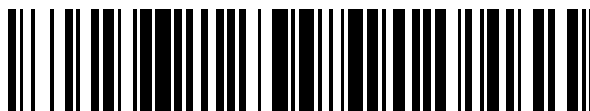


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 079 861**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 31/502 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.01.2023** **PCT/EP2023/050542**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.07.2023** **WO23135169**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.01.2023** **E 23700741 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2026** **EP 4463162**

54 Título: **Conexina 43 para su uso en el tratamiento de cáncer con mutación en *BRCA1/2***

30 Prioridad:

11.01.2022 EP 22382009

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.09.2026

73 Titular/es:

FUNDACIÓN PROFESOR NOVOA SANTOS
(85,00%)
Avda. Xubias de Arriba, 84
15006 A Coruña, ES y
SERVIZO GALEGO DE SAÚDE (SERGAS)
(15,00%)

72 Inventor/es:

MAYÁN SANTOS, MARÍA DOLORES;
RODRÍGUEZ-CANDELA MATEOS, MARINA;
ACEA NEBRIL, BENIGNO y
SANTIAGO FREIJANES, MARÍA PAZ

74 Agente/Representante:

MARTÍNEZ, Miguel Ángel

ES 3 079 861 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

Conexina 43 para su uso en el tratamiento de cáncer con mutación en *BRCA1/2*

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo médico. Particularmente, la presente invención se refiere a conexina 43 (Cx43) para su uso en el tratamiento de cáncer con mutación en *BRCA1/2* seleccionado de: cáncer de mama triple negativo (TNBC) con mutación en *BRCA1/2* y/o cáncer de ovario con mutación en *BRCA1/2* y/o cáncer de pulmón con mutación en *BRCA1/2*; preferiblemente en combinación con un inhibidor de poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP) (PARPi).

Estado de la técnica

Los genes *BRCA1/2* (*BRCA1* y *BRCA2*) codifican para proteínas supresoras de tumores implicadas en la reparación del ADN. Las mutaciones perjudiciales en estos genes aumentan el riesgo de cáncer de mama y de ovario 5 y 10-30 veces el número normal, respectivamente. Aunque sólo el 5-10 % de los casos de cáncer de mama se deben a estas mutaciones, su impacto es muy superior a través del alto riesgo al que están asociados. Entre el 50 y el 65 % de las mujeres con mutación en *BRCA1* desarrollarán cáncer de mama a la edad de 70 años, y entre el 35 y el 46 % en el caso del cáncer de ovario; entre el 40 y el 57 % de las mujeres con mutación en *BRCA2* padecerá neoplasia mamaria a la edad de 70 años, y entre el 13 y el 23 % desarrollará carcinoma de ovario. La gran mayoría de los tumores de mama con mutación en *BRCA* pertenecen al subtipo de cáncer de mama triple negativo. De acuerdo con esto, el tercer cáncer más común asociado a mutaciones en *BRCA1/2* es carcinoma de páncreas, y estas mutaciones de línea germinal elevan significativamente el riesgo a lo largo de la vida de este cáncer. El riesgo relativo general de cáncer de páncreas entre portadores de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* es de aproximadamente 2,26 y 2-9, respectivamente, y se ha estimado que el 6-10 % de todos los pacientes con adenocarcinoma de páncreas portan una mutación en *BRCA1/2* de línea germinal o somática. Por otro lado, las mutaciones de línea germinal en *BRCA2* son los factores genéticos que conducen al mayor riesgo de cáncer de próstata (8,6 veces en hombres ≤ 65 años), el segundo cáncer más común en hombres en todo el mundo. Aunque menos común, las mutaciones en *BRCA1* (el 1-2 % frente al 0,44 %) también están asociadas a un mayor riesgo de neoplasia de próstata esporádica (3,5 veces), y las mutaciones perjudiciales de línea germinal en ambos genes están relacionadas con un mal desenlace y una mayor agresividad. Finalmente, con respecto al cáncer de pulmón, una mutación en *BRCA2* (c.9976T) se ha asociado a una probabilidad del 85 % más alta de presentar cualquier tipo de cáncer de pulmón, y los fumadores que albergan esa mutación específica tienen casi el doble (25 %) del riesgo general de desarrollar cáncer de pulmón.

Investigaciones recientes han centrado su atención en la posibilidad terapéutica de “explotar” este tipo de cáncer mutado para eliminar las células cancerosas, aprovechando su falta de proteína(s) de *BRCA1/2*. El mecanismo de acción de esta estrategia se basa en la inhibición de las otras enzimas principales implicadas en la reparación del ADN, las poli(ADP-ribosa) polimerasas (PARP) (inhibición de PARP, PARPi). Los denominados inhibidores de PARP representan un tratamiento dirigido que actúa bloqueando la respuesta de reparación del ADN en tumores deficientes en el proceso de reparación por recombinación homóloga (HRR), tales como células con mutación en *BRCA1/2*. Estos compuestos inhiben las PARP y las atrapan en las roturas de cadena simple del ADN (SSB), lo que finalmente conduce a roturas de doble cadena (DSB) y a la muerte celular en ausencia de otros agentes reparadores, en un proceso denominado letalidad sintética. Los PARPi han logrado aumentar la supervivencia libre de progresión (carcinomas metastásicos) y también han inducido una notable reducción tumoral en cánceres de mama, ovario, páncreas y próstata con mutación en *BRCA1/2*. Investigaciones recientes también han centrado su atención en el adenocarcinoma de pulmón con mutación en *BRCA1/2*, ya que el tratamiento con PARPi ha mostrado resultados prometedores, particularmente en el cáncer de pulmón de células pequeñas.

Entre los inhibidores de PARP disponibles (olaparib, niraparib, veliparib, talazoparib, rucaparib), olaparib (AZD-2281, *Lynparza*, AstraZeneca) es uno de los más eficaces, y ha sido autorizado recientemente en los Estados Unidos por la Administración de Alimentos y Medicamentos y en la Unión Europea por la Agencia Europea de Medicamentos (ref. EMEA/H/C/003726) para el tratamiento de las siguientes neoplasias, tanto en monoterapia como también en combinación con bevacizumab:

- Cáncer de evolución rápida de ovarios, trompas de Falopio y peritoneo, con o sin mutaciones en *BRCA1/2*, previamente tratado eficazmente con quimioterapia específica, y que puede haber recidivado.
- Cáncer de mama HER2 negativo con mutación en *BRCA1/2* que se ha diseminado más allá del foco inicial y para el cual las quimioterapias específicas no han sido eficaces.
- Cáncer de páncreas metastásico con mutación en *BRCA1/2* que no ha empeorado después de al menos 4 meses de quimioterapia a base de platino.
- Cáncer de próstata metastásico con mutación en *BRCA1/2* después de un tratamiento quirúrgico y

hormonal/quimioterapéutico sin éxito.

Aunque el olaparib se ha implementado más en el contexto del cáncer de ovario, cada vez hay más evidencia que respalda su uso como monoterapia o terapia de mantenimiento en el cáncer de mama triple negativo con mutación en *BRCA1/2*, tal como los ensayos clínicos OlympiAD (identificador ClinicalTrials.gov NCT02032823), PETREMAC (identificador ClinicalTrials.gov NCT02624973) o ICEBERG1 (identificador ClinicalTrials.gov NCT00494234).

A pesar del innegable atractivo de este enfoque terapéutico para el cáncer con mutación en *BRCA1/2*, existen diversos fenotipos clínicos con resistencia *de novo* a PARPi, y sólo el 20 %-40 % de los pacientes potencialmente adecuados se benefician de él. Entre los diferentes mecanismos implicados en la resistencia a PARPi, es importante destacar un mayor flujo de salida de fármaco, el restablecimiento del proceso de reparación por recombinación homóloga (HRR), la interrupción de las proteínas PARP1 y PARP2 y la restitución de la estabilidad de las horquillas de replicación. En cuanto a la evidencia preclínica de resistencia a PARPi, se ha informado con frecuencia que la línea celular de TNBC HCC1937, que es homocigota para la mutación 5382insC en *BRCA1*, es relativamente resistente a olaparib, en relación con una posible preservación de las rutas de reparación del ADN, lo que la convierte en una candidata adecuada para estudiar la resistencia *de novo* a olaparib en TNBC con mutación en *BRCA1*.

Debido a la alta heterogeneidad del cáncer de mama triple negativo y la falta de dianas terapéuticas, así como al riesgo clínico asociado de las mutaciones en *BRCA1/2* en el cáncer de ovario, páncreas, próstata y pulmón, es crucial explotar la característica/debilidad singular de los tumores con mutación en *BRCA1/2* e intentar evitar la resistencia a PARPi.

Por tanto, existe una necesidad médica no satisfecha de encontrar estrategias destinadas a mejorar la sensibilidad y reducir la resistencia a PARPi en tumores con mutación en *BRCA1/2* (por ejemplo, cáncer de mama, ovario, páncreas, próstata y pulmón). La presente invención se centra en resolver este problema y se muestra en el presente documento una estrategia terapéutica fiable para mejorar la sensibilidad y reducir la resistencia a PARPi en tumores con mutación en *BRCA1/2*.

Descripción de la invención

Breve descripción de la invención

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

Tal como se explicó anteriormente, la presente invención proporciona una estrategia terapéutica fiable para mejorar la sensibilidad y reducir la resistencia a PARPi en tumores con mutación en *BRCA1/2*. Esta estrategia terapéutica fiable comprende el uso de Cx43 en el tratamiento de cáncer con mutación en *BRCA1/2*, preferiblemente seleccionado de: cáncer de mama triple negativo (TNBC) con mutación en *BRCA1/2* o cáncer de ovario con mutación en *BRCA1/2* o cáncer de pulmón con mutación en *BRCA1/2*. En una realización preferida, Cx43 se administra en combinación con el PARPi.

Particularmente, los resultados proporcionados por la presente invención ofrecen nuevas estrategias para superar la resistencia *de novo* a PARPi (olaparib) en cáncer de mama triple negativo con mutación en *BRCA1* (figura 1 a figura 7) y para potenciar la sensibilidad a olaparib en el cáncer de ovario con mutación en *BRCA1* (figura 8). El restablecimiento de Cx43 en estas células cancerosas resistentes *de novo* conduce a una resensibilización significativa al tratamiento con olaparib, reduciendo su CI50 casi a la mitad en comparación con las células de tipo natural (figura 1.A). Este enfoque reduce drásticamente las capacidades proliferativas y de formación de colonias tumorales en cultivos 2D (figuras 1.B-C) y esferoides 3D (figura 7) y aumenta la acumulación de daño al ADNbc (figuras 4.B-C) y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (figura 3). También disminuye la respuesta de las enzimas PARP al disminuir la PARilación total de proteínas (figuras 2.A-B), lo que finalmente conduce a un incremento agudo en la muerte celular programada por apoptosis, tanto en cultivos normales (figura 5.A) y condiciones de suspensión forzada/que inducen anoikis (figura 6.A).

Las conclusiones extraídas de este trabajo pueden beneficiar a los tipos de cáncer susceptibles al tratamiento con olaparib con mutación en *BRCA1/2*, que incluyen carcinomas de mama, páncreas, ovario, pulmón y próstata, aumentando así considerablemente el impacto de esta nueva estrategia terapéutica dentro del prometedor campo de PARPi.

Así, la primera realización de la presente invención se refiere a Cx43 para su uso en el tratamiento de cáncer con mutación en *BRCA1/2* seleccionado de: cáncer de mama triple negativo (TNBC) con mutación en *BRCA1/2*, cáncer de ovario con mutación en *BRCA1/2* y/o cáncer de pulmón con mutación en *BRCA1/2*; en donde el vehículo de administración es una nanopartícula, una vesícula extracelular o un vector de expresión que codifica para conexina 43.

En una realización preferida, Cx43 se administra antes de, después de o simultáneamente a (es decir,

concomitantemente con) un tratamiento con un PARPi.

En una realización preferida, Cx43 se administra antes de, después de o simultáneamente a (es decir, concomitantemente con) un tratamiento con un PARPi seleccionado de: olaparib, niraparib, veliparib, talazoparib o rucaparib.

Alternativamente, la presente invención se refiere a un método para tratar a pacientes que padecen cáncer con mutación en *BRCA1/2* seleccionado de: cáncer de mama triple negativo (TNBC) con mutación en *BRCA1/2* o cáncer de ovario con mutación en *BRCA1/2* o cáncer de pulmón con mutación en *BRCA1/2*, que comprende la administración de una dosis o cantidad terapéuticamente eficaz de Cx43, preferiblemente en combinación con un PARPi, o una composición farmacéutica que comprende los mismos; en donde el vehículo de administración es una nanopartícula, una vesícula extracelular o un vector de expresión que codifica para conexina 43.

La segunda realización de la presente invención se refiere a un producto farmacéutico de combinación (a continuación en el presente documento, "producto farmacéutico de combinación de la invención") que comprende conexina 43 y un PARPi; en donde el vehículo de administración es una nanopartícula, una vesícula extracelular o un vector de expresión que codifica para conexina 43.

En una realización preferida, el producto farmacéutico de combinación comprende Cx43 seleccionado de proteína, ARNm o ADN de Cx43.

En una realización preferida, el producto farmacéutico de combinación comprende Cx43 y un PARPi seleccionado de: olaparib, niraparib, veliparib, talazoparib o rucaparib.

La tercera realización de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica (a continuación en el presente documento, "composición farmacéutica de la invención") que comprende el producto farmacéutico de combinación de la invención y, opcionalmente, excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables; en donde el vehículo de administración es una nanopartícula, una vesícula extracelular o un vector de expresión que codifica para conexina 43.

En una realización preferida, la presente invención se refiere a la composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento de cáncer con mutación en *BRCA1/2*, preferiblemente seleccionado de: TNBC con mutación en *BRCA1/2*, cáncer de ovario con mutación en *BRCA1/2* y/o cáncer de pulmón con mutación en *BRCA1/2*.

En una realización preferida, el vehículo de administración para administrar Cx43 es una nanopartícula, una vesícula extracelular o un vector de expresión que codifica para Cx43. Particularmente, cualquiera de las vesículas extracelulares conocidas en el estado de la técnica anterior puede usarse para este propósito [Guillaume van Niel, *et al.*, 2018. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, volumen 19, páginas 213-228(2018)] [Oscar P. B. Wiklander *et al.*, 2019. Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles. *Science Translational Medicine*. 15 de mayo 2019. Vol. 11, número 492, eaav8521. DOI: 10.1126/scitranslmed.aav8521].

En el contexto de la presente invención, se definen los siguientes términos:

- El término "que comprende" significa que incluye, pero no se limita a todo lo que sigue a la expresión "que comprende". Por tanto, el uso del término "que comprende" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden estar presentes o no.
- Por "que consiste en" significa que incluye, y se limita a todo lo que sigue a la expresión "que consiste en". Por tanto, la expresión "que consiste en" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, y que no puede haber otros elementos presentes.
- Por "excipiente o portador farmacéuticamente aceptable" se refiere a un excipiente que puede incluirse opcionalmente en la composición farmacéutica de la invención y que no provoca efectos toxicológicos adversos significativos para el paciente.
- Por "dosis o cantidad terapéuticamente eficaz" de la composición farmacéutica de la invención se entiende una cantidad que, cuando se administra tal como se describe en el presente documento, produce una respuesta terapéutica positiva en un sujeto que tiene cáncer. La cantidad exacta requerida variará entre sujetos, dependiendo de la edad y el estado general del paciente, la gravedad de la afección que esté tratándose, el modo de administración, y similares. Un experto habitual en la técnica puede determinar en cualquier caso individual una cantidad "eficaz" adecuada mediante experimentación rutinaria, basándose en la información proporcionada en el presente documento.

Descripción de las figuras

Figura 1. Cx43 resensibiliza significativamente las células de cáncer de mama triple negativo con mutación en *BRCA1* al inhibidor de PARP olaparib. A. Curva dosis-respuesta a las 48 h de células HCC1937 con vector vacío de control (EV, rojo) y células HCC1937 con Cx43 restituida (verde) tratadas con diversas concentraciones de PARPi olaparib (0-1200 μ M). La viabilidad celular para cada tratamiento se normalizó frente a la viabilidad celular de sus respectivos controles sin tratar. Se incluye la curva dosis-respuesta del vehículo de olaparib, dimetilsulfóxido (DMSO), para tener en cuenta la posible citotoxicidad del DMSO a concentraciones más altas del fármaco. $n=3$, cada n está representado por un punto en el gráfico. Prueba de la t corregida para comparaciones múltiples usando el método de Holm-Šidák. * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$, ns=no significativo. También se especifican los parámetros del análisis de la curva dosis-respuesta, incluyendo la concentración inhibitoria máxima media CI50 (μ M), el valor de p de la prueba F de suma de cuadrados adicional, el intervalo de confianza (IC) del 95 % de la CI50 (μ M) y R cuadrado. Se realizó una prueba F de suma de cuadrados adicional para evaluar las diferencias en el parámetro logCI50 de mejor ajuste entre las líneas celulares. B. Ensayo de proliferación de células EV (gris) y Cx43_HCC1937 (blanco) durante el transcurso de 96 h, tomando mediciones cada 24 h, bajo tratamiento con olaparib 100 y 200 μ M. Los valores de proliferación o bien se normalizaron frente a sus respectivos controles sin tratar para cada punto temporal (gráfico superior), o bien se informaron los datos sin procesar de proliferación por absorbancia (gráfico inferior). $n=3$, cada n está representado por un punto en el gráfico, media+DE, valores medios especificados en los gráficos. Prueba de la t corregida para comparaciones múltiples usando el método de Holm-Šidák. * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$, ns=no significativo. C. Ensayo de formación de colonias de células EV (gris) y Cx43_HCC1937 (blanco) tratadas con olaparib 100 μ M durante 7 días. La viabilidad celular para cada tratamiento se normalizó frente a la viabilidad celular de sus respectivos controles sin tratar (gráfico de la izquierda) o se expresó como valores de absorbancia brutos (gráfico de la derecha). $N=3$, cada n está representado como un punto en el gráfico; media+DE; valores medios especificados en el gráfico. Prueba de la t . * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$, ns=no significativo.

Figura 2. Cx43 reduce la PARilación general de proteínas y se asocia con niveles más bajos de RAD51 en células de cáncer de mama triple negativo con mutación en *BRCA1* bajo tratamiento con olaparib. A-B. La restitución de Cx43 en células HCC1937 reduce la PARilación general de proteínas durante el tratamiento con olaparib. Inmunotransferencia de tipo Western (A) e inmunofluorescencia (B) frente al polímero de poli(ADP-ribosa) (PAR) (rojo) en células EV y Cx43_HCC1937 tratadas con olaparib 50/100 μ M durante 48 y 96 h. El rojo ácido Ponceau S se muestra como control de carga de proteína total (A). Los núcleos se tiñen con DAPI (azul, B). C. Las células EV_HCC1937 tienen mayor RAD51 en respuesta a olaparib que las células Cx43_HCC1937. Inmunofluorescencia representativa frente a RAD51 (rojo) y 53BP1 (verde) en células EV y Cx43_HCC1937 tratadas con olaparib 100 μ M durante 96 h. Los núcleos se tiñen con DAPI (azul).

Figura 3. Cx43 aumenta significativamente la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares en células de cáncer de mama triple negativo con mutación en *BRCA1* durante el tratamiento con olaparib. Cuantificación basada en fluorescencia de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares en células EV (gris) y Cx43_HCC1937 (blanco) tratadas con olaparib 50/100 μ M durante 96 h. El tratamiento con TBHP 100 μ M se incluyó como control positivo de la producción de ROS. Todas las mediciones se relativizaron con respecto a la densidad celular en cada una de las condiciones (gráfico de la izquierda); cada condición experimental se normalizó además con respecto a su homólogo sin tratar (gráfico de la derecha). Media+DE; los valores medios se especifican en el gráfico. $n=3$, cada n está representado por un punto en el gráfico. Prueba de la t . * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$, ns=no significativo.

Figura 4. El olaparib aumenta significativamente la senescencia mediada por p21 y la acumulación de daño al ADN en células de cáncer de mama triple negativo con mutación en *BRCA1* con Cx43 restituida. A. La restitución de Cx43 en las células HCC1937 conduce a la senescencia mediada por p21 después del tratamiento con olaparib. Inmunotransferencia de tipo Western frente al marcador de senescencia p21 en células EV y Cx43_HCC1937 tratadas con olaparib 50/100 μ M durante 48 y 96 h. El rojo ácido Ponceau S se muestra como control de carga de proteína total. Los gráficos representan la expresión de proteínas para todas las condiciones, relativizada con respecto a sus respectivos valores de carga de Ponceau y posteriormente normalizada con respecto a la expresión de células EV_HCC1937 sin tratar. Media+DE; los valores medios se especifican en el gráfico. $N=3$, cada n está representado como un punto en el gráfico. ANOVA unidireccional con la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para comparaciones específicas y relevantes. * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$. B. La restitución de Cx43 en las células HCC1937 produce daño al ADN y acumulación del marcador de senescencia γ H2AX (p-Ser139) después del tratamiento con olaparib. Se realizó una inmunotransferencia de tipo Western frente a γ H2AX (p-Ser139) después de 48 y 96 h de tratamiento con olaparib 50/100 μ M en células EV y Cx43_HCC1937. El rojo ácido Ponceau S se muestra como control de carga de proteína total. Los gráficos representan la expresión de proteínas para todas las condiciones, relativizada con respecto a sus respectivos valores de carga de Ponceau y posteriormente normalizada con respecto a la expresión de las células EV_HCC1937 sin tratar. Media+DE; los valores medios se especifican en el gráfico. $n=3$, cada n está representado por un punto en el gráfico. ANOVA unidireccional con la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para comparaciones específicas y relevantes. * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,001$. C. Inmunofluorescencia representativa frente a γ H2AX (verde) en células EV y Cx43_HCC1937 tratadas con olaparib 50 y 100 μ M durante 96 h. Los núcleos se tiñen con Hoechst (azul). $n=2$.

Figura 5. Cx43 aumenta significativamente la muerte celular programada en células de cáncer de mama triple

negativo con mutación en *BRCA1* bajo tratamiento con olaparib. La restitución de Cx43 en células HCC1937 aumenta la apoptosis mediante la escisión de la caspasa 3 y PARP-1 después del tratamiento con olaparib. Se realizó una inmunotransferencia de tipo Western frente a la caspasa 3 escindida, PARP-1 y PARP-2 después de 48 y 96 h de tratamiento con olaparib 50/100 μ M en células EV y Cx43_HCC1937. El rojo ácido Ponceau S se muestra como control de carga de proteína total. Los gráficos representan la expresión de proteínas para todas las condiciones, relativizada con respecto a sus respectivos valores de carga de Ponceau y posteriormente normalizada con respecto a la expresión de las células EV_HCC1937 sin tratar. Media+DE; los valores medios se especifican en el gráfico. n=3 (n=1 para la caspasa 7), cada n está representado por un punto en el gráfico. ANOVA unidireccional con la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para comparaciones específicas y relevantes. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001.

Figura 6. Cx43 aumenta significativamente la muerte celular programada y el daño al ADN, y reduce la PARilación general en células de cáncer de mama triple negativo con mutación en *BRCA1* durante el tratamiento con olaparib en condiciones que inducen anoikis. A. Inmunotransferencia de tipo Western frente a caspasa 3 escindida, γ H2AX (p-Ser139) y PAR en células EV y Cx43_HCC1937 tratadas con olaparib 50 μ M y cultivadas en presencia y ausencia de suero fetal bovino (FBS) al 10 % en condiciones que inducen anoikis durante 48 h. El rojo ácido Ponceau S se muestra como control de carga de proteína total. La isoforma de Cx43 de 20 kDa está resaltada con un rectángulo de línea discontinua en la inmunotransferencia. Los gráficos representan la expresión de proteínas para todas las condiciones, relativizada con respecto a sus respectivos valores de carga de Ponceau y luego normalizada con respecto a la expresión de células EV_HCC1937 sin tratar (UT) o células Cx43_HCC1937 sin tratar (cuantificaciones de Cx43 de 20 kDa y vimentina). Media+DE; los valores medios se especifican en el gráfico. n=3, cada n está representado por un punto en el gráfico. ANOVA unidireccional con la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para comparaciones específicas y relevantes. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001. B. Imágenes representativas de células EV y Cx43_HCC1937 cultivadas en condiciones de suspensión forzada que inducen anoikis a las 0 y 48 h, en presencia/ausencia de FBS al 10 % y olaparib 50 μ M.

Figura 7. El tratamiento con olaparib en células de cáncer de mama triple negativo con mutación en *BRCA1* y restitución de Cx43 conduce a una proliferación de esferoides 3D significativamente menor que en las células de tipo natural. Imágenes representativas de contraste de fase de esferoides de EV y Cx43_HCC1937 sembrados en placa a densidades celulares iniciales de 3000 y 3000-5000, respectivamente, en condiciones de adhesión ultrabaja (día -4) y, una vez que tuvieron 4 días de edad (día 0), tratados con olaparib 200, 400 y 600 μ M durante un total de 8 días (días 0-8). Se realizó un seguimiento individual de su tamaño y se fotografiaba cada 48 h. Los esferoides de EV se muestran en rojo y los esferoides de Cx43 en verde (y también en azul para Cx43_HCC1937 sembrado en placa a una densidad celular inicial de 5000). Los gráficos representan el área del esferoide en píxeles. n=5-6, cada n está representado como un punto en el gráfico. Prueba de la t. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, ns=no significativo.

Figura 8. La restitución de Cx43 resensibiliza significativamente la línea celular de cáncer de ovario con mutación en *BRCA1* SNU251 al tratamiento con olaparib. A. Inmunotransferencia de tipo Western representativa frente a Cx43 en células EV y Cx43_SNU251. El rojo ácido Ponceau S se muestra como control de carga de proteína total. B. Ensayo de proliferación de células SNU251 con EV (gris) y Cx43 restituida (blanco) tratadas con olaparib 100/200 μ M durante 96 h. Los valores de proliferación o bien se normalizaron con respecto a sus respectivos controles sin tratar para cada punto temporal (gráfico de la izquierda), o bien se informaron los datos sin procesar de proliferación por absorbancia (gráfico de la derecha). n=3, cada n está representado por un punto en los gráficos, media+DE, valores medios especificados en los gráficos. Prueba de la t corregida para comparaciones múltiples usando el método de Holm-Šidák. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001, ns=no significativo.

Figura 9. Las vesículas extracelulares pequeñas (sEV) que contienen Cx43 mejoran la eficacia de olaparib en células HCC1937 con mutación en *BRCA1* resistentes *de novo*. A. Inmunotransferencia de tipo Western representativa frente a Cx43 en sEV derivadas de HEK-293T y EV/Cx43_HCC1937. Las proteínas tetraspaninas CD9 y CD63 se incluyen como marcadores de sEV. B. Ensayo de formación de colonias de células HCC1937 de tipo natural tratadas con olaparib 75 μ M, sEV sin Cx43 (sEV EV_HCC) o sEV positivas para Cx43 (HEK-293T-sEV, denominadas sEV-Cx43+ en la figura, y Cx43_HCC1937-sEV, denominadas Cx43+_HCC, resaltadas con cuadrados rojos) y sus combinaciones durante 5 días. Se presentan los datos sin procesar de proliferación por absorbancia. n=1 (2 réplicas), valores medios especificados en el gráfico.

Figura 10. Función de Cx43 como supresor tumoral en el cáncer con mutación en *BRCA1/2*. A. El restablecimiento de Cx43 reduce significativamente la proliferación y la formación de colonias en líneas celulares de cáncer de mama triple negativo (TNBC), carcinoma de ovario y carcinoma de pulmón con mutación en *BRCA*. Las vesículas extracelulares pequeñas (sEV) que contienen Cx43 mejoran la eficacia de olaparib en las células Ludlu-1 de cáncer de pulmón con deficiencia de *BRCA2*. (Izquierda) Ensayo de formación de colonias de células HCC1937 de TNBC con mutación en *BRCA1* con EV y Cx43 restablecida durante el transcurso de 6 días. Las células EV_HCC1937 se muestran en gris y las células con Cx43 restablecida en blanco. Media+DE; valores medios especificados en el gráfico n=3, cada n está representado como un punto en el gráfico. Prueba de la t. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001. (Centro) Ensayo de proliferación de células HCC1937 y de carcinoma de ovario SNU251 con mutación en *BRCA1* con EV y Cx43 restablecida durante el transcurso de 96 horas, tomando mediciones cada 24 horas. Las células con EV se muestran en negro/gris y las células con Cx43 restituida en verde/blanco. n=3, cada n está representado por

un punto en el gráfico. Prueba de la t corregida para comparaciones múltiples usando el método de Holm-Šidák. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001. (Derecha) Ensayo de formación de colonias de células de cáncer de pulmón Ludlu-1 de tipo natural con mutación en *BRCA2* tratadas durante 5 días con sEV positivas para Cx43 (Cx43-sEV), derivadas de células HEK293T no tumorales, olaparib 75 μ M y su combinación. Se presentan los datos sin procesar de proliferación por absorbancia. Se realizaron 2 réplicas, cuyos valores medios se especifican en el gráfico; cada réplica está representada por un punto en el gráfico. En la parte derecha puede observarse una inmunotransferencia de tipo Western representativa frente a Cx43-sEV aisladas de células no tumorales enriquecidas en Cx43. La proteína tetraspanina CD63, un marcador típico de sEV, se incluye como control. B. La restitución de Cx43 reduce significativamente la proliferación 3D en células de TNBC con mutación en *BRCA1*. Imágenes representativas de esferoides derivados de EV y Cx43_HCC1937 a lo largo del tiempo. Los esferoides de HCC1937 se sembraron en placa a una densidad inicial de 3000 (EV y Cx43) y 5000 (Cx43) células y se analizaron cada 2 días durante un periodo total de 12 días. Los esferoides de EV se muestran en rojo y los esferoides de Cx43 en verde (y también en azul para Cx43_HCC1937 sembrados en placa a una densidad inicial de 5000 células). Los gráficos representan el área del esferoide en píxeles. n=6, cada n está representado como un punto en el gráfico. Prueba de la t. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001. Inmunofluorescencias confocales representativas (proyección de máxima intensidad) frente a Ki67 (verde) y Cx43 (rojo) en esferoides de EV (densidad celular inicial de 3000) y Cx43_HCC1937 (densidad celular inicial de 3000 y 5000) de 12 días de edad. Los núcleos se tiñeron con Hoechst (azul). Se adquirieron apilamientos Z con un tamaño de paso de 15 μ m. C. El restablecimiento de Cx43 resensibiliza significativamente las células de TNBC con mutación en *BRCA1* con respecto a anoikis. Imágenes representativas de contraste de fase a las 0 h y 48 h de células EV y Cx43_HCC1937 cultivadas en condiciones de suspensión forzada que inducen anoikis, en presencia (blanco) y ausencia (negro) de suero fetal bovino (FBS) al 10 %. Los agregados celulares están indicados mediante líneas rojas discontinuas. Después de 48 horas de inducción de anoikis, se realizó una inmunotransferencia de tipo Western frente a la caspasa 3 escindida y la vimentina. El rojo ácido Ponceau S se muestra como control de carga de proteína total. Los gráficos representan la expresión de la caspasa 3 escindida y la vimentina para todas las condiciones, relativizada con respecto a sus respectivos valores de carga de Ponceau y posteriormente normalizada con respecto a las células EV_HCC1937 cultivadas en FBS al 10 %. Media+DE; los valores medios se especifican en el gráfico. n=3; cada n se representa con un punto en el gráfico. ANOVA unidireccional con la prueba de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher para comparaciones específicas y relevantes. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001. D-E. El restablecimiento de Cx43 reduce significativamente la migración de esferoides 2D (D) y 3D (E) en células de TNBC con mutación en *BRCA1*. D. Imágenes representativas de lapso de tiempo del ensayo de cicatrización de heridas/rasguños realizado en células HCC1937 con EV y Cx43 durante 14 h. Las células con EV se muestran en negro y las células con Cx43 restituida en verde. El gráfico representa el área de cobertura del rasguño a las 0, 7 y 14 h, es decir, la superficie que aún no ha sido cubierta por células migrantes, que se representa como veces de la cobertura del rasguño en el tiempo de 0 h (establecido en 1). n=3, cada n se representa como un punto en el gráfico. Prueba de la t. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001. E. Imágenes representativas de contraste de fase de esferoides de EV (rojo) y Cx43 (verde)_HCC1937 de 3 días de edad, 3 horas después de la siembra en placas recubiertas de gelatina para el ensayo de migración, y su seguimiento 24 h después de la siembra en placa. El frente de migración está indicado por líneas rojas discontinuas. También se muestran esferoides 24 horas después de la siembra en placa teñidos con cristal violeta. El gráfico representa el área migrada de cada esferoide a las 24 h, cuantificada en píxeles y normalizada con respecto al área inicial del esferoide a las 3 h después de la siembra en placa. n=7, donde cada n se representa con un punto en el gráfico. Prueba de la t. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se ilustra mediante los ejemplos expuestos a continuación sin la intención de limitar su ámbito de protección.

Ejemplo 1. Materiales y métodos

Ejemplo 1.1. Líneas celulares y condiciones de cultivo

Para el desarrollo de esta patente se usaron líneas celulares establecidas de cáncer de mama triple negativo humano (HCC1937), carcinoma de ovario (SNU251), cáncer de pulmón (Ludlu-1) y embrionarias de riñón (HEK293T). Sus principales características y condiciones de cultivo se resumen en la tabla 1. Todas las células se cultivaron en una incubadora humidificada (SANYO CO₂) a 37 °C y el 5 % de CO₂, con cambio de medio cada dos o tres días. Todas las células usadas en los experimentos eran de pases bajos a intermedios, generalmente dentro de los primeros 10-15 pases después de descongelar las reservas celulares.

Tabla 1

Línea celular	Tipo - Subtipo	Características relevantes	Condiciones de cultivo
HCC1937	Carcinoma ductal primario de mama – Triple negativo/Basal A	Mutaciones: <i>PTEN</i> (delección) <i>BRCA1</i> (c.5266dupC) (5382insC), <i>RB1</i> (c.2212_2325del114), <i>TPR222</i> (c.23G>T) (c.-57+99G>T), <i>TP53</i> (c.916C>T)	Medio Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI) (Lonza) + suero fetal bovino (FBS) al 10 % (v/v) (Gibco, Thermo Fisher Scientific) + 100 U/ml de penicilina/100 µg/ml de estreptomina (Gibco, Thermo Fisher Scientific)
SNU251	Adenocarcinoma endometriode de ovario	Derivada de sitio metastásico (ascitis) Mutaciones: <i>BRCA1</i> (c.5445G>A), <i>MLH1</i> (c.2168C>A)	RPMI + FBS al 10 % (v/v) + 100 U/ml de penicilina/100 µg/ml de estreptomina
Ludlu-1	Carcinoma de células escamosas de pulmón	Mutaciones: <i>BRCA2</i> , <i>TP53</i> (p.248R>W), Desequilibrio alélico por polimorfismos de línea germinal en <i>BRCA1</i>	RPMI + FBS al 10 % (v/v) + 100 U/ml de penicilina/100 µg/ml estreptomina
HEK293T	Células embrionarias de riñón	Derivada de células embrionarias de riñón humano 293 (HEK293); contiene el antígeno T de SV40 Usada para la producción retroviral y el aislamiento de sEV	DMEM + FBS al 10 % (v/v) + 100 U/ml de penicilina/100 µg/ml de estreptomina

Líneas celulares humanas inmortalizadas usadas en la presente invención, indicando el tipo de tumor de origen y subtipo (si es aplicable), características relevantes incluyendo el perfil de mutación y las condiciones de cultivo

Las líneas celulares se autenticaron mediante genotipado de repeticiones cortas en tándem realizado por el Centro de Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (IIBM), Madrid. Todas las líneas celulares usadas en los experimentos estaban libres de micoplasma, y las pruebas de micoplasma se realizaron de manera rutinaria.

Ejemplo 1.2. Procedimientos de transformación bacteriana y transfección/infección de plásmidos en líneas celulares

Transformación bacteriana

Se añadió 1 µl de ADN plasmídico (disolución madre de 700-1000 ng/µl) a 20 µl de células competentes de *E. coli* DH5α y se dejaron en hielo durante 30 min. Luego, las bacterias se sometieron a un choque térmico a 42 °C durante 30 s y se dejaron en hielo durante 5 min. Se añadieron 100 µl de caldo LB (Miller) (Sigma-Aldrich) a la mezcla y se incubó en un agitador a 37 °C durante 1 h. Las bacterias transformadas se sembraron en placas de agar de caldo LB (Lennox) (Sigma-Aldrich) con 100 µg/ml de ampicilina y se dejaron crecer durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, se seleccionaron colonias individuales y se cultivaron en caldo LB (Miller) con 100 µg/ml de ampicilina durante la noche a 37 °C. Se ejecutaron controles negativos de transformación y expansión bacteriana en paralelo.

El ADN plasmídico comprende un vector pIRESpuo2 (Clontech) con la secuencia humana de Cx43, junto con su vector vacío (EV) correspondiente.

Aislamiento de ADN plasmídico

El ADN plasmídico se aisló de las bacterias previamente transformadas con el kit GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante, y la concentración de ADN se determinó con un Nanodrop ND-1000.

Transfección de plásmidos en líneas celulares

Las células de la línea celular HCC1937 de TNBC y las células de carcinoma de ovario SNU251 se transfectaron mediante electroporación con los plásmidos pIRESpuro2_EV/Cx43 usando el kit V Amaxa Cell Line Nucleofector (Lonza) en el dispositivo Cell Line Nucleofector (Lonza), según las instrucciones del fabricante. En resumen, 1 millón de células centrifugadas con una confluencia del 80 % se resuspendieron cuidadosamente en primer lugar en 100 µl de disolución Cell Line Nucleofector y luego se añadieron 3 µg de ADN plasmídico. Luego, las células se transfirieron a una cubeta y se sometieron a electroporación mediante el programa U-028. Luego, las células transfectadas y las células transfectadas de manera simulada se sembraron en placa en sus respectivos medios de crecimiento sin antibióticos y se incubaron durante la noche. Al día siguiente, se inició la selección con puromicina (Tocris Bioscience) en medio de crecimiento completo, y la concentración del antibiótico se aumentó gradualmente hasta que todas las células transfectadas de manera simulada murieron. Después se evaluó la eficiencia de la transfección celular mediante inmunotransferencia de tipo Western frente a Cx43 (véase la tabla 3 para consultar las referencias).

Ejemplo 1.3. Tratamientos terapéuticos de líneas celulares

Las líneas celulares tumorales inmortalizadas se trataron con olaparib, cuyas características principales se resumen en la tabla 2. Los tratamientos se renovaban cada 48 horas, a menos que se especificara lo contrario.

Tabla 2

Tratamiento	Marca	Disolución madre
Olaparib/Lynparza	Astrazeneca	50 mM en dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich), -20 °C

Características del compuesto terapéutico olaparib usado en el presente proyecto

Ejemplo 1.4. Inmunofluorescencia

Inmunofluorescencia de cultivos 2D

Se sembraron 2000-10000 células en cubreobjetos de vidrio (Thermo Fisher Scientific) previamente recubiertos con bromhidrato de poli-D-lisina (Sigma-Aldrich) y se cultivaron hasta alcanzar aproximadamente el 80 % de confluencia. Se lavaron con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 4 % (PFA, Sigma-Aldrich) en PBS durante 15 min a temperatura ambiente y se enjuagaron dos veces con PBS. A continuación, las células se incubaron con glicina 0,1 M (Sigma-Aldrich) en agua destilada para extinguir PFA durante 10 min a temperatura ambiente, y luego sus membranas se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,2 % (Sigma-Aldrich) en PBS durante 10 min a temperatura ambiente. Después de dos lavados de 5 min con PBS, los posibles sitios de unión inespecíficos de anticuerpos se bloquearon con albúmina de suero bovino (BSA; Sigma-Aldrich) al 1 % diluida en PBST (PBS + Tween 20 al 0,1 %; Sigma-Aldrich) durante 30 min a temperatura ambiente. Las células se incubaron durante la noche a 4 °C en la oscuridad con el anticuerpo primario (véanse las referencias en la tabla 3) diluido en BSA al 1 % en PBST. Al día siguiente, las células se enjuagaron tres veces con PBS durante 10 min cada vez y luego se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad con anticuerpo secundario (véanse las referencias en la tabla 3) diluido en BSA al 1 % en PBST. Después de eso, se lavaron tres veces con PBS durante 5 min cada vez y sus núcleos se tiñeron con 1 µg/ml de Hoechst (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) diluido en PBS durante 10 min. Finalmente, las células se enjuagaron tres veces con PBS durante 10 min cada vez y los cubreobjetos se montaron en portaobjetos de vidrio para microscopio con glicerol al 50 % (v/v) (Sigma-Aldrich) diluido en PBS, sellando sus bordes con esmalte de uñas y almacenándolos a 4 °C hasta su análisis. Alternativamente, los cubreobjetos se montaron directamente con el medio de montaje ibidi con DAPI (ibidi).

Inmunofluorescencia de cultivos 3D

La tinción por inmunofluorescencia de los esferoides se realizó siguiendo el protocolo propuesto por (Nürnberg *et al.*, 2020) con modificaciones sutiles. Se recogieron al menos 10 esferoides/condición en microtubos, se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con PFA al 4 % durante la noche a 4 °C. Luego se enjuagaron dos veces con PBS y el PFA se extinguió con glicina 0,5 M en PBS durante 1 hora a 37 °C en una incubadora con agitador Thermoshake (Gerhardt Analytical Systems) a 95 rpm. A continuación, los esferoides se incubaron con tampón de penetración (glicina 0,3 M, Triton X-100 al 0,2 %, DMSO al 20 % en PBS) durante 30 min a 37 °C y 95 rpm para potenciar la entrada posterior de anticuerpos y colorante nuclear. Se lavaron dos veces con PBS y se bloquearon con tampón de bloqueo (BSA al 1 %, Triton X-100 al 0,2 %, DMSO al 10 % en PBS) durante 2 h a 37 °C y 95 rpm. Luego, el anticuerpo primario se diluyó en tampón de anticuerpos (BSA al 1 %, Tween20 al 0,2 %, DMSO al 5 % en PBS) y se incubó durante la noche a 37 °C y 95 rpm. Al día siguiente, las muestras se lavaron 5 veces con tampón de lavado (BSA al 1 %, Tween20 al 0,2 % en PBS), 5 min/lavado, a temperatura ambiente y con agitación suave. Se añadieron conjuntamente anticuerpos secundarios (véanse las referencias en la tabla 3) y 5 µg/ml de colorante nuclear Hoechst en tampón de anticuerpos y se incubaron durante la noche a 37 °C y 95 rpm en la oscuridad. Los esferoides se lavaron 5 veces con tampón de lavado, 5 min/lavado, a temperatura ambiente y con agitación suave. La clarificación óptica de los esferoides se realizó mediante incubación en glicerol al 90 % (v/v) en agua destilada

durante al menos 24 h a 37 °C y 95 rpm en la oscuridad. Luego las muestras se montaron en portaobjetos de fondo de vidrio de 18 pocillos 1,5H (ibidi) usando glicerol al 90 % (v/v) y se mantuvieron a 4 °C en la oscuridad hasta la obtención de imágenes confocales.

5 Obtención de imágenes de inmunofluorescencia

Las inmunofluorescencias de los cultivos 2D se fotografiaron con un microscopio Olympus BX61 acoplado a una cámara digital DP71 (Olympus). Las imágenes confocales se obtuvieron usando un microscopio confocal Nikon A1R (Nikon).

10

Tabla 3

Lista de anticuerpos usados en esta patente				
Antígeno diana- (conjugación)	Huésped	Aplicaciones y dilución	Fabricante	Referencia
53BP1	Conejo	IF	Novus Biologicals	NB100-305SS
Caspasa-3 escindida (Asp175)	Conejo	WB	Cell Signaling	9661
CD9	Conejo	WB	Santa Cruz Biotechnology	sc-9148
CD63	Conejo	WB	Santa Cruz Biotechnology	sc-15363
Conexina 43	Conejo	WB, IF	Sigma-Aldrich	C6219
Ki67	Ratón	IF	Cell Signaling	9449
IgG de ratón-(Alexa Fluor 594)	Cabra	IF	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific	A-11032
IgG de ratón-(FITC)	Cabra	IF	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific	F-2761
IgG de ratón-(HRP)	Oveja	WB	Sigma-Aldrich	NA-931
p21	Conejo	WB	Cell Signaling	2947
PAR/pADPr	Ratón	WB, IF	R&D Systems	4335-MC-100
PARP-1	Conejo	WB	Cusabio	CSB- PA017457LA01HU
PARP-2	Conejo	WB	FineTest	FNab06156
Fosfo-histona H2A.X (Ser 139)	Ratón	WB, IF	Santa Cruz Biotechnology	sc-517348
IgG de conejo-(Alexa Fluor 568)	Cabra	IF	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific	A10042
IgG de conejo-(FITC)	Cabra	IF	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific	F-2765
IgG de conejo-(HRP)	Cabra	WB	Sigma-Aldrich	A6154
Rad51	Ratón	IF	Novus Biologicals	NB100-148

Anticuerpos usados en el presente proyecto. Todos los antígenos diana son humanos a menos que se especifique.

Aplicaciones: inmunotransferencia de tipo Western (WB), inmunofluorescencia (IF).

15 Ejemplo 1.5. Análisis de la expresión de proteínas

Aislamiento de proteínas

Se recogieron 2-5 millones de células mediante tripsinización, se contaron y se lavaron dos veces con PBS. Los
sedimentos celulares para el aislamiento de proteínas totales se lisaron completamente en hielo con una jeringa de
insulina de calibre 30 (Omnican, Braun) en tampón de lisis de proteínas helado suplementado con 0,1 mM de
fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, Sigma-Aldrich) y un cóctel de inhibidores de proteasa 1X (Sigma-Aldrich). El
tampón de lisis de proteínas estaba compuesto por NaCl 150 mM (Sigma-Aldrich), Tris-HCl 50 mM (pH 7,5, Sigma-
Aldrich), EDTA 5 mM (pH 8, Sigma-Aldrich), dodecilsulfato de sodio al 0,1 % (p/v) (SDS, Sigma-Aldrich), Nonidet P-
40 al 0,5 % (v/v) (Sigma-Aldrich) y N-lauroilsarcosina al 0,5 % (v/v) (Sigma-Aldrich).

Una vez aisladas, la concentración de proteínas se cuantificó usando un Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher

Scientific) o mediante el ensayo de Bradford. Para este procedimiento, se preparó una curva de calibración convencional de 7 concentraciones conocidas de BSA. Luego, se cargaron 10 µl de los extractos de proteínas y la curva de calibración en una placa de microtitulación de 96 pocillos (Corning) y se añadieron 300 µl del reactivo de Bradford (BioRad), previamente diluido 1:5 en agua destilada. Después de incubar la mezcla durante 5 min a 37 °C, se midió la absorbancia a 620 nm usando un lector de microplacas NanoQuant Infinite M200 (Tecan) y se extrapoló la concentración de proteínas a partir de la curva convencional de BSA.

Inmunotransferencia de tipo Western

Los extractos de proteínas se mezclaron con un tampón de carga, que consistía en β-mercaptoetanol al 10 % (v/v) (Sigma-Aldrich), SDS al 10 %, glicerol al 50 % (v/v), Tris-HCl 200 mM pH 6,8 y azul de bromofenol al 0,1 % (Sigma-Aldrich). Se hirvieron a 95 °C durante 8 min y se cargaron 20-30 µg de proteína en geles de fabricación propia de acrilamida/bis-acrilamida al 8 %, 10 % o 15 %, dependiendo del peso molecular de la(s) proteína(s) diana que iba(n) investigarse. Se hicieron correr los geles a 80 V durante aproximadamente 2 h usando un sistema de electroforesis Mini-PROTEAN Tetra (BioRad), y luego se transfirieron a membranas de polifluoruro de vinilideno (PVDF) preactivadas con metanol (Millipore) a 100 V y 4 °C durante 1-1,5 h con una celda de transferencia electroforética Mini Trans-Blot (BioRad). Posteriormente, las membranas con las proteínas transferidas se tiñeron con la disolución de tinción de rojo Ponceau S ATX (Sigma-Aldrich) durante 10 min a temperatura ambiente, se fotografiaron en un aparato de obtención de imágenes Amersham 600 (GE Healthcare) y se destiñeron con agua destilada. Luego se bloquearon durante 1 h a temperatura ambiente con leche desnatada al 5 % (Sigma-Aldrich) diluida en tampón TBST (solución salina tamponada con Tris TBS compuesta por Tris 20 mM y NaCl 150 mM, suplementada con Tween-20 al 0,05 % (v/v), Sigma-Aldrich) con agitación. A continuación, las membranas se incubaron durante la noche a 4 °C con rotación con los anticuerpos primarios de interés (véanse las referencias de los anticuerpos en la tabla 3), diluidos en leche desnatada al 5 % en TBST. Después de 4-5 lavados con TBST (5 min/lavado), las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con rotación con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) (véanse las referencias de los anticuerpos en la tabla 3), diluidos en leche desnatada al 5 % en TBST. Las membranas se enjuagaron de nuevo 4-5 veces (5 min/lavado) con TBST y la señal se reveló con el sustrato de inmunotransferencia de tipo Western Pierce ECL (Thermo Fisher Scientific), en o bien un aparato de obtención de imágenes LAS-3000 (Fujifilm) o bien en un aparato de obtención de imágenes Amersham 600 (GE Healthcare). Cuando fue necesario, se separaron los anticuerpos de las membranas durante 15 min con una disolución tampón de pH 2,2 compuesta por 7,5 glicina, 0,5 g de SDS y 5 ml de Tween20 en 500 ml de agua destilada. Una vez separados, las membranas se lavaron con TBST durante 15 min, volvieron a bloquearse con leche desnatada al 5 % y volvieron a incubarse con los anticuerpos seleccionados. Las imágenes de tinción con Ponceau y de inmunotransferencia de tipo Western se analizaron y la intensidad de sus bandas se cuantificó con el software Image J.

Ejemplo 1.6. Ensayo de proliferación

La proliferación de líneas celulares tumorales se evaluó usando el kit de recuento celular 8 (Dojindo Molecular Technologies). Este kit comprende WST-8, una sal de tetrazolio altamente soluble en agua que, tras su reducción por deshidrogenasas celulares de las células viables, da lugar a un colorante formazán amarillo que es soluble en los medios de cultivo celular y puede cuantificarse. En resumen, se sembró un número similar de células (1000-5000) en placas de 96 pocillos (Corning) y se dejaron crecer durante el periodo de tiempo deseado bajo diferentes condiciones de tratamiento. Luego, se renovó el medio de cultivo (volumen de 100 µl/pocillo) y se añadieron 10 µl del reactivo CCK-8 a cada pocillo. Las placas se incubaron en la oscuridad durante 3 horas a 37 °C, y la absorbancia se midió a 450 nm en un lector de placas NanoQuant Infinite 200 (Tecan).

Ejemplo 1.7. Ensayo de formación de colonias

Para evaluar la capacidad clonogénica de las líneas celulares tumorales, se sembraron como suspensiones de células individuales (5000-10000 células) en placas de 6 ó 12 pocillos (Corning) y se incubaron durante 6-7 días con cambio de medio cada 48 h. Después de este tiempo, se lavaron con PBS, se fijaron con PFA al 4 % durante 15 min a temperatura ambiente y se tiñeron con colorante violeta cristal al 0,1 % (Sigma-Aldrich) durante 20 min a temperatura ambiente. Luego se enjuagaron con PBS, se secaron al aire y se fotografiaron. La tinción se disolvió con ácido acético al 30 % durante 10 min en un agitador. Luego el eluyente se transfirió a una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia, indicativa del crecimiento de colonias, a 570 nm usando un lector de microplacas NanoQuant Infinite M200 (Tecan).

Ejemplo 1.8. Medición de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares

Para la determinación de la producción de ROS intracelulares en células HCC1937 sometidas a tratamiento con olaparib, se sembraron 4000 células (EV_HCC1937) y 10000 células (Cx43_HCC1937) por duplicado en una microplaca de poliestireno negro de 96 pocillos (Corning) y se trataron con olaparib 50 y 100 µM durante 96 h con cambio de medio a las 48 h. Luego, se determinó la producción de ROS usando el kit de ensayo celular de ROS DCFDA/H2DCFDA (Abcam) siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, después de 96 h de tratamiento con olaparib, las células de control positivo se trataron con una disolución de hidroperóxido de terc-butilo (TBHP)

100 μ M preparada en DMEM sin rojo de fenol (Lonza) con FBS al 10 % durante 2 h. Después de eso, todas las células se lavaron con 100 μ l/pocillo de tampón 1X y luego se tiñeron con 100 μ l/pocillo de disolución de trabajo de diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA) 25 μ M durante 45 min a 37 °C en la oscuridad. El DCFDA es un colorante fluorogénico, desacetilado por esterasas celulares a un compuesto no fluorescente, que finalmente es oxidado por ROS para convertirse en 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) altamente fluorescente. Se retiró la disolución de DCFDA y las células se lavaron una vez con DMEM sin rojo de fenol con FBS al 10 %. Se dejaron durante 1 h a 37 °C y se midió la fluorescencia en un lector de placas Synergy HTX (BioTek) a 485/+20 nm (excitación) y 528/+20 nm (emisión).

Después de la medición de ROS, se realizó el ensayo de proliferación en CCK-8. En resumen, se retiró el medio y se reemplazó con 100 μ l/pocillo de RPMI completo. Se añadieron 10 μ l de reactivo CCK-8 a cada pocillo y las células se incubaron a 37 °C en la oscuridad durante 3 horas. La absorbancia se midió a 450 nm en un lector de placas NanoQuant Infinite 200 (Tecan).

La fluorescencia de fondo del DMEM sin rojo de fenol con FBS al 10 % se restó de todos los valores de fluorescencia de ROS, que luego se normalizaron frente a sus respectivos valores de absorbancia de proliferación. Cada condición experimental se normalizó además frente a su homólogo sin tratar.

Ejemplo 1.9. Cultivo celular en condiciones que inducen anoikis

Se cultivaron células HCC1937 en condiciones de crecimiento independientes del anclaje durante 48 horas. Para este propósito, se recubrieron placas de Petri de poliestireno no adherentes de 90 mm (Thermo Fisher Scientific) con 10 mg/ml de poli-HEMA (Sigma-Aldrich), lo que hace que la superficie de la placa sea altamente repelente a las células, promoviendo su cultivo en condiciones de suspensión forzada. Luego se sembraron en placa directamente 1-3 millones de células en presencia o ausencia de FBS al 10 % y olaparib 50 μ M y se dejaron sin perturbar. Se tomaron imágenes de los cultivos a las 0 y 48 horas, y luego se recogieron los sedimentos celulares para su análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western.

Ejemplo 1.10. Esferoides tumorales tridimensionales

El fondo de las microplacas de fondo plano de 96 pocillos (Greiner Bio-One) se recubrió con una disolución al 1,5 % de agarosa ultrapura de bajo punto de fusión (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Los fondos cóncavos de agarosa proporcionan condiciones no adhesivas y aumentan los contactos celulares. Se sembraron 100-200 μ l de suspensiones de células individuales sobre la agarosa diluida en sus respectivos medios suplementados con membrana basal Matrigel Matrix con factor de crecimiento reducido al 3,5 % (Corning) y 5 ng/ml de EGF recombinante humano (Sigma-Aldrich). Después de eso, las placas se incubaron en condiciones convencionales de cultivo celular y los esferoides se observaron a partir del día 2 mediante microscopía óptica.

Ejemplo 1.11. Aislamiento y análisis de vesículas extracelulares pequeñas (sEV).

Para el aislamiento de vesículas extracelulares pequeñas (sEV), las células donantes de sEV se cultivaron en matraces de 175 cm² (Thermo Fisher Scientific) hasta alcanzar una confluencia del 85 %. Luego se lavaron cuidadosamente tres veces con PBS estéril y se cultivaron en medios sin FBS durante 48 h. Los sobrenadantes que contenían sEV se recogieron, se centrifugaron a 1800 x g y se filtraron a través de un filtro de 0,22 μ m para desechar cualquier célula. Se calculó la densidad final de las células donantes y se sometieron a ultracentrifugación los sobrenadantes derivados del mismo número de células a 100000 x g durante 90 min a 4 °C usando una ultracentrífuga Hitachi CP100NX con un rotor P70AT (Hitachi). Después de desechar el sobrenadante, se recogieron los sedimentos que contenían las sEV. Para el análisis de inmunotransferencia de tipo Western, los sedimentos se sometieron a ultracentrifugación de nuevo a 100000 x g durante 90 min a 4 °C en PBS y, luego se lisaron en tampón de lisis de proteínas. Si iban a usarse sEV para tratamientos *in vitro*, los sedimentos se recogían directamente en el medio de cultivo celular apropiado, se combinaban con el fármaco pertinente, si procedía, se incubaban a 37 °C durante 1 h y, finalmente, se añadían a las células diana. Los tratamientos *in vitro* con sEV se renovaron cada 48 h con sEV recién aisladas. Las sEV para inmunotransferencia de tipo Western o tratamientos *in vitro* se aislaron generalmente de un matraz de 175 cm² de células donantes, a menos que se especifique lo contrario.

Ejemplo 1.12. Ensayos de migración en 2D y 3D

Para evaluar la capacidad de las células tumorales para migrar en 2D, se realizó un ensayo de cicatrización de heridas por rasguño acoplado a la obtención de imágenes de células vivas en lapso de tiempo usando un citómetro de imágenes cuantitativas confocales CQ1 (Yokogawa) durante el transcurso de 14 h. Este experimento se realizó en condiciones fisiológicas, a 37 °C y el 5 % de CO₂ en un ambiente humidificado. Las células se cultivaron hasta alcanzar una confluencia del 95 % y se mantuvieron en un medio sin suero durante la noche. Luego se raspó la monocapa celular usando una punta de pipeta de 200 μ l inclinada a 30° y se redujo el FBS en el medio del 10 al 0,2 %. Luego las células se introdujeron en el citómetro y se tomaron imágenes a las 0, 4, 7, 10 y 14 h tras el rasguño. La cobertura de rasguño (área libre de células) a las 0, 7 y 14 h se cuantificó usando el complemento Wound_healing_size_tool de Image J (Suarez-Arnedo *et al.*, 2020) y se representó como veces en el tiempo de 0 h.

Para el ensayo de migración basado en esferoides, los esferoides se generaron en condiciones de adhesión ultrabaja y, 72 h tras la siembra, se cambió su medio por uno que contenía FBS al 2 % y se transfirieron a los pocillos internos de una microplaca de fondo plano de 96 pocillos (Corning) recubierta con gelatina al 0,1 % (Sigma-Aldrich). Los esferoides se centraron en cada pocillo de la placa y se dejaron adherir durante 3 horas a 37 °C. Luego se fotografiaron individualmente (t=0 h) con un microscopio invertido Nikon Eclipse Ti (Nikon) y se incubaron durante 24 h en condiciones convencionales de cultivo celular. Después de 24 h, volvieron a obtenerse imágenes, y se midieron las áreas de migración de esferoides individuales a las 0 y 24 h mediante el software Breast Analyser. Luego, la tasa de migración a las 24 h se expresó como veces del área ocupada por el esferoide en el tiempo de 0 h.

Ejemplo 1.13. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó usando el software GraphPad Prism versión 8.0.2. Los resultados se presentan como media $\pm$ desviación estándar (DE) o error estándar de la media (EEM). Para comparar dos grupos, se realizó una prueba de la t de Student bilateral. En cuanto a la evaluación de más de dos grupos, se usaron múltiples pruebas de la t o análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Se realizó una prueba F de suma de cuadrados adicional para examinar las diferencias en el parámetro logCI50 de mejor ajuste entre las líneas celulares tumorales tratadas con diferentes fármacos.

Las diferencias estadísticas se consideraron significativas a un $P < 0,05$, con * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, ns=no significativo. La mayoría de los experimentos se realizaron al menos 3 veces de manera independiente (n=3), a menos que se especifique lo contrario, incluyendo generalmente al menos dos réplicas por n.

Ejemplo 2. Resultados

Ejemplo 2.1. Cx43 resensibiliza significativamente células de cáncer de mama triple negativo con mutación en *BRCA1* al inhibidor de PARP olaparib.

Se estudiaron los efectos de Cx43 sobre la respuesta tumoral al PARPi olaparib, con el fin de determinar si su restablecimiento podría proporcionar un beneficio adicional además de suprimir los procesos tumorales.

También se obtuvieron curvas de dosis-respuesta de HCC1937 tratadas con el inhibidor de PARP olaparib (0-1200 μ M) y su disolvente correspondiente DMSO (figura 1.A). La viabilidad celular se relativizó con respecto a los controles sin tratar para cada línea celular. Se observó que la sobreexpresión de Cx43 (verde) proporcionaba una respuesta terapéutica significativamente ventajosa en las células HCC1937 tratadas con olaparib en todas las concentraciones sometidas a prueba hasta 1000 μ M, y esto no se vio afectado por la disolución de olaparib en el disolvente DMSO hasta 600 μ M, muy por encima de las concentraciones del fármaco usadas en este estudio. La CI50 de olaparib fue de 601,9 μ M para el vector vacío de control (EV) y de 350,1 μ M para Cx43_HCC1937 (figura 1.A).

A continuación, se realizaron ensayos de proliferación con concentraciones intermedias de olaparib de 100 y 200 μ M con células HCC1937 durante 96 h (figura 1.B). La viabilidad celular se relativizó o bien con respecto a los controles sin tratar para cada línea celular en cada punto temporal, con el fin de tener en cuenta la proliferación ya reducida de las células con Cx43 restituida (gráfico superior), o bien se informó como valor de absorbancia bruto (gráfico inferior). Se observó una disminución robusta y significativa de la viabilidad celular en las células Cx43_HCC1937 (blanco) tratadas con olaparib en comparación con las células EV_HCC1937 (gris), mantenida en todas las concentraciones y puntos temporales (figura 1.B).

Estos resultados previos se confirmaron además con ensayos de formación de colonias de células HCC1937 tratadas con olaparib 100 μ M durante el transcurso de siete días (figura 1.C). Las mediciones de viabilidad celular o bien se relativizaron con respecto a los controles sin tratar para cada línea celular, con el fin de tener en cuenta la proliferación ya reducida de las células con Cx43 restituida (gráfico de la izquierda), o bien se informaron como valores de absorbancia brutos (gráfico de la derecha). El tratamiento con olaparib 100 μ M provocó una disminución profunda de la viabilidad de las células HCC1937 tras la restitución de Cx43 (figura 1.C).

Ejemplo 2.2. Cx43 reduce la PARilación general de proteínas y se asocia con niveles más bajos de RAD51 en células de cáncer de mama triple negativo con mutación en *BRCA1* bajo tratamiento con olaparib

Con el fin de establecer la funcionalidad de PARP en HCC1937 durante el tratamiento con olaparib, se evaluó el polímero total de poli(ADP-ribosa) (PAR), producto de la actividad de PARP-1, mediante inmunotransferencia de tipo Western en células HCC1937 tratadas con olaparib (50/100 μ M) durante 48 y 96 h (figura 2.A). Con el paso del tiempo y el aumento de la concentración del tratamiento, pudo observarse cómo los niveles de PAR aumentaban en las células EV_HCC1937, pero disminuían en las células Cx43_HCC1937, en consonancia con una falta de respuesta y una respuesta positiva a la inhibición de PARP, respectivamente. La distribución de PAR también se examinó mediante inmunofluorescencia en células HCC1937 tratadas con olaparib 100 μ M durante 96 h (figura 2.B). Pudo observarse una tendencia similar a la observada en la figura 2.A aquí: PAR (rojo) aumentó significativamente

en las células EV_HCC1937 después del tratamiento con olaparib, mientras que disminuyó en Cx43_HCC1937, con la peculiaridad de una señal mayoritariamente nuclear en EV_HCC1937 sin tratar y citoplasmática en Cx43_HCC1937 (figura 2.B). Las variaciones en la localización de PAR pueden atribuirse a diferencias en el ciclo celular, con mayores razones de PAR nuclear con respecto a citoplasmático durante la fase S, y menores en las etapas G0/G1.

En línea con esta línea de investigación, RAD51 y 53BP1, involucrados en la reparación de roturas de doble cadena de ADN (DSB) por recombinación homóloga (HR) y unión de extremos no homólogos (NHEJ), se evaluaron por inmunofluorescencia en células HCC1937 tratadas con olaparib 100 μ M durante 96 h (figura 2.C). RAD51 se ha vinculado positivamente con la resistencia a PARPi, mientras que la pérdida de 53BP1 se asocia con una menor sensibilidad a PARPi. Los focos de 53BP1 (verde) parecieron aumentar tras el tratamiento con olaparib en ambas líneas celulares por igual. Sin embargo, los focos de RAD51 (rojo) aumentaron sólo en las células EV_HCC1937 tratadas con el fármaco, con sólo unas pocas células Cx43_HCC1937 positivas para RAD51, lo que sugiere un posible mecanismo de resistencia en las células EV HCC1937 (figura 2.C).

Ejemplo 2.3. Cx43 aumenta significativamente la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares en células de cáncer de mama triple negativo con mutación en *BRCA1* durante el tratamiento con olaparib

A continuación, se investigó la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares en células HCC1937 pIRES después del tratamiento con olaparib 50 y 100 μ M durante 96 h (figura 3). Las células de control positivo se trataron el día de la medición con el inductor de ROS, hidroperóxido de terc-butilo (TBHP), a 100 μ M durante 2 h. Después del tratamiento con los compuestos, todas las células se tiñeron con diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFDA), un colorante fluorogénico que produce el compuesto altamente fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) tras la oxidación por ROS celulares, y que se detecta mediante espectroscopía de fluorescencia (excitación a 485 nm, emisión a 535 nm). Después de la medición de ROS, se cuantificó la densidad celular, y los valores de fluorescencia de producción de ROS para cada condición se normalizaron con respecto a sus respectivos valores de proliferación (gráfico de la izquierda) para tener en cuenta las diferentes densidades celulares. Cada condición experimental se normalizó además con respecto a su homólogo sin tratar (gráfico de la derecha). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las células EV_HCC1937 (gris) y Cx43_HCC1937 (blanco) sin tratar, ni entre los controles positivos tratados con TBHP. Tras el tratamiento con olaparib, la producción de ROS en Cx43_HCC1937 aumentó, mientras que disminuyó en EV_HCC1937 de manera dependiente de la dosis (gráfico de la izquierda). En general, los valores de ROS fueron significativamente más altos en las células Cx43_HCC1937 tratadas con olaparib que en sus homólogos de EV (gráfico de la derecha), lo que potencialmente puede estar asociado con la acumulación de daño al ADN y una respuesta apoptótica elevada a olaparib en Cx43_HCC1937, tal como se observará en la figura 4.B-C y figura 5.A.

Los niveles de ROS aumentados se consideran un arma de doble filo en el cáncer, ya que puede promover la progresión del tumor al afectar el microambiente, pero también está relacionado con una menor resistencia a múltiples fármacos y un aumento de la muerte celular, particularmente por apoptosis, autofagia y necroptosis. Estudios recientes también señalan un efecto citotóxico (daño al ADN) de los niveles elevados de ROS derivados de las mitocondrias, como resultado del tratamiento con olaparib.

Ejemplo 2.4. Olaparib aumenta significativamente la senescencia mediada por p21 y la acumulación de daño al ADN en células de cáncer de mama triple negativo con mutación en *BRCA1* con Cx43 restituida

La senescencia celular es un proceso que habitualmente se considera supresor del cáncer debido a su implicación en la prevención de la proliferación y progresión de las células tumorales, y a su papel efector en varios tratamientos antitumorales. Ya que se ha descrito que la terapia con olaparib promueve la senescencia a través del aumento de p16, el aumento de p53 o el aumento de RB806 y la disminución de p53, dependiendo del tipo de célula de cáncer de ovario, la senescencia se estudió mediante inmunotransferencia de tipo Western en células HCC1937 tratadas con olaparib (50/100 μ M) durante 48 y 96 h (figura 4.A). El marcador de senescencia p21 aumentó significativamente en Cx43_HCC1937 después de 96 h de tratamiento con olaparib 100 μ M, que a su vez presentó niveles significativamente más altos que sus células EV_HCC1937 tratadas con olaparib 100 μ M durante 96 h.

Finalmente, teniendo en cuenta el mecanismo de acción de olaparib, se evaluó γ H2AX (p-Ser139), un marcador de daño al ADN (roturas de doble cadena de ADN - roturas de ADNbc) y senescencia celular, mediante inmunotransferencia de tipo Western, en células HCC1937 tratadas con olaparib (50/100 μ M) durante 48 y 96 h (figura 4.B). El tratamiento con olaparib 50/100 μ M durante 96 h en células Cx43_HCC1937 provocó un aumento significativo de γ H2AX en comparación con su condición basal y los mismos tratamientos en células EV_HCC1937, lo que indica una mayor acumulación sin reparación de roturas de ADNbc. También se evaluó γ H2AX mediante inmunofluorescencia en HCC1937 tratadas con olaparib 50 y 100 μ M durante 96 h (figura 4.C). Las células Cx43_HCC1937 sin tratar ya mostraron un mayor número de focos de γ H2AX (verde) que las EV_HCC1937, y esta tendencia aumentó durante el tratamiento con olaparib, lo que respalda el hecho de que olaparib conduce a una mayor acumulación de daño al ADNbc en Cx43_HCC1937 (figura 4.C).

Ejemplo 2.5. Cx43 aumenta significativamente la muerte celular programada en células de cáncer de mama triple

negativo con mutación en *BRCA1* bajo tratamiento con olaparib

Para caracterizar adicionalmente el efecto de la restitución de Cx43 en la resensibilización de HCC1937 a olaparib, se realizaron análisis de inmunotransferencia de tipo Western frente a varias proteínas asociadas a muerte celular en células HCC1937 tratadas con olaparib (50/100 μ M) durante 48 y 96 h (figura 5). Cx43_HCC1937 mostró un aumento significativamente robusto de la caspasa 3 activa escindida después de 96 h de tratamiento con olaparib 50 y 100 μ M, en contraste con la casi nula respuesta en EV_HCC1937. Los niveles generales de PARP-1 y PARP-2 no mostraron cambios significativos entre Cx43 y EV_HCC1937 en ninguna de las condiciones; se detectó una fuerte escisión de PARP-1 en células Cx43_HCC1937 después de 96 h de tratamiento con olaparib 50 y 100 μ M, en contraste con los bajos niveles de escisión en EV_HCC1937. Estos resultados sugieren una apoptosis aumentada en las células Cx43_HCC1937 después del tratamiento con olaparib a través de la caspasa 3 escindida, lo que probablemente induce la escisión posterior de PARP-1. Se presume que la PARP-1 escindida inhibe adicionalmente la actividad catalítica de la proteína todavía no escindida, lo que permite la conservación de su sustrato NAD⁺ y, como resultado del ATP, y posibilita que las células lleven a cabo la muerte celular programada.

Ejemplo 2.6. Cx43 aumenta significativamente la muerte celular programada y el daño al ADN y reduce la PARilación general en células de tumor de mama triple negativo con mutación en *BRCA1* durante el tratamiento con olaparib en condiciones que inducen anoikis.

Con el fin de someter a prueba el efecto de Cx43 sobre la respuesta tumoral a olaparib en un entorno más fisiológicamente relevante, las células HCC1937 se trataron con olaparib 50 μ M y se cultivaron en condiciones de suspensión forzada/independiente del anclaje que inducen anoikis durante 48 h (figura 6.A).

Anoikis, un término acuñado por primera vez en 1994, se refiere a una forma de muerte celular programada inducida por la interrupción de la adhesión celular de las células epiteliales normales, que se desprenden de la matriz extracelular circundante. La resistencia a la anoikis se ha identificado como un rasgo distintivo de las células cancerosas, ya que la supervivencia de células normalmente adherentes en condiciones de suspensión puede permitir su metástasis a sitios distantes. Se ha estudiado tanto en presencia como en ausencia de suero; la privación de suero constituye otra forma de medir la resiliencia celular en circunstancias adversas, ya que el suero fetal bovino (FBS) contiene una variedad de factores de crecimiento y otros elementos necesarios para la supervivencia celular en cultivo.

En estas circunstancias, y a diferencia de los resultados observados después de 48 h de circunstancias de cultivo normales (figura 5), los niveles de caspasa 3 escindida ya eran significativamente mayores en las células Cx43_HCC1937 después de sólo 48 h de inducción de anoikis, particularmente en ausencia de suero (figura 6.A). El tratamiento de las células Cx43_HCC1937 con olaparib aumentó adicionalmente esta escisión, incluso más cuando se privó de suero, y contrastó con la ausencia de cambios significativos en sus homólogos de EV. En cuanto a γ H2AX, Cx43_HCC1937 sin tratar ya mostraron niveles significativamente mayores que sus homólogos de EV, siendo el efecto más pronunciado cuando se retiró el suero (figura 6.A). El tratamiento con olaparib en ausencia de suero exacerbó adicionalmente este resultado (figura 6.A), como también se observa en condiciones de cultivo normales (figura 4.B). La PARilación total de proteínas, que resulta directamente de la actividad de PARP, también pareció seguir la tendencia observada en condiciones de cultivo regulares (figuras 2.A-B), con un aumento en las células EV_HCC1937, pero una disminución en Cx43_HCC1937, después del tratamiento con olaparib (figura 6.A), lo que indica una inhibición efectiva de la actividad enzimática de PARP sólo tras el restablecimiento de Cx43.

Estos experimentos sugieren no sólo una confirmación en condiciones que inducen anoikis de los resultados observados en circunstancias de cultivo normales (figura 2, figura 4 y figura 5), pero también un mayor efecto apoptótico. Las células Cx43_HCC1937 de suspensión forzada sin tratar, particularmente privadas de suero, ya eran más sensibles a anoikis que sus homólogos de EV (la restitución de Cx43 proporciona resensibilización a anoikis), por lo que 48 h de tratamiento con olaparib 50 μ M en estas condiciones condujeron a una mayor respuesta a anoikis/apoptótica (figura 6.A) en células Cx43_HCC1937 sin tener que esperar 96 h para obtener un efecto similar en condiciones de cultivo normales (figura 5), donde apenas se detectó respuesta apoptótica en el punto temporal de 48 h.

En línea con estos resultados, en condiciones que inducen anoikis de 48 h, las células HCC1937 crecieron en suspensión y tendieron a formar agregados, que parecían más grandes en EV_HCC1937 que en Cx43_HCC1937, y generalmente más pequeños en ausencia de suero (figura 6.B). El tratamiento con olaparib 50 μ M dio como resultado la desintegración parcial de estas agrupaciones, dejando un mayor porcentaje de células sueltas flotantes, parte de las cuales presumiblemente estaba muerta según la figura 6.A; este efecto fue más pronunciado en Cx43_HCC1937 que en su homólogo de EV, lo que indica una capacidad de las células HCC1937 de tipo natural para sobrevivir en condiciones de suspensión y una resensibilización de las células HCC1937 a anoikis y a olaparib tras el restablecimiento de Cx43.

Ejemplo 2.7. El tratamiento con olaparib en células de cáncer de mama triple negativo con mutación en *BRCA1* con Cx43 restituida conduce a una proliferación de esferoides 3D significativamente menor que en las células de tipo natural

Con el fin de someter a prueba adicionalmente el potencial de Cx43 para aumentar el efecto de olaparib en células HCC1937 en modelos preclínicos que implican un entorno más complejo y heterogéneo, representativo de los tumores *in vivo*, se obtuvieron esferoides de EV y Cx43_HCC1937 tridimensionales (figura 7).

Se produjeron esferoides de tamaño uniforme sembrando en placa 3000 células EV y Cx43_HCC1937 en condiciones de adhesión ultrabaja, así como 5000 células Cx43_HCC1937 en paralelo para tener en cuenta el efecto antiproliferativo esperado de Cx43 en células tumorales sin tratar (día -4) (figura 7). Cuando los esferoides tenían 4 días de edad y un tamaño inicial algo similar (comparando los esferoides de EV_HCC1937 sembrados en placa a 3000 células con los esferoides de Cx43_HCC1937 sembrados en placa a una densidad de 5000 células), se inició el tratamiento con olaparib (200, 400 y 600 μ M) (tratamiento del día 0), durante un periodo total de 8 días. Durante este tiempo, se realizó un seguimiento individual de los esferoides y se registró su tamaño cada 48 horas. Las concentraciones de olaparib fueron superiores a las usadas en los experimentos 2D para tener en cuenta la mayor resistencia al fármaco prevista en los modelos 3D.

Después de eso, se combinaron las mediciones del área de los esferoides para cada condición y se compararon los esferoides de EV con los esferoides de Cx43_HCC1937, aquellos sembrados en placa a densidades celulares iniciales de o bien 3000 o bien 5000. En las cuatro condiciones (sin tratar, olaparib 200, 400 y 600 μ M), los esferoides de Cx43_HCC1937 (verde) sembrados en placa a la misma densidad celular inicial que los esferoides de EV (rojo) (3000 células), fueron significativamente más pequeños. Después de 8 días, estos modelos 3D con Cx43 restituida eran, en promedio, un 41,7 %, un 29,68 % y un 12,57 % más pequeños que sus homólogos de EV cuando se sometían a un tratamiento con olaparib 200, 400 y 600 μ M, respectivamente.

En cuanto a los esferoides de Cx43_HCC1937 sembrados en placa a una densidad celular inicial de 5000 (azul), también fueron significativamente más pequeños que EV_HCC1937, particularmente en las etapas posteriores del tratamiento (días 4, 6 y 8), incluso cuando se sembraron en placa a casi el doble de la densidad celular inicial. Mientras que los esferoides de EV_HCC1937 sin tratar aumentaron su tamaño con el tiempo, Cx43_HCC1937 no lo hizo, sino que condujo a una ligera disminución de su tamaño inicial (día 0), o bien sea debido a una muerte celular aumentada o bien a una rigidez potenciada. Es interesante observar que después de 8 días de tratamiento con olaparib 600 μ M, los esferoides de Cx43_HCC1937 (densidades celulares iniciales de 3000 y 5000) eran prácticamente inexistentes, en comparación con los esferoides de EV_HCC1937 que todavía estaban bien definidos (figura 7).

Estos resultados refuerzan adicionalmente, en un modelo preclínico, la potencial ventaja terapéutica de los tumores con mutación en *BRCA1* con Cx43 restituida bajo tratamiento con el PARPi olaparib.

Ejemplo 2.8. La restitución de Cx43 resensibiliza significativamente la línea celular de cáncer de ovario SNU251 con mutación en *BRCA1* al tratamiento con olaparib

Con el fin de complementar los resultados anteriores con otro cáncer tratado con PARPi clínicamente relevante, se repitieron los ensayos con la línea celular de cáncer de ovario SNU251 con mutación en *BRCA1*, nucleofectada eficientemente con plásmidos de EV o de restitución de Cx43 (figura 8). Las células SNU251 de tipo natural (EV) no tenían expresión nativa de Cx43, según se analizó mediante inmunotransferencia de tipo Western (figura 8.A).

A continuación, se realizaron ensayos de proliferación durante 96 h en presencia de olaparib 100 y 200 μ M (figura 8.B). Las células SNU251 con Cx43 restablecida (blanco) mostraron una respuesta significativamente mejor a olaparib que las células de EV (gris), a partir de las 48 h, tanto con datos de proliferación normalizados (gráfico de la izquierda) como con datos de proliferación sin procesar (gráfico de la derecha), aunque la diferencia fue más aguda en estos últimos.

Hasta el momento, las células de mama HCC1937 y las de ovario SNU251 con mutación en *BRCA1* pueden resensibilizarse eficazmente al tratamiento con olaparib tras la restitución de Cx43 (figura 1 - figura 7 y figura 8).

Ejemplo 2.9. Las vesículas extracelulares pequeñas (sEV) que contienen Cx43 mejoran la eficacia de olaparib en células HCC1937 con mutación en *BRCA1* resistentes *de novo*

Las vesículas extracelulares pequeñas (sEV) son nanopartículas derivadas de células, basadas en fosfolípidos, que permiten la comunicación entre células cercana y distante, y están implicadas en diferentes procesos fisiológicos y patológicos y, más recientemente, han despertado gran interés como prometedores nanoportadores de próxima generación para la administración dirigida de diversos productos terapéuticos. Se ha determinado que Cx43 está presente en determinadas sEV, desempeñando un papel clave para facilitar la administración de su carga y su captación por las células diana.

Con el fin de evaluar el potencial terapéutico de las sEV como portadores/vehículos de administración de Cx43 en combinación con olaparib, se trataron células HCC1937 de tipo natural, que se sabe que son resistentes *de novo* a olaparib, con sEV sin Cx43 y enriquecidas con Cx43 aisladas de diferentes fuentes celulares: la línea celular de

riñón embrionario humano HEK-293T, una fuente ampliamente usada de sEV en ensayos clínicos debido a sus diversas ventajas, y células HCC1937 de control (EV) y con Cx43 restituida (sEV autólogas). Tanto (i) las sEV derivadas de células no tumorales (tales como HEK-293T) como (ii) las Cx43_HCC1937-sEV autólogas contienen altos niveles de Cx43, mientras que las EV_HCC1937-sEV no contienen Cx43; todas las sEV se tiñeron positivamente para las proteínas tetraspaninas CD9 y CD63, que son marcadores de sEV (figura 9.A). El tratamiento de cinco días con sEV positivas para Cx43 aisladas de dos fuentes celulares diferentes (HEK-293T-sEV, denominada "sEV-Cx43+" en la figura, y Cx43_HCC1937-sEV, denominada "Cx43+_HCC", resaltados con cuadrados rojos) mejoró significativamente el efecto citotóxico de olaparib 75 μ M en comparación con olaparib solo en células HCC1937, tal como se determina mediante el ensayo de formación de colonias (figura 9.B), lo que respalda su posible aplicación en entornos preclínicos/clínicos para la administración dirigida de este fármaco.

Ejemplo 2.10. Cx43 actúa como un supresor tumoral en cáncer con mutación en *BRCA1/2*

Para caracterizar adicionalmente su implicación en el cáncer con mutación en *BRCA1/2*, se restituyó Cx43 mediante transfección de plásmidos en líneas celulares de TNBC y de carcinoma de ovario con mutación en *BRCA1*, HCC1937 y SNU251, respectivamente. Los experimentos de proliferación durante el transcurso de 96 h mostraron una reducción significativa en la actividad proliferativa de las células HCC1937 y SNU251 con Cx43 restituida (verde/blanco) en comparación con las células con EV de control (gris) (figura 10.A izquierda y centro). Estos resultados se confirmaron además mediante ensayos de formación de colonias en células HCC1937 después de 6 días en cultivo (figura 10.A izquierda), corroborando que el restablecimiento de Cx43 redujo significativamente la formación de colonias en comparación con sus homólogos de EV. De manera similar, las células de cáncer de pulmón Ludlu-1 de tipo natural con mutación en *BRCA2* se trataron durante 5 días con sEV enriquecidas con Cx43 (Cx43-sEV), que actúan como vehículos de administración de Cx43 y derivan de células HEK293T no tumorales, lo que conduce a una reducción en la proliferación de células tumorales (figura 10.A derecha). La combinación de Cx43-sEV con olaparib 75 μ M también potenció notablemente el efecto citotóxico del fármaco (figura 10. A derecha).

A continuación, se estudió la implicación de Cx43 en la patogénesis de TNBC bajo enfoques más fisiológicos, concretamente el cultivo de esferoides 3D (figura 10.B) y condiciones que inducen anoikis (figura 10.C). El cultivo de esferoides 3D (figura 10.B) de células HCC1937 durante 12 días corroboró adicionalmente la reducción en la proliferación determinada en el cultivo 2D (figura 10.A) dando como resultado el restablecimiento de Cx43. Los esferoides de Cx43_HCC1937 (línea verde) fueron significativamente más pequeños que sus homólogos de EV (línea roja) en cada punto temporal medido (4, 6, 8, 10 y 12 días) cuando se sembraron en placa a la misma densidad celular inicial (3000 células); curiosamente, incluso si las células Cx43_HCC1937 (línea azul) se sembraron en placa a una densidad celular mayor que las células EV_HCC1937 (línea roja) (5000 frente a 3000 células, respectivamente), su proliferación fue significativamente más lenta y los esferoides terminaron siendo más pequeños que sus homólogos de EV (figura 10.B).

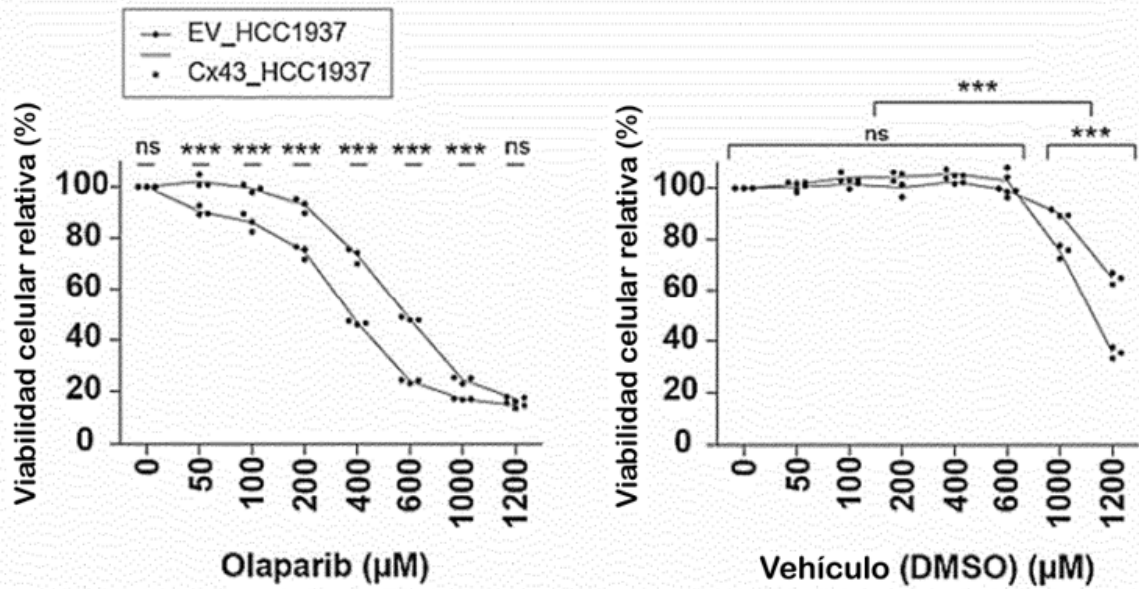
La anoikis se refiere a una forma de muerte celular programada inducida por la interrupción de la adhesión celular de las células epiteliales normales, que se desprenden de la matriz extracelular circundante. La resistencia a la anoikis se ha identificado como un rasgo distintivo de las células cancerosas, ya que la supervivencia de células normalmente adherentes en condiciones de suspensión puede permitir su metástasis a sitios distantes. Se ha estudiado tanto en presencia como en ausencia de suero; la privación de suero constituye otra forma de medir la resiliencia celular en circunstancias adversas, ya que el suero fetal bovino (FBS) contiene una variedad de factores de crecimiento y otros elementos necesarios para la supervivencia celular en cultivo. Cuando se cultiva en condiciones de suspensión forzada/independiente del anclaje durante 48 h (figura 10.C), las células Cx43_HCC1937 formaron agregados multicelulares más pequeños (líneas rojas discontinuas) que EV_HCC1937, particularmente en ausencia de FBS. Tal como se evalúa mediante inmunotransferencia de tipo Western, la escisión del mediador de la apoptosis caspasa 3 aumentó significativamente en Cx43_HCC1937, especialmente en condiciones de privación de suero, en comparación con EV_HCC1937. La vimentina, un factor contribuidor clave en la transición epitelio-mesenquimal, se reguló por incremento en EV_HCC1937 en todas las condiciones, en línea con la resistencia a anoikis, y se reguló por disminución de manera estadísticamente significativa en Cx43_HCC1937. Estos experimentos sugieren una resensibilización de anoikis de HCC1937 tras la restitución de Cx43, particularmente cuando se encuentran en condiciones de privación de suero.

Finalmente, se estudió la migración celular de las células HCC1937 en condiciones de esferoides 2D (figura 10.D) y 3D (figura 10.E). La migración 2D de HCC1937 se determinó mediante un ensayo de cicatrización de rasguños/heridas acoplado a microscopía de lapso de tiempo en condiciones de privación de suero durante 14 h después del rasguño de una monocapa celular (figura 10.D). La cobertura del rasguño (área libre de células) a las 0, 7 y 14 horas se cuantificó y se expresó como veces del área inicial de la herida (tiempo de 0 h). Las células HCC1937 con Cx43 restituida (verde) mostraron un área con rasguño sin células significativamente mayor que sus homólogos de EV (negro), lo que indica una capacidad migratoria reducida (figura 10.D). Los experimentos de migración de esferoides se realizaron cultivando por separado esferoides de 3 días y sembrándolos en microplacas de fondo plano recubiertas de gelatina, evaluando la migración después de 24 h (figura 10.E; frente de migración indicado con líneas rojas discontinuas). La restitución de Cx43 en HCC1937 condujo a una migración de esferoides significativamente reducida (verde) en comparación con su homólogo de EV (rojo).

REIVINDICACIONES

1. Conexina 43 para su uso en el tratamiento de un cáncer con mutación en *BRCA1/2* seleccionado de: cáncer de mama triple negativo (TNBC) con mutación en *BRCA1/2*, cáncer de ovario con mutación en *BRCA1/2* y/o cáncer de pulmón con mutación en *BRCA1/2*; en donde el vehículo de administración es una nanopartícula, una vesícula extracelular o un vector de expresión que codifica para conexina 43.
5
2. Conexina 43 para su uso según la reivindicación 1, en donde la conexina 43 se administra concomitantemente con un inhibidor de poli(ADP-ribosa) polimerasa (PARP).
10
3. Conexina 43 para su uso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la conexina 43 se administra concomitantemente con un inhibidor de PARP seleccionado de: olaparib, niraparib, veliparib, talazoparib, iniparib o rucaparib.
15
4. Producto farmacéutico de combinación que comprende conexina 43 y un inhibidor de PARP; en donde el vehículo de administración es una nanopartícula, una vesícula extracelular o un vector de expresión que codifica para conexina 43.
20
5. Producto farmacéutico de combinación según la reivindicación 4, en donde la conexina 43 puede seleccionarse entre proteína, ARNm o ADN de conexina 43.
25
6. Producto farmacéutico de combinación según cualquiera de las reivindicaciones 4 ó 5, que comprende conexina 43 y un inhibidor de PARP seleccionado de: olaparib, niraparib, veliparib, talazoparib, iniparib o rucaparib.
30
7. Producto farmacéutico de combinación según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, que comprende conexina 43 y olaparib.
35
8. Composición farmacéutica que comprende el producto farmacéutico de combinación según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 y, opcionalmente, excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables; en donde el vehículo de administración es una nanopartícula, una vesícula extracelular o un vector de expresión que codifica para conexina 43.
9. Composición farmacéutica según la reivindicación 8, para su uso en el tratamiento de un cáncer con mutación en *BRCA1/2* seleccionado de: TNBC con mutación en *BRCA1/2*, cáncer de ovario con mutación en *BRCA1/2* y/o cáncer de pulmón con mutación en *BRCA1/2*; en donde el vehículo de administración es una nanopartícula, una vesícula extracelular o un vector de expresión que codifica para conexina 43.

Figura 1

A

	Olaparib	
	EV_HCC1937	Cx43_HCC1937
CI ₅₀ (μM)	601.9	350.1
Valor de p de la prueba F de suma de cuadrados adicional	<0.0001	
IC del 95% CI ₅₀ (μM)	585.8-618.4	327.1-374.1
R cuadrado	0.9963	0.988

Figura 1 (cont.)

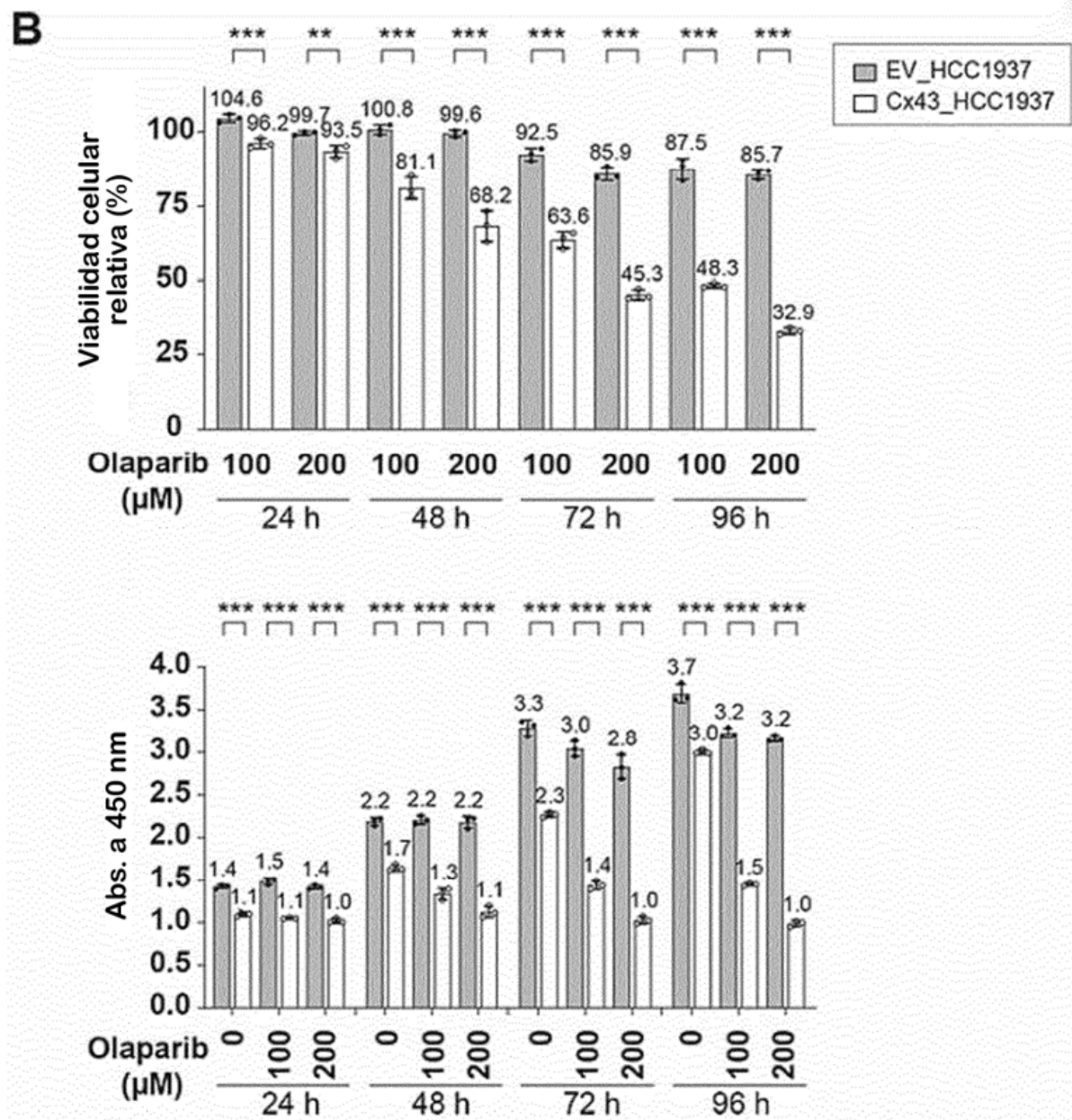


Figura 1 (cont.)

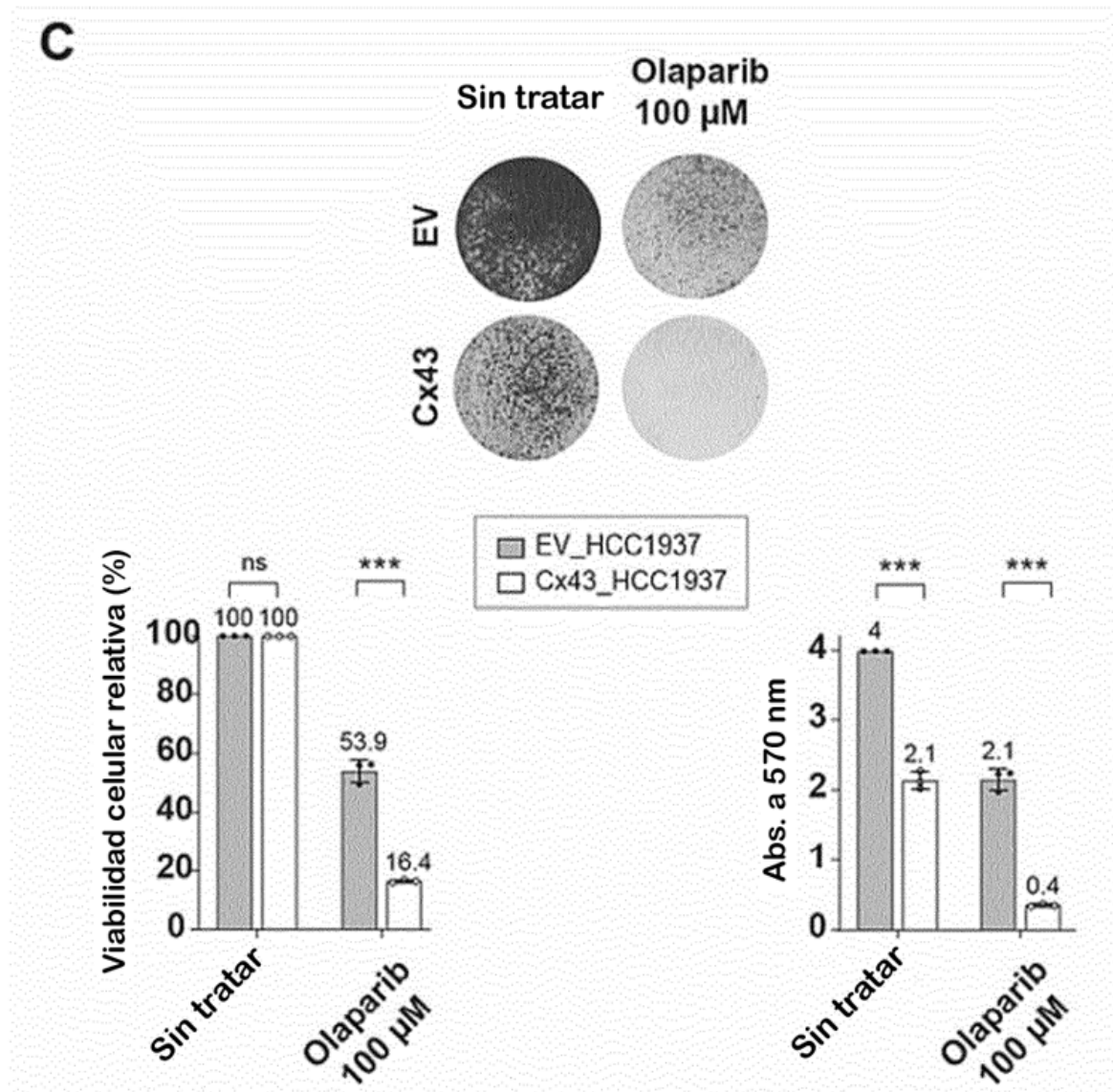


Figura 2

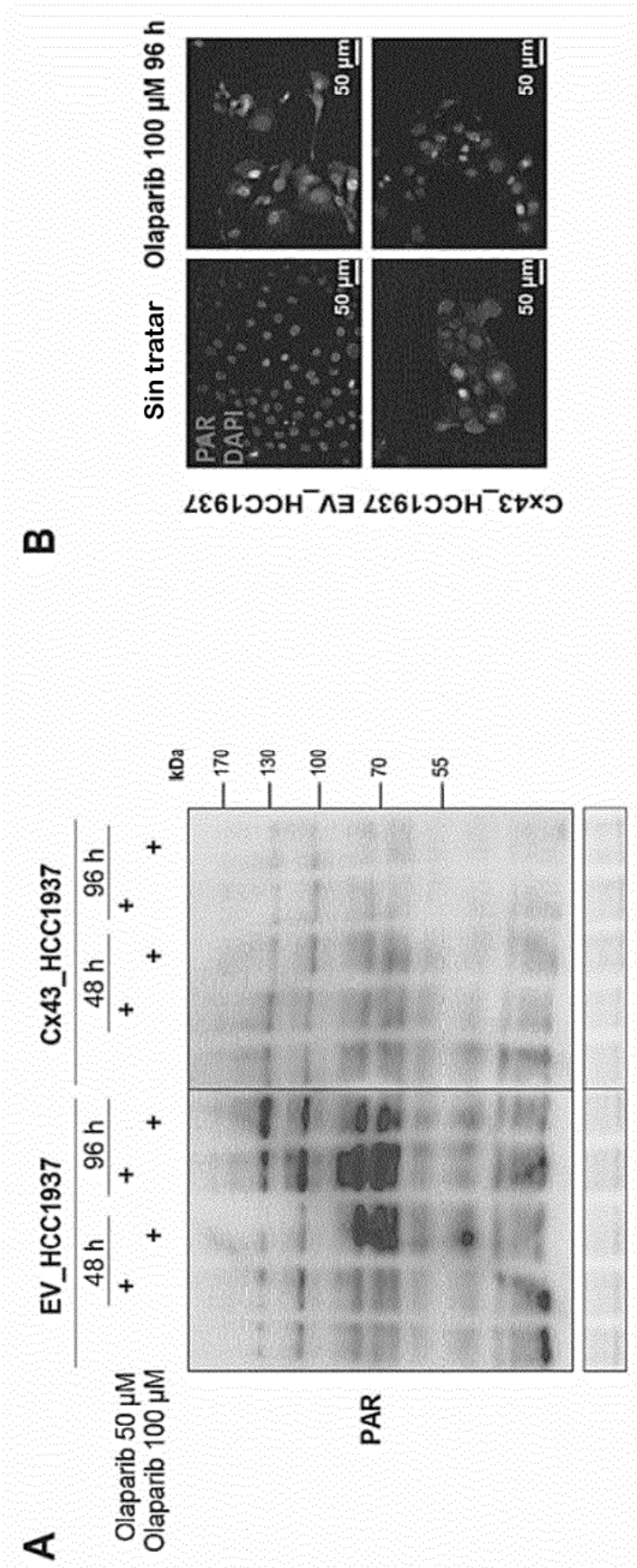


Figura 2 (cont.)

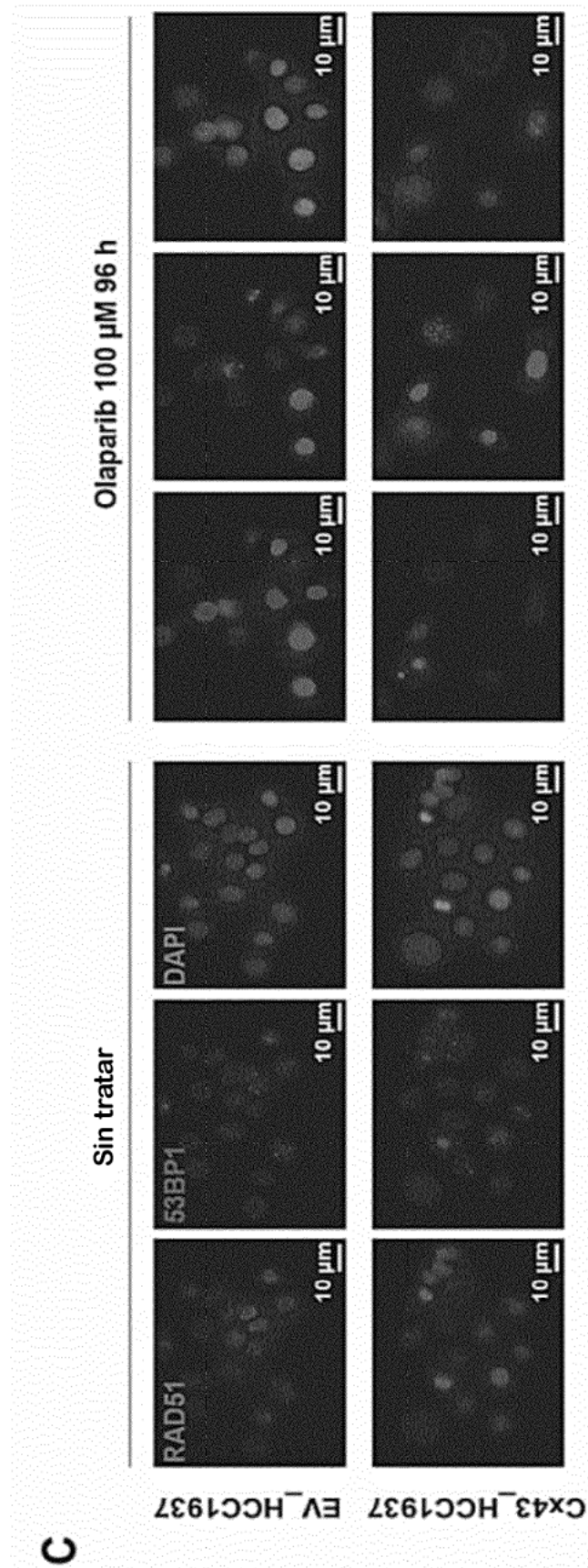


Figura 3

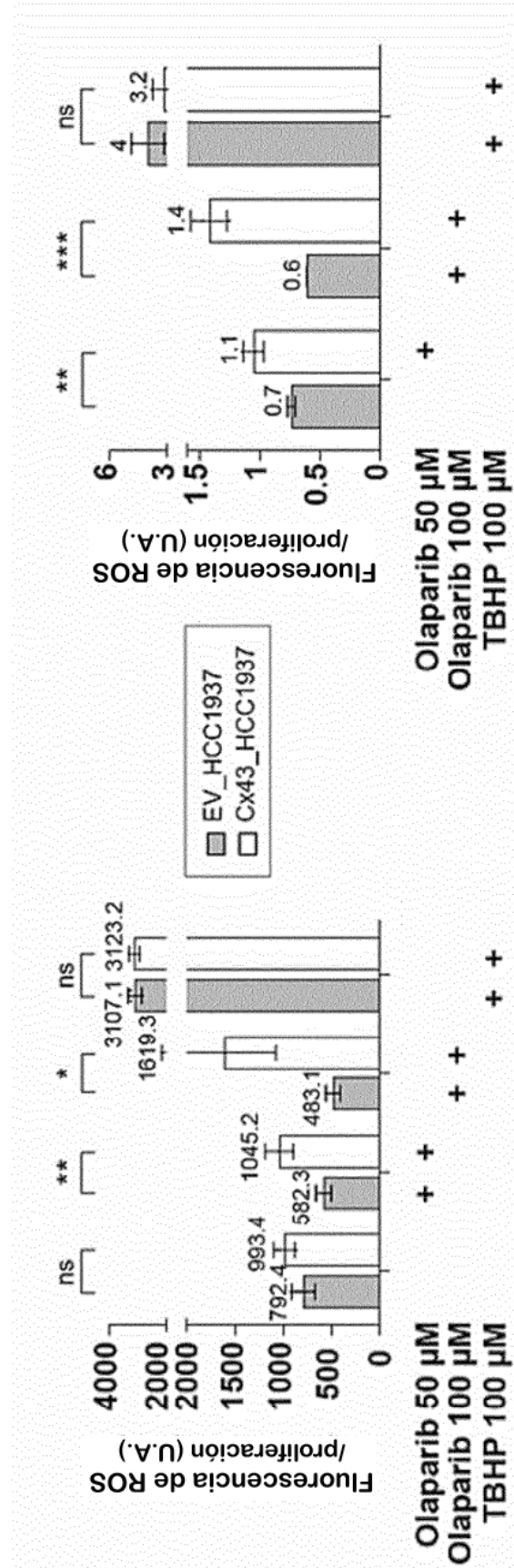


Figura 4

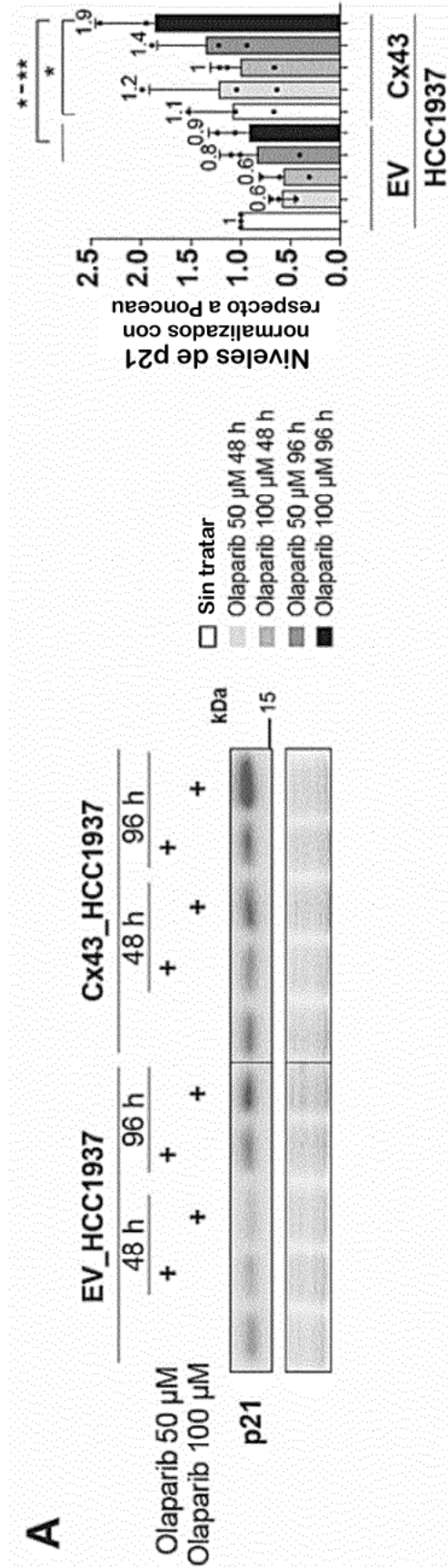


Figura 4 (cont.)

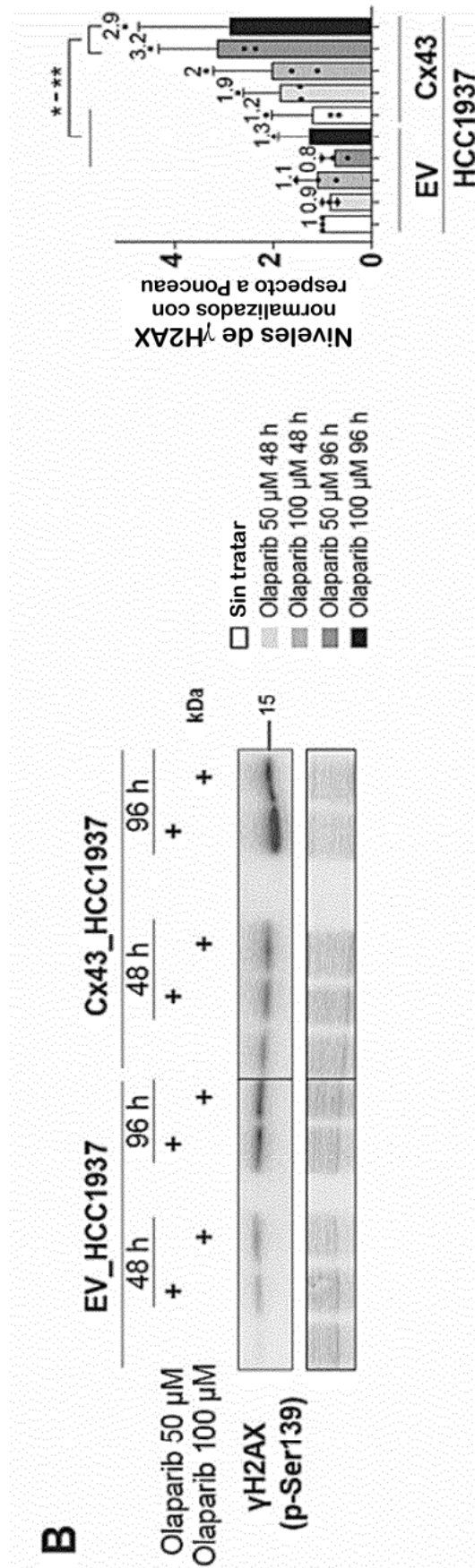


Figura 4 (cont.)

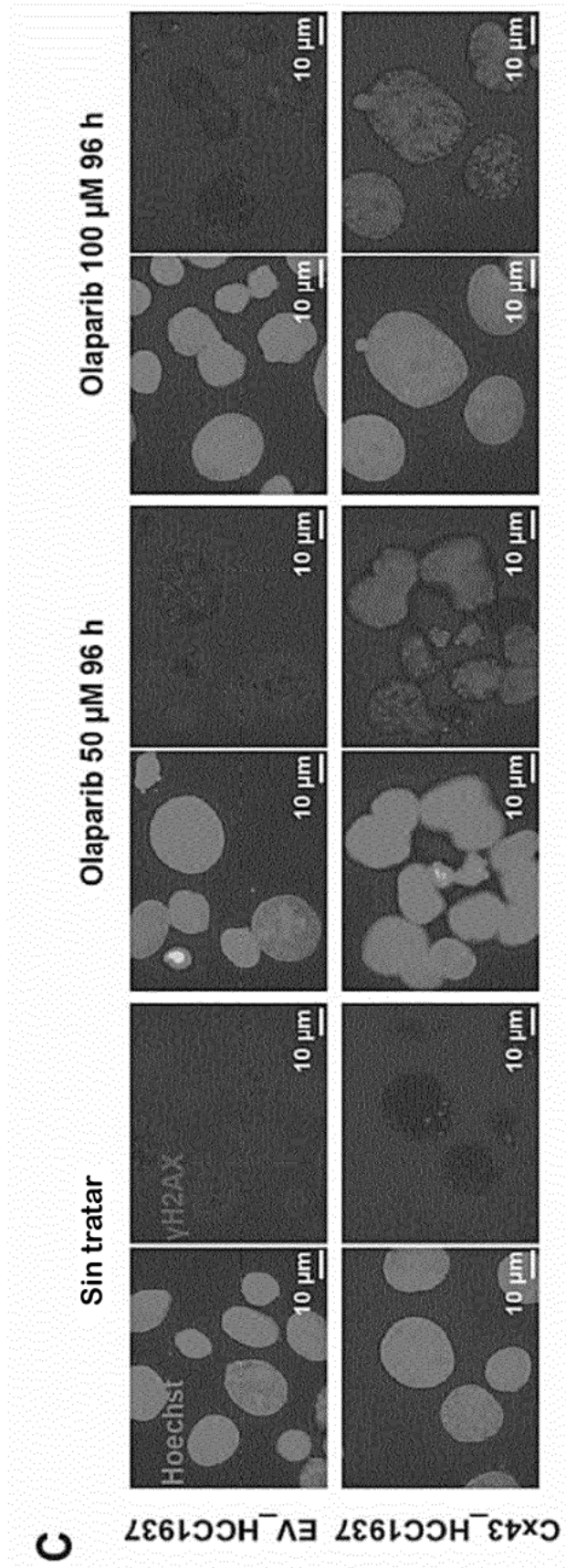


Figura 5

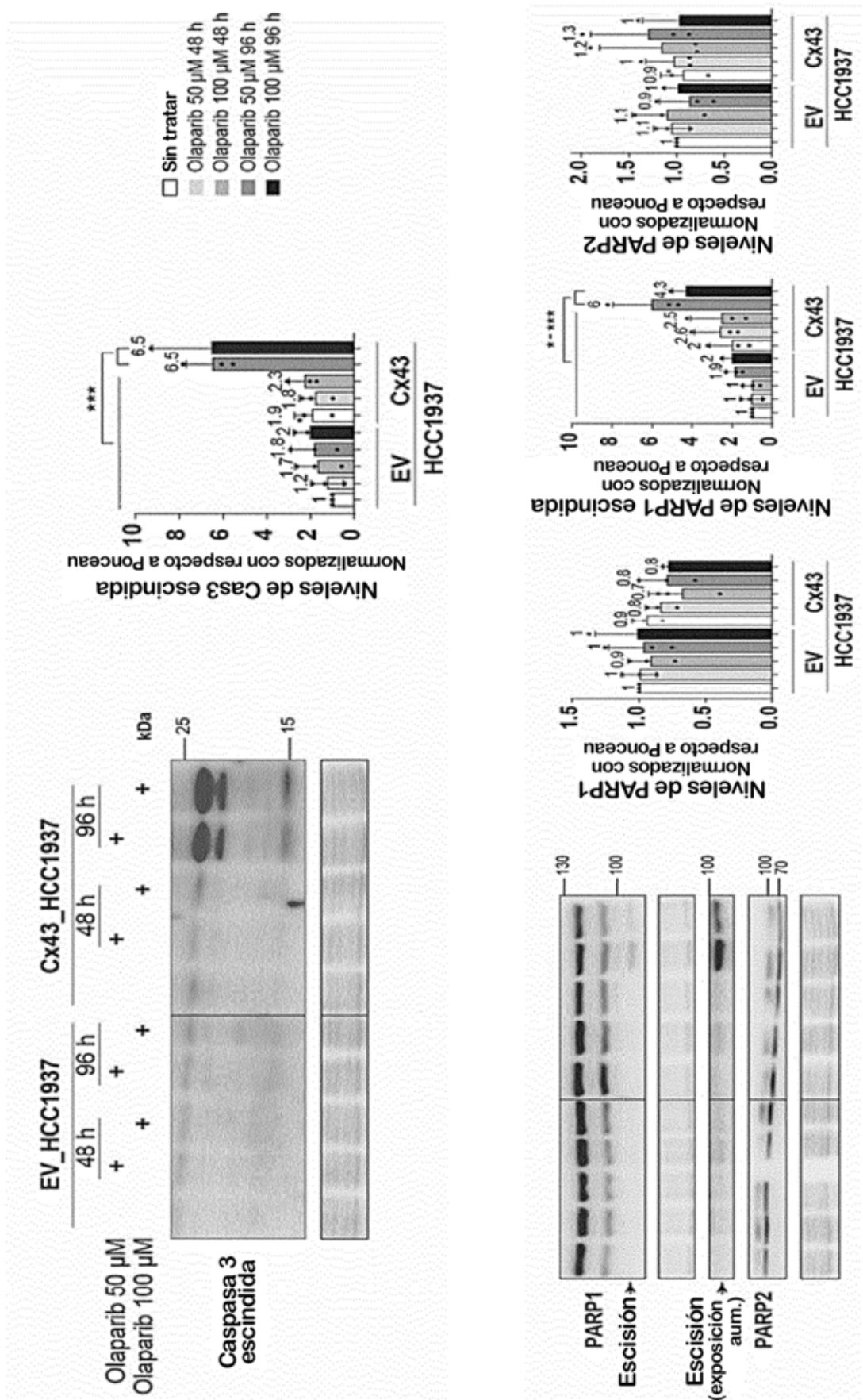


Figura 6

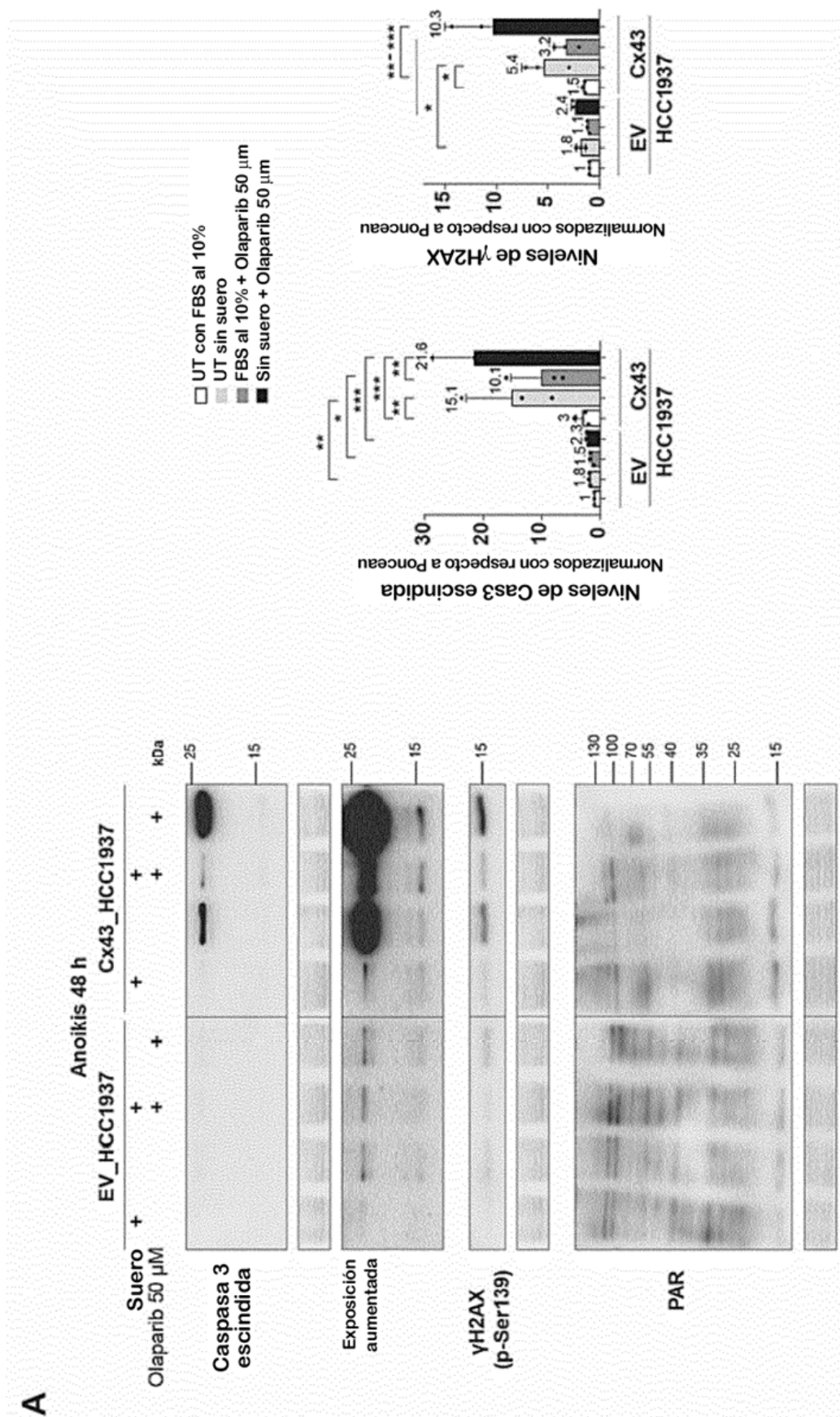


Figura 6 (cont.)

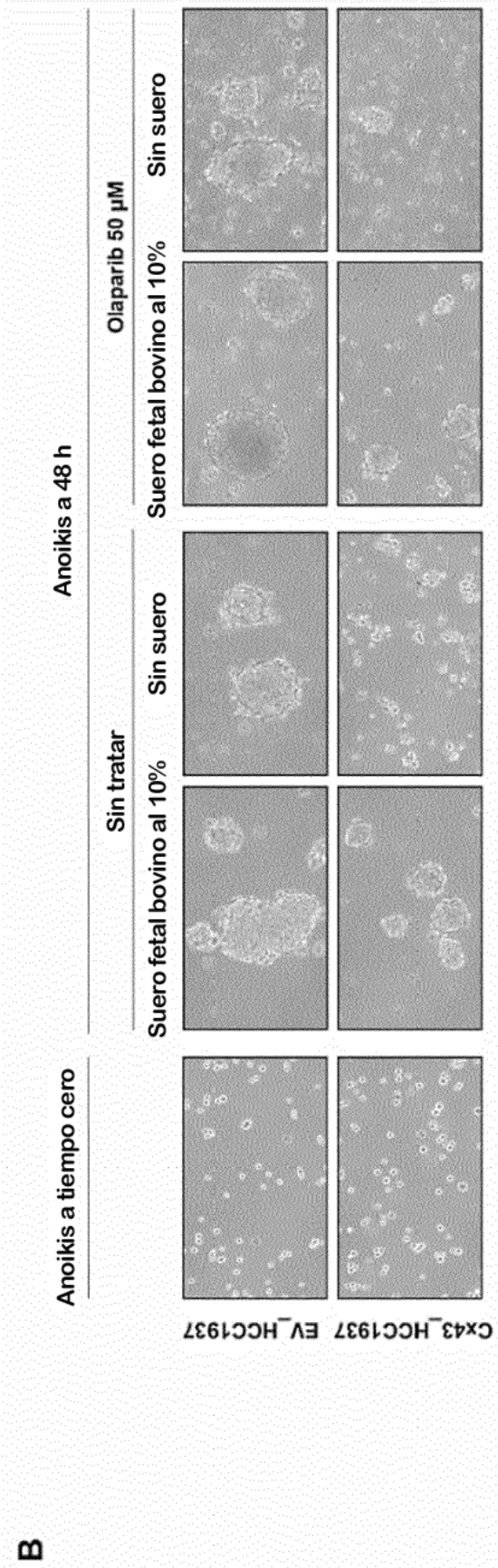


Figura 7

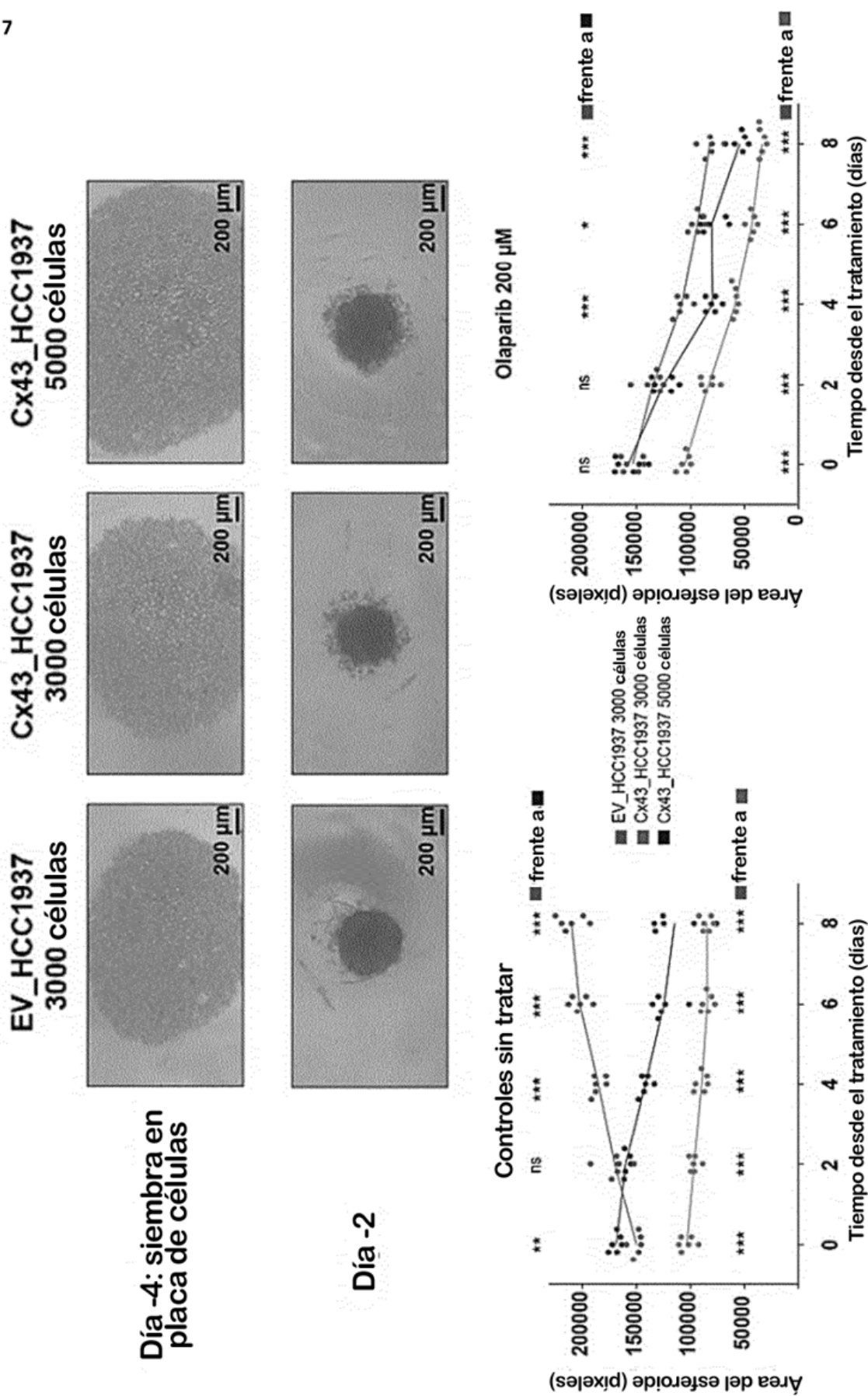


Figura 7 (cont.)

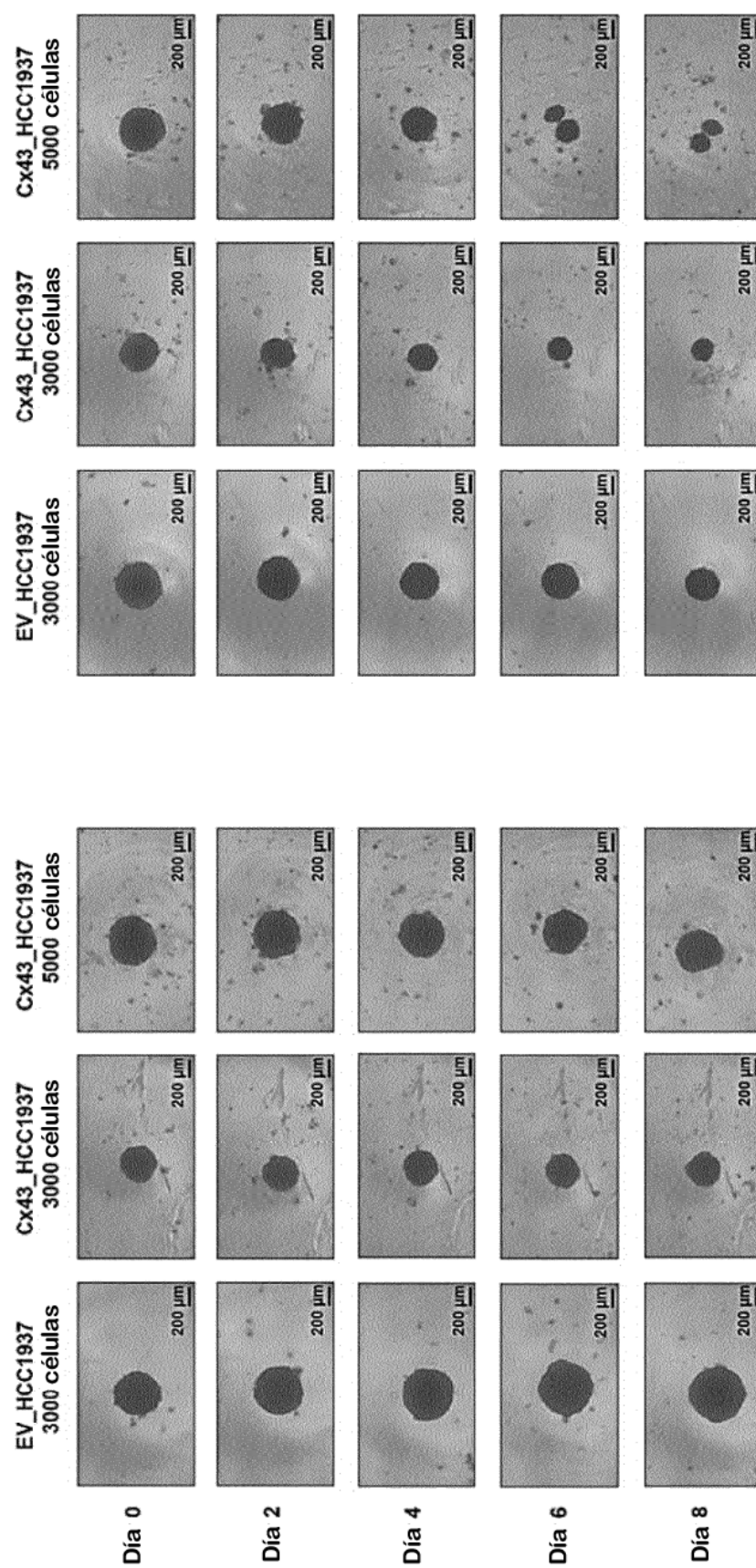


Figura 7 (cont.)

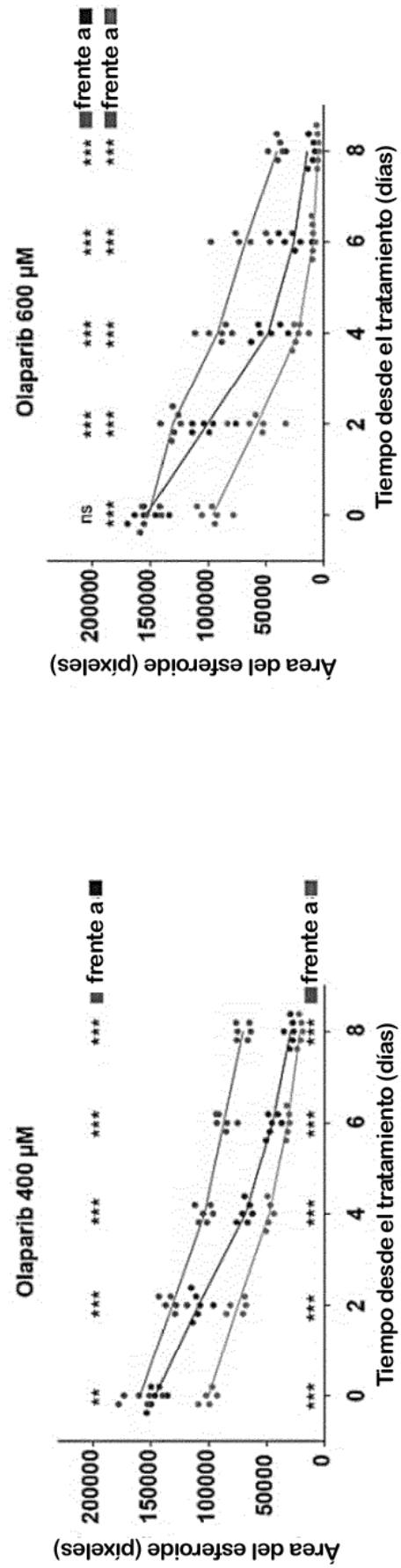


Figura7 (cont.)

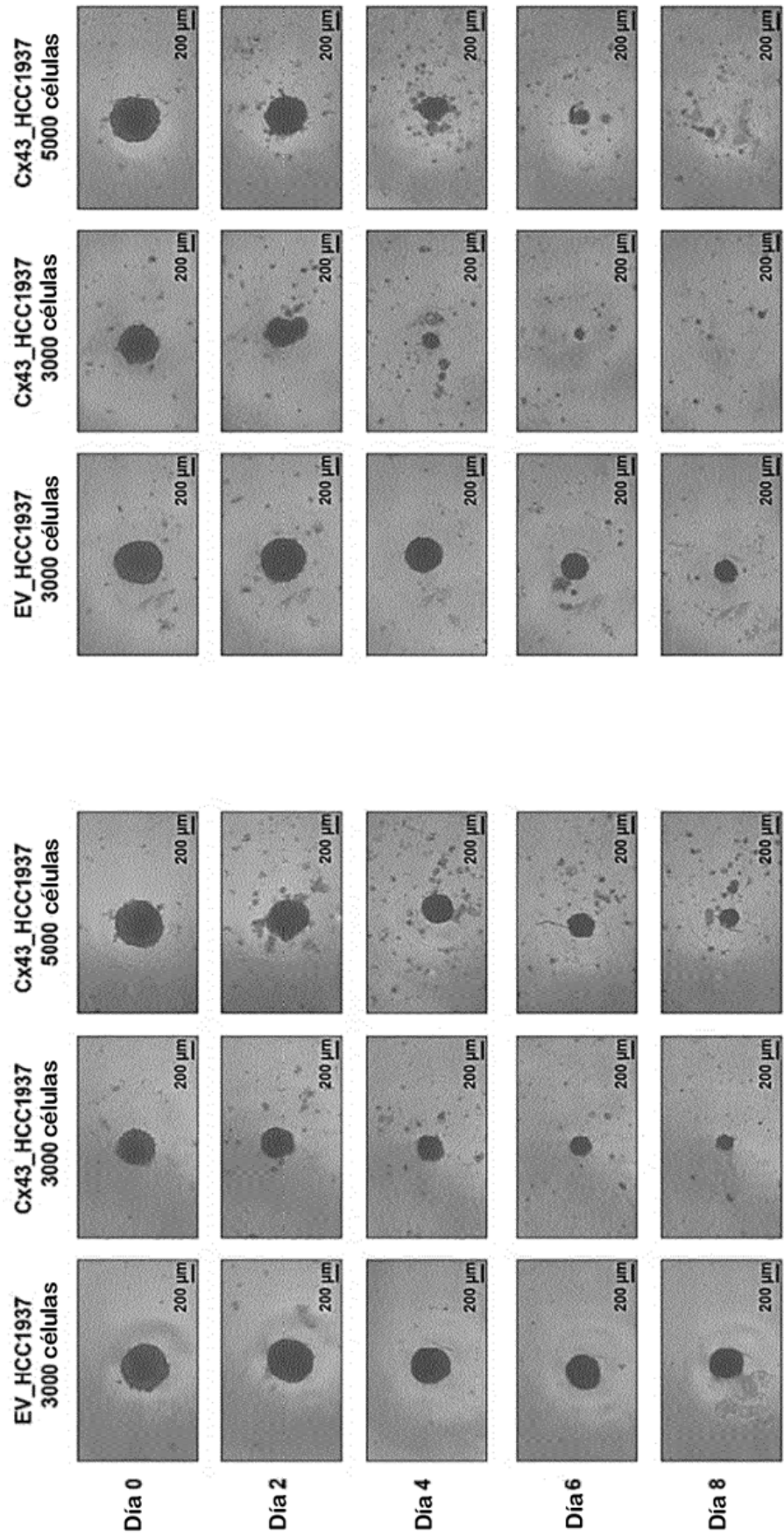


Figura 8

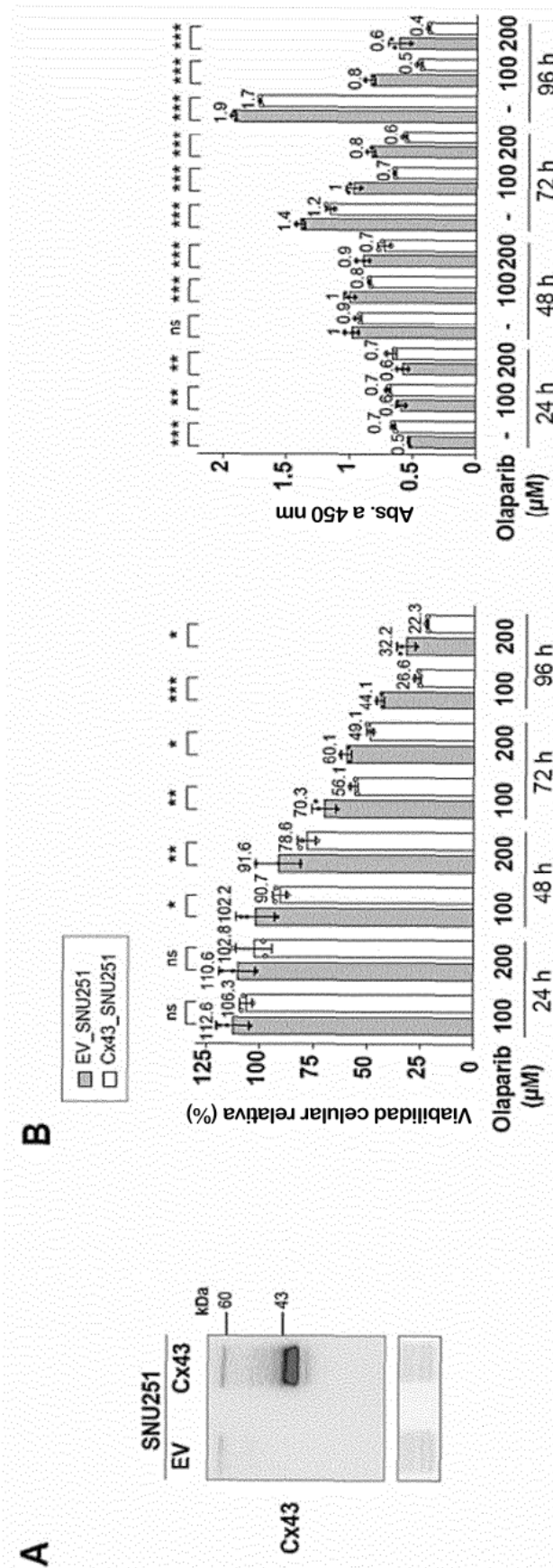


Figura 9

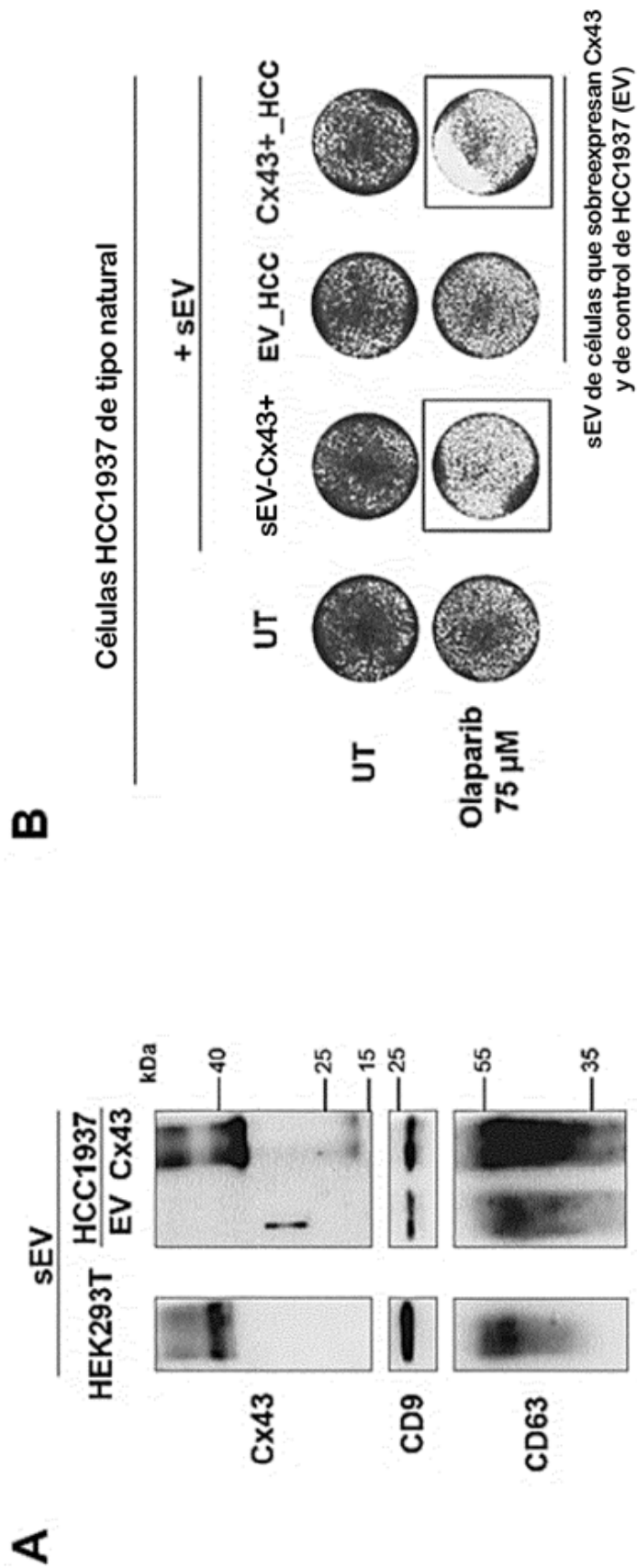


Figura 10

A

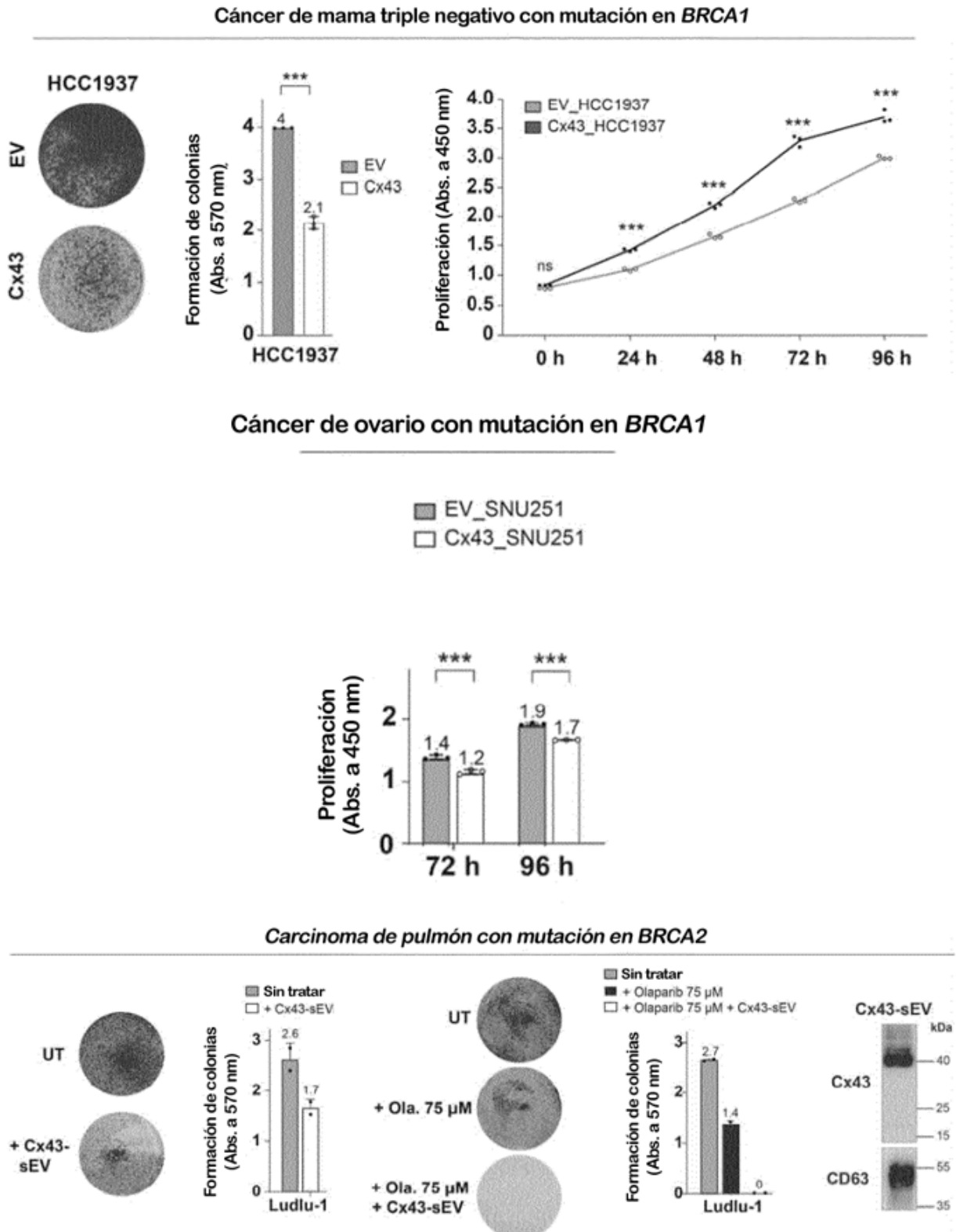
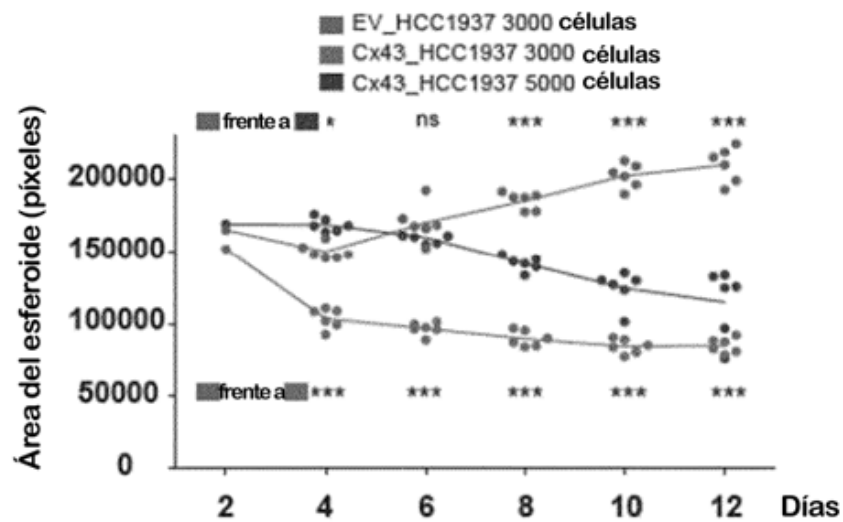
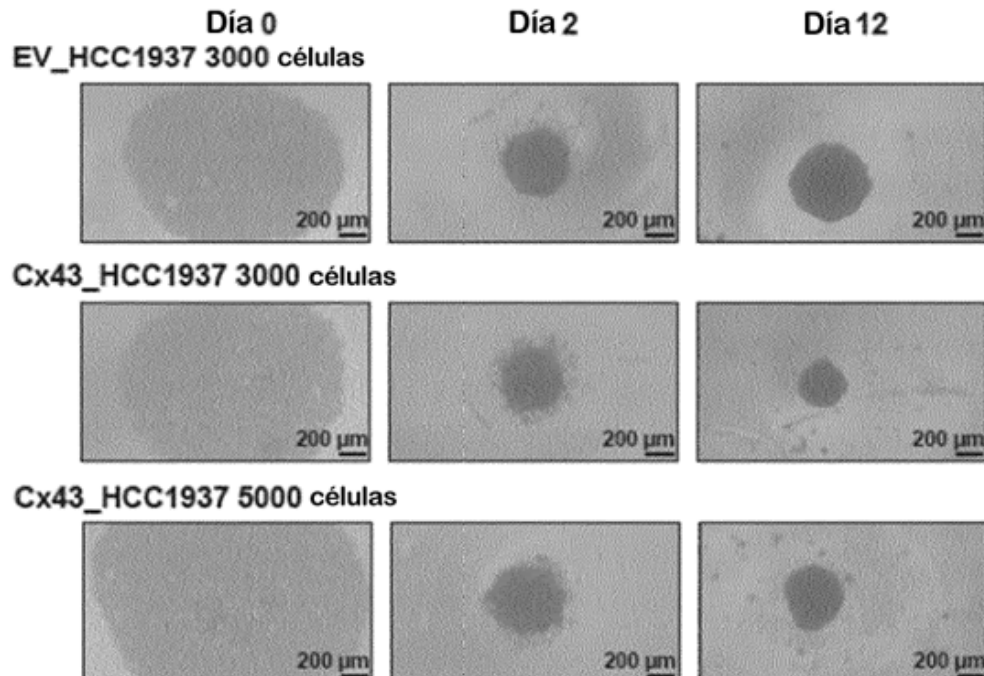


Figura 10 (cont.)

B



Esferoides en el día 12

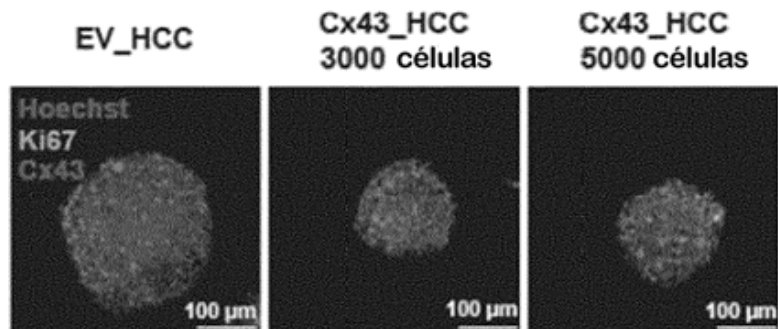
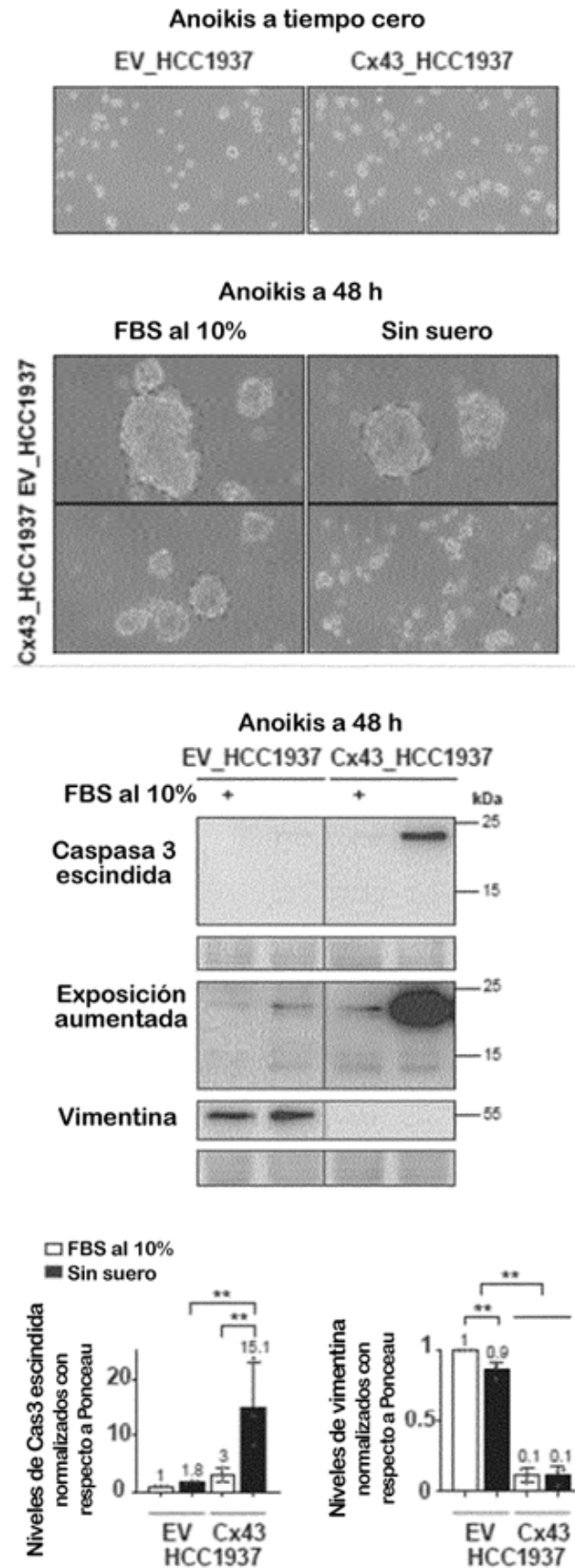


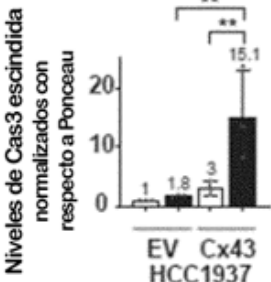
Figura 10 (cont.)

C



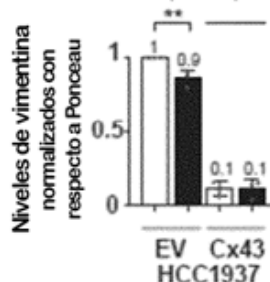
□ FBS al 10%

■ Sin suero



Niveles de Cas3 escindida normalizados con respecto a Ponceau

Condition	EV_HCC1937	Cx43_HCC1937
FBS al 10%	1	1.8
Sin suero	3	15.1

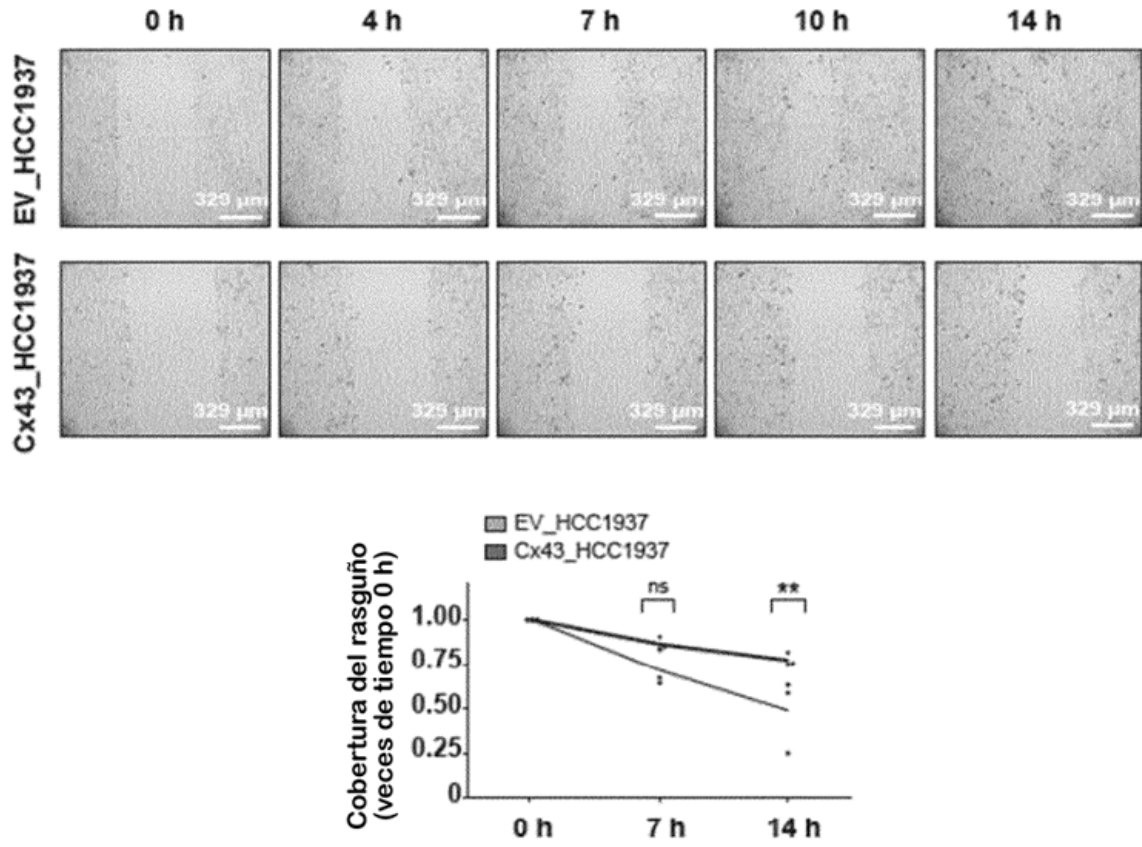


Niveles de vimentina normalizados con respecto a Ponceau

Condition	EV_HCC1937	Cx43_HCC1937
FBS al 10%	1	0.9
Sin suero	0.1	0.1

Figura10 (cont.)

D



E

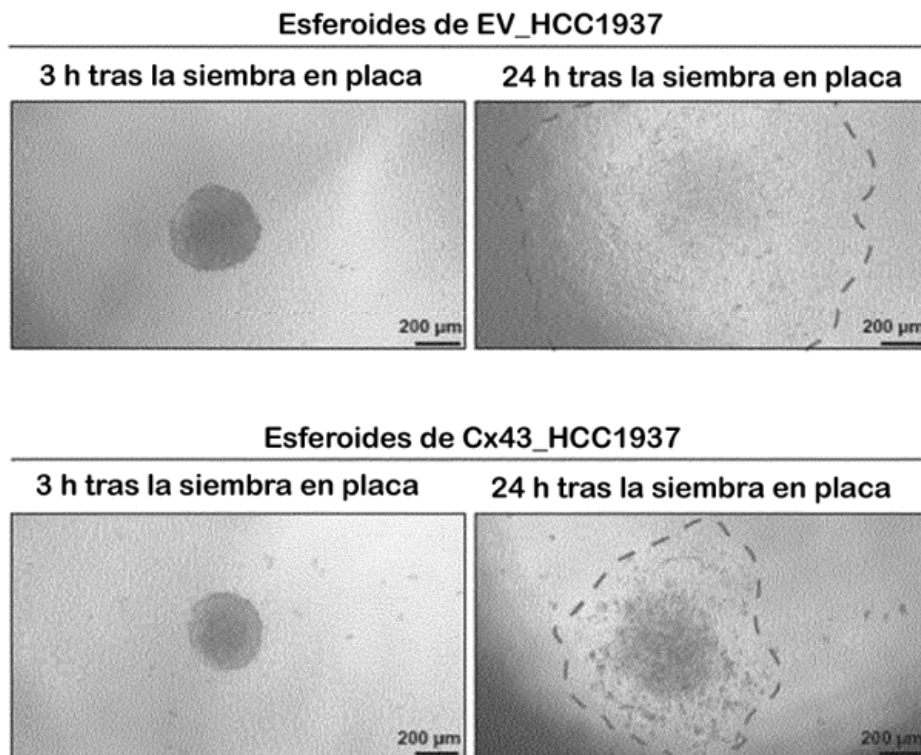


Figura 10 E (cont.)

