnica anterior ha analizado y comparado la expresión de Cyr61 sobre las CTC y DTC con la expresión en células no cancerosas en muestras líquidas. De esta manera, no está nada claro si dicha proteína podía utilizarse como marcador en muestras líquidas.

65

Debido a que las mCTC y mDTC resultan difíciles de detectar con las proteínas marcadoras disponibles, existe una necesidad crucial de marcadores adicionales y nuevos que mejoren la detección y caracterización de las CTC y DTC en el cuerpo humano.

5 Sumario de la invención

La presente invención proporciona métodos de detección del cáncer de mama que comprenden:

- 10 (a) obtener una muestra de plasma a partir de un sujeto;
(b) determinar la concentración de Cyr61 en la muestra;
(c) comparar la concentración de Cyr61 en la muestra de prueba con la concentración de Cyr61 en una muestra de referencia;

en los que Cyr61 es Cyr61 soluble;

- 15 en los que el cáncer de mama es detectado si la concentración de Cyr61 en la muestra de prueba es superior que en la muestra de referencia;

en los que la determinación de la concentración de Cyr61 comprende la detección mediante ELISA, y

en los que el ELISA es un ELISA de tipo sándwich que utiliza dos anticuerpos anti-Cyr61 humana que se unen a unos epítomos de Cyr61 distintos.

- 20 Los presentes inventores han descubierto de manera sorprendente que Cyr61 representa un marcador muy ventajoso para el cáncer de mama y las células de cáncer de mama y sus fragmentos en sangre, plasma, suero y/o aspirado de médula ósea, ya que el marcador se expresa en las células cancerosas pero no en otras células presentes en estas muestras de líquido.

- 25 En una forma de realización particularmente preferida la presente invención proporciona unos métodos de detección de cáncer de mama que comprenden:

(a) obtener una muestra de sangre de un sujeto humano y separar las células del plasma;

- 30 (b) determinar la concentración de Cyr61 en el plasma mediante un ELISA de tipo sándwich, en el que el ELISA utiliza dos anticuerpos anti-Cyr61 humana diferentes que se unen a unos epítomos de Cyr61 distintos que están separados mediante por lo menos 50 aminoácidos;

- 35 (c) comparar la concentración de Cyr61 soluble en la muestra de prueba con la concentración de Cyr61 en una muestra de referencia, en el que la muestra de referencia es una muestra de plasma de mujeres sanas por encima de cincuenta años de edad.

En estos métodos el cáncer de mama o las células de cáncer de mama se detectan si la concentración de Cyr61 en la muestra de prueba es superior que en la muestra de referencia.

- 40 En una forma de realización adicional, la presente invención proporciona unos métodos como se describen anteriormente, en los que los epítomos de Cyr61 distintos unidos por los anticuerpos anti-Cyr61 humana diferentes están separados mediante por lo menos 50 aminoácidos, o separados mediante por lo menos 75, 85 o 100 aminoácidos.

- 45 En una forma de realización adicional, la presente invención proporciona unos métodos como se describen anteriormente, en los que la muestra de referencia es una muestra de plasma de mujeres sanas por encima de cincuenta años de edad.

50 Divulgación detallada de la invención

La presente invención proporciona unos métodos de detección de cáncer de mama que comprenden:

(a) obtener una muestra de plasma a partir de un sujeto; y

- 55 (b) determinar la presencia de Cyr61 soluble y/o asociada a la superficie celular en la muestra de plasma;

en los que la muestra de plasma se selecciona de entre sangre y en los que la determinación de la presencia de Cyr61 comprende la detección mediante ELISA.

- 60 La muestra de plasma se obtiene de un sujeto, que es preferentemente un ser humano, aunque asimismo puede ser un animal.

- 65 En el contexto de la presente solicitud, los términos cáncer y tumor se utilizan intercambiamente. Una célula de cáncer es una única célula tumoral o parte de un agregado mayor de células tumorales, es decir, un agregado de células en el contexto de las CTC o micrometástasis en el contexto de las DTC. Las células de cáncer son de naturaleza heterogénea y resulta difícil proporcionar una definición que comprenda todas las células de cáncer. En el contexto de la presente invención, una célula de cáncer es una célula que expresan citoqueratinas epiteliales y

no expresa el marcador leucocítico CD45.

El método se lleva a cabo más frecuentemente utilizando una muestra de plasma obtenida de un sujeto que se sospecha que presenta cáncer de mama o un sujeto en el que previamente se ha diagnosticado cáncer de mama. De acuerdo con lo anterior, los métodos de la presente invención se llevan a cabo preferentemente utilizando una muestra de plasma de un sujeto en el que previamente se ha diagnosticado cáncer de mama, utilizando un método que difiere de los métodos de la presente invención. Tal como se explicará con mayor detalle posteriormente, en la presente forma de realización los métodos de la presente invención proporcionarán un diagnóstico diferencial del cáncer de mama.

Los métodos para obtener una muestra de mama de un sujeto, son bien conocidos en la técnica y puede utilizarse cualquiera de dichos métodos en la realización de los métodos de la presente invención. Los métodos de obtención de una muestra de plasma a partir de una muestra de sangre completa son bien conocidos en la técnica. Los métodos de la presente invención son métodos *in vitro* para detectar cáncer de mama.

Los métodos divulgados en la presente memoria pero no reivindicados pueden utilizarse para la detección de Cyr61 soluble y/o asociada a superficie celular. El término "Cyr61 soluble" se utiliza en la presente solicitud para referirse a la proteína y fragmentos identificables de la misma como presentes en la muestra de plasma.

La expresión "Cyr61 asociada a la superficie celular" se utiliza en la presente solicitud para referirse a la proteína o un fragmento identificable de la misma en caso de estar presente sobre la superficie de las células, microvesículas y/o exosomas o como una parte integral de las mismas.

En una forma de realización la invención proporciona unos métodos de detección de cáncer de mama que comprenden:

- (a) obtener una muestra de plasma a partir de un sujeto, muestra; y
- (b) determinar la presencia de Cyr61 soluble en la muestra.

De manera similar, la invención proporciona unos métodos de detección de cáncer de mama que comprenden:

- (a) obtener una muestra de plasma a partir de un sujeto; y
- (b) determinar la presencia de Cyr61 soluble en la muestra.

En un aspecto la presente invención proporciona unos métodos, métodos de detección de cáncer de mama, en los que la muestra es una muestra de sangre, el plasma es aislado y se detecta Cyr61 en el plasma. La detección puede comprender un análisis inmunocitoquímico. En la forma de realización preferida la detección comprende detectar Cyr61 en plasma con un ELISA.

Los métodos de la presente divulgación son asimismo particularmente ventajosos para la detección de las CTC y/o las DTC. Las CTC son células tumorales que expresan citoqueratinas epiteliales y que no expresan el marcador leucocítico CD45, que han sido liberadas desde un origen canceroso y, de esta manera, se encuentran presentes en líquidos corporales. Los presentes inventores inesperadamente han encontrado que las CTC pueden detectarse y caracterizarse mediante la expresión de Cyr61. Los métodos de detección pueden comprender poner en contacto células, microvesículas y/o exosomas o el homogeneizado de los mismos con por lo menos un anticuerpo adicional seleccionado de entre un anticuerpo anticitoqueratina y un anticuerpo anti-CD45.

Las DTC son células tumorales o células que expresan citoqueratinas epiteliales y que no expresan el marcador leucocítico CD45 y que se encuentran presentes fuera de un origen canceroso en el cuerpo y que se encuentran presentes en sitios secundarios, tales como médula ósea, hígado, pulmones o cerebro. Los sitios secundarios pueden ser cualquier sitio en el cuerpo humano que no sea el sitio de origen canceroso o sitios que han sido definido como fuentes de CTC. De esta manera, las DTC son células de cáncer que expresan Cyr61 que se obtienen de un sitio en el cuerpo humano que no es el sitio de origen canceroso.

En una forma de realización particularmente preferida, el método de detección de células de cáncer de la presente invención utiliza un ELISA de tipo sándwich que utiliza dos anticuerpos anti-Cyr61 humana diferentes de unión a diferentes epítopos de Cyr61. En dicha forma de realización, la muestra es preferentemente sangre, se aísla el plasma y se detecta Cyr61 en el plasma utilizando un ELISA de tipo sándwich que utiliza dos anticuerpos anti-Cyr61 humana diferentes de unión a diferentes epítopos de Cyr61. En un aspecto, los diferentes epítopos de Cyr61 a los que se unen los diferentes anticuerpos anti-Cyr61 humana se encuentran separados mediante por lo menos 50 aminoácidos o por lo menos 75, 85 o 100 aminoácidos. Lo anterior significa que cada uno de los epítopos de Cyr61 a los que se unen los anticuerpos anti-Cyr61 humana se encuentran separados de los otros epítopos de mediante por lo menos 75 aminoácidos.

En una forma de realización preferida adicional el método de detección de cáncer de mama en un sujeto según la presente invención comprende la determinación de la concentración de Cyr61 en la muestra de prueba. En un

aspecto este método comprende además una etapa de comparar la concentración de Cyr61 en la muestra de prueba con la concentración de Cyr61 en una muestra de referencia.

5 Los presentes inventores han mostrado que los métodos respectivos son particularmente ventajosos si el método de detección de cáncer de mama en un sujeto utiliza una muestra de referencia seleccionada de una muestra de plasma de mujeres sanas de más de cincuenta años de edad.

10 La concentración de Cyr61 en la muestra de referencia puede obtenerse determinando la concentración de Cyr61 en una muestra de referencia única, por ejemplo en una muestra única de una mujer sana de más de cincuenta años de edad. Alternativamente, la concentración de Cyr61 en la muestra de referencia puede determinarse como el valor de la media o medio de la concentración de Cyr61 en varias muestras de referencia, por ejemplo como el valor medio de la concentración de Cyr61 en varias muestras de referencia de mujeres sanas de más de cincuenta años de edad.

15 En general los métodos de detección de cáncer de mama como se describe anteriormente detectan el cáncer de mama si la concentración de Cyr61 es superior que en la muestra de referencia.

20 La etapa de detección de un estado patológico puede comprender una etapa, en la que las células, microvesículas y/o exosomas presentes en la muestra líquida son homogeneizados, y Cyr61 se detecta en el homogeneizado. Las células en una muestra son homogeneizadas rompiendo las membranas celulares y liberando los orgánulos celulares y el citoplasma. Son conocidos en la materia numerosos métodos para la homogeneización de células y pueden utilizarse en el contexto de la presente invención para detectar la Cyr61 ubicada en las células. En un enfoque alternativo, la Cyr61 asociada a la superficie celular se detecta y este enfoque no requiere obviamente la homogeneización celular. En ambos métodos, las células, las microvesículas y/o los exosomas pueden separarse de la muestra líquida antes de determinar la presencia de Cyr61. Esto puede realizarse por ejemplo mediante centrifugación. El proceso de separación puede incluir asimismo métodos de concentración de las células o los fragmentos de células o con relación a la muestra líquida tal cual o con relación a otras células que no expresan Cyr61.

30 La detección de la presencia de Cyr61 puede comprender la detección de la presencia o la determinación de la concentración de Cyr61. Son conocidos en la materia numerosos métodos diferentes para detectar la presencia o determinar la concentración de Cyr61 y puede ser utilizado cualquier enfoque analítico que resulte adecuado para detectar Cyr61 en una muestra de plasma en ácido nucleico (*cyr61*) o nivel de proteína.

35 En los métodos divulgados pero no reivindicados se determina la concentración de Cyr61 utilizando un anticuerpo o unos derivados de anticuerpo para detectar los niveles de Cyr61. Por lo tanto, los métodos de detección de las células cancerosas pueden ser caracterizados por una etapa, en los que la detección comprende poner en contacto las células, las microvesículas y/o los exosomas o el homogeneizado de los mismos con un anticuerpo anti-Cyr61. Los anticuerpos anti-Cyr61 son conocidos en la materia y pueden ser utilizados para los objetivos divulgados en la presente memoria. Por ejemplo, los métodos pueden comprender métodos de análisis inmunocitoquímico basados en anticuerpo bien conocidos en la materia.

45 En un aspecto particular, los métodos de detección de cáncer o células cancerosas como son divulgados en la presente memoria pero no reivindicados comprenden además una etapa, en los que las células, las microvesículas y/o los exosomas o el homogeneizado de los mismos se ponen en contacto con un anticuerpo anti-Cyr61 y con por lo menos un anticuerpo adicional seleccionado de entre un anticuerpo anticitoqueratina y un anticuerpo anti-CD45. Son conocidos en la materia numerosos anticuerpos anticitoqueratina y anti-CD45 y pueden utilizarse para los objetivos divulgados en la presente memoria. Como se indica anteriormente, las CTC son células tumorales que expresan citoqueratinas epiteliales pero no expresan el marcador de leucocitos CD45. El método que utiliza varios anticuerpos proporciona así una caracterización más completa de los tipos celulares analizados como parte del proceso de detección.

En un aspecto el método anterior de detección de cáncer o de células cancerosas comprende:

- 55 (a) poner en contacto las células, las microvesículas y/o los exosomas o el homogeneizado de los mismos con por lo menos un primer conjunto de anticuerpos que comprende un anticuerpo anti-Cyr61 y un anticuerpo anticitoqueratina y/o un anticuerpo anti-CD45;
- (b) poner en contacto la muestra con un segundo conjunto de anticuerpos con especificidad para cada uno de los anticuerpos del primer conjunto de anticuerpos;
- 60 (c) detectar una señal emitida por la unión del segundo anticuerpo.

En un aspecto relacionado el método de detección de cáncer o células cancerosas comprende:

- 65 (a) poner en contacto las células, las microvesículas y/o los exosomas o el homogeneizado de los mismos con por lo menos un primer conjunto de anticuerpos que comprende un anticuerpo anti-Cyr61 y un anticuerpo anticitoqueratina y/o un anticuerpo anti-CD45;

- (b) retirar el anticuerpo no unido mediante lavado;
- (c) poner en contacto la muestra con un segundo conjunto de anticuerpos con especificidad para cada uno de los anticuerpos del primer conjunto de anticuerpos;
- (d) retirar el anticuerpo no unido mediante lavado; y
- 5 (e) detectar una señal emitida por la unión del segundo anticuerpo.

La señal emitida por la unión del segundo anticuerpo puede ser una señal fluorescente y puede ser detectada mediante unos dispositivos de detección automatizados.

10 El anticuerpo puede unirse a la proteína entera o una parte o fragmento de Cyr61. Pueden utilizarse asimismo unos métodos adicionales de detección e incluyen FACS, transferencia western, ensayos enzimáticos, PCR, tecnologías de hibridación y matriz. Se incluyen además los métodos basados en análisis o detección biofísicos o bioquímicos, que incluyen análisis microscópico, tales como análisis de intervalo de longitud de onda completo, métodos cromatográficos o electroforéticos, técnicas de marcado/derivatización, por ejemplo utilizando isótopos
15 compuestos químicos, cromatografía de gases, microscopía de fuerza atómica, espectrometría de masas, por ejemplo acoplada o no con cromatografía y otros métodos espectrométricos, espectroscopia por resonancia magnética nuclear y otros métodos espectrométricos. Además, las partes diferentes de estos métodos se han combinado en la técnica anterior, incluyendo la captura de Cyr61 mediante inmunoprecipitación, seguido por análisis espectrométrico de masas o cromatografía acoplada con una espectrometría de masas. Hasta el momento,
20 como la detección de la presencia o concentración de Cyr61 está basada en la detección de un ácido nucleico, se prefiere la detección de ARN, particularmente ARNm.

Los métodos de detección de células cancerosas divulgados en la presente memoria pero no reivindicados pueden comprender una comparación del valor obtenido con un estándar interno o externo. Dependiendo de los oligonucleótidos de formato de ensayo (ADN o ARN), las proteínas o los péptidos que presenten la secuencia de Cyr61 pueden utilizarse en una concentración conocida como el estándar.

Los métodos de detección de un estado patológico como son divulgados en la presente memoria pero no reivindicados pueden asimismo comprender una etapa, en la que la concentración de Cyr61 en la muestra se compara con la concentración de Cyr61 en una muestra de referencia. La concentración de Cyr61 en una muestra de referencia puede detectarse, pero no necesariamente, en el mismo ensayo que la concentración de la Cyr61 en la muestra que debe someterse a prueba. De hecho, la concentración de Cyr61 en la muestra de referencia puede haber sido obtenida como un estándar mucho antes de determinar la concentración en la muestra que debe someterse a prueba y la comparación de la concentración en la muestra que debe someterse a prueba y la concentración en la muestra de referencia puede realizarse automáticamente mediante un dispositivo que analiza la concentración de Cyr61 en la muestra que debe someterse a prueba.

Los métodos de detección de células cancerosas como son divulgados en la presente memoria pero no reivindicados son particularmente adecuados para el diagnóstico del cáncer. Por lo tanto, el método proporcionado para el diagnóstico del cáncer comprende un método de detección de células cancerosas como se describe anteriormente.

Cualquier forma diagnóstica de cáncer puede utilizarse en los métodos descritos anteriormente. Sin embargo, preferentemente los métodos son utilizados para el diagnóstico diferencial del cáncer, tal como para la identificación de células tumorales circulantes y/o células tumorales de diseminación.

Los métodos para el diagnóstico o el diagnóstico diferencial del cáncer como son divulgados en la presente memoria pero no reivindicados pueden comprender la detección de marcadores de cáncer adicionales, por ejemplo incluyendo la detección de HIF-1 y/o PD-L1. La presente solicitud por primera vez muestra que, en determinados tipos de cáncer, la expresión de Cyr61 en células de cáncer presente en muestras líquidas está estrechamente relacionada con la expresión de HIF-1 y/o PD-L1. Se conocen de la técnica numerosas alternativas diferentes para detectar la expresión de HIF-1 y/o PD-L1 y pueden utilizarse en los métodos divulgados en la presente memoria para la detección de HIF-1 y/o PD-L1. La detección de Cyr61, de HIF-1 y/o de PD-L1 puede llevarse a cabo en un único ensayo o en ensayos completamente no relacionados.

En determinados aspectos el diagnóstico de cáncer tal como se proporciona en la presente memoria representa el diagnóstico de una célula de cáncer de mama que es una célula de cáncer epitelial o un tipo de célula de cáncer mesenquimatoso.

Los métodos para el diagnóstico del cáncer resultan particularmente adecuados para el diagnóstico diferencial del potencial metastásico de una célula de cáncer de mama, una célula de cáncer de próstata, una célula de cáncer de pulmón, etc.

De esta manera, la presente divulgación puede utilizarse para identificar el régimen de tratamiento para un paciente en el que se ha diagnosticado cáncer, incluyendo pacientes en los que se ha diagnosticado cáncer y de los que se extraído el tumor primario mediante procedimientos quirúrgicos.

En unos aspectos alternativos, los métodos de detección de células de cáncer como son divulgados en la presente memoria pero no reivindicados se orientan al diagnóstico de estado inflamatorio de cáncer temprano. Es bien conocido que determinados estados inflamatorios inducen estados microambientales adversos, como la hipoxia, que permiten la detección de células malignas tempranas, por ejemplo en afecciones tales como la pancreatitis o la colitis ulcerosa.

En un aspecto relacionado adicional, los métodos proporcionados para el cribado de un fármaco anticanceroso comprenden:

- (a) administrar el fármaco a un sujeto;
- (b) obtener una muestra líquida del sujeto, en los que la muestra líquida comprende células;
- (c) determinar la presencia y/o concentración de Cyr61 en una muestra líquida del sujeto;
- (d) identificar el fármaco como anticanceroso, si la concentración de Cyr61 en la muestra es inferior a la concentración de Cyr61 en una muestra de referencia.

Breve descripción de las figuras

Figura 1:

A: comparación del grado de diferenciación epitelial de las estirpes de células tumorales diseminadas BC-M1 (cáncer mama) y LC-M1 (cáncer pulmonar) con las estirpes celulares de cáncer de mama mediante análisis de transferencia western. Las células se cultivaron bajo condiciones estándares.

B: cuantificación e identificación del inductor angiogénico rico en cisteína 61 (Cyr61) mediante análisis de CL-EM/EM y SILAC. Imagen superior: intervalo de masas relevante del espectro EM₁. Imagen inferior: espectro de CL-IEP-QTOF-CID de modo de iones positivos de m/z 1180.55

C: análisis de la expresión de Cyr61 en células de cáncer mediante transferencia western. Se muestra lamina-A/C como un ejemplo de una proteína no expresada diferencialmente entre MDA-MB-468 (MDA-468) y BC-M1.

D: análisis cuantitativo de la expresión de Cyr61. Se normalizaron las señales respecto al control de carga alfa-tubulina. Los valores medios de tres experimentos independientes se proporcionan como números y desviación estándar tal como se indica mediante barras de error estándar. E: análisis de transferencia western en estirpes celulares de cáncer de próstata para Cyr61. PC-E1 y PC-M1 son estirpes celulares de DTC de cáncer de próstata.

Figura 2:

Tabla 1: identificación de la expresión diferencial de inductor angiogénico rico en cisteína 61 (Cyr61) mediante SILAC y CL-EM/EM. Se comparó el perfil de expresión de proteínas de MDA-MB-468 y BC-M1 en 4 réplicas biológicas. Se muestra el valor de expresión de lámina-A/C como referencia para una proteína no expresada diferencialmente.

^a Un valor positivo de la proporción de señales media significa expresión de proteína incrementada en BC-M1 y un valor negativo significa expresión de proteína incrementada en MDA-468.

^b Se llevó a cabo la cuantificación manualmente. ^cPrueba t de Student, con $p < 0.05$ se consideró significativo.

Figura 3:

A: señales de inductor angiogénico rico en cisteína 61 (Cyr61) mediante análisis inmunohistoquímico en muestras de una micromatriz de tejidos tumorales (MTT) de mama primarios. El centro de la imagen muestra una sección de la MTT y las secciones ampliadas a la izquierda y a la derecha muestran patrones de tinción representativos. El número analizado de casos fue de 147.

B: detección inmunohistoquímica de Cyr61 en metástasis de médula ósea de pacientes de cáncer de mama. Los núcleos se tiñeron con Hemalum. Barras de escala: A: 100 μm ; B: 67 μm .

Figura 4:

Tabla 2: asociación de la expresión de Cyr61 y propiedades clínico-patológicas en una micromatriz de tejidos de cáncer de mama y en muestras de cáncer pulmonar primario humano.

^aPrueba chi-cuadrado de Pearson o prueba exacta de Fisher.

^bEn total, se obtuvieron resultados de tinción para Cyr61 para 147 tumores de mama primarios. Debido a que no se disponía de todos los datos clínico-patológicos para la totalidad de dichos casos, el número de casos puede ser inferior a 147 para algún parámetro individual.

5 Figura 5:

análisis de los niveles de inductor angiogénico rico en cisteína 61 (Cyr61) en un sistema modelo de diseminación de células tumorales a la médula ósea; análisis de transferencia western.

10 A: condiciones iniciales tras el cultivo de las estirpes celulares bajo condiciones estándares de cultivo celular.

B: simulación del establecimiento de DTC en un microambiente hipóxico (1% de O₂) tal como el presente en la médula ósea. Para MCF-7, el control positivo (+) era MDA-MB-231 (MDA-231).

15 C: análisis cuantitativo de transferencia western para Cyr61 para las condiciones especificadas en la figura 2B.

D: efecto de la estabilización del factor 1-alfa inducible por hipoxia (HIF-1 α) sobre Cyr61.

20 E: niveles de Cyr61 en las subestirpes metastásicas óseas (MDA-231 SA y MDA-231 B02) y la subestirpe metastásica cerebral (MDA-231 BR) de MDA-231.

F: impacto del ayuno de glucosa sobre los niveles de Cyr61. Grp78 (proteína regulada por glucosa de 78 kDa) sirvió de control positivo. Debido a que una gran cantidad de células MDA-231 se desprendió del matraz de cultivo celular tras 50 h de retirada de la glucosa, se analizaron dichas células por separado.

25 G: inducción de Cyr61 y vimentina bajo condiciones excepcionalmente adversas (hipoxia y ayuno de glucosa).

Las barras verticales de error muestran la desviación estándar. S: condiciones de cultivo estándares.

30 Figura 6:

análisis de transferencia western para el inductor angiogénico rico en cisteína 61 (Cyr61) y PD-L1 (ligando 1 de muerte celular programada 1) en entidades de cáncer que se diseminan predominantemente mediante la sangre o los vasos linfáticos (A) o con una proporción destacable de diseminación peritoneal (B). Las estirpes celulares se cultivaron bajo condiciones estándares y la alfa-tubulina sirvió de control de carga. Se analizó BC-M1 y MDA-MB-468 (MDA-468) para la comparación con otros experimentos.

35 A: entidades de cáncer analizadas: cáncer de próstata (LNCAP, Du145, PC-3), cáncer de mama (BT20, BT474, ZR-75-1), cabeza de cabeza y cuello (Cal27, SCC 25).

40 B: entidad de cáncer analizada: cáncer pancreático (Panc1, Panc2, BxPC3, 5061).

Figura 7:

45 respuesta del inductor angiogénico rico en cisteína 61 (Cyr61) a ErbB-2 bajo condiciones estándares de cultivo celular (S) y condiciones hipóxicas (1% de O₂). Se transfectó MDA-MB-468 (MDA-468) con un vector de expresión de ErbB-2 (MDA-468 ErbB-2). MDA-468 PM expresa una proteína ErbB-2 en la que la tirosina en la posición 1248 se sustituyó por fenilalanina. Se transfectó un control de MDA-468 con un vector de expresión sin inserto.

50 A: análisis de transferencia western para las proteínas y condiciones indicadas.

B: análisis cuantitativo de Cyr61 y niveles de vimentina bajo hipoxia.

55 C: imágenes de microscopía de células MDA-468 que se tiñeron para vimentina y núcleos (DAPI) tras el cultivo bajo condiciones estándares de cultivo celular (S) y 90 h de 1% de O₂. Se muestran imágenes compuestas de las señales de vimentina y de DAPI. Las células positivas para vimentina se han señalado con flechas.

60 D: proporción de células positivas para vimentina en las estirpes celulares MDA-468, en porcentaje.

E: análisis de transferencia western para la estirpe celular de cáncer de mama BT20 y tres estirpes celulares de carcinoma de células escamosas.

65 F: inducción de Cyr61 tras la estimulación celular con el factor de crecimiento epidérmico EGF. La estimulación se llevó a cabo bajo condiciones estándares.

Figura 8:

detección de la secreción de inductor angiogénico rico en cisteína 61 (Cyr61) en MDA-MB-231 (A) y BC-M1 (B). Las células se trataron con brefeldina A para bloquear la secreción de proteínas. El sobrenadante del medio de cultivo celular contenía la fracción de proteína secretada, mientras que el sedimento contenía las células desprendidas. Las imágenes de transferencia western muestran el análisis de Cyr61 y la proteína regulada por glucosa de 78 kDa (Grp78; control positivo). Se analizó la alfa-tubulina para detectar la potencial contaminación con proteínas citoplasmáticas en el sobrenadante. El gráfico a la derecha muestra una hoja de balance para las cantidades de proteínas de los matraces de cultivo celular. Se muestran los valores medios de tres experimentos independientes y se expresan numéricamente. La desviación estándar se indica mediante barras verticales de error. Debido a que la cantidad total de proteínas para dos de las tres réplicas de las células desprendidas MDA-231 (no tratadas) era inferior a 50 µg, se muestra una transferencia western sin dicha muestra. (C) Análisis de las estirpes celulares indicadas para los miembros de la familia de la integrina mediante transferencia western. El receptor de Cyr61 más prominente de la familia de la integrina es el heterodímero de la integrina αv y la integrina β3, ambos presentes en las estirpes celulares de DTC a niveles elevados. Las células se cultivaron bajo condiciones estándares.

Figura 9:

aislamiento de Cyr61 mediante inmunoprecipitación utilizando anticuerpo de conejo anti-Cyr61 (H78) para el aislamiento de Cyr61 y un anticuerpo monoclonal de ratón para la detección de Cyr61 en la transferencia western. Los lisados de células completas para BC-M1 y MDA-MB-231 sirvieron de controles positivos para la inmunoprecipitación respectiva. La inmunoprecipitación de Cyr61 a partir de BC-M1 se designa como BC-M1 Cyr61 y para MDA-MB-231 se designa como MDA-MB-231 Cyr61. Los ensayos que utilizan IgG en lugar del anticuerpo anti-Cyr61 (H78) sirvieron de controles para la especificidad de la inmunoprecipitación. Como control negativo se analizó el tampón para muestras SDS. Los experimentos se llevaron a cabo en muestras biológicas por triplicado.

Figura 10:

A: análisis de transferencia western del anticuerpo anti-Cyr61 de Santa Cruz (H78) y del anticuerpo de Cell Signaling (CST). Para ambos anticuerpos se aplicaron los mismos lisados celulares. Para el análisis del anticuerpo de CST, se aplicaron 40 µg de proteína a cada carril y se diluyó el anticuerpo primario 1:500. Para el análisis del anticuerpo H78, se aplicaron 20 µg de proteína a cada carril y se diluyó el anticuerpo primario 1:1,000. Se llevaron a cabo análisis cuantitativos mediante análisis densitométrico de las películas de rayos X. Los valores medios se proporcionan numéricamente y las barras de error indican la desviación estándar. B: análisis de transferencia western para la evaluación del anticuerpo anti-Cyr61 (H78) a una dilución de 1:10,000 (izquierda) y de 1:1,000 (derecha). Se aplicó una serie de dilución de Cyr61 recombinante humana y lisados de células completas de las estirpes celulares especificadas. Para la visualización de detección no específica del anticuerpo anti-Cyr61, se aplicaron 40 µg del lisado de células MCF-7. Se analizaron dichas muestras de proteínas con diluciones variables de anticuerpo anti-Cyr61, así como con tiempos de exposición variables de las películas de rayos X. Para MDA-MB-468 (MDA-468), MDA-MB-231 (MDA-231) y BC-M1 se aplicaron 10 µg de lisado celular.

Figura 11:

curvas de calibración para el cálculo de ecuaciones lineales. A. Se determinaron los valores en los análisis cuantitativos de las transferencias western tal como se muestra en la figura 10B. El eje x muestra los valores de las intensidades de señal para Cyr61 recombinante y el eje y muestra la cantidad de proteína Cyr61 recombinante. Cada punto de medición es el valor medio de tres experimentos y la desviación estándar de los valores de x se presenta como barras de error horizontales. El gráfico insertado muestra los parámetros de la ecuación, que se calculó como $y=2.5678 x$, en la que y es la cantidad de proteína de Cyr61 [µg] y x es la intensidad de la señal en las películas de rayos X [unidades arb.]. B, C, D: curvas de calibración que comprenden el eje x con los valores de las intensidades de señal para Cyr61 recombinante y el eje y con la cantidad de proteína Cyr61 recombinante aplicada. Cada punto de medición es el valor medio de tres experimentos de ELISA y la desviación estándar de los valores de x se presentan como barras de error horizontales. Los gráficos insertados muestran los parámetros de la ecuación, que consiste en y como cantidad de proteína de Cyr61 [µg], x es la intensidad de señal (DO405 nm) en el lector de ELISA y el valor fijo como la ordenada en el origen. B: curva de calibración para los análisis de MCF-7. C: curva de calibración para los análisis de los sobrenadantes de cultivo celular. D: curva de calibración para el análisis de los lisados celulares y sobrenadantes de cultivo celular de MCF-7, MDA-MB-468, MDA-MB-231 y BC-M1.

Figura 12:

A: determinación de los valores de Cyr61 en el sobrenadante de cultivo celular de las estirpes celulares de cáncer de mama mediante ELISA. Las células se cultivaron bajo condiciones estándares de cultivo. Para el

punto temporal $t=0$ h, se añadió medio fresco a las células seguido de la determinación de la concentración de Cyr61 en cada punto de medición. A partir de la concentración de Cyr61 determinada (y volumen de medio conocido) y el número de células, se calculó el número de Cyr61 por célula. B: determinación de las tasas de secreción de Cyr61 en BC-M1 y MDA-MB-231. Aparte de los experimentos en la figura 12A, se substituyó el medio de cultivo celular cada 12 h. Los valores muestran los valores medios de tres experimentos independientes. La desviación estándar se representa mediante barras verticales de error. C: análisis de transferencia western de muestras de plasma procedentes de donantes sanos para Cyr61. De cada donante se aplicaron 100 μ l de plasma sanguíneo. Debido a que se aplicó a las muestras una etapa de purificación de las proteínas, se analizó la recuperación de Cyr61 mediante adición de 100 ng de Cyr61 recombinante a 100 μ l de plasma del donante nº 1. El lisado celular de BC-M1 (sin etapa de purificación) sirvió de control adicional. Para identificar las bandas inespecíficas potenciales con intensidad de señal débil, la película de rayos X se expuso durante 15 minutos.

Figura 13:

análisis de transferencia western de los anticuerpos anti-Cyr61 de Santa Cruz H78 (izquierda) y H2 (derecha). Para ambos anticuerpos se aplicaron los mismos lisados celulares. Para el análisis de los anticuerpos H78 y H2, se aplicaron 20 μ g de proteína a cada carril y se diluyó el anticuerpo primario 1:1,000. La alfa-tubulina sirvió de control de carga.

Figura 14:

aislamiento de Cyr61 mediante inmunoprecipitación utilizando el anticuerpo de ratón anti-Cyr61 (H2). Para la detección de Cyr61 mediante transferencia western se utilizó el anticuerpo de conejo anti-Cyr61 (H78). Se aplicó sobrenadante de cultivo celular de MDA-MB-231 para la inmunoprecipitación (MDA-MB-231 Cyr61). La aplicación de IgG en lugar del anticuerpo anti-Cyr61 (H2) sirvió de control para la especificidad de la inmunoprecipitación (IgG de MDA-MB-231). Cyr61 recombinante sirvió de referencia para la estimación de la cantidad aislada de Cyr61. Como control negativo se analizó el tampón para muestras SDS. El lisado de células MDA-MB-231 sirvió de control adicional de especificidad de la inmunoprecipitación.

Figura 15:

análisis de transferencia western para la evaluación de los anticuerpos anti-Cyr61 H78 (izquierda) y H2 (derecha). Los anticuerpos primarios se aplicaron a una dilución de 1:10,000. Se aplicó una serie de dilución de Cyr61 humana recombinante y purificada y lisados de células completas de las estirpes celulares especificadas. Para la visualización de detección no específica potencial de los anticuerpos anti-Cyr61, se analizaron adicionalmente 40 μ g del lisado de células MCF-7. MDA-MB-231 (MDA-231).

Figura 16:

curva de calibración para el cálculo de una ecuación lineal. La curva de calibración se utilizó para los análisis mostrados en la figura 17. El eje x muestra los valores de las intensidades de señal para Cyr61 recombinante y el eje y muestra la cantidad de proteína Cyr61 recombinante aplicada. El gráfico insertado muestra los parámetros de la ecuación, que se calculó como $y=0.4118x + 0.0009$, en la que y es la cantidad de proteína de Cyr61 [ng] y x es la intensidad de la señal en el lector de ELISA a 450 nm y el valor fijo de 0.000928 como ordenada en el origen.

Figura 17:

determinación de las cantidades de Cyr61, 5 μ g de lisado de células completas (A) y 0.5 μ l de sobrenadante de cultivo celular (B) mediante ELISA. Se sometieron a ensayo muestras puras de los lisados celulares y sobrenadantes (gris claro), así como muestras de lisados celulares y sobrenadantes de cultivo en los que se habían añadido 500 pg de Cyr61 recombinante (gris oscuro). Los números muestran los valores medios de tres experimentos. La desviación estándar se representa mediante barras verticales de error. Las células se cultivaron bajo condiciones estándares de cultivo y el sobrenadante de cultivo celular se recolectó tras 72 h.

Figura 18:

curva de calibración para el cálculo de una ecuación lineal. La curva de calibración se utilizó para los análisis mostrados en la figura 19. El eje x muestra los valores de las intensidades de señal para Cyr61 recombinante y el eje y muestra la cantidad de proteína Cyr61 recombinante aplicada. El gráfico insertado muestra los parámetros de la ecuación, que se calculó como $y=0.40636x + 0.00498$, en la que y es la cantidad de proteína de Cyr61 [ng] y x es la intensidad de la señal en el lector de ELISA a 450 nm y el valor fijo de 0.00498 como ordenada en el origen.

Figura 19:

determinación de las cantidades de Cyr61 en muestras de MCF-7 mediante ELISA. A: análisis de lisados celulares. Se sometieron a ensayo muestras de lisados celulares puros (gris claro) y 10 µg de lisados celulares en los que se había añadido Cyr61 humana recombinante (gris oscuro). B: análisis de sobrenadantes de cultivo celular. Se sometieron a ensayo muestras de sobrenadantes de cultivo celular puros (gris claro) y 20 µl de sobrenadantes de cultivo celular en los que se había añadido Cyr61 humana recombinante (gris oscuro). Los números muestran los valores medios de tres experimentos. La desviación estándar se representa mediante barras verticales de error. Las células se cultivaron bajo condiciones estándares de cultivo y el sobrenadante de cultivo celular se recolectó tras 72 h.

Figura 20:

curva de calibración para el cálculo de una ecuación lineal. La curva de calibración se utilizó para los análisis mostrados en la figura 21. El eje x muestra los valores de las intensidades de señal para Cyr61 recombinante y el eje y muestra la cantidad de proteína Cyr61 recombinante aplicada. El gráfico insertado muestra los parámetros de la ecuación, que se calculó como $y=0.40669x + 0.00279$, en la que y es la cantidad de proteína de Cyr61 [ng] y x es la intensidad de la señal en el lector de ELISA a 450 nm y el valor fijo de 0.00279 como ordenada en el origen.

Figura 21:

determinación de las cantidades de Cyr61 en muestras de MDA-MB-231 (MDA-231) mediante ELISA. A: análisis de lisados celulares. Se sometieron a ensayo muestras de lisados celulares puros (gris claro) y 1 µg de lisados celulares en los que se había añadido Cyr61 humana recombinante (gris oscuro). B: análisis de sobrenadantes de cultivo celular. Se sometieron a ensayo muestras de sobrenadantes de cultivo celular puros (gris claro) y 75 nl de sobrenadantes de cultivo celular en los que se había añadido Cyr61 humana recombinante (gris oscuro). Los números muestran los valores medios de tres experimentos. La desviación estándar se representa mediante barras verticales de error. Las células se cultivaron bajo condiciones estándares de cultivo y el sobrenadante de cultivo celular se recolectó tras 72 h.

Figura 22:

análisis de transferencia western de muestras de plasma procedentes de donantes sanos para Cyr61 utilizando el anticuerpo anti-Cyr61 H78. De cada donante se aplicaron 100 µl de plasma sanguíneo. Debido a que se aplicó a las muestras una etapa de purificación de las proteínas, se analizó la recuperación de Cyr61 mediante adición de 100 ng de Cyr61 recombinante a 100 µl de plasma del donante nº 1. El lisado celular de BC-M1 (sin etapa de purificación) sirvió de control adicional. Para identificar las bandas inespecíficas potenciales con intensidad de señal débil, la película de rayos X se expuso durante 15 minutos.

Figura 23:

curva de calibración para el cálculo de una ecuación lineal. La curva de calibración se utilizó para los análisis mostrados en la figura 24. El eje x muestra los valores de las intensidades de señal para Cyr61 recombinante y el eje y muestra la cantidad de proteína Cyr61 recombinante aplicada. El gráfico insertado muestra los parámetros de la ecuación, que se calculó como $y=0.40982x + 0.00283$, en la que y es la cantidad de proteína de Cyr61 [ng] y x es la intensidad de la señal en el lector de ELISA a 450 nm y el valor fijo de 0.00283 como ordenada en el origen.

Figura 24:

aplicación del ELISA de Cyr61 a muestras de plasma de individuos sanos de más de 50 años de edad. Cada punto de datos muestra el valor medio de muestras de plasma de cuatro individuos que se analizaron por triplicado. Se muestra el valor medio numéricamente y la desviación estándar como barras verticales de error. La curva muestra un ajuste no lineal (alométrico) de los valores. La ecuación correspondiente presentaba la forma $y = 2.341 \times x^{-1.050}$

Figura 25:

determinación del límite de detección del ELISA de Cyr61 en muestras de plasma de individuos de control femeninos sanos de más de 50 años de edad. Se añadió Cyr61 humana recombinante a 2.5 µl de volumen de plasma, seguido de la aplicación del ELISA. Para la evaluación del límite de detección, se compararon tres muestras de plasma puro con plasma que contenía Cyr61 añadido, utilizando una prueba de Student de dos colas para cada punto de datos. Se presenta el valor de p de cada prueba t numéricamente. El valor de p de 0.05 se indica como una línea horizontal.

Figura 26:

ensayos de estabilidad de Cyr61 en el plasma de pacientes de cáncer de mama. Todas las muestras de plasma se almacenaron a -80°C tras la adquisición. A: muestras de plasma de pacientes de cáncer de mama sin signos visibles de metástasis manifiestas. Las muestras se obtuvieron en los años 1998 y 1999. B: muestras de plasma de pacientes de cáncer de mama metastásico. Las muestras se obtuvieron en octubre de 2016 y se analizaron inmediatamente después de la adquisición. Todas las muestras se analizaron repetidamente para Cyr61 mediante ELISA en octubre de 2016, abril de 2017 y agosto de 2017. Cada muestra fue analizada por triplicado en cada punto temporal. Los valores presentados son de valores medios y la desviación estándar se proporciona como barras verticales de error. El ligero incremento de los valores de Cyr61 durante el tiempo podría deberse a los avances en la manipulación de las muestras.

Figura 27:

determinación de los niveles de Cyr61 en $100\ \mu\text{l}$ de plasma sanguíneo de personas de control sanas y de pacientes de cáncer de mama mediante ELISA. A: valores de Cyr61 en un grupo de donantes sanos seleccionados indiscriminadamente. Se utilizaron cinco microgramos de lisado celular de MDA-MB-231 (MDA-231) como control positivo. B: valores de Cyr61 en un grupo de mujeres sanas de más de 50 años de edad en el momento de obtención de la muestra. C: concentración de Cyr61 en muestras de pacientes de cáncer de mama metastásico (gris claro) y de pacientes sin signos de metástasis manifiesta en el momento del diagnóstico del tumor primario (negro). A modo de comparación, se muestran los valores medios de las concentraciones de Cyr61 mostradas en A (sanas, gris oscuro) y B (mujeres de más de 50 años, columnas blancas). Se analizaron $100\ \mu\text{l}$ de medio de cultivo celular para una estimación de fondo no específico. Los números indican los valores medios de tres mediciones y se indica la desviación estándar mediante barras verticales de error.

Figura 28:

análisis de sobrenadantes de cultivo celular mediante ELISA de tipo sándwich de Cyr61. Se aplicaron sobrenadantes de cultivo celular de MDA-MB-231 y MCF-7 en una serie de dilución. En el caso de MDA-MB-231, la concentración de Cyr61 del sobrenadante era de $1050\ \mu\text{g/ml}$ y se aplicaron $100\ \mu\text{l}$ de muestra en cada punto de medición. Para simplificar, las cantidades calculadas de Cyr61 por cada $100\ \mu\text{l}$ de sobrenadante de MDA-MB-231 se especifican en el eje x. Para cada punto de medición, se analizaron los tres valores de MDA-MB-231 y MCF-7 mediante prueba t de Student. Para Cyr61 en una cantidad de $0.125\ \text{ng}$ se obtuvo un valor de p de 0.031 .

Figura 29:

comparación del inductor angiogénico rico en cisteína 61 (Cyr61) en células de cáncer de mama con células de personas de control sano.

A: análisis de transferencia western de BC-M1, MDA-MB-468 (MDA-468), MDA-MB-231 (MDA-231) y células sanguíneas mononucleares de tres voluntarios sanos (PBMC).

B: detección de Cyr61 tras adición de estirpe celular a muestras de sangre (MDA-231 y BC-M1) y médula ósea (MDA-231) procedentes de voluntarios sanos mediante doble tinción inmunocitoquímica para citoqueratina y Cyr61.

C: detección de Cyr61 en CTC de pacientes de cáncer de mama. Las imágenes compuestas son superposiciones de las señales de citoqueratina, Cyr61 y DAPI. El enriquecimiento en células mononucleares se llevó a cabo mediante centrifugación de densidad Ficoll. Magnificación de microscopía: $400\ \times$.

Figura 30:

análisis del inductor angiogénico rico en cisteína 61 (Cyr61) en células de cáncer de mama y en células de personas de control sanas. A, B: detección de Cyr61 en las estirpes celulares de cáncer de mama BC-M1, MDA-MB-468 (MDA-468) y MCF-7 añadidas a muestras de sangre de voluntarios sanos mediante doble tinción inmunocitoquímica. En todos los experimentos, $n=3$. C: detección de Cyr61 en células tumorales circulantes (CTC) de la sangre periférica de pacientes de cáncer de mama. Las posiciones de las CTC se señalan con flechas. Las imágenes compuestas son superposiciones de las señales de citoqueratina, Cyr61, DAPI y CD45 (en caso de aplicarse). Para los detalles del análisis de CTC, ver la figura 17. Las células tumorales se aislaron con un dispositivo de enriquecimiento de CTC basado en el tamaño. Magnificación de microscopía: $400\ \times$. D: simulación de la diseminación de células tumorales de microambientes hipóxicos en secciones bien oxigenadas de la sangre. Las estirpes celulares se cultivaron con 1% de O_2 durante 14 días (14 d) o se cultivaron durante 14 días con 1% de O_2 seguido del cultivo durante 4 h con 10% de O_2 (14 d 4 h). La respuesta de Cyr61 se analizó mediante transferencia western (anteriormente) y se analizó cuantitativamente (posteriormente). Los números muestran el valor medio de tres experimentos independientes y la desviación estándar se indica

mediante barras verticales de error. Los niveles de Cyr61 en MCF-7 no se analizaron cuantitativamente debido a que no se detectó Cyr61 en esta estirpe celular. S: condiciones de cultivo estándares.

Figura 31:

detección de Cyr61 en CTC de la muestra de sangre del paciente nº 6 (ver la figura 27C). Los núcleos se tiñeron con DAPI; CD45 sirvió de marcador de exclusión de las células sanguíneas normales y se utilizó la panqueratina como marcador de detección de CTC. La imagen compuesta es una superposición de los canales de DAPI, CD45, citoqueratina y Cyr61. La magnificación de microscopía era de 400x.

Figura 32:

Tabla 3: detalle de los análisis de Cyr61 en CTC: ejemplo 11

Figura 33:

análisis de la sensibilidad y especificidad de los niveles de Cyr61 en el plasma de pacientes de cáncer de mama (n=786) frente a mujeres sanas (edad>50, n=124). Se muestran las curvas características de receptor-operador (ROC) para todos los pacientes analizados (A), el subgrupo de estadio T1 (B) y el subgrupo DCSI (C). ABC: área bajo la curva. IC: intervalo de confianza

Ejemplo 1

El ejemplo 1 proporciona una vista general de los materiales y métodos utilizados en los ejemplos 2 a 11, posteriormente.

Materiales y métodos

Pacientes. Se llevaron a investigaciones con seres humanos siguiendo las reglas de Helsinki tras obtener la autorización del comité de ética de la Medical Association Hamburg. Se obtuvo consentimiento informado de todos los pacientes antes de cualesquiera procedimientos relacionados con el estudio. Se utilizaron muestras de mujeres con cáncer de mama o de personas de control sanas tratadas en el University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Alemania. Para los análisis de CTC, se extrajo sangre de pacientes de cáncer de mama positivos para metástasis distantes. Para la detección de Cyr61 en plasma sanguíneo, se analizó la sangre de pacientes de cáncer de mama que no habían mostrado signos detectables de metástasis manifiesta en el momento del diagnóstico o de pacientes con recaída metastásica.

Especímenes de médula ósea. Se aspiró médula ósea bilateralmente de las crestas ilíacas tanto anterior como posterior (10 ml/sitio) de voluntarios sanos. Se llevaron a cabo los procedimientos siguientes bajo condiciones estériles. Se lavaron aspirados de médula ósea en HBSS (Biochrom AG, Berlin, Alemania) y se diluyeron en PBS (Gibco/Life Technologies, Carlsbad, EE.UU.) y se separaron mediante centrifugación de densidad utilizando Ficoll Paque Plus (GE Healthcare, Munich, Alemania). Se recogieron células mononucleares de la capa de interfase y se lavaron dos veces en PBS con suero de feto bovino al 10% (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel). Se prepararon citocentrifugados mediante centrifugación de células mononucleares de médula ósea sedimentando sobre portaobjetos de vidrio (Superfrost plus, Glaswarenfabrik Karl Hecht KG, Sondheim, Alemania; 7×10^5 células mononucleares en cada portaobjetos). Los portaobjetos se secaron al aire durante la noche y se almacenaron a -80°C . Las muestras de sangre se procesaron tal como se ha indicado para las muestras de médula ósea y para los experimentos de adición, se añadieron estirpes celulares a sangre o médula ósea de individuos sanos y se procesaron tal como se ha indicado.

Estirpes celulares y condiciones de cultivo (condiciones de cultivo celular estándar). El cultivo de las estirpes celulares de DTC se llevó a cabo esencialmente tal como se ha descrito (11). Se ha informado anteriormente (12) de una vista general detallada de la generación, autenticación y las propiedades de las estirpes celulares de DTC, BC-M1 (obtenida de médula ósea de un paciente de cáncer mamario), LC-M1 (obtenido de médula ósea de un paciente de cáncer de pulmón) y PC-E1 y PC-M1 (obtenido de la médula ósea de un paciente de cáncer de próstata). Para una caracterización detallada de las estirpes celulares, ver las refs. (12, 11). Brevemente, las estirpes celulares de DTC se cultivaron a 37°C en un medio humidificado con 5% de dióxido de carbono y 10% de oxígeno. El medio de cultivo era RPMI 1640 complementado con suero de feto bovino al 10%, L-glutamina 2 mM, insulina 10 mg/l, transferrina 5.5 mg/l (todos de Life Technologies, Darmstadt, Alemania), 50 $\mu\text{g/l}$ de factor de crecimiento epidérmico (EGF, Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Alemania) y 10 $\mu\text{g/l}$ de factor de crecimiento fibroblástico básico humano (b-FGF, Miltenyi Biotec). La estirpe celular de cáncer de mama MCF-7 se obtuvo de la American Type Culture Collection. Las estirpes celulares de cáncer de mama MDA-MB-468 (MDA-468), MDA-MB-231 (MDA-231) y BT-20 se adquirieron de Cell Lines Service (Eppelheim, Alemania). La estirpe celular de cáncer de mama Hs578t fue amablemente proporcionada por Thomas Dittmar (University of Witten/Herdecke, Alemania). Las subestirpes metastásicas óseas MDA-MB-231 MDA-MB-231 SA (13) y MDA-MB-231 B02 (14) se cultivaron en DMEM con FCS al 10% y L-glutamina 2 mM. MDA-MB-231 B02 fue amablemente proporcionada por

Philippe Clézardin y MDA-MB-231 SA fue amablemente proporcionada por Theresa A. Guise. La subestirpe metastásica cerebral (en ratones) MDA-MB-231, MDA-MB-231 BR, fue amablemente proporcionada por Frank Winkler (German Cancer Research Centre, Heidelberg, Alemania) y se cultivó tal como se ha indicado para MDA-231 (ver posteriormente).

MDA-468, MCF-7, PC-3, LNCAP, Du145, Hs578t, MDA-231, SCC25, Cal27 y BT-20 fueron cultivados en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con suero de feto bovino al 10% y L-glutamina 2 mM (todos de Life Technologies). Se cultivaron las células MDA-468, que sobreexpresan ErbB-2 (MDA-468 ErbB-2), las células de control resistentes a G418 correspondientes portadoras de un vector de expresión sin inserto (control MDA-468) y el mutante YF del vector de expresión ErbB-2 que no presenta el sitio de fosforilación Y1248 (MDA-468 PM) [23], tal como se ha indicado para MDA-468 con complementación con 400 µg/ml de G418 al medio. Todas las estirpes celulares se cultivaron a 37°C en un medio humidificado. Las estirpes celulares que se habían cultivado en RPMI se mantuvieron en presencia de 5% de CO₂ y las estirpes celulares cultivadas en DMEM se mantuvieron en presencia de 10% de CO₂. Con la excepción de las estirpes celulares de DTC, la mezcla de gases restante era aire atmosférico. Dichas condiciones de cultivo celular se refieren a "condiciones estándares de cultivo celular" en dicho trabajo. Se generaron muestras de proteínas dentro de los seis meses posteriores a la resucitación de las estirpes celulares.

Cultivo de las estirpes celulares en presencia de 1% de O₂ bajo condiciones de ayuno de glucosa o en presencia de cloruro de cobalto. El cultivo de las estirpes celulares en presencia de 1% de O₂ (hipoxia) se llevó a cabo utilizando el incubador Heracell 15 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EE.UU.). Se ajustó la presión parcial de oxígeno con N₂. Al cultivar las estirpes celulares en medio que no contenía glucosa (Glu⁰), se utilizó DMEM sin glucosa y RPMI sin glucosa (ambos de Life Technologies). Para los experimentos de ayuno de glucosa en presencia de 1% de O₂, se combinaron ambas condiciones. Las demás condiciones de cultivo eran iguales a las condiciones de cultivo estándares. Para la estabilización de HIF-1α, las células se incubaron con cloruro de cobalto 150 µM. Para dichos experimentos, todos los demás parámetros eran iguales a las condiciones estándares de cultivo celular.

Tratamiento de brefeldina A. Se aplicó brefeldina A (BFA) para analizar la secreción de Cyr61 en células en cultivo. Se adquirió BFA de Merck (Calbiochem, Darmstadt, Alemania) y se disolvió en DMSO a una concentración de 10 mg/ml (solución madre). A continuación, la solución madre se diluyó en 12 ml de medio de cultivo celular sin FCS hasta una concentración final de 5 µg/ml por cada matraz de cultivo celular de 75 cm². Las células se incubaron con BFA durante 18 h bajo condiciones estándares de cultivo celular. Para las células de control se aplicó DMSO sin BFA. Se llevaron a cabo etapas de centrifugación a 0°C hasta que las proteínas del medio de cultivo no estuvieran disueltas en el tampón de lisis (urea 9.8 M, EDTA 15 mM y Tris 30 mM). Se recolectó el medio de cultivo y se centrifugó a 2000 x g durante 5 min. El sedimento celular (células desprendidas) se lavó con 8 ml de PBS y las células se lisaron con tampón de lisis y se procesaron tal como se indica en una sección posterior. El sobrenadante (12 ml por cada matraz de cultivo celular) se concentró con dispositivos de centrifugación Ultraspinn (Vivaspin 4, membrana PES de 10,000 Da de MWCO, Sartorius-Stedim, Göttingen, Alemania) hasta un volumen de 200 µl. Tras la adición de 3 ml de mezcla de lisis, se concentró nuevamente el sobrenadante a un volumen de 200 µl. Se recolectó el sedimento celular tal como se ha indicado para la recolección celular para la transferencia western. Las tres fracciones (células desprendidas, lisado celular y sobrenadante) se sometieron a transferencia western tal como se indica posteriormente. Para los experimentos de BFA, se aplicaron 50 µg de proteína para la transferencia western.

Enriquecimiento en CTC basado en el tamaño. Los presente inventores aplicaron un dispositivo de separación independiente del marcador (Parsortix, ANGLE PLC, Surrey, Reino Unido) para el enriquecimiento en células tumorales. El sistema Parsortix utiliza una tecnología de microfluidos en forma de un casete desechable (casete de separación celular cc3R, Parsortix) para capturar CTC separándolas de la sangre de pacientes de cáncer. Se recogieron cuatro ml de sangre en BD Vacutainers (BD Belliver Industrial Estate, Plymouth, Reino Unido). Se bombeó sangre automáticamente a través del casete. El casete enriquece en CTC basándose en su mayor tamaño (≥ 10 µm) en comparación con otros componentes sanguíneos. Para reducir el nivel de fondo, el casete se lavó automáticamente con PBS (Life Technologies). Se recolectaron células tumorales aisladas, se citocentrifugaron sobre un portaobjetos (SuperFrost/Plus) y se tiñeron tal como se indica posteriormente. Para los experimentos de adición de estirpes celulares con sangre de personas sanas, se recibió sangre recién extraída del Institute for Transfusion Medicine, University Medical Center Hamburg-Eppendorf. Se extrajeron muestras clínicas de pacientes de cáncer de mama positivos para metástasis distantes.

Detección inmunocitoquímica de Cyr61 en muestras de estirpes celulares, sangre y médula ósea. Se añadieron las estirpes celulares a muestras de sangre o médula ósea de personas de control sanas. Las muestras se procesaron tal como se ha indicado para el análisis del espécimen de médula ósea o para el enriquecimiento para CTC basado en el tamaño. Se llevó a cabo una doble tinción inmunocitoquímica aplicando el anticuerpo anti-Cyr61 (H78) en combinación con un cóctel de anticuerpos específicos de citoqueratina. El cóctel de anticuerpos de citoqueratina del anticuerpo AE1/AE3 (anticuerpo monoclonal de ratón, Affymetrix eBioscience, Frankfurt, Alemania) y C11 (anticuerpo monoclonal de ratón, Cell Signaling Technology, Danvers, EE.UU.). Se utilizaron conjugados directos de AE1/AE3-Alexa Fluor488 y C11-Alexa Fluor488 en caso de que se indique para el

experimento individual. La detección de células sanguíneas normales se llevó a cabo utilizando el anticuerpo anti-CD45 acoplado con Alexa Fluor 647 (BioLegend, San Diego, EE.UU.) en donde se indica.

Se descongelaron portaobjetos 30 minutos antes de la incubación con solución B recién diluida (135 µl de solución B en 10 ml de ePBS) de Epimet-Kit (AS Diagnostik, Hückeswagen, Alemania) durante 10 minutos. Tras el lavado con PBS tres veces durante 3 min, las células se permeabilizaron durante 10 minutos con Triton X-100 al 1% en PBS. Tras otra etapa de lavado se llevó a cabo el bloqueo de la unión no específica utilizando AB-Serum (Biotest, Dreieich, Alemania) (al 10% en PBS) durante 20 minutos. Se añadió el anticuerpo primario contra Cyr61 a una dilución 1:50 y se incubó a temperatura ambiente durante 1 h. El diluyente era AB-Serum al 10% en PBS. Los portaobjetos se lavaron nuevamente tres veces con PBS y se aplicó anticuerpo secundario de conejo antirratón Alexa 546 o Alexa 532 (Molecular Probes, Eugene, EE.UU.) durante 45 minutos diluido 1:200 en AB al 10%-suero en PBS. Tras tres etapas de lavado con PBS, se aplicaron los anticuerpos específicos de citoqueratina y se incubaron durante 60 min. El diluyente era AB-Serum al 10% en PBS en todos los casos. Para el cóctel de anticuerpos AE1/AE3 C11, la dilución era 1:700 para AE1/AE3 y C11 se diluyó 1:200. Se eliminaron anticuerpos específicos de citoqueratina residuales mediante 3 etapas de lavado con PBS. En el caso de que se aplicasen anticuerpos específicos de citoqueratina no conjugados, se añadió anticuerpo secundario de conejo antirratón fluorocromo Alexa 488 (Molecular Probes) a una dilución 1:200 en AB-Serum al 10% y se incubó durante 45 min. Tras otra etapa de lavado (3x con PBS), se cubrieron los portaobjetos con medio de montaje Vectashield que contenía DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, EE.UU.). Se llevaron a cabo controles de tinción en paralelo, utilizando medios de dilución del anticuerpo primario y anticuerpo secundario; los portaobjetos se evaluaron manualmente utilizando el microscopio Axioplan 2 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemania).

Micromatriz de tejidos de Cyr61 (TMA). La expresión proteica de Cyr61 en muestras clínicas de tumor mamario se evaluó mediante tinción inmunohistoquímica (IHQ) tal como se indica posteriormente. Se utilizó una micromatriz de tejidos de cáncer de mama (TMA, ver la ref. [24]) para el análisis de expresión de Cyr61 en tumores primarios. Para la generación de TMA, se obtuvieron muestras de 0.6 mm de partes invasivas de los tumores, que habían sido seleccionados por un patólogo y se introdujeron en 3 matrices separadas. Se cortaron secciones de 6 µm a partir de los bloques de TMA. El diagnóstico postoperatorio, incluyendo la evaluación del tipo histológico y gradación, fue evaluado por patólogos en secciones de tejido fijadas con formalina e incluidas en parafina. Como control negativo, se omitió el anticuerpo primario en secciones paralelas. Para la evaluación 245 muestras de tumor fueron elegibles, de las que, para 184 tumores primarios, se disponían de datos clínico-patológicos. La inmunotinción de Cyr61 fue evaluada en modo ciego por la patóloga Sabine Riethdorf utilizando una puntuación inmunorreactiva basada en la intensidad de tinción y el porcentaje de células positivas. Para cada muestra de tejido, se registró la fracción de células tumorales inmunoteñidas y se estimó la intensidad de tinción en una escala de tres grados (0, 1, 2). A continuación, los tumores se clasificaron inicialmente según criterios arbitrariamente predefinidos en tres grupos, incluyendo muy bajo, fuertemente positivo y un grupo intermedio. Los criterios exactos para dichos grupos eran los siguientes: 0: muy débil (próximo al límite de detección o sin tinción en absoluto); 1: intervalo medio (tinción 1+ en (50% de células o tinción 2+ en (10% de células); 2: fuerte: (tinción 1+ en > 50% de células o tinción 2+ en >10%). Los análisis estadísticos para las comparaciones de distribución de variables clínicas y patológicas se examinaron utilizando la prueba chi-cuadrado de Pearson o la prueba exacta de Fisher. Los valores de P inferiores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos. Se evaluaron los datos clínicos desde la fecha del diagnóstico inicial hasta la muerte o la fecha del último seguimiento. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando la versión 21 del software SPSS (Chicago, EE.UU.).

Tinción inmunohistoquímica de Cyr61. Para la tinción IHQ del TMA, se aplicó el anticuerpo policlonal de conejo anti-Cyr61 (H78) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EE.UU.). Dicho anticuerpo había sido aplicado anteriormente por otro grupo de trabajo para la tinción de TMA en cáncer de próstata [39]. Se aplicaron especímenes incluidos en parafina sobre portaobjetos de microscopía de pacientes de cáncer de mama. Se eliminó la cera de parafina mediante incubación del espécimen a 60°C durante dos horas, seguido de la incubación de las muestras dos veces en xileno durante 10 min cada vez. Para eliminar el xileno, los portaobjetos se incubaron en etanol al 99%, seguido de la incubación en etanol al 96% y en etanol al 80%. Se llevó a cabo cada etapa dos veces y el tiempo de incubación era de 2 min para cada etapa. Tras una breve etapa de lavado en agua, las muestras se autoclavaron a 120°C en tampón de citrato (pH 6.0) durante 5 minutos. Después, las secciones se enjuagaron con TBST durante 5 min. Se llevó a cabo un tratamiento de peroxidasa utilizando la solución de bloqueo de peroxidasa Dako REAL (DAKO, Glostrup, Dinamarca) durante cinco minutos. Tras una breve etapa de lavado con TBST, se aplicó el anticuerpo anti-Cyr61. El anticuerpo se utilizó a una dilución 1:750 utilizando el diluyente de anticuerpos Dako (DAKO) y se incubó a 4°C durante la noche. Después, se llevaron a cabo tres etapas de lavado con TBST durante 3 minutos. Para la detección del anticuerpo primario, se utilizó polímero marcado-HRP y el anticuerpo secundario del sistema de detección de peroxidasa DAKO REAL/DAB (DAKO nº K5001) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la detección cromogénica, se aplicó 3,3'-diaminobencidina (DAB). Tras una breve etapa de lavado, se visualizaron los núcleos mediante tinción con hemalum (Merck, Darmstadt, Alemania). Los especímenes se secaron mediante incubación en etanol al 80%, seguido de la incubación en etanol al 96%, etanol al 99% y xileno. Cada etapa se llevó a cabo dos veces durante dos minutos cada vez. Para la conservación del espécimen, se utilizó medio de montaje Eukitt (Kindler, Freiburg, Alemania). La tinción de las metástasis de médula ósea se llevó a cabo tal como se ha indicado para el TMA.

Detección inmunocitoquímica de vimentina en estirpes celulares. Se descongelaron portaobjetos 30 minutos antes de la incubación con solución B recién diluida (135 µl de solución B en 10 ml de PBS) de Epimet-Kit (AS Diagnostik, Hückeswagen, Alemania) durante 10 minutos. Tras el lavado con PBS tres veces durante 3 min, las células se permeabilizaron durante 10 minutos con Triton X-100 al 1% en PBS. Tras otra etapa de lavado se llevó a cabo el bloqueo de la unión no específica utilizando AB-Serum (Biotest, Dreieich, Alemania) (al 10% en solución salina tamponada con fosfato) durante 20 minutos. Para la detección de la vimentina, se aplicó el anticuerpo antivimentina (BD Pharmingen, Erembodegem, Bélgica; clon monoclonal de ratón RV202) que asimismo se utilizó para la transferencia western. El anticuerpo antivimentina se diluyó 1:100 en AB-Serum al 10% en PBS y se incubó durante 60 min. El diluyente era diluyente de anticuerpos Dako con componentes reductores de fondo (DAKO). Como anticuerpo secundario, el anticuerpo de cabra antiratón fluorocromo Alexa 546 se diluyó 1:200 en AB-Serum al 10% en PBS y se incubó durante 45 min. Tras otra etapa de lavado (3x con PBS), se cubrieron los portaobjetos con medio de montaje Vectashield que contenía DAPI (Vector Laboratories). Se llevaron a cabo controles de tinción en paralelo, utilizando medios de dilución del anticuerpo primario y anticuerpo secundario; los portaobjetos se evaluaron manualmente utilizando el microscopio Axioplan 2 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Alemania).

Recolección celular y obtención de muestras para transferencia western. Las células se lavaron tres veces con solución salina tamponada con fosfato precalentada a 37°C, se recolectaron en 300 µl de tampón de lisis por cada matraz de cultivo celular de 75 cm². Los lisados celulares se homogeneizaron sobre hielo mediante tratamiento ultrasónico utilizando el dispositivo ultrasónico UP50H (Hielscher, Teltow, Alemania) mediante 3 etapas idénticas (amplitud 100%, 10 s) y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h, seguido de centrifugación (15.000 g a temperatura ambiente durante 5 min) y recolección del sobrenadante. Se lavaron las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con 1 ml de PBS. A continuación, las células se incubaron en mezcla de lisis y se homogeneizaron mediante tratamiento ultrasónico. Después, las proteínas se purificaron mediante precipitación utilizando 600 µl de precipitante (componente del kit 2-D Wuant, GE Healthcare, Uppsala, Suecia) por cada 250 µl de la muestra y coprecipitante (componente del kit 2-D Quant) en la misma cantidad (17). Las proteínas purificadas se disolvieron en 100 µl de urea 9.8 M y se solubilizaron durante 1 h a temperatura ambiente.

Se llevó a cabo la precipitación de las proteínas de las muestras de plasma sanguíneo tal como se ha indicado anteriormente para las estirpes celulares (33). Las proteínas precipitadas se disolvieron en urea 9.8 M.

Se determinó la concentración de las proteínas utilizando el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (Pierce, Rockford, EE.UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando BSA como patrón. Las muestras se almacenaron a -80°C. Se confirmó la calidad de las muestras y la calidad de los resultados del ensayo BCA mediante geles de SDS teñidos con Coomassie coloidal. El procedimiento de tinción se llevó a cabo según Neuhoff (18).

SDS-PAGE y transferencia western. La separación de las proteínas se llevó a cabo con el sistema Novex XCell Sure-Lock mini (Invitrogen, Groningen, Países Bajos) o la celda Protean II xi (Bio-Rad, Hercules, EE.UU.) utilizando geles de separación de poliacrilamida al 10% y un sistema tampón de Laemmli. Las muestras se diluyeron en tampón para muestras de SDS, se desnaturalizaron con calor a 95°C durante 5 min y se cargaron en los geles. El patrón de tamaño molecular era el marcador de proteínas pEqGOLD V (Peqlab, Erlangen, Alemania). Para el análisis de transferencia western, se aplicaron 40 µg de proteína por cada muestra, excepto cuando se especifica lo contrario. Después del SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a membranas Immobilon-P^{sq} (Millipore GmbH, Schwalbach, Alemania). Las proteínas se transfirieron mediante transferencia de cubeta ("tank blot") utilizando el sistema de electroforesis vertical mini VE dotado de unidades de transferencia de cubeta (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Los anticuerpos primarios se aplicaron siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando las diluciones indicadas en la sección "Antibodies used for western blot". En caso de que no se encontrara disponible información viable del proveedor, la membrana se bloqueó con leche en polvo baja en grasas al 5% (Roth, Karlsruhe, Alemania) en TBST (tampón de bloqueo) durante una hora con agitación suave. En dichos casos, los anticuerpos primarios se diluyeron en tampón de bloqueo y se aplicaron en las membranas a 4°C con agitación suave durante la noche. Los anticuerpos secundarios apropiados conjugados con peroxidasa de rábano picante (todos de DAKO, Glostrup, Dinamarca) se utilizaron a diluciones de 1:500 a 1:10,000 según la intensidad de señal del experimento individual. Todos los anticuerpos secundarios se diluyeron con tampón de bloqueo. Las bandas se visualizaron utilizando el reactivo de detección de transferencia western ECL Prime y películas radiográficas (ambos de GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las películas radiográficas se digitalizaron utilizando el densitómetro de imágenes GS-700 (Bio-Rad). El análisis densitométrico se llevó a cabo utilizando el software Quantity One (Bio-Rad). Cada reacción se llevó a cabo en muestras biológicas por triplicado. Las membranas se lavaron utilizando el tampón de deshibridado siguiente: Se añadieron 7.56 g de Tris, 20 g de SDS, 7.8 g de 2-mercaptoetanol, ajuste a pH 9.5 utilizando HCl, H₂O hasta 1 l. Antes de la utilización, se añadieron 0.1 g de DTT a 25 ml del tampón de deshibridado. Las membranas se incubaron a temperatura ambiente bajo agitación suave durante una hora. Tras el lavado con TBST, las membranas se incubaron con tampón de bloqueo durante una hora y se aplicó un anticuerpo primario diferente.

Anticuerpos utilizados para la transferencia western. Los anticuerpos se adquirieron de los proveedores siguientes: anticuerpo anti-AE1/AE3, monoclonal de ratón, dilución 1:10,000. Affymetrix eBioscience, Frankfurt, Alemania. BD Biosciences, Franklin Lakes, EE.UU.: antiintegrina αv (CD51), monoclonal de ratón, clon Clone 21/CD51, dilución

1:500. BD Pharmingen, Erembodegem, Bélgica: anticuerpo antivimentina, monoclonal de ratón, clon RV202, dilución 1:5,000. Cell Signaling Technology, Danvers, EE.UU.: anticuerpo antitubulina-alfa (11H10), monoclonal de conejo, dilución 1:10,000. Anticuerpo anti-BiP (C50B12), monoclonal de conejo (BiP es un sinónimo de Grp78), dilución 1:1,000. Anticuerpo anti-Cyr61, policlonal de conejo, dilución 1:1,000 (MDA-MB-231, Hs578t, BC-M1, LC-M1) otras estirpes celulares 1:500. Anti-HIF-1 α (D2U3T), monoclonal de conejo, dilución 1:1,1000. Anticuerpo antilamina A/C, policlonal de conejo, dilución 1:1000. anticuerpo anti-PD-L1 (E1L3N), monoclonal de conejo, dilución 1:1000. Los anticuerpos antiintegrina se obtuvieron del kit muestreador de anticuerpos de integrina (Cell Signaling Technology), con la excepción de la antiintegrina α v. Las diluciones aplicadas fueron: antiintegrina α 5: 1:1,000, integrina β 4 (D8P6C) XP 1:1,000, integrina α 4 (D2E1) XP 1:500, integrina β 1 (D2E5) 1:2,000, integrina β 3 (D7X3P) XP 1:2,000, integrina β 5 (D24A5) 1:1,000.

Abcam, Cambridge, Reino Unido: Anticuerpo anti-ErbB-2, monoclonal de ratón (clon CB11), dilución 1:500. Anticuerpo anti-CXCR4, policlonal de conejo, dilución 1:4,000. BD Biosciences, Heidelberg, Alemania: anticuerpo antiintegrina α v, monoclonal de ratón (clon 21/CD51), dilución 1:500. Cell Signaling Technology: anticuerpo anti-AKT, policlonal de conejo, dilución 1:5,000. Anticuerpo antifosfo-AKT (Ser473), monoclonal de conejo (clon 193H12), dilución 1:500. Anticuerpo antialfa-tubulina, monoclonal de conejo (clon 11H10), dilución 1:10,000. Anticuerpo anti-BiP, monoclonal de conejo (clon C50B12) (BiP es un sinónimo de Grp78), dilución 1:1,000. Anticuerpo anti-Cyr61, policlonal de conejo, dilución 1:1,000 (MDA-MB-231, Hs578t, BC-M1, LC-M1) otras estirpes celulares 1:500. Anticuerpo antirreceptor de EGF, monoclonal de conejo (clon D38B1), dilución 1:1,000. Anti-HIF-1 α , monoclonal de conejo (clon D2U3T), dilución 1:1,000. Anticuerpo antiintegrina α 5, policlonal de conejo, dilución 1:1,000. Anticuerpo antiintegrina β 4, monoclonal de conejo (clon D8P6C), dilución 1:1,000. Anticuerpo antiintegrina α 4, monoclonal de conejo (clon D2E1), dilución 1:500. Anticuerpo antiintegrina β 1, monoclonal de conejo (clon D2E5), dilución 1:2,000. Anticuerpo antiintegrina β 3, monoclonal de conejo (clon D7X3P), dilución 1:2,000. Anticuerpo antiintegrina β 5, monoclonal de conejo (clon D24A5), dilución 1:1,000. Anticuerpo antilamina A/C, policlonal de conejo, dilución 1:1000. Anticuerpo anti-PD-L1, monoclonal de conejo (clon E1L3N), dilución 1:2,000. Epitomics, Burlingame, EE.UU.: anticuerpo anticadherina-E, monoclonal de conejo (clon EP700Y), dilución 1:20,000. Merck (Calbiochem), Darmstadt, Alemania: anticuerpo anti-c-ErbB-2/c-Neu (Ab-3), monoclonal de ratón (clon 3B5), dilución 1:4,000. Micromet, Munich, Alemania: anticuerpo antipan-citoqueratina, monoclonal de ratón (clon A45/BB3), dilución 1:10,000. Novus Biologicals, Littleton, EE.UU.: anticuerpo anticadherina-N, monoclonal de conejo (clon EPR1792Y), dilución 1:10,000. Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EE.UU.: anticuerpo anti-EGFR (1005), policlonal de conejo, dilución 1:5,000. Anticuerpo anti-Cyr61 (H78), policlonal de conejo, dilución 1:1,000 (MDA-MB-468, MCF-7, PBMC) o 1:10,000 (todas las demás estirpes celulares). Anticuerpo anti-Cyr61 (H2), monoclonal de ratón, dilución 1:1,000 (MDA-MB-468, MCF-7) o 1:10,000 (todas las demás estirpes celulares).

Marcaje con isótopos estables utilizando aminoácidos en el cultivo celular (SILAC). Para el análisis del perfil de expresión de proteínas, se seleccionaron las estirpes celulares de cáncer de mama MDA-468 y BC-M1 y se cultivaron tal como se ha descrito para condiciones estándares de cultivo celular, excepto las especificadas. En caso de que no se indique lo contrario, se siguieron las instrucciones del kit de cuantificación de proteínas Pierce SILAC (Pierce Biotechnology). Se seleccionó BC-M1 para el marcaje de proteínas debido a que RPMI, al contrario que DMEM, contiene prolina e hidroxiprolina, evitando el potencial falso marcaje de las prolinas sin suplementación artificial del medio con prolina. Para BC-M1 se utilizó medio RPMI para SILAC y para MDA-468 se utilizó medio DMEM para SILAC, y se complementaron con suero de feto bovino dializado al 10% (todos de Pierce Biotechnology) y con L-glutamina 2 mM (Life Technologies). El RPMI se complementó adicionalmente con 10 mg/l de insulina, 5.5 mg/l de transferrina (ambos de Life Technologies), 50 μ g/l de EGF y 10 μ g/l de b-FGF (ambos de Miltenyi Biotec). Las proteínas de BC-M1 se marcaron utilizando $^{13}\text{C}_6$ -Arginina-HCl y $^{13}\text{C}_6$ -Lisina-2HCl (ambos de Pierce Biotechnology) a una concentración de 100 mg por litro de RPMI. El DMEM para MDA-468 se complementó con arginina-HCl y lisina-2HCl (ambos de Pierce Biotechnology). Los aminoácidos se añadieron a los medios después de la filtración esterilizante. A continuación, en la presente memoria los medios se denominaron medio de SILAC (pesado y ligero). El análisis morfológico de las células mediante microscopía reveló una alteración morfológica detectable de las células cultivadas en medio SILAC en comparación con las células cultivadas bajo condiciones estándares de cultivo celular hasta el pase 7 (inclusive, es decir, \pm 18 días).

Preparación de muestras preparativas para espectrometría de masas. Para el marcaje preparativo de las proteínas, las células se cultivaron durante 3 pases en medio SILAC en matraces de cultivo celular de 75 cm² bajo condiciones estándares. Dependiendo del crecimiento celular, las células se dividieron en una proporción 1:3 o 1:4 cada 2 a 3 días. Se analizaron cuatro matraces cada uno de pase 3 que se cultivaron en fechas diferentes. Se describe el protocolo siguiente para un matraz. La recolección de células se llevó a cabo tal como se ha indicado para la transferencia western y las células se lisaron en 400 μ l de mezcla de lisis (urea 8 M/EDTA 15 mM/Tris 30 mM). El lisado se homogeneizó mediante tratamiento de ultrasonidos utilizando el dispositivo de ultrasonidos UP50H (3 etapas idénticas (amplitud 100%, 10 s). A continuación, se dejó que las proteínas se disolviesen mediante incubación de la muestra a temperatura ambiente durante 1 h, seguido de centrifugación (12.000 g a temperatura ambiente durante 5 min) y recolección del sobrenadante. Después, la muestra se complementó con 0.05 volúmenes de DTT 1 M/Tris 1 M y se incubó a 56°C durante 20 min bajo agitación vigorosa. DTT asimismo sirvió de secuestrante para la formación potencial de iones isocianato a partir de urea. El bloque irreversible de los grupos SH se llevó a cabo mediante adición de IAA a una concentración final de 200 mM. Se ajustó el valor del pH a 9.5 utilizando Tris 2 M. A continuación, la muestra se incubó a temperatura ambiente y se protegió de la luz

5 durante 30 min bajo agitación vigorosa. Después, las proteínas se purificaron mediante precipitación utilizando 1.2 ml de precipitante (componente del kit 2-D Quant, GE Healthcare) por cada 500 µl de muestra y coprecipitante (componente del kit 2-D Quant) en la misma cantidad que de precipitante (17). Las proteínas se sedimentaron mediante centrifugación (16.000 g durante 5 min) y se lavaron con 1 ml de Tris 80 mM en acetona al 80%. Se eliminaron las sustancias contaminantes residuales mediante una etapa de lavado adicional con 1 ml de acetona 80 mM. Las proteínas purificadas se disolvieron en 100 µl de urea 9.8 M y se solubilizaron durante 1 h a temperatura ambiente. Después de lo anterior, se realizó la determinación de la concentración de proteína utilizando el ensayo BCA. Las muestras se diluyeron con 9 volúmenes de NH₄HCO₃ 100 mM, pH 8.3. Las proteínas se digirieron con tripsina (tripsina de grado de secuenciación, Roche, Mannheim, Alemania) mediante la adición de 1 µg de tripsina por cada 20 µg de proteína de la muestra. Para los análisis posteriores, se combinaron 380 µg de proteína de cada estirpe celular (MDA-468 y BC-M1) en una proporción 1:1. Después, la muestra se incubó a 37°C durante la noche bajo agitación vigorosa.

15 Desalación de péptidos. Tras la digestión triptica, los péptidos se desalaron utilizando un cartucho de fase inversa (cartucho Oasis HLB Plus Short, 225 mg, 60 µm, Waters, Manchester, Reino Unido). El cartucho se acondicionó con 3 ml de metanol al 100% (MeOH) y se equilibró con 3 ml de ácido fórmico (AF) al 0.2%, MeOH al 5% (tampón de lavado, disuelto en HPLC-H₂O) utilizando jeringas de 5 ml. Se disolvieron los péptidos tripticos en 1 ml de tampón de lavado y se cargaron en un cartucho utilizando una jeringa de 1 ml. Tras la carga, el cartucho se lavó con 3 ml de tampón de lavado y los péptidos se eluyeron con 1.5 ml de MeOH al 60% utilizando jeringas de 3 ml. El eluido se evaporó utilizando un evaporador centrífugo Speed vac.

25 Fraccionamiento OFFGEL. Los péptidos desalados se fraccionaron según sus puntos isoeléctricos utilizando un dispositivo fraccionador OFFGEL (Agilent Technologies, fraccionador 3100 OFFGEL, Waldbronn, Alemania). Para el enfoque isoeléctrico (IEF), se utilizó la configuración de 24 pocillos y tiras de IPG con un gradiente lineal de pH 4-7 de 24 cm (GE Healthcare, Munich). La muestra se disolvió en 3 ml de tampón de carga (MeOH al 20%, tampón IPGF al 1% [pH 4 a 7], disuelto en H₂O-HPLC) y se añadieron 150 µl de volumen de muestra a cada pocillo. Para proteger las fracciones de la desecación durante el procedimiento de enfoque, se añadieron 100 µl de tampón de carga sin muestra a las fracciones nº 1 y nº 24. Para las fracciones nº 2 y nº 23, se añadieron 23.50 µl de tampón de carga. La IEF se llevó a cabo con una corriente máxima de 50 µA y tensiones típicas de entre 300 V y 2500 V hasta alcanzar un total de 50 kWh. Después, se recogieron las fracciones de IEF y se secaron utilizando un sistema Speed vac.

35 Análisis de nanoUPLC-ESI-QTOF-EM/EM. Se llevaron a cabo análisis de espectrometría de masas en un espectrómetro de masas QTOF (QTOF Premier, Micromass/Waters, Manchester, Reino Unido) dotado de un nanoUPLC (nanoAcQUITY, Waters, Manchester, Reino Unido). Para las mediciones de QTOF, se disolvieron muestras concentradas en 30 µl de AF al 0.1% y se cargaron 4 µl en una columna de muestreo (columna UPLC nanoAcquity, C18, 180 µm x 20 mm, Waters, Manchester, Reino Unido). Tras el muestreo, la columna de muestreo se lavó durante 5 min con ACN al 2%, AF al 0.1% (5 µl/min). Los péptidos se eluyeron en la columna de separación (columna UPLC nanoAcquity, BEH 130 C18, Waters; 100 µm x 100 mm, 500 nl/min, gradiente: A, ácido fórmico al 0.1% en H₂O-HPLC; B, ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo, 2-50% de B en 87 min). La pulverización se generó a partir de un emisor de sílice fusionada (D.I. 10 µm, New Objective, Woburn, EE.UU.) a una tensión capilar de 1520 V, una temperatura de la fuente de 100°C y una tensión del cono de 40 V en modo de iones positivos. Los datos se registraron en modo de adquisición dependiente de datos (DDA). Se llevaron a cabo barridos de análisis de EM en un intervalo de m/z de 400 a 1500 con un tiempo de barrido de 0.6 s y un retardo entre barridos de 0.05 s. Se utilizaron las tres señales más abundantes para la fragmentación. Se obtuvieron espectros de EM/EM de 100 a 1500 m/z con un tiempo de barrido de 3.2 s y una rampa de colisión de 15 a 35 eV. Se utilizó una exclusión en línea para prevenir múltiples sucesos de fragmentación (tiempo de exclusión: 60 s, ventana de exclusión: +/- 0.1 m/z). Para la calibración, se registró un espectro Lockspray cada 20 segundos (1 pmol/µl [Glu1] fibrinopéptido B (Sigma, Munich, Alemania) en un intervalo de m/z de 100 a 1500 utilizando una energía de colisión de 22 eV.

50 Se llevó a cabo un análisis de nanoUPLC-ESI-QTOF-EM/EM dirigido al péptido Cyr61 tal como se ha indicado anteriormente, con las modificaciones siguientes. Los péptidos se eluyeron en una columna de separación (columna UPLC nanoAcquity, BEH 130 C18, Waters; 75 µm x 200 mm, 200 nl/min, gradiente: A, ácido fórmico al 0.1% en H₂O-HPLC; B, ácido fórmico al 0.1% en acetonitrilo, 2-50% de B en 87 min). Se llevaron a cabo barridos de análisis de EM en un intervalo de m/z de 400 a 1500 con un tiempo de barrido de 0.6 s y un retardo entre barridos de 0.05 s. Se utilizaron las dos señales más abundantes para la fragmentación. Se obtuvieron espectros de EM/EM de 100 a 1500 m/z con un tiempo de barrido de 0.95 s y una rampa de colisión de 20 a 32 eV. Para la detección de Cyr61, se utilizó una lista de inclusión: m/z 1180.6389 (+/- 0.1 Da), tiempo de retención: 4174.8 s (+/- 90 s), tiempo de barrido: 4.95 s, retardo entre barridos: 0.05 s, rampa de colisión: 20-32 eV.

60 Identificación de péptidos. Para la identificación de péptidos, se suavizaron los espectros en bruto (Savitzky-Golay, canal de ventana suavizada: 3, número de suavizaciones: 2), centrados (anchura mín. de pico a media altura: 4, centroide hasta: 80%) y corregido para masa patrón utilizando Protein Lynx Global Server versión 2.5.2 (Waters, Manchester, Reino Unido). La lista de picos resaltante se exportó en forma de un archivo mzML. La identificación se llevó a cabo con The OpenMS Proteomic Pipeline (TOPP) (19) utilizando la interfaz gráfica de usuario TOPPAS, que es parte del paquete de software de fuente abierta OpenMS (20). Se realizó una búsqueda de los archivos

mzML frente a una base de datos de señuelos humanos (Uniprot, base de conocimiento de proteínas (UniProtKB), www.uniprot.org) utilizando dos motores de búsqueda diferentes (el algoritmo de búsqueda abierto de espectrometría de masas (OMSSA) (21), XTANDEM (22) con los parámetros siguientes: tolerancia para masa de precursores fijada en 35 ppm y tolerancia para masa de fragmentos fijada en 0.1 Da. Además, se permitió un corte faltante y se consideró que una oxidación de metionina, una carbami-desmetilación en la cisteína, así como un marcaje $^{3}C_6$ tanto en la lisina como en la arginina, eran modificaciones variables. Después, se estimaron probabilidades de error posteriores utilizando la herramienta ID-PostErrorProbability y se calcularon las identificaciones de consenso basándose en las identificaciones de péptidos de los dos motores de búsqueda utilizando la herramienta ConsensusID (23). Con la herramienta FalseDiscoveryRate se calcularon los valores q y el umbral para la identificación correcta de péptido se fijó en un valor de q de 0.05. Finalmente, los archivos de identificación de péptido se exportaron en forma de archivos idXML.

Cuantificación mediante SILAC. Para la cuantificación mediante SILAC, los archivos de datos en bruto se convirtieron en archivos mzXML en modo de perfil utilizando el conversor de archivos massWolf. El procesamiento de las señales se llevó a cabo utilizando TOPPAS (19). En primer lugar, se convirtieron los archivos mzXML en archivos mzML utilizando la herramienta FileConverter. Para el procesamiento posterior de los datos, los archivos mzML se filtraron con la herramienta FileFilter (únicamente nivel MS1, intervalo rt [s]: 1800-5000). Los datos en bruto filtrados se suavizaron utilizando NoiseFilterSGolay (longitud de marco: 13, orden polinómico: 4). Se identificaron las parejas de SILAC y se cuantificaron utilizando la herramienta SILACAnalyzer utilizando los parámetros siguientes. El umbral de tiempo de retención se fijó en 50 segundos y se utilizó un valor umbral de intensidad de 5 recuentos. La correlación de intensidad se fijó en 0.6 y se consideró una desviación del modelo de 2.5. Un péptido requirió la estimación de por lo menos tres picos isotópicos y un máximo de siete picos isotópicos con el analizador SILAC. El marcaje se fijó en $^{13}C_6$ para la lisina y la arginina, y para la detección se permitió un corte faltante. Los resultados se exportaron en forma de archivos consensusXML. El grupo de datos de los péptidos identificados, que se manipuló en forma de archivos idXML, se hizo corresponder con las parejas de SILAC correspondientes utilizando la herramienta IDMapper y se exportó en forma de archivos csv. Los archivos CSV se cargaron en Mathematica. Para cada pareja de SILAC, la proporción se calculó mediante división de la intensidad del péptido ligero por la intensidad del pesado. Las proporciones de péptidos se agruparon según la proteína a la que se habían asignado y se utilizó la proporción media de péptidos como la proporción de la proteína.

Para el análisis de los datos, sólo se consideraron identificaciones de péptidos que se correspondían con una única proteína (péptidos únicos). Las proteínas sólo se analizaron adicionalmente en el caso de que se detectasen péptidos únicos en por lo menos tres de las cuatro réplicas biológicas. Los péptidos que se derivaban del extremo C-terminal de una proteína que no terminaban con K o R fueron excluidos manualmente. Se calculó el valor medio y la desviación estándar para todos los péptidos detectados para una proteína. Las proteínas que se consideraron expresadas diferencialmente debían exceder un valor de 2.0 en términos de factor de cambio con significancia estadística con $p < 0.05$ (prueba t de Student).

Determinación de las tasas de crecimiento mediante recuento celular. Para la determinación de las tasas de crecimiento, las células tumorales en primer lugar se cultivaron en placas de 6 pocillos bajo condiciones estándares. Se utilizaron 15.000 a 25.000 células por pocillo y se dejó que creciesen durante un día. Para la determinación del número de células inicial, se determinó el número de células de un pocillo de la manera siguiente. Las células se desprendieron mediante tripsinización y se transfirieron a una cámara de recuentos Neubauer utilizando la tinción vital de azul tripán para identificar las células muertas. Se determinó el número de células para nueve cuadrados y se calculó el número de células por pocillo para dichos valores. El número de células resultante sirvió como valor del número de células inicial ($t=0$ h) para el experimento individual. Las células se cultivaron en paralelo en pocillos adicionales y se trataron tal como se indica en las secciones de cultivo celular. Tras los puntos temporales apropiados, se recolectaron las células y se contaron tal como se ha indicado. Se llevaron a cabo réplicas biológicas de la misma manera en experimentos independientes.

Se llevaron a cabo análisis morfológicos de las células bajo ayuno de glucosa utilizando el microscopio Axiovert 25 (Carl Zeiss AG).

Ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA). Obtención de muestras: se obtuvo plasma sanguíneo de personas de control sanas o pacientes de cáncer de mama mediante centrifugación de muestras de sangre recién extraídas a 2500 x g durante 15 min. Se clarificó el sobrenadante del cultivo celular mediante centrifugación a 2500 x g durante 15 min. Para el lisado de células completas de las estirpes celulares, las células se lisaron con tampón LPIP (NaCl 140 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM, NP40 al 0.05%, glicerol al 10%) y los lisados celulares se aplicaron en una dilución apropiada. El diluyente era PBS. En el caso de plasma y sobrenadante de cultivo celular, se aplicaron 100 μ l de volumen de muestra sin diluir. Se adquirió proteína Cyr61 humana recombinante de Abnova (Taipei, Taiwan). Se determinó la concentración de la proteína utilizando el kit de ensayo de proteínas BCA de Pierce.

Para la detección de Cyr61 en muestras de células tumorales, se estableció un ELISA. Las etapas de pipeteado se llevaron a cabo con una pipeta multicanal de 100 μ l. En primer lugar, se recubrieron las placas de 96 pocillos (placa de fondo plano de 96 pocillos, Costar, Sigma Aldrich) con el anticuerpo anti-Cyr61 (anticuerpo policlonal de

conejo anti-Cyr61 (H78), Santa Cruz Biotechnology). El anticuerpo anti-Cyr61 se diluyó a una concentración de 3 µg/ml en PBS (Gibco/Life Technologies) y se añadieron 25 µl del anticuerpo diluido a cada pocillo. La placa se incubó a 4°C durante la noche. Para eliminar el anticuerpo no unido, las células se lavaron con 100 µl de volumen tres veces. La primera vez, los pocillos se lavaron con PBS, seguido de dos etapas utilizando PBS con Tween-20 al 0.02% (Roth, Karlsruhe, Alemania). A continuación, los pocillos se bloquearon con tampón de bloqueo (leche seca desnatada al 5% [Roth], en PBS con Tween al 0.02%) utilizando 30 µl de tampón de bloqueo en cada pocillo durante dos horas a temperatura ambiente. A lo anterior siguieron tres etapas de lavado con 100 µl de volumen. La primera vez, los pocillos se lavaron con PBS, seguido de dos etapas utilizando PBS con Tween-20 al 0.02%. Para la detección de Cyr61 en las muestras, se añadieron 100 µl de volumen de muestra a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas. A continuación, los pocillos se lavaron con tres etapas de lavado tal como se ha indicado anteriormente. El anticuerpo secundario (IgG de cabra anticonejo-AP, Santa Cruz Biotechnology) se diluyó 1: 3,000 con tampón de bloqueo y se añadieron 30 µl de la dilución a cada pocillo, seguido de incubación durante una hora a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron con tres etapas de lavado tal como se ha indicado. Tras la adición de 100 µl de solución de sustrato precalentada (solución de sustrato de micropocillo de un componente de fosfato de para-nitrofenilo, Southern Biotech, Birmingham, EE.UU.) a cada pocillo, la reacción se incubó en la oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 15 µl de NaOH 3 N. Las muestras se analizaron utilizando un lector de ELISA (NanoQuant Infinite M200 pro, Tecan, Männedorf, Suiza) a 405-620 nm. Se llevaron a cabo análisis estadísticos de los niveles de Cyr61 entre los grupos de pacientes con un ensayo ANOVA de un factor utilizando el programa OriginPro 8.0 (Northampton, EE.UU.), en el que los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos.

Recientemente se ha establecido una modificación del ELISA de Cyr61 en un ELISA de tipo sándwich, que se llevó a cabo de la manera siguiente. El ensayo se llevó a cabo en tiras sueltas F8 MaxiSorp (Thermo Fisher, Waltham, EE.UU.). El anticuerpo anti-Cyr61 (H78) se diluyó a una concentración de 6 µg/ml en PBS y se añadieron 25 µl del anticuerpo diluido a cada pocillo. El ensayo se incubó a 4°C durante la noche. A continuación, los pocillos se lavaron con 100 µl de PBS y dos veces con 100 µl de PBS con Tween-20 al 0.02% (Roth). A continuación, los pocillos se bloquearon con tampón de bloqueo utilizando 30 µl por pocillo y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Los pocillos se lavaron nuevamente con 100 µl de PBS y dos veces con 100 µl de PBS con Tween-20 al 0.02% (Roth). Después, se añadieron 100 µl de muestra, por ejemplo plasma no diluido, a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante dos horas, seguido de tres etapas de lavado, tal como se ha indicado. Como anticuerpo de detección, se utilizó el anticuerpo anti-Cyr61, monoclonal de ratón (clon 365108) de R&D Systems (Minneapolis, EE.UU.). Dicho anticuerpo se diluyó en PBS a una concentración de 30 µg/ml y se aplicaron 25 µl de la dilución en cada pocillo, seguido de la incubación a 4°C durante la noche. Se eliminó el anticuerpo no unido mediante tres etapas de lavado, tal como se ha indicado. Como anticuerpo secundario, se diluyó un anticuerpo policlonal de cabra antirratón acoplado con peroxidasa de rábano picante (P0447, Dako, Glostrup, Dinamarca) 1:250 con tampón de bloqueo y se aplicaron 30 µl de la dilución a cada pocillo. El anticuerpo secundario se incubó a temperatura ambiente durante una hora. El ensayo se lavó tres veces tal como se ha indicado. Como sustrato, se añadieron a cada pocillo 100 µl de sustrato de micropocillo HRP de un componente TMB (E102, Bethyl Laboratories, Montgomery, EE.UU.). La incubación se llevó a cabo protegido de la luz durante 15 min, seguido de la parada de la reacción mediante la adición de 100 µl de ácido sulfúrico 1 N. Se detectó la extinción a 450 nm utilizando el lector de ELISA NanoQuant Infinite M200 pro.

Inmunoprecipitación. Para el análisis de Cyr61 mediante inmunoprecipitación, se aplicaron $1-2 \times 10^7$ células. Tras la recolección de las células, las células se sedimentaron a 1450 rpm durante 15 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y las células se lavaron con PBS y se sedimentaron mediante centrifugación. Para la lisis celular, se añadieron al sedimento celular 100 µl de tampón LPIP, 5 µl de cloruro sódico 5 M y 105 µl de agua. Tras la homogeneización, la muestra se incubó durante 5 minutos a 4°C, seguido de centrifugación a $10.000 \times g$ durante 15 min a 4°C. Se descartó el sedimento. A continuación, se añadieron 400 µl de tampón LPIP a cada tubo. Para la precipitación de Cyr61, se aplicaron 20 µl del anticuerpo anti-Cyr61 (anticuerpo anti-Cyr61 (H78) policlonal de conejo, Santa Cruz Biotechnology). Para el ensayo de control de IgG, se utilizaron 10 µl de IgG de conejo normal-AC (Santa Cruz Biotechnology). Las muestras se incubaron en un rotador a 4°C. Tras 3 h de incubación, se añadieron 25 µl de perlas (proteína A-seferosa, CL-4B/GE Healthcare) a cada ensayo y se incubaron en un rotador a 4°C durante una hora adicional. A continuación, los conjugados de perlas-anticuerpos se lavaron utilizando 1 ml de tampón LPIP para cada ensayo, seguido de centrifugación a 2.000 rpm a 4°C. El lavado se repitió cuatro veces. Los anticuerpos se cortaron mediante la aplicación de 50 µl de tampón para muestras y se añadieron 5 µl de agente reductor (tampón para muestras NuPAGE LDS 4X, agente reductor de muestras NuPAGE 10 X, ambos de Gibco/Life Technologies) a las muestras, seguido de incubación a 70°C en un termociclador. Tras la centrifugación a 2000 rpm a 4°C durante 1 minuto, se separaron las muestras mediante SDS-PAGE. Se llevó a cabo SDS-PAGE utilizando XCell SureLock Mini-Cell 1 unidad, Thermo Fisher, Waltham, EE.UU.), geles premoldeados TruPage al 4-12%, 12 pocillos y tampón de migración de TEA-tricina SDS TruPAGE (ambos de Sigma Aldrich). Las proteínas se transfirieron mediante el módulo XCell II Blot (Thermo Fisher) en membranas de nitrocelulosa Protan (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se detectó Cyr61 utilizando el anticuerpo anti-Cyr61, monoclonal de ratón (clon 365108) de R&D Systems (Minneapolis, EE.UU.) a una dilución de 1: 500.

Ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA) mejorado.

Obtención de muestras: Se obtuvo plasma sanguíneo de personas de control sanas o pacientes de cáncer de mama mediante centrifugación de muestras de sangre recién extraídas a 2500 x g durante 15 min. Se clarificó el sobrenadante del cultivo celular mediante centrifugación a 2500 x g durante 15 min. Para el lisado de células completas de las estirpes celulares, las células se lisaron con tampón LPIP (NaCl 140 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM, NP40 al 0.05%, glicerol al 10%) y los lisados celulares se aplicaron en una dilución apropiada. El diluyente era PBS (Gibco/Life Technologies). En el caso de muestras de plasma, se aplicaron 2.5 µl de volumen de muestra. Se adquirió proteína Cyr61 humana recombinante de Abnova (Taipei, Taiwan). Se determinaron las concentraciones de proteína utilizando el kit de ensayo de proteínas BCA de Pierce.

Las etapas de pipeteado se llevaron a cabo con una pipeta multicanal de 100 µl utilizando placas TC, de 96 pocillos, estándares, F (Sarstedt). Para el recubrimiento de los pocillos, se aplicó el anticuerpo anti-Cyr61 H2 de Santa Cruz Biotechnology. El anticuerpo se diluyó 1:250 en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con FCS al 10% y se aplicaron 35 µl del anticuerpo diluido en cada pocillo. La placa se incubó a 4°C durante la noche bajo agitación suave. Para eliminar el anticuerpo no unido, las células se lavaron con 100 µl de volumen tres veces. La primera vez, los pocillos se lavaron con PBS, seguido de dos etapas utilizando PBS con Tween-20 al 0.02% (Roth, Karlsruhe, Alemania). A continuación, se bloqueó la unión no específica con tampón de bloqueo (leche seca desnatada al 5% [Roth], en PBS con Tween al 0.02%) utilizando 100 µl de tampón de bloqueo en cada pocillo. El ensayo se incubó bajo agitación suave a 4°C durante la noche. A continuación, se llevaron a cabo tres etapas de lavado utilizando 100 µl de volumen en cada una tal como se ha indicado. Para la incubación con muestras de plasma, se añadieron 2.5 µl de plasma diluido en 97.5 µl de DMEM con FCS al 10% y se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente bajo agitación suave. A lo anterior le siguieron tres etapas de lavado con 100 µl de volumen cada una, tal como se ha indicado. A continuación, se añadió el anticuerpo anti-Cyr61 H78 (Santa Cruz Biotechnology) a los pocillos. El anticuerpo anti-Cyr61 se diluyó 1:500 en DMEM con FCS al 10% y se añadieron 35 µl del anticuerpo diluido a cada pocillo, seguido de incubación a temperatura ambiente bajo agitación suave durante dos horas. A lo anterior le siguieron tres etapas de lavado con 100 µl de volumen cada una, tal como se ha indicado. Para la detección de Cyr61, se diluyó un anticuerpo policlonal de cabra anticonejo acoplado con peroxidasa de rábano picante (Dako, Glostrup, Dinamarca) 1:250 con tampón de bloqueo y se aplicaron 35 µl de la dilución a cada pocillo. La reacción se incubó a temperatura ambiente durante una hora bajo agitación suave. A lo anterior siguieron tres etapas de lavado con 100 µl de volumen cada una, tal como se ha indicado. A continuación, se añadieron a cada pocillo 100 µl de sustrato de micropocillo HRP de un componente TMB (Bethyl Laboratories, Montgomery, EE.UU.). La incubación se llevó a cabo protegida de la luz a temperatura ambiente durante 15 min. La reacción se detuvo mediante la adición de 100 µl de solución de parada para sustratos TMB (Immunochemistry Technologies, Bloomington, EE.UU.) e incubación en la oscuridad bajo agitación suave durante 15 min. Se detectó la extinción a 450/620 nm utilizando el lector ELISA NanoQuant Infinite M200 pro (Tecan, Männedorf, Suiza). Los valores de DO se convirtieron a concentraciones de Cyr61 utilizando proteína Cyr61 recombinante y purificada como patrón.

Inmunoprecipitación (IP) de Cyr61 mejorada. Para el aislamiento de Cyr61, se utilizaron 100 µl de sobrenadante de cultivo celular recién recolectado que se había dejado 72 h sobre células MDA-MB-231. Las perlas (proteína A-seferosa, CL - 4B; GE Healthcare, Munich, Alemania) se suspendieron en 500 µl de tampón de IP frío (tampón LPIP con comprimidos cOMplete ULTRA de inhibidor de proteasas de Roche, Mannheim, Alemania). A continuación, se añadieron 4 µg del anticuerpo monoclonal de ratón anti-Cyr61 H2 (Santa Cruz Biotechnology). En el ensayo de control, se sustituyó el anticuerpo anti-Cyr61 por IgG de ratón normal-AC (Santa Cruz Biotechnology). Los ensayos se incubaron en un rotador a 4°C durante la noche. Para eliminar el anticuerpo no unido, las perlas se lavaron cinco veces con 1 ml de tampón de IP (2,000 x g durante 1 minuto). Las perlas se suspendieron en 100 µl de sobrenadante de cultivo celular y 900 µl de tampón de IP frío y se incubaron en un rotador a 4°C durante tres días. A continuación, los conjugados de perlas-anticuerpos se lavaron utilizando 1 ml de tampón de IP para cada ensayo, seguido de centrifugación (2,000 x g durante 1 minuto). Se repitió el lavado cuatro 3 veces. Los anticuerpos se cortaron mediante la aplicación de 100 µl de tampón para muestras Laemmli a las perlas sedimentadas y se calentaron a 70°C durante diez minutos. Tras la centrifugación (10,000 x g durante 1 minuto), se analizó una alícuota del sobrenadante mediante transferencia western para Cyr61 utilizando el anticuerpo anti-Cyr61 H78 (Santa Cruz Biotechnology) para la detección de Cyr61.

Ejemplo 2: identificación de Cyr61 como marcador mesenquimatoso.

Las estirpes celulares de mDTC de la médula ósea de los pacientes de cáncer (BC-M1, cáncer de mama; LC-M1, cáncer de pulmón; PC-E1 y PC-M1, cáncer de próstata) sirvieron de modelos útiles para estudiar la biología de las DTC (12). En particular, BC-M1 y LC-M1 mostraron características mesenquimatosas, tales como una expresión elevada de vimentina, aunque conservaron algunos atributos epiteliales, tales como un nivel bajo de expresión de determinadas citoqueratinas (figura 1A). En contraste, las células de cáncer de mama MDA-468 de tipo basal presentan un fenotipo predominantemente epitelial, aunque contienen una subpoblación de células tumorales que están enriquecidas en proteínas marcadoras mesenquimatosas como vimentina (ver a continuación). Para conocer mejor el proceso de diseminación, los presentes inventores analizaron el perfil de proteínas de BC-M1 y MDA-468 mediante SILAC (marcaje con isótopos estables con aminoácidos en cultivo celular) y espectrometría de masas

CL-EM/EM. Las células BC-M1 se marcaron metabólicamente, mientras que MDA-468 se cultivó en presencia de los isótopos ligeros correspondientes. La única proteína detectada que cumplía los requisitos de los presentes inventores era Cyr61. Se sobreexpresaba Cyr61 en BC-M1 en comparación con MDA-468 en dichos experimentos (tabla 1 en la figura 2; figura 1B). Se presenta lamina-A/C como ejemplo de proteína que no se expresa diferencialmente en BC-M1 y MDA-468 en el enfoque de CL-EM/EM. Dichos resultados se confirmaron mediante transferencia western (figura 1C, D). De esta manera, los presentes inventores se centraron en Cyr61 en los análisis siguientes.

Ejemplo 3. Expresión elevada de proteína Cyr61 en células tumorales con atributos mesenquimatosos.

Las células tumorales con un fenotipo mesenquimatoso pronunciado (Hs578t, BC-M1 y LC-M1) eran positivas para Cyr61 (figura 1C, D). La estirpe celular de cáncer de mama MDA-MB-231 (MDA-231), que comparte atributos epiteliales y mesenquimatosos, asimismo muestra niveles elevados de Cyr61. En contraste, las estirpes celulares con atributos epiteliales (MDA-468 y MCF-7) expresan Cyr61 a niveles muy bajos. Los niveles de Cyr61 en las estirpes celulares de cáncer de próstata PC-E1 y PC-M1 (figura 1E) eran inferiores a los de BC-M1. A partir de los análisis de las estirpes celulares de los presentes inventores, por lo tanto, se supuso que mCTC/mDTC eran positivos para Cyr61 junto con la ligera expresión de citoqueratinas.

Ejemplo 4. Respuesta de Cyr61 al estrés microambiental y coexpresión con PD-L1.

Los presentes inventores establecieron un sistema modelo para el análisis de niveles de Cyr61 durante el curso de la diseminación de las células de cáncer a la médula ósea con énfasis en la hipoxia (figura 5).

Los presentes inventores observaron una coexpresión notablemente similar de Cyr61 y HIF-1 α (factor 1-alfa inducible por hipoxia) en las condiciones iniciales del sistema modelo de los presentes inventores (condiciones de cultivo celular estándares, figura 5A). HIF-1 α es el regulador maestro de adaptación metabólica a la hipoxia. A continuación, los presentes inventores modelaron el establecimiento de DTC en zonas hipóxicas de la médula ósea sometiendo las células a 1% de O₂ en una serie temporal (figura 5B). En MDA-231 y MDA-468, la regulación negativa de Cyr61 se vio acompañada de la inducción de la proteína marcadora mesenquimatoso vimentina durante la hipoxia. La correlación inversa entre Cyr61 e HIF-1 α sugiere una regulación negativa dependiente de HIF-1 α de Cyr61, aunque este efecto no resultó muy evidente bajo 1% de O₂. Con el fin de clarificar lo anterior, los presentes inventores trataron las células con cloruro de cobalto en presencia de condiciones estándares de cultivo celular (figura 5D). El cobalto (Co²⁺) inhibe la interacción de HIF-1 α con la proteína de von Hippel-Lindau, conduciendo a la acumulación de HIF-1 α (24). Estos experimentos revelaron una acumulación de HIF-1 α con la consiguiente regulación negativa de Cyr61. A continuación, los presentes inventores analizaron Cyr61 en las subestirpes metastásicas óseas de MDA-231, MDA-231 SA (13) y MDA-231 B02 (14) (figura 5E), asumiendo que dichas células tumorales debían adaptarse a las condiciones hipóxicas in vivo durante la expansión metastásica. Los presentes inventores observaron una correlación inversa entre Cyr61 e HIF-1 α en dichas estirpes celulares, lo que concuerda con las respuestas celulares de Cyr61 e HIF-1 α con el tratamiento de Co²⁺. Los presentes inventores analizaron adicionalmente la subestirpe metastásica cerebral de MDA-231, MDA-231 BR, a fin de someter a ensayo los resultados de los presentes inventores de metástasis en médula ósea en el contexto de las metástasis cerebrales. MDA-231 BR mostraba los niveles de Cyr61 más altos de entre todas las células analizadas en las líneas de trabajo que se habían cultivado bajo condiciones de cultivo estándares.

La hipoxia frecuentemente es una consecuencia de un suministro ineficiente de la sangre en tumores que se ve acompañado de una falta de nutrientes. Por lo tanto, los presentes inventores analizaron la respuesta celular al ayuno de glucosa (figura 5F). Para BC-M1 y LC-M1, se detectó una reducción de la expresión de Cyr61 con el ayuno de glucosa, mientras que se observó una inducción de Cyr61 en las células MDA-231 y Hs578t. Al someter MDA-468 a hipoxia y ayuno de glucosa conjuntamente, se indujo tanto Cyr61 como vimentina (figura 5D, E).

Para considerar la situación en los pacientes, en los que las células tumorales deben escapar de la inmunovigilancia durante el proceso de diseminación, los presentes inventores monitorizaron los niveles de PD-L1 (ligando 1 de muerte celular programada 1). PD-L1 protege a las células tumorales de la eliminación por las células T y ha sido detectada recientemente en CTC (25). Debido a que se observó que PD-L1 podía ser inducido por 0.5% de O₂ mediante HIF-1 α (26), los presentes inventores analizaron una potencial inducción de PD-L1 por concentraciones de O₂ relevantes para la médula ósea (1% de O₂) o mediante tratamiento con Co²⁺. Los presentes inventores observaron una inducción de PD-L1 en BC-M1 y Hs578t bajo 1% de O₂ (figura 5B) y en ambas estirpes celulares se indujo transitoriamente PD-L1 (figura 5D) en respuesta al tratamiento de Co²⁺. Además, se observaron niveles extraordinariamente elevados de PD-L1 en MDA-231 BR (figura 5E). Lo anterior muestra que las DTC, con un fenotipo similar a BC-M1, pudieron mantener niveles de PD-L1 bajo condiciones hipóxicas, tales como las presentes en la médula ósea in vivo y confirma que el modelo de los presentes inventores es compatible con la situación en los pacientes a este respecto.

Ejemplo 5. Coexpresión de Cyr61 con PD-L1 y expresión frecuente de Cyr61 en estirpes celulares de cáncer pancreático.

Los presentes inventores observaron una determinada coexpresión de Cyr61 y PD-L1 (figura 5A). Para probar dicha suposición, los presentes inventores compararon Cyr61 y PD-L1 en estirpes celulares adicionales de diferentes entidades tumorales (figura 6). Los presentes inventores encontraron para estirpes celulares de cáncer de próstata, de mama, así como de cabeza y cuello, coexpresión de Cyr61 y PD-L1 (figura 6A). En dichas entidades tumorales, la diseminación de las células tumorales se produce predominantemente mediante diseminación hematológica o linfática.

En contraste, en el cáncer pancreático, la expansión metastásica frecuentemente se produce mediante diseminación peritoneal (27). Para las estirpes celulares de cáncer pancreático analizadas, los presentes inventores observaron una correlación inversa entre los niveles de Cyr61 y de PD-L1 (figura 6B).

Además, el cáncer pancreático es un ejemplo de entidades de células tumorales, que pueden dar lugar a inflamación (pancreatitis), conduciendo a la diseminación de las células premalignas (28). Los presentes inventores detectaron en la totalidad de las cuatro estirpes celulares de cáncer pancreático analizadas, Cyr61, sugiriendo una expresión frecuente de Cyr61 en cáncer pancreático.

Ejemplo 6. Respuesta de Cyr61 a la expresión de ErbB-2 bajo condiciones hipóxicas.

Aparte de los tumores de mama triple-negativos, los tumores positivos para ErbB-2 muestran sólo un número bajo de células tumorales individuales con atributos mesenquimatosos (4). Por lo tanto, los presentes inventores supusieron que ErbB-2 podría afectar a la adquisición de atributos mesenquimatosos y niveles de Cyr61 (figura 7A, B). ErbB-2 se sobreexpresaba en MDA-468 y la estirpe celular resultante se denominó MDA-468 ErbB-2. Las células de control de MDA-468 portaban un vector de expresión sin inserto y MDA-468 PM expresaba una proteína ErbB-2 en la que la tirosina 1248 se había sustituido por fenilalanina (12). Bajo condiciones estándares de cultivo celular, se redujo la expresión de Cyr61 en MDA-468 ErbB-2 en comparación con el control de MDA-468. Tras la exposición a condiciones hipóxicas, los valores de expresión de Cyr61 en MDA-ErbB-2 se redujeron todavía más. En comparación con el control de MDA-468, MDA-ErbB-2 y MDA-468 PM mostraron una atenuación de la inducción de vimentina bajo condiciones hipóxicas. Lo anterior se confirmó a nivel celular mediante tinción inmunofluorescente para vimentina (figura 7C, D).

En efecto, el modelo celular de los presentes inventores contiene un error sistemático, ya que en MDA-468 sin vector de expresión, Cyr61 se encontraba regulado negativamente bajo hipoxia (figura 5B), mientras que para el control de MDA-468, no se observó lo anterior (figura 7A). Por lo tanto, los presentes inventores confirmaron la regulación negativa de Cyr61 en un grupo independiente de estirpes celulares (figura 7E). Se seleccionó la estirpe celular de cáncer de mama BT20 y tres estirpes celulares de carcinoma de células escamosas de cáncer de cabeza y cuello. Para la totalidad de las cuatro estirpes celulares, se observó la inducción de ErbB-2 bajo hipoxia con regulación negativa concomitante de Cyr61.

Además, la estimulación de EGF del control de MDA-468 y de MDA-468 ErbB-2 condujo a una inducción masiva de Cyr61 (figura 7F). Estos experimentos se llevaron a cabo bajo condiciones estándares de cultivo celular.

Ejemplo 7. Identificación de la secreción de Cyr61 en DTC.

Las células tumorales primarias pueden secretar Cyr61 al espacio extracelular. Sin embargo, no está claro si Cyr61 asimismo puede ser secretado por las CTC o DTC. Por lo tanto, se analizó el medio de cultivo celular de las DTC BC-M1 para la presencia de Cyr61 secretado (figura 8). Debido a que no podía excluirse que las células lisadas puedan liberar Cyr61, las células fueron tratadas con brefeldina (BFA) en paralelo. La BFA inhibe el transporte de las proteínas del retículo endoplasmático al aparato de Golgi. Para eliminar las células desprendidas del medio de cultivo celular, se centrifugó el medio de cultivo. La fracción soluble se denominó sobrenadante y los residuos insolubles se denominaron células desprendidas. Debido a que el tratamiento de BFA conduce a la activación de Grp78 (30), la inducción de Grp78 sirvió de control positivo.

Se detectaron niveles elevados de Cyr61 en el control de sobrenadante no tratado en comparación con la fracción tratada con BFA correspondiente, en MDA-231 y en BC-M1 (figura 8A, B). Además, el análisis de la proteína citoplasmática no secretada alfa-tubulina no reveló ninguna contaminación detectable de proteínas citoplasmáticas en la fracción sobrenadante, sugiriendo la detección de Cyr61 secretado en las estirpes celulares analizadas.

Para la inducción de una función biológica de Cyr61 secretado, las células requieren la presencia de receptores de Cyr61 adecuados. De entre una diversidad de diferentes receptores de Cyr61, el heterodímero de integrina αv e integrina $\beta 3$ (integrina $\alpha v \beta 3$) es uno de los receptores de Cyr61 mejor investigados (34). Por lo tanto, los presentes inventores determinaron la presencia de diferentes integrinas en las estirpes celulares con énfasis en el receptor integrina $\alpha v \beta 3$ de Cyr61 (figura 8C). Con la excepción de MCF-7, en la que la integrina $\beta 3$ no era detectable, todas las estirpes celulares investigadas presentaban los prerrequisitos estructurales para la formación

de un complejo Cyr61-integrina $\alpha\beta 3$ funcional. Las estirpes celulares de DTC mostraban niveles muy elevados de integrina αv e integrina $\beta 3$. Además, las subestirpes metastásicas óseas MDA-231, MDA-231 SA y MDA-231 B02 mostraban niveles elevados de integrina αv e integrina $\beta 3$ en comparación con la estirpe celular parental.

5 **Ejemplo 8. Establecimiento de un ensayo de inmunosorción ligada a enzima para la detección del inductor angiogénico rico en cisteína 61 (ELISA de Cyr61).**

10 Análisis de estirpes celulares mediante transferencia western. En primer lugar, se investigó si el anticuerpo anti-Cyr61 (anticuerpo anti-Cyr61 policlonal de conejo (H78), Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EE.UU.) era capaz de unirse a Cyr61 en solución líquida. Los presentes inventores establecieron una inmunoprecipitación (IP) de Cyr61 en los lisados celulares de BC-M1 y MDA-MB-231 (figura 9). Las estirpes celulares se cultivaron bajo condiciones estándares de cultivo. La proteína Cyr61 se capturó utilizando el anticuerpo de conejo anti-Cyr61 (H78) y se detectó en la transferencia western mediante un anticuerpo de ratón anti-Cyr61. Dichos datos muestran que Cyr61 puede aislarse de las muestras líquidas con el anticuerpo anti-Cyr61 (H78).

15 A continuación, se comparó la calidad del anticuerpo anti-Cyr61 (H78) con un anticuerpo anti-Cyr61 de Cell Signalling (CST) mediante transferencia western (figura 10A). Se analizaron los lisados celulares de cuatro estirpes celulares diferentes de niveles variables de Cyr61. Ambos anticuerpos detectaron una señal en una masa molecular de aprox. 40 kDa, que en ambos casos era la señal predominante en las transferencias western. El anticuerpo H78 proporcionó señales más claras con menos señales de fondo que el anticuerpo de CST, en particular en lisados celulares con niveles bajos de Cyr61, tales como MDA-MB-468. En los análisis cuantitativos de las transferencias western, se detectaron las señales de Cyr61 más altas para BC-M1 utilizando el anticuerpo H78, mientras que para el anticuerpo CST, los valores más altos se observaron para MDA-MB-231. Debido a que para todos los experimentos se utilizaron los mismos lisados celulares, es improbable que dicho efecto sea el resultado de un efecto biológico. Posiblemente, lo anterior podría deberse a los límites de precisión de la medición, ya que se solapan las barras de error para los valores de MDA-MB-231 y BC-M1. Alternativamente, dicho efecto podría deberse a diferentes sitios de reconocimiento en Cyr61 por los dos anticuerpos diferentes. Debido a que el anticuerpo H78 proporciona señales con menos ruido de fondo, se utilizó dicho anticuerpo para el establecimiento del ELISA.

20 El anticuerpo H78 se analizó adicionalmente mediante aplicación de Cyr61 recombinante humano en una serie de dilución (figura 10B). Las transferencias western mostraron una banda en una masa molecular de aproximadamente 40 kDa tanto en los lisados celulares como en las muestras de proteína Cyr61 recombinante. Las masas moleculares observadas son compatibles con una masa molecular predicha de péptido procesado (péptido de señal cortado) de aprox. 39.5 kDa.

25 Para las muestras con Cyr61 recombinante, se observaron señales adicionales en una masa molecular de aprox. 90 kDa. Debido a que Cyr61 posee cinco puentes disulfuro, dichas señales podrían ser dímeros de Cyr61 que no pudieron cortarse por completo en la preparación de las muestras.

30 En tiempo de exposición prolongada de las películas radiográficas, se detectaron señales inespecíficas débiles en las estirpes celulares. Bajo dichas condiciones, las señales de Cyr61 específicas explican la parte principal de la señal total, aunque se vuelven detectables señales inespecíficas. En particular, el lisado celular de MCF-7 no proporcionó una señal de Cyr61 específica detectable y el fondo no específico más alto de entre las estirpes celulares analizadas. Debido a que este resultado resulta crucial para el establecimiento del ELISA de Cyr61, asimismo se aplicaron 40 μg de lisado celular de MCF-7 para visualizar el fondo inespecífico en dicha estirpe celular. A partir de las intensidades de señal de la serie de dilución de Cyr61 recombinante (figura 10B), se derivó una curva de calibración (figura 11A). Se representaron gráficamente las intensidades de señal [unidades arbitrarias] de las cantidades de proteína Cyr61 conocida y se derivó una curva de calibración (ajuste lineal).

35 Se determinó la ecuación lineal como $y=2.5678x$ (ecuación 1), en la que 'y' es la cantidad de proteína Cyr61 [μg] y 'x' es la intensidad de señal en las películas radiográficas.

40 La aplicación de la ecuación 1 a las intensidades de señal de Cyr61 determinadas en los lisados celulares de las estirpes celulares (figura 10B) permitió el cálculo de la cantidad de proteína Cyr61 en los lisados celulares (10 μg de proteína total). Los valores medios calculados de cantidad de proteína Cyr61 de los tres experimentos eran:

45 MCF-7: 0.1 ng \pm 0.4 ng
 50 MDA-MB-468: 6.5 ng \pm 5.4 ng
 55 MDA-MB-231: 23.9 ng \pm 14.3 ng y
 60 BC-M1: 32.8 ng \pm 12.5 ng.

65 Por lo tanto, 10 μg de lisado celular de BC-M1 contienen aprox. 33 ng de Cyr61, que es 0.33 por ciento de la cantidad total de proteínas.

Al contrario que para los ELISA de Cyr61 (ver posteriormente), los valores de las intensidades de señal de Cyr61

en MCF-7 no se restaron como fondo inespecífico respecto de las intensidades de señal de Cyr61 de las demás estirpes celulares debido a que las proteínas de los lisados celulares se habían separado según su masa. Lo anterior permitió la discriminación de las señales inespecíficas de las señales específicas de Cyr61 en dichos experimentos.

Análisis técnicos de las estirpes celulares mediante ELISA de Cyr61. Análogamente a los análisis de los lisados celulares mediante transferencia western, se analizó Cyr61 mediante ELISA. En primer lugar, se generó en una serie de dilución una curva de calibración con cantidades proteicas conocidas de Cyr61 recombinante (figura 11B). Se determinó que la ecuación lineal era:

$$y=64.104x + 0.467 \text{ (ecuación 2),}$$

en la que 'y' es la cantidad de proteína Cyr61 [μ g], 'x' es la intensidad de señal en las películas radiográficas y el valor fijo 0.467 es la ordenada en el origen.

Se observó en los análisis de transferencia western que MCF-7 es una estirpe celular sin señales de Cyr61 detectables, aunque son cierto grado de fondo inespecífico. Con el fin de investigar lo anterior adicionalmente, se analizó una serie de lisados de células MCF-7 con cantidades crecientes de proteína. Se observaron los valores de DO405 nm siguientes:

Cantidad aplicada de proteína de lisado de células MCF-7 [μ g]	Valor medio (n=3) DO405 nm	Desviación estándar de los valores de DO405
0	0.002896656	0.000754309
2.5	0.071150015	0.003339141
5	0.151973335	0.003518485
10	0.261973327	0.00317575
20	0.454233329	0.006123999

Estos datos muestran que la cantidad de fondo inespecífico es proporcionan a la cantidad aplicada de proteína del lisado celular. La aplicación de la ecuación 2 al valor de 10 μ g de MCF-7 como ejemplo resulta en un valor de 17.26 ng \pm 0.67 ng de Cyr61, que puede considerarse un falso positivo (valor de fondo) para Cyr61 en MCF-7.

Con el fin de someter a ensayo la idea de que los valores de las muestras de MCF-7 pueden restarse de las muestras que deben analizarse para obtener la cuantificación de Cyr61 sin ruido de fondo, los presentes inventores añadieron a las muestras de 10 μ g de lisados celulares de MCF-7 cantidades diferentes de proteína Cyr61 recombinante y determinaron el valor de DO405. A partir de dichos valores, se restó el valor de DO405 previamente determinado para 10 μ g del lisado celular de MCF-7 (0.261973327) y después se aplicó la ecuación 2 a los valores. Los valores resultantes se presentan en las columnas 4 y 5:

a 10 μ g de lisado celular de MCF-7 se añadió Cyr61 recombinante [μ g]	Valor medio (n=3) DO405 nm	Desviación estándar de los valores de DO405	Cantidad calculada de proteína Cyr61 [ng] tras la sustracción de MCF-7 (valores medios)	Cantidad calculada de proteína Cyr61 [ng] tras la sustracción de MCF-7 (desviación estándar)
0	0.238639767	0.007433709	-1.03	0.94
1	0.27349667	0.002929	1.21	0.65
2.5	0.311413361	0.000727006	3.64	0.51
5	0.354000014	0.004590354	6.37	0.76
10	0.42162001	0.008609143	10.70	1.02
20	0.513366677	0.005907896	16.58	0.85
50	0.903566639	0.003611554	41.60	0.70
100	1.857266665	0.001929598	102.73	0.59
200	3.53030001	0.008883117	209.98	1.04

La comparación de los valores obtenidos (columna 4) con los valores de entrada (columna 1) muestra que los valores de Cyr61 falsos positivos se han eliminado en gran medida.

El propósito principal del establecimiento del ELISA de Cyr61 eran los análisis de los sobrenadantes de cultivo celular para analizar la Cyr61 secretada. Por lo tanto, los presente inventores analizaron los sobrenadantes del cultivo celular de MCF-7.

Debido a que Cyr61 no era detectable en los lisados celulares de MCF-7 analizados mediante transferencia western, los presentes inventores asumieron que Cyr61 no es sintetizado por MCF-7 (o sólo a niveles muy bajos). Por lo tanto, es probable que Cyr61 no resulta secretado por MCF-7, de manera que el sobrenadante puede

ES 3 006 332 T3

aplicarse para la sustracción del fondo de similar a los experimentos realizados con los lisados celulares.

Análogamente a los experimentos sobre los lisados celulares (figura 11B), para los análisis de los sobrenadantes de cultivo celular, se generó una curva de calibración utilizando Cyr61 recombinante (figura 11C).

5

La ecuación resultante para la curva de calibración era:

$$y=63.528x + 1.1162 \quad (\text{ecuación 3})$$

10 en la que 'y' es la cantidad de proteína Cyr61 [µg], 'x' es la intensidad de señal (DO405 nm) en el lector de ELISA y el valor fijo de 1.1162 es la ordenada en el origen.

Se sometió a ensayo si el valor de DO405 para los sobrenadantes de cultivo celular de MCF-7 era proporcional al volumen aplicado [µl] de sobrenadante de cultivo.

15

Sobrenadante de cultivo celular aplicado de MCF-7 [µl]	Valor medio (n=3) DO405 nm	Desviación estándar de los valores de DO405
0	0.0018903	0.000472051
50	0.016325	0.000990123
100	0.028531999	0.000410819

De manera similar a los resultados de los experimentos realizados en las estirpes celulares, el valor de DO405 nm se incrementa con cantidades crecientes del sobrenadante del cultivo de células MCF-7. La aplicación del valor de 50 µl del sobrenadante del cultivo de MCF-7 a la ecuación 3 proporciona una cantidad calculada de proteína Cyr61 (falso positivo) de 2.15 ng ± 1.18 ng de Cyr61 en esa muestra.

20

A continuación, se sometió a ensayo si los valores de las muestras de MCF-7 pueden sustraerse de las muestras que deben analizarse para obtener la cuantificación de Cyr61 sin ruido de fondo. Por lo tanto, los presentes inventores añadieron a muestras de 50 µl de sobrenadantes de cultivo celular de MCF-7, proteína Cyr61 recombinante. A partir de los valores obtenidos, se sustrajo el valor de DO405 previamente determinado para 50 µl de sobrenadante de MCF-7 (0.016325) y después se aplicó la ecuación 3 a los valores. Los valores resultantes se presentan en las columnas 4 y 5:

25

A 50 µl de sobrenadante del cultivo de MCF-7 se añadió Cyr61 recombinante [µg].	Valor medio (n=3) DO405 nm	Desviación estándar de los valores de DO405	Cantidad calculada de proteína Cyr61 [ng] tras la sustracción de MCF-7 (valores medios)	Cantidad calculada de proteína Cyr61 [ng] tras la sustracción de MCF-7 (desviación estándar)
0	0.015379	0.000195517	-1.18	1.13
1	0.052273333	0.003801922	1.17	1.36
2.5	0.073559566	0.002990397	2.52	1.31
5	0.117190335	0.003245137	5.29	1.32
10	0.183230014	0.005838419	9.49	1.49
20	0.269056667	0.003035627	14.94	1.31
50	0.782196652	0.003402488	47.54	1.33
100	1.620499986	0.005436908	100.79	1.46
200	3.16052621	0.000862133	198.63	1.17

30 La comparación de los valores obtenidos (columna 4) con los valores de entrada (columna 1) muestra que los valores de Cyr61 falsos positivos se han eliminado en gran medida.

Debido a que dichos resultados sugieren que los niveles de Cyr61 pueden determinarse con precisión en muestras de cultivo celular, se aplicó dicho procedimiento a nuevos grupos de muestras de estirpe celular. Nuevamente, se generó una curva de calibración utilizando Cyr61 recombinante (figura 11D). La ecuación resultante para la curva de calibración era:

35

$$y=63.914x + 0.4226 \quad (\text{ecuación 4})$$

40

en la que 'y' es la cantidad de proteína Cyr61 [µg], 'x' es la intensidad de señal (DO405 nm) en el lector de ELISA y el valor fijo de 0.4226 es la ordenada en el origen.

A continuación, se analizaron 50 µl de sobrenadante de cultivo celular de las estirpes celulares MCF-7, MDA-MB-468, MDA-MB-231 y BC-M1 (columna 1, posteriormente). El valor para los sobrenadantes de MCF-7 se sustrajo

45

ES 3 006 332 T3

de los valores de las otras estirpes celulares y se aplicó la ecuación 4 a los valores resultantes. La cantidad de proteína Cyr61 [ng] se muestra en la columna 4:

Se analizó la estirpe celular en 50 µl de sobrenadante de cultivo.	Valor medio (n=3) DO405 nm	Desviación estándar de los valores de DO405	Cantidad calculada de proteína Cyr61 [ng] tras la sustracción de MCF-7 (valores medios)	Cantidad calculada de proteína Cyr61 [ng] tras la sustracción de MCF-7 (desviación estándar)
MCF-7	0.018244	0.00081034	-	-
MDA-MB-468	0.154306665	0.0030896	9.12	0.57
MDA-MB-23	0.547366622	0.00508453	34.24	0.70
BC-M1	0.705300052	0.00939629	44.34	0.97

5 Por lo tanto, 50 µl de sobrenadante de cultivo celular de BC-M1 contenían $44.3 \text{ ng} \pm 1.0 \text{ ng}$ de Cyr61.

10 Se evaluó la calidad de dichos valores mediante adición de 50 ng de Cyr61 recombinante a 50 µl de los sobrenadantes individuales de cultivo celular y se analizaron nuevamente. En este caso, se procesó el valor de MCF-7, debido a que se habían añadido 50 ng de Cyr61 a las muestras. Por lo tanto, al igual que para las demás estirpes celulares, del valor medio de MCF-7, se sustrajo el valor anterior del sobrenadante de cultivo celular (0.018244). A lo anterior le siguió la aplicación de la ecuación 4 a los valores de la totalidad de las 4 estirpes celulares. Los valores esperados son la suma de los valores previamente calculados para Cyr61 y los 50 ng añadidos de Cyr61 recombinante añadido. ejemplo BC-M1: $44.3 \text{ ng} + 50 \text{ ng} = 94.3 \text{ ng}$:

Estirpe celular cuyos 50 µl de sobrenadante de cultivo recibió la adición de 50 ng de Cyr61 recombinante.	Valor medio (n=3) DO405 nm	Desviación estándar de los valores de DO405	Cantidad calculada de proteína Cyr61 [ng] tras la sustracción de MCF-7 (valores medios)	Cantidad calculada de proteína Cyr61 [ng] tras la sustracción de MCF-7 (desviación estándar)	Valor esperado de proteína Cyr61 [ng]
MCF-7	0.714863333	0.00455625	44.95	0.66	50
MDA-MB-468	0.836704498	0.00571979	52.73	0.74	59.1
MDA-MB-231	1.283070001	0.00246919	81.26	0.53	84.2
BC-M1	1.573926803	0.0069443	99.85	0.81	94.3

15 Se llevaron a cabo experimentos correspondientes con los lisados celulares de las muestras. Se aplicaron cinco µg de proteína de los lisados celulares. Se sustrajo el valor de MCF-7 de los valores de las demás estirpes celulares y se procesaron los valores resultantes mediante la utilización de la ecuación 4:

5 µg de extracto de células completas analizado a partir de	Valor medio (n=3) DO405 nm	Desviación estándar de los valores de DO405	Cantidad calculada de proteína Cyr61 [ng] tras la sustracción de MCF-7 (valores medios)	Cantidad calculada de proteína Cyr61 [ng] tras la sustracción de MCF-7 (desviación estándar)
MCF-7	0.094796667	0.0026035	-	-
MDA-MB-468	0.263613331	0.00594331	11.21	0.64
MDA-MB-231	0.845366674	0.00507125	48.39	0.58
BC-M1	1.06184969	0.00588954	62.23	0.63

20 Por lo tanto, 5 µg de lisado de células completas de BC-M1 contienen $62.2 \text{ ng} \pm 0.6 \text{ ng}$ de Cyr61.

25 De manera similar a los sobrenadantes de cultivo celular, se llevó a cabo una evaluación de la calidad mediante la adición de 50 ng de Cyr61 recombinante a las muestras. A partir de las muestras, se sustrajo el valor anterior de MCF-7 (0.094796667) y se calculó la cantidad de proteína [ng] mediante la ecuación 4:

5 µg de extracto de células completas con adición de 50 ng de Cyr61 recombinante analizado a partir de	Valor medio (n=3) DO405 nm	Desviación estándar de los valores de DO405	Cantidad calculada de proteína Cyr61 [ng] tras la sustracción de MCF-7 (valores medios)	Cantidad calculada de proteína Cyr61 [ng] tras la sustracción de MCF-7 (desviación estándar)	Valor esperado de proteína Cyr61 [ng]
MCF-7	0.79160334	0.00588954	44.96	0.63	50

ES 3 006 332 T3

MDA-MB-468	1.0157129	0.00220473	59.28	0.40	61.2
MDA-MB-231	1.583993323	0.00542196	95.60	0.60	98.4
BC-M1	1.817249991	0.00690779	110.51	0.70	112.2

5 Aunque la cantidad calculada de Cyr61 en dichas muestras en MCF-7 es inferior a lo esperado (45 ng detectados vs. 50 ng esperados), los valores esperados para las tres otras muestras concuerdan bien con los valores observados (por ejemplo, 110.5 ng calculados vs. 112 ng esperados para BC-M1). Lo anterior apoya la idea de que el ELISA de Cyr61 es una herramienta adecuada para los análisis cuantitativos de los niveles de Cyr61 en lisados de células completas y sobrenadantes de cultivo celular.

10 Debido a que la cantidad de proteína Cyr61 puede determinarse en términos de ng en las muestras, resulta posible calcular la cantidad de moléculas de Cyr61 en la muestra. El cálculo se presenta en la muestra del sobrenadante de BC-M1, que proporcionó un valor de 44 ng de Cyr61. El cálculo se llevó a cabo para Cyr61 procesado con el péptido de señal cortado:

15 Datos: $m(\text{Cyr61})=44 \text{ ng}$ y $M(\text{Cyr61})=39438.4 \text{ g/mol}$
 Buscados: n (cantidad de sustancia [moles]).
 La ecuación era: $m=n \times M$
 Rendimientos de transformación: $n=m/M$
 Inserción de los valores: $n=44 \text{ ng} \times 39438.4 \text{ g/mol}$
 Rendimientos: $n=1,12 \times 10^{-12}$ moles.

20 La multiplicación de la cantidad de sustancia por la constante de Avogadro proporciona el número de moléculas Cyr61 en la muestra:

25 Número de moléculas= 1.12×10^{-12} moles $\times 6,022 \times 10^{23}$
 Número de moléculas= 6.77×10^{11}

Por lo tanto, 50 μl del sobrenadante de BC-M1 contenía 6.77×10^{11} moléculas de Cyr61 en dicha muestra.

30 Procedimientos análogos de cálculo proporcionan los valores siguientes para los otros sobrenadantes de cultivo celular (para un volumen de 50 μl de sobrenadante de cultivo celular):

sobrenadante de cultivo celular de BC-M1. $6.77 \times 10^{11} \pm 1.48 \times 10^{10}$ moléculas,
 sobrenadante de cultivo celular de MDA-MB-231. $5.23 \times 10^{11} \pm 1.06 \times 10^{10}$ moléculas,
 sobrenadante de cultivo celular de MDA-MB-468. $1.39 \times 10^{11} \pm 8.68 \times 10^9$ moléculas.

35 El cálculo de los lisados celulares proporciona las cantidades siguientes de moléculas de Cyr61 en 5 μg de lisado celular:

40 Lisado de células BC-M1: $9.50 \times 10^{11} \pm 9.66 \times 10^9$ moléculas.
 Lisado de células MDA-MB-231: $7.39 \times 10^{11} \pm 8.86 \times 10^9$ moléculas.
 Lisado de células MDA-MB-468: $1.71 \times 10^{11} \pm 9.71 \times 10^9$ moléculas.

45 Estos análisis se refieren únicamente a problemas técnicos en la determinación de Cyr61. Los análisis de Cyr61 secretado al sobrenadante de cultivo celular que permiten llegar a conclusiones biomédicas se describen en la sección siguiente.

50 La comparación de los resultados de transferencia western con los resultados obtenidos mediante ELISA mostraron que ambos enfoques proporcionaban valores comparables. Las diferencias entre ambos enfoques se deben principalmente a la menor sensibilidad del enfoque de transferencia western en comparación el ELISA, lo que puede observarse en las curvas de calibración con Cyr61 recombinante. En consecuencia, el intervalo dinámico del enfoque ELISA es mucho mayor que para los análisis de transferencia western. Además, las barras de error para las mediciones de ELISA eran mucho menores que para los análisis de transferencia western. Desde ese punto de vista, el ELISA es claramente superior al enfoque de transferencia western en términos de sensibilidad, rango dinámico y exactitud.

55 En contraste, la ventaja inherente del enfoque de transferencia western es la capacidad de discriminar entre las señales de Cyr61 específicas y las señales de fondo inespecíficas debido a la separación de las proteínas en el SDS PAGE. El enfoque de ELISA no contiene una etapa de fraccionamiento similar, por lo que resulta más difícil discriminar entre señales de Cyr61 verdaderas y fondo inespecífico. Este problema pudo ser gestionado por la aplicación del anticuerpo altamente específico anti-Cyr61 (H78) y mediante la introducción de una etapa de reducción de ruido de fondo. Por lo tanto, debe considerarse que los valores de Cyr61 para MCF-7 son iguales a cero por definición, aunque, después de la exposición masiva de las películas radiográficas tras la transferencia western, se detectaron señales muy débiles en el lisado de células MCF-7. Sin embargo, dichas señales asimismo podrían ser de unión inespecífica. Además, dicho modo de sustracción del fondo sólo incluye proteínas que se

encuentran presentes en el proteoma de MCF-7. Otras proteínas, por ejemplo, proteínas que podrían causar señales inespecíficas en MDA-MB-468, pero que están ausentes en MCF-7, no se consideran en este enfoque. Sin embargo, dicho enfoque proporciona valores fiables en el ELISA. Los análisis apoyan la idea de que a valores muy bajos de Cyr61, los valores calculados son ligeramente inferiores a sus valores reales. De esta manera, el ensayo de los presentes inventores presenta en cierta medida la tendencia a generar resultados falsos negativos antes que falsos positivos.

Análisis biológicos de las estirpes celulares mediante ELISA de Cyr61. Las mediciones de los valores de Cyr61 en las estirpes celulares mediante transferencia western se refieren a la cantidad aplicada de proteína en el SDS-PAGE. Debido a que dicho enfoque no resulta aplicable a las proteínas secretadas, se ha establecido un sistema de referencia estandarizado alternativo para Cyr61 secretado. Dicho sistema incluye el número de células y el tiempo de cultivo, de manera que puede determinarse la tasa de secreción de Cyr61 en forma de tasa de secreción de Cyr61 en número de moléculas de Cyr61 por célula y día.

Por lo tanto, se sembró un número definido de células. En tiempos definidos de cultivo, se recolectó el sobrenadante del cultivo celular y se determinó el número de células para cada punto temporal. Para el cálculo del número de moléculas de Cyr61 en las muestras, se analizó un patrón de Cyr61 recombinante y purificada. El cálculo del número de moléculas de Cyr61 se llevó a cabo tal como se ha indicado anteriormente. Los resultados de dichos análisis se muestran en la figura 12A. El número de moléculas de Cyr61 por célula considera el número de células para cada punto de medición, mientras que se calcula la concentración de Cyr61 con independencia del número de células. Para el punto temporal $t=0$, se añadió medio fresco a las células.

Las células secretaron rápidamente Cyr61 al medio (0 h vs. 24 h). Después, la concentración de Cyr61 se mantuvo notablemente constante durante el tiempo y aparentemente era específica para la estirpe celular individual.

Debido a la inesperada secreción rápida de Cyr61, se repitió el experimento para BC-M1 y MDA-MB-231 con modificaciones (figura 12B). En ese caso, después de cada 12 h, se sustituyó el medio de cultivo celular por medio fresco y se analizó el medio recolectado para Cyr61. Dichos datos muestran que BC-M1 y MDA-MB-231 son capaces de secretar más Cyr61 en 48 h que lo observado en la figura 12A bajo esas condiciones (por ejemplo, BC-M1, 0 h vs. 48 h: 772 ng/ml en la figura 12A y $469 + 463 + 527 + 527$ ng=1983 ng/ml en la figura 12B para 0 vs. 48 h). En particular, la tasa de secreción de Cyr61 se incrementó en MDA-MB-231 tras la extracción repetida de media durante el tiempo (figura 12B). En consecuencia, las células secretaron en 12 h prácticamente la cantidad de Cyr61 detectada en la figura 12A durante 24 h (figura 12A: 0 h vs. 24 h, 999 ng/ml y en la figura 12B: 48 h, 954 ng/ml).

Dichos datos sugieren que la concentración local de Cyr61 es bastante dependiente de la estirpe celular individual, más que del número de células. Dicho mantenimiento preciso de la concentración de Cyr61 podría implicar la existencia de un aparato de medición y control de Cyr61 en las células. Posiblemente, incluso las colonias pequeñas de células tumorales generan un microambiente local enriquecido en Cyr61 que circunda a las células. Debe considerarse que dichos valores de Cyr61 probablemente reflejan un estado estacionario con una síntesis nueva y degradación constantes de las moléculas de Cyr61.

Ejemplo 9. Mejora de un ensayo de inmunosorción ligada a enzima para la detección del inductor angiogénico rico en cisteína 61 (ELISA de Cyr61).

Estirpes celulares

Para la mejora del ELISA anteriormente indicado para la detección de inductor angiogénico rico en cisteína 61 (Cyr61), se aplicaron dos anticuerpos anti-Cyr61. Un anticuerpo era el anticuerpo policlonal de conejo anti-Cyr61 H78, que se generó contra los aminoácidos 163 a 240 de Cyr61 humana. El otro anticuerpo era el anticuerpo monoclonal de ratón anti-Cyr61 H2, que se generó contra los aminoácidos 345 a 381 de Cyr61 humana. Ambos anticuerpos eran de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EE.UU..

En primer lugar, se investigaron los perfiles de reconocimiento de Cyr61 de los anticuerpos H78 y H2 en un grupo de estirpes celulares mediante transferencia western (figura 13). Ambos anticuerpos mostraron una única banda en aprox. 40 kDa. Además, las distribuciones de las intensidades de señal de Cyr61 en las estirpes celulares eran similares para ambos anticuerpos.

A continuación, se investigó si el anticuerpo anti-Cyr61 (H78) era capaz de unirse a su diana Cyr61 en solución líquida. Por lo tanto, los presentes inventores establecieron una inmunoprecipitación (IP) de Cyr61 en el sobrenadante de cultivo celular de MDA-MB-231 (figura 14). La estirpe celular se cultivó bajo condiciones estándares de cultivo. La proteína Cyr61 se capturó utilizando el anticuerpo de ratón anti-Cyr61 (H2) y se detectó en la transferencia western mediante un anticuerpo de conejo anti-Cyr61 (H78). Para la IP de Cyr61, se aplicaron 200 μ l de sobrenadante de cultivo celular de MDA-MB-231 con una concentración de Cyr61 de 1.05 ng/ml, de esta manera, se aplicó una cantidad total de 210 ng de Cyr61. Se aplicó veinte por ciento del inmunoprecipitado para la transferencia western. La intensidad de la señal para Cyr61 inmunoprecipitado era comparable a la intensidad

de la señal de 50 ng de Cyr61 recombinante, sugiriendo que el rendimiento de Cyr61 aislado a partir del sobrenadante de cultivo es próximo a 100 por ciento.

5 Para el establecimiento del ELISA de Cyr61, se analizaron los anticuerpos H78 y H2. Se investigaron ambos anticuerpos mediante la aplicación de proteína Cyr61 recombinante humana en una serie de dilución y los lisados celulares (figura 15).

10 Las transferencias western mostraron una única banda en una masa molecular de aproximadamente 40 kDa en los lisados celulares para ambos anticuerpos. Las masas moleculares observadas son compatibles con una masa molecular predicha de péptido procesado (péptido de señal cortado) de aprox. 39.5 kDa. Para las muestras con Cyr61 recombinante, se observaron señales adicionales en una masa molecular de aprox. 80 kDa. Debido a que Cyr61 presenta cinco puentes disulfuro, dichas señales podrían ser dímeros de Cyr61 unidos mediante puentes disulfuro que no pudieron cortarse por completo en la preparación de las muestras. La comparación de las intensidades de señal obtenidas para Cyr61 recombinante con las de los lisados celulares de MDA-MB-231 y Hs578t permite una estimación de las cantidades de Cyr61 en los lisados celulares. En el caso del anticuerpo H78, las intensidades de señal en MDA-MB-231 y Hs578t corresponden a aproximadamente 1 ng de Cyr61. Debido a que se analizaron 10 µg de lisados celulares, un microgramo de lisado celular de MDA-MB-231 o Hs578t contendría 100 pg de Cyr61 según detección con el anticuerpo H78. De manera similar, mediante la aplicación del anticuerpo H2, los lisados celulares contendrían aproximadamente 2.5 ng de Cyr61 por cada 10 µg o 250 pg por cada 1 µg de lisado celular.

25 Debido a que los análisis de transferencia western sugieren que los anticuerpos anti-Cyr61 H78 y H2 podrían resultar adecuados para la aplicación en un ELISA, estos anticuerpos fueron adicionalmente evaluados. Los análisis de transferencia western mostraron niveles elevados de Cyr61 en MDA-MB-231 (MDA-231) y en Hs578t y señales no detectables en MCF-7 y SKBR3. Por lo tanto, dichas estirpes celulares fueron seleccionadas como controles positivos o negativos para el establecimiento del ELISA de Cyr61.

30 Para el análisis de ELISA de las estirpes celulares, se generó una curva de calibración con cantidades proteicas conocidas de Cyr61 recombinante en una serie de dilución (figura 16).

Se determinó que la ecuación lineal era:

$$y = 0.4118 + 0.0009 \quad (\text{ecuación 1})$$

35 en la que 'y' es la cantidad de proteína Cyr61 [ng], 'x' es la DO (densidad óptica) a 450 nm y el valor fijo 0.0009 es la ordenada en el origen. Se utilizó la ecuación 1 para la determinación de las cantidades de Cyr61 en los lisados celulares y sobrenadantes de cultivo celular de un grupo de muestras de ensayo (figura 17). En 5 µg de lisado celular de MDA-231 se detectaron 413 pg y en el lisado celular de Hs578t se detectaron 414 ng de Cyr61, mientras que en MCF-7 y SKBR3 no se observaron señales (figura 17A). Con el fin de confirmar que estas son señales específicas de Cyr61, se añadieron 500 ng de Cyr61 recombinante a las muestras. Después, el valor para MDA-231 se incrementó a 935 pg y para Hs578t, se detectó un valor de 930 pg. En el caso de MCF-7 y SKBR3, se detectaron 503 pg de Cyr61 en los lisados celulares respectivos tras la adición de 500 pg de Cyr61 recombinante a las muestras. Debido a que Cyr61 puede secretarse al espacio extracelular, podría ser posible que otras proteínas secretadas afectasen a la especificidad del ELISA. Con el fin de someter a ensayo si el ELISA discrimina específicamente Cyr61 de otras proteínas secretadas, se analizaron sobrenadantes de cultivo celular (figura 17B). Las estirpes celulares que eran positivas para Cyr61 citoplasmático asimismo eran positivas para Cyr61 en los sobrenadantes de cultivo celular (MDA-231 y Hs578t), mientras que las estirpes celulares que eran negativas para Cyr61 en el citoplasma (MCF-7 y SKBR3) asimismo eran negativas para Cyr61 en los sobrenadantes de cultivo celular. La adición de 500 pg de Cyr61 recombinante a los sobrenadantes de cultivo celular de dichas estirpes celulares incrementó los valores detectados de Cyr61 en aprox. 500 ng en cada estirpe celular.

55 Además, las cantidades detectadas de Cyr61 mediante ELISA podrían compararse con las detectadas mediante transferencia western. En MDA-231 y Hs578t se detectaron aproximadamente 100 pg/µg de Cyr61 utilizando el anticuerpo H78, mientras que utilizando el anticuerpo H2, las cantidades de Cyr61 fueron de 250 pg/µg de Cyr61 mediante transferencia western. El ELISA proporcionó valores de aproximadamente 83 pg/µg de Cyr61 para MDA-231 y Hs578t.

60 Con el fin de identificar potenciales señales inespecíficas en el ELISA, se analizaron adicionalmente el lisado celular y el sobrenadante de cultivo de la estirpe celular negativa para Cyr61, MCF-7. La ecuación resultante para la curva de calibración era:

$$y=0.40636 x + 0.00498 \quad (\text{ecuación 2})$$

65 en la que 'y' es la cantidad de proteína Cyr61 [ng], 'x' es la DO a 450 nm y el valor fijo 0.00498 es la ordenada en el origen (figura 18). Se utilizó la ecuación 2 para la determinación de las cantidades de Cyr61 en los lisados celulares y sobrenadantes de cultivo celular de un grupo de muestras de ensayo de MCF-7 (figura 19).

Las señales falsas positivas en el ELISA debidas a la unión inespecífica de proteína serán detectables como intensidades de señal que son proporcionales a la cantidad de proteína aplicada en MCF-7 (figura 19A). De hecho, se detectaron valores similares que eran independientes de la cantidad de proteína aplicada. La adición de cantidades diferentes de Cyr61 recombinante a 10 µg de lisado celular de MCF-7 proporcionó valores de Cyr61 ligeramente inferiores a lo esperado. Lo anterior sugiere que dicho ensayo presenta una tendencia a infrarrepresentar los valores de Cyr61 y que los valores de fondo en los lisados celulares de MCF-7 no se originan en la unión inespecífica. Se llevaron a cabo experimentos correspondientes para el sobrenadante de cultivo celular (figura 19B). El incremento de los volúmenes de los sobrenadantes de cultivo celular de MCF-7 mostró valores bajo constantes que podrían atribuirse a ruido de fondo. La adición de cantidades diferentes de Cyr61 recombinante a 20 µl de sobrenadante de cultivo celular refleja con exactitud las cantidades de Cyr61 dentro de los límites de precisión.

Se analizaron muestras de MDA-231 de una manera similar a las de MCF-7. La curva de calibración para las muestras de MDA-231 se muestra en la figura 20 y la curva de calibración presentaba la forma:

$$y=0.40669 x + 0.00279 \quad (\text{ecuación 3})$$

en la que 'y' es la cantidad de proteína Cyr61 [µg], 'x' es la intensidad de señal en el lector ELIA y el valor fijo 0.00279 es la ordenada en el origen.

Los análisis para los lisados celulares de MDA-231 se muestran en la figura 21A y para los sobrenadantes de cultivo se muestran en la figura 21B. Un microgramo de lisado celular de MDA-231 contenía 80 pg de Cyr61 en dichas mediciones (figura 21A), que podría servir de valor de referencia para los experimentos de adición con Cyr61 recombinante. Por ejemplo, tras la adición de 50 pg de Cyr61 recombinante a 1 µg de lisado celular de MDA-231, se detectaron 140 pg de Cyr61 en la muestra, que es 10 pg más de lo esperado. En el caso de los sobrenadantes de cultivo celular (figura 21), para 75 nl de sobrenadante de cultivo celular de MDA-231, se detectaron 93 pg de Cyr61. La adición de 75 nl de sobrenadante con 50 pg de Cyr61 recombinante proporcionó un valor de 151 pg de Cyr61, que era 8 pg de Cyr61 superior a lo esperado.

Potencialmente, para sobrenadantes de cultivo celular, el ELISA proporcionó valores ligeramente superiores a lo esperado en el caso de que la cantidad de Cyr61 sea baja. Lo anterior podría observarse en la serie de dilución del sobrenadante de cultivo de MDA-2231, en el que un incremento del volumen de muestra en un factor de 10 condujo a un incremento inferior a un factor de 10 de la cantidad calculada de Cyr61.

Muestras de pacientes.

Debido a que las muestras de plasma pueden contener otras proteínas diferentes de las de las muestras de cultivo celular, los presentes inventores investigaron si el ELISA de Cyr61 establecido podía aplicarse al análisis de muestras procedentes de pacientes. En primer lugar, se sometió a ensayo el estado de Cyr61 en el plasma de individuos de control sanos mediante transferencia western utilizando el anticuerpo H78 (figura 22). Lo anterior podría proporcionar información sobre la unión inespecífica del anticuerpo anti-Cyr61 a otras proteínas. Debido a que la aplicación de 100 µl de plasma sanguíneo resultó en la distorsión masiva de las bandas de gel de SDS (no representadas), los presentes inventores aplicaron una etapa de purificación de proteínas. Con el fin de confirmar que Cyr61 se recupera en dicha etapa de purificación, se añadieron 100 ng de Cyr61 recombinante a una alícuota de las muestras de paciente.

Sólo se detectaron señales inespecíficas débiles con una masa de aprox. 40 kDa en la muestra del donante nº 3. Las otras secciones de la película radiográfica no mostraron señales inespecíficas, sugiriendo que el plasma sanguíneo de las personas sanas muestra niveles solo muy bajos de Cyr61 soluble y que el anticuerpo anti-Cyr61 detecta específicamente Cyr61 en el suero sanguíneo.

A continuación, el ELISA de Cyr61 se aplicó al análisis de muestras de plasma procedentes de donantes sanos. La curva de calibración se muestra en la figura 23 y presentaba la forma $y=0.40982 x + 0.00283$ (ecuación 4), en la que 'y' es la cantidad de proteína de Cyr61 [ng] y 'x' es la intensidad de la señal en el lector de ELISA a 450 nm y el valor fijo de 0.00283 como ordenada en el origen.

Los análisis de muestras de plasma procedentes de individuos sanos femeninos de más de 50 años de edad se muestran en la figura 24. Dichos análisis mostraron que los valores de Cyr61 en el plasma son bajos en comparación con los del sobrenadante de cultivo de MDA-231. Además, las cantidades calculadas de Cyr61 en las muestras se redujeron con cantidades crecientes de plasma. Un motivo para este efecto es un valor de DO remanente pequeño después de la sustracción del fondo, ya que la sustracción del fondo no es perfecta en todos los casos. Debido a que dicho valor pequeño remanente asimismo se multiplica durante la conversión a nanogramos por mililitro, dicho valor remanente se incrementa a menos volúmenes de muestra.

Para el análisis de las muestras de plasma de pacientes de cáncer de mama, así como de personas de control

sanos, se analizaron 2.5 µl de plasma (figura 24). Dichos análisis sugieren la presencia de un valor de fondo de 1.1 ng/ml de Cyr61 que resulta de la sustracción imperfecta del fondo antes que de la presencia real de Cyr61 en las muestras. Además, dichos análisis sugieren que el resultado de medición de Cyr61 es próximo a cero en el caso de que se analice un gran volumen de plasma de individuos sanos.

El límite de detección del ELISA de Cyr61 se determina utilizando muestras de plasma de individuos de control femeninos sanos de más de 50 años de edad. Debido a que para el análisis de los pacientes de cáncer de mama se aplicaron 2.5 µl de plasma, los experimentos mostrados en la figura 25 asimismo se llevaron a cabo utilizando 2.5 µl de plasma. En dicho experimento, se añadió Cyr61 recombinante a muestras de plasma de individuos sanos y el valor de DO detectado se comparó con los valores de DO de plasma sin adición de Cyr61. Dichos análisis mostraron que la probabilidad de una discriminación correcta de muestras positivas para Cyr61 respecto de muestras negativas se reduce a menores cantidades de Cyr61. La cantidad más pequeña de Cyr61 que podía discriminarse significativamente ($p=0.05$, prueba t de Student) de una muestra negativa era de 1.3 pg de Cyr61 ($p=0.022$), mientras que no pudieron identificarse significativamente 0.6 pg de Cyr61 ($p=0.299$).

La aplicación de 1.3 pg de Cyr61 en 2.5 µl de plasma es una concentración de Cyr61 de 520 pg/ml. En el caso de 1.3 pg de Cyr61, la concentración calculada de Cyr61 era de 1.707 ng/ml. Para un volumen de plasma de 2.5 µl, se determinó un valor falso positivo de 1.109 ng/ml (figura 25). La sustracción de dicho valor falso positivo respecto del valor detectado proporciona la concentración de Cyr61 presente en la muestra: 1.707 ng/ml - 1.109 ng/ml = 0.598 ng/ml. Lo anterior es una desviación de 78 pg o una masa de 0.195 pg de Cyr61 con un límite de detección de 1.3 pg.

Estabilidad de Cyr61 en muestras de plasma.

Se analizó la estabilidad de Cyr61 en muestras de plasma procedentes de pacientes de cáncer de mama. Además, dichas mediciones proporcionaron una primera visión de la concentración de Cyr61 en el plasma de los pacientes de cáncer de mama (figura 26). El primer grupo de muestras comprendía muestras de plasma procedentes de pacientes de cáncer de mama sin signos visibles de metástasis manifiestas (estadio M0) que se adquirieron entre los años 1998 y 1999 (figura 26A). Los presentes inventores no pudieron evaluar los cambios potenciales de concentración de Cyr61 desde el tiempo de adquisición de las muestras hasta las primeras mediciones. Con el fin de identificar dichos cambios potenciales, se analizó un segundo grupo de muestras. El segundo grupo consistía en muestras de plasma recién obtenidas procedentes de pacientes de cáncer de mama metastásico en el tiempo del diagnóstico (M1, figura 26B) que se analizaron inmediatamente después de la obtención de las muestras de sangre en octubre de 2016. Todas las muestras se almacenaron a -80°C y se descongelaron para el análisis de la concentración de Cyr61 mediante la aplicación de 2.5 µl de plasma.

La primera medición de Cyr61 se llevó a cabo en octubre de 2016 y proporcionó concentraciones de Cyr61 en los pacientes de cáncer de mama M0 ($n=15$) de 1.5 a 223.6 ng/ml con un valor medio de 112.5 ± 71.5 ng/ml. En el caso de los pacientes de cáncer de mama M1 ($n=14$), las concentraciones de Cyr61 estaban comprendidas entre 58.3 ng/ml y 286.9 ng/ml, con un valor medio de 141.1 ± 78.1 ng/ml.

La concentración de Cyr61 en muestras de plasma recién adquiridas se determinó en el momento de la adquisición (octubre de 2016), en abril de 2017 y en agosto de 2017 (figura 26B). Globalmente, la concentración de Cyr61 se mantuvo notablemente constante durante el tiempo y era similar a la concentración inicial de Cyr61 (octubre de 2016) en las mediciones siguientes. La concentración inicial de Cyr61 en las muestras que se adquirieron entre 1998 y 1999 (figura 26A) era desconocida. En efecto, las concentraciones de Cyr61 determinadas en octubre de 2016, abril de 2017 y agosto de 2017 eran similares en cada muestra para cada punto temporal. Para la mayoría de las muestras, se observó un ligero incremento de las concentraciones de Cyr61 en las mediciones repetidas, que podría deberse a los avances graduales en la manipulación del ELISA durante el tiempo.

Dichos análisis sugieren que Cyr61 es muy estable en muestras de plasma por lo menos durante los primeros 10 meses después de la obtención, y los niveles de Cyr61 no resultan afectados por los ciclos de congelación-descongelación. Las muestras que se adquirieron en 1998 y 1999 mostraron un grado similar de estabilidad, al igual que las muestras recién analizadas. Por lo tanto, debido a la estabilidad de Cyr61, es concebible que las muestras de plasma puedan reflejar correctamente la concentración de Cyr61 en el momento de la adquisición de las muestras.

Conclusiones

El ELISA de Cyr61 establecido resulta adecuado para la detección de Cyr61 de muestras de estirpe celular (lisado de células completas y sobrenadantes de cultivo), así como de muestras procedentes de pacientes. Los componentes críticos de un ELISA: los dos anticuerpos primarios H2 y H78, mostraron unión específica a Cyr61 en dichas muestras utilizando proteína Cyr61 humana recombinante como control. En particular, ambos anticuerpos proporcionaron resultados cuantitativos similares en transferencias western en comparación el ELISA que mostraba que los presentes inventores han establecido un sistema muy homogéneo y robusto que puede utilizarse en diferentes aplicaciones.

Los datos sobre otros ELISA comerciales normalmente son secretos de empresa, mientras que los anticuerpos primarios se describen en el ensayo de los presentes inventores. La combinación de un anticuerpo monoclonal de ratón anti-Cyr61 con un anticuerpo de conejo anti-Cyr61 confiere al ensayo la especificidad requerida. Además, los sitios de reconocimiento de los dos anticuerpos de Cyr61 están claramente separados (aa 163 a 240 para H78 y aa 345 a 381 para H2), que permiten la detección específica de Cyr61 con alta sensibilidad y con un impedimento estérico minimizado.

Para el ELISA, los presentes inventores aplicaron el anticuerpo H2 como anticuerpo de captura que se une al Cyr61 presente en la muestra. Mediante la utilización de inmunoprecipitación, los presentes inventores pudieron mostrar que H2 es capaz de capturar aproximadamente 100% de la Cyr61 presente en la muestra.

El ELISA de los presentes inventores mostraba un rango dinámico lineal a través de varios órdenes de magnitud, por ejemplo, entre 1 y 1000 pg de Cyr61, que permitía la cuantificación fiable de Cyr61 de muestras muy diluidas a concentradas en un único experimento. El límite de detección del ELISA es inferior a 1.3 pg de Cyr61 en muestras de plasma. En la experiencia de los presentes inventores, dicha sensibilidad es sobradamente suficiente para analizar muestras de plasma de una diversidad de diferentes cánceres, tales como cáncer de mama, de próstata, de pulmón o de hígado. Un atributo interesante, que raramente se considera en otros ELISA, es el efecto de los valores falsos positivos que pueden originarse en la sustracción imperfecta del fondo en las muestras procedentes de pacientes (ver la figura 24). Los presentes inventores consideraron dicho efecto para las muestras de plasma y proporcionan una ecuación que tiene en cuenta dicho efecto. Estas investigaciones redujeron el número de resultados falsos positivos.

Además, los presentes inventores analizaron el ELISA para compatibilidad con diferentes sustancias potencialmente presentes en la muestra, tales como cócteles inhibidores de proteasa, urea, cloruro sódico, SDS y otros (resultados no representados), lo que les permitió diseñar y evaluar el ELISA según requisitos específicos de la muestra.

Debido a que el ELISA de los presentes inventores está diseñado a partir de los componentes indicados, resulta posible preparar las cantidades exactas de pocillos requeridos para un experimento individual, lo que incrementa la relación coste-eficiencia de los experimentos. Además, resulta posible almacenar los pocillos de ELISA a -20°C antes o después de la incubación de la muestra sin pérdida de intensidad de la señal, lo que incrementa la flexibilidad en el diseño experimental y apoya adicionalmente el diseño de configuraciones experimentales de mayor tamaño.

Ejemplo 10. Análisis de los niveles de *cyr61* en plasma sanguíneo de pacientes de cáncer de mama mediante ELISA de Cyr61. Debido a que el proteoma de las muestras de sangre difiere de las de las estirpes celulares de cáncer, los presentes inventores investigaron si el ELISA de Cyr61 establecido puede aplicarse al análisis de muestras de sangre. Para la detección de Cyr61 soluble en la sangre, se analizó el plasma sanguíneo.

En primer lugar, el estado de Cyr61 en el plasma de individuos de control sanos se sometió a ensayo mediante transferencia western (figura 12C). De manera similar a los análisis con estirpes celulares, lo anterior puede proporcionar información sobre la unión inespecífica del anticuerpo anti-Cyr61. Debido a que la aplicación de 100 µl de plasma sanguíneo resultó en la distorsión masiva de las bandas de gel de SDS, los presentes inventores aplicaron una etapa de purificación de proteínas para las muestras analizadas en la presente memoria. Con el fin de confirmar que Cyr61 se recupera en dicha etapa de purificación, se añadieron 100 ng de Cyr61 recombinante a una alícuota de las muestras de paciente.

Sólo se detectaron señales inespecíficas débiles con una masa de aprox. 40 kDa en la muestra del donante nº 3. Las otras secciones de la película radiográfica no mostraron señales inespecíficas, sugiriendo que el plasma sanguíneo de las personas sanas muestra niveles únicamente muy bajos de Cyr61 soluble y que el anticuerpo anti-Cyr61 detecta específicamente Cyr61 en el suero sanguíneo.

Tras la confirmación de la especificidad del anticuerpo anti-Cyr61 mediante transferencia western, se aplicó el ELISA de Cyr61 tal como se ha indicado anteriormente a muestras de plasma sanguíneo (figura 27). Para todos los ensayos realizados con material humano, se analizaron 100 µl de plasma por triplicado y se calcularon los valores de concentración de Cyr61 [ng/ml]. Las muestras procedentes de pacientes se analizaron sin una etapa de purificación de las proteínas. En primer lugar, se analizó el plasma de 14 individuos sanos arbitrariamente seleccionados (con independencia del sexo, edad, etc., figura 27A). Como valor de referencia, se analizaron 100 ng de Cyr61 recombinante.

Debido a que la proteína principal presente en el plasma sanguíneo es la albúmina, los presentes inventores analizaron además medio de cultivo celular que contenía 10% de suero de feto bovino purificado, que contiene albúmina bovina como componente proteico principal. Por lo tanto, el valor obtenido de 2.78 ± 0.26 ng/ml para el medio de cultivo celular podría considerarse un valor de fondo inespecífico.

Las concentraciones de Cyr61 calculadas en las muestras procedentes de personas de control sanas estaban comprendidas entre 2.27 ± 0.35 ng/ml y 5.71 ± 0.60 ng/ml. El valor medio de la totalidad de las 14 muestras era de 3.47 ± 1.40 ng/ml. Debido a que el cáncer de mama ocurre frecuentemente en mujeres de edad superior a 50 años, los presentes inventores analizaron muestras de sangre de 20 mujeres sanas de más de 50 años de edad en el tiempo de adquisición de las muestras de sangre (figura 27B). En dicho grupo, las concentraciones de Cyr61 en el plasma estaban comprendidas entre 1.93 ± 0.39 ng/ml y 3.98 ± 0.66 ng/ml. El valor medio de la totalidad de las 20 muestras era de 3.07 ± 0.26 ng/ml.

Análogamente, se analizaron los valores de Cyr61 en muestras de plasma procedentes de pacientes de cáncer de mama metastásico y de pacientes de cáncer de mama sin metástasis manifiesta en el tiempo del diagnóstico de tumor primario (M0) (figura 27C). El valor medio de Cyr61 de las muestras de pacientes de cáncer de mama metastásico (n=7) era de 115.4 ± 84.1 ng/ml. Los valores estaban comprendidos entre 56.6 ± 1.1 ng/ml y 297.4 ± 2.5 ng/ml en los pacientes individuales. Para los pacientes de cáncer no metastásico (estadio M0) (n=17), se detectó un valor medio para Cyr61 de 13.9 ± 0.49 ng/ml, y los valores estaban comprendidos entre 11.0 ± 0.8 ng/ml y 15.4 ± 1.2 ng/ml en los pacientes individuales.

Los niveles de Cyr61 entre todas las personas sanas analizadas (n=35) y todos los pacientes de cáncer analizados (M0 y M1; n=22) eran diferentes de manera estadísticamente significativa ($p=1.36 \times 10^{-5}$). Para la comparación entre los pacientes no metastásicos (M0, n=17) y los pacientes metastásicos (M1, n=7), se obtuvo un valor estadísticamente significativo de $p=3.70 \times 10^{-5}$.

Dichos análisis mostraron que el plasma sanguíneo de los pacientes de cáncer de mama mostraba valores elevados de Cyr61 en comparación con los controles sanos y los valores de Cyr61 se incrementaron durante el curso de la progresión metastásica.

El ELISA de Cyr61 puede aplicarse al análisis de muestras de plasma de pacientes de cáncer. Las muestras de plasma de personas de control sanas, en particular mujeres de más de 50 años, mostraron valores de Cyr61 muy bajos. Dichos valores eran comparables a los valores del medio de cultivo celular sin células tumorales, que se analizaron como control inespecífico. Sin embargo, los presentes inventores no han llevado a cabo una sustracción del fondo para los análisis de las muestras de plasma, de manera que los valores reales de las muestras humanas podrían ser ligeramente inferiores a los calculados.

Los presentes inventores recientemente modificaron el ELISA de Cyr61 por un ELISA de tipo sándwich. El protocolo optimizado se describe en la sección de métodos. Un ejemplo de dicho ensayo obtenido en los sobrenadantes de cultivo celular de MDA-MB-231 (control positivo) y MCF-7 (control negativo) se muestra en la figura 28. Dicho ensayo permitió la detección de Cyr61 en el sobrenadante de MDA-MB-231 en una cantidad de Cyr61 de 0.125 ng con significancia estadística ($p=0.031$, prueba t de Student). Para dichos experimentos, se aplicó un sobrenadante de cultivo celular de MDA-MB-231 con una concentración de Cyr61 de 1050 μ g/ml. Se determinó la concentración utilizando Cyr61 recombinante como patrón. Se aplicaron sobrenadantes de cultivo celular de MDA-MB-231 y MCF-7 en una serie de dilución. En el caso de los valores obtenidos de MDA-MB-231, se derivó una curva de calibración. Se aplicó dicha curva de calibración a una muestra de medio de cultivo celular en el que se habían añadido 0.5 ng de Cyr61 recombinante. La aplicación de la curva de calibración a la extinción de dicha muestra proporcionó un valor de 0.48 ng de Cyr61.

Como primera aplicación de dicho ensayo de Cyr61, los presentes inventores compararon las muestras de cinco pacientes de cáncer de mama desde el tiempo del diagnóstico y sin signos de metástasis manifiesta, con cinco muestras de individuos sanos. En los pacientes de cáncer de mama, los presentes inventores detectaron un valor medio de 10.3 ng/ml \pm 9.2 ng/ml y, en los individuos sanos, se observó un valor de 1.0 ng/ml \pm 0.4 ng/ml.

Para la detección de Cyr61 mediante ELISA, los componentes principales eran anticuerpo policlonal de conejo anti-Cyr61 (H78) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EE.UU.), anticuerpo monoclonal de ratón anti-Cyr61 (clon 365108) de R&D Systems (Minneapolis, EE.UU.) y un lector de ELISA (por ejemplo, NanoQuant infinite M200 pro, Tecan, Männedorf, Suiza, a longitudes de onda adecuadas para el sustrato individual aplicado). Los controles positivos son sobrenadantes de cultivo celular de MDA-MB-231 o Hs578t o Cyr61 humana recombinante disponible comercialmente (Abnova, Taipei, Taiwan). Los valores para los sobrenadantes de dichas estirpes celulares deben encontrarse comprendidos entre 0.9 y 1.4 μ l/ml. Los sobrenadantes de cultivo celular deben mantenerse por lo menos durante 48 h sobre las células. Los controles negativos pueden ser sobrenadantes de cultivo celular de MCF-7 o GI101 o medio de cultivo celular recién preparado. Un enfoque apropiado para el análisis de la muestra de plasma humano es la generación de una serie de dilución utilizando Cyr61 recombinante que se añade al plasma sanguíneo de personas de control sanas que se compara con plasma sanguíneo solo. Las concentraciones de Cyr61 en plasma sanguíneo habitualmente están comprendidas entre 1 ng/ml (personas sanas), 10 ng/ml (cáncer de mama sin metástasis) y 100 ng/ml (cáncer de mama metastásico).

A continuación, los presentes inventores investigaron la concentración de Cyr61 en muestras de plasma de pacientes de cáncer de mama utilizando un ELISA que comprendía los anticuerpos anti-Cyr61 H2 y H78 para la detección de Cyr61 (figura 24 y figura 25). Para la detección de Cyr61 soluble en la sangre, se analizó el plasma

sanguíneo. Debido a que el cáncer de mama ocurre frecuentemente en mujeres de edad superior a 50 años, los presentes inventores analizaron muestras de sangre de mujeres sanas de más de 50 años de edad en el tiempo de adquisición de las muestras de sangre. Los presentes inventores analizaron 2.5 µl de plasma sanguíneo de 786 pacientes de cáncer de mama y 124 mujeres sanas de más de 50 años de edad utilizando el ensayo de inmunoadsorción ligada a enzima (ELISA) de los presentes inventores, desarrollado específicamente para la detección de la proteína Cyr61. Las mujeres sanas mostraron una concentración de Cyr61 de 0.588 ± 0.187 ng/ml, mientras que los pacientes de cáncer de mama (n=786) presentaban concentraciones elevadas de Cyr61 de 25.6 ± 41.3 ng/ml. Notablemente, los pacientes con carcinoma ductal *in situ* (DCSI, n=74) o cáncer de mama de estadio T1 (n=386) mostraban niveles ya elevados de Cyr61 (31.8 ± 45.8 ng/ml y 29.0 ± 44.3 ng/ml, respectivamente). Debido a dicho claro patrón de Cyr61 entre pacientes de control sanos y pacientes de cáncer de mama, los presentes inventores a continuación determinaron la sensibilidad y especificidad de Cyr61 para la detección de cáncer de mama utilizando el análisis de ROC (figura 33). Para todos los pacientes de cáncer de mama, los presentes inventores determinaron una sensibilidad de 69.8% y una especificidad de 100%. Para los pacientes con cáncer de mama invasivo de estadio temprano (T1), la sensibilidad era de 71.5% y la especificidad asimismo era de 100%. Notablemente, el ensayo de los presentes inventores asimismo fue capaz de detectar incluso una lesión *in situ* de carcinoma ductal (DCSI) de mama con precisión similar (sensibilidad: 74.3%, especificidad: 100%). Dichas elevadas especificidades se debían al hecho de que todos los controles sanos eran virtualmente negativos para Cyr61.

Ejemplo 11. Expresión de Cyr61 en tejidos tumorales sólidos de pacientes de cáncer de mama.

Los presentes inventores evaluaron si la expresión de Cyr61 en tumor primario es un determinante de la diseminación de células tumorales a la médula ósea. Los presentes inventores llevaron a cabo inmunotinción de 147 tumores de mama primarios (figura 3A, tabla 2 en la figura 4) y correlacionaron los resultados con la presencia de DTC detectadas con el ensayo estandarizado de los presentes inventores (3). En total, 35 tumores (24%) mostraban señales de Cyr61 fuertes; 29 tumores (20%) mostraron señales moderadas, y 83 tumores (56%) mostraron señales de Cyr61 débiles o nulas. Resulta interesante que no se encontrara ninguna correlación significativa entre el estado de Cyr61 en el tumor primario y el estado de DTC.

Además, se observó tinción de Cyr61 en metástasis óseas de pacientes de cáncer de mama (figura 3B, n=4). Las células tumorales eran uniformemente positivas para Cyr61, mientras que el tejido normal circundante mostraba una tinción muy débil o ninguna señal en absoluto. Desafortunadamente, los tumores primarios correspondientes de los mismos pacientes no se encontraban disponibles.

Ejemplo 12. Expresión de Cyr61 en CTC/DTC de muestras clínicas.

A continuación, los presentes inventores analizaron la expresión de Cyr61 en DTC y CTC recién obtenidas de pacientes de cáncer. Con el fin de evaluar el potencial de Cyr61 como marcador de las células tumorales en médula ósea y sangre, se compararon los niveles de Cyr61 de las células de cáncer de mama con los de las células sanguíneas mononucleares o de células ósea de voluntarios sanos (figura 29). En un primer experimento, los presentes inventores analizaron células sanguíneas mononucleares mediante transferencia western (figura 29A) y encontraron que dichas células eran negativas para Cyr61. A continuación, las estirpes celulares se añadieron a modo de control positivo interno a células sanguíneas mononucleares (MDA-231 o BC-M1) o de médula ósea (MDA-231) de voluntarios sanos. Las señales de Cyr61 en MDA-231 y BC-M1 eran claramente diferentes en sangre o células de médula ósea (figura 29B). La evaluación técnica del método en un pequeño grupo de tres muestras de médula ósea de pacientes de cáncer de mama positivos para DTC reveló que pocas DTC mostraban señales de Cyr61, mientras que la mayoría de las DTC mostraba señales de Cyr61 muy débiles o indetectables (figura 29C).

Se consiguió una detección de Cyr61 sensible mediante una nueva técnica sin marcaje que enriquece las CTC según su tamaño y permite una detección de microscopía posterior fiable de incluso intensidades de señal de Cyr61 bajas (figura 30). Se detectaron células tumorales mediante tinción de citoqueratina (figura 30A) y la contratinción adicional de leucocitos con anticuerpos de CD45 garantizó la especificidad del ensayo, incluso en el caso en que la expresión de citoqueratina era débil (figura 30B), lo que resulta importante para detectar las CTC sometidas a un EMT.

A continuación, se aplicó dicho ensayo a muestras de sangre periférica de 33 pacientes de cáncer de mama. En total, se detectaron CTC en 8 casos y se observaron CTC positivas para Cyr61 en tres pacientes. De las 69 CTC de las tres pacientes, 17 células (25%) eran positivas para Cyr61. Se proporcionan datos de los análisis de Cyr61 en las CTC en la tabla 3 de la figura 32.

Las CTC con señales fuertes de Cyr61 mostraron comúnmente un patrón de tinción de citoqueratina fragmentado con solo focos citoplasmáticos positivos para citoqueratina claros y una intensidad de señal reducida (figura 30C, panel superior). En contraste, las CTC débilmente positivas para Cyr61 o negativas para Cyr61 mostraron un patrón de citoqueratina filamentoso con una elevada intensidad de señal en todo el citoplasma (figura 30C, panel inferior).

Con el fin de obtener un conocimiento más detallado de la dinámica de la expresión de Cyr61 en DTC y CTC, los presentes inventores simularon la diseminación de las células tumorales de microambientes hipóxicos al torrente sanguíneo. La semivida de las CTC en la sangre era de aproximadamente 1 a 2.4 h y tras 4 h, aproximadamente un tercio de las CTC todavía era detectable en la sangre (35). Las concentraciones de oxígeno en los vasos sanguíneos más grandes son de aproximadamente 10% de O₂. Por lo tanto, los presentes inventores cultivaron estirpes celulares bajo condiciones hipóxicas (1% de O₂) durante 14 días para estimular la hipoxia tumoral, seguido del sometimiento de dichas células a 10% de O₂ durante 4 h (figura 30D). La cuestión era si las CTC de microambientes hipóxicos alcanzan sitios secundarios más rápidamente que la respuesta de los niveles de Cyr61 en las CTC a la concentración de oxígeno incrementada en la sangre.

Los niveles de Cyr61 se alteraron masivamente bajo hipoxia persistente en comparación con las condiciones estándares de cultivo, en las que MDA-231 y BC-M1 indujeron fuertemente Cyr61 y MDA-468 reguló negativamente Cyr61. Bajo las condiciones de reoxigenación (1% de O₂ durante 14 días + 4 h de 10% de O₂ vs. 14 días de 1% de O₂) MDA-468 y MDA-231 mantuvieron niveles de Cyr61 prácticamente constantes, sugiriendo que los fenotipos de CTC correspondientes alcanzarían sitios secundarios con sólo alteraciones menores de los niveles de Cyr61. En contraste, BC-M1 regula negativamente Cyr61 en respuesta a la reoxigenación a 16% (1% de O₂ durante 14 días + 4 h de 10% de O₂ vs. 14 días de 1% de O₂) sugiriendo que las células con un fenotipo BC-M1 podrían alcanzar sitios distantes con otros fenotipos de Cyr61, diferentes de los fenotipos con los que iniciaron el pase.

El elevado valor diagnóstico de la detección de Cyr61 en muestras de pacientes se muestra para un paciente con cáncer de mama metastásico (paciente nº 6). Se llevó a cabo el análisis de Cyr61 soluble en sangre (figura 27C) y simultáneamente el análisis de Cyr61 en CTC (figura 17), y mostró que dicho paciente presentaba un nivel elevado de Cyr61, de 79.8 ± 4.5 ng/ml y CTC positivas para Cyr61 en la sangre.

25 Ejemplo 13. Comentario.

En el presente ejemplo los presentes inventores identificaron Cyr61 como una proteína relevante que responde con sensibilidad a las condiciones de estrés microambiental, tales como la hipoxia y el ayuno de glucosa en células de cáncer en diseminación. Mediante el análisis de muestras clínicas de pacientes de cáncer de mama, los presentes inventores documentaron la presencia de Cyr61 en el plasma sanguíneo, en células tumorales primarias, CTC, DTC y metástasis óseas manifiestas.

En los últimos años, el análisis de "biopsias líquidas" de células tumorales o material circulante (ADN, proteínas o exosomas) liberado por las células tumorales en la sangre periférica de pacientes de cáncer ha hecho un progreso notable (37). En un estudio reciente de Cohen et al., se ha informado de un notable progreso adicional mediante el desarrollo de un nuevo ensayo sanguíneo que combina el análisis de mutaciones del ADN circulante con la determinación de las proteínas asociadas a tumor en el suero (38). Sin embargo, la tasa de detección de los estadios tempranos de cáncer, que representa el objetivo del cribado del cáncer, sigue siendo un reto. En total, sólo 43% de los tumores de estadio I eran positivas. La tasa es incluso más baja en muestras de cáncer de mama, mientras que la sensibilidad incluyendo todos los estadios alcanzó únicamente el 33% (38). Lo anterior constituye un reto significativo debido a que es conocido que la detección precoz del cáncer puede reducir la mortalidad relacionada con el cáncer (39).

En contraste, los presentes inventores encontraron que las concentraciones de Cyr61 en el plasma sanguíneo ya presentan niveles elevados en los estadios tempranos del cáncer de mama en comparación con individuos de control sanos de sexo y edad correspondientes. El ensayo ELISA de los presentes inventores mostró un rendimiento superior en comparación con la mamografía, como herramienta estándar actual para el cribado del cáncer de mama. Para el subgrupo de DCSI, recientemente se ha informado de sensibilidades de 58% a 81% y especificidades de 72% a 79% utilizando la mamografía (40). Por lo tanto, el análisis de sólo 2.5 µl de plasma sanguíneo resulta suficiente para el ELISA de Cyr61 de los presentes inventores para discriminar entre un estado "sano" y un estadio temprano del cáncer de mama. El ensayo ELISA de Cyr61 es una alternativa simple y económica para los ensayos de biopsia líquida establecidos. En el futuro, el ensayo podría ser una herramienta útil que podría complementar y guiar la utilización de la mamografía en mujeres en programas de cribado de cáncer de mama.

La Cyr61 es una proteína citoplasmática de 42 kDa que puede secretarse al espacio extracelular y ya pueden observarse niveles de Cyr61 incrementados en el cáncer de mama temprano sin ningún signo de metástasis manifiestas distantes. Los presentes inventores pudieron mostrar que la detección de Cyr61 secretado en el plasma sanguíneo es de potencial uso diagnóstico para la detección precoz y evaluación de riesgo del cáncer de mama (ver posteriormente).

En el cáncer, Cyr61 participa en la diferenciación, migración y en la inducción de la angiogénesis o el control de la proliferación celular. En el cáncer de mama, se ha informado de que una expresión elevada de Cyr61 está asociada a una elevada invasividad en estirpes celulares y con formación de metástasis tras la inyección de dichas estirpes celulares en ratones.

En efecto, las proteínas podrían estar reguladas bajo estrés microambiental, como la hipoxia, que asimismo afecta a la inducción de atributos mesenquimatosos y a la diseminación de las células tumorales y la metástasis. Por lo tanto, los presentes inventores sometieron las estirpes celulares a 1% de O₂, que es el límite inferior de concentración de oxígeno en la médula ósea. Además, 1% de O₂ resulta suficiente para estabilizar HIF-1 α en la mayoría de células humanas. Con la excepción de BC-M1 y Hs578t, todas las estirpes celulares analizadas regularon negativamente Cyr61 bajo dichas condiciones. En BC-M1 y Hs578t, la regulación negativa de Cyr61 sólo se observó con una estabilización fuerte de HIF-1 α con el tratamiento de Co²⁺. Lo anterior sugiere que 1% de O₂ podría no resultar suficiente para inducir una estabilización robusta de HIF-1 α y la posterior regulación negativa de Cyr61 en dichas células. Por lo tanto, las DTC con un fenotipo de Hs578t y BC-M1 son capaces de mantener niveles de Cyr61 en el microambiente de la médula ósea y son detectables mediante la expresión de Cyr61. Dicho resultado resulta de particular interés, ya que Hs578t y BC-M1 muestran un fenotipo mesenquimatoso que sólo es débilmente positivo para las proteínas marcadores epiteliales (12).

Además, los presentes inventores observaron una coexpresión frecuente de Cyr61 y PD-L1 en estirpes celulares de entidades tumorales que se diseminan mediante expansión hematogena o mediante expansión linfática. Los presentes inventores todavía no han investigado la relación funcional entre PD-L1 y Cyr61. Sin embargo, la coexpresión de Cyr61 y PD-L1 sugiere que las células positivas para Cyr61 están bien protegidas de la eliminación por las células inmunitarias. Por lo tanto, la detección de una expresión fuerte de Cyr61 en las CTC o DTC de pacientes de cáncer de mama, próstata, pulmón, así como de cabeza y cuello, podría ser una indicación de la citoprotección frente al reconocimiento por células inmunitarias. Los niveles elevados de Cyr61 y PD-L1 en una estirpe celular metastásica cerebral de MDA-231 sugiere que Cyr61 no sólo podría participar en la metástasis al hueso, sino asimismo a otros sitios distantes, en particular el cerebro. La metástasis cerebral resulta de especial interés en la terapia de la metástasis del cáncer de mama, ya que anticuerpos terapéuticos como la herceptina no pueden cruzar la barrera hematoencefálica.

Los presentes inventores conocen a partir de su propia experiencia experimental que la detección de Cyr61 con anticuerpos (transferencia western e inmunocitoquímica) es mucho más sensible y robusta que la detección de PD-L1 con anticuerpos. Por lo tanto, la detección de Cyr61 en CTC y DTC asimismo podría ser un marcador sustitutivo adecuado para la capacidad de las CTC y DTC de escapar a la destrucción por células inmunitarias.

Todas las estirpes celulares de cáncer pancreático analizadas eran positivas para Cyr61, sugiriendo la expresión frecuente de Cyr61 en el cáncer pancreático. En particular, los presentes inventores observaron niveles elevados de Cyr61 en la estirpe celular de cáncer pancreático con atributos mesenquimatosos Panc1 y niveles bajos de Cyr61 en BxPC3 (fenotipo epitelial). Al contrario que entidades tumorales tales como el cáncer de mama y de próstata, la extensión metastásica con frecuencia se produce mediante diseminación peritoneal en el cáncer pancreático. En el cáncer pancreático, EMT y la diseminación ya pueden producirse en el estadio inflamatorio de la pancreatitis; de esta manera, en un estadio premaligno del cáncer pancreático. Por lo tanto, resulta posible que Cyr61 resulte regulado positivamente durante EMT en el estadio de pancreatitis y que Cyr61 resulte adecuado para detectar enfermedades pancreáticas ya en el estadio inflamatorio.

Con el fin de validar los estudios *in vitro* de los presentes inventores, se evaluaron los niveles de proteína Cyr61 en especímenes clínicos mediante inmunohistoquímica. La puntuación de la intensidad de tinción reveló que 24% de los tumores de mama primarios mostraban una expresión fuerte de Cyr61, que es similar a observaciones anteriores por otros grupos. La expresión de Cyr61 no estaba correlacionada con la detección de DTC en médula ósea, lo que podría explicarse en la regulación versátil de Cyr61 según las condiciones microambientales reales.

Los presentes inventores a continuación se concentraron en la expresión de Cyr61 en células de cáncer en diseminación de pacientes de cáncer de mama. Para detectar Cyr61 en CTC, se desarrollaron ensayos de inmunotinción multiplex sensibles, que permitieron a los presentes inventores detectar incluso células tumorales con bajos niveles de Cyr61. Los presentes inventores observaron una marcada heterogeneidad de los niveles de Cyr61 en las CTC, tanto respecto a la variabilidad entre pacientes como a la variabilidad intrapaciente. Dicho resultado podría reflejar el hecho de que las CTC derivan de diversos sitios y podrían encontrarse con diversas condiciones microambientales que afectan a la expresión de Cyr61. Para la detección de la citoqueratina en CTC/DTC, los presentes inventores aplicaron en este caso un cóctel de anticuerpos pan-citoqueratina de amplio espectro. Dicho cóctel resulta adecuado para detectar citoqueratina en las estirpes celulares de DTC con expresión regulada negativamente de citoqueratinas típicas de los adenocarcinomas (12, 29). Resulta interesante que no se observaron células positivas para Cyr61/negativas para citoqueratina, concordando con un resultado anterior de que las células de cáncer de mama que no presentan proteínas de citoqueratina en absoluto son muy infrecuentes (32). Además, subraya la ausencia de Cyr61 en células hematopoyéticas y apunta a la potencial utilidad de Cyr61 como marcador de CTC/DTC.

Los resultados de los presentes inventores apoyan la visión de que las células tumorales en diseminación pueden experimentar una transición fluida de características epiteliales a mesenquimatosas, mientras que una conversión completa a un fenotipo totalmente mesenquimatoso de las células de adenocarcinoma se produciría de manera infrecuente (o nunca) *in situ*. Conjuntamente, los presentes resultados apoyan la visión de que la expresión de Cyr61 en las células de cáncer de mama podría subyacer a diversas influencias reguladoras durante el paso del

sitio primario al sitio metastásico, y Cyr61 citoplasmático en el tumor primario, por lo tanto, no es un buen indicador de los cambios adaptativos requeridos para la supervivencia y expansión metastásica.

Los presentes inventores observaron que las células sanguíneas y de médula ósea normales muestran niveles extremadamente bajos de Cyr61, lo que podría permitir el desarrollo adicional de Cyr61 como marcador de detección de CTC y DTC con atributos mesenquimatosos. Dichas células con frecuencia son omitidas por los ensayos actuales, basados en antígenos epiteliales, lo que podría explicar los resultados falsos negativos. Por lo tanto, se necesitan urgentemente nuevos marcadores de mCTC y mDTC. La detección de Cyr61 en células tumorales con atributos mesenquimatosos podría apoyar la identificación de mCTC/mDTC.

Más importante de cara al futuro uso diagnóstico, el plasma sanguíneo de personas sanas de edades correspondientes mostraba niveles muy bajos de Cyr61 secretado, detectado con el ELISA de Cyr61 en comparación con valores significativamente superiores en pacientes de cáncer de mama. Dicho resultado importante sugiere que los niveles elevados de Cyr61 en el plasma sanguíneo son un atributo de las células de cáncer de mama.

En todas las estirpes celulares analizadas, los presentes inventores encontraron que la cantidad de Cyr61 secretada es proporcional a la cantidad de Cyr61 citoplasmático. Por lo tanto, resulta plausible que las estirpes celulares de entidades de cáncer que son positivas para Cyr61 citoplasmático, tal como cáncer de pulmón, próstata, cabeza y cuello o pancreático, asimismo secretan Cyr61. Debido a que el grupo de donantes sanos reunido arbitrariamente mostraba niveles muy bajos de Cyr61, los presentes inventores esperaban detectar niveles elevados de Cyr61 en el plasma sanguíneo de los pacientes de cáncer de otras entidades diferentes de cáncer de mama.

Todas las muestras de plasma analizadas que se obtuvieron de pacientes de cáncer en el tiempo del diagnóstico eran positivas para Cyr61, mientras que los presentes inventores clasificaron 56% de los tumores primarios como débilmente positivos o negativos para Cyr61 en la micromatriz de tejidos. Un motivo para lo anterior podría ser los diferentes métodos de detección, con diferentes sensibilidades para Cyr61 (inmunohistoquímica vs. ELISA). Aunque las moléculas de Cyr61 se extienden en la superficie del portaobjetos en el caso de la IHQ, el ELISA integra las señales de todas las moléculas de Cyr61 en 100 µl de muestra en un único valor de DO. Dicho enfoque ELISA podría incrementar la sensibilidad, conduciendo a más mediciones positivas para Cyr61, pero no podría discriminar entre células individuales positivas y negativas para Cyr61.

Además, las células tumorales pueden secretar considerables cantidades de Cyr61 al espacio extracelular; en particular, bajo condiciones de persistente intercambio de fluidos, se secretan cantidades elevadas de Cyr61. En los pacientes, lo anterior sería similar a una situación en la que las células tumorales se encuentran próximas a vasos sanguíneos. Lo anterior podría llevar a una retirada constante de Cyr61 y a la inducción de la secreción de Cyr61 por las células tumorales. Bajo dichas condiciones, la Cyr61 naciente podría secretarse inmediatamente, de manera que Cyr61 no podría acumularse dentro de las células. Por lo tanto, la sensibilidad del ELISA junto con la secreción de Cyr61 bajo condiciones de intercambio de líquidos podría permitir la detección de Cyr61 en el plasma sanguíneo, aunque las células tumorales muestren niveles bajos de Cyr61 o aunque las colonias de células tumorales sean relativamente pequeñas.

Por lo tanto, la detección basada en ELISA de Cyr61 en el plasma sanguíneo podría resultar adecuada para la detección precoz del cáncer de mama, lo que podría ayudar a reducir el número de mamografías en los programas actuales de cribado de mujeres de más de 50 años de edad. Lo anterior podría reducir considerablemente los costes sanitarios y los potenciales efectos secundarios causados por la radiación. Además, los presentes inventores mostraron que los niveles de CYR61 se incrementan con la progresión tumoral (es decir, valores más altos en pacientes M1 vs. pacientes M0), indicando un potencial uso como marcador basado en sangre para evaluar y monitorizar el riesgo de progresión a metástasis, la causa principal de muerte relacionada con el cáncer, y para monitorizar la eficacia de las terapias antimetastásicas (36).

Referencias

1. Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 2004;4(6) :448-56.
2. Pantel K, Alix-Panabieres C, Riethdorf S. Cancer micrometastases. *Nat Rev Clin Oncol* 2009;6(6):339-51.
3. Janni W, Vogl FD, Wiedswang G, Synnestvedt M, Fehm T, Juckstock J, et al. Persistence of disseminated tumor cells in the bone marrow of breast cancer patients predicts increased risk for relapse--a European pooled analysis. *Clin Cancer Res* 2011;17(9):2967-76.
4. Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL, Smas ME, Ting DT, et al. Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition. *Science* 2013; 339(6119):580-4.
5. Alix-Panabieres & Pantel, Challenges in Circulating Tumor Cell Research, *Nature Reviews*, vol. 14, 2014,

- 623-631.
6. US 2004/0086504.
- 5 7. US 2011/0189700.
8. Sun et al., Involvement of Cyr61 in Growth, Migration and Metastasis of Prostate Cancer Cells, *British Journal of Cancer*, vol. 99, 2008, 1656-1667.
- 10 9. Lin et al., Elevated Expression of Cyr61 Enhances Peritoneal Dissemination of Gastric Cancer Cells Through Integrin $\alpha 2\beta 1$, *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, 2007, 34594-34604.
- 15 10. Bendas & Borsick, Cancer Cell Adhesion and Metastasis, Selectins, Integrins and the Inhibitory Potential of Heparins, *International Journal of Cell Biology*, vol. 2012, 1-10.
11. Pantel K, Dickmanns A, Zippelius A, Klein C, Shi J, Hoechtlen-Vollmar W, et al. Establishment of micrometastatic carcinoma cell lines: a novel source of tumor cell vaccines. *J Natl Cancer Inst* 1995;87(15):1162-8.
- 20 12. Bartkowiak K, Effenberger KE, Harder S, Andreas A, Buck F, Peter-Katalinic J, et al. Discovery of a novel unfolded protein response phenotype of cancer stem/progenitor cells from the bone marrow of breast cancer patients. *J Proteome Res* 2010;9(6):3158-68.
- 25 13. Pollari S, Kakonen SM, Edgren H, et al. Enhanced serine production by bone metastatic breast cancer cells stimulates osteoclastogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 125: 421-430.
14. Peyruchaud O, Winding B, Pecheur I, et al. Early detection of bone metastases in a murine model using fluorescent human breast cancer cells: application to the use of the bisphosphonate zoledronic acid in the treatment of osteolytic lesions. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 2027-2034.
- 30 15. Dittmar T, Husemann A, Schewe Y, Nofer JR, Niggemann B, Zanker KS, et al. Induction of cancer cell migration by epidermal growth factor is initiated by specific phosphorylation of tyrosine 1248 of c-erbB-2 receptor via EGFR. *FASEB J* 2002;16(13):1823-5.
- 35 16. Lehtinen L, Vainio P, Wikman H, Reemts J, Hilvo M, Issa R, et al. 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase associates with poor prognosis in breast cancer, induces epithelial-mesenchymal transition, and promotes cell migration in cultured breast cancer cells. *J Pathol* 2012;226(4):674-86.
- 40 17. Bartkowiak K, Wiczorek M, Buck F, Harder S, Moldenhauer J, Effenberger KE, et al. Two-dimensional differential gel electrophoresis of a cell line derived from a breast cancer micrometastasis revealed a stem/progenitor cell protein profile. *J Proteome Res* 2009;8(4):2004-14.
- 45 18. Neuhoff V, Arold N, Taube D, et al. Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 1988; 9: 255-262.
- 50 19. Kohlbacher O, Reinert K, Gropf C, et al. TOPP--the OpenMS proteomics pipeline. *Bioinformatics* 2007; 23: e191-197.
20. Sturm M, Bertsch A, Gropf C, et al. OpenMS - an open-source software framework for mass spectrometry. *BMC Bioinformatics* 2008; 9: 163.
- 55 21. Geer LY, Markey SP, Kowalak JA, et al. Open mass spectrometry search algorithm. *J Proteome Res* 2004; 3: 958-964.
22. Fenyo D, Beavis RC. A method for assessing the statistical significance of mass spectrometry-based protein identifications using general scoring schemes. *Anal Chem* 2003; 75: 768-774.
- 60 23. Nahnsen S, Bertsch A, Rahnenfuhrer J, et al. Probabilistic consensus scoring improves tandem mass spectrometry peptide identification. *J Proteome Res* 2011; 10: 3332-3343.
24. Yuan Y, Hilliard G, Ferguson T, et al. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha. *J Biol Chem* 2003; 278: 15911-15916.
- 65 25. Mazel M, Jacot W, Pantel K, Bartkowiak K, Topart D, Cayrefourcq L, Rossille D, Maudelonde T, Fest T, Alix-

- Panabières C. Frequent expression of PD-L1 on circulating breast cancer cells. *Mol Oncol*. 2015 Jun 9. doi: 10.1016/j.molonc.2015.05.009. [Epub ahead of print].
- 5 26. Barsoum IB, Smallwood CA, Siemens DR, et al. A mechanism of hypoxia-mediated escape from adaptive immunity in cancer cells. *Cancer Res* 2014; 74: 665-674.
27. Yachida S, Iacobuzio-Donahue CA. The pathology and genetics of metastatic pancreatic cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2009 Mar;133(3):413-22.
- 10 28. Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, Maitra A, Bailey JM, McAllister F, Reichert M, Beatty GL, Rustgi AK, Vonderheide RH, Leach SD, Stanger BZ. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation. *Cell*. 2012 Jan 20;148(1-2):349-61.
- 15 29. Effenberger KE, Borgen E, Eulenburger CZ, Bartkowiak K, Grosser A, Synnestvedt M, et al. Detection and clinical relevance of early disseminated breast cancer cells depend on their cytokeratin expression pattern. *Breast Cancer Res Treat* 2011;125(3):729-38.
- 20 30. Dery MA, Jodoin J, Ursini-Siegel J, Aleynikova O, Ferrario C, Hassan S, et al. Endoplasmic reticulum stress induces PRNP prion protein gene expression in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2013; 15(2):R22.
31. Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, et al. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353(8):793-802.
- 25 32. Willipinski-Stapelfeldt B, Riethdorf S, Assmann V, Woelfle U, Rau T, Sauter G, et al. Changes in Cytoskeletal Protein Composition Indicative of an Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Micrometastatic and Primary Breast Carcinoma Cells. *Clin Cancer Res* 2005;11(22):8006-14.
- 30 33. Bartkowiak, K., Kwiatkowski, M., Buck, F., Gorges, T. M., et al., Disseminated Tumor Cells Persist in the Bone Marrow of Breast Cancer Patients through Sustained Activation of the Unfolded Protein Response. *Cancer Res* 2015, 75, 5367-5377.
- 35 34. Vellon, L., Menendez, J.A. and Lupu, R. (2005) AlphaVbeta3 integrin regulates heregulin (HRG)-induced cell proliferation and survival in breast cancer. *Oncogene*, 24, 3759-3773.
- 35 35. Meng, S., Tripathy, D., Frenkel, E.P., Shete, S., Naftalis, E.Z., Huth, J.F., Beitsch, P.D., Leitch, M., Hoover, S., Euhus, D., Haley, B., Morrison, L., Fleming, T.P., Herlyn, D., Terstappen, L.W., Fehm, T., Tucker, T.F., Lane, N., Wang, J. and Uhr, J.W. (2004) Circulating tumor cells in patients with breast cancer dormancy. *Clin Cancer Res*, 10, 8152-8162.
- 40 36. Bidard, F.C., Peeters, D.J., Fehm, T., Nole, F., Gisbert-Criado, R., Mavroudis, D., Grisanti, S., Generali, D., Garcia-Saenz, J.A., Stebbing, J., Caldas, C., Gazzaniga, P., Manso, L., Zamarchi, R., de Lascoiti, A.F., De Mattos-Arruda, L., Ignatiadis, M., Lebofsky, R., van Laere, S.J., Meier-Stiegen, F., Sandri, M.T., Vidal-Martinez, J., Politaki, E., Consoli, F., Bottini, A., Diaz-Rubio, E., Krell, J., Dawson, S.J., Raimondi, C., Rutten, A., Janni, W., Munzone, E., Caranana, V., Agelaki, S., Almici, C., Dirix, L., Solomayer, E.F., Zorzino, L., Johannes, H., Reis-Filho, J.S., Pantel, K., Pierga, J.Y. and Michiels, S. (2014) Clinical validity of circulating tumour cells in patients with metastatic breast cancer: a pooled analysis of individual patient data. *Lancet Oncol*, 15, 406-414
- 45 37. Bardelli A and Pantel K. Liquid Biopsies, What We Do Not Know (Yet). *Cancer Cell*. 2017; 31(2):172-179]
- 50 38. J. D. Cohen et al., *Science* 10.1126/science.aar3247 (2018)]
39. Heidi Ledford. Simple blood test detects eight different kinds of cancer. *Nature*. 18 January 2018]
- 55 40. Aminololama-Shakeri S et al. Can Radiologists Predict the Presence of Ductal Carcinoma In Situ and Invasive Breast Cancer? *AJR Am J Roentgenol*. 2017; Apr; 208(4) : 933-939]

REIVINDICACIONES

1. Método de detección de cáncer de mama que comprende:
- 5 (a) obtener una muestra de plasma a partir de un sujeto;
(b) determinar la concentración de Cyr61 en la muestra;
(c) comparar la concentración de Cyr61 en la muestra de prueba con la concentración de Cyr61 en una
muestra de referencia;
en el que Cyr61 es Cyr61 soluble;
- 10 en el que el cáncer de mama es detectado si la concentración de Cyr61 en la muestra de prueba es superior
que en la muestra de referencia;
en el que la determinación de la concentración de Cyr61 comprende la detección mediante ELISA, y
en el que el ELISA es un ELISA de tipo sándwich que utiliza dos anticuerpos anti-Cyr61 humana que se
unen a unos epítomos de Cyr61 distintos.
- 15 2. Método de detección de cáncer de mama según la reivindicación 1, en el que los epítomos de Cyr61 distintos
unidos por los anticuerpos anti-Cyr61 humana diferentes están separados mediante por lo menos 50 aminoácidos,
o separados mediante por lo menos 75, 85 o 100 aminoácidos.
- 20 3. Método de detección de cáncer de mama según la reivindicación 1 o 2, en el que la muestra de referencia es
una muestra de plasma de mujeres sanas de más de cincuenta años de edad.

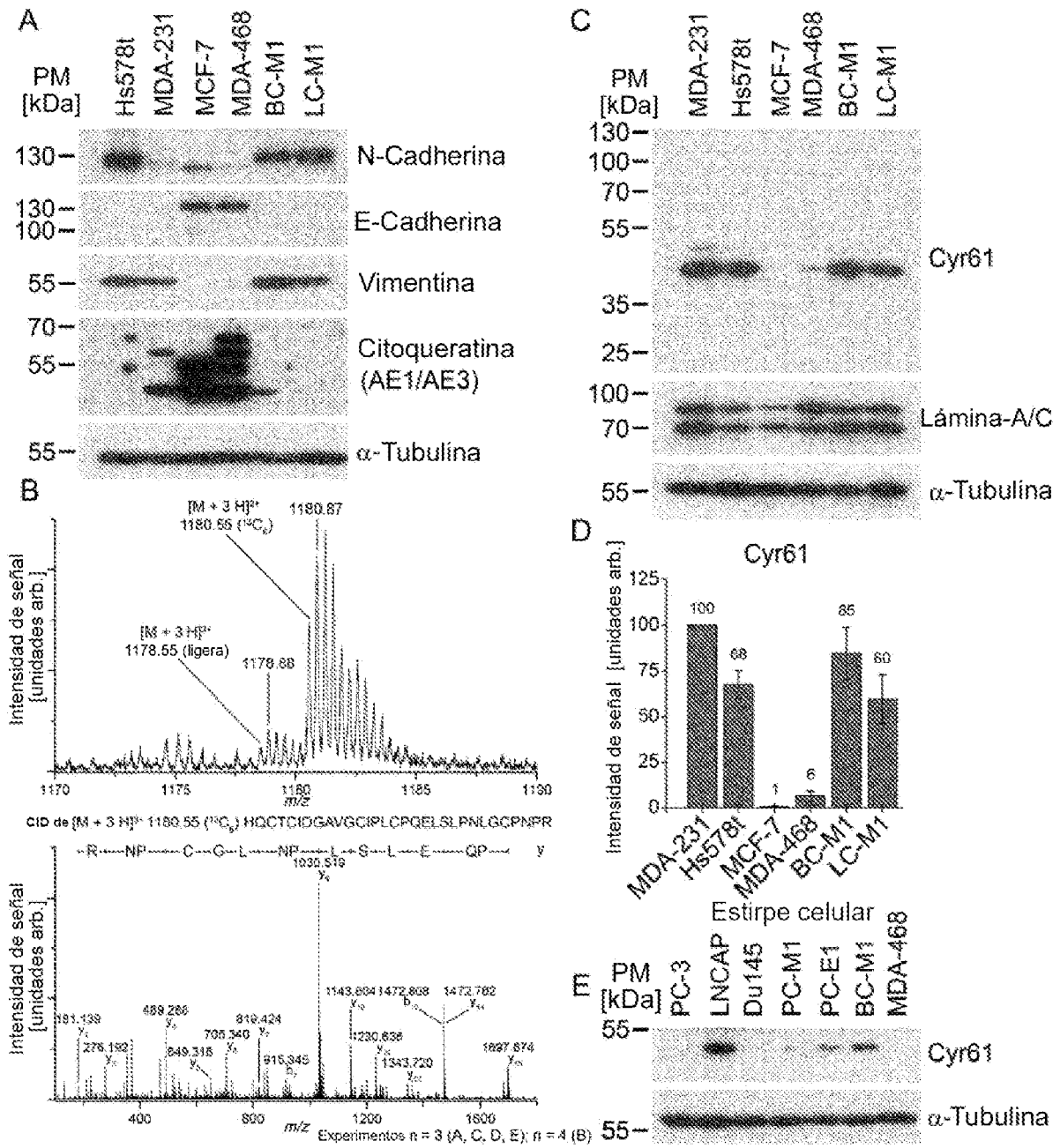


Figura 1

Tabla 1

nº acc. de Swiss-prot	nombre de proteína recomendado por UniProtKB/Swiss-Prot (nombre corto)	número total de péptidos analizados	número de péptidos diferentes analizados	número de réplicas biológicas	valor medio*	desviación estándar	valor de p*
O00622	Proteína CYR61 / inductor angiogénico rico en cisteína 61 (Cyr61)	6	2	4	5.23 ⁵	1.66	8.46 x 10 ⁻⁷
P02545	Lámina-A/C	112	20	4	-1.05	0.21	0.003

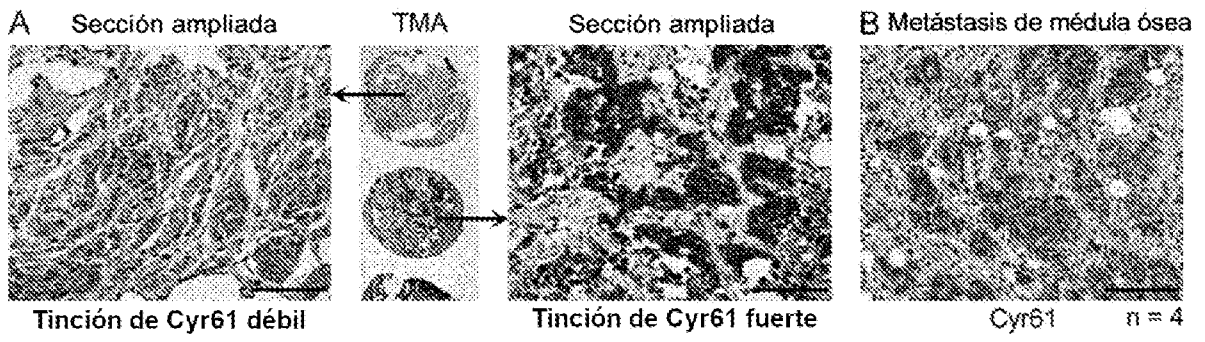


Figura 3

Tabla 2

Cáncer de mama	Cyr61 débil (puntuación 0)		Cyr61 moderado (puntuación 1)		Cyr61 fuerte (puntuación 2)		valor de p*
	n	%	n	%	n	%	
Todos^a	83	56	29	20	35	24	-
Histología							0.242
Ductal infiltrante	67	79	23	79	23	62	
Lobular infiltrante	11	13	3	10	9	24	
otros	7	8	3	10	5	14	
Estado de DTC (médula ósea)							0.157
positivo	19	23	9	31	14	40	
negativo	64	77	20	69	21	60	
Estado de menopausia							0.942
posmenopáusico	54	64	19	66	28	76	
premenopáusico	25	30	10	34	9	24	
otros	5	6	0	0	0	0	
Estadio							0.323
T ₁	40	48	16	62	24	65	
T ₂	34	40	10	34	13	35	
T ₃	3	4	0	0	0	0	
T ₄	7	8	1	3	0	0	
Estado de ganglio linfático							0.035
positivo	39	46	6	21	12	32	
negativo	45	54	23	79	25	68	
Gradación							0.002
G1	3	60	34	57	45	74	
G2	1	20	19	24	9	15	
G3	1	20	27	34	7	11	
Estado de receptor hormonal (ER + PR)							0.123
positivo	60	71	24	83	32	86	
negativo	25	29	5	17	5	14	
Estado de ErbB-2							0.397
positivo	1	1	1	4	2	6	
negativo	72	99	25	96	33	94	
Subtipado							0.222
positivo para ER+PR	51	68	21	81	28	82	
triple negativo	21	26	4	15	5	15	
positivo para ErbB2	3	4	1	4	1	3	

Figura 4

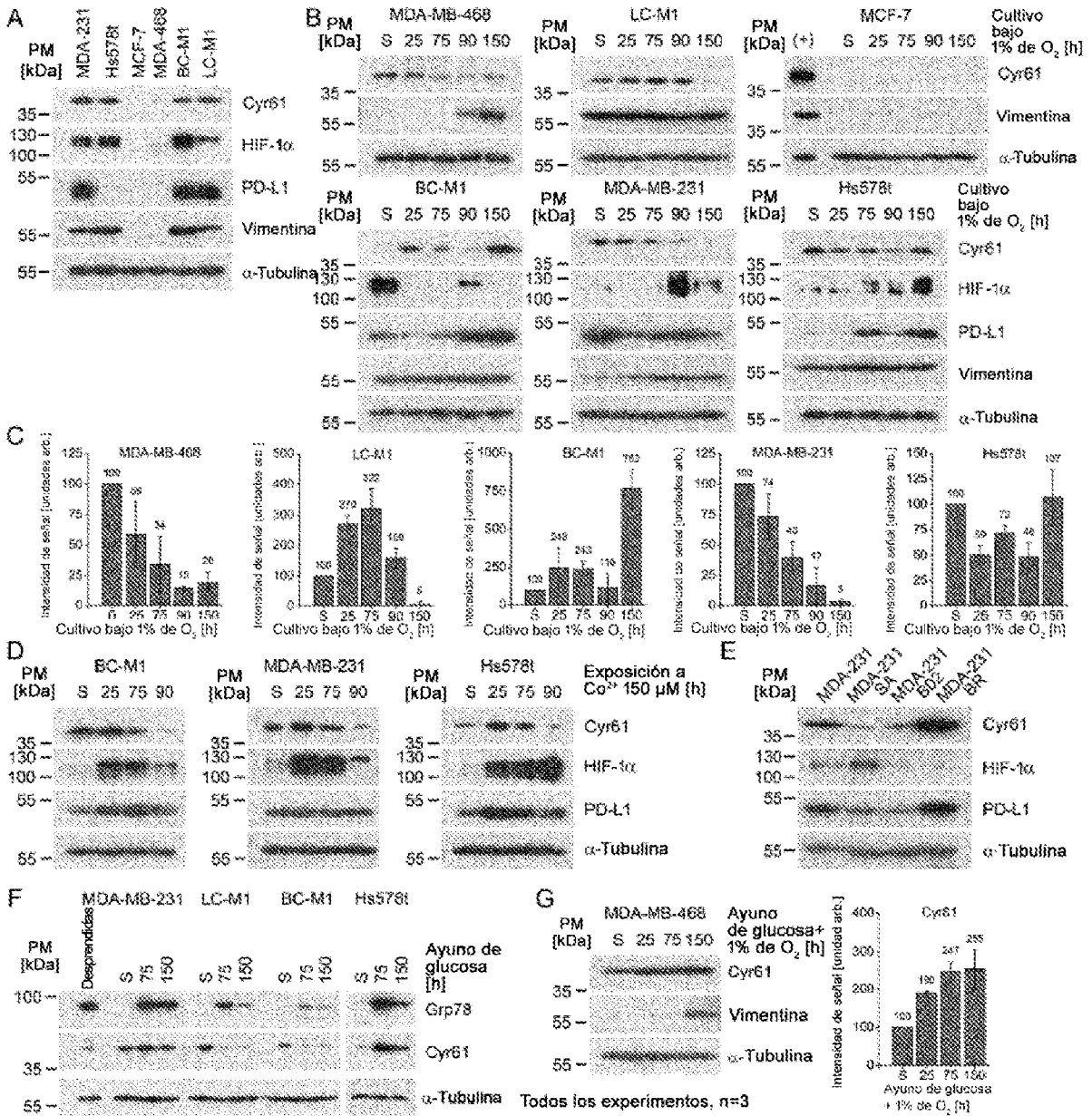


Figura 5

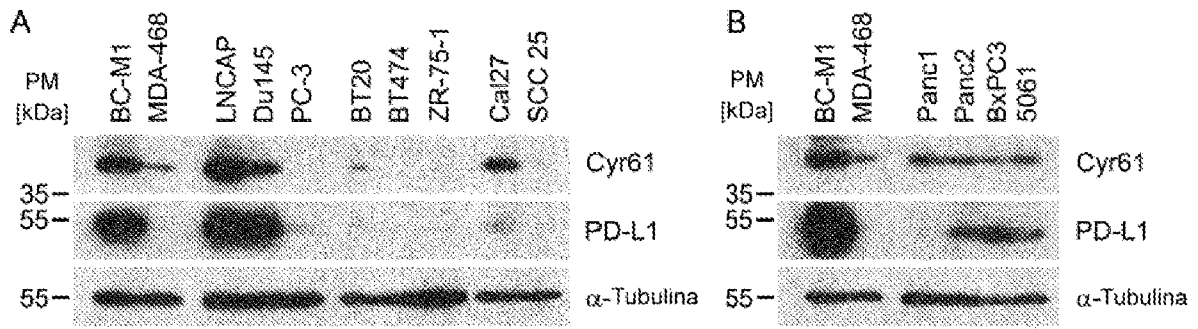


Figura 6

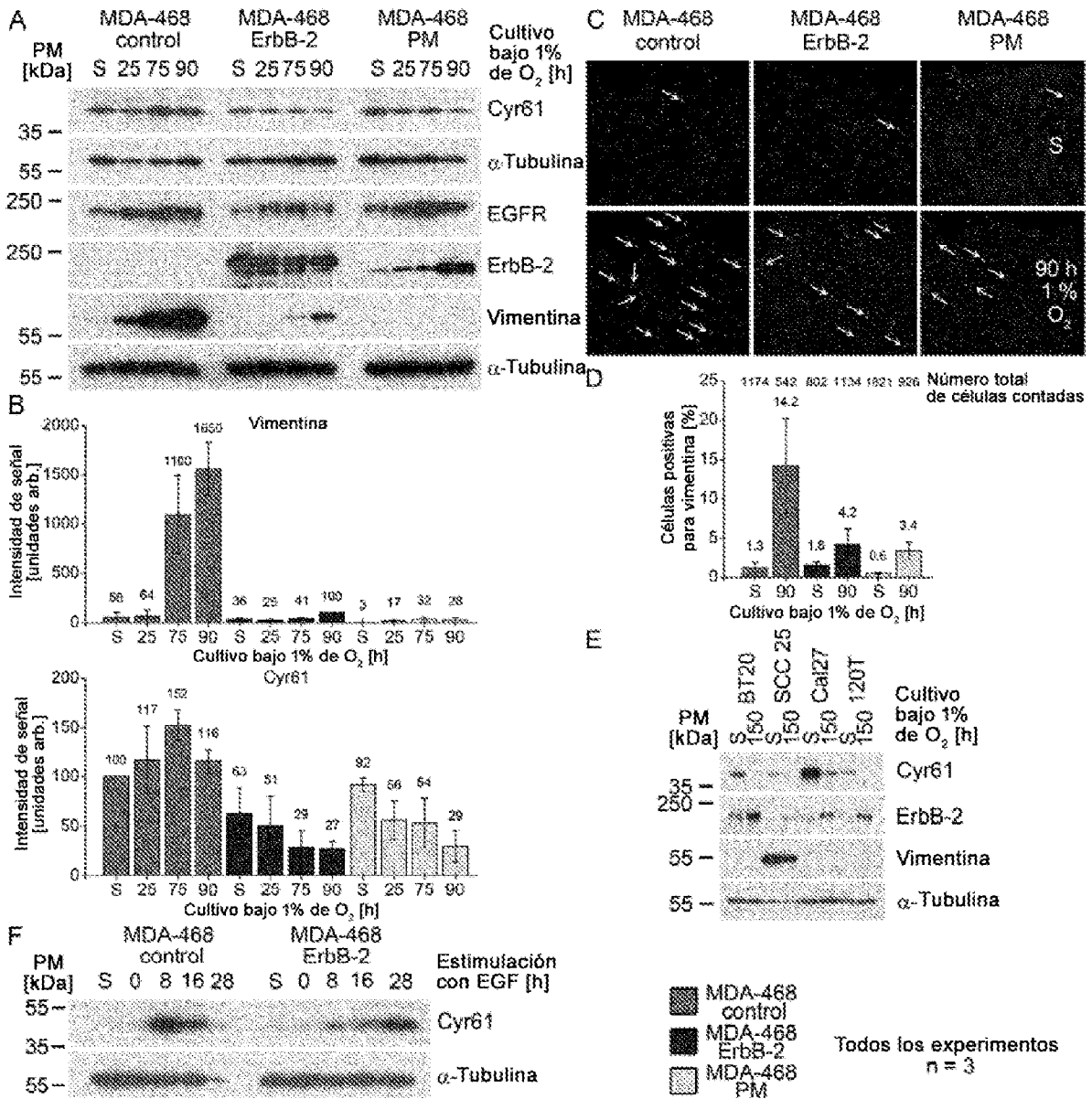


Figura 7

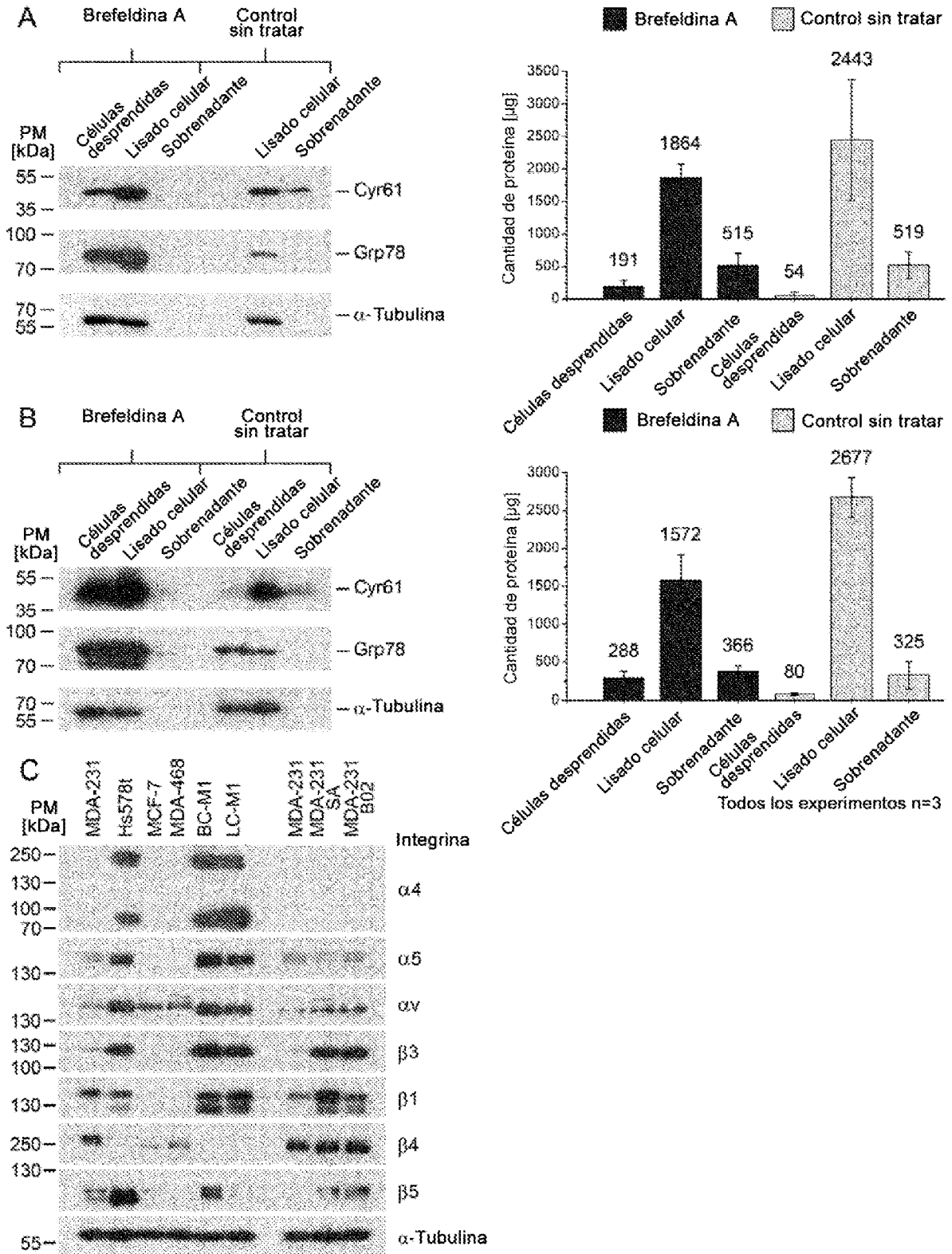


Figura 8

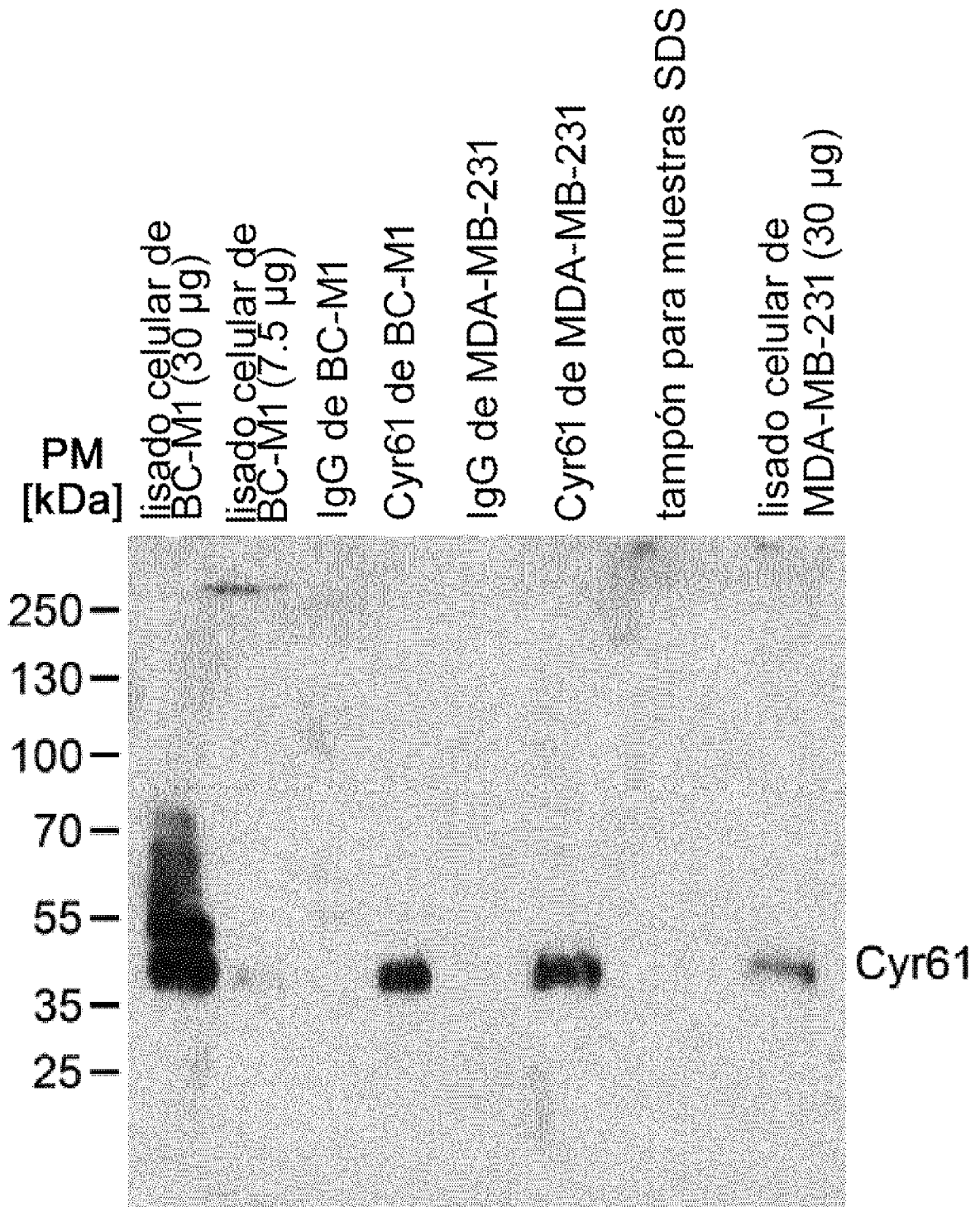


Figura 9

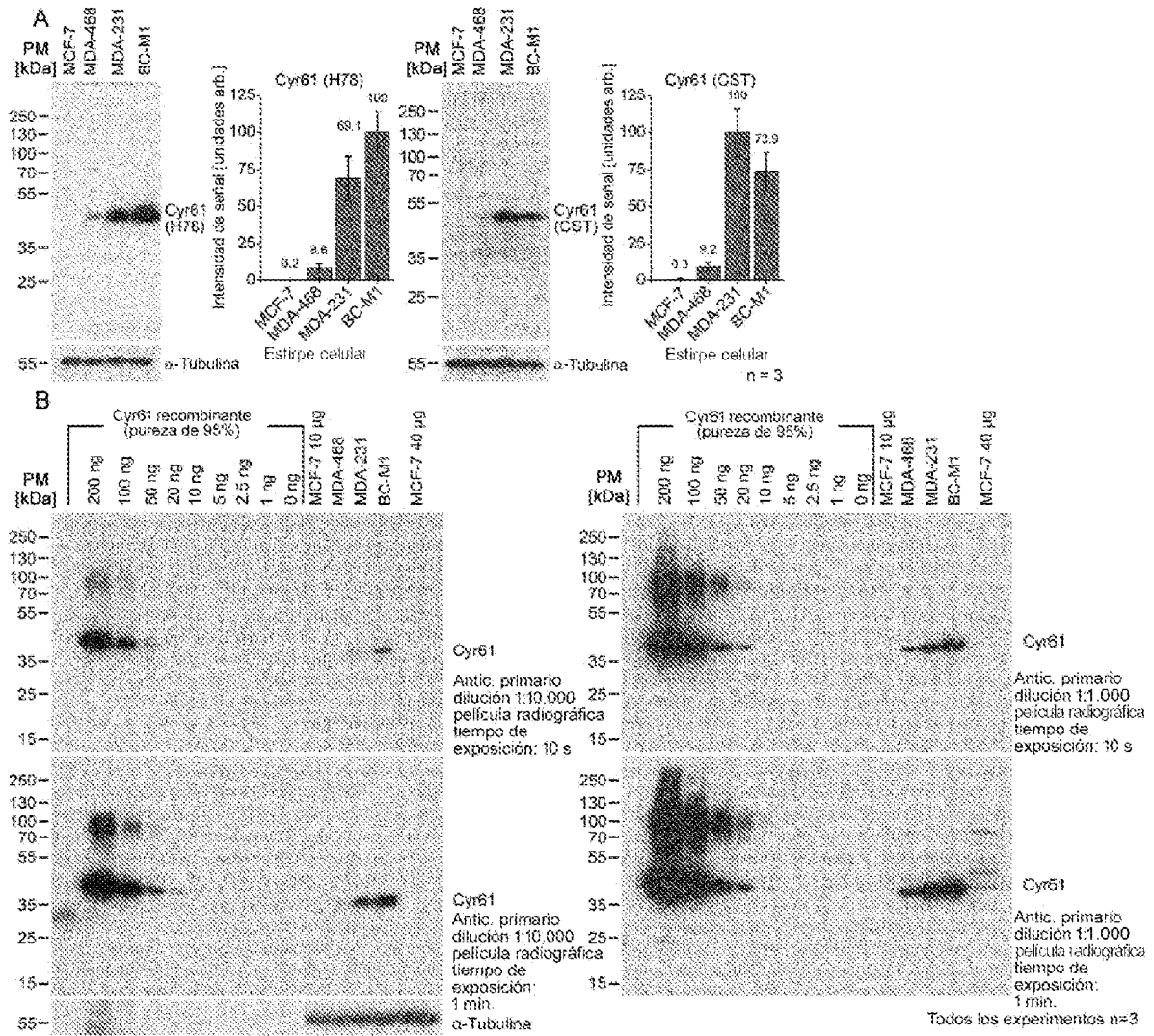


Figura 10

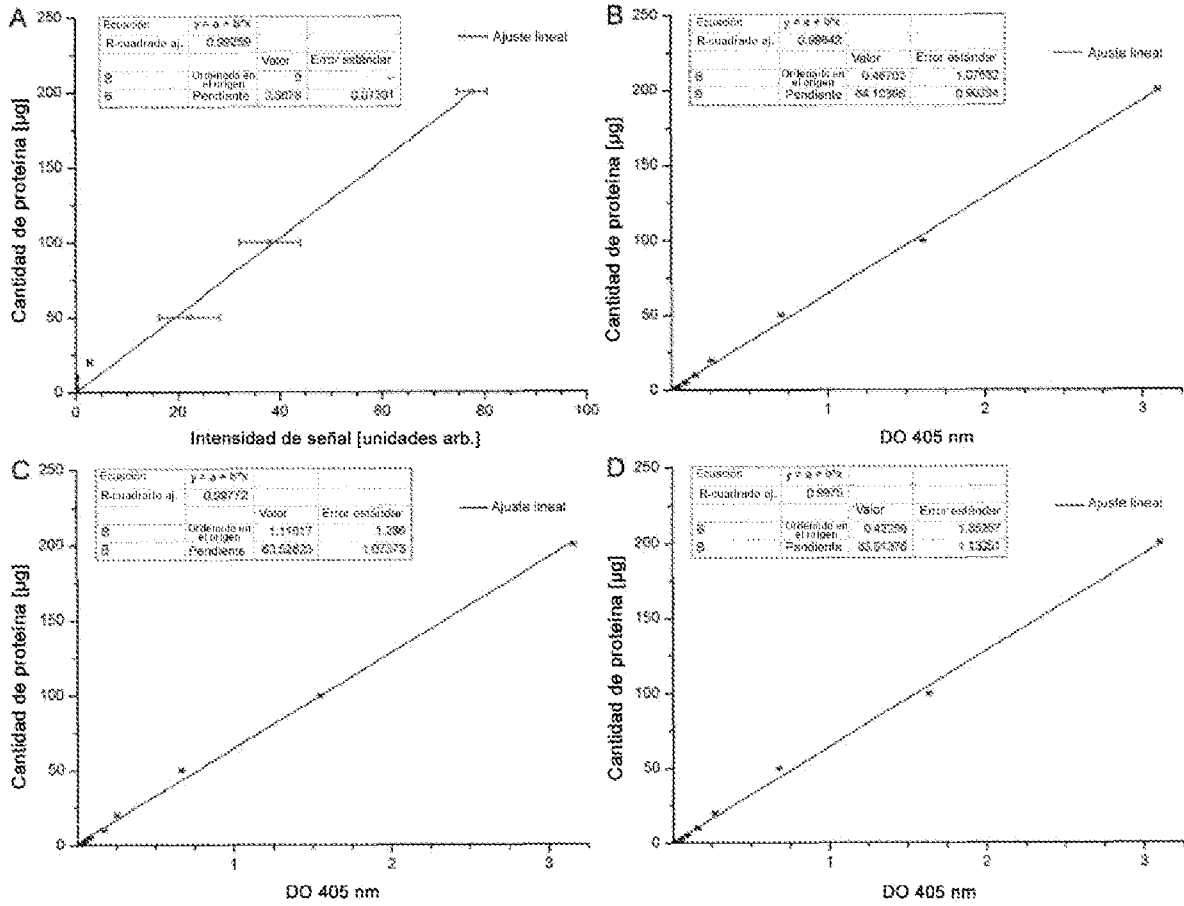


Figura 11

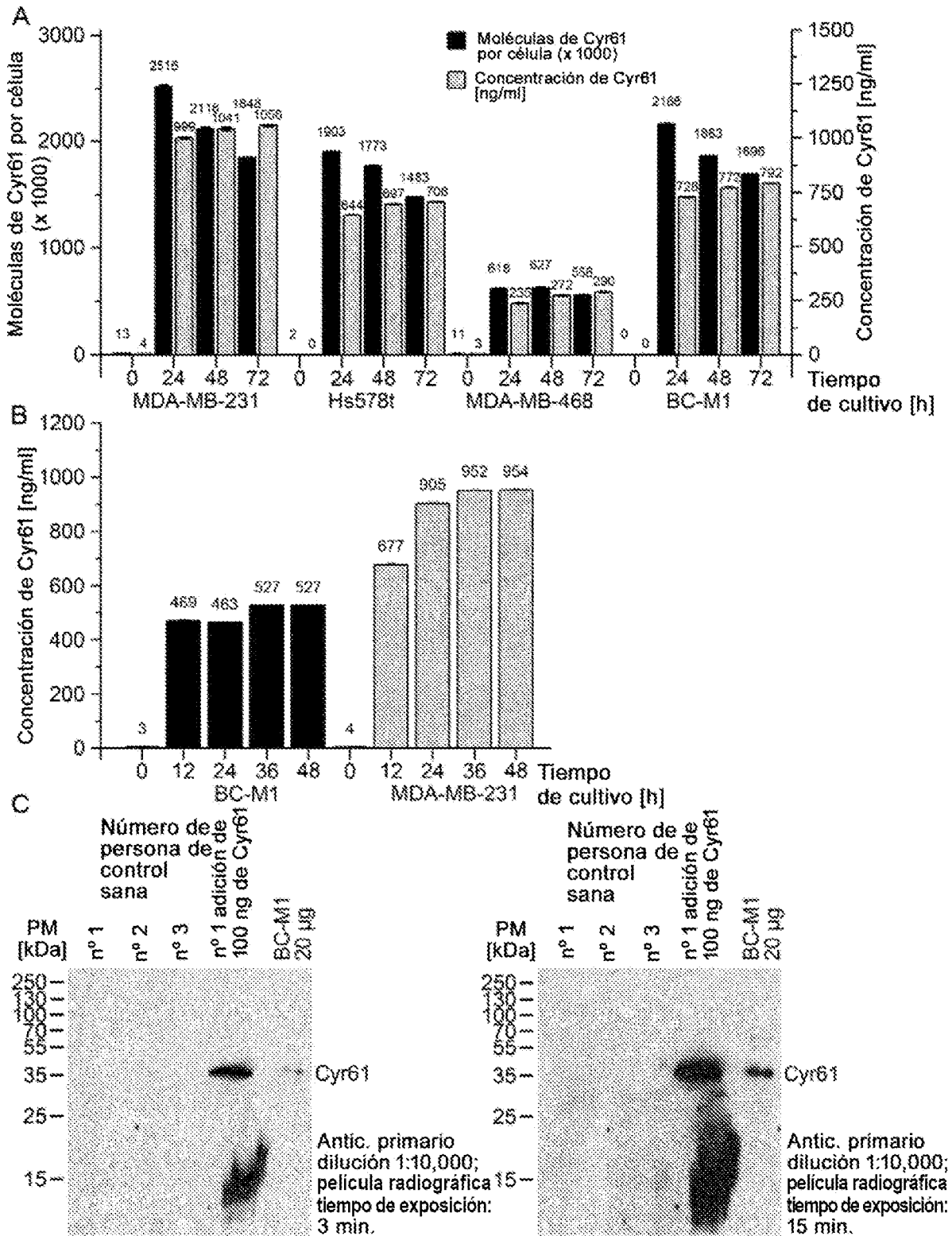


Figura 12

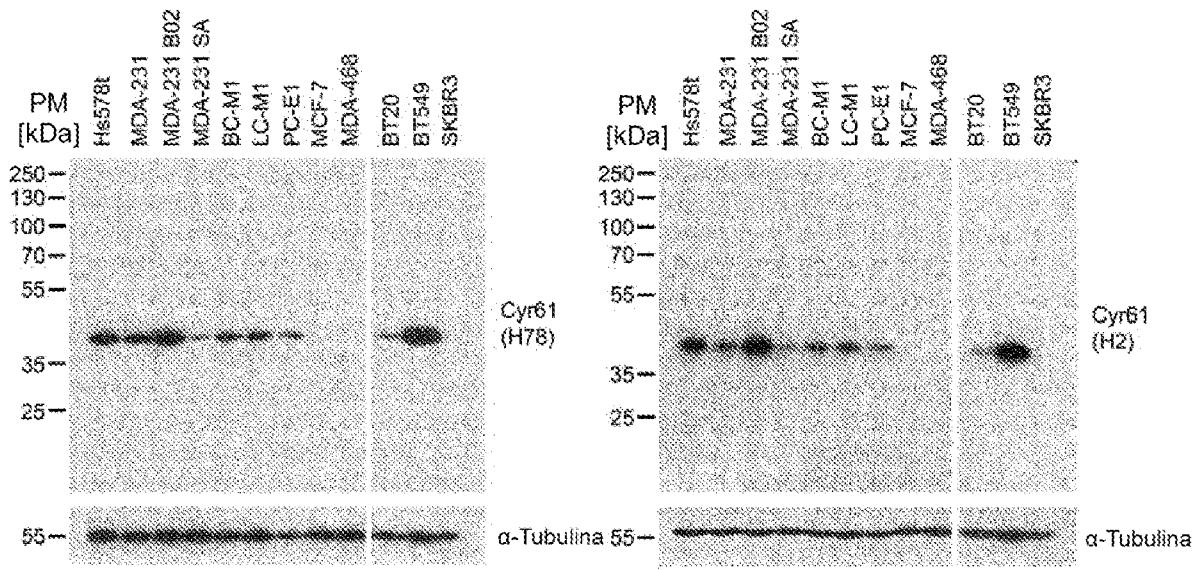


Figura 13

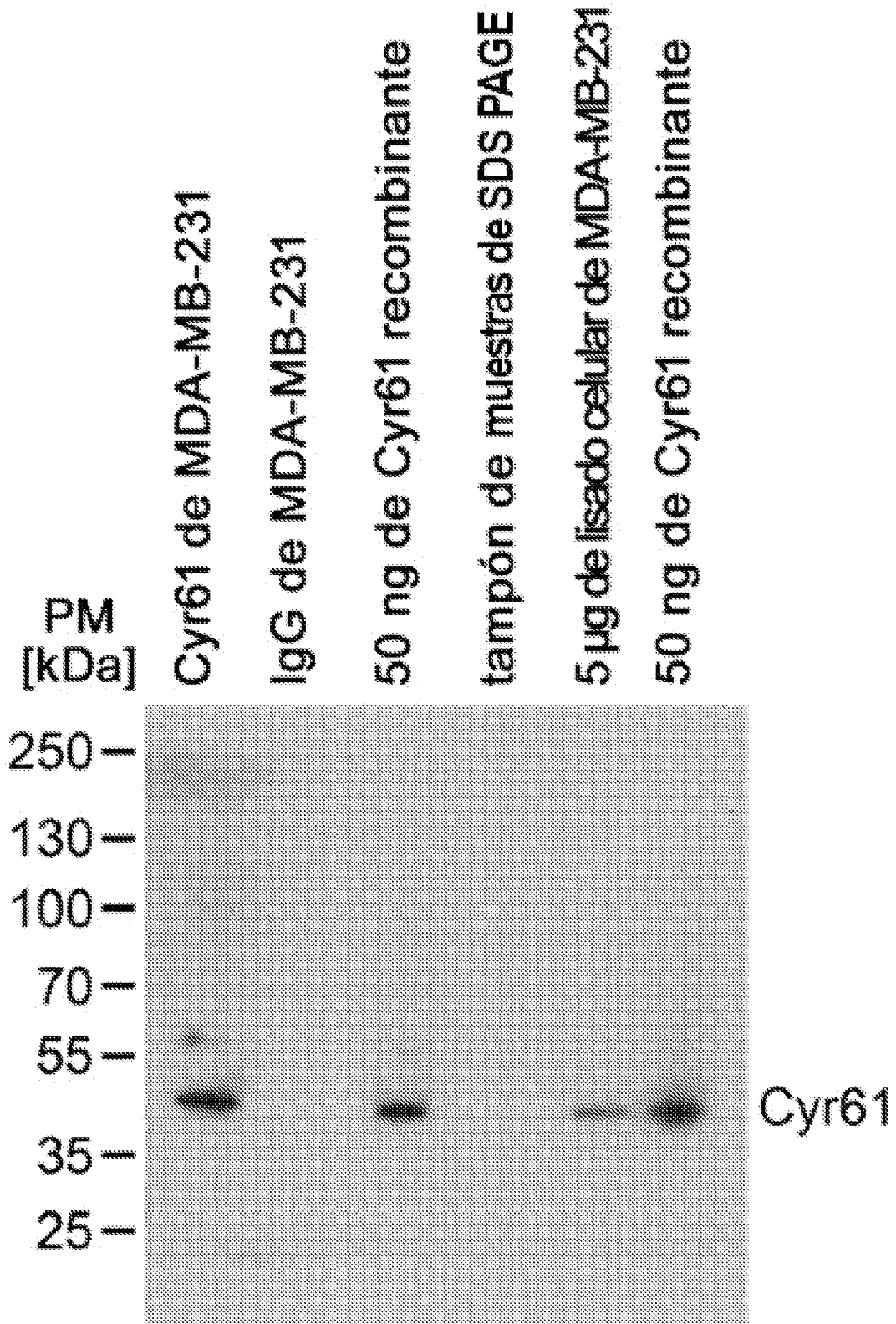


Figura 14

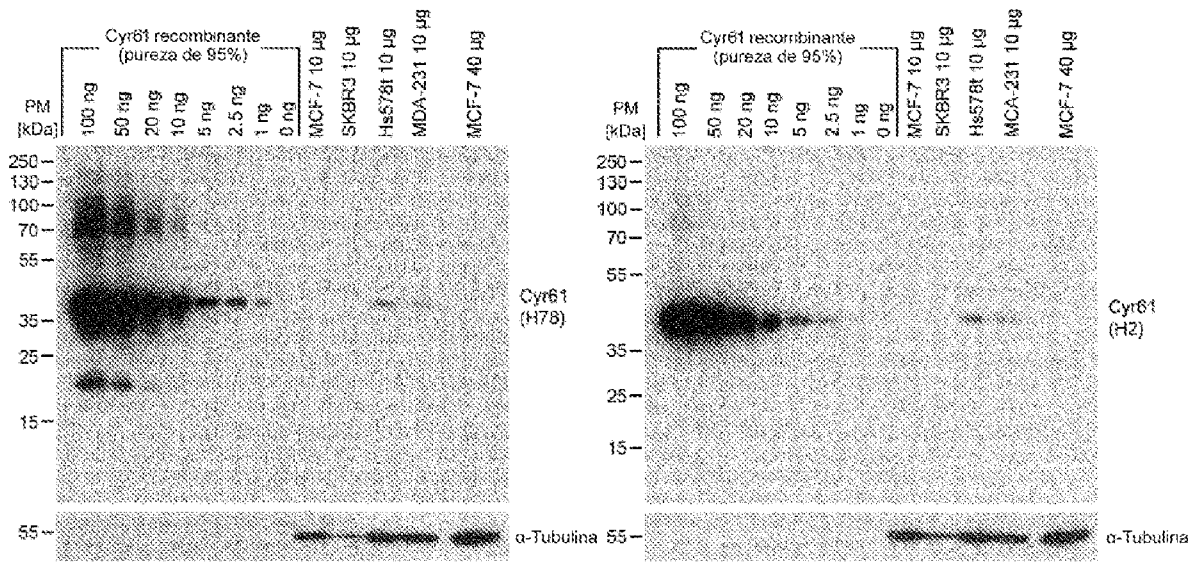


Figura 15

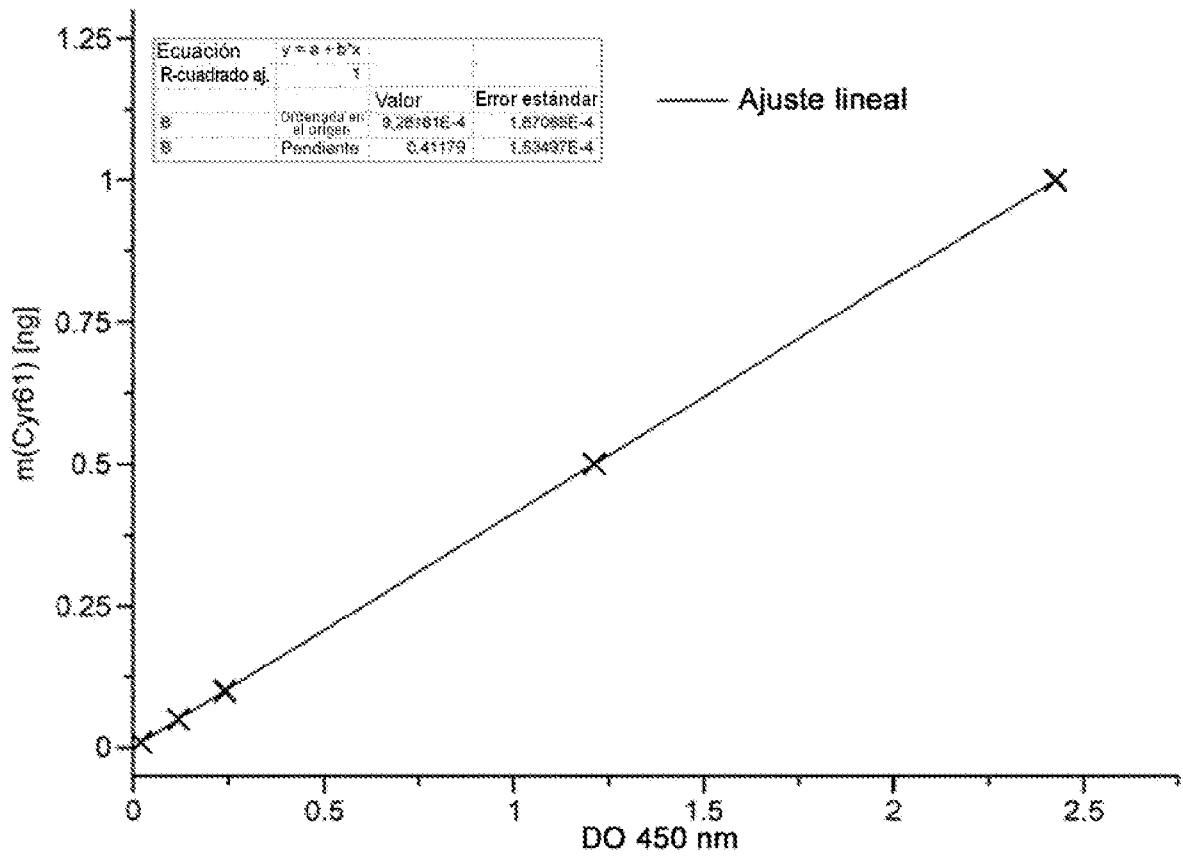


Figura 16

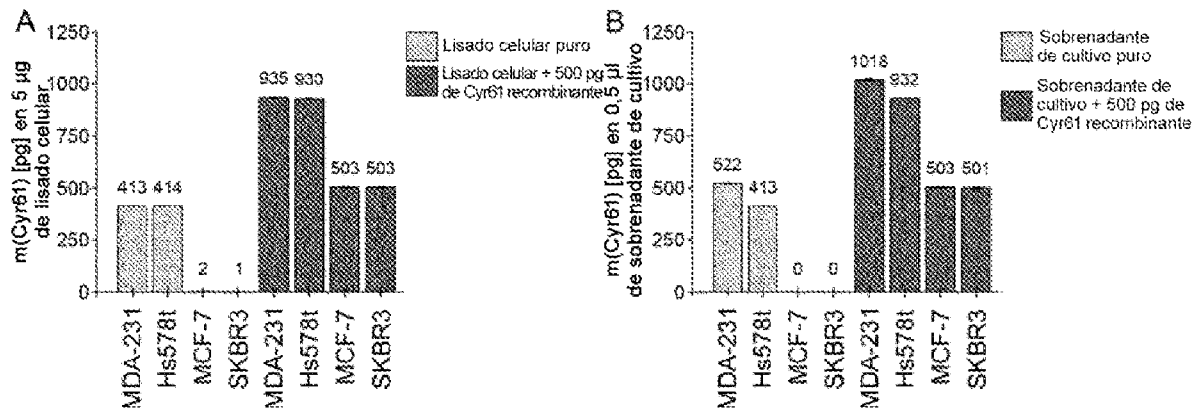


Figura 17

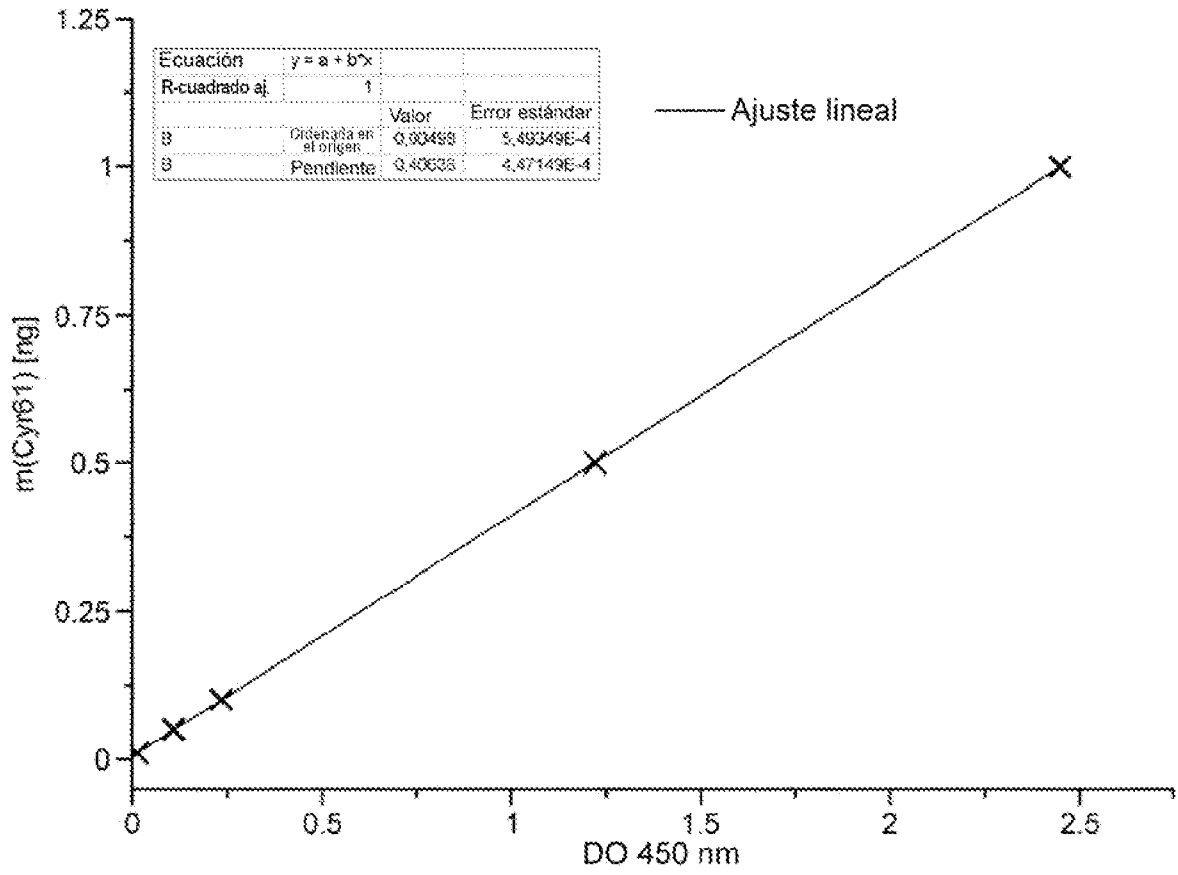


Figura 18

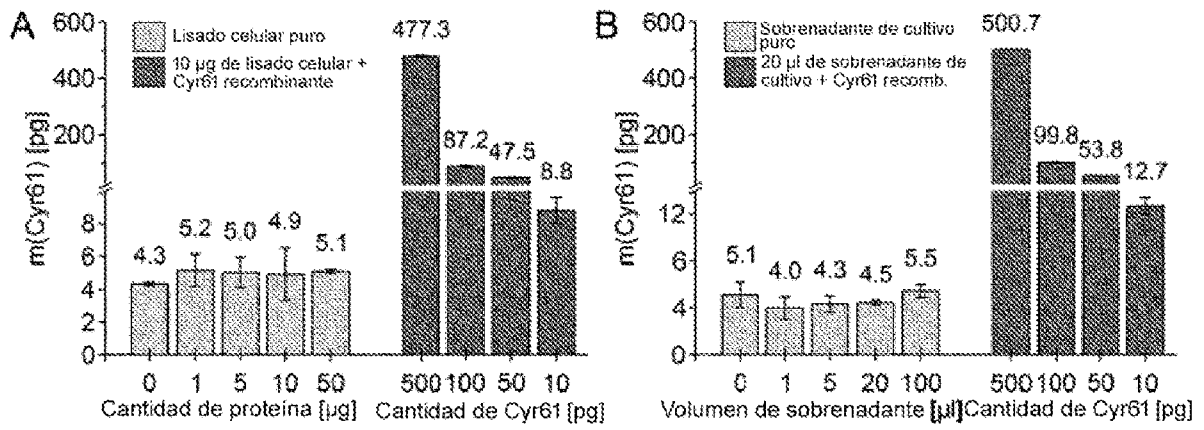


Figura 19

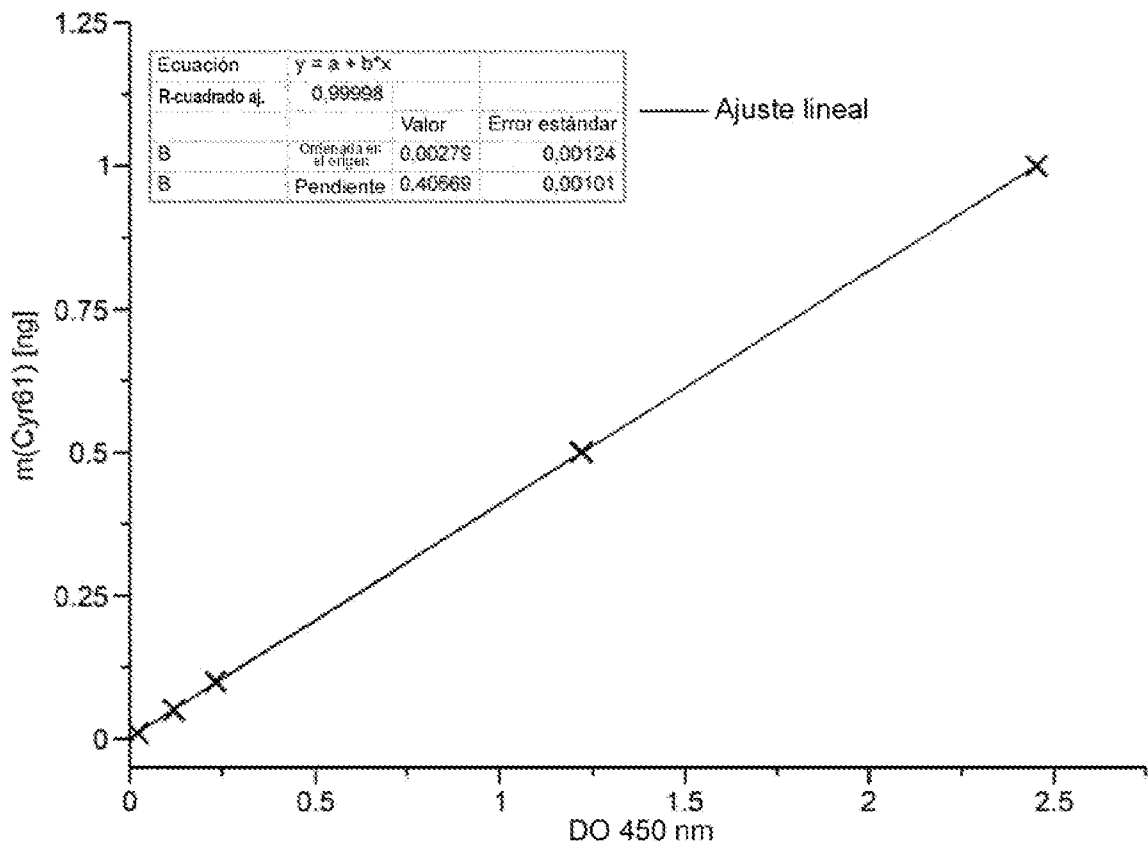


Figura 20

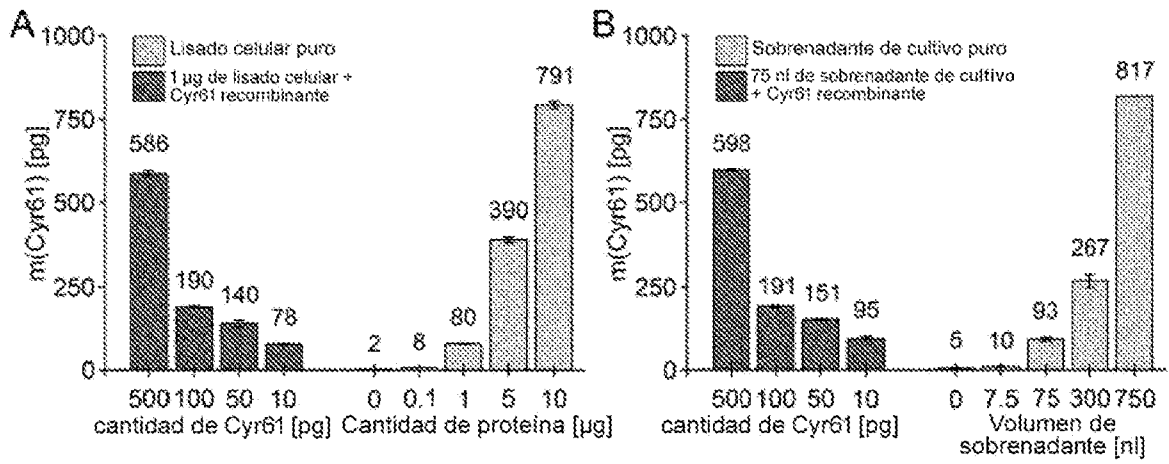


Figura 21

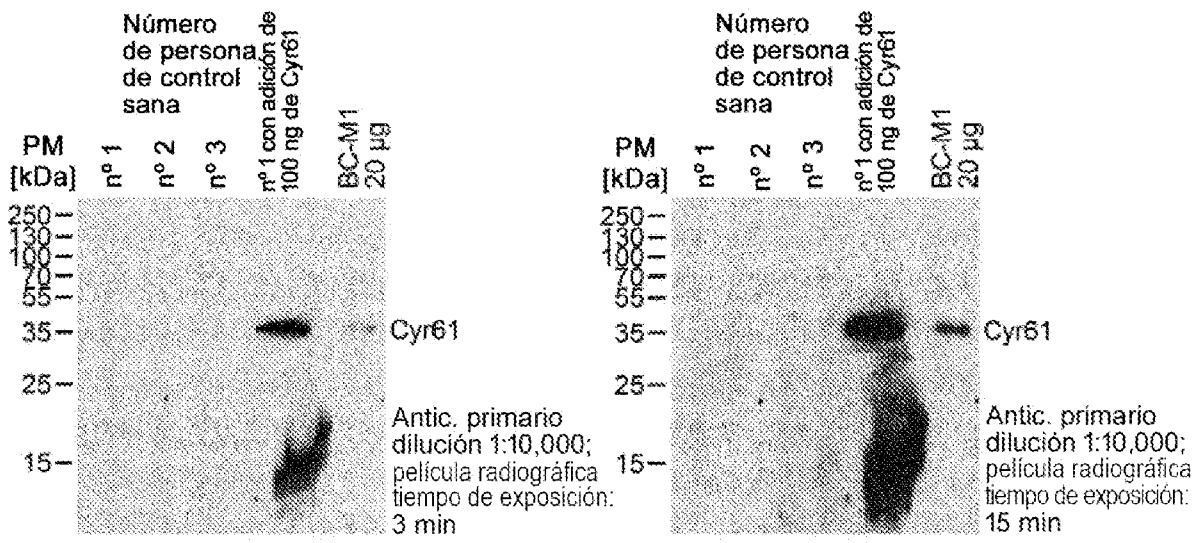


Figura 22

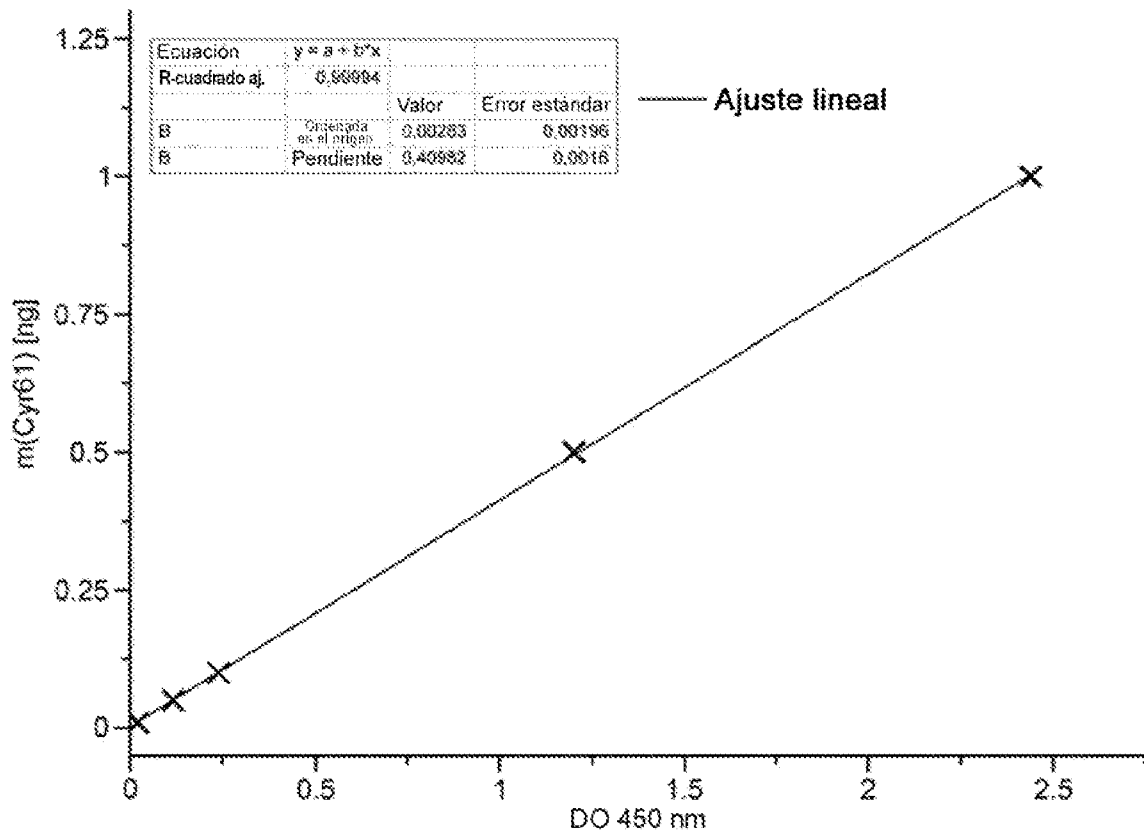


Figura 23

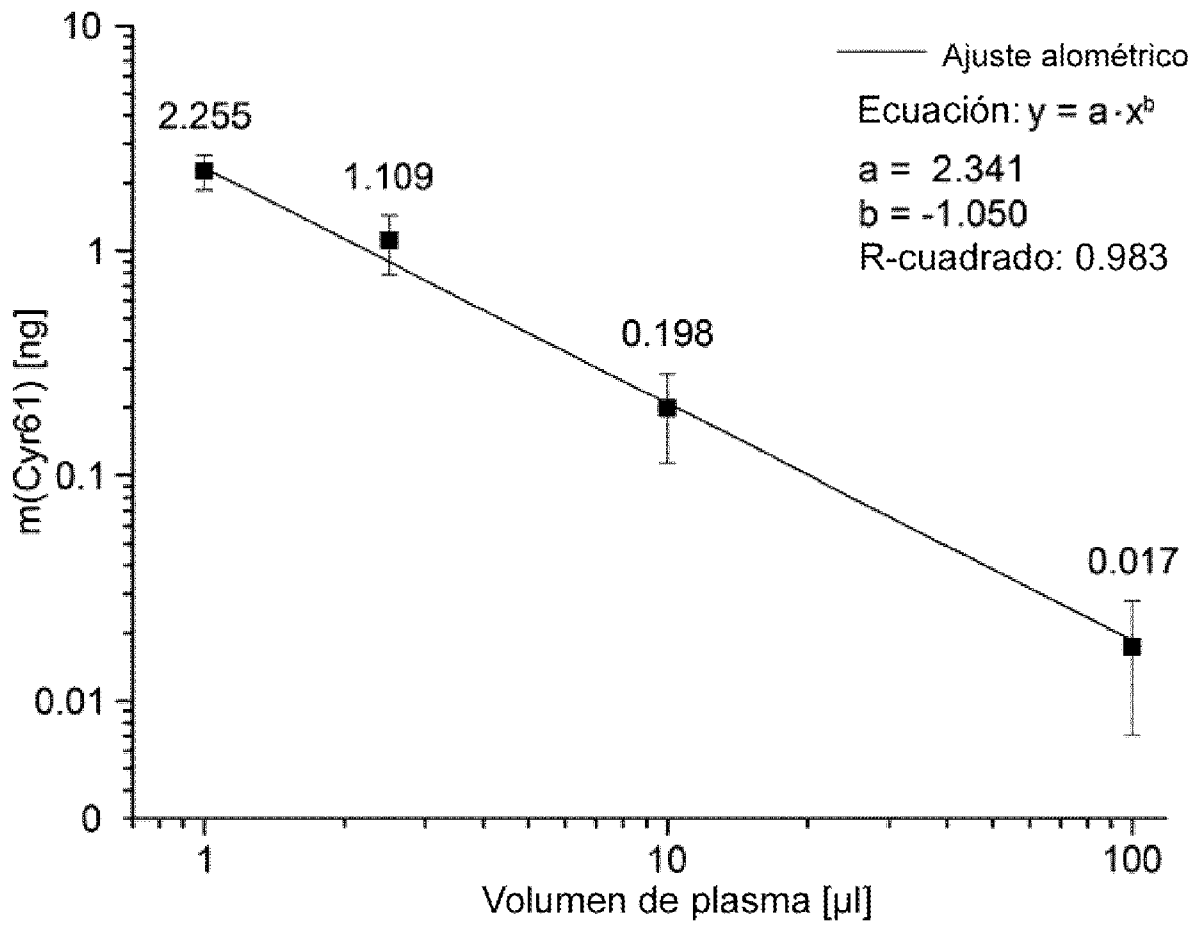


Figura 24

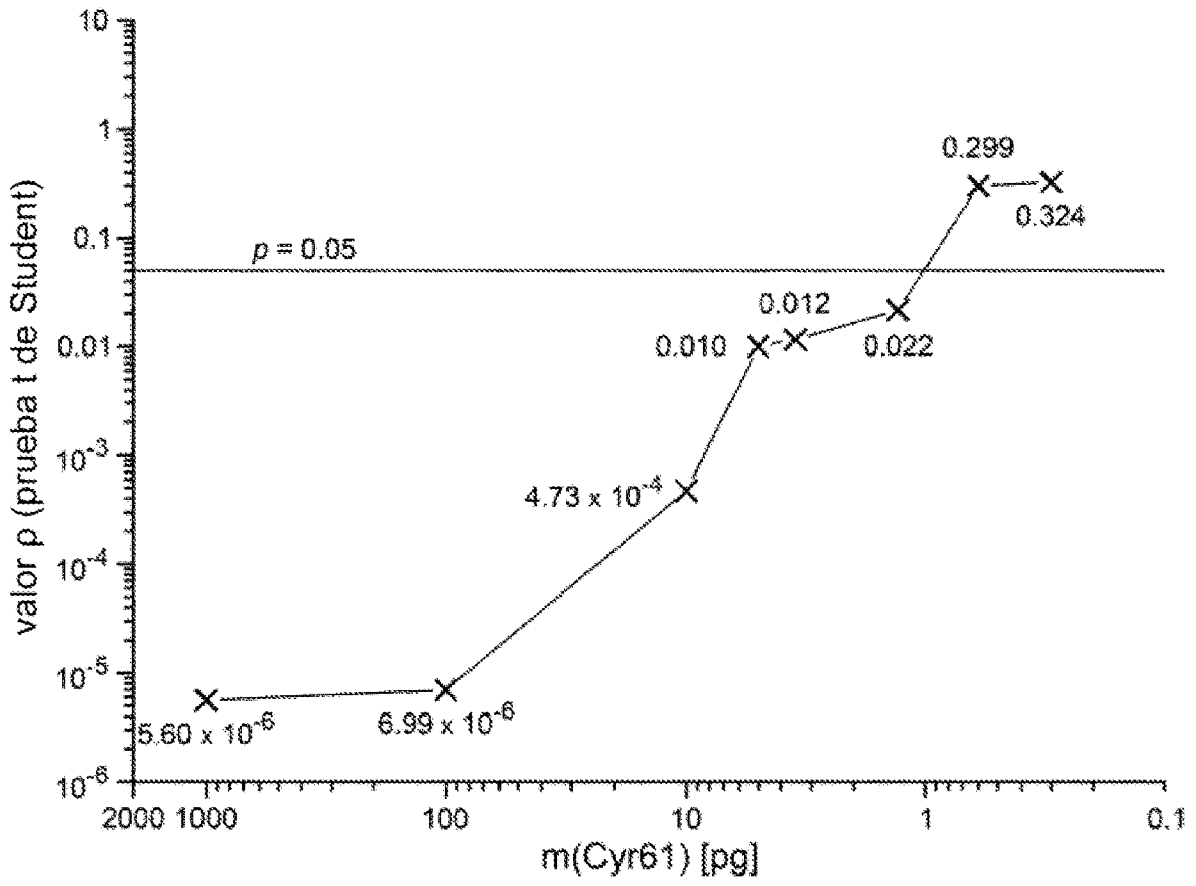


Figura 25

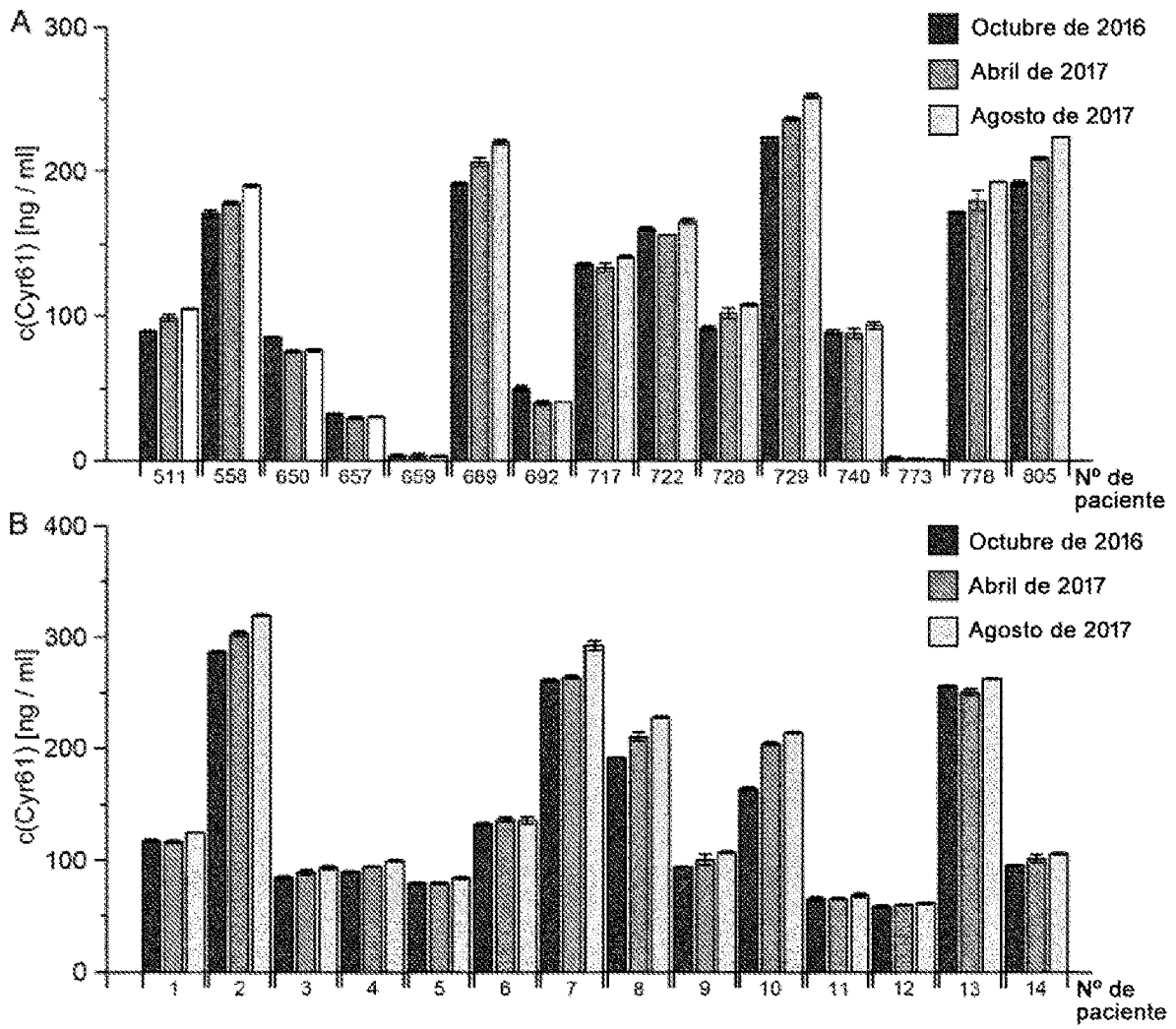


Figura 26

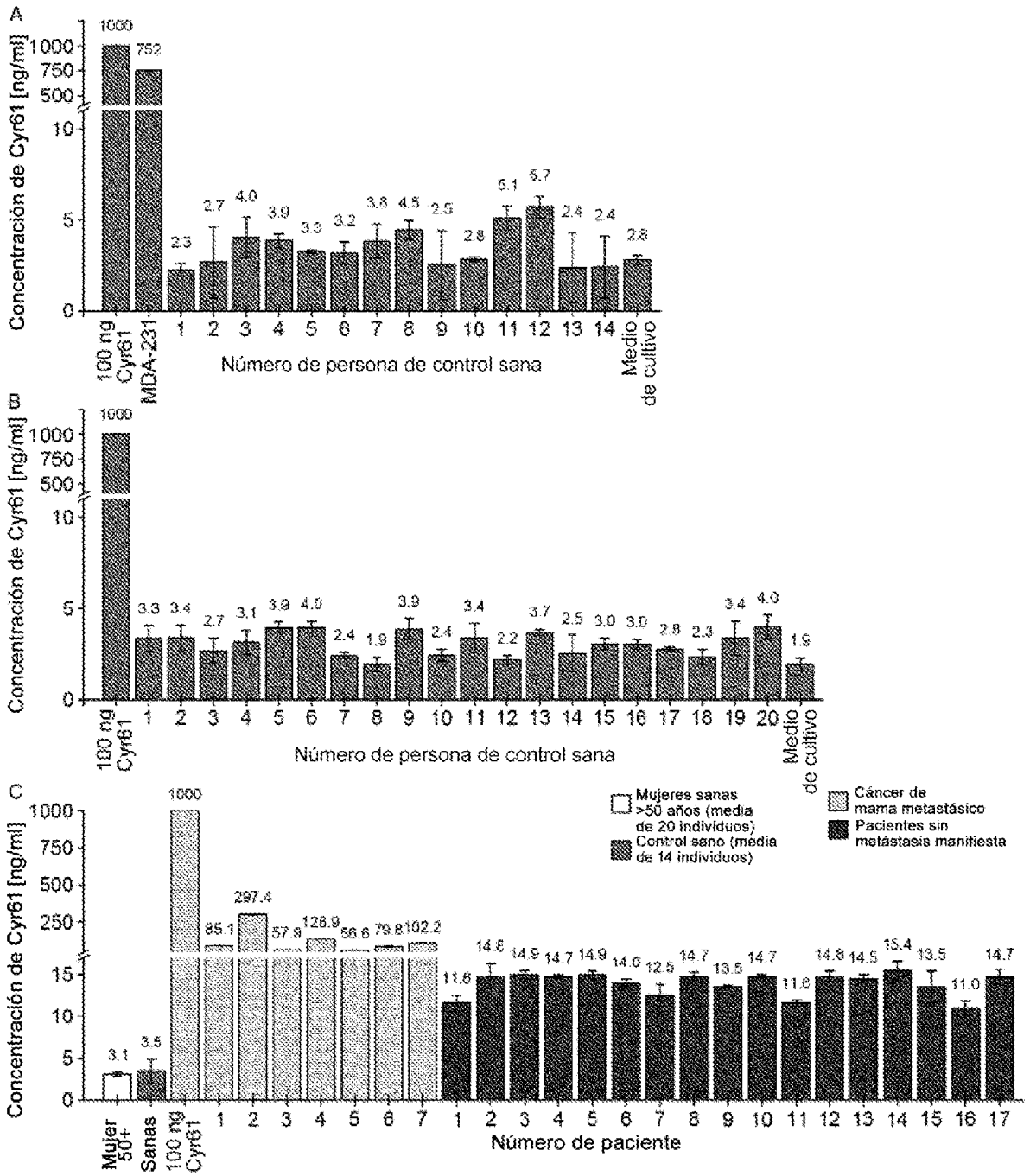


Figura 27

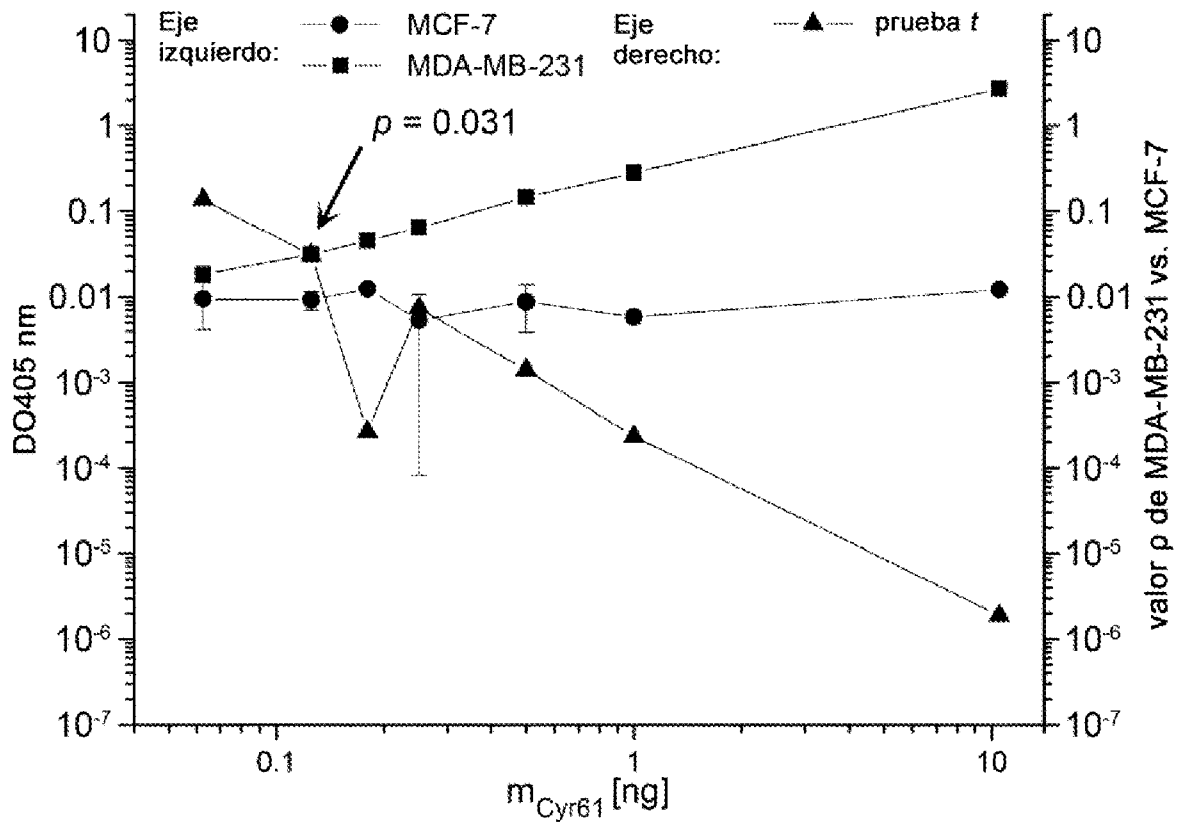
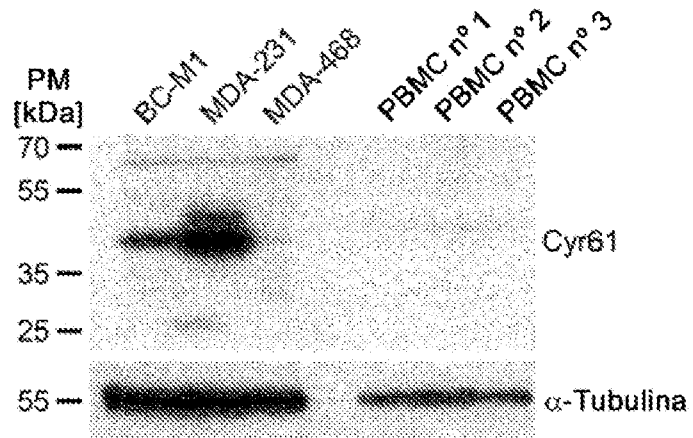
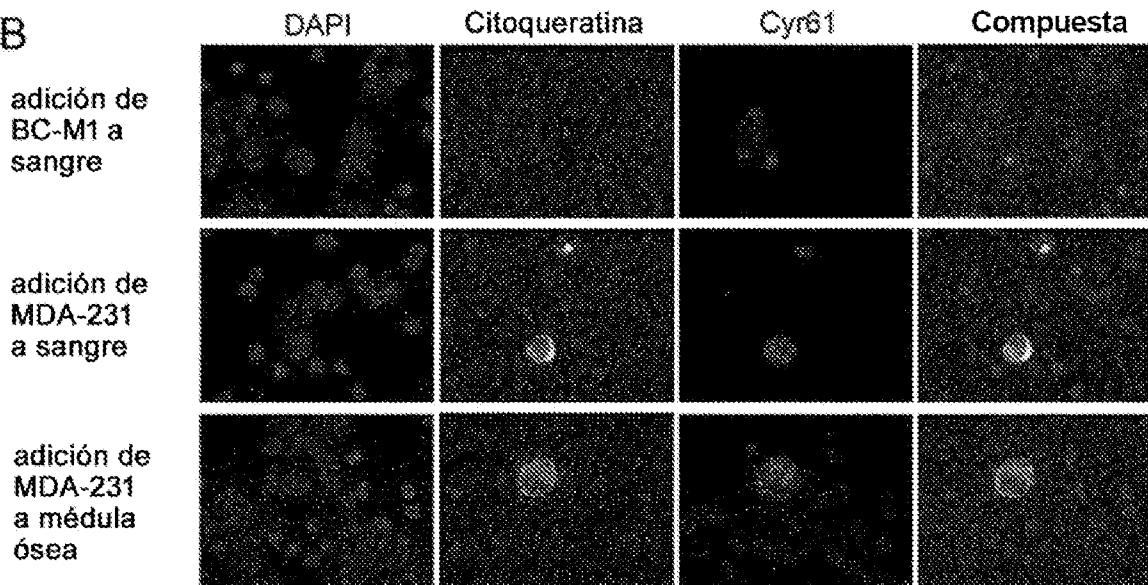


Figura 28

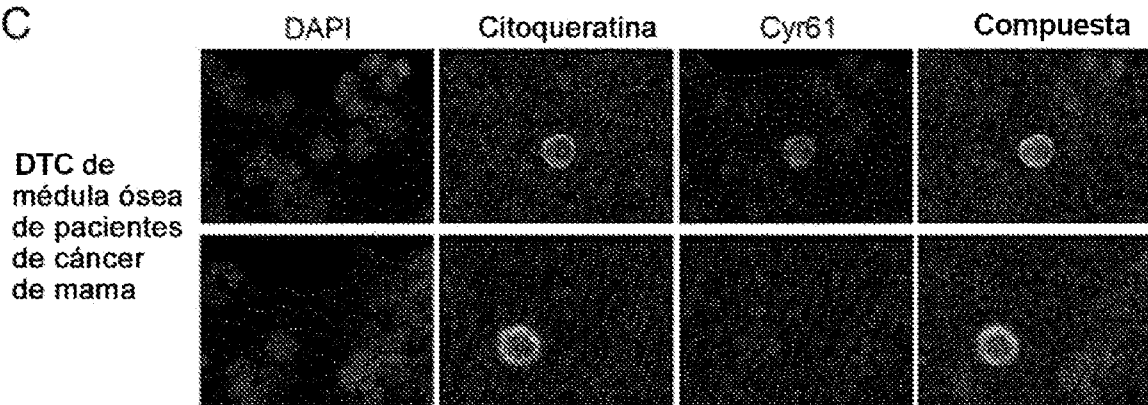
A



B



C



Todos los experimentos n=3

Figura 29

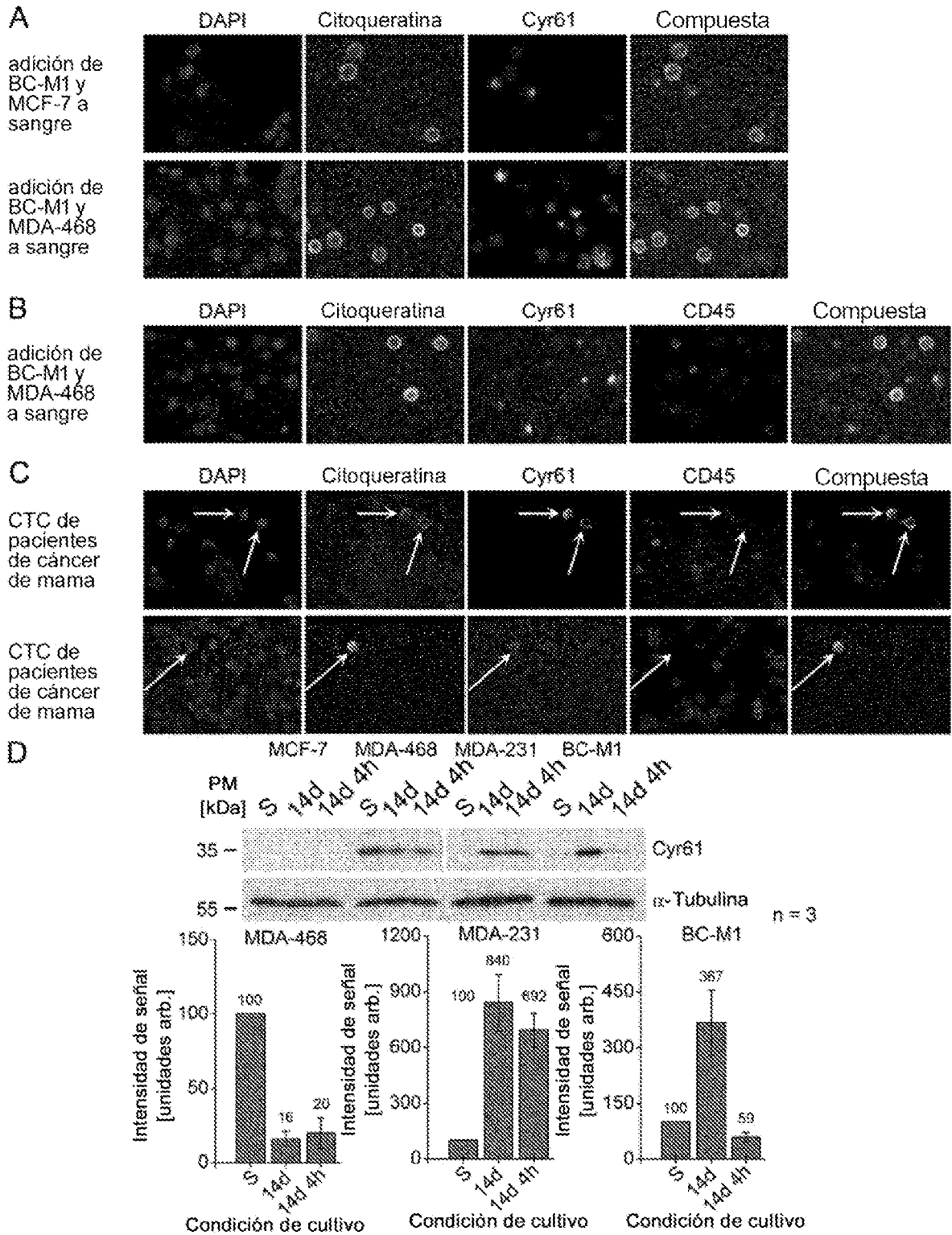


Figura 30

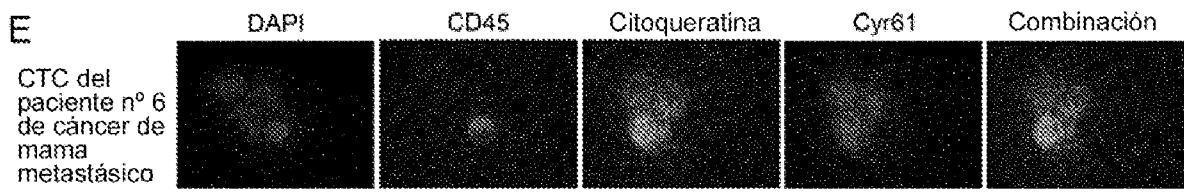


Figura 31

Tabla 3

Tasas de detección de CTC y Cyr61 en muestras de sangre procedentes de pacientes de cáncer de mama

Todos los pacientes	Muestras analizadas		CTC positivas (citoqueratina)		CTC positivas para Cyr61		n	%
	n	%	n	%	n	%		
	33	100	8	24			3	9
Pacientes positivos para CTC	CTC positivas para citoqueratina		CTC positivas para citoqueratina/Cyr61		CTC positivas para citoqueratina/negativas para Cyr61			
Paciente nº 1	11		9		2			
Paciente nº 2	3		0		3			
Paciente nº 3	8		1		7			
Paciente nº 4	1		0		1			
Paciente nº 5	39		7		32			
Paciente nº 6	1		0		1			
Paciente nº 7	5		0		5			
Paciente nº 8	1		0		1			
Suma de CTC (%)	69 (100)		17 (25)		52 (75)			

Figura 32

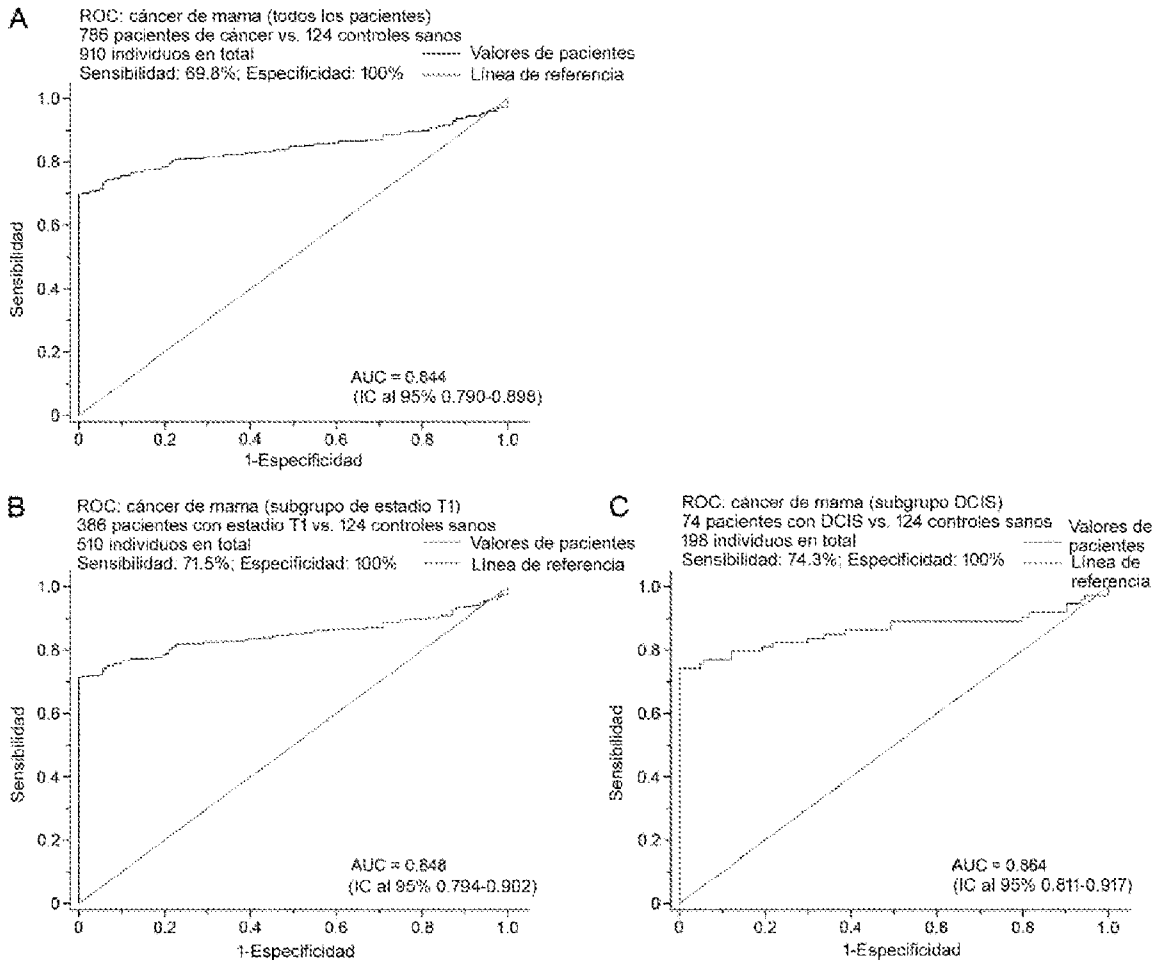


Figura 33