(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 627 011**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
A61K 31/713 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.01.2008** **PCT/US2008/001343**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **14.08.2008** **WO08097466**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.01.2008** **E 08713370 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017** **EP 2126566**

(54) Título: **Variantes de corte y empalme específicas de metástasis de Mena y usos de las mismas en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de tumores**

(30) Prioridad:

02.02.2007 US 899303 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.07.2017

(73) Titular/es:

ALBERT EINSTEIN COLLEGE OF MEDICINE, INC. (33.3%)
1300 MORRIS PARK AVENUE
BRONX, NY 10461, US;
MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY (33.3%) y
IFO-REGINA ELENA CANCER INSTITUTE (33.3%)

(72) Inventor/es:

CONDEELIS, JOHN, S.;
GOSWAMI, SUMANTA;
GERTLER, FRANK y
NISTICO, PAOLA

(74) Agente/Representante:

ELZABURU SLP, .

ES 2 627 011 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

Variantes de corte y empalme específicas de metástasis de Mena y usos de las mismas en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de tumores

Antecedentes de la invención

A lo largo de esta solicitud se hace referencia entre paréntesis a diversas publicaciones. Las citas completas de estas referencias se pueden hallar al final de la memoria descriptiva inmediatamente antes de las reivindicaciones.

Uno de cada tres cánceres diagnosticados en mujeres en los EE.UU. se debe al cáncer de mama; se espera que se diagnostiquen 212.920 casos nuevos de cáncer de mama invasivo y otros 61.980 casos de cáncer de mama localizado en los EE.UU. en 2006. Se espera que 40.970 mujeres fallezcan de cáncer de mama en 2006 en los EE.UU. solamente (American Cancer Society, Breast Cancer Facts and Figures 2006). La metástasis en un 10-15% de pacientes de cáncer de mama es agresiva, y puede tardar 3-10 años en manifestarse tras el diagnóstico inicial. En la actualidad, no se puede determinar con exactitud el pronóstico en un 70% de pacientes, lo que da como resultado un tratamiento innecesario de muchas pacientes que no se beneficiarán, y se pueden ver perjudicadas por la radioterapia y la quimioterapia. La disponibilidad de un anticuerpo y un par de cebadores asociados para una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que identifiquen de manera exclusiva y específica la enfermedad metastásica permitirá una predicción exacta del desarrollo de la enfermedad, y permitirá un tratamiento adecuado.

La invasión de células tumorales en el tejido circundante y la intravasación en vasos sanguíneos y linfáticos está implicada en la progresión del cáncer de mama metastásico. Este proceso de múltiples etapas implica varios cambios fenotípicos que ocurren de manera secuencial, y dan lugar a una célula hiperinvasiva (Condeelis et al., 2005). En un esfuerzo por identificar estos sucesos individuales y entender los sucesos moleculares que subyacen en estos cambios fenotípicos, se han desarrollado modelos animales, así como un análisis de quimiotaxia que aísla las células invasivas *in vivo* de las células tumorales primarias corrientes (APTC) (Wyckoff et al., 2000). El aislamiento basado en la quimiotaxia de las células invasivas y el análisis posterior de la expresión génica han dado como resultado la identificación de una característica distintiva de la expresión de genes específicos de invasión en las células invasivas (Wang et al., 2004). En estos estudios, se han identificado varios genes que necesitan estar estimulados de manera coordinada en las células invasivas para que la invasión conduzca a la metástasis (Wang et al., 2006).

Uno de los genes clave de la característica distintiva de invasión es el que codifica la proteína citoesquelética Mena. Mena es un miembro de la familia de proteínas Ena/VASP. Estas proteínas son moléculas reguladoras que controlan el movimiento, la motilidad y la forma de las células en varios tipos de células y organismos. Se ha propuesto que funcionan impidiendo que los filamentos de actina se recubran mediante proteínas de recubrimiento en sus extremos barbados (Barzik et al., 2005). Se ha propuesto que la actividad anti-recubrimiento de Mena amplifica la producción en el extremo barbado de la rutas de complejos de cofilina y Arp2/3, lo que es suficiente para incrementar el potencial metastásico en los tumores mamarios (Wang et al., 2006). Las proteínas Ena/VASP también son constituyentes de las uniones adherentes necesarias para sellar las membranas en la lámina epitelial y controlar la organización de la actina en el contacto por adhesión con cadherina (Scott et al., 2006). Este proceso está alterado con frecuencia en el cáncer. Las proteínas Ena/VASP contienen dominios específicos que incluyen el dominio EVH1 N-terminal, que desempeña un papel esencial en la localización de proteínas intracelulares interaccionando con motivos ricos en prolina hallados en proteínas tales como zixina y vinculina (Prehoda et al., 1999). Se sabe que el dominio rico en prolina del centro actúa como mediador en la interacción con proteínas que tienen los dominios SH3 y WW, y también con la proteína de unión a monómeros de actina profilina (Gertler et al., 1996). El dominio C-terminal de Mena contiene un dominio EVH2 que está implicado en la tetramerización de la proteína, y también en la unión a G- y F-actina (Kuhnel et al., 2004). La interacción del dominio EVH2 con los extremos en crecimiento de los filamentos de actina es esencial para el transporte de Ena/VASP a los lamelipodios y filopodios (Loureiro et al., 2002). Mena está elevada en las células de cáncer de mama invasivo de ratón y rata (Wang et al., 2004), y se sobreexpresa en los tejidos de cáncer de mama humano (Di Modugno et al., 2004). Se han clonado y secuenciado homólogos de Mena humanos y de ratón, y se han identificado diversas variantes de corte y empalme (Gertler et al., 1996; Urbanelli et al., 2006).

Recientemente se ha demostrado que las variantes de corte y empalme pueden funcionar de manera muy eficaz como biomarcadores del cáncer (Brinkman 2004; Venables 2006). Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de identificar variantes de corte y empalme que estén elevadas de manera específica en las células de cáncer metastásico, tales como las células de cáncer de mama metastásico.

Sumario de la invención

La invención proporciona un método para determinar si un sujeto tiene un tumor metastásico, que comprende analizar una muestra de sangre, tejido y/o tumor del sujeto en busca de la expresión de la variante ++ y/o +++ de Mena, en el que la expresión de la variante ++ y/o +++ de Mena se compara con la expresión de Mena11a, y en el que la sobreexpresión de la variante ++ y/o +++ de Mena indica la presencia de un tumor metastásico.

La invención también proporciona un método para determinar la eficacia de la terapia de tratamiento de un tumor

metastásico en un sujeto que se ha sometido o se está sometiendo a tratamiento contra un tumor metastásico, y el método comprende analizar una muestra de sangre, tejido y/o tumor del sujeto en busca de la expresión de la variante ++ y/o +++ de Mena, en el que la expresión de la variante ++ y/o +++ de Mena se compara con la expresión de Mena11a, y en el que la sobreexpresión de la variante ++ y/o +++ de Mena indica la necesidad de continuar la terapia para tratar el tumor.

La invención también proporciona un método para determinar el pronóstico de un sujeto que tiene un tumor metastásico, que comprende analizar una muestra de sangre, tejido y/o tumor del sujeto en busca de la expresión de la variante ++ y/o +++ de Mena, en el que la expresión de la variante ++ y/o +++ de Mena se compara con la expresión de Mena11a, y el pronóstico del sujeto mejora con una disminución de la expresión de la variante ++ y/o +++ de Mena.

La invención proporciona un método para inhibir la metástasis de un tumor en un sujeto, y el método comprende reducir la presencia o actividad de la isoforma ++ (SEQ ID Nº:2) y/o la isoforma +++ (SEQ ID Nº:4) de Mena en el sujeto, en el que la expresión de la variante ++ y/o +++ de Mena se compara con la expresión de Mena11a.

La invención proporciona un método para el cribado de un compuesto candidato que inhibe la metástasis de un tumor, y el método comprende poner en contacto el compuesto con una línea celular o cultivo tisular que expresa la isoforma ++ (SEQ ID Nº:2) y/o la isoforma +++ (SEQ ID Nº:4) de Mena, en el que la expresión de la variante ++ y/o +++ de Mena se compara con la expresión de Mena11a, y en el que la reducción de la expresión de la isoforma ++ y/o +++ de Mena indica que el compuesto es un compuesto candidato para inhibir la metástasis de un tumor.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1A-1B. Cuantificación de las isoformas de Mena en el modelo de aloinjerto de ratas MTLn3 (A) y el modelo transgénico de ratones PyMT (B). El cebador pan Mena muestra una sobreexpresión de cuatro a cinco veces en las células invasivas. Los exones ++ y +++, tal como se observan mediante reacciones específicas de QPCR para ellos, indican que ambos también se sobreexpresan en las células invasivas.

Figura 2. Las isoformas ++ y +++ de Mena se sobreexpresan en células MTLn3 metastásicas tal como se determina mediante QRT-PCR. El cebador pan Mena muestra una sobreexpresión de cuatro veces en las células invasivas. Los exones ++ y +++, tal como se observan mediante reacciones específicas de QPCR para ellos, indican que ambos se sobreexpresan en células de cáncer recogidas de sangre y de metástasis de pulmón eficaces.

Figura 3. La variante de corte y empalme +++ de Mena se expresa en líneas celulares de cáncer de mama humano. Se muestra MDA231 a la izquierda y T47D a la derecha.

Figura 4A-4B. Alineación de secuencias para exones ++ y +++ en células invasivas alineadas con secuencias publicadas de ratón y humanas. Los nucleótidos del exón ++ (SEQ ID Nº: 1) y su secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID Nº:2) se alinean en A, y los nucleótidos del exón +++ (SEQ ID Nº:3) y su secuencia de aminoácidos deducida (SEQ ID Nº:4) se alinean en B.

Figura 5. Estrategia para el diseño de cebadores para cada uno de los exones de Mena y Smart RACE.

Figura 6. Efecto del proceso de separación con microesferas magnéticas en el patrón de expresión génica de las células invasivas.

Figura 7. Efecto de la contención en agujas en el patrón de expresión génica de las células invasivas.

Figura 8. Aumento de la migración de células tumorales cuando se expresa Mena 3+. El área es una medida de la migración de las células. tn = tipo natural.

Figura 9. Inhibición de la migración de células tumorales metastásicas cuando se inhibe Mena con mito, una molécula que redirige Mena a un lugar erróneo en la célula.

Descripción detallada de la invención

La invención proporciona un método para determinar si un sujeto tiene un tumor metastásico, que comprende analizar una muestra de sangre, tejido y/o tumor del sujeto en busca de la expresión de la variante ++ y/o +++ de Mena, en el que la expresión de la variante ++ y/o +++ de Mena se compara con la expresión de Mena11a, y en el que la sobreexpresión de la variante ++ y/o +++ de Mena indica la presencia de un tumor metastásico.

La invención también proporciona un método para determinar la eficacia de la terapia de tratamiento de un tumor metastásico en un sujeto que se ha sometido o se está sometiendo a tratamiento contra un tumor metastásico, y el método comprende analizar una muestra de sangre, tejido y/o tumor del sujeto en busca de la expresión de la variante ++ y/o +++ de Mena, en el que la expresión de la variante ++ y/o +++ de Mena se compara con la expresión de Mena11a, y en el que la sobreexpresión de la variante ++ y/o +++ de Mena indica la necesidad de continuar la terapia para tratar el tumor.

La invención también proporciona un método para determinar el pronóstico de un sujeto que tiene un tumor metastásico, que comprende analizar una muestra de sangre, tejido y/o tumor del sujeto en busca de la expresión de la variante ++ y/o +++ de Mena, en el que la expresión de la variante ++ y/o +++ de Mena se compara con la expresión de Mena11a, y en el que el pronóstico del sujeto mejora con una disminución de la expresión de la variante ++ y/o +++ de Mena.

El tumor puede ser, por ejemplo, un tumor epitelial secretor. El tumor puede ser, por ejemplo, un tumor de mama, páncreas, próstata, colon, cerebro o hígado.

Tal como se usa en la presente memoria, la sobreexpresión de las variantes ++ y/o +++ de Mena significa la sobreexpresión respecto de sus niveles en el tejido normal o respecto de sus niveles en carcinomas localizados (no metastásicos). La expresión de la variante que se sobreexpresa se normaliza respecto de la expresión de una variante de proteína que no se sobreexpresa en un tumor metastásico, concretamente Mena11a.

La expresión de las variantes ++ y/o +++ de Mena se detecta *in vitro*. La expresión se puede detectar a nivel de la variante de ácido nucleico y/o a nivel de la isoforma de proteína. Se puede extraer una muestra de sangre, tumor, tejido o células del sujeto mediante el uso de procedimientos habituales, que incluyen biopsia y aspiración. Las células que se extraen del sujeto se pueden analizar mediante el uso de inmunocitofluorimetría (análisis FACS). La expresión de las variantes ++ y +++ de Mena se puede detectar mediante métodos de detección fácilmente definidos en la técnica conocida, que incluyen, sin limitación, métodos inmunológicos tales como transferencia de Western, análisis de hibridación, métodos de formación de imágenes de fluorescencia, y/o detección de radiación.

La muestra de sangre, tejido, células o tumor se puede analizar mediante el uso de un agente que se une de manera específica a la isoforma ++ (SEQ ID Nº:2) o la isoforma +++ (SEQ ID Nº:4) de Mena. El agente que se une de manera específica a la isoforma ++ o +++ de Mena puede ser, por ejemplo, un anticuerpo, un péptido o un aptámero. Tal como se usa en la presente memoria, el término "anticuerpo" abarca los anticuerpos completos y los fragmentos de anticuerpos completos, en los que los fragmentos se unen de manera específica a la variante ++ o +++ de Mena. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, pero sin limitación, los fragmentos $F(ab')_2$ y Fab' y los anticuerpos de cadena simple. $F(ab')_2$ es un fragmento de unión al antígeno de una molécula de anticuerpo con la región del fragmento cristalizable (Fc) delecionada, y la región de unión conservada. Fab' es 1/2 de la molécula $F(ab')_2$ que posee solamente 1/2 de la región de unión. El término anticuerpo pretende abarcar además los anticuerpos policlonales y los anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos se pueden producir mediante métodos muy conocidos para los expertos en la técnica. Un anticuerpo policlonal, por ejemplo, se puede producir inmunizando un ratón, conejo, o rata con polipéptidos purificados codificados por las variantes ++ y/o +++ de Mena. El anticuerpo monoclonal se puede producir después retirando el bazo del ratón inmunizado, y fusionando las células de bazo con células de mieloma para formar un hibridoma que, cuando se cultive, producirá un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo puede ser, p.ej., cualquiera de un anticuerpo IgA, IgD, IgE, IgG, o IgM. El anticuerpo IgA puede ser, p.ej., un anticuerpo IgA1 o IgA2. El anticuerpo IgG puede ser, p.ej., un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG3 o IgG4. También se puede usar una combinación de cualquiera de estos subtipos de anticuerpos. Una consideración al seleccionar el tipo de anticuerpo a usar es el tamaño del anticuerpo. Por ejemplo, el tamaño de IgG es menor que el de IgM, lo que permite una mayor penetración de IgG en los tejidos. El anticuerpo puede ser un anticuerpo humano o un anticuerpo no humano, tal como un anticuerpo de cabra o un anticuerpo de ratón. Los anticuerpos se pueden "humanizar" mediante el uso de métodos habituales de ADN recombinante.

Los aptámeros son oligonucleótidos monocatenarios o análogos de oligonucleótidos que se unen a una molécula objetivo particular, tal como una proteína. Así, los aptámeros son el análogo oligonucleotídicos de los anticuerpos. Sin embargo, los aptámeros son más pequeños que los anticuerpos. Su unión es muy dependiente de la estructura secundaria formada por el oligonucleótido del aptámero. Se pueden usar aptámeros de ARN y de ADN monocatenario (o análogos). Se pueden seleccionar aptámeros que se unen a prácticamente cualquier objetivo particular mediante el uso de un proceso iterativo denominado SELEX, que significa evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial.

El agente que se une de manera específica a la isoforma ++ o +++ de Mena se puede marcar con un marcador detectable. El marcaje se puede llevar a cabo mediante el uso de una diversidad de métodos de marcaje, que incluyen marcadores de peroxidasa, quimioluminiscentes, y/o radiactivos conocidos en la técnica. El marcador detectable puede ser, por ejemplo, un marcador no radiactivo o fluorescente, tal como biotina, fluoresceína (FITC), acridina, colesterol, o carboxi-X-rodamina, que se puede detectar mediante el uso de fluorescencia y otros métodos de formación de imágenes fácilmente conocidos en la técnica. De manera alternativa, el marcador detectable puede ser un marcador radiactivo, que incluye, por ejemplo, un radioisótopo. El radioisótopo puede ser cualquier isótopo que emita radiación detectable, tal como, por ejemplo, ^{35}S, ^{32}P, o ^{3}H. La radiactividad emitida por el radioisótopo se puede detectar mediante métodos muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, la emisión gamma del radioisótopo se puede detectar mediante el uso de métodos de formación de imágenes de rayos gamma, en particular formación de imágenes mediante gammagrafía.

La expresión de las variantes ++ y/o +++ de Mena en un sujeto se puede detectar por medio de análisis de hibridación de ácido nucleico extraído de una muestra de sangre, tumor, tejido o células del sujeto mediante el uso de una o más sondas de ácido nucleico que hibridan de manera específica al ácido nucleico que codifica las

isoformas ++ y/o +++ de Mena. El ácido nucleico que codifica la isoforma ++ de Mena puede tener la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID Nº:1. El ácido nucleico que codifica la isoforma +++ de Mena puede tener la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID Nº:3. Las sondas de ácido nucleico pueden ser ADN o ARN, y pueden tener una longitud que varía de alrededor de 8 nucleótidos a la longitud completa de la variante ++ o +++ de ácido nucleico de Mena. Los métodos de hibridación son muy conocidos en la técnica, véase, p.ej., Sambrook y Russell (2001). Las sondas se pueden preparar mediante una diversidad de métodos conocidos para los expertos en la técnica, que incluyen, sin limitación, la digestión con enzimas de restricción del ácido nucleico de Mena; y la síntesis automatizada de oligonucleótidos cuya secuencia corresponde a porciones seleccionadas de la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico de Mena, mediante el uso de sintetizadores de oligonucleótidos disponibles comercialmente, tales como el sintetizador de ADN/ARN de Applied Biosystems Modelo 392. Se pueden usar combinaciones de dos o más sondas de ácido nucleico, que corresponden a regiones diferentes o solapantes de la variante ++ o +++ de Mena, para analizar una muestra de diagnóstico en busca de la expresión de la variante ++ o +++ de Mena.

Las sondas de ácido nucleico se pueden marcar con uno o más marcadores detectables. El marcaje de las sondas de ácido nucleico se puede llevar a cabo mediante el uso de varios métodos conocidos en la técnica (p.ej., traslación de mella, marcaje terminal, marcaje terminal por relleno, reacción de intercambio con polinucleótido quinasa, cebado aleatorio, o polimerasa SP6) con una diversidad de marcadores (p.ej., marcadores radiactivos, tales como ^{35}S, ^{32}P, o ^{3}H, o marcadores no radiactivos, tales como biotina, fluoresceína (FITC), acridina, colesterol, o carboxi-X-rodamina (ROX)).

La muestra se puede analizar mediante el uso de cebadores de PCR que hibridan de manera específica al ácido nucleico que codifica la isoforma ++ (SEQ ID Nº:2) o la isoforma +++ (SEQ ID Nº:4) de Mena. El ácido nucleico que codifica la isoforma ++ de Mena puede tener la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID Nº:1. El ácido nucleico que codifica la isoforma +++ de Mena puede tener la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID Nº:3.

La muestra se puede analizar con respecto a la variante ++ de Mena, la variante +++ de Mena, o tanto la variante ++ como la variante +++ de Mena.

Además, o de manera alternativa, se pueden sobreexpresar otras variantes de corte y empalme de Mena durante la metástasis de ciertos tumores.

La sobreexpresión de la variante ++ y/o +++ de Mena se puede dar en combinación con la sobreexpresión de uno o más, por ejemplo, de la subunidad p21 del complejo Arp 2/3, la subunidad p16 del complejo Arp 2/3, actinina alfa 3, proteína de recubrimiento alfa 1, receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), WAVE 3, actina gamma, LIM-quinasa 1, cofilina 1, Rock 1, RhoA o proteína quinasa Cz. Se ha descrito la detección de la expresión de estos genes (p.ej., Kamai et al., 2003; Otsubo et al., 2004; Wang et al., 2004).

La invención proporciona además métodos para inhibir la metástasis de un tumor en un sujeto, y el método comprende reducir la presencia o actividad de la isoforma ++ (SEQ ID Nº:2) y/o la isoforma +++ (SEQ ID Nº:4) de Mena en el sujeto, en el que la expresión de la variante ++ y/o +++ de Mena se compara con la expresión de Mena11a. El método puede implicar la intervención a nivel de ADN, ARN, y/o proteína. Por ejemplo, se puede reducir la presencia o actividad de la isoforma mediante la adición de una molécula inversa, una ribozima, o una molécula de ARN de interferencia (ARNi) al tumor, en el que la molécula inversa, ribozima o molécula de ARNi inhibe de manera específica la expresión de la isoforma. La molécula inversa, ribozima, o molécula de ARNi puede estar compuesta de ácido nucleico (p.ej., ADN o ARN) o moléculas miméticas de ácido nucleico (p.ej., moléculas miméticas de fosforotionato), tal como se conoce en la técnica. Los métodos para tratar el tejido con estas composiciones también se conocen en la técnica. La molécula inversa, ribozima o molécula de ARNi se puede añadir directamente al tejido canceroso en una composición farmacéutica que comprende preferiblemente un excipiente que aumenta la penetración de la molécula inversa, ribozima o molécula de ARNi en las células del tejido. La molécula inversa, ribozima o ARNi se puede expresar a partir de un vector que se transfecta en el tejido canceroso. Tales vectores se conocen en la técnica.

La presencia o actividad de la isoforma se puede reducir mediante la adición de un anticuerpo o aptámero al tejido, en el que el anticuerpo o aptámero se une de manera específica y reduce la actividad de la isoforma en el tejido. El anticuerpo o aptámero se puede añadir directamente al tejido, preferiblemente en una composición farmacéutica que comprende un agente que aumenta la penetración del anticuerpo o aptámero en el tejido. El anticuerpo o aptámero se puede codificar en un vector que se usa para transfectar el tejido canceroso.

La invención también proporciona métodos para el cribado de un compuesto candidato que inhibe la metástasis de un tumor, en el que el método comprende poner en contacto el compuesto con una línea celular o cultivo tisular que expresa la isoforma ++ (SEQ ID Nº:2) y/o la isoforma +++ (SEQ ID Nº:4) de Mena, en el que la expresión de la variante ++ y/o +++ de Mena se compara con la expresión de Mena11a, y en el que la reducción de la expresión de la isoforma ++ y/o +++ de Mena indica que el compuesto es un compuesto candidato para inhibir la metástasis de un tumor.

La descripción también describe un polipéptido purificado, en el que el polipéptido se sobreexpresa en un tumor

metastásico, y el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos de la isoforma ++ (SEQ ID Nº:2) y/o la isoforma +++ (SEQ ID Nº:4) de Mena. La invención también proporciona ácidos nucleicos aislados que codifican estos polipéptidos. El ácido nucleico aislado puede ser ADN o ARN. El ácido nucleico puede comprender la secuencia de nucleótidos para la variante ++ (SEQ ID Nº:1) y/o la variante +++ (SEQ ID Nº:3) de Mena.

Los análisis de laboratorio del tejido de biopsias de pacientes mediante el uso de los protocolos habituales para la detección de la expresión de variantes de ácidos nucleicos o isoformas de proteínas se pueden llevar a cabo en laboratorios de histopatología convencionales. La invención proporciona kits para estos análisis. Los kits de la presente invención para detectar la presencia o ausencia de un tumor metastásico pueden contener un anticuerpo, un péptido o un aptámero que se unen de manera específica a la isoforma ++ (SEQ ID Nº:2) o la isoforma +++ (SEQ ID Nº:4) de Mena. De manera alternativa, o además, los kits pueden contener una sonda o cebadores de PCR que hibridan de manera específica al ácido nucleico que codifica la isoforma ++ (SEQ ID Nº:2) o la isoforma +++ (SEQ ID Nº:4) de Mena. El ácido nucleico que codifica la isoforma ++ de Mena puede tener la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID Nº:1. El ácido nucleico que codifica la isoforma +++ de Mena puede tener la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID Nº:3.

La presente invención se ilustra en la siguiente sección de Detalles Experimentales, que se expone para ayudar a comprender la invención.

DETALLES EXPERIMENTALES

Materiales y Métodos

Aislamiento de Células Tumorales Invasivas mediante Análisis de Invasión in vivo y Clasificación de Células Activada por Fluorescencia de Células Tumorales Primarias. Se usaron tumores mamarios derivados de MTLn3 en ratas (Wang et al., 2004), el modelo transgénico de cáncer de mama en ratones controlado por PyMT, y el análisis de invasión *in vivo* como se describieron previamente (Wang et al., 2004; Wyckoff et al., 2000) para estudiar el patrón de expresión génica de subpoblaciones invasivas de células de carcinoma en tumores primarios vivos. El análisis de invasión *in vivo* usa microagujas rellenas de Matrigel y factores de crecimiento para recoger células tumorales invasivas de tumores primarios. Las microagujas se mantienen en un dispositivo de sujeción y se colocan en el tumor primario con un micromanipulador. Se usó un décimo del volumen de cada aguja para determinar el número de células recogidas. Las células recogidas fueron una mezcla de células de carcinoma (75%) y macrófagos (25%). Del 9/10 de volumen restante de la microaguja, se eliminaron los macrófagos mediante separación magnética con el uso de microesferas CD11b (Mitenyl Biotech, EE.UU.), y se extrajo el ARN de las células de carcinoma purificadas como se describió previamente (Wang et al., 2004). Para aislar las células tumorales primarias corrientes (APTCs), se separó un pequeño fragmento de tumor del tumor completo, se fragmentó, y se filtró dos veces a través de un filtro de nailon para obtener una suspensión de células individuales. Para aislar las células tumorales a partir de sangre, se llevó a cabo una punción en la aurícula derecha en animales anestesiados; los eritrocitos se lisaron mediante el uso de un tampón de lisis de cloruro amónico. Para purificar las células cancerosas a partir de la metástasis de pulmón, se fragmentó una porción del pulmón, y se filtró dos veces a través de un filtro de nailon para obtener una suspensión de células individuales. Se llevó a cabo la clasificación de células activada por fluorescencia (FACS) con las suspensiones de células individuales resultantes basándose en la expresión de la proteína fluorescente verde (GFP) en las células tumorales. Las células tumorales positivas para GFP se recogieron en un tubo y se lisaron directamente para extraer el ARN. Todos los procedimientos se realizaron sobre hielo o a 4 °C.

Controles para el Patrón de Expresión Génica Específico de Invasión. Para detectar los efectos de la toma de muestras con microagujas sobre la expresión génica, las líneas celulares usadas para preparar tumores y las células tumorales clasificadas mediante FACS a partir de tumores primarios se sometieron a una recogida con microagujas, matrigel, y factor de crecimiento epidérmico (EGF). Los patrones de genes resultantes de estos estímulos no estuvieron relacionados con la característica distintiva de invasión mostrada previamente (Wang et al., 2004) ya que los genes regulados por EGF y matrigel se eliminaron del análisis final. Se analizó el efecto de la contención en agujas de las células invasivas después de que entrasen en la microaguja, y los datos se presentan en la Figura 6. Finalmente, con respecto al efecto del uso de microesferas de anticuerpos dirigidos hacia las células invasivas para separar los tipos de células, la expresión de genes relacionados con la característica distintiva de invasión de las células tumorales no se ve afectada, tal como se muestra en la Figura 7 y como se discute en la sección de resultados y discusión. Así, solamente el medio dentro del tumor primario genera el patrón de expresión génica de las células invasivas.

Líneas Celulares y Cultivo Celular. El adenocarcinoma de ratas MTLn3, y las líneas celulares de cáncer de mama humanas MDA-231 y T47D se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, Virginia. Las condiciones de cultivo para MTLn3 fueron alfa MEM con un 5% de FBS. MDA-231 y T47D se cultivaron en medio esencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco/Vogt (DMEM) con un 10% de suero bovino fetal (FBS), insulina y selenio.

RT-PCR y QRT-PCR: La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) y PCR en tiempo real cuantitativa (QRT-PCR) se llevaron a cabo mediante el uso de los cebadores mencionados en la Tabla 1. La QRT-PCR se llevó a cabo mediante el uso del kit SyBr Green, detector de secuencias ABI 9700, y el análisis de los datos

se llevó a cabo mediante el uso del programa informático ABI Prism 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se proporciona una estrategia para el diseño de las secuencias de los cebadores en la Figura 5.

RACE, Clonación y Secuenciación: El RACE de 3' y 5' se llevó a cabo mediante el uso del kit Invitrogen RACE Ready cDNA (las secuencias se proporcionan en la Tabla 1, y la estrategia de diseño de cebadores de RACE se proporciona en la Figura 5), y se clonaron mediante el uso del kit de clonación de Invitrogen TOPO TA, siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, la PCR se llevó a cabo mediante el uso de dos cebadores internos para las secuencias ++ y +++ (Tabla 1) y un cebador de oligo dT para el extremo 5', y un cebador de poli G para el extremo 3'. Los productos de PCR se eluyeron del gel y se clonaron en el vector pCR-TOPO. El vector ligado se transformó en células químicamente competentes; los clones seleccionados se secuenciaron mediante el uso de cebadores M13. La alineación de secuencias se llevó a cabo mediante el uso del programa informático DNASTAR.

Tabla 1. Secuencias de Cebadores

Secuencias de cebadores de Mena

1.	AGAGGATGCCAATGTCTTCG	(SEQ ID Nº:5)
2.	TGTCTAGGCAATGTTGGCC	(SEQ ID Nº:6)
3.	GATTCAAGACCATCAGGTTGTG	(SEQ ID Nº:7)
4.	CAATGTTGGCCCTAAATAGAA	(SEQ ID Nº:8)
d4.	TTCTATTTAGGGCCAACATTG	(SEQ ID Nº:9)
5.	TACATCGCAAATTAGTGCTGTC	(SEQ ID Nº:10)
d5.	GACAGCACTAATTTGCGATGT	(SEQ ID Nº:11)
6.	CCAACCAGAAAACCTTGGG	(SEQ ID Nº:12)
7.	TGCTTCAGCCTCTCATAGTCA	(SEQ ID Nº:13)
8.	GAGCGAGAGAGGCAGAG	(SEQ ID Nº:14)
9.	GCTCGGAAGCAGAGGAGTCT	(SEQ ID Nº:15)

Cebador Pan Mena

Directo:	CGGCAGTAAGTCACCTGTCA	(SEQ ID Nº:16)
Inverso:	CTTCAGCTTTGCCAGCTCTT	(SEQ ID Nº:17)

Cebadores Smart

Oligonucleótido SMART II™ A

AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG (SEQ ID Nº:18)

Cebador A de CDS de 3'-RACE

AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC (T) 30V N (SEQ ID Nº:19)

(N = A, C, G, o T; V = A, G, o C)

Cebador A de CDS de 5'-RACE (T) 25V N (SEQ ID Nº:20)

(N = A, C, G, o T; V = A, G, o C)

Largo:

CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT (SEQ ID Nº:21)

Corto:

CTAATACGACTCACTATAGGGC (SEQ ID Nº:22)

Resultados y Discusión

En este estudio se han identificado isoformas específicas de Mena que están elevadas en las células de cáncer de mama invasivo. Se utilizaron tres modelos en este informe, es decir, el modelo de aloinjerto de adenocarcinoma de ratas MTLn3, el modelo de cáncer de mama transgénico de ratones PyMT y varias líneas celulares de cáncer de mama humano. La expresión de Mena está elevada 3-4 veces en las células de cáncer de mama primarias invasivas (Wang et al., 2004). Los controles realizados para determinar los efectos de las manipulaciones usadas para recoger las células tumorales invasivas del tumor mamario primario demuestran que la expresión de la isoforma de invasión

de Mena no se induce por la recogida de las células. Solamente el microambiente del tumor induce la expresión de estas isoformas. En este estudio se determinó la estabilidad de esta sobreexpresión, es decir, las células invasivas recogidas mediante un análisis de invasión *in vivo* mostraron una elevación de 3-4 veces de la expresión de Mena en comparación con APTCs. Por lo tanto, las células se siguieron y se separaron de la sangre y de la metástasis pulmonar. Mediante el uso del modelo MTLn3 y del modelo transgénico PyMT de ratón, se recogieron las células invasivas y se separaron mediante un análisis de invasión *in vivo*, y las APTCs mediante clasificación por FACS. El análisis mediante RT-PCR de las células invasivas mostró que hubo amplicones específicos de los exones ++ y +++ elevados en ambos modelos. También se detectó un amplicón específico para el exón +. Sin embargo, no mostró ningún cambio entre las células invasivas y las APTCs. Los estudios mediante QRT-PCR confirmaron el hallazgo de la RT-PCR, y mostraron una elevación de los exones ++ y +++ en las células invasivas para el modelo de MTLn3 (Figura 1A) y para el modelo de PyMT de ratón (Figura 1B). La Figura 2 muestra que la variante de corte y empalme ++ y +++ del ARN mensajero de Mena permanece elevada en las células que se han intravasado a la sangre y en las células que han formado metástasis eficaces en el pulmón. Esto indica que el cambio del nivel de expresión se debe a un cambio genético estable en las células metastásicas.

Los resultados de la RT-PCR y la QRT-PCR mostraron que ambos exones ++ y +++ están elevados en las células invasivas. Sin embargo, no estuvo claro si los exones están presentes en un único transcrito o en transcritos diferentes. Para abordar esta cuestión, se clonaron y se secuenciaron los transcritos que albergaban ++ y +++ de los tumores transgénicos de ratón PyMT invasivos. Se seleccionó el análisis RACE para identificar los transcritos que contenían los exones ++ y +++. Los resultados proporcionan una secuencia consenso de al menos 10 clones para cada transcrito. Los resultados muestran un 100% de coincidencia con las secuencias publicadas de ratón, y demostraron que los exones ++ y +++ están en transcritos diferentes. Las alineaciones para las secuencias ++ y +++ se muestran en la Figura 4.

Las Figuras 6 y 7 muestran que las dos variantes 2+ y 3+ permanecen elevadas a nivel de mARN en las células tumorales circulantes en la sangre, lo que hace posible un análisis de sangre para estas variantes. Así, se puede usar una PCR, sondas de ácidos nucleicos y/o tinción con anticuerpos para diagnosticar una enfermedad metastásica mediante el uso de una muestra de sangre.

Basándose en los datos de alineación de secuencias anteriores, una sonda molecular, ácido nucleico o anticuerpo, o ambos, hacia cada variante ++ o +++ proporcionaría una herramienta de diagnóstico/pronóstico importante. Debido a que la estimulación de la expresión de los exones ++ y +++ observada aquí es un cambio estable en las células tumorales mamarias invasivas y metastásicas, las sondas dirigidas de manera específica hacia estos exones serían marcadores de diagnóstico potentes con respecto a la presencia de células metastásicas, y por lo tanto con respecto a la posibilidad de enfermedad metastásica.

La Figura 8 muestra el aumento de la migración de células tumorales cuando se expresa Mena 3+. De manera importante, como se muestra en la Figura 9, la inhibición de la migración de células tumorales metastásicas se da cuando se inhibe Mena, en este caso mediante el uso de mito, una molécula que redirige a Mena hacia un lugar erróneo en la célula. Este resultado establece que la inhibición de la función de Mena inhibe la migración de las células metastásicas, y por lo tanto es una buena estrategia para inhibir la metástasis.

Todos los adenocarcinomas humanos derivan de órganos epiteliales que pueden compartir una estrategia morfogenética común a nivel molecular (Condeelis y Pollard, 2006; Wang et al., 2004, 2005). La característica distintiva de la invasión, de la que Mena 2+ y 3+ son isoformas de invasión, predice que se usa la misma estrategia morfogenética para la morfogénesis normal de órganos y la metástasis tumoral. Esto sugiere que Mena 2+ y 3+ serán objetivos útiles para el diagnóstico y la terapia de todos los adenocarcinomas comunes en seres humanos adultos. En particular, la invención descrita en la presente memoria será aplicable a tumores tales como tumores de mama, próstata, páncreas, colon, cerebro e hígado.

Referencias

Barzik M, Kotova TI, Higgs HN et al. Ena/VASP proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins. J Biol Chem. 5 de agosto de 2005; 280(31):28653-62.

Brinkman BM. Splice variants as cancer biomarkers. Clin Biochem. julio de 2004; 37(7):584-94.

Condeelis y Pollard (2006) Macrophages: Obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. Cell 124: 263-266.

Condeelis J, Singer RH, Segall JE. The great escape: when cancer cells hijack the genes for chemotaxis and motility. Annu Rev Cell Dev Biol. 2005;21: 695-718.

Di Modugno F, Bronzi G, Scanlan MJ et al. Human Mena protein, a serex-defined antigen overexpressed in breast cancer eliciting both humoral and CD8+ T-cell immune response. Int J Cancer. 10 de mayo de 2004; 109(6):909-18.

Gertler FB, Niebuhr K, Reinhard M et al. Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. Cell. 18 de oct. de 1996; 87(2):227-39.

Kamai T, Tsujii T, Arai K, Takagi K, Asami H, Ito Y, Oshima H. Significant association of Rho/ROCK pathway with invasion and metastasis of bladder cancer. Clin Cancer Res. julio de 2003; 9(7):2632-41.

Kuhnel K, Jarchau T, Wolf E et al. The VASP tetramerization domain is a right-handed coiled coil based on a 15-residue repeat. Proc Natl Acad Sci USA. 7 de dic. de 2004; 101(49):17027-32.

Loureiro JJ, Rubinson DA, Bear JE et al. Critical roles of phosphorylation and actin binding motifs, but not the central proline-rich region, for Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) function during cell migration. Mol Biol Cell. julio de 2002; 13 (7):2533-46.

Otsubo T, Iwaya K, Mukai Y, Mizokami Y, Serizawa H, Matsuoka T, Mukai K. Involvement of Arp2/3 complex in the process of colorectal carcinogenesis. Mod Pathol. abril de 2004; 17(4):461-7.

Prehoda KE, Lee DJ, Lim WA. Structure of the enabled/VASP homology 1 domain-peptide complex: a key component in the spatial control of actin assembly. Cell. 14 de mayo de 1999; 97(4):471-80.

Sambrook J y Russell DW. Molecular Cloning. A Laboratory Manual, tercera edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

Scott JA, Shewan AM, den Elzen NR et al. Ena/VASP proteins can regulate distinct modes of actin organization at cadherin-adhesive contacts. Mol Biol Cell. marzo de 2006; 17(3):1085-95.

Urbanelli L, Massini C, Emiliani C et al. Characterization of human Enah gene. Biochim Biophys Acta. ene.-feb. de 2006; 1759(1-2):99-107.

Venables JP. Unbalanced alternative splicing and its significance in cancer. Bioessays. abril de 2006; 28(4):378-86.

Wang W, Goswami S, Lapidus K, et al. Identification and testing of a gene expression signature of invasive carcinoma cells within primary mammary tumors. Cancer Res. 1 de dic. de 2004; 64(23):8585-94.

Wang, Goswami, Sahai, Wyckoff, Segall, Condeelis (2005) Tumor Cells caught in the act of invading: their strategy for enhanced cell motility. Trends Cell Biol. 15:138-145.

Wang W, Mouneimne G, Sidani M et al., The activity status of cofilin is directly related to invasion, intravasation, and metastasis of mammary tumors. J Cell Biol. 8 de mayo de 2006; 173(3):395-404.

Wyckoff JB, Segall JE, Condeelis JS. The collection of the motile population of cells from a living tumor. Cancer Res. 1 de oct. de 2000; 60(19):5401-4.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Albert Eisntein College of Medicine of Yeshiva University
Massachusetts Institute of Technology
IFO-Regina Elena Cancer Institure

<120> Variantes de corte y empalme específicas de metástasis de Mena y usos de las mismas en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de tumores.

<130> 96700/1343

<150> US 60/899,303
<151> 02-02-2007

<160> 22

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1
<211> 12
<212> ADN
<213> Humano

<400> 1
ttctatttag gg 12

<210> 2
<211> 4
<212> PRT
<213> Humano

<400> 2
Phe Tyr Leu Gly
1

<210> 3
<211> 57
<212> ADN
<213> Humano

<400> 3
gcccagagca aggttactgc tacccaggac agcactaatt tgcgatgtat tttctgt 57

<210> 4
<211> 19
<212> PRT
<213> Humano

<400> 4
Ala Gln Ser Lys Val Thr Ala Thr Gln Asp Ser Thr Asn Leu Arg Cys
1 5 10 15

Ile Phe Cys

<210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 5

agaggatgcc aatgtcttcg 20

<210> 6
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 6
tgtctaggca atgttggcc 19

<210> 7
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador
<400> 7
gattcaagac catcaggttg tg 22

<210> 8
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 8
caatgttggc cctaaataga a 21

<210> 9
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 9
ttctatttag ggccaacatt g 21

<210> 10
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 10
tacatcgcaa attagtgctg tc 22

<210> 11
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 11
gacagcacta atttgcgatg t 21

<210> 12
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 12
ccaaccagaa aaccttggg 19

<210> 13
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 13
tgcttcagcc tctcatagtc a 21

<210> 14
<211> 17
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 14
gagcgagaga ggcagag 17

<210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 15
gctcggaagc agaggagtct 20

<210> 16
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 16
cggcagtaag tcacctgtca 20

<210> 17
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 17
cttcagcttt gccagctctt 20

<210> 18
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 18
aagcagtggt atcaacgcag agtacgcggg 30

<210> 19
<211> 57
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<220>
<221> característica miscelánea
<222> (57)..(57)
<223> n es a, c, t o g

<400> 19
aagcagtggt atcaacgcag agtactvvvv vvvvvvvvvv vvvvvvvvvv vvvvvvn 57

<210> 20
<211> 28
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<220>
<221> característica miscelánea
<222> (28)..(28)
<223> n es a, c, g o t

<400> 20
atvvvvvvvv vvvvvvvvvv vvvvvvvn 28

<210> 21
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 21
ctaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gtatcaacgc agagt 45

<210> 22
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebador

<400> 22
ctaatacgac tcactatagg gc 22

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar si un sujeto tiene un tumor metastásico, que comprende analizar una muestra de sangre, tejido y/o tumor del sujeto en busca de la expresión de la variante ++ y/o +++ de Mena, en el que la expresión de la variante ++ y/o +++ de Mena se compara con la expresión de Mena 11a, y en el que la sobreexpresión de la variante ++ y/o +++ de Mena indica la presencia de un tumor metastásico.

2. Un método para determinar la eficacia de la terapia de tratamiento de un tumor metastásico en un sujeto que se ha sometido o se está sometiendo a tratamiento contra un tumor metastásico, y el método comprende analizar una muestra de sangre, tejido y/o tumor del sujeto en busca de la expresión de la variante ++ y/o +++ de Mena, en el que la expresión de la variante ++ y/o +++ de Mena se compara con la expresión de Mena 11a, y en el que la sobreexpresión de la variante ++ y/o +++ de Mena indica la necesidad de continuar la terapia para tratar el tumor.

3. Un método para determinar el pronóstico de un sujeto que tiene un tumor metastásico, que comprende analizar una muestra de sangre, tejido y/o tumor del sujeto en busca de la expresión de la variante ++ y/o +++ de Mena, en el que la expresión de la variante ++ y/o +++ de Mena se compara con la expresión de Mena 11a, y en el que el pronóstico del sujeto mejora con una disminución de la expresión de la variante ++ y/o +++ de Mena.

4. Un método para el cribado de un compuesto candidato que inhibe la metástasis de un tumor, y el método comprende poner en contacto el compuesto con una línea celular o cultivo tisular que expresa la isoforma ++ (SEQ ID Nº:2) y/o la isoforma +++ (SEQ ID Nº:4) de Mena, en el que la expresión de la variante ++ y/o +++ de Mena se compara con la expresión de Mena 11a, y en el que la reducción de la expresión de la isoforma ++ y/o +++ de Mena indica que el compuesto es un compuesto candidato para inhibir la metástasis de un tumor.

5. Una molécula inversa, ribozima, molécula de ARNi, anticuerpo o aptámero para el uso en la inhibición de la metástasis de un tumor en un sujeto, por lo cual la molécula inversa, ribozima, molécula de ARNi, anticuerpo o aptámero reduce la presencia o actividad de la isoforma ++ (SEQ ID Nº:2) y/o isoforma +++ (SEQ ID Nº:4) de Mena en el sujeto, en el que la expresión de la variante ++ y/o +++ de Mena se compara con la expresión de Mena 11a.

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 o la molécula inversa, ribozima, molécula de ARNi, anticuerpo o aptámero para la inhibición de la metástasis de un tumor en un sujeto de la reivindicación 5, en el que el tumor es un tumor epitelial secretor o en el que el tumor es un tumor de mama, páncreas, próstata, colon, cerebro o hígado.

7. El método de la reivindicación 1, 2 o 3, en el que la muestra se analiza mediante el uso de un agente, tal como un anticuerpo, un péptido o un aptámero, que se une de manera específica a la isoforma ++ (SEQ ID Nº:2) o la isoforma +++ (SEQ ID Nº:4) de Mena.

8. El método de la reivindicación 1, 2, o 3, en el que la muestra se analiza mediante el uso de al menos una sonda de ácido nucleico, tal como una sonda de ADN o una sonda de ARN, que hibrida de manera específica con un ácido nucleico que codifica la isoforma ++ de Mena o la isoforma +++ de Mena, en el que la isoforma ++ de Mena tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID Nº:2 y la isoforma +++ de Mena tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID Nº:4, o en el que la muestra se analiza mediante el uso de cebadores de PCR que hibridan de manera específica con un ácido nucleico que codifica la isoforma ++ de Mena o la isoforma +++ de Mena, en el que la isoforma ++ de Mena tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID Nº:2 y la isoforma +++ de Mena tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID Nº:4.

9. El método de la reivindicación 1, 2, o 3, en el que la muestra se analiza en busca de la variante ++ y la variante +++ de Mena.

10. El método de la reivindicación 1, 2, o 3, en el que la sobreexpresión de la variante ++ y/o +++ de Mena se da en combinación con la sobreexpresión de una o más de actinina alfa 3, actina gamma, RhoA o proteína quinasa Cz.

11. La molécula inversa, ribozima, molécula de ARNi, anticuerpo o aptámero para el uso en la inhibición de la metástasis de un tumor en un sujeto de la reivindicación 5, en la que la presencia o actividad de la isoforma se reduce mediante la adición de una molécula inversa, una ribozima, o una molécula de ARNi al tumor, en la que la molécula inversa, ribozima o molécula de ARNi inhibe de manera específica la expresión de la isoforma, o en la que la presencia o actividad de la isoforma se reduce mediante la adición de un anticuerpo o aptámero al tumor, en la que el anticuerpo o aptámero se une de manera específica y reduce la actividad de la isoforma.

12. El método de la reivindicación 7 o 8, en el que el agente, anticuerpo, péptido o aptámero o la sonda de ácido nucleico están marcados con un marcador detectable.

13. El método de la reivindicación 8, en el que el ácido nucleico que codifica la isoforma ++ de Mena tiene la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID Nº:1, o en el que el ácido nucleico que codifica la isoforma +++ de Mena tiene la secuencia de nucleótidos expuesta en SEQ ID Nº:3.

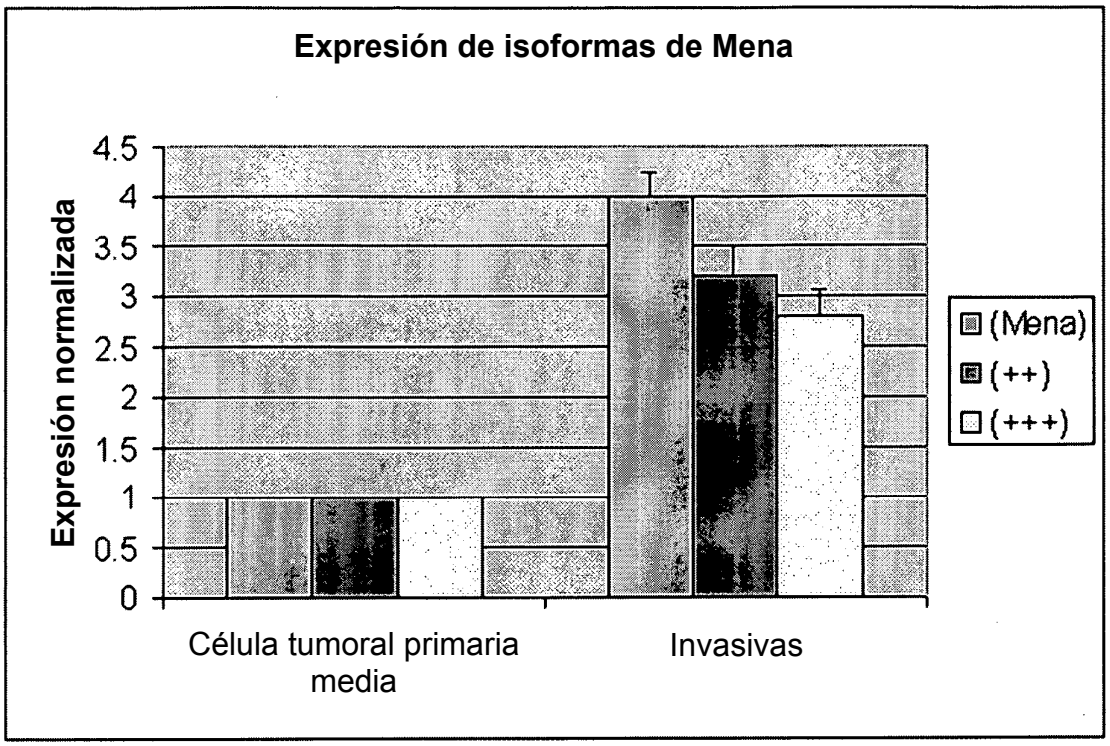

Expresión de isoformas de Mena
Expresión normalizada
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Célula tumoral primaria media
Invasivas
(Mena)
(++)
(+++)

FIGURA 1A

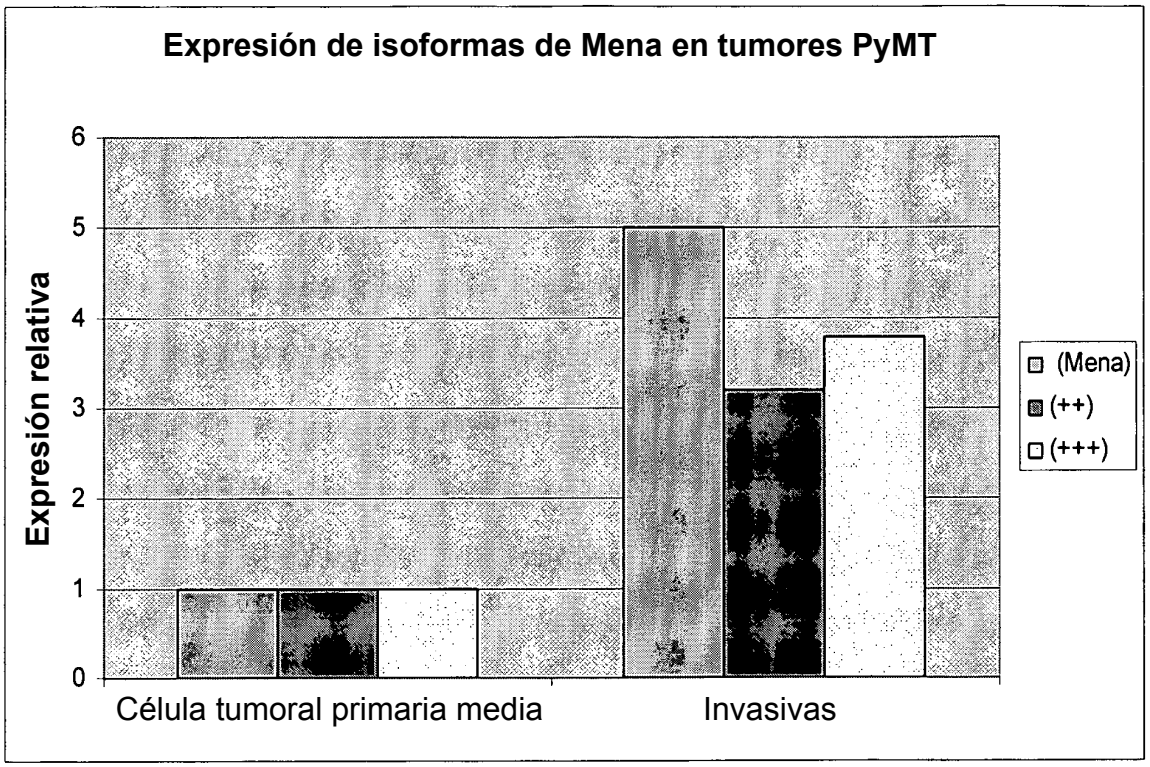

Expresión de isoformas de Mena en tumores PyMT
Expresión relativa
6
5
4
3
2
1
0
Célula tumoral primaria media
Invasivas
(Mena)
(++)
(+++)

FIGURA 1B

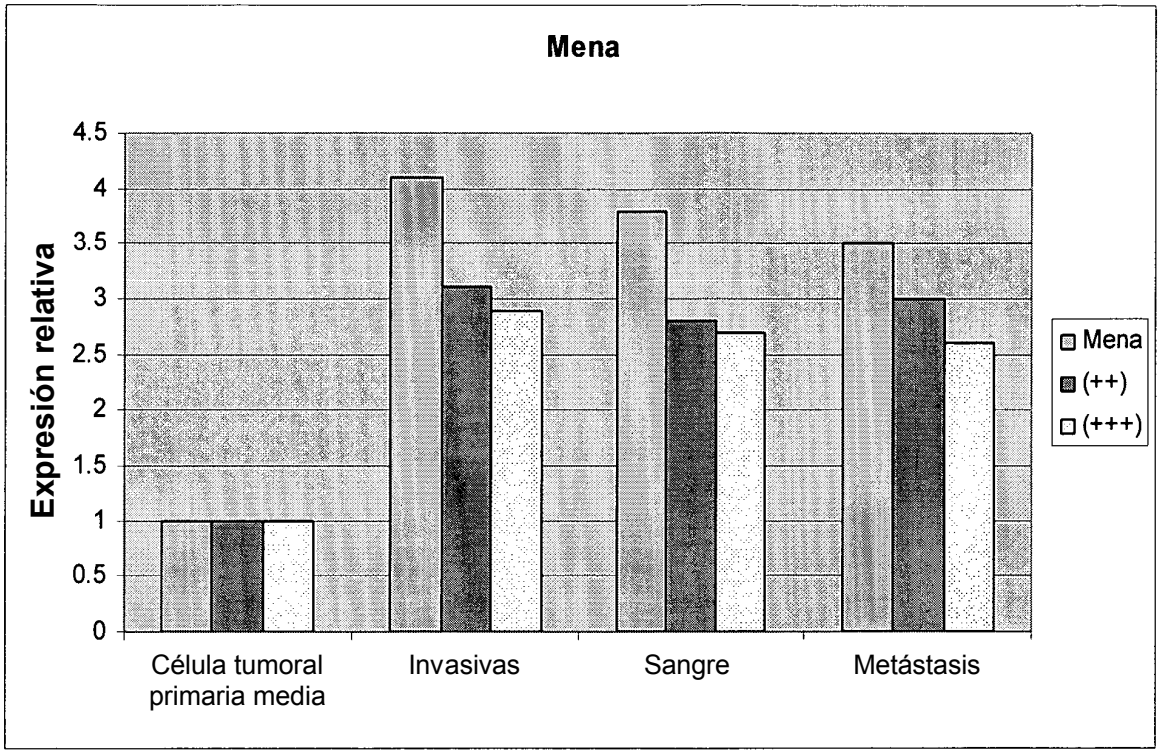
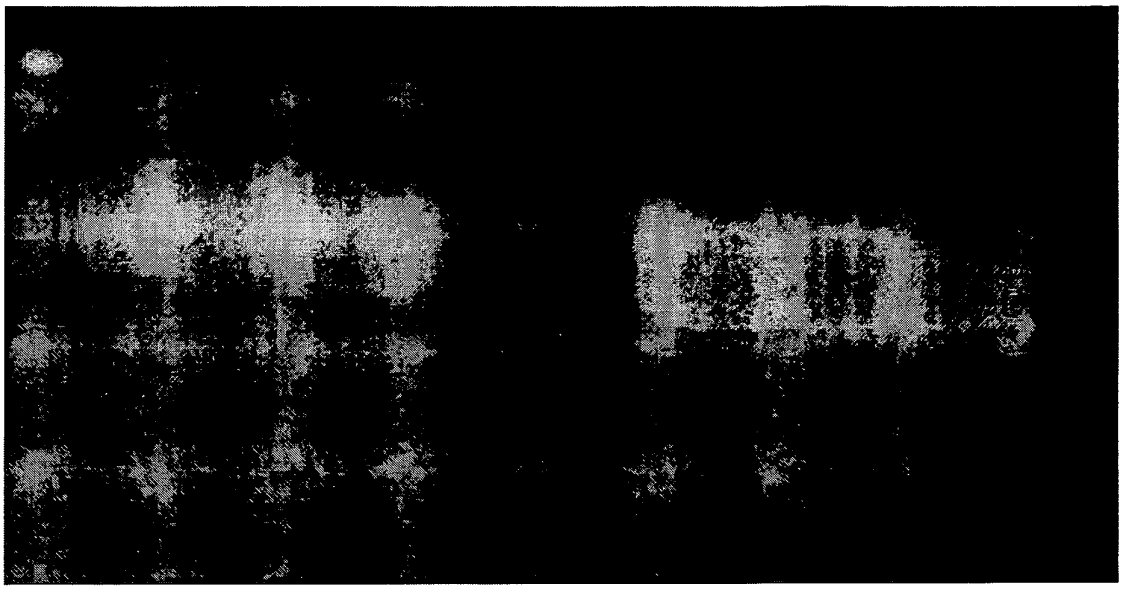

Mena
Expresión relativa
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Célula tumoral primaria media
Invasivas
Sangre
Metástasis
Mena
(++)
(+++)

FIGURA 2



MDA 231 T47D

FIGURA 3

A Secuencia de nucleótidos ++

Humano: TTCTATTTAGGG
Ratón: TTCTATTTAGGG
Invasivo: TTCTATTTAGGG
SEQ ID NO:1

Secuencia de aminoácidos ++ deducida

Humano: FYLG
Ratón: FYLG
Invasivo: FYLG
SEQ ID NO:2

B Secuencia de nucleótidos +++

Humano: GCCCAGAGCAAGGTTACTGCTACCCAGGACAGCACTAATTTGCGATGTATTTTCTGT
Ratón: GCCCAGAGCAAGGTTACTGCTACGCAGGACAGCACTAATTTGCGATGTATTTTCTGT
Invasivo: GCCCAGAGCAAGGTTACTGCTACGCAGGACAGCACTAATTTGCGATGTATTTTCTGT
SEQ ID NO:3

Secuencia de aminoácidos +++ deducida

Humano: AQSKVTATQDSTNLRCIFC
Ratón: AQSKVTATQDSTNLRCIFC
Invasivo: AQSKVTATQDSTNLRCIFC
SEQ ID NO:4

FIGURA 4A-4B

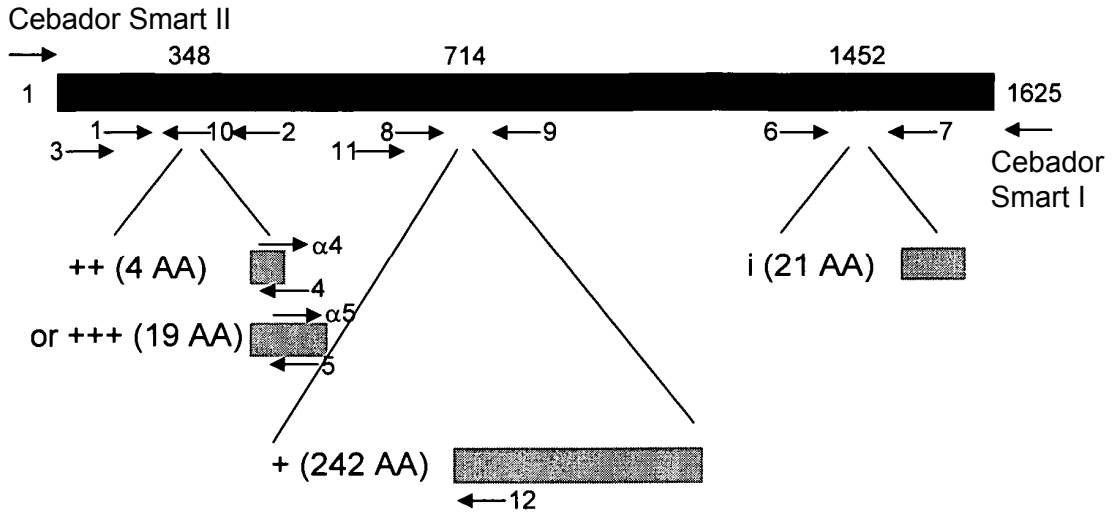

Cebador Smart II
348
714
1452
1
1625
1
10
2
8
9
6
7
3
11
Cebador
Smart I
α4
++ (4 AA)
4
α5
or +++ (19 AA)
5
i (21 AA)
+ (242 AA)
12

FIGURA 5

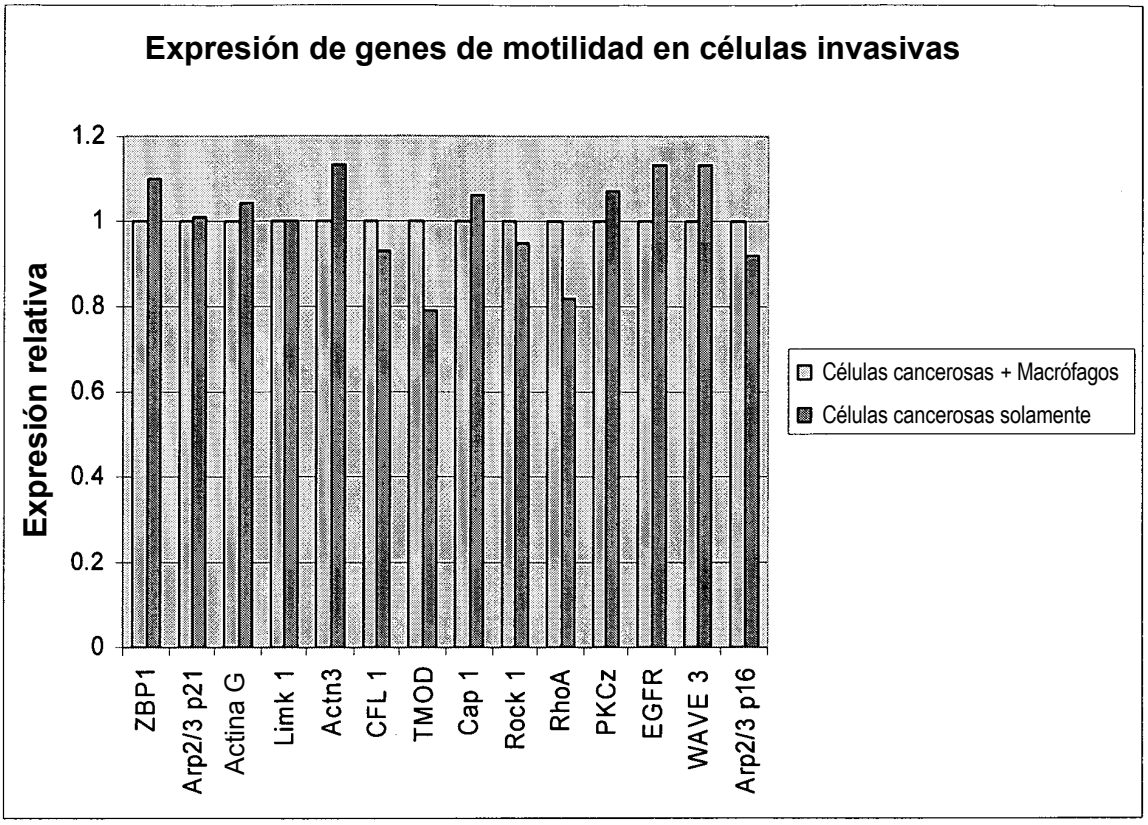

Expresión de genes de motilidad en células invasivas
Expresión relativa
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
ZBP1
Arp2/3 p21
Actina G
Limk 1
Actn3
CFL 1
TMOD
Cap 1
Rock 1
RhoA
PKCz
EGFR
WAVE 3
Arp2/3 p16
Células cancerosas + Macrófagos
Células cancerosas solamente

FIGURA 6

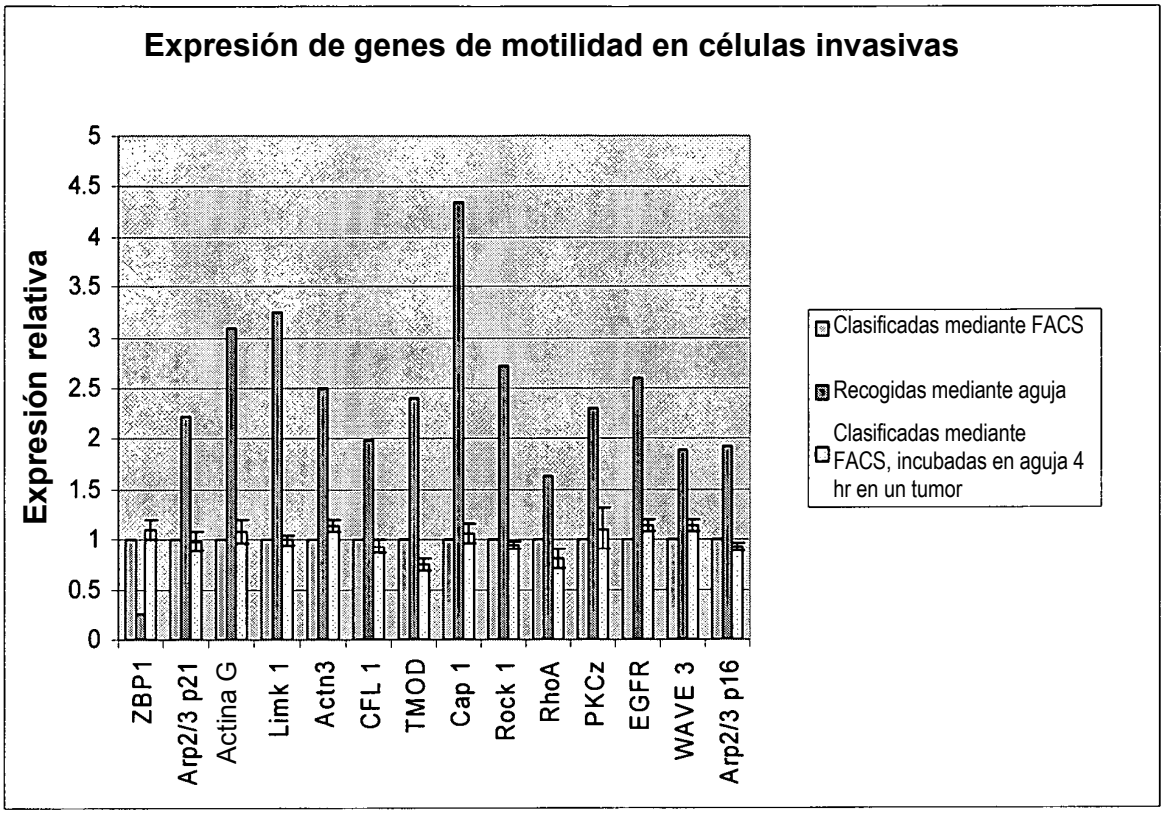

Expresión de genes de motilidad en células invasivas
Expresión relativa
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
ZBP1
Arp2/3 p21
Actina G
Limk 1
Actn3
CFL 1
TMOD
Cap 1
Rock 1
RhoA
PKCz
EGFR
WAVE 3
Arp2/3 p16
Clasificadas mediante FACS
Recogidas mediante aguja
Clasificadas mediante FACS, incubadas en aguja 4 hr en un tumor

FIGURA 7

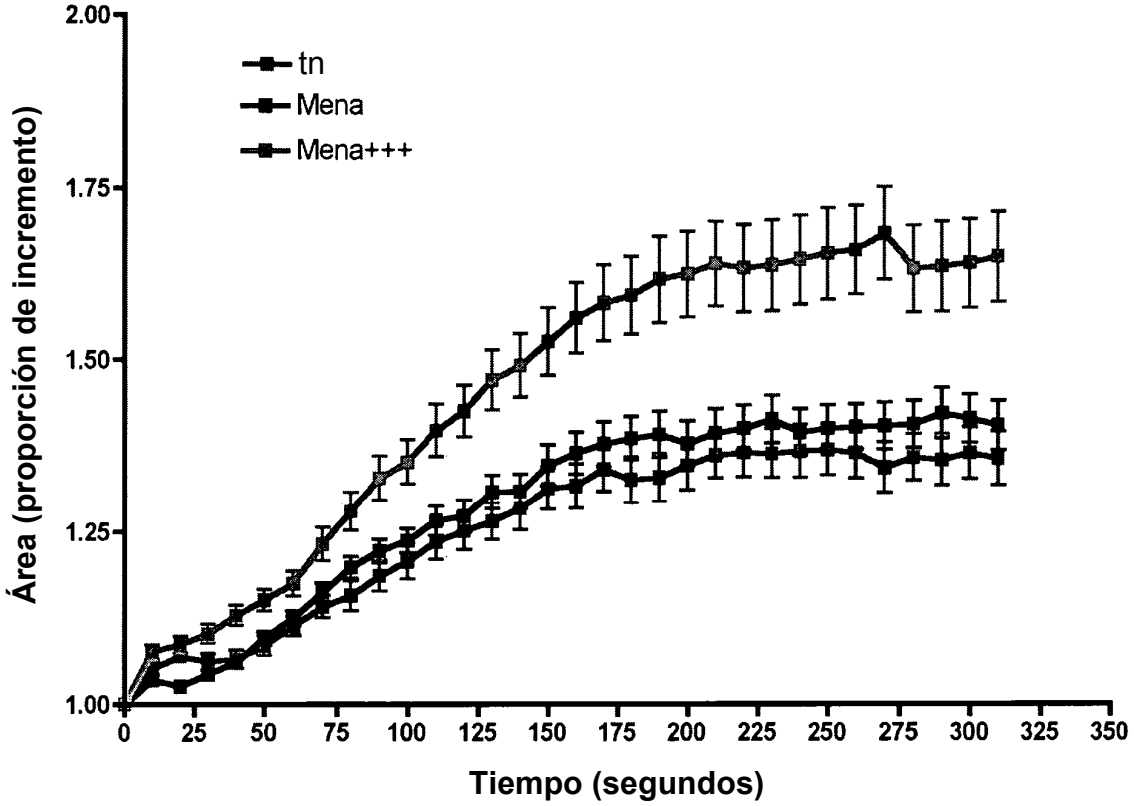

2.00
1.75
1.50
1.25
1.00
Área (proporción de incremento)
tn
Mena
Mena+++
0
25
50
75
100
125
150
175
200
225
250
275
300
325
350
Tiempo (segundos)

FIGURA 8

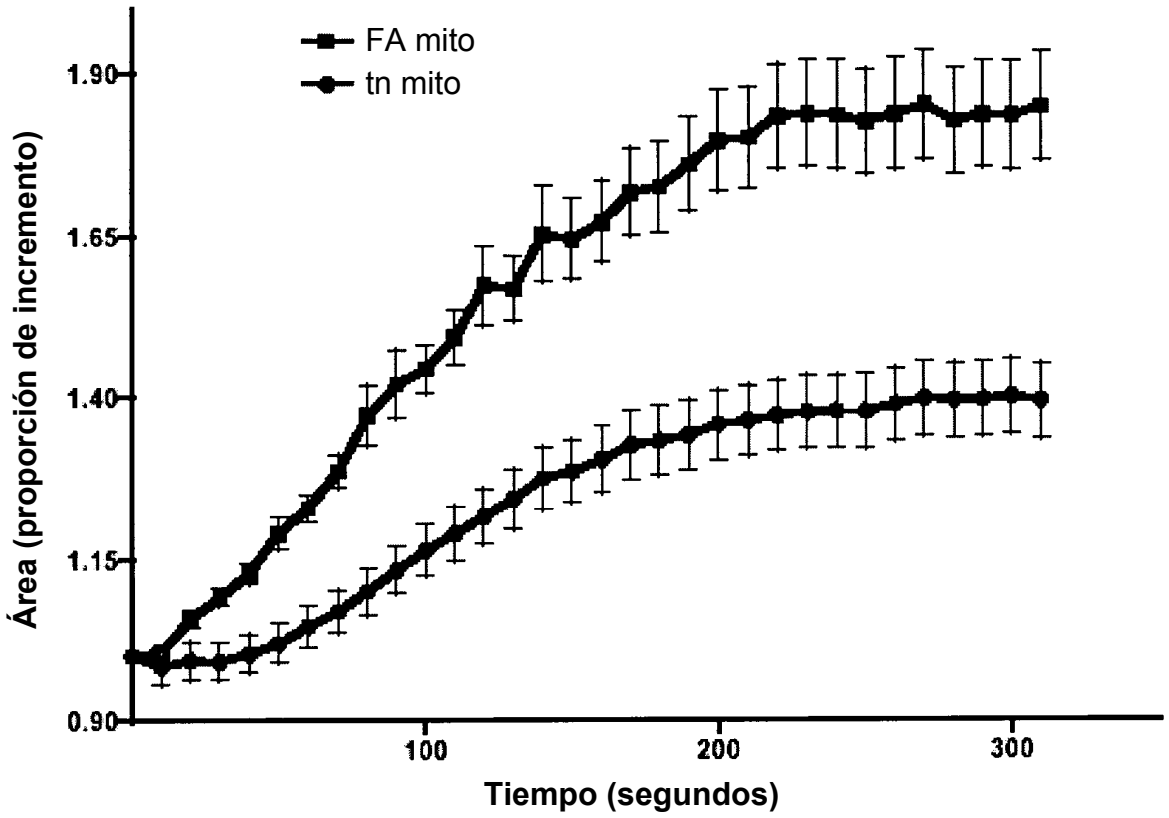

FA mito
tn mito
1.90
1.65
1.40
1.15
0.90
Área (proporción de incremento)
100
200
300
Tiempo (segundos)

FIGURA 9