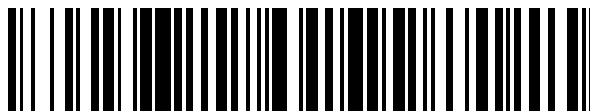


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 792 150**

21 Número de solicitud: 201930398

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

06.05.2019

43 Fecha de publicación de la solicitud:

10.11.2020

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN E
INNOVACIÓN BIOSANITARIA PRINCIPADO DE
ASTURIAS (100.0%)
Avenida Roma s/n
33011 Oviedo (Asturias) ES**

72 Inventor/es:

**CHIARA ROMERO, María Dolores;
BERNARDO CASTIÑEIRA, Cristóbal y
VALDÉS GALLEGO, Nuria**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **MÉTODO PARA PREDECIR Y/O DIAGNOSTICAR LA METÁSTASIS DEL CÁNCER**

57 Resumen:

Método para predecir y/o diagnosticar la metástasis del cáncer.

La invención hace referencia a un método in vitro para diagnosticar y/o pronosticar la metástasis del cáncer en un sujeto que padece de cáncer, o para predecir la supervivencia global de un sujeto que padece de cáncer, que comprende determinar los niveles de metilación, o los niveles de expresión, del promotor de un gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas en una muestra de dicho sujeto. La invención también hace referencia a un agente inhibidor de la actividad de una proteína codificada por un gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas, para su uso en el tratamiento y/o prevención de la metástasis del cáncer.

ES 2 792 150 A1

DESCRIPCIÓN

Método para predecir y/o diagnosticar la metástasis del cáncer

5 La invención se refiere a un método *in vitro* para diagnosticar y/o pronosticar la metástasis del cáncer en un sujeto que padece dicho cáncer, o para predecir la supervivencia global de un sujeto que padece de cáncer, además de a un agente inhibidor de la actividad de una proteína codificada por un gen que pertenece al cluster (o grupo) de genes de las protocadherinas para su uso en el tratamiento y/o la
10 prevención de la metástasis del cáncer en un sujeto. Por tanto, la presente invención pertenece al campo del tratamiento y el diagnóstico del cáncer.

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 La deficiencia del complejo II mitocondrial, la succinato deshidrogenasa (SDH), se asocia frecuentemente con el desarrollo de tumores, especialmente feocromocitomas y paragangliomas (PPGL). Los PPGL son tumores neuroendocrinos raros que se originan en el tejido paragangliónico difuso y en la glándula suprarrenal, respectivamente. Aproximadamente el 40% de estos tumores son hereditarios y están
20 relacionados con mutaciones en la línea germinal en SDHB, SDHC, SDHA, SDHD y SDHAF2 (en conjunto SDHx), además de RET, VHL, NF1, TMEM127, MAX, FH, KIF1B y EGLN1 entre otros. Una de las peculiaridades de los PPGL es que son generalmente tumores de crecimiento lento e indolentes (de bajo riesgo). Sin embargo, el 10-30% de los PPGL producen metástasis, habitualmente varios años o incluso
25 décadas después del primer diagnóstico; y una vez que ocurre la metástasis, las opciones de tratamiento son bastante limitadas. Actualmente, no se han establecido criterios clínicos o histopatológicos basados en la evidencia que distingan los tumores malignos de los benignos, y la aparición de metástasis es la única evidencia de PPGL malignos. Otra peculiaridad es que el resultado de los PPGL metastásicos (mePPGLs)
30 es sumamente variable; algunos pacientes permanecen clínicamente estables durante décadas, mientras que otros experimentan una enfermedad de progresión rápida, y no existen marcadores de pronóstico fiables para identificar los pacientes con un riesgo más elevado de una enfermedad agresiva.

35 Actualmente, la presencia de mutaciones inactivantes en la línea germinal en el gen SDHB es, con mucho, la herramienta de predicción molecular de malignidad más

importante. Aunque se han observado mutaciones en otros genes de predisposición a PPGL, tales como FH, SDHC, SDHD, SDHA y TMEM127 en pacientes con mePPGL, estas mutaciones representan únicamente <5% de los casos, convirtiendo la mutación en la línea germinal de los genes SDHB en el único factor de riesgo para la metástasis
 5 fiable. Las mutaciones en la línea germinal del gen SDHB se encuentran en más del 40% de pacientes con mePPGL (especialmente tumores extra-adrenales, es decir, fuera de la médula suprarrenal) y aproximadamente el 50% de los pacientes con mutaciones en SDHB desarrollan metástasis asociada con tasas de supervivencia de corta duración. A pesar de los extensos esfuerzos de investigación, la forma en la que
 10 las células tumorales deficientes en SDHB adquieren la capacidad de colonizar órganos distantes sigue siendo una cuestión central en el campo y un desafío que debe ser superado para lograr una mejor gestión clínica. Este problema subraya la apremiante necesidad de pruebas moleculares novedosas y eficientes que permitan una mejora en el pronóstico y terapias personalizadas.

15

Se cree que la pérdida del complejo SDH funcional causa un estado pseudohipóxico caracterizado por la estabilización post-traducciona l de los factores inducibles por hipoxia HIF-1 α y HIF-2 α , lo que conduce a un aumento de la expresión de los factores angiogénicos, de crecimiento y mitogénicos. Sin embargo, no se ha establecido una
 20 distinción cuantitativa o cualitativa clara y definitiva entre las vías de señalización de la hipoxia en PPGL benignos (bPPGL) y mePPGL. Además, no se conoce si la estabilización de HIF- α difiere entre los SDHB-PPGL y los tumores portadores de mutaciones en otros genes SDHx. Existen también pruebas cada vez más concluyentes de la implicación crítica de genes silenciados epigenéticamente en la
 25 iniciación de los SDHx-PPGL (Oishi T, et al. 2017. *J Clin Transl Endocrinol.* 7:12–20; de Cubas AA, et al. 2015. *Clin Cancer Res.*, 21:3020–3030; Letouzé E, et al. 2013, *Cancer Cell.*, 23:739–752; Lorient C, et al. 2012, *J Clin Endocrinol Metab.*, 97:E954-E962). El estudio de los perfiles de la metilación de ADN ha permitido descubrir un fenotipo hiper-metilador en los SDHx-PPGL y ha revelado que el succinato actúa como
 30 un oncometabolito, que inhibe las dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato (OG), tal como histona y ADN-demetilasas. Algunos de los cambios epigenéticos identificados se asocian a varias características de los SDHx-PPGL. Por ejemplo, el silenciamiento de genes implicados en la diferenciación de células neuroendocrinas, tales como PNMT, conlleva el fenotipo secretor noradrenérgico de los SDHx-PPGL, la
 35 hipermetilación del gen KRT19 contribuye a la activación de la transición epitelial a mesenquimal que se observa en los SDHB-mePPGL, y se ha observado

hipermetilación del gen RDBP en los mePPGL, aunque este cambio resultó ser independiente de los antecedentes genéticos de los tumores. No obstante, la información disponible en referencia al papel de los rasgos epigenéticos en el desarrollo metastásico del cáncer, en particular, de los SDHB-PPGL es aún escasa.

5

Por lo tanto, existe la necesidad en el estado de la técnica de encontrar nuevos biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico de la metástasis del cáncer, además de una diana de utilidad para el tratamiento y prevención de la metástasis del cáncer.

10 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los inventores de la presente invención han descubierto que los niveles de metilación del ADN son significativamente más elevados en el cáncer metastásico, específicamente, en los SDHB-PPGLs metastásicos que en el cáncer sin metástasis.

15

El cambio en los niveles de metilación del ADN incluye una metilación *de novo* a largo plazo de los cluster de genes de las protocadherinas *PCDHA*, *PCDHB* y *PCDHG*. La metilación de uno de estos genes, *PCDHGC3*, se validó adicionalmente y se observó que es de significancia clínica. Se validaron altos niveles de metilación del promotor de *PCDHGC3* en SDHB-PPGL metastásicos primarios, y se observó que se amplificaban en las correspondientes metástasis, estando correlacionados de forma significativa con una expresión reducida de *PCDHGC3*. De forma interesante, esta alteración epigenética pudo detectarse en tumores primarios que desarrollaron metástasis varios años después. También se muestra que la regulación por disminución de *PCDHGC3* promueve capacidades de iniciación de la metástasis tales como la proliferación, la migración y la invasión celular.

20
25

La presente invención proporciona la primera evidencia de una función de un gen *PCDH* en la patogénesis de un tumor de origen neuroendocrino. Se observan mutaciones somáticas y en la línea germinal en *SDHB* en un número creciente de neoplasmas, incluyendo tumores estromales gastrointestinales, tumores neuroendocrinos pancreáticos, ganglioneuromas y carcinomas de células renales. Fundamentalmente, la deficiencia de SDH en estos tumores tiene implicaciones pronósticas importantes. Los datos que se muestran aquí sugieren que la metilación *de novo* del gen *PCDHGC3* de las protocadherinas tiene una función en el fenotipo metastásico del cáncer, en particular, en los SDHB-PPGL, y, por tanto, podría ser de utilidad como herramienta para identificar pacientes con un riesgo más elevado de

30
35

desarrollar una enfermedad metastásica y como un marcador de pronóstico en los PPGL y otros tipos de cáncer relacionados con *SDHB*. Estos resultados proporcionan una diana novedosa para la terapia molecular y podrían tener importantes implicaciones clínicas para diseñar un seguimiento clínico y un tratamiento en el

5 cáncer asociado a *SDHB*.

Método de la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a un método *in vitro* para el diagnóstico

10 y/o pronóstico de la metástasis del cáncer en un sujeto que padece cáncer, o para predecir los resultados clínicos de un sujeto que padece cáncer, o para determinar la respuesta de un sujeto a una terapia, de aquí en adelante “método de la invención”, que comprende

a) determinar los niveles de metilación del promotor, o los niveles de expresión, de un

15 gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas en una muestra de dicho sujeto, y

b) comparar los niveles de metilación, o los niveles de expresión, obtenidos en la etapa a) con un valor de referencia,

en donde

- 20 - si los niveles de metilación obtenidos en la etapa (a) son superiores a los niveles de metilación del valor de referencia, o
- los niveles de expresión en la etapa (a) son inferiores a los niveles de expresión del valor de referencia, entonces
- (i) el tumor PPGL es un tumor metastásico, o es propenso a desarrollar
- 25 metástasis,
- (ii) el pronóstico, los resultados clínicos, y/o la respuesta del sujeto a la terapia es negativa.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término “diagnosticar” hace referencia a

30 la identificación de la naturaleza de una dolencia, enfermedad u otro problema mediante examen de los síntomas, parámetros o biomarcadores en un sujeto. En el contexto de la presente invención, el parámetro requerido para el diagnóstico es los niveles de metilación, o los niveles de expresión, de un gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas en una muestra del sujeto.

35

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “pronóstico” hace referencia al proceso de predecir la probabilidad o el desarrollo esperado de una enfermedad (en el presente caso metástasis), que incluye si los signos y síntomas mejorarán o empeorarán (y cómo de rápido) o permanecerán estables en el tiempo. El término “predicción” se utiliza en el presente documento para hacer referencia a la probabilidad de que un paciente tenga unos resultados clínicos en particular. Tal como se explicará más adelante, los resultados clínicos pueden ser positivos o negativos. Los métodos predictivos de la presente invención pueden ser utilizados clínicamente para tomar decisiones sobre el tratamiento eligiendo las modalidades de tratamiento más apropiadas para cualquier paciente en particular. El método predictivo de la presente invención es una herramienta valiosa a la hora de predecir si un paciente es susceptible de responder favorablemente a un régimen de tratamiento.

En el contexto de la presente invención, la expresión “el pronóstico del sujeto es negativo” significa que el tumor del sujeto es un tumor maligno que va a sufrir metástasis. Por el contrario, la expresión “El pronóstico del sujeto es positivo” significa que el tumor es un tumor benigno que no va a sufrir metástasis. Tal como se utiliza en el presente documento, los términos “cáncer” y “tumor” se consideran equivalentes.

En la presente invención la expresión “resultados clínicos” se entiende como el curso esperado de una enfermedad. Denota la predicción del doctor de cómo la enfermedad de un sujeto progresará, y si existe una posibilidad de recuperación o de recurrencia.

El término “resultados clínicos negativos” o “mal pronóstico” significa una disminución en cualquier medición del estado del paciente, incluyendo aquellas mediciones que se utilizan de forma ordinaria en la técnica, tales como la duración del intervalo libre de recurrencia (ILR), el tiempo de supervivencia global (SG), supervivencia libre de enfermedad (SLE), la duración de intervalo libre de recurrencia distante (ILRD), y similar. Un aumento en la probabilidad de los resultados clínicos positivos corresponde a una disminución en la probabilidad de la metástasis del cáncer.

La predicción de los resultados clínicos puede realizarse utilizando cualquier medición de los criterios de valoración utilizados en oncología y conocidos por el médico especialista. Los parámetros de los criterios de valoración útiles para describir la evolución de una enfermedad incluyen:

- progresión libre de enfermedad que, tal como se utiliza en la presente memoria, describe la proporción de sujetos en remisión completa que no han tenido recurrencia de la enfermedad durante el periodo de tiempo en estudio;
 - 5 • una respuesta objetiva, que, tal como se utiliza en la presente invención, describe la proporción de personas tratadas en las que se observa una respuesta completa o parcial;
 - control del tumor, que, tal como se utiliza en la presente invención, hace referencia a la proporción de personas tratadas en las que se observa una respuesta completa, una respuesta parcial, una respuesta menor o una enfermedad estable ≥ 6 meses.
 - 10 • supervivencia libre de progresión que, tal como se utiliza en la presente memoria, se define como el tiempo desde el inicio del tratamiento hasta la primera medición del crecimiento del cáncer.
 - supervivencia libre de progresión de seis meses o una tasa “SLP6” que, tal como se utiliza en la presente memoria, hace referencia al porcentaje de gente que están libres de progresión en los primeros seis meses después del inicio de la terapia
 - 15 • “supervivencia libre de enfermedad” (SLE) se entiende como la duración de tiempo después del tratamiento para una enfermedad específica durante el cual un sujeto sobrevive sin signos de la enfermedad, y
 - 20 • la mediana de la supervivencia que, tal como se utiliza en la presente memoria, hace referencia al momento en el cual la mitad de los sujetos entraron en el estudio.
- 25 En una realización particular, los resultados clínicos se miden como la supervivencia global.

En la presente invención, el término “supervivencia global” (también denominada SG) hace referencia a la duración de tiempo a partir de o bien la fecha del diagnóstico o bien el inicio del tratamiento de una enfermedad, tal como el cáncer, en que los pacientes diagnosticados con la enfermedad están aún vivos. En un ensayo clínico, medir la supervivencia global es una manera de ver cómo de bien funciona un nuevo tratamiento.

30

El cálculo de las medidas detalladas anteriormente en la práctica puede variar de un estudio a otro estudio dependiendo de que la definición de eventos sea censurada o no se considere.

- 5 La expresión “determinar la respuesta de un sujeto a una terapia” hace referencia a la evaluación de los resultados de una terapia en un paciente con cáncer en respuesta a una terapia. La respuesta del sujeto a la terapia puede ser negativa (el sujeto no responde a la terapia) o positiva (el sujeto responde a la terapia).
- 10 En la presente invención, se considera que un sujeto tiene una “respuesta negativa a la terapia” o “no responde a la terapia” cuando, durante e inmediatamente después del tratamiento, la reducción en el tamaño del tumor es menor del 25%, el tumor se estabiliza o el tumor sigue creciendo sin verse afectado por la terapia, sufriendo metástasis y alcanzando otros órganos. Por el contrario, se considera que un sujeto
- 15 tiene una “respuesta positiva a la terapia” o “responde a la terapia” cuando la reducción en el tamaño del tumor es de más del 25%, o el tumor no es detectable o el tumor permanece estable y no sufre metástasis. Una respuesta negativa del sujeto a la terapia significa que la terapia administrada no está siendo efectiva. Hay disponible una gran cantidad de tratamientos para afrontar la metástasis del cáncer y cualquiera
- 20 de ellos puede utilizarse en el contexto de la presente invención.

En el contexto de la presente invención, “metástasis” se entiende como la propagación de un tumor o cáncer del órgano donde comenzó a un órgano diferente. Generalmente ocurre a través de la sangre o del sistema linfático. Cuando las células cancerígenas

25 se extienden y forman un nuevo tumor, este último se denomina tumor secundario o metastásico. Las células cancerígenas que forman el tumor secundario son como las del tumor original. Si un cáncer de pulmón, por ejemplo, se extiende (produce metástasis) al hueso, el tumor secundario se forma de células malignas del cáncer de pulmón. La enfermedad en el hueso es cáncer de pulmón metastásico y no cáncer de

30 huesos.

En una primera etapa, el método de la invención comprende determinar los niveles de metilación del promotor de un gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas en una muestra de un sujeto.

35

Se considera que el término “metilación” significa la presencia de un grupo metilo añadido por la acción de una enzima ADN-metiltransferasa a una base o bases de citosina en una región del ácido nucleico, por ejemplo ADN genómico. Tal como se describe en la presente memoria, existen diversos métodos conocidos por los expertos
5 en la técnica para determinar el nivel o el grado de metilación de un ácido nucleico.

Cualquier método para detectar la metilación de ADN puede ser utilizado en los métodos de la presente invención. Una cantidad de métodos están disponibles para la detección de ADN metilado diferencialmente en loci específicos bien en muestras de
10 tejido primario o bien en muestras de pacientes tales como sangre, orina, heces o saliva. Para un análisis de la proporción o el grado de metilación de ADN en un gen diana, el ADN se trata habitualmente con bisulfito de sodio y las regiones de interés son amplificadas utilizando cebadores y condiciones de PCR que amplificarán independientemente del estado de metilación del ADN. La metilación del amplicón
15 general o de los sitios CpG individuales puede entonces ser evaluada mediante secuenciación, incluyendo pirosecuenciación, digestión de la enzima de restricción (COBRA) o mediante análisis de curvas de fusión. De forma alternativa, pueden utilizarse métodos basados en ligamiento para el análisis de la metilación en sitios CpG específicos. Se está desarrollando la detección de ADN metilado de forma
20 aberrante liberado a partir de tumores y en los fluidos corporales como un medio para el diagnóstico del cáncer. En el caso de secuencias hipermetiladas, es necesario utilizar métodos sensibles que permiten la amplificación selectiva de la secuencia de ADN metilado a partir de un antecedente de ADN celular normal que no está metilado. Dichos métodos basados en ADN tratado con bisulfito, por ejemplo; incluyen PCR
25 selectiva de metilación (MSP), PCR *Heavymethyl*, PCR *Headloop* y reacción en cadena dependiente del auxiliar.

Brevemente, los métodos para detectar la metilación incluyen, sin limitarse a, cizallamiento aleatorio o fragmentación aleatoria del ADN genómico, el corte del ADN
30 con una enzima de restricción sensible a la metilación o dependiente de metilación y posteriormente identificar y/o analizar de forma selectiva el ADN cortado o sin cortar. La identificación selectiva puede incluir, por ejemplo, separar el ADN cortado y sin cortar (por ejemplo, por tamaño) y cuantificar una secuencia de interés que se cortó o, alternativamente, que no fue cortada. De forma alternativa, el método puede abarcar
35 amplificar ADN intacto después de la enzima de restricción, amplificando de ese modo únicamente el ADN que no fue escindido por la enzima de restricción en el área

amplificada. En algunas realizaciones, la amplificación puede ser realizada utilizando cebadores que son específicos de los genes. De forma alternativa, pueden añadirse adaptadores a los extremos del ADN fragmentado de forma aleatoria, el ADN puede ser digerido con una enzima de restricción dependiente de metilación o sensible a la metilación, el ADN intacto puede ser amplificado utilizando cebadores que hibridan con las secuencias de los adaptadores. En este caso, puede realizarse una segunda etapa para determinar la presencia, ausencia o cantidad de un gen en particular en un pool de ADN amplificado. En algunas realizaciones, el ADN es amplificado utilizando PCR cuantitativa en tiempo real.

10

En algunas realizaciones, los métodos comprenden cuantificar la densidad media de metilación en una secuencia diana dentro de una población de ADN genómico. En algunas realizaciones, el método comprende poner en contacto ADN genómico con una enzima de restricción dependiente de metilación o una enzima de restricción sensible a la metilación bajo condiciones que permiten que al menos algunas copias de los sitios de escisión potenciales de la enzima de restricción en el locus permanezcan sin escindir; cuantificar copias intactas del locus; y comparar la cantidad del producto amplificado con un valor de control que representa la cantidad de metilación del ADN de control, cuantificando de este modo la densidad media de metilación en el locus en comparación con la densidad de metilación del ADN de control.

20

La cantidad de metilación de un locus de ADN puede determinarse proporcionando una muestra de ADN genómico que comprende el locus, escindiendo el ADN con una enzima de restricción que es o bien sensible a la metilación o bien dependiente de metilación, y a continuación cuantificando la cantidad de ADN intacto o cuantificando la cantidad de ADN cortado en el locus del ADN de interés. La cantidad de ADN intacto o cortado dependerá de la cantidad inicial de ADN genómico que contiene el locus, la cantidad de metilación en el locus, y el número (es decir, la fracción) de nucleótidos en el locus que se metilan en el ADN genómico. La cantidad de metilación en un locus de ADN puede determinarse comparando la cantidad de ADN intacto o ADN cortado con un valor de control que representa la cantidad de ADN intacto o ADN cortado en una muestra de ADN tratada de forma similar. El valor de control puede representar un número conocido o previsto de nucleótidos metilados. De forma alternativa, el valor de control puede representar la cantidad de ADN intacto o cortado del mismo locus en otra célula (por ejemplo, normal, no enferma) o en un segundo locus.

30

35

Utilizando al menos una enzima de restricción sensible a la metilación o dependiente de metilación bajo condiciones que permiten que al menos algunas copias de los sitios potenciales de escisión de la enzima de restricción en el locus permanezcan sin escindir, y posteriormente cuantificando las copias intactas restantes y comparando la cantidad con un control, puede determinarse la densidad media de metilación de un locus. Una enzima sensible a la metilación es una que corta el ADN si su secuencia de reconocimiento no está metilada, mientras que una enzima dependiente de metilación corta el ADN si su secuencia de reconocimiento está metilada. Si la enzima de restricción entra en contacto con las copias de un locus de ADN bajo condiciones que permiten que al menos algunas copias de los sitios de escisión potenciales de la enzima de restricción en el locus permanezcan sin escindir, entonces el resto del ADN intacto será directamente proporcional a la densidad de metilación, y por tanto puede compararse con un control para determinar la densidad de metilación relativa del locus en la muestra. De forma similar, si una enzima dependiente de metilación se pone en contacto con unas copias del locus de ADN bajo condiciones que permitan que al menos algunas copias de los sitios de escisión potenciales de la enzima de restricción en el locus permanezcan sin escindir, entonces el resto del ADN intacto será inversamente proporcional a la densidad de metilación, y por tanto puede compararse con un control para determinar la densidad de metilación relativa del locus en la muestra.

Los kits para los métodos anteriores pueden incluir por ejemplo, una o más enzimas de restricción dependientes de metilación, enzimas de restricción sensibles a la metilación, reactivos, sondas y/o cebadores de amplificación (por ejemplo, por PCR).

Métodos de amplificación (por ejemplo, PCR cuantitativa o amplificación lineal cuantitativa) puede ser utilizada para cuantificar la cantidad de ADN intacto dentro de un locus flanqueado por cebadores de amplificación a continuación de la digestión de restricción. Los métodos de amplificación cuantitativa son ampliamente conocidas en el estado de la técnica. Las amplificaciones pueden monitorizarse en "tiempo real".

Los métodos adicionales para detectar la metilación de ADN pueden implicar una secuenciación genómica antes y después del tratamiento del ADN con bisulfito. Cuando se pone en contacto bisulfito de sodio con el ADN, la citosina no metilada se convierte en uracilo, mientras que la citosina metilada no se modifica. En algunas

realizaciones, la digestión de la enzima de restricción de los productos de PCR amplificados a partir de ADN convertido con bisulfito se utiliza para detectar la metilación del ADN.

- 5 Una reacción por PCR específica de metilación (“MSP”) puede utilizarse sola o en combinación con otros métodos para detectar la metilación del ADN. Un ensayo de MSP conlleva la modificación inicial del ADN por bisulfito de sodio, convirtiendo todas las citosinas no metiladas, pero no las metiladas, a uracilo, y la posterior amplificación con cebadores específicos para ADN metilado versus no metilado. De igual manera,
- 10 puede utilizarse un ensayo *MethyLight* solo o en combinación con otros métodos para detectar la metilación del ADN. Brevemente, en el proceso *MethyLight* el ADN genómico se convierte en una reacción de bisulfito de sodio (el proceso de bisulfito convierte los residuos de citosina no metilados en uracilo). La amplificación de una secuencia de ADN de interés se realiza entonces utilizando cebadores de PCR que
- 15 hibridan a dinucleótidos CpG. Utilizando cebadores que hibridan solamente a secuencias que son el resultado de la conversión de bisulfito del ADN metilado, (o alternativamente a secuencias no metiladas), la amplificación puede indicar el estado de metilación de las secuencias en las que los cebadores hibridan. Además, el producto de amplificación puede ser detectado con una sonda que específicamente se
- 20 une a una secuencia que es el resultado del tratamiento con bisulfito de un ADN no metilado. Si se desea, se pueden utilizar tanto cebadores como sondas para detectar el estado de metilación. Por tanto, los kits para su uso con *MethyLight* puede incluir bisulfito de sodio además de cebadores o sondas marcadas de forma que puedan detectarse (incluyendo, pero sin limitarse a, sondas *Taqman* o de balizas moleculares)
- 25 que distinguen entre ADN metilado y no metilado que han sido tratados con bisulfito. Otros componentes de los kits pueden incluir, por ejemplo, reactivos necesarios para la amplificación del ADN, incluyendo pero sin limitarse a, tampones para PCR, desoxinucleótidos; y una polimerasa termoestable.
- 30 Una reacción Ms-SNuPE (extensión de los cebadores del nucleótido simple sensible a la metilación, del inglés “*Methylation-sensitive Single Nucleotide Primer Extension*”) puede ser utilizada sola o en combinación con otros métodos para detectar la metilación del ADN. La técnica de Ms-SNuPE es un método cuantitativo para evaluar las diferencias de metilación en sitios CpG específicos en base al tratamiento con
- 35 bisulfito del tratamiento del ADN, seguido por una extensión de cebador de nucleótido único. Brevemente, el ADN genómico se hace reaccionar con bisulfito de sodio para

convertir la citosina no metilada en uracilo mientras se deja la 5-metilcitosina sin modificar. La amplificación de la secuencia diana deseada se realiza a continuación utilizando cebadores de PCR específicos para ADN convertido con bisulfito, y el producto resultante es aislado y utilizado como un modelo para el análisis de la metilación en el sitio o sitios CpG de interés.

Cualquiera de las técnicas mencionadas anteriormente puede ser utilizada para determinar los niveles de metilación del promotor de un gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas en una muestra del sujeto, según se divulga en la primera etapa del método de la invención.

Las protocadherinas (PCDH), que son expresadas predominantemente en el sistema nervioso, constituyen la familia más grande de la superfamilia de las cadherinas de las moléculas de adhesión celular. En los mamíferos, se han definido dos tipos de genes PCDH: los genes PCDH no agrupados, que se esparcen por el genoma; y los genes PCDH agrupados, que se organizan en tres cluster génicos estrechamente enlazados designados como α , β y γ . Por tanto, tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "cluster de genes de las protocadherinas (PCDH)" hace referencia a un conjunto de genes que se organizan en tres cluster de genes estrechamente enlazados, designados como α (PCDHA), β (PCDHB) y γ (PCDHG). También se mostró que los elementos de la familia de genes PCDH son mediadores en la adhesión célula-célula en ensayos basados en células. En una realización particular, el cluster de genes de las PCDH es el cluster de genes PCDHA, cluster de genes PCDHB, o el cluster de genes PCDHG.

Entre los ejemplos de genes que pertenecen al cluster de genes PCDHA se incluyen, sin limitarse a, PCDHA@ [cluster de protocadherinas alfa, locus complejo; HGNC ID: HGNC:8662, chr. 5q31], PCDHACT [constante de las protocadherinas alfa, HGNC ID: HGNC:8678, chr. 5q31], PCDHAC1 [subfamilia de las protocadherinas alfa C, 1; HGNC ID: HGNC:8676, chr. 5q31.3], PCDHAC2 [subfamilia de las protocadherinas alfa C, 2; HGNC ID: HGNC:8677, chr. 5q31.3], PCDHA1 [protocadherina alfa 1; HGNC ID: HGNC:8663, chr. 5q31.3], PCDHA2 [protocadherina alfa 2; HGNC ID: HGNC:8668, chr. 5q31.3], PCDHA3 [protocadherina alfa 3; HGNC ID: HGNC:8669, chr. 5q31.3], PCDHA4 [protocadherina alfa 4; HGNC ID: HGNC:8670, chr. 5q31.3], PCDHA5 [protocadherina alfa 5; HGNC ID: HGNC:8671, chr. 5q31.3], PCDHA6 [protocadherina alfa 6; HGNC ID: HGNC:8672, chr. 5q31.3], PCDHA7 [protocadherina alfa 7; HGNC

ID: HGNC:8673, chr. 5q31.3], PCDHA8 [protocadherina alfa 8; HGNC ID: HGNC:8674, chr. 5q31.3], PCDHA8 [protocadherina alfa 8; HGNC ID: HGNC:8674, chr. 5q31.3], PCDHA9 [protocadherina alfa 9; HGNC ID: HGNC:8675, chr. 5q31.3], PCDHA10 [protocadherina alfa 10; HGNC ID: HGNC:8664, chr. 5q31.3], PCDHA11
 5 [protocadherina alfa 11; HGNC ID: HGNC:8665, chr. 5q31.3], PCDHA12 [protocadherina alfa 12; HGNC ID: HGNC:8666, chr. 5q31.3], PCDHA13 [protocadherina alfa 13; HGNC ID: HGNC:8667, chr. 5q31.3], o PCDHA14 [pseudogen de la protocadherina alfa 14; HGNC ID: HGNC:2163, chr. 5q31.3].

10 Entre los ejemplos de genes que pertenecen al cluster de genes de las PCDHB se incluyen, sin limitarse a, PCDHB@ [cluster de protocadherinas beta; HGNC ID: HGNC:8679; chr. 5q31], PCDHB1 [protocadherina beta 1; HGNC ID: HGNC:8680; chr. 5q31.3], PCDHB2 [protocadherina beta 2; HGNC ID: HGNC:8687; chr. 5q31.3], PCDHB3 [protocadherina beta 3; HGNC ID: HGNC:8688; chr. 5q31.3], PCDHB4
 15 [protocadherina beta 4; HGNC ID: HGNC:8689; chr. 5q31.3], PCDHB5 [protocadherina beta 5; HGNC ID: HGNC:8690; chr. 5q31.3], PCDHB6 [protocadherina beta 6; HGNC ID: HGNC:8691; chr. 5q31.3], PCDHB7 [protocadherina beta 7; HGNC ID: HGNC:8692; chr. 5q31.3], PCDHB8 [protocadherina beta 8; HGNC ID: HGNC:8693; chr. 5q31.3], PCDHB9 [protocadherina beta 9; HGNC ID: HGNC:8694; chr. 5q31.3],
 20 PCDHB10 [protocadherina beta 10; HGNC ID: HGNC:8681; chr. 5q31.3], PCDHB11 [protocadherina beta 11; HGNC ID: HGNC:8682; chr. 5q31.3], PCDHB12 [protocadherina beta 12; HGNC ID: HGNC:8683; chr. 5q31.3], PCDHB13 [protocadherina beta 13; HGNC ID: HGNC:8684; chr. 5q31.3], PCDHB14 [protocadherina beta 14; HGNC ID: HGNC:8685; chr. 5q31.3], PCDHB15
 25 [protocadherina beta 15; HGNC ID: HGNC:8686; chr. 5q31.3], PCDHB16 [protocadherina beta 16; HGNC ID: HGNC:14546; chr. 5q31.3], PCDHB17P [pseudogen de protocadherina beta 17; HGNC ID: HGNC:14547; chr. 5q31.3], PCDHB18P [pseudogen de protocadherina beta 18; HGNC ID: HGNC:14548; chr. 5q31.3] o PCDHB19P [pseudogen de protocadherina beta 19; HGNC ID:
 30 HGNC:14549; chr. 5q31.3].

Ejemplos de genes que pertenecen al cluster de genes de las PCDHG incluyen, sin limitarse a, PCDHG@ [cluster de protocadherinas gamma; HGNC ID: HGNC:8679; chr. 5q31], PCDHGA1 [subfamilia de las protocadherinas gamma A, 1; HGNC ID:
 35 HGNC:8696; chr. 5q31.3], PCDHGA2 [subfamilia de las protocadherinas gamma A, 2; HGNC ID: HGNC:8700; chr. 5q31.3], PCDHGA3 [subfamilia de las protocadherinas

gamma A, 3; HGNC ID: HGNC:8701; chr. 5q31.3], PCDHGA4 [subfamilia de las
 protocadherinas gamma A, 4; HGNC ID: HGNC:8702; chr. 5q31.3], PCDHGA5
 [subfamilia de las protocadherinas gamma A, 5; HGNC ID: HGNC:8703; chr. 5q31.3],
 PCDHGA6 [subfamilia de las protocadherinas gamma A, 6; HGNC ID: HGNC:8704;
 5 chr. 5q31.3], PCDHGA7 [subfamilia de las protocadherinas gamma A, 7; HGNC ID:
 HGNC:8705; chr. 5q31.3], PCDHGA8 [subfamilia de las protocadherinas gamma A, 8;
 HGNC ID: HGNC:8706; chr. 5q31.3], PCDHGA9 [subfamilia de las protocadherinas
 gamma A, 9; HGNC ID: HGNC:8707; chr. 5q31.3], PCDHGA10 [subfamilia de las
 protocadherinas gamma A, 10; HGNC ID: HGNC:8697; chr. 5q31.3], PCDHGA11
 10 [subfamilia de las protocadherinas gamma A, 11; HGNC ID: HGNC:8698; chr. 5q31.3],
 PCDHGA12 [subfamilia de las protocadherinas gamma A, 12; HGNC ID: HGNC:8699;
 chr. 5q31.3], PCDHGB1 [subfamilia de las protocadherinas gamma B, 1; HGNC ID:
 HGNC:8708; chr. 5q31], PCDHGB2 [subfamilia de protocadherinas gamma B, 2;
 HGNC ID: HGNC:8709; chr. 5q31], PCDHGB3 [subfamilia de protocadherinas gamma
 15 B, 3; HGNC ID: HGNC:8710; chr. 5q31], PCDHGB4 [subfamilia de protocadherinas
 gamma B, 4; HGNC ID: HGNC:8711; chr. 5q31], PCDHGB5 [subfamilia de
 protocadherinas gamma B, 5; HGNC ID: HGNC:8712; chr. 5q31], PCDHGB6
 [subfamilia de protocadherinas gamma B, 6; HGNC ID: HGNC:8713; chr. 5q31],
 PCDHGB7 [subfamilia de protocadherinas gamma B, 7; HGNC ID: HGNC:8714; chr.
 20 5q31], PCDHGB8P [pseudogen de la subfamilia de protocadherinas gamma B, 8;
 HGNC ID: HGNC:8715; chr. 5q31], PCDHGB9P [pseudogen de la subfamilia de las
 protocadherinas gamma B, 9; HGNC ID: HGNC:15688; chr. 5q31], PCDHGCT
 [constante de protocadherina gamma; HGNC ID: HGNC:8719; chr. 5q31], PCDHGC3
 [subfamilia de protocadherinas gamma C, 3; HGNC ID: HGNC:8716; chr. 5q31.3],
 25 PCDHGC4 [subfamilia de protocadherinas gamma C, 4; HGNC ID: HGNC:8717; chr.
 5q31.3] o PCDHGC5 [subfamilia de protocadherinas gamma C, 5; HGNC ID:
 HGNC:8718; chr. 5q31.3].

En una realización particular, el gen que pertenece al cluster de genes de
 30 protocadherinas es un gen que pertenece al cluster de genes de las PCDHG que, en
 una realización más particular, el gen es el gen PCDHGC3.

El gen PCDHGC3 (subfamilia de protocadherinas gamma C, 3) es un miembro del
 cluster de genes de las protocadherinas gamma, uno de los tres cluster relacionado
 35 ligados en tándem en el cromosoma cinco. Estos cluster de genes tienen una
 organización de tipo inmunoglobulina, lo que sugiere que un nuevo mecanismo puede

estar implicado en su regulación y expresión. El cluster de genes gamma incluye 22 genes divididos en 3 subfamilias según se divulga anteriormente. La subfamilia A contiene 12 genes, la subfamilia B contiene 7 genes y 2 pseudogenes, y la subfamilia C relacionada de forma más distante, contiene 3 genes. Los alineamientos en tándem de 22 exones de una región variable grande están seguidos por una región constante que contiene 3 exones compartidos por todos los genes en el cluster. Cada exón de la región variable codifica la región extracelular, que incluye 6 ectodominios de cadherina y una región transmembrana. Los exones de la región constante codifican la región citoplasmática común. Muy probablemente estas proteínas de adhesión celular de tipo cadherina neuronal juegan un papel crítico en el establecimiento y la función de conexiones específicas célula-célula en el cerebro. Se ha descrito una escisión alternativa para los genes del cluster gamma. Otros nombres para los genes PCDHGC3 son de tipo cadherina 2, protocadherina 2 y protocadherina 43. Los símbolos PCDH2, PC-43, PC43, y PCDH-GAMMA-C3 pueden también ser utilizados para hacer referencia al gen PCDHGC3. El gen PCDHGC3 se conserva en chimpancé, vaca, ratón, rata y pollo.

En el contexto de la presente invención, los niveles de metilación del promotor de cualquiera de los genes mencionados anteriormente pueden utilizarse en el método de la invención para el diagnóstico y/o el pronóstico de la metástasis del cáncer en un sujeto. No obstante, en una realización particular, se utilizan los niveles de metilación del promotor del gen PCDHGC3. En otra realización particular, el promotor del gen PCDHGC3 comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una identidad de secuencia de, al menos, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % con la secuencia SEQ ID NO: 1.

En la presente invención, se entiende que "identidad" o "identidad de secuencia" hace referencia al grado de similitud entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos obtenidas mediante el alineamiento de las dos secuencias. Dependiendo del número de residuos comunes entre las secuencias alineadas, se obtendrá un grado diferente de identidad, expresado como un porcentaje. El grado de identidad entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse por métodos convencionales, por ejemplo, por algoritmos de alineamiento de secuencias estándar conocidos en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo BLAST [Altschul S.F. et al. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990 Oct 5; 215(3): 403-10]. Los programas de BLAST, por ejemplo, BLASTN, BLASTX, y T BLASTX, BLASTP y TBLASTN, son de

dominio público en el sitio web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information* o NCBI). El experto en la técnica entiende que las mutaciones en la secuencia de nucleótidos de los genes que conducen a sustituciones de aminoácidos conservadoras en posiciones no críticas para la funcionalidad de la proteína, son mutaciones evolutivamente neutrales que no afectan su estructura global o su funcionalidad.

En una realización más particular, el promotor del gen PCDHGC3 comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una identidad de secuencia del 100% con la secuencia SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 1

Ggactctgtgtgccgctgtcggccaatgaagacgctggagatcgggccctgcccttctgcgccccgggatg
aggcagagactgaacagccg¹gcg²agcaaatcaacg³gcatccAGAAAGCCATGTCG⁴GACT
CG⁵GCG⁶CCCAGCG⁷CCCAAGCG⁸CTAACCCGCTGAAAGTTTCTCAGCGAAATCT
CAGGGACGATCTGGACCCCGCTGAGAGGAACTGCTTTTGAGTGAGATGGTCCC
AGAGGCCTGGAGGAGCGGACTGGTAAGCACCGGGAGGGTAGTGGGAGTTTTGC
 TTCTGCTTGGTGCTTGAACAAGGCTTCCACGGTCATTCACTATGAGATCCCGGA
 GGAAAGAGAG

La SEQ ID NO: 1 comprende la región del ADN genómico analizada para detectar la metilación del promotor de PCDHGC3 (en negrita). En letras minúsculas se muestra la región 5' no traducida del gen PCDHGC3, y en letras mayúsculas la secuencia del comienzo del primer exón. El codón de iniciación de la transcripción (ATG) está subrayado. Los sitios CpG metilados se muestran con doble subrayado y se identifican con un número superíndice que corresponde a las siguientes posiciones en el cromosoma 5 del genoma humano (GRCh38:CM000667.2 por Ensembl): 1. chr5:140,855,546; 2. chr5:140,855,549; 3. chr5:140,855,561; 4. chr5:140,855,581; 5. chr5:140,855,587; 6. chr5:140,855,590; 7. chr5:140,855,597; y 8. chr5:140,855,605.

En una realización particular, la etapa a) del método de la invención comprende determinar el estado de metilación de al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho de los sitios CpG de la secuencia SEQ ID NO: 1.

Alternativamente a los niveles de metilación del promotor, etapa a) del método de la invención abarca determinar los niveles de expresión de un gen que pertenece al

cluster de genes de las protocadherinas para diagnosticar y/o predecir (pronosticar) la metástasis del cáncer, y/o predecir los resultados clínicos de un sujeto que padece de cáncer, y/o determinar la respuesta de un sujeto a una terapia.

- 5 El término “expresión” incluye cualquier etapa implicada en la producción de un polipéptido que incluye, pero sin limitarse a, transcripción, modificación post-transcripcional, traducción, modificación post-traducción, y secreción. Por lo tanto, como el experto en la técnica entiende, los niveles de expresión de los genes pueden medirse determinando los niveles de expresión del ARNm de dichos genes o
- 10 determinando los niveles de proteínas codificados por dichos genes.

El nivel de expresión se determina midiendo el nivel de expresión de un gen de interés para una población de pacientes determinada, determinando el nivel de expresión medio de dicho gen para la población, y comparando el nivel de expresión del mismo

15 gen para un único paciente con el nivel de expresión medio para la población de pacientes determinada. Por ejemplo, si se determina que el nivel de expresión de un gen de interés para el paciente individual está por encima del nivel de expresión medio de la población de pacientes, se determina que dicho paciente tiene una expresión elevada del gen de interés. Alternativamente, si se determina que el nivel de expresión

20 de un gen de interés para el paciente individual está por debajo del nivel de expresión medio de la población de pacientes, se determina que dicho paciente tiene una expresión baja del gen de interés. En algunas realizaciones, el paciente individual tiene metástasis del cáncer, y la población de pacientes tiene cáncer pero no metástasis (es decir, un tumor benigno).

25 Tal como se entiende por el experto en la técnica, los niveles de expresión génica pueden ser cuantificados midiendo los niveles del ARN mensajero (ARNm) de dicho gen o de la proteína codificada por dicho gen.

30 Para este propósito, la muestra biológica puede tratarse para romper física o mecánicamente el tejido o la estructura celular, liberando los componentes intracelulares en una solución orgánica para preparar ácidos nucleicos. Los ácidos nucleicos se extraen mediante métodos disponibles en el comercio conocidos por el experto en la técnica.

35

Por tanto, los niveles de expresión de un gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas pueden ser cuantificados a partir del ARN que se obtiene como resultado de la transcripción de dicho gen (ARNm) o, de forma alternativa, a partir del ADN complementario (ADNc) de dicho gen. Por lo tanto, en una realización particular de la invención, la cuantificación de los niveles de expresión de un gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas comprende la cuantificación del ARN mensajero de dicho gen o un fragmento de dicho ARNm, ADN complementario del gen o un fragmento de dicho ADNc o mezclas de los mismos.

10 Prácticamente puede utilizarse cualquier método dentro del alcance de la invención para detectar y cuantificar los niveles de ARNm codificados por el gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas o del correspondiente ADNc de los mismos. A modo de ilustración no limitativa, los niveles de ARNm codificados por dicho gen pueden ser cuantificados utilizando métodos convencionales, por ejemplo, métodos que comprenden amplificación de ARNm y la cuantificación de dicho producto de la amplificación del ARNm, tal como electroforesis y tinción, o alternativamente, mediante ensayo de transferencia de tipo *Southern* y utilizando sondas adecuadas, ensayo de transferencia de tipo *Northern* y utilizando sondas específicas del ARNm del gen de interés (gen que pertenece al cluster de genes de protocadherinas) o del correspondiente ADNc del mismo, mapeo con nucleasa S1, ensayo por RT-PCR, hibridación, micromatrices, etc., preferiblemente mediante PCR cuantitativa en tiempo real utilizando un marcador adecuado. De forma similar, pueden también cuantificarse los niveles de ADNc correspondientes a dicho ARNm codificado por dicho gen mediante la utilización de técnicas convencionales; en este caso, el método de la invención incluye una etapa para sintetizar el correspondiente ADNc mediante transcripción inversa (RT) del correspondiente ARNm seguido de la amplificación y cuantificación de dicho producto de amplificación de ADNc.

En una realización particular, se cuantifican los niveles de expresión del gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa o una matriz de ADN o ARN.

En una realización particular, el gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas es el gen PCDHGC3. El gen PCDHGC3 ha sido explicado anteriormente en los párrafos anteriores. La secuencia de nucleótidos del gen PCDHGC3 puede observarse en el gen: PCDHGC3 ENSG00000240184, versión de

Ensembl ENSG00000240184.7, cuya transcripción da lugar a 3 transcritos, donde cada uno codifica una isoforma de proteína diferente. La Tabla 1 a continuación muestra la secuencia de nucleótidos del transcrito y las correspondientes proteínas.

Transcrito (secuencia de referencia del NCBI)	Proteína (secuencia de referencia del NCBI)
Número de acceso NM_002588, Versión NM_002588.4, variante de transcrito 1 (SEQ ID NO: 2)	Número de acceso NP_002579, Versión NP_002579 .2, precursor de isoforma 1 (SEQ ID NO: 3)
Número de acceso NM_032402, Versión NM_032402.1, variante de transcrito 2 (SEQ ID NO: 4)	Número de acceso NP_115778, Versión NP_115778.1, precursor de isoforma 2 (SEQ ID NO: 5)
Número de acceso NM_032403, Versión NM_032403.2, variante de transcrito 3 (SEQ ID NO: 6)	Número de acceso NP_115779, Versión NP_115779.1, precursor de isoforma 3 (SEQ ID NO: 7)

5 Tabla 1

Por tanto, en una realización particular, el gen PCDHGC3 comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una identidad de secuencia de, al menos, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, o 99% con la secuencia SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6. Por tanto, las variantes alélicas de la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6 están abarcadas dentro del contexto de la presente invención. No obstante, en una realización particular, el gen PCDHGC3 comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una identidad de secuencia de 100% con la secuencia SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 6.

15

Además, el nivel de expresión del gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas puede también cuantificarse cuantificando los niveles o cantidad de la proteína codificada por dicho gen, o cualquier variante funcionalmente equivalente de dicha proteína.

20

En el contexto de la presente invención, “variante funcionalmente equivalente de la proteína” se entiende como (i) variantes de la proteína codificadas por un gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas en los que uno o más de los residuos de aminoácidos son sustituidos por un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferiblemente un residuo de aminoácido conservado), en donde dicho residuo de aminoácido sustituido puede o no ser uno codificado por el código genético, o (ii) variantes que comprenden una inserción o una delección de uno o más aminoácidos y que tienen la misma función que la proteína codificada por un gen que

25

pertenece al cluster de genes de las protocadherinas, es decir, para mediar en la adhesión célula-célula en ensayos basados en células. Las variantes de la proteína pueden ser identificadas utilizando métodos basados en la capacidad de la proteína codificada por el gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas para mediar en la adhesión célula-célula y la supervivencia celular en ensayos basados en células. Para determinar la adhesión célula-célula, los constructos de expresión que codifican los genes PCDH son transfectados en células K562 (línea celular de la leucemia humana, ATCC CCL243) y, después de 24 horas en cultivo, se permite la agregación de las células transfectadas (que se agrupan) durante 1–2 horas en un rocker (agitador por balanceo) en el interior de la incubadora. Las células se fijan a continuación en paraformaldehído al 4%, se lavan, y se enjuagaron con glicerol al 50% para la toma de imágenes de microscopio y la cuantificación de los agregados celulares.

El nivel de proteínas puede cuantificarse mediante cualquier método convencional que permita la detección y cuantificación de dicha proteína en una muestra de un sujeto. A modo de ilustración no limitativa, dichos niveles de proteínas pueden ser cuantificados, por ejemplo, utilizando anticuerpos con una capacidad de unión específica a la proteína (o un fragmento de la misma que contenga un determinante antigénico) y la posterior cuantificación de los complejos formados. Los anticuerpos utilizados en estos ensayos pueden estar o no marcados. Entre los ejemplos ilustrativos de marcadores que pueden ser utilizados se incluyen isótopos radiactivos, enzimas, fluoróforos, reactivos de quimioluminiscencia, sustratos o cofactores enzimáticos, inhibidores de enzimas, partículas, colorantes, etc. Existe una amplia gama de ensayos conocidos que pueden utilizarse en la presente invención que utilizan anticuerpos no marcados (anticuerpo primario) y anticuerpos marcados (anticuerpo secundario); estas técnicas incluyen transferencia *Western-blot* o *Western*, ELISA (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), RIA (radioinmunoensayo), EIA competitivo (inmunoensayo enzimático competitivo), DAS-ELISA (ELISA tipo sándwich doble anticuerpo), técnicas inmunocitoquímicas e inmunohistoquímicas, técnicas basadas en el uso de micromatrices de proteínas o biochips que incluyen anticuerpos específicos o ensayos basados en la precipitación coloidal en formatos tales como tiras reactivas. Otras maneras de detectar y cuantificar las proteínas incluyen técnicas de cromatografía por afinidad, ensayos de unión de ligandos, etc. Cuando se utiliza un método inmunológico, puede utilizarse cualquier anticuerpo o reactivo que se conoce que se une específicamente a la proteína con una alta afinidad para detectar la cantidad de la

misma. Entre los ejemplos de anticuerpos se incluyen, sin limitarse a, sueros policlonales, sobrenadantes de hibridomas o anticuerpos monoclonales, fragmentos de anticuerpos, Fv, Fab, Fab' y F(ab')₂, scFv, diacuerpos humanizados, triacuerpos, tetracuerpos, nanocuerpos, alfacuerpos, péptidos grapados, ciclopéptidos y anticuerpos.

En una realización particular, los niveles de proteínas son cuantificados mediante ensayo de transferencia de tipo Western, inmunohistoquímica, ELISA o matriz de proteínas.

En otra realización particular, los niveles de proteínas son cuantificados a partir de exosomas o ADN circulante. Los exosomas son vesículas de membranas de 40 – 100 nm secretadas por la mayoría de los tipos de células in vivo e in vitro. Los exosomas se forman en una población particular de endosomas, denominada cuerpos multivesiculares (MVB) mediante el brote interno hacia el interior del lumen del compartimento. Tras la fusión de los MVB con la membrana plasmática, se segregan estas vesículas internas. Pueden aislarse exosomas de diversas líneas celulares o fluidos corporales por diversos métodos bien conocidos en la técnica; diversos kits comerciales están disponibles para el aislamiento de exosomas tales como ExoQuick™ o ExoTest™.

Tal como se ha explicado en párrafos anteriores, en una realización particular del método de la invención, el gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas es un gen que pertenece al cluster de genes PCDHG que, en una realización más particular, el gen es el gen PCDHGC3. Por tanto, en otra realización particular, la proteína codificada por el gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas es la proteína codificada por el gen PCDHGC3, es decir, la proteína PCDHGC3.

Tal como se ha explicado anteriormente, existen tres isoformas de proteínas PCDHGC3 que comprenden las secuencias SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 7. Por tanto, en una realización particular, el nivel de expresión de genes PCDHGC3 puede cuantificarse mediante la cuantificación de los niveles de cualquiera de las isoformas de proteínas PCDHGC3.

Como es bien conocido por los expertos en la técnica, alterar la estructura primaria de una proteína mediante una sustitución conservadora puede no alterar significativamente la actividad de esa proteína debido a que la cadena lateral del aminoácido que se introduce en la secuencia puede ser capaz de formar enlaces y contactos similares a la cadena lateral del aminoácido que ha sido sustituido. Son posibles las sustituciones no conservadoras siempre que estas no interrumpan o interfieran con la función de las isoformas de la proteína PCDHGC3. Por tanto, en el contexto de la presente invención, también abarca variantes funcionalmente equivalentes de las isoformas de la proteína PCDHGC3. El término "variante funcionalmente equivalente" ha sido explicado anteriormente. Puede identificarse un ensayo para determinar si una proteína determinada es una variante funcionalmente equivalente de la proteína PCDHGC3 utilizando métodos basados en la capacidad de la proteína PCDHGC3 para mediar en la adhesión célula-célula en ensayos basados en células. Una proteína determinada se considera una variante de la proteína PCDHGC3 si dicha proteína muestra una identidad de secuencia de, al menos, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 o 99% con la SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 7. El término "identidad de secuencia" ha sido definido previamente. Se considera que tales mutantes, variantes o derivados son "funcionales" si mantienen las mismas o similares propiedades y/o actividad que la proteína PCDHGC3. Una variante de la proteína PCDHGC3 de la invención se considera funcional cuando el nivel de actividad es al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, aún más preferiblemente 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de la de la proteína PCDHGC3. El experto puede en la práctica de rutina determinar dichas propiedades y actividades y ejemplos de tales métodos se proporcionan en la presente especificación y se han mencionado anteriormente.

Una vez que se han determinado los niveles de metilación, o los niveles de expresión, del promotor de un gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas en una muestra del sujeto (etapa a), el método de la invención comprende comparar los niveles de metilación, o los niveles de expresión, obtenidos en la etapa a) con un valor de referencia.

La determinación de los niveles de metilación del promotor, o los niveles de expresión, de un gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas deben estar correlacionados con los valores de un valor de referencia. Dependiendo del tipo de tumor que va a ser analizado, la naturaleza exacta del valor de referencia puede

variar. Por tanto, el valor de referencia puede ser la media de los niveles de metilación (o los niveles de expresión) del promotor obtenidos en un conjunto de sujetos que tienen un tumor no metastásico. De igual manera, el valor de referencia puede ser el valor de la media de los niveles de metilación, o los niveles de expresión, del promotor de un gen en un conjunto de muestras de sujetos con cáncer que no han cursado metástasis.

En general, las muestras de referencia habituales serán obtenida de sujetos que están clínicamente bien documentados y en los que la ausencia de metástasis está bien caracterizada. Deberían tenerse en cuenta diversas consideraciones cuando se determina el valor de referencia. Entre tales consideraciones están la edad, peso, sexo, condición física general del paciente y similar. Por ejemplo, iguales cantidades de un grupo de al menos 2, al menos 10, al menos 100 preferiblemente más de 1000 sujetos, preferiblemente clasificados de acuerdo con las anteriores consideraciones, por ejemplo, de acuerdo a diversas categorías de edad, se toman como el grupo de referencia. El conjunto de muestras del que se obtiene el nivel de referencia estará formado preferiblemente por sujetos que padecen del mismo tipo de cáncer que el paciente objeto del estudio. De igual manera, el valor de referencia dentro de un grupo de pacientes puede establecerse utilizando una curva ROC (del inglés receiving operating curve o característica operativa del receptor) y midiendo el área bajo la curva para todos los pares de sensibilidad y especificidad para determinar qué par proporciona los mejores valores y a qué valor de referencia corresponde.

Una vez que se establece el valor de referencia, los valores de metilación, o los valores de expresión, obtenidos en la etapa (a) del método de la invención, pueden compararse con este valor de referencia, y por tanto se les puede asignar un nivel de “bajo” (disminución) o “alto” (aumento) de los niveles de metilación o niveles de expresión del promotor del gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas.

Por “nivel alto” se entiende que el valor de media de los dinucleótidos CpG metilados en el sujeto analizado es más elevado que en el valor de referencia, es decir, o bien la proporción de las moléculas de ADN metiladas en un sitio CpG en particular es mayor o bien existe un mayor número de sitios CpG separados metilados en el sujeto. Debe entenderse que los términos “aumentado” e “incrementado” se utilizan de forma intercambiable con el término “superior”. La presente invención no está limitada por

una cantidad precisa de residuos metilados que se consideran indicativos de diagnóstico de metástasis en un sujeto, ya que se produce alguna variación entre las muestras del paciente. La presente invención tampoco está limitada por el posicionamiento del residuo metilado.

5

En una realización particular, un aumento en la expresión por encima del valor de referencia de al menos 1,1-veces, 1,5-veces, 2-veces, 5-veces, 10-veces, 20-veces, 30-veces, 40-veces, 50-veces, 60-veces, 70-veces, 80-veces, 90-veces, 100-veces o incluso más en comparación con el valor de referencia se considera una expresión
10 “superior” (aumento). En una realización particular, una disminución de la expresión por debajo del valor de referencia de al menos 0,9- veces, 0,75-veces, 0,2-veces, 0,1-veces, 0,05-veces, 0,025-veces, 0,02-veces, 0,01-veces, 0,005-veces o incluso menos en comparación con el valor de referencia se considera una expresión “inferior” (reducida).

15

En vista de estos resultados, se alcanzan las siguientes conclusiones:

- si los niveles de metilación obtenidos en la etapa (a) son superiores a los niveles de metilación del valor de referencia, o
- los niveles de expresión obtenidos en la etapa (a) son inferiores a los niveles
20 de expresión del valor de referencia, entonces
 - (i) el tumor PPGL es un tumor metastásico o es propenso a desarrollar metástasis,
 - (ii) el pronóstico, los resultados clínicos, y/o la respuesta del sujeto a la
terapia es negativa.

25

El método de la presente invención puede ser realizado en una muestra biológica adecuada. Tal como se utiliza en la presente memoria, una “muestra biológica” hace referencia a cualquier muestra de material biológico obtenida de un animal tal como, pero sin limitarse a, material celular, biofluidos (por ejemplo, sangre), heces,
30 especímenes de biopsias de tejidos, especímenes quirúrgicos o fluido que ha sido introducido en el cuerpo de una animal y posteriormente retirado. La muestra biológica que se somete a prueba de acuerdo con el método de la presente invención puede ser sometida a prueba directamente o puede requerir alguna forma de tratamiento previo al ensayo. Por ejemplo, una biopsia o una muestra quirúrgica pueden requerir
35 homogeneización previa al ensayo o pueden requerir seccionamiento para un ensayo in situ para determinar los niveles de expresión cualitativos de los genes individuales.

En el grado en el que la región del ADN de interés está presente en la muestra biológica, la muestra biológica puede someterse directamente a ensayo o bien todo o parte del ácido nucleico presente en la muestra biológica puede ser aislada previamente al ensayo. En otro ejemplo, la muestra puede ser parcialmente purificada o enriquecida de otro modo previamente al análisis.

En una realización particular, la muestra se selecciona del grupo que consiste en sangre, orina, heces y tejido de una biopsia. En una realización más particular, la muestra es una muestra de un tumor.

En la presente invención “muestra de tumor” se entiende como la muestra (por ejemplo, tejido tumoral, célula tumoral circulante, ADN tumoral circulante) que se origina a partir del tumor cancerígeno primario. Dicha muestra puede ser obtenida mediante métodos convencionales, por ejemplo biopsia, utilizando métodos bien conocidos por los expertos en las técnicas médicas relacionadas. Los métodos para obtener una muestra de biopsia incluyen dividir un tumor en trozos grandes, o la microdissección, u otros métodos de separación celular conocidos en la técnica. Las células tumorales pueden obtenerse adicionalmente mediante citología a través de la aspiración con una aguja de calibre pequeño. Para simplificar la conservación y la manipulación de la muestra, las muestras pueden fijarse en formalina e impregnarse en parafina, o bien congelarse en primer lugar y a continuación impregnarse en un medio de congelación de tejidos tal como un compuesto OCT (del inglés “*Optimal Cutting Temperature*”), mediante inmersión en un medio altamente criogénico que permita la congelación rápida.

El método de la invención hace referencia a un método *in vitro* para el diagnóstico y/o pronóstico de la metástasis del cáncer en un sujeto que padece de cáncer, o para predecir los resultados clínicos de un sujeto que padece de cáncer, o para determinar la respuesta de un sujeto a una terapia.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “cáncer” hace referencia a aquellas enfermedades en las que células anormales se dividen sin control y pueden invadir tejidos cercanos. Las células cancerígenas pueden también extenderse a otras partes del organismo a través de los sistemas sanguíneo y linfático (metástasis). Existen diversos tipos de cáncer principales. El carcinoma es un cáncer que comienza en la piel o en los tejidos que reviste o recubre los órganos internos. El sarcoma es un

cáncer que comienza en el hueso, cartílago, tejido graso, músculo, vasos sanguíneos, u otros tejidos conjuntivos o de soporte. La leucemia es un cáncer que comienza en el tejido hematopoyético, tal como la médula ósea, y causa que se produzcan grandes cantidades de células sanguíneas anormales y se introduzcan en la sangre. El linfoma y mieloma múltiple son tipos de cáncer que comienzan en las células del sistema inmune. Los tipos de cáncer del sistema nervioso central son tipos de cáncer que comienzan en los tejidos del cerebro o de la médula espinal. El cáncer puede ser un tumor sólido o un tumor no sólido, incluyendo la metástasis.

- 10 Los ejemplos no limitativos de un tumor o cáncer incluyen un tumor o cáncer de pulmón, tal como un cáncer de pulmón de células pequeñas o células no pequeñas, o un adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas o un carcinoma de células grandes. Ejemplos particulares no limitativos de un tumor o cáncer incluyen un carcinoma, sarcoma, linfoma, leucemia, adenoma, adenocarcinoma, melanoma,
- 15 glioma, glioblastoma, meningioma, neuroblastoma, retinoblastoma, astrocitoma, oligodendrocitoma, mesotelioma, neoplasia, tumor, cáncer o malignidad reticuloendotelial, linfática o hematopoyética. Ejemplos adicionales no limitativos en particular de tumor o cáncer es una neoplasia, tumor o cáncer de pulmón, tiroides, cabeza o cuello, nasofaringe, garganta, nariz o senos nasales, cerebro, espinal, de
- 20 mama, de glándula adrenal, glándula pituitaria, tiroides, linfa, gastrointestinal (boca, esófago, estómago, duodeno, íleo, yeyuno (intestino delgado), colon, recto), del tracto genito-urinario (útero, ovarios, cuello del útero, endometrial, vejiga, testículos, pene, próstata), riñón, páncreas, hígado, huesos, médula ósea, linfa, sangre, músculo, o piel. Aún otros ejemplos no limitativos adicionales en particular de un tumor o cáncer
- 25 incluyen cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer gástrico, mesotelioma pleural, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer del intestino grueso, cáncer del intestino delgado, cáncer de esófago, cáncer de duodeno, cáncer de lengua, cáncer faríngeo, cáncer de la glándula salivar, tumor cerebral, schwannoma, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer del conducto biliar, cáncer de endometrio,
- 30 cáncer de cuello uterino, cáncer del cuerpo del útero, cáncer de ovarios, cáncer de vejiga, cáncer de uretra, cáncer de piel, angioma, linfoma maligno, melanoma maligno, cáncer de tiroides, cáncer de paratiroides, cáncer nasal, cáncer paranasal, cáncer del órgano auditivo, carcinoma de suelo de boca, cáncer laríngeo, cáncer parotídeo, cáncer submandibular, tumor óseo, angiofibroma, sarcoma retinal, cáncer de pene,
- 35 tumor testicular, cáncer sólido pediátrico, sarcoma de Kaposi, tumor del seno maxilar,

histiocitoma fibroso, leiomiosarcoma, rhabdomiosarcoma, linfoma, mieloma múltiple o leucemia.

No obstante, en una realización particular del método de la invención, el cáncer es un
5 tumor feocromocitoma y paraganglioma (PPGL), cáncer de colon, o cáncer renal, preferiblemente, el cáncer renal es un carcinoma de células renales de tipo células claras (CCRCC).

Los feocromocitomas y paragangliomas (PPGL) son tumores productores de
10 catecolamina que surgen respectivamente de células medulares adrenales o cromafines de paraganglios. Más del 30% de los PPGL tienen una base hereditaria debido a las mutaciones de más de 11 genes de susceptibilidad tumoral identificados hasta la fecha. Los PPGL en pacientes con mutaciones *SDHB* se caracterizan por la producción de noradrenalina y/o dopamina, sin una producción significativa de
15 adrenalina.

Por tanto, en una realización particular, el tumor PPGL está asociado con las mutaciones del gen *SDHx*. En otra realización particular, el gen *SDHx* se selecciona de la lista que consiste en gen *SDHB*, gen *SDHC*, gen *SDHA*, gen *SDHD* y gen
20 *SDHAF2*.

El gen *SDHB* proporciona instrucciones para realizar una de cuatro subunidades de la enzima succinato deshidrogenasa (*SDH*). La enzima *SDH* juega un papel de vital importancia en las mitocondrias, que son estructuras en el interior de las células que
25 convierten la energía del alimento en una forma que las células puedan utilizar. Dentro de las mitocondrias, la enzima *SDH* une dos vías importantes en la conversión de energía: el ciclo del ácido cítrico (o ciclo de Krebs) y la fosforilación oxidativa. Como parte del ciclo del ácido cítrico, la enzima *SDH* convierte un compuesto denominado succinato en otro compuesto denominado fumarato. Se liberan durante esta reacción
30 partículas con carga negativa denominadas electrones. La proteína *SDHB* proporciona un sitio de unión para los electrones a medida que se transfieren a la vía de fosforilación oxidativa. En la fosforilación oxidativa, los electrones ayudan a crear una carga eléctrica que proporciona energía para la producción de adenosina trifosfato (*ATP*), la principal fuente de energía de las células.

35

El gen SDHC proporciona instrucciones para realizar una de cuatro subunidades de la enzima SDH. La proteína SDHC ayuda a anclar la enzima SDH en la membrana mitocondrial.

- 5 El gen SDHA proporciona instrucciones para realizar una de cuatro subunidades de la enzima SDH. La enzima SDH juega un papel de vital importancia en la mitocondria. La proteína SDHA es la subunidad activa de la enzima que realiza la conversión del succinato, y también ayuda a transferir electrones a la vía de fosforilación oxidativa. En la fosforilación oxidativa, los electrones ayudan a crear una carga eléctrica que
10 proporciona energía para la producción de adenosina trifosfato (ATP), la principal fuente de energía de la célula.

El gen SDHAF2 proporciona instrucciones para producir una proteína que interactúa con la enzima SDH. La proteína SDHAF2 ayuda a una molécula denominada FAD a
15 unirse a la enzima SDH. La FAD se denomina un cofactor debido a que ayuda a la enzima a llevar a cabo su función.

Tal como se utiliza en el presente documento “sujeto” o “paciente” hace referencia a todos los animales clasificados como mamíferos e incluye, pero no se limita a,
20 animales domésticos y de granja, primates humanos, por ejemplo, seres humanos, primates no humanos, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, perros, gatos o roedores. Preferiblemente, el sujeto es un hombre o mujer humano de cualquier edad o raza.

25 Método terapéutico de la invención

Los inventores han observado adicionalmente que inhibir la actividad de una proteína codificada por un gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas, puede tratarse y/o prevenirse el cáncer y, más particularmente, la metástasis del cáncer.
30

Por lo tanto, en otro aspecto, la presente invención hace referencia a un agente inhibidor de la actividad de una proteína codificada por un gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas, (de aquí en adelante “agente inhibidor de la invención”) para su uso en el tratamiento y/o prevención de la metástasis del cáncer
35 en un sujeto que padece dicho cáncer.

Tal y como se utiliza en el presente documento, el término “agente inhibidor” hace referencia a cualquier molécula o compuesto capaz de completa o parcialmente inhibir la actividad de una proteína, tanto previniendo el producto de expresión del gen que codifica la proteína (es decir, interrumpiendo la transcripción génica y/o bloqueando la traducción del ARNm que procede de la expresión génica) y directamente uniéndose a e inhibiendo la proteína codificada por dicho gen. En la presente invención, la proteína está codificada por un gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas.

La expresión “gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas” ha sido explicada previamente en la presente descripción. En una realización particular, el gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas se selecciona de la lista que consiste en el cluster de genes PCDHA, cluster de genes PCDHB y cluster de genes PCDHG. En una realización particular, el gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas es un gen que pertenece al cluster de genes PCDHG en el que, en una realización más particular, el gen es el gen PCDHGC3. Todos estos términos y realizaciones particulares de los mismos han sido divulgados/definidos para el método de la invención, y son aplicables al presente aspecto inventivo. Las secuencias de nucleótidos/aminoácidos del gen PCDHGC3, los transcritos derivados de dicho gen, y las diferentes isoformas de las proteínas que proceden de la traducción de los transcritos se muestran en la Tabla 1 anterior.

A modo de ilustración no limitativa, los agentes inhibidores adecuados para su uso en la presente invención incluyen compuestos químicos, oligonucleótidos antisentido, ARN de interferencia (ARNip), ARN catalíticos o ribozimas específicos y anticuerpos inhibidores.

Oligonucleótidos Antisentido

Un aspecto adicional de la invención hace referencia al uso de ácidos nucleicos “antisentido” para inhibir la expresión, por ejemplo, para inhibir la transcripción y/o traducción de un ácido nucleico que codifica la proteína, la actividad de la cual va a ser inhibida. Los ácidos nucleicos antisentido pueden enlazarse a la potencial diana del fármaco mediante complementariedad de bases convencional o, por ejemplo, en el caso de unirse a ADN de doble cadena mediante interacción específica en la ranura grande la doble hélice. Generalmente, estos métodos hacen referencia a una gama de

técnicas utilizadas generalmente en el arte e incluyen cualquier método que esté basado en la unión específica a las secuencias de oligonucleótidos.

Un oligonucleótido antisentido puede distribuirse, por ejemplo, como un plásmido de expresión que, cuando es transcrito en una célula, produce ARN complementario para al menos una única parte del ARNm celular que codifica la proteína. De forma alternativa, el oligonucleótido antisentido es una sonda de oligonucleótidos generada ex vivo que, cuando se introduce en el interior de la célula, produce la inhibición de la expresión de genes hibridando con el ARNm y/o las secuencias de genes de un ácido nucleico diana. Dichas sondas de oligonucleótidos son preferiblemente oligonucleótidos modificados que son resistentes a nucleasas endógenas, por ejemplo, exonucleasas y/o endonucleasas y son por lo tanto estables in vivo. Son ejemplos de moléculas de ácidos nucleicos para el uso de los mismos como oligonucleótidos antisentido los análogos de ADN de fosforamidato, fosfotionato y metilfosfonato.

Con respecto al oligonucleótido antisentido, se prefieren las regiones de oligodesoxirribonucleótidos derivados del sitio de inicio de la traducción, por ejemplo, entre -10 y +10 del gen diana. Las aproximaciones antisentido implican el diseño de oligonucleótidos (ya sea ADN o ARN) que son complementarias al ARNm que codifica el polipéptido diana. El oligonucleótido antisentido se enlazarán al ARNm transcrito y se evitará la traducción.

Los oligonucleótidos que son complementarios al extremo 5' del ARNm, por ejemplo la secuencia no traducida 5' hasta e incluyendo el codón de inicio AUG deben funcionar de la manera más eficiente para inhibir la traducción. No obstante, se ha mostrado que las secuencias complementarias a las secuencias 3' no traducidas del ARNm son también eficientes para inhibir la traducción del ARNm. Por lo tanto, los oligonucleótidos complementarios podrían ser utilizados en las regiones 5' o 3' no traducidas, regiones no codificantes de un gen en una aproximación antisentido para inhibir la traducción de dicho ARNm. Los oligonucleótidos complementarios a la región 5' no traducida del ARNm deben incluir el complemento del codón de inicio AUG. Los oligonucleótidos complementarios a la región codificante del ARNm son inhibidores de la traducción menos eficientes pero podrían también ser utilizados de acuerdo con la invención. Si están designados para hibridar con la región 5', la región 3' o la región codificante del ARNm, los ácidos nucleicos antisentido deben tener al menos seis

nucleótidos de largo y preferiblemente tener menos de aproximadamente 100 y más preferiblemente menos de aproximadamente 50, 25, 17 o 10 nucleótidos de largo.

El oligonucleótido antisentido puede ser un ADN o ARN de cadena única o de doble
5 cadena o mezclas quiméricas o derivados o versiones modificadas del mismo. El oligonucleótido puede modificarse en el grupo base, el grupo azúcar o la cadena central de fosfato, por ejemplo, para mejorar la estabilidad de la molécula, su capacidad de hibridación, etc. El oligonucleótido puede incluir otros grupos enlazados, tales como péptidos (por ejemplo, para dirigirlos a los receptores de las células
10 hospedadoras), agentes para facilitar el transporte a través de la membrana celular o de la barrera hematoencefálica, y agentes intercalantes. Para este propósito, el oligonucleótido puede conjugarse a otra molécula, por ejemplo, un péptido, un agente transportador, un agente de escisión desencadenada por hibridación, etc.

15 Los oligonucleótidos antisentido pueden comprender al menos un grupo de base modificada. El oligonucleótido antisentido también puede comprender al menos un grupo azúcar modificado seleccionado del grupo que incluye, pero que no está limitado a, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa, y hexosa. El oligonucleótido antisentido también puede contener una cadena central similar a un péptido neutro. Tales
20 moléculas se conocen como oligómeros de ácido nucleico peptídico (ANP). En aún otra realización, el oligonucleótido antisentido comprende al menos una cadena central de fosfato modificado. En aún otra realización, el oligonucleótido antisentido es un oligonucleótido alfa-anomérico.

25 Mientras que se pueden utilizar oligonucleótidos antisentido complementarios a la región codificante de la secuencia diana de ARNm, también se pueden utilizar aquellos complementarios a la región transcrita no traducida.

En algunos casos, puede resultar difícil alcanzar las concentraciones intracelulares del
30 antisentido suficientes para suprimir la traducción del ARNm endógeno. Por lo tanto, una aproximación preferida utiliza un constructo de ADN recombinante en el que el oligonucleótido antisentido se sitúa bajo el control de un promotor fuerte de pol III o pol II.

35 De forma alternativa, la expresión del gen diana puede reducirse dirigiendo secuencias de desoxirribonucleótidos complementarias a la región reguladora del gen (es decir, el

promotor y/o potenciadores) para formar estructuras de triple hélice que previenen la transcripción del gen en las células diana en el organismo. En ciertas realizaciones, los oligonucleótidos antisentido son morfolinós antisentido.

5 *ARNip*

Los ARN de interferencia pequeños o ARNip son agentes que son capaces de inhibir la expresión de un gen diana mediante interferencia de ARN. Un ARNip se puede sintetizar químicamente, se puede obtener mediante transcripción *in vitro* o se puede
 10 sintetizar *in vivo* en la célula diana. Habitualmente, los ARNip consisten en ARN de cadena doble de entre 15 y 40 nucleótidos de longitud y que puede contener una región protuberante 3' y/o 5' de 1 a 6 nucleótidos. La longitud de la región protuberante es independiente de la longitud total de la molécula de ARNip. Los ARNip actúan mediante la degradación o el silenciamiento del mensajero diana después de la
 15 transcripción.

Los ARNip de la invención son sustancialmente homólogos al ARNm del gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas, o a la secuencia de genes que codifican la proteína. Por "sustancialmente homólogos" se entiende que tienen una
 20 secuencia que es suficientemente complementaria o similar al ARNm diana, de tal manera que el ARNip sea capaz de degradar este último a través de interferencia de ARN. Los ARNip adecuados para causar dicha interferencia incluyen ARNip formados por ARN, además de ARNip que contienen diferentes modificaciones químicas tales como: (i) ARNip en los que los enlaces entre los nucleótidos son diferentes a los que
 25 aparecen en la naturaleza, tales como enlaces fosforotionato; (ii) Conjugados de la cadena de ARN con un reactivo funcional, tal como un fluoróforo; (iii) Modificaciones de los extremos de las cadenas de ARN, en particular del extremo 3' mediante la modificación con diferentes grupos funcionales hidroxilo en la posición 2'; (iv) Nucleótidos con azúcares modificados tales como residuos O-alkilados en la posición
 30 2' como 2'-Ometilribosa o 2'-O-fluorosibosa; o (v) Nucleótidos con bases modificadas tales como bases halogenadas (por ejemplo 5-bromouracilo y 5-iodouracilo), bases alkiladas (por ejemplo 7-metilguanosina).

Los ARNip pueden ser utilizados en forma de ARN de doble cadena con las
 35 características mencionadas anteriormente. Alternativamente, es posible el uso de vectores que contienen la secuencia de la cadena sentido y antisentido del ARNip bajo

el control de promotores adecuados para la expresión del mismo en la célula de interés.

El ARNip puede ser generado intracelularmente a partir del denominado ARNhc (ARN
5 de horquilla corto) caracterizado por que las cadenas antiparalelas que forman el ARNip están conectadas por una región del lazo o una región horquilla. Los ARNhc pueden ser codificados por plásmidos o virus, en particular retrovirus, y están bajo el control de un promotor.

10 El ARNip y el ARNhc de la invención pueden obtenerse utilizando una serie de técnicas conocidas por la persona experta en el arte. La región de la secuencia de nucleótidos tomada como base para diseñar el ARNip no es limitativa y puede contener una región de la secuencia de codificación (entre el codón de inicio y el
15 codón de finalización) o puede contener, de manera alternativa, secuencias de la región 5' o 3' no traducidas, preferiblemente entre 25 y 50 nucleótidos de longitud y en cualquier posición en la posición en dirección 3' con respecto al codón de inicio.

Enzimas de ADN

20 Por otro lado, la invención también contempla el uso de enzimas de ADN para inhibir la expresión del gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas. Las enzimas de ADN incorporan parte de las características del mecanismo de las tecnologías tanto antisentido como de ribozimas. Las enzimas de ADN se diseñan de tal manera que reconocen una secuencia de ácido nucleico diana en particular similar
25 al oligonucleótido antisentido, no obstante, al igual que el ribozima, son catalíticas y escinden específicamente el ácido nucleico diana.

Ribozimas

30 También pueden utilizarse moléculas de ribozimas diseñadas para escindir catalíticamente los productos de transcripción de un ARNm diana para evitar la traducción del ARNm que codifica la proteína, cuya actividad va a ser inhibida. Las ribozimas son moléculas enzimáticas de ARN capaces de catalizar la escisión específica de ARN. El mecanismo de la acción de las ribozimas implica una
35 hibridación específica de la secuencia de una molécula de ribozima con un ARN diana complementario, seguido de un evento de escisión endonucleolítica. La composición

de las moléculas de ribozimas incluye preferiblemente una o más secuencias complementarias al ARNm diana y la secuencia bien conocida responsable de la escisión del ARNm o una secuencia funcionalmente equivalente. Ejemplos de ribozimas que van a ser utilizados en la presente invención incluyen ribozimas de cabeza de martillo y ARN endorribonucleasa (de aquí en adelante "ribozimas de tipo Cech").

Anticuerpos inhibidores

10 En el contexto de la presente invención, por "anticuerpo inhibidor" se entiende cualquier anticuerpo capaz de unirse específicamente a la proteína codificada por un gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas, y que inhiben una o más de las funciones de dicha proteína. Los anticuerpos pueden prepararse utilizando cualquiera de los métodos que son conocidos por el experto en la técnica, algunos de los cuales han sido mencionados anteriormente. Por tanto, los anticuerpos policlonales se preparan mediante la inmunización de un animal con la proteína que va a ser inhibida. En el contexto de la presente invención, entre los anticuerpos adecuados se incluyen anticuerpos intactos que comprenden una región variable de unión al antígeno y una región constante, "Fab", "F(ab')₂" y "Fab'", Fv, fragmentos scFv, 15 diacuerpos y anticuerpos biespecíficos.

El presente aspecto hace referencia a un agente inhibidor de la actividad de una proteína codificada por un gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas, para su uso en el tratamiento y/o prevención de la metástasis del 25 cáncer en un sujeto que padece de dicho cáncer. En una realización particular, el gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas es el gen PCDHGC3 que codifica la proteína PCDHGC3. Entre los ejemplos de agentes inhibidores de la actividad de la proteína PCDHGC3 se incluyen, sin limitarse a, ARNip de PCDHGC3 de Thermo Fisher Scientific, tal como el ARNip con números de ID 175327, 175328, 175329, 280722, 280723, 280724, 85222, 85317, 85411, HSS181790, HSS181791, 30 HSS181792, MSS234896, MSS234897, MSS234898, RSS300654, RSS300655, RSS340440, s138392, s138393, s138394, s200447, s96674, s96675, s96676; y anticuerpos anti-PCDHGC3 tales como, anticuerpos HPA008755, HPA010580 y HPA077289 de Atlas Antibodies o Sigma-Aldrich; anticuerpos policlonales y 35 monoclonales anti-PCDHGC3 de Thermo Fisher Scientific.

Los agentes inhibidores de la presente invención se utilizan para el tratamiento y/o prevención de la metástasis del cáncer en un sujeto que padece de dicho cáncer.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, el término “tratamiento” o “tratar” es una aproximación para obtener resultados beneficiosos o deseados, incluyendo resultados clínicos. Para la finalidad de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: aliviar uno o más síntomas que son el resultado de la enfermedad, disminuir el grado de la enfermedad, estabilizar la enfermedad (por ejemplo prevenir o retrasar el empeoramiento de la enfermedad), prevenir o retrasar la extensión (por ejemplo, metástasis) de la enfermedad, prevenir o retrasar la recurrencia de la enfermedad, retrasar o ralentizar la progresión de la enfermedad, mejorar el estado de la enfermedad, proporcionar una remisión (parcial o total) de la enfermedad, disminuir la dosis de una o más medicaciones requeridas para tratar la enfermedad, retrasar la progresión de la enfermedad, aumentar la calidad de vida, y/o prolongar la supervivencia. En el contexto de la presente invención, el agente inhibidor de la invención inhibe o reduce la recaída, crecimiento, progresión, empeoramiento o metástasis del tumor o cáncer; da como resultado la destrucción parcial o completa de la masa, volumen, tamaño de la célula o el número de células neoplásicas, tumorales, cancerígenas o malignas, estimulando, induciendo o aumentando la necrosis, lisis o apoptosis de células neoplásicas, tumorales, cancerígenas o malignas, reduciendo la masa celular, tamaño, volumen de la neoplasia, tumor, cáncer o malignidad, inhibiendo o evitando la progresión o un aumento del volumen, masa, tamaño o números de células de la neoplasia, tumor, cáncer o malignidad, o prolongando la vida; da como resultado la reducción o disminución de la gravedad, duración o frecuencia de un síntoma adverso o complicación asociada con o causada por la neoplasia, tumor, cáncer o malignidad; o el método tiene como resultado la reducción o disminución del dolor, molestias, náusea, debilidad o letargo, o tiene como resultado el aumento de la energía, el apetito, una movilidad mejorada o el bienestar psicológico.

30

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “previniendo” (o “prevenir” o “prevención”) hace referencia a la capacidad del agente inhibidor de la actividad de una proteína codificada por un gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas, para minimizar o impedir la progresión de una enfermedad, condición o trastorno en un sujeto. En la presente invención, la enfermedad, condición o

35

trastorno es cáncer. El término “cáncer” además de “metástasis” han sido definidos previamente en la presente descripción.

En una realización particular, el cáncer es un tumor feocromocitoma y paraganglioma (PPGL), cáncer de colon, o cáncer renal, preferiblemente, el cáncer renal es un carcinoma de células renales de tipo células claras (CCRCC). En una realización más particular, el tumor PPGL está asociado con las mutaciones del gen SDHx. En una realización aún más particular, el gen SDHx se selecciona de la lista que consiste en gen SDHB, gen SDHC, gen SDHA, gen SDHD y gen SDHAF2. Todos estos términos han sido definidos anteriormente en los párrafos previos.

La administración del agente inhibidor de la invención al sujeto comprende la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva del agente inhibidor. El término “cantidad terapéuticamente efectiva” significa la cantidad de agente inhibidor que provocará la respuesta biológica o médica de un tejido, sistema, animal o humano, que busca el investigador, veterinario, médico u otro clínico. En el contexto de la presente invención, la respuesta biológica o médica a provocar es el tratamiento y/o prevención del cáncer y la metástasis del cáncer, es decir, inhibir la migración de las células cancerígenas y/o inhibir la proliferación de las células cancerígenas.

El agente inhibidor de la presente invención puede utilizarse en combinación con uno o más fármacos en el tratamiento, prevención, control, mejora o reducción del riesgo de cáncer, donde la combinación de los fármacos entre sí es más segura o más efectiva que cualquiera de los fármacos en solitario. Entre los ejemplos de fármacos que pueden ser utilizados en combinación con el agente inhibidor de la invención para el tratamiento, prevención, control, mejora o reducción del cáncer se incluyen, sin limitarse a, cisplatino o carboplatino, gemcitabina, paclitaxel, docetaxel, etopósido y vinorelbina.

La relación en peso del agente inhibidor de la presente invención con respecto al otro u otros ingredientes activos puede variar y dependerá de la dosis efectiva de cada ingrediente. Generalmente, se utilizará una dosis efectiva de cada uno. Por tanto, por ejemplo, cuando el agente inhibidor de la presente invención se combina con otro agente, la relación en peso del agente inhibidor con respecto al otro agente se situará generalmente en un rango de aproximadamente 1000:1 a aproximadamente 1:1000, o de aproximadamente 200:1 a aproximadamente 1:200.

El agente inhibidor de la presente invención puede ser administrado por vías de administración oral, parenteral (por ejemplo, inyección intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, ICV, intracisternal o infusión, inyección subcutánea, o implante), por pulverizador de inhalación, vía nasal, vaginal, rectal, sublingual, bucal o tópica y puede ser formulado, solo o en conjunto, en formulaciones de unidades de dosificación adecuadas que contengan soportes, adyuvantes y vehículos no tóxicos convencionales farmacéuticamente adecuados apropiados para cada vía de administración. Además del tratamiento de animales de sangre caliente el agente inhibidor de la invención es efectivo para su uso en humanos.

El agente inhibidor de la presente invención puede ser incorporado en composiciones farmacéuticas para su administración al sujeto. Por tanto, en una realización particular, el inhibidor de la invención está comprendido dentro de una composición farmacéutica.

El agente inhibidor de la presente invención puede ser presentado convenientemente en forma de unidad de dosificación y puede ser preparado mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Todos los métodos incluyen la etapa de asociar el principio activo con el soporte que constituye uno o más ingredientes secundarios. En general, las composiciones farmacéuticas se preparan asociando uniformemente e íntimamente el principio activo con un soporte líquido o un soporte sólido finamente dividido o ambos, y a continuación, si fuera necesario, conformando el producto en la formulación deseada. En la composición farmacéutica el compuesto activo está incluido en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado sobre el proceso o la condición de las enfermedades. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "composición" pretende abarcar un producto que comprende los ingredientes especificados en las cantidades especificadas, además de cualquier producto que sea el resultado, directa o indirectamente, de la combinación de los ingredientes específicos en las cantidades específicas.

Las composiciones farmacéuticas que contienen el principio activo pueden estar en una forma adecuada para uso por vía oral, por ejemplo, como comprimidos, pastillas, pastillas para chupar, suspensiones acuosas o oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsiones, soluciones, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires. Las composiciones destinadas para su uso por vía oral pueden prepararse de acuerdo a cualquier método conocido en la técnica para la preparación de composiciones farmacéuticas y dichas composiciones pueden contener uno o más agentes

seleccionados del grupo que consiste en agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes conservantes para proporcionar preparaciones farmacéuticamente con una atractiva presentación y de sabor agradable. Los comprimidos contienen el principio activo en una mezcla con excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables que son adecuados para la preparación de comprimidos. Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes, tales como carbonato cálcico, carbonato sódico, lactosa, fosfato de calcio o fosfato de sodio; agentes de granulación y agentes disgregantes, por ejemplo, almidón de maíz, o ácido algínico; agentes aglutinantes, por ejemplo almidón, gelatina o goma arábica; y agentes lubricantes, por ejemplo estearato de magnesio, ácido esteárico o talco. Los comprimidos pueden ser no recubiertos o pueden recubrirse mediante técnicas conocidas para retrasar la disgregación y absorción en el tracto gastrointestinal y por lo tanto proporcionar una acción sostenida durante un periodo de tiempo más prolongado. Por ejemplo, puede emplearse un material de retardo de tiempo tal como monoestearato de glicerilo o distearato de glicerilo. Los comprimidos orales pueden también formularse para una liberación inmediata, tal como comprimidos u obleas de fusión rápida, comprimidos de disolución rápida o películas de disolución rápida.

Las formulaciones para uso oral pueden también presentarse como cápsulas de gelatina dura, en donde el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, por ejemplo, carbonato cálcico, fosfato de calcio o caolín, o como cápsulas de gelatina blanda en donde el principio activo se mezcla con agua o un medio oleoso, por ejemplo aceite de cacahuete, parafina líquida, o aceite de oliva.

Las suspensiones acuosas contienen los materiales activos en una mezcla con excipientes adecuados para la elaboración de suspensiones acuosas. Tales excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma arábica; agentes dispersantes o humectantes pueden ser un fosfátido, por ejemplo lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoxicetanol, o productos de condensación del óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como un monooleato de sorbitol polioxietilénico, o productos de condensación de óxido de

etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de sorbitán polioxietilénico, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de sorbitán polioxietilénico. Las suspensiones
5 acuosas también pueden contener también uno o más conservantes, por ejemplo p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo, uno o más agentes colorantes, uno o más agentes aromatizantes, y uno o más agentes edulcorantes, tales como sacarosa o sacarina.

Se pueden formular suspensiones oleosas suspendiendo el principio activo en un
10 aceite vegetal, por ejemplo aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco, o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las suspensiones oleosas pueden contener un agente espesante, por ejemplo cera de abejas, parafina sólida o alcohol cetílico. Se pueden añadir agentes edulcorantes tales como los indicados anteriormente, y agentes aromatizantes para proporcionar una preparación
15 oral de sabor agradable. Estas composiciones se pueden conservar mediante la adición de un antioxidante tal como ácido ascórbico.

Los polvos y gránulos dispersables, adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante adición de agua, proporcionan el principio activo en una mezcla con
20 un agente dispersante o humectante, agente de suspensión y uno o más conservantes. Los agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados, se encuentran ejemplificados por los mencionados ya anteriormente. También pueden estar presentes excipientes adicionales, por ejemplo agentes edulcorantes, aromatizantes y colorantes.

25 Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal, por ejemplo aceite de oliva o aceite de cacahuete, o un aceite mineral, por ejemplo parafina líquida o mezclas de éstos. Los agentes emulsionantes adecuados pueden
30 ser gomas de origen natural, por ejemplo goma arábiga o goma de tragacanto, fosfátidos de origen natural, por ejemplo habas de soja, lecitina, y ésteres o ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de sorbitán, y productos de condensación de dichos ésteres parciales con óxido de etileno, por ejemplo monooleato de sorbitán polioxietilénico. Las emulsiones también
35 pueden contener agentes edulcorantes y aromatizantes.

Las composiciones farmacéuticas también pueden estar en forma de suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Esta suspensión se puede formular de acuerdo con la técnica conocida utilizando los agentes de dispersión o humectantes y agentes de suspensión apropiados que se han mencionado anteriormente. La preparación
5 inyectable estéril, también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril, en un diluyente o disolvente no tóxico aceptable por vía parenteral, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que pueden ser empleados se encuentran el agua, una solución de Ringer y una solución isotónica de cloruro de sodio. Además, convencionalmente se emplean aceites fijos
10 estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite fijo blando, incluyendo mono o diglicéridos sintéticos. Además, ácidos grasos tales como el ácido oleico tienen uso en la preparación de inyectables.

El agente inhibidor de la presente invención se puede administrar también en forma de
15 supositorios para la administración del fármaco por vía rectal. Estas composiciones pueden prepararse mezclando el fármaco con un excipiente no irritante adecuado que sea sólido a temperaturas ordinarias pero líquido a la temperatura rectal, y que por lo tanto se funda en el recto para liberar el fármaco. Tales materiales son manteca de cacao y polietilenglicoles.

20 Para un uso tópico, se emplean cremas, pomadas, geles, soluciones o suspensiones y similares que contienen los compuestos de la presente invención. De forma similar, pueden utilizarse también parches transdérmicos para la administración por vía tópica.

25 En el tratamiento, prevención, control, mejora o reducción del riesgo de cáncer y/o metástasis del cáncer, un nivel de dosificación apropiado del agente inhibidor de la invención será generalmente de aproximadamente 0,01 a 500 mg por Kg de peso corporal del paciente por día que puede ser administrado en dosis únicas o múltiples.
30 Un nivel de dosificación adecuado puede ser de aproximadamente 0,01 a 250 mg/kg por día, aproximadamente 0,05 a 100 mg/kg por día, o aproximadamente 0,1 a 50 mg/kg por día. Dentro de este rango la dosificación puede ser de 0,05 a 0,5, 0,5 a 5 o 5 a 50 mg/kg por día. Para la administración oral, las composiciones pueden estar provistas en forma de comprimidos que contienen de 1,0 a 1000 miligramos del
35 principio activo, en particular 1,0, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 25,0, 50,0, 75,0, 100,0, 150,0, 200,0, 250,0, 300,0, 400,0, 500,0, 600,0, 750,0, 800,0, 900,0, and 1.000,0 miligramos

del agente inhibidor para el ajuste sintomático de la dosificación al paciente que va a ser tratado. Los compuestos pueden ser administrados en un régimen de 1 a 4 veces por día, o pueden administrarse una vez o dos veces por día.

- 5 Se entenderá, sin embargo, que el nivel de dosis específico y la frecuencia de dosificación específica para cualquier paciente en particular pueden variar y dependerán de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico empleado, la estabilidad metabólica y la longitud de la acción del dicho compuesto, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, modo y tiempo de
10 administración, tasa de excreción, combinación de fármacos, la gravedad de la condición en particular, y el huésped que se somete a terapia.

Kit de la invención y sus usos

- 15 Para poner en práctica el método de la invención o el uso terapéutico de la invención, se necesitan reactivos para determinar los niveles de metilación o los niveles de expresión del gen diana. Estos agentes pueden proporcionarse en un kit, siendo utilizado dicho kit para el diagnóstico y/o pronóstico de la metástasis del cáncer en un sujeto que padece de cáncer, o para predecir los resultados clínicos de un sujeto que
20 padece de cáncer, o para predecir los resultados clínicos de un sujeto que padece de cáncer, o para determinar la respuesta de un sujeto que tiene cáncer a una terapia. De igual manera, se contemplan también en la presente invención kits que comprenden los agentes inhibidores de la invención para tratar el cáncer, en particular, metástasis del cáncer.

25

En otro aspecto, la invención hace referencia a un kit para el diagnóstico y/o el pronóstico de la metástasis del cáncer en un sujeto que padece de cáncer, o para predecir los resultados clínicos de un sujeto que padece de cáncer, o para determinar la respuesta a la terapia de un sujeto que tiene cáncer, donde el kit comprende: a)
30 medios para cuantificar los niveles de metilación, o los niveles de expresión, del promotor de un gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas en una muestra de dicho sujeto; y b) medios para comparar los niveles de metilación, o los niveles de expresión, cuantificados en dicha muestra con un valor de referencia.

- 35 Entre los medios o reactivos para cuantificar los niveles de metilación, o los niveles de expresión, del promotor de un gen que pertenece al cluster de genes de las

protocadherinas se incluyen, sin limitarse a, sondas y cebadores específicos para un gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas, y anticuerpos que se unen específicamente a la proteína codificada por el gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas.

5

En una realización particular, el gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas es el gen PCDHGC3. Por tanto, los reactivos para cuantificar los niveles de metilación, o los niveles de expresión, del promotor son sondas y cebadores específicos del gen PCDHGC3. La secuencia de nucleótidos del gen PCDHGC3 ha sido divulgada en el método de la invención. De forma similar, en otra realización particular, la proteína codificada por el gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas es la proteína PCDHGC3. Por tanto, los reactivos para cuantificar los niveles de metilación, o los niveles de expresión, del promotor son anticuerpos que se unen específicamente a la proteína PCDHGC3. Se han divulgado previamente ejemplos de anticuerpos específicos para la proteína PCDHGC3.

10
15

Adicionalmente, la presente invención también abarca kits que comprenden los agentes inhibidores de la invención para su uso en el tratamiento y/o la prevención de la metástasis del cáncer en un sujeto que padece de dicho cáncer. Se han divulgado en párrafos anteriores ejemplos de agentes inhibidores de la actividad de la proteína que es codificada por un gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas. En una realización particular, los agentes inhibidores de la invención son específicos al gen PCDHGC3 o la proteína PCDHGC3. Ejemplos de estos agentes inhibidores se divulgan anteriormente en la presente descripción.

20
25

Todas las realizaciones particulares del método de la invención y el agente inhibidor de la invención son aplicables a los kits de la invención y a sus usos.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que es entendido comúnmente por un experto en la técnica al que esta invención pertenece. Pueden utilizarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica de la presente invención. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones el término “comprender” y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes, o etapas. Objetos, ventajas y características adicionales de la invención resultarán evidentes

30
35

para los expertos en la técnica tras el examen de la descripción, o pueden aprenderse mediante práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitativos de la presente invención.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1. Las huellas de la metilación del ADN de tejidos con SDHB-PPGL muestran diferencias entre los SDHB-bPPGL y los SDHB-mePPG. (A) Agrupamiento jerárquico no supervisado y mapa térmico (heatmap) que incluye dinucleótidos CpG con metilación de ADN diferencial entre los SDHB-bPPGL y los SDHB-mePPGL. Los valores de metilación medios se muestran de 0 (azul) a 1 (amarillo). (B) Distribución de sitios CpG hiper- e hipometilados en relación con el estado de islas CpG (panel superior) y diferentes regiones genómicas (panel inferior) en comparación con el fondo de la matriz.

15

Figura 2. Metilación de largo alcance (long-range) de los cluster PCDHA y PCDHG en SDHB-mePPGL. (A) Representación esquemática de la región genómica que contienen los cluster PCDHA, PCDHB y PCDHG. El gen PCDHGC3 está resaltado por un cuadrado rojo. Los datos en el gráfico muestran un ejemplo representativo de los valores beta de las sondas indicadas localizadas en las regiones genómicas indicadas como A y B en SDHB-mePPGL y SDHB-bPPGL incluidos en el conjunto de descubrimientos de los PPGLs. (B) Niveles de ARNm de los genes PCDHA, PCDHB y PCDHG expresados en paraganglios normales (n=3 cuerpos carotídeos humanos independientes), bPPGL no mutante en SDHx (n=9), SDHD-bPPGL (n=5), y SDHB-bPPGL (n=2). Los datos se obtienen de un conjunto descrito de datos de micromatrices de Affymetrix (Merlo *et al.* 2012, J Clin Endocr Metab 97(11):E2194-200). (C) Datos de metilación del promotor PCDHGC3 según se determina por modificación de ADN con bisulfito, amplificación de ADN y pirosecuenciación en 4 SDHB-mePPGL y 2 SDHB-bPPGL incluidos en la serie de descubrimientos. *p=0,04.

30

Figura 3. Metilación de nivel elevado del promotor PCDHGC3 en los SDHB-mePPGL. (A) Representación esquemática de la estructura del gen PCDHGC3 y la región genómica que contiene los sitios CpG seleccionados para estudios de validación. (B-E) Representación gráfica de los porcentajes de metilación detectados en nuestra serie de validación (B-C) o la serie TCGA (D-E), que incluye los PPGL indicados, que fueron clasificados de acuerdo con el diagnóstico confirmado de metastásicos

35

(mePPGL) o no metastásicos (bPPGL) (B,D) o de acuerdo a la presencia (mut SDHB) o ausencia (wt SDHB) de mutaciones en la línea germinal en los bPPGL y mePPGL (C,E). (D-E). Los datos de metilación de tejidos primarios y metastásicos similares se representan gráficamente en el panel F. Tal como se muestra, se analizaron 2 y 3
 5 tejidos metastásicos de diferentes sitios anatómicos para el paciente 1 y 4, respectivamente. Los datos de dos PPGL primarios estaban disponibles para el paciente 5 de la serie TCGA. (G) Niveles de ARNm de PCDHGC3 determinados por RT-qPCR en 4 SDHB-mePPGL y 3 SDHB-bPPGL. (H) Representación gráfica de los niveles de metilación del ADN y de ARNm para PCDHGC3 en cada una de las
 10 muestras analizadas en el panel G. (I) Niveles relativos del ARNm de PCDHGC3 en tumores metilados o no metilados incluidos en la base de datos de TCGA. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

Figura 4. Significancia clínica de la metilación de PCDHGC. (A) Curva característica operativa del receptor (curva ROC) que muestra la capacidad de metilación de PCDHGC3 (19%) a la hora de distinguir SDHB-PPGL metastásicos de no metastásicos. El área bajo la curva es 89,7%. (B) Representación gráfica de los porcentajes de metilación detectados en nuestra serie de validación incluyendo bPPGL y mePPGL con mutaciones en SDHB. Se calcularon los valores negativos (NPV) y
 20 positivos (PPV) para niveles de metilación al 19%. (C, D) Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para pacientes con SDHB-PPGL [nuestra serie de validación (C); nuestra serie de validación + serie TCGA (D)] estratificadas por sus niveles de metilación de PCDHGC3.

Figura 5. Ausencia de metilación del promotor de PCDHGC3 en células con niveles reducidos de proteínas SDHB y niveles aumentados de cualquiera de HIF-1 α o HIF-2 α . (A, D) Análisis de transferencia de tipo Western de la expresión de SDHB en 786-O (+) y 786-O (-) (A) o RCC4 (+) (D) Células seleccionadas después de transfección con plásmidos lentiCRISPR portadores de ARN de guía única (de las siglas en inglés sgRNA) de PCDHGC3 (KO) o un vector vacío (C). Se incubaron células RCC4 (+)
 30 transfectadas bajo condiciones (Nx, 21% O₂) o hipóxicas (Hx, 1% O₂) durante 12 horas antes de su posterior análisis. (B,E) Niveles de ARNm de SDHB en células de control (C) y en células inactivadas (*knockout*) de PCDHGC3 (KO): 786-O (panel B) y RCC4 (panel E). (C, F) Niveles de metilación de PCDHGC3 en células de control (C) y
 35 células inactividad (*knockout*) de PCDHGC3 (KO): 786-O (panel C) y RCC4 (panel F). **** $p < 0,0001$.

Figura 6. Los niveles disminuidos de PCDHGC3 inducen la proliferación, migración a invasión celular. Células 786-O (+) y RCC4 (+) fueron transfectadas de forma estable con ARNhc de PCDHGC3 (hcPCDHGC3) o el vector de control ARNhc (Ctrl). (A, C) Niveles de ARNm de PCDHGC3 en Ctrl y células hcPCDHGC3. (B,D) La proliferación celular después del silenciamiento de PCDHGC3 fue determinada mediante conteo de células en el tiempo en células incubadas bajo condiciones normóxicas o hipóxicas (1% O₂). Los datos se representan como la media \pm d.e. de dos experimentos realizados por triplicado. (E) Análisis del ciclo celular de las células indicadas como evaluadas por citometría de flujo. (F) Ensayos de formación de colonias. Se sembraron mil células por placa por triplicado para cada condición, y se sometieron a tinción con violeta cristal en el día 14. Se muestran imágenes representativas de células con tinción con violeta cristal. El número relativo de colonias (n=3) se representa gráficamente. (G, H) Se realizan ensayos de curación de heridas en las células indicadas. (G) Se analizó la tasa de migración frontal de monocapas de células mediante microscopía con vídeo time-lapse (grabación durante intervalos de tiempo); al menos 10 campos diferentes fueron elegidos aleatoriamente a través de la longitud de la herida. Los valores son la media de la media \pm d.e. de dos experimentos independientes. (H) Imágenes representativas capturadas con un objetivo de 10 aumentos en el momento en que se realiza la herida (0 horas) o 3 horas después de que se realice la herida (3 horas). (I, J) 786 (+) (I) y RCC4 (+) (J) Se permitió la migración de células de control (Ctrl) y células hcPCDHGC3 cultivadas como esferoides tumorales durante 20 horas, y se grabaron imágenes en time-lapse con una resolución de tiempo de 30 minutos. El área esferoide transversal de 10 esferas tumorales en cada condición experimental se midió en los puntos de tiempo indicados (J). Se muestran imágenes representativas de películas en time-lapse en los puntos de tiempo indicados en los paneles I y J. *p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001.

Figura 7. Estimaciones Kaplan-Meier de supervivencia total entre pacientes con CCRCC. Los pacientes se clasifican de acuerdo con el nivel de expresión de PCDHGC3: alta expresión, $\geq 11,8$; baja expresión, $< 11,8$.

Figura 8. Estimaciones Kaplan-Meier de la supervivencia total entre pacientes con cáncer de colon. (A) Los pacientes se clasifican de acuerdo con el nivel de metilación de PCDHGC3: alta metilación, $\geq 55\%$; baja metilación, $< 55\%$ (A) o de acuerdo con el

nivel de los niveles de transcritos de PCDHGC3: alta expresión, $\geq 8,98$; baja expresión, $< 8,98$ (B).

EJEMPLOS

5

Ejemplo 1

I. MATERIALES Y MÉTODOS

10 **Especímenes Tumorales**

Se obtuvieron muestras de sangre de pacientes con PPGL que fueron diagnosticado y tratados entre 2005 y 2016 (Hospital Universitario Central de Asturias, el Complejo Universitario de Navarra, el Hospital Provincial de Castellón, el Hospital General Virgen de la Luz, el Hospital Gregorio Marañón, el Hospital de Bellvitge, el Hospital
15 Clínico Universitario de Valencia, el Hospital Virgen del Rocío y Hospital Macarena en España) y en 1975 y 2011 (Mayo Clinic, Rochester, Minnesota). Se obtuvieron paraganglios (cuerpos carotídeos y glándula adrenal) de 6 autopsias independientes. Se obtuvo ADN genómico de tejidos o bien congelados o bien incluidos en parafina. Se obtuvieron materiales congelados del núcleo del tumor, contenían más del 60% de
20 células tumorales y se congelaron inmediatamente en el momento de la resección quirúrgica y se almacenaron a -80°C en *RNAlater* (marca registrada de Ambión) hasta su procesamiento. Se obtuvo consentimiento informado escrito de los pacientes y el estudio fue aprobado por el Comité Ético de nuestra institución. Se consideró que un PPGL era maligno cuando el paciente presentaba metástasis en sitios distantes del
25 tumor primario carentes de células cromafines.

Análisis de mutación

Se aisló ADN genómico utilizando un kit QIAmp DNA mini kit (Qiagen, Inc., Chatsworth, CA) y posteriormente se trató con RNasa A (1 unidad/ml) a 37°C durante
30 5 minutos del ADN de la sangre. El análisis de la mutación se realizó mediante secuenciación directa tal como se ha descrito anteriormente. Se analizaron genes VHL y SDHx para determinar la presencia de grandes deleciones en el ADN de la sangre utilizando el método de amplificación de sondas dependiente de ligandos múltiples (MLPA), siguiendo las recomendaciones del fabricante (SALSA MLPA P016 y P226,
35 respectivamente, MRC Holanda, Países Bajos). No se pudo realizar ningún análisis de mutación a nivel somático debido a la cantidad limitada de ADN. No obstante, se

espera que la tasa de mutaciones SDHx en el ADN del tumor DNA sea mínima tal como se sugiere por trabajos publicados anteriormente. Además, la inmunohistoquímica SDHB en algunos tumores que carecen de mutaciones SDHx fue positiva sugiriendo de este modo la ausencia de mutaciones SDHx somáticas.

5

Análisis de metilación en genoma completo

Se extrajo ADN tumoral con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y bisulfito convertido antes del análisis en genoma completo de la metilación con la matriz Infinium Human Methylation450 BeadChip (Illumina®, San Diego, CA, EE.UU.) en el “Centro Nacional de Genotipado” español CEGEN-ISCIII. Los archivos con datos en bruto se importaron y se procesaron previamente utilizando el paquete de R/Bioconductor minfi (versión 1.14.0). Las señales de metilación en bruto fueron normalizadas utilizando el método de subconjunto cuantil dentro de la matriz de normalización (SWAN, por sus siglas en inglés). Una medida de metilación se definió como defectuosa si tenía un valor p de detección por encima de 0,01. Las sondas con más de 2 medidas defectuosas se retiraron del conjunto de datos. La metilación se describió como el valor beta, que se encontraba en un rango de 0 (sin metilación) y 1 (metilación completa).

Anotación, análisis de ontología génica (GO, por sus siglas en inglés) y análisis de enriquecimiento con histona

Los conjuntos de sondas se convirtieron a conjuntos de genes utilizando la información de la anotación del paquete de Bioconductor TxDb.Hsapiens.UCSC.hg19.knownGene (versión 3.1.2). Se asignó una sonda a un gen si la sonda estaba contenida dentro del área de todas las regiones genómicas representadas por los diferentes transcritos que pertenecen a dicho gen o dentro de una región de 2 kb aguas arriba del correspondiente sitio de inicio de la transcripción. Después de la conversión sonda a gen, los conjuntos de genes de interés fueron analizados utilizando la herramienta de software HOMER v4.9, 2-20-2017. El conjunto completo de genes en el HumanMethylation450 se utilizó como fondo. Este software también se utilizó para el análisis de GO y el análisis de rutas, utilizando diferentes bases de datos, tales como, la base de datos Gene Ontology (GO) Biological Process, las ontologías de la base de datos Molecular Signatures Database (MSigDB) (Subramanian A, et al. 2005. *Proc Natl Acad Sci U S A.*,102:15545–15550), y la Enciclopedia Kyoto de genes y genomas (KEGG) y la base de datos de análisis de rutas metabólicas Reactome. Para capturar adicionalmente la relación entre los términos, utilizamos el software Metascape (<http://metascape.org>) (Tripathi S, et al. 2015, *Cell Host Microbe*.18:723–735); se

seleccionó el conjunto de términos enriquecidos y se representó como un gráfico de red, donde los términos con similitud >0,3 están conectados por bordes. Seleccionamos los términos con los mejores valores de p, con la restricción de que no existan más de 15 términos y no más de 250 términos en total.

5

Para analizar el enriquecimiento de marcas de histona en el subconjunto de sondas, se utilizó la información contenida en el UCSC Genome Browser Broad Histone track del proyecto ENCYClopedia Of DNA Elements (ENCODE). Se utilizó la prueba exacta de Fisher para determinar si había enriquecimiento significativo de marcas de histona en el subconjunto de interés. Se ajustaron los valores p para múltiples comparaciones utilizando el método de Benjamini-Hochberg para controlar la tasa de descubrimientos falsos (FDR, por sus siglas en inglés). Se utilizó un nivel de significancia de 0,05 para determinar si la combinación proporcionada de la marca de histona y la línea celular presentaron un cambio significativo en la proporción. Se utilizó el logaritmo en base 2 de las razones de posibilidades (OR, del inglés Odds ratio) como una medida del tamaño del efecto.

10
15

Análisis de metilación del ADN

El nivel de metilación de los CpGs seleccionados se validó mediante modificación de ADN con bisulfito, amplificación del ADN y pirosecuenciación (PyroMarkQ24 Advanced System®). Los cebadores utilizados para la amplificación por PCR (5'-GGGATGAGGTAGAGATTGAATAG-3' [SEQ ID NO: 8]; 5'-CCTCCAAACCTCTAAAACCATCTCA-3' [SEQ ID NO: 9]) y la secuenciación (5'-GAGGTAGAGATTGAATAGT-3' [SEQ ID NO: 10]) se diseñaron con la herramienta PyroMark assay designer. Esta aproximación facilitó un análisis de los niveles de metilación de 8 sitios CpG dentro de un fragmento por PCR con bisulfito de 182-pb. La significancia estadística de las diferencias entre grupos de tumores fue evaluada utilizando una prueba de t con un umbral de significancia de 0,05.

20
25

30 Generación de líneas de células *Knockout* utilizando la técnica de Repeticiones Palindrómicas Cortas Agrupadas y Regularmente Interespaciadas (CRISPR)-Cas9

Se diseñaron dos ARN de guía única o sgRNA para el vector lentiCRISPR v2 siguiendo las directrices de GeCKOv2 humano: 5'-caccgTCGCCCTCTCCTTGAGGCGC-3' [SEQ ID NO: 11] - 5'-aaacGCGCCTCAAGGAGAGGGCGAc-3' [SEQ ID NO: 12] y 5'-

35

caccgGGCCGGCAACCGGCGCCTCA-3' [SEQ ID NO: 13] - 5'-
aaacTGAGGCGCCGGTTGCCGGCCc-3' [SEQ ID NO: 14]. A continuación, se cortó
150 ng del plásmido lentiCRISPR con Esp3I (Thermo Scientific) y se ligó con oligos
hibridados (0,5 µM) y T4 ADN ligasa (NEB) en la misma reacción, que consistía en 10
5 ciclos de 5 minutos a 37°C seguido de 10 minutos a 16°C. Los dos plásmidos que
albergan secuencias de sgARN o vectores vacíos (como controles) fueron
transfectados en células 293T en presencia de plásmidos auxiliares de lentivirus (VSV-
G y PAX), y los sobrenadantes se recogieron después de 24 horas y 48 horas de la
transfección y se mezclaron. Los virus se utilizaron para infectar células en matraces
10 de cultivo al 80% de confluencia, con 4 µg/ml de polibreno. Se seleccionaron clones
con 4 µg/ml de puromicina y 500 µg/ml G418 durante dos semanas.

Silenciamiento génico inducido por ARNhc

Constructos de ARNhc o ARNhc de PCDHGC3 no diana clonados en el vector
15 lentiviral GIPZ fueron obtenidos a partir de Dharmacon. Para la infección viral de
células 786-O o RCC4, el medio habitual fue reemplazado con un medio de cultivo que
contiene 5 µg/ml polibreno. Las células fueron expuestas a continuación a lentivirus
durante 48 horas, se lavaron y se cultivaron en medios de selección que contienen 4
µg/ml de puromicina durante 10 días.

20

Transferencia de tipo *Western*

Las células fueron homogeneizadas en un tampón de lisis con un contenido de HEPES-
KOH 50 mM, pH 7,3, NaCl 250 mM, EDTA 5 mM, Nonidet P-40 al 0,2%, ditiotritol 5
mM, e inhibidores de la proteasa (fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,5 mM, Na₃VO₄ 1
25 mM, 1 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de pepstatina, 10 µg/ml de leupeptina) durante 10
minutos a 4°C. Después de la centrifugación a 8.000 x g durante 5 minutos, se
recuperaron los sobrenadantes, y se determinaron las concentraciones de proteínas
con el reactivo de Bradford de ensayo de proteínas. Los lisados (20 µg) se cargaron y
se resolvieron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS a 6% seguido
30 de transferencia a una membrana de difluoruro de polivinilideno de Immun-Blot (Bio-
Rad). Las membranas fueron hibridadas con anti-SDHB (Sigma) a una relación 1:1000
o anticuerpos anti-β-actina (Sigma) a una relación 1:10000 y se desarrollaron con
anticuerpos secundarios (IRDye 800CW anti-IgG de conejo y IRDye 800CW anti-IgG
de ratón IgG, LI-COR Biosciences) marcados con fluorescencia. Se grabaron
35 imágenes de membranas con el sistema de toma de imágenes en infrarrojo Odyssey
(Li-Cor Biotechnology).

Análisis del ciclo celular

Se recogieron las células cultivadas a una confluencia del 70% y se fijaron en etanol al
5 70%, seguido de tratamiento con RNasa A y tinción con yoduro de propidio (PI). Se
realizó un análisis de citometría de flujo para cuantificar la distribución de células en
las fases G1, S, y G2–M del ciclo celular.

Cuantificación de ARNm

10 Se aisló el ARN total con el Kit de aislamiento de miARN mirVana™ (Ambion) de
acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizó un ensayo TaqMan (Applied
Biosystems) para analizar la expresión de PCDHGC3. Cada muestra fue analizada
para determinar la peptidilprolil isomerasa A (PPIA) ARNm para normalizar las
15 cantidades de entrada de ARN y realizar la cuantificación relativa. Todas las
reacciones fueron realizadas por triplicado, y la expresión de ARNm fue normalizada
contra controles endógenos utilizando el método comparativo delta-delta CT.

Ensayo de supervivencia clonogénico

Para estudiar el potencial de auto-renovación, las células fueron sembradas a una
20 densidad muy baja de 1×10^3 células por 100x17 mm por placa y se cultivaron durante
10 días. Posteriormente, las células se fijaron con metanol helado sobre hielo durante
10 minutos y se colorearon con violeta cristal al 0,5% antes de que los clones se
contaran manualmente.

25 Ensayos de invasión celular y grabación de vídeo en time-lapse

Para la generación de esferas tumorales, las células fueron cultivadas en un medio de
formación de esferoide (medio de cultivo de crecimiento complementado con
metilcelulosa al 0,2%) en un entorno convexo no adhesivo durante 12 horas a 37°C y
5% CO₂. Las esferas tumorales se mezclaron con una matriz de colágeno (2,5 mg/ml)
30 y se incubaron durante 30 minutos a 37°C antes del análisis microscópico. La toma de
imágenes de microscopio en time-lapse fue realizada en un microscopio Zeiss
AxioObserver Z1 (Carl Zeiss, Alemania) con un objetivo de lentes de inmersión en
aceite Plan-Apochromat 40X/1,3 (NA=1,3, distancia de trabajo=0,21 mm) o Plan-
Apochromat 63X/1,4 (NA=1,4, distancia de trabajo=0,19 mm), una cámara (AxioCam
35 MRm; Carl Zeiss), y un accesorio Apotome (ApoTome 2; Carl Zeiss). Se tomaron
imágenes en mosaico utilizando un software AxioVision (Carl Zeiss) durante un

periodo de 20 horas con una resolución de tiempo de 30 minutos. Se midió el área transversal del esferoide de 10 esferas tumorales en cada condición experimental en cada punto de tiempo para calcular la velocidad de invasión.

5 Ensayos de curación de heridas

Se cultivaron células para su confluencia en un inserto (Ibidi) de silicona de 2 pocillos con un hueco libre de células definido. Después del acoplamiento celular, los insertos se retiraron, y cualquier célula flotante fue retirada con un lavado extenso con medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Los movimientos lineales de las células fueron monitorizados utilizando un microscopio Zeiss AxioObserver Z1 con un objetivo de 20× aumentos. Fueron capturadas imágenes en intervalos de 15 minutos durante 12 horas de cinco campos diferentes en cada pocillo. Se eligieron tres campos aleatoriamente a través de la longitud de la herida para medir la tasa de migración de células en el área herida.

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software estadístico SPSS versión 19 (SPSS, Inc., Chicago, IL) tal como se ha descrito previamente o el software R 3.5.2. $p < 0,05$ fue definido como estadísticamente significativo. Para evaluar la asociación entre los niveles de metilación de PCDHGC3 y la presencia de metástasis en pacientes con mutaciones SDHB, se utilizó un modelo de regresión logística univariante para calcular la razón de posibilidades (OR) y un intervalo de confianza del 95%.

II. RESULTADOS

Perfil de Hipermetilación de SDHB-mePPGLs

El estado de metilación del ADN de >450.000 sitios CpG se comparó en 18 tejidos con PPGL y 4 paragangliónicos normales, utilizando Matrices de Metilación Illumina Infinium. La Tabla 2 muestra las características clínicopatológicas y genéticas detalladas incluidas en esta serie de descubrimientos. Tal como se muestra, 12 PPGL presentaron un comportamiento clínico benigno después de un periodo medio de seguimiento de 101 ± 18 meses y 6 PPGL presentaron metástasis sincrónica. Cuatro de

los 6 mePPGL portaban mutaciones SDHB y los otros dos tumores carecían de cualquier mutación conocida.

A	B	C	D	E	F	G
14	PCC	Sí	NINGUNO		136	0
35	H&N	Sí	SDHB	c725G>A	NA	NA
27	H&N	Sí	NINGUNO		144	84
55	H&N	No	SDHB	c.725G>A	142	142
55	H&N	No	NINGUNO		NA	NA
25	H&N	No	SDHD	c.33C>A	120	120
66	H&N	No	NINGUNO		108	108
42	H&N	No	NINGUNO		109	109
39	H&N	No	SDHD	c.383InsT	105	105
44	A_PGL	Sí	SDHB	c725G>A	29	0
29	A_PGL	No	SDHB	del exón 1	96	96
29	H&N	No	NINGUNO		84	84
44	H&N	No	SDHD	c.191_192delTC c.544_550delGGGCTC	90	90
45	H&N	No	SDHB	T	89	89
39	H&N	No	SDHD	c.191_del192delTC	95	95
45	H&N	No	NINGUNO		80	80
48	H&N	Sí	SDHB	del exón 1	9	0
48	H&N	Sí	SDHB	c.166_170delCCTCA	32	10

5 **Tabla 2.** Datos clínicos y genéticos de pacientes con PPGL incluidos en el ensayo de matrices de metilación. H&D: Cabeza y cuello; A_PGL: Paraganglioma abdominal; PPC: feocromocitoma; Columnas: A: Edad en el diagnóstico (años); B: Localización del tumor; C: Enfermedad metastásica; D: Gen mutado; E: Mutación; F: Seguimiento (meses); G: meses sin metástasis.

10

Las diferencias significativas en la metilación entre los PPGL y los controles normales implicaron únicamente 25 CpG diferencialmente metilados (21 hipermetilados y 4 hipometilados) localizados en las regiones del promotor de 19 genes (Tabla 3).

control_pgl.hyper.450k	control_pgl.hypo.450k
cg21625301	cg00159780
cg26435961	cg07521889
cg09088580	cg15244360
cg01927162	cg24888989

cg16755833
 cg08847919
 cg04833853
 cg10402321
 cg18053228
 cg17091056
 cg03461781
 cg20848921
 cg00488747
 cg02099148
 cg07931190
 cg01736389
 cg00663986
 cg10062109
 cg10638573
 cg10256045
 cg01497527

Tabla 3. Sondas con metilación diferencial en los PPGL versus paraganglios normales.

5 No se encontraron diferencias significativas entre los controles normales y los SDHx-PPGL en esta serie o entre SDHx-PPGL y PPGL que carecen de mutaciones SDHx. Sin embargo, los datos revelaron que el perfil de metilación fue significativamente diferente en el grupo de SDHB-PPGL cuando se comparan tumores metastásicos (n=4) con no metastásicos (n=3): los SDHB-mePPGL tenían 1960 sitios CpG (se
 10 atribuyen a 1119 genes) con valores medios de metilación más de dos veces más elevados que los de los SDHB-bPPGL ($p < 0,01$) (Figura 1A). Únicamente se observaron 16 sitios CpG hipometilados en los SDHB-mePPGL comparados con los SDHB-bPPGL. Los sitios CpG hipermetilados estaban sumamente enriquecidos en islas CpG (CGI) (en compa??? “CGI-shore” (orilla de islas), “CGI shelves” (salientes de
 15 islas) y no-CGI) y se localizaron en su mayoría dentro de las regiones del promotor del gen (Figura 1B).

El análisis del conjunto de genes hipermetilados identificado en los SDHB-mePPGL mediante GO y análisis de rutas reveló un enriquecimiento significativo de términos
 20 GO relacionados con la diferenciación neuronal, la transmisión sináptica y la adhesión celular. Estadísticamente se observaron solapamientos significativos con genes que poseen la marca H3K27 trimetilada en sus promotores y dianas génicas del complejo

represor transcripcional PRC2/EED-EZH2. A nivel de cromosomas, una observación sorprendente fue la identificación de una región larga en el locus del cromosoma 5q31 (aproximadamente 800 Kb) que tenía una alta densidad de sitios CpG hipermetilados y abarcados en los cluster de genes PCDHA, PCDHB y PCDHG. Esta observación provocó que los inventores investigaran si cualquiera de esos genes PCDH podrían ser genes candidatos para estar implicados en el comportamiento metastásico de los SDHB-PPGL.

En primer lugar, se exploraron los niveles de expresión de genes PCDH individuales en paraganglios normales y PPGL. Para esta finalidad, consultamos conjuntos de datos de micromatrices de Affymetrix (Merlo, A. et al. 2012. J Clin Endocrinol Metab, 97: E2194-200) y observamos que los niveles de ARNm de todos los genes PCDH fueron similares en bPPGL y paraganglios normales. Más aún, de los PCDH individuales detectables por conjuntos de sondas múltiples, los PCDHGC3 mostraron la expresión más robusta (Figura 2). La validación experimental de los datos de matrices de metilación se obtuvo mediante secuenciación con bisulfito del promotor de PCDHGC3 en 4 SDHB-mePPGL y 2 SDHB-bPPGL. Tal como se muestra en la Figura 2, los datos confirmaron los resultados obtenidos de las matrices de metilación, mostrando que el promotor de PCDHGC3 está no metilado en los SDHB-bPPGL y experimenta metilación de novo en los SDHB-mePPGL. Por tanto, se seleccionó el gen PCDHGC3 para estudios adicionales.

Metilación de alto nivel del promotor de PCDHGC3 en SDHB-mePPGL primarios y sus metástasis.

Se exploró el estado de metilación de PCDHGC3 mediante secuenciación con bisulfito en una serie de validación de PPGL (Tabla 4).

A	B	C	D	E	F	G	H
47, F	H&N	No	SDHB	c.88_314+247del	No	36	36
17, M	H&N	No	SDHB	c.644delC	No	48	48
46, M	H&N	No	SDHB	c.166_170delCCTC A	No	60	60
32, M	H&N	No	SDHB	c.269G>A	No	120	120
39, F	H&N	No	SDHB	del exón 3	No	84	84
41, F	H&N	No	SDHB	c.761C>T	No	96	96
54, F	H&N	No	SDHB	c.79C>T	No	72	72
44, M	H&N	No	SDHB	c.166_170delCCTC A	No	78	78

ES 2 792 150 A1

66, M	Ab	No	SDHB	del exón 1	No	60	60
UN, M	Ab	No	SDHB	c.688C>T	No	UN	UN
66, M	Ab	No	SDHB	del exón 1	No	60	60
38, F	Ab	No	SDHB	c.558-3 C>G	No	180	180
33, F	A_PGL	No	SDHB	del exón 2	No	30	30
17, M	Ad	No	SDHB	del exón 6-8	No	37	37
20, F	H&N	No	SDHB	c.649C>T	No	22	22
6, M	Ab	No	SDHB	del exón 1	No	36	36
49, F	Ad	No	Sin SDHx		No	12	12
UN	H&N	No	Sin SDHx		UN	UN	UN
UN	H&N	No	Sin SDHx		UN	UN	UN
UN	H&N	No	Sin SDHx		UN	UN	UN
47, F	Ad	No	Sin SDHx		No	13	13
66, M	H&N	No	SDHB	c.136C>T	No	78	78
40, F	Ad	No	NF1	UN	No	185	185
UN, F	Ad	No	Sin SDHx *&		No	62	62
UN, F	Ad	No	Sin SDHx *&		No	58	58
39, F	Ad	No	Sin SDHx *		No	12	12
46, F	Ab	Sí	SDHB	c725G>A	Sí	29	0
65, M	Ab	Sí	SDHB	c.558-3 C>G	No	120	0
58, M	Ab	Sí	SDHB	c.637dupA	No	36	9
54, F	H&N	Sí	SDHB	c.166_170delCCTC A	Sí	33	10
48, M	Ab	Sí	SDHB	del exón 1	Sí	9	0
36, M	VC	Sí	SDHB	c.423+1G>A	No	60	0
14, M	Ab	Sí	SDHB	del exón 1	No	36	UN
43, F	Ab	Sí	SDHB	del exón 6-8	Sí	96	0
16, M	Ab	Sí	SDHB	del exón 1	No	36	UN
22, M	Ab	Sí	SDHB	c.166_170delCCTC A	No	36	UN
36, F	TC	Sí	SDHB	c.688C>T	No	36	0
17, F	Ab	Sí	SDHB	c.637dupA	No	18	0
50, F	Ab	Sí	SDHB	c.637dupA	No	22	0
44, F	Ab	Sí	SDHB	c.1-?_72+?del	No	36	0
50, F	Ab	Sí	SDHB	c.637dupA	No	24	0
42, F	Ab	Sí	SDHB	del exón 1	No	36	0
66, M	Ad	Sí	SDHB	UN	No	144	84
47, F	Ab	Sí	SDHB	del exón 1	Sí	36	0
24, M	Ab	Sí	SDHB	-	No	72	2
46, M	Ab	Sí	SDHB	-	No	60	0
61, F	SC	Sí	SDHB	-	Sí	132	0
33, M	Ab	Sí	SDHB	-	No	108	0
67, F	Ab	Sí	SDHB	-	Sí	120	36
57, M	Ab	Sí	SDHB	-	No	60	0
38, F	Ab	Sí	SDHB	-	No	192	4

31, F	Ab	Sí	SDHB	-	Sí	120	36
53, F	Ab	Sí	SDHB		No	96	0
69, M	Ab	Sí	Sin SDHx	#	No	99	29
54, F	Ad	Sí	Sin SDHx		No	108	0
20, M	TC	Sí	Sin SDHx	&#	No	36	UN
39, M	H&N	Sí	Sin SDHx	*&	Sí	144	84
29, F	Ab	Sí	Sin SDHx		Sí	84	18
14, F	Ad	Sí	Sin SDHx	*	No	136	0
53, M	Ad	Sí	Sin SDHx		Sí	32	10
60, M	Ad	Sí	Sin SDHx		No	48	12
75, M	Ad	Sí	Sin SDHx		Sí	60	36
78, M	Ad	Sí	Sin SDHx		Sí	2	2
4, F	Ad	Sí	Sin SDHx		No	96	12
15, F	Ad	Sí	NF1	UN	No	95	94
36, M	Ad	Sí	NF1	UN	Sí	12	0

Tabla 4. Resumen del grupo de pacientes utilizado para la validación de la metilación de *PCDHGC3*. Género: M: Masculino, F: Femenino, UN: Desconocido; Localización del tumor: H&N: Cabeza y cuello, Ab: Abdominal, Ad: Adrenal; A_PGL: PGL abdominal; TC: Torácico, VC: Vesical, CS: Sacro; Columnas: A: Edad en el diagnóstico, Género; B: Localización del tumor; C: Enfermedad metastásica; D: Gen mutado; E: Mutación; F: Exitus; G: Seguimiento (meses); H: meses sin metástasis.

La región genómica seleccionada para la validación se muestra en la Figura 3A. No se observó metilación en dos glándulas adrenales humanas no tumorales ni en dos carcinomas neuroendocrinos adrenales, tumores no relacionados apareciendo en el mismo órgano. En contraste, se detectó metilación de novo de *PCDHGC3* en PPGL que era significativamente más alta en los mePPGL en comparación con bPPGL (Figura 3B) ($p < 0,0001$). La metilación no estaba asociada con variables clínicas tales como edad, sexo, o localización del tumor. Sin embargo, cuando se considera la presencia o ausencia de mutaciones de la línea germinal, se observó que la metilación de novo estaba restringida a tumores con mutaciones SDHB, excepto por 2 mePPGL sin mutaciones SDHB que mostraron niveles de metilación de 22% y 50%. De forma importante, el nivel de metilación fue significativamente más elevado en los SDHB-mePPGL (media=37,24%; d.e.=3,93%, n=27) que en los SDHB-bPPGL (media=9,59%; d.e.=2,18%, n=19) (Figura 3C) ($p < 0,0001$). Un análisis de regresión logística univariante reveló que la metilación del promotor de *PCDHGC3* estaba

significativamente asociada con la metástasis en pacientes con mutaciones SDHB (razón de posibilidades = 1,105; 95% CI = 1,033 a 1,18).

De forma importante, en los SDHB-mePPGL con altos niveles de metilación, el diagnóstico de tumores primarios y enfermedad metastásica fue sincrónico en todos los casos excepto en siete que presentaron un tiempo sin metástasis que se encontraba en un rango de 1 a 19 años. La ausencia de metástasis en pacientes con SDHB-bPPGL se confirmó con ensayos de tomas de imágenes y exámenes clínicos durante un periodo de seguimiento de $5,6 \pm 3,8$ años.

10

Entre los bPPGL y mePPGL que carecían de mutaciones SDHB, 0 de 7 y 2 de 13 (15%) PPGL, respectivamente, mostraron niveles de metilación por encima del 20%, con valores de metilación del 22% y 50% en los 2 casos de mePPGL. El periodo de seguimiento de los bPPGL fue $5,5 \pm 3,9$ años.

15

A continuación, se realizó una validación in silico utilizando datos de metilación disponibles públicamente, la cual se obtuvo utilizando la matriz Infinium Human Methylation450 BeadChip, para las muestras de PPGL publicadas en el Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA, del inglés The Cancer Genome Atlas) (Fishbein, L. et al. 2017, Cancer Cell, 31: 181-193). De este grupo de 181 PPGL, se seleccionaron 166 PPGL primarios con diagnóstico confirmado de bPPGL o mePPGL. Se calculó la media de los niveles de metilación, que se detectó con 5 sondas consecutivas que hibridaron dentro del promotor de PCDHGC3 (ver Figura 3A), para cada una de las muestras de tumores incluidas en la serie. Los análisis de estos datos mostraron que los niveles de metilación de PCDHGC3 fueron significativamente más elevados en los mePPGL que en los bPPGL ($p < 0,0001$) (Figura 3D). Los tumores con altos niveles de metilación de PCDHGC3 no portaron mutaciones somáticas de PCDHGC3 o deleciones genómicas en el locus cromosómico de PCDHGC3 5q31 donde está localizado PCDHGC3. Aunque el número de SDHB-mePPGL en esta serie fue bastante limitado ($n=5$), se realizó un análisis segregando los PPGL según la presencia o ausencia de mutaciones SDHB de la línea germinal. Tal como se muestra en la Figura 3E, la metilación de novo de PCDHGC3 se limitó en su mayoría a los SDHB-PPGL. Los niveles de metilación fueron más elevados en los SDHB-mePPGL (mediana=43; media=40,55%; d.e.=14,35%, $n=5$) que en los SDHB-bPPGL (mediana=14,18%; media=20,1%; d.e.=18,12%, $n=10$; $p=0,024$). Seleccionando el valor de la mediana de metilación de los SDHB-bPPGL como un valor de corte, observamos que

35

la metilación de novo de PCDHGC3 resultó más frecuente en pacientes con SDHB-mePPGL que en pacientes con SDHB-bPPGL (100% versus 50% de los casos, respectivamente). Aunque el periodo de seguimiento descrito de los pacientes con SDHB-bPPGL en la serie del TCGA fue bastante corto [$1,66 \pm 0,76$ años (casos no metilados) y $2,28 \pm 2,14$ años (casos metilados)], se confirmó ausencia de metástasis durante ese periodo de tiempo. Como en la serie de los inventores, dos de los pacientes con SDHB-mePPGL desarrollaron metástasis 4 y 18,81 años, respectivamente, después del diagnóstico del tumor primario. Entre los bPPGL y los mePPGL que carecían de mutaciones SDHB, únicamente 2 de 144 (1,3%) y de 6 (16,6%) PPGL, respectivamente, mostraron metilación de novo de PCDHGC3.

Los niveles de metilación de PCDHGC3 también se analizaron en tejidos parejos primario y metastásico de 4 pacientes con SDHB-mePPGL que fueron incluidos en nuestra serie de validación. En este análisis, también se incluyeron los resultados de 1 paciente con tejido primario y metastásico SDHB-mePPGL que fue descrito en la serie de TCGA. Una comparación de los niveles de metilación del promotor de PCDHGC3 entre el tumor primario y la metástasis reveló que el nivel medio de metilación fue significativamente más elevado en la metástasis (media=67,5%, d.e.=2,09%, n=8) que en el PPGL primario correspondiente (media=38,48%, d.e.=4,18%, n=6) ($p < 0,0001$) (Figura 3F).

Silenciamiento epigenético de PCDHGC3 en SDHB-mePPGL

En conjunto, los datos sugieren que la alteración epigenética en el gen PCDHGC3 podría estar implicada en la fisiopatología de los SDHB-mePPGL. Por tanto, los inventores buscaron determinar si la metilación del promotor de PCDHGC3 está asociada con una disminución en la expresión del gen PCDHGC3. Se realizó un análisis cuantitativo de los niveles de ARNm de PCDHGC3 en un subconjunto reducido de SDHB-PPGL (4 mePPGL y 3 bPPGL) a partir del cual estaba disponible un ARN de alta calidad. Los niveles de ARNm de PCDHGC3 fueron significativamente inferiores (media=0,04; d.e.=0,02) en los SDHB-mePPGL que en los SDHB-bPPGL (media=0,147; d.e.=0,02) ($p=0,023$) (Figura 3G). Además, los niveles de metilación y los niveles de ARNm de PCDHGC3 se correlacionaron inversamente (coeficiente de correlación de Pearson = -0,84, $p=0,0173$), lo que sugiere que la metilación está funcionalmente ligada al silenciamiento génico (Figura 2H). El análisis de la base de datos del TCGA también reveló que los niveles de ARNm de PCDHGC3 fueron significativamente inferiores en los SDHB-mePPGL en comparación con los SDHB-

bPPGL (Figura 3I). También se observó una correlación inversa entre el ARNm de PCDHGC3 y los niveles de metilación en esa serie de pacientes (Coeficiente de correlación de Pearson = -0,314, $p < 0,001$).

5 **Significancia clínica de la metilación de PCDHGC3 en pacientes con SDHB-PPGL**

Para evaluar si la metilación de PCDHGC3 se presentaba como una herramienta predictiva de utilidad sobre tener/desarrollar una enfermedad metastásica en pacientes con mutaciones SDHB, realizamos un análisis de la curva característica operativa del receptor (ROC). El área bajo la curva (AUC), utilizando un valor de corte de niveles de metilación del 19%, fue 0,897 (95% CI = 0,795-0,999). Los valores predictivos negativos (NPV) y positivos (PPV) fueron 88,9% y 86,5%, respectivamente (Figura 4B). El análisis de la curva ROC utilizando los datos de nuestra serie de validación más la serie del TCGA produjo un AUC de 0,871 (95% CI = 0,774-0,968), y el NPV y el PPV fueron, respectivamente, 85,2% y 83,8%.

15

Para evaluar la significancia del pronóstico de la metilación de PCDHGC3, examinamos su asociación con la supervivencia en pacientes con SDHB-PPGL mediante el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier. Todos los pacientes fallecieron debido a PPGL. El valor de corte para definir los mePPGL con una alta o baja metilación de PCDHGC3 fue 28%, que es la mediana del nivel de metilación observado en los SDHB-PPGL. El grupo de metilación elevada de PCDHGC3 mostró una supervivencia global significativamente inferior de la que mostró el grupo de metilación baja de PCDHGC3 [cociente de riesgo (HR): 3,8 (intervalo de confianza de 95% (CI): 1,23-13,66); $p = 0,026$ prueba de Mantel Cox] (Figura 4C). Se obtuvieron resultados similares cuando se añadieron los SDHB-PPGL del grupo del TCGA a nuestra serie [HR:4,16 (95% CI 1,33-11,92); $p = 0,012$ prueba de Mantel Cox] (Figura 4D).

20

25

No se requieren SDHB y HIF- α para la metilación del promotor de PCDHGC3

El hallazgo de que la modificación epigenética de PCDHGC3 estaba en su mayoría limitada a los SDHB-PPGL sugiere que este rasgo está relacionado en cuanto a su mecanismo con la deficiencia de SDHB y el fenotipo metastásico de los SDHB-PPGL. De hecho, el modelo predominante de la metilación del sitio CpG en tumores con deficiencia de SDHx sostiene que la acumulación de succinato en tumores SDHx-PPGL no solamente inducen la acumulación de proteína HIF- α , sino también inhibe la desmetilación oxidativa dependiente de 2-OG, que a su vez produce la hipermetilación

35

del ADN. Por tanto, se sometió a ensayo si la disminución de los niveles de SDHB y/o la acumulación de la proteína HIF- α son suficientes para desencadenar la metilación del promotor de PCDHGC3. El silenciamiento de SDHB se realizó utilizando el método CRISPR-Cas9 en dos líneas de células cancerígenas renales 786-O relacionadas, que carecen (-) o contienen (+) el gen VHL. En la ausencia de VHL, las células 786-O acumulan la proteína HIF-2 α , pero no HIF-1 α , bajo condiciones normóxicas. En contraste, la HIF-2 α se degrada bajo condiciones normóxicas en células 786-O que expresan VHL. Se verificó el SDHB knockout mediante la cuantificación de la proteína SDHB y los niveles de ARNm (Figura 5A y B). Tal como se muestra en la Figura 4C, la metilación de novo del promotor de PCDHGC3 no ocurrió en células 786-O (+) o 786-O (-) con una disminución de los niveles de proteínas SDHB. La misma aproximación se utilizó en las células RCC4 (+) de cáncer renal que expresan VHL transfectado de forma exógena. La Figura 5D-F muestra la ausencia de metilación de novo del promotor de PCDHGC3 en células RCC4 (+) con valores reducidos de la proteína SDHB. También se observó ausencia de metilación después de la exposición de células RCC4 (+) con SDHB silenciado a condiciones hipóxicas (1% O₂, 12 horas) que inducen la acumulación de HIF-1 α . Estos datos sugieren que los niveles reducidos de la proteína SDHB no son suficientes para inducir la metilación de PCDHGC3 y que la actividad de HIF- α no es un requerimiento para la metilación de PCDHGC3 en células deficientes en SDHB.

Una disminución en la expresión génica de PCDHGC3 aumenta la proliferación, migración e invasión celular

Para desenmarañar la relevancia putativa de los eventos epigenéticos de PCDHGC3, se buscó analizar la significancia funcional de la pérdida de PCDHGC3 en fenotipos de células cancerígenas utilizando líneas celulares 786-O (+) y RCC4 (+) en las que la expresión génica de PCDHGC3 fue parcialmente eliminada por la transfección lentiviral del ARNhc (células PCDHGC3-ARNhc). Los niveles de ARNm de PCDHGC3 disminuyeron hasta aproximadamente 20% y 40% en células PCDHGC3-ARNhc-786-O (+) y -RCC4 (+), respectivamente, en comparación con aquellas células transfectadas con el ARNhc de control (Figura 6A y C). Para investigar la posible función de PCDHGC3 en la proliferación celular, se realizó un conteo de células en células PCDHGC3-ARNhc y en las correspondientes células de control. Tal como se muestra en la Figura 6B y D, la inhibición de la expresión de PCDHGC3 aumentó significativamente las tasas de crecimiento celular en ambas líneas de células (aumentos de 8,5-veces y 3,2-veces en el 8º día de cultivo en células 786-O (+) y

RCC4 (+), respectivamente). Por consiguiente, el número de células PCDHGC3-ARNhc-786-O en la fase S del ciclo celular aumentó en un 21% en comparación con el de las células de control (Figura 6E). La proliferación celular también fue promovida en las células de control incubadas bajo condiciones hipóxicas (1% O₂) y este efecto fue
 5 aumentado adicionalmente a continuación del tratamiento con PCDHGC3-ARNhc (aproximadamente aumentos de 2-veces en ambas líneas celulares en comparación con la proliferación en las células hipóxicas de control). La represión de PCDHGC3 también condujo a un aumento significativo (1,6-veces) en el crecimiento clonogénico de las células, lo que sugiere que la actividad de PCDHGC3 está implicada en la
 10 tumorigenicidad (Figura 6F).

Los ensayos de curación de heridas mostraron que la expresión reducida de PCDHGC3 aumentó el potencial migratorio de las células 786-O (+) en aproximadamente un 35% en comparación con el de las células de control (Figura 6G
 15 y H). También analizamos si el silenciamiento de PCDHGC3 afectó el potencial invasivo de las células. Para esta finalidad, utilizamos esferoides celulares completamente embebidos dentro de matrices de colágeno y realizamos toma de imágenes de células vivas de los agregados celulares durante un periodo de 20 horas con una resolución de tiempo de 30 minutos. Este análisis reveló que la migración y la
 20 invasión de células tumorales en la matriz de colágeno tuvieron lugar de una forma coordinada, manteniendo contactos célula a célula y generando esferoides con perímetros progresivamente más grandes e irregulares. Una comparación de las variaciones en el área en el tiempo en las células de control y en células ARNhc-PCDHGC3-786-O (+) o -RCC4(+) reveló que las células ARNhc-PCDHGC3 invadieron
 25 la matriz extracelular más rápido de lo que lo hicieron las células de control (Figura 6I y J).

III. CONCLUSIÓN

30 Identificar pacientes con PPGL con SDHB mutado hereditario que son propensos a desarrollar enfermedad metastásica es un desafío importante en el entorno clínico. Aquí, se proporciona una evidencia de alteraciones epigenéticas en los SDHB-mePPGL que difieren de aquellas en los SDHB-bPPGL. Más específicamente, los inventores observaron que el silenciamiento epigenético del gen PCDHGC3 está
 35 implicado de forma putativa en el comportamiento metastásico de los SDHB-PPGL.

Los datos que se muestran aquí, con el mayor número de SDHB-PPGL estudiados epigenéticamente hasta ahora, proporcionan una signatura epigenética novedosa que está presente en los SDHB-mePPGL. Aproximadamente un 70% de los genes hipermetilados que se identifican aquí en los SDHB-mePPGL no habían sido descritos
5 previamente, lo que sugiere que esos genes podrían ser relacionados específicamente con el proceso metastásico, además de la presencia de las mutaciones de la línea germinal SDHB. El análisis del enriquecimiento funcional de dicha signatura epigenética revela que la mayoría de los genes afectados están implicados en la diferenciación neuronal y se encontraban también metilados en células madre
10 cancerígenas. Este es un hallazgo relevante que apoya la hipótesis de que las células madre están implicadas en el desarrollo de este tipo de cáncer. Los datos que se muestran aquí también destacan un enriquecimiento significativo de genes localizados en el locus cromosómico 5q31 que abarca los cluster de genes PCDHA, PCDHB, y PCDHG.

15

Los genes PCDH constituyen el grupo más diverso dentro de la superfamilia de las cadherinas e incluyen 60 proteínas codificadas por los cluster multigénicos en tándem PCDHA, PCDHB, y PCDHG; estos genes están implicados en la regulación del desarrollo neurológico y se acoplan en trans-interacciones homofílicas/heterofílicas
20 como multímeros. Aquí, se proporciona la primera evidencia de que los PCDH pueden jugar un papel en la tumorigénesis de tumores neuroendocrinos, específicamente los PPGL. Se muestra la metilación y el silenciamiento de uno de los genes de PCDH, PCDHGC3, en subconjuntos específicos de PPGL. De acuerdo con los datos de TCGA-PPGL y la serie de validación, el promotor de PCDHGC3 estaba no metilado en
25 la mayoría de los PPGL que carecen de mutaciones SDHx pero sufrieron metilación de novo en aproximadamente el 30% de los SDHB-bPPGL y casi todos los SDHB-mePPGL. De forma interesante, los niveles de metilación fueron bajos en los SDHB-bPPGL, moderados en los SDHB-mePPGL y elevados en los tejidos metastásicos derivados de los SDHB-mePPGL. Estos datos sugieren que este rasgo epigenético se
30 amplifica progresivamente durante la transformación de las células tumorales de un estado benigno a los estados invasivos y metastásicos, tal como se sugiere para otros oncogenes y genes supresores de tumores.

De forma importante, se proporciona aquí evidencia de que PCDHGC3 podría
35 funcionar como un gen supresor de la metástasis en los PPGL. Los datos in vitro mostraron que una expresión reducida de genes PCDHGC3 en dos líneas de células

cancerígenas diferentes dieron como resultado un aumento de la proliferación celular, migración celular e invasión celular colectiva.

Los datos presentados en la presente memoria revelan que el silenciamiento epigenético de PCDHGC3 está asociado con una deficiencia de SDHB. Unos niveles reducidos de la proteína SDHB, que son inducidos por el silenciamiento génico mediado por CRISPR/Cas9 en dos líneas de células cancerígenas diferentes, no resultaron suficientes para desencadenar la metilación de novo del promotor PCDHGC3. Considerando el papel atribuido a la deficiencia de SDH como inductor del factor de transcripción de HIF- α , también se sometió a ensayo si la acumulación de HIF-1 α o HIF-2 α en células deficientes en SDHB podría ser el enlace que falta para la metilación de PCDHGC3. Los datos revelaron que ninguna de estas subunidades de HIF- α parece tener una función en la inducción de este evento epigenético.

Los datos presentados en la presente memoria llevan a los inventores a proponer que las señales mediadas por PCDHGC3 epigenéticamente silenciado pueden proporcionar células tumorales con capacidad metastásica. Es posible que las alteraciones epigenéticas de PCDHGC3 durante la iniciación de tumores no conduzcan automáticamente a la manifestación de un potencial metastásico completo. En lugar de ello, el potencial metastásico evoluciona probablemente a través de la amplificación cuantitativa, proporcionando en última instancia a la célula la capacidad metastásica. De forma interesante, los inventores observaron metilación de PCDHGC3 en tumores primarios que desarrollaron metástasis varios años después de la extracción quirúrgica del tumor. Por lo tanto, la metilación de PCDHGC3 funciona como una herramienta de predicción de la metástasis en pacientes con mutaciones SDHB.

Según el mejor entender de los inventores, este estudio proporciona la primera evidencia de una función de un gen PCDH en la patogénesis de un tumor de origen neuroendocrino. Se observan mutaciones somáticas y de la línea germinal en SDHB en una cantidad creciente de neoplasmas, incluyendo tumores estromales gastrointestinales, tumores pancreáticos neuroendocrinos, ganglioneuromas y carcinomas de células renales. De forma importante, la deficiencia de SDH en estos tumores tiene importantes implicaciones de pronóstico. Los datos que se muestran en la presente memoria sugieren que la metilación de novo del gen de las protocadherinas PCDHGC3 puede tener una función en el fenotipo metastásico de los

SDHB-PPGL, y, por tanto, podría ser de utilidad como una herramienta para identificar pacientes con un alto riesgo de desarrollar una enfermedad metastásica y como un marcador de pronóstico en los PPGL y otros tipos de cáncer relacionados con SDHB. Estos hallazgos proporcionan una nueva diana para la terapia molecular y podría tener importantes implicaciones clínicas para diseñar un seguimiento y un tratamiento clínicos en el cáncer relacionado con SDHB.

Ejemplo 2. Pronóstico de PCDHGC3 en otros tipos de cáncer diferentes a PPGL: cáncer de colon y cáncer renal.

10

I – MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron los niveles de expresión de genes y de metilación de ADN de PCDHGC3 en carcinoma de riñón de células claras y en cáncer de colon utilizando datos públicos disponibles del Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) (Fishbeing, L. et al. 2017, Cancer Cell, 31: 181-193). Los conjuntos de datos del carcinoma de riñón de células claras del TCGA y del cáncer de colon del TCGA contenían 537 y 462 tumores primarios, respectivamente. Se encontraban disponibles tanto los niveles de metilación como los de transcritos para el cáncer de colon, mientras que únicamente estaban disponibles los datos de transcritos para el cáncer renal. Los datos moleculares y clínicos se descargaron del UCSC Xena Browser. Se calculó la media de los niveles de metilación, la cual se detectó con 5 sondas consecutivas que hibridaron dentro del promotor de PCDHGC3 (ver Figura 3A), para cada una de las muestras de tumores incluidas en la serie.

Para el análisis de la significancia clínica de la metilación de PCDHGC3, se utilizó el valor de la mediana de los niveles de transcritos de PCDHGC3 como el valor de corte para establecer una dicotomía de los tumores como elementos de alta expresión (por encima de la mediana) y elementos de baja expresión (por debajo de la mediana). El análisis de la OS reveló que una expresión reducida de PCDHGC3 en cáncer renal de células claras estaba significativamente asociado con una baja OS (HR: 1,49; 95%CI: 0,9-2,64; prueba de Mantel Cox, $p = 0,005$). La Figura 7 muestra la curva de supervivencia de Kaplan Meier. Después de ajustar el tamaño del tumor, las metástasis linfáticas o las metástasis a distancia, la metilación de PCDHGC3 resultó un factor de pronóstico independiente para la supervivencia global ($p = 0,003$).

35

Los niveles de transcritos de PCDHGC3 estaban inversamente correlacionados con los niveles de metilación de PCDHGC3 en el cáncer de colon ($r = -0,47$; $p < 0,0001$). Para el análisis de la significancia clínica de la metilación de PCDHGC3, los tumores fueron clasificados como tumores con altos niveles de metilación (por encima del valor del percentil P75) o con bajos niveles de metilación (por debajo del percentil P75). El grupo de alta metilación de PCDHGC3 mostró una supervivencia total significativamente más baja de la que mostró el grupo de baja metilación de PCDHGC3 (HR: 1,5; 95%CI: 0,9-2,64; prueba de Mantel Cox, $p=0,014$). La Figura 8A muestra la curva de supervivencia de Kaplan Meier. Después de ajustar las metástasis linfáticas o las metástasis a distancia y el estadio de la enfermedad, la metilación de PCDHGC3 resultó un factor de pronóstico independiente para la supervivencia global ($p = 0,014$).

Para el análisis de la significancia clínica de la expresión de genes de PCDHGC3, los tumores se clasificaron como tumores con bajos niveles de expresión (por encima del valor de percentil P25) o altos niveles de expresión (por debajo del valor de percentil P25). El grupo de baja expresión de PCDHGC3 mostró una supervivencia global más baja que la mostrada por el grupo de alta expresión de PCDHGC3 (HR: 2,11; 95%CI: 1,13-3,04; prueba de Mantel Cox, $p=0,014$). La Figura 8B muestra la curva de supervivencia de Kaplan Meier. Después de ajustar las metástasis linfáticas o las metástasis a distancia y el estadio de la enfermedad, la metilación de PCDHGC3 resultó un factor de pronóstico independiente para la supervivencia global ($p = 0,048$).

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para el diagnóstico y/o pronóstico de la metástasis del cáncer en un sujeto que padece cáncer, o para predecir los resultados clínicos de un sujeto que padece cáncer, o para determinar la respuesta de un sujeto a una terapia, que comprende
- 5 a) determinar los niveles de metilación del promotor, o los niveles de expresión, de un gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas en una muestra de dicho sujeto, y
- 10 b) comparar los niveles de metilación, o los niveles de expresión, obtenidos en la etapa a) con un valor de referencia, en donde
- si los niveles de metilación obtenidos en la etapa (a) son superiores a los niveles de metilación del valor de referencia, o
 - 15 - los niveles de expresión obtenidos en la etapa (a) son inferiores a los niveles de expresión del valor de referencia, entonces
 - (i) el tumor PPGL es un tumor metastásico, o es propenso a desarrollar metástasis,
 - (ii) el pronóstico, los resultados clínicos, y/o la respuesta del sujeto a la
 - 20 terapia es negativa.
2. Método según la reivindicación 1, en donde el cáncer es un tumor feocromocitoma y paraganglioma (PPGL), cáncer de colon, o cáncer renal, preferiblemente, el cáncer renal es carcinoma renal de células claras (CCRCC).
- 25
3. Método según la reivindicación 1 o 2, en donde el cluster de genes de las protocadherinas se selecciona de la lista que consiste en cluster de genes PCDHA, cluster de genes PCDHB y cluster de genes PCDHG.
- 30
4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas es el gen PCDHGC3.
5. Método según la reivindicación 4, en donde el gen PCDHGC3 comprende una secuencia de nucleótidos con una identidad de secuencia de, al menos, 70% con la
- 35 secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, o SEQ ID NO: 7.

6. Método según la reivindicación 4, en donde el promotor del gen PCDHGC3 comprende una secuencia de nucleótidos con una identidad de secuencia de, al menos, 70% con la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 1.
- 5 7. Método según la reivindicación 6, en donde la etapa a) comprende determinar el estado de metilación de al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete u ocho de los sitios CpG de la secuencia SEQ ID NO: 1.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el tumor PPGL
10 está asociado con mutaciones del gen SDHx.
9. Método según la reivindicación 8, en donde el gen SDHx se selecciona de la lista que consiste en gen SDHB, gen SDHC, gen SDHA, gen SDHD y gen SDHAF2.
- 15 10. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la muestra se selecciona del grupo que consiste en sangre, orina, heces y tejido de una biopsia.
11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el sujeto es un mamífero, preferiblemente, un primate, más preferiblemente, un humano.
20
12. Un agente inhibidor de la actividad de una proteína codificada por un gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas, para su uso en el tratamiento y/o prevención de la metástasis del cáncer en un sujeto que padece dicho cáncer.
- 25 13. Un agente inhibidor para su uso según la reivindicación 12, en donde el gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas se selecciona de la lista que consiste en el cluster de genes PCDHA, cluster de genes PCDHB y cluster de genes PCDHG.
- 30 14. Un agente inhibidor para su uso según la reivindicación 12 o 13, en donde el gen que pertenece al cluster de genes de las protocadherinas es el gen PCDHGC3.
15. Un agente inhibidor para su uso según la reivindicación 14, en donde el gen PCDHGC3 comprende una secuencia de nucleótidos con una identidad de secuencia
35 de, al menos, 70% con la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, o SEQ ID NO: 7.

16. Un agente inhibidor para su uso según la reivindicación 14 o 15, en donde la proteína codificada por el gen PCDHGC3 es la proteína PCDHGC3.

5 17. Un agente inhibidor para su uso según la reivindicación 16, en donde la proteína PCDHGC3 comprende una secuencia de aminoácidos con una identidad de secuencia de, al menos, 70% con la secuencia SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 8.

10 18. Un agente inhibidor para su uso según la reivindicación 12 a 17, en donde el cáncer es un tumor feocromocitoma y paraganglioma (PPGL), cáncer de colon, o cáncer renal, preferiblemente, el cáncer renal es carcinoma de células renal de células claras (CCRCC).

15 19. Un agente inhibidor para su uso según la reivindicación 18, en donde el tumor PPGL está asociado con las mutaciones del gen SDHx.

20. Un agente inhibidor para su uso según la reivindicación 19, en donde el gen SDHx se selecciona de la lista que consiste en gen SDHB, gen SDHC, gen SDHA, gen SDHD y gen SDHAF2.

20

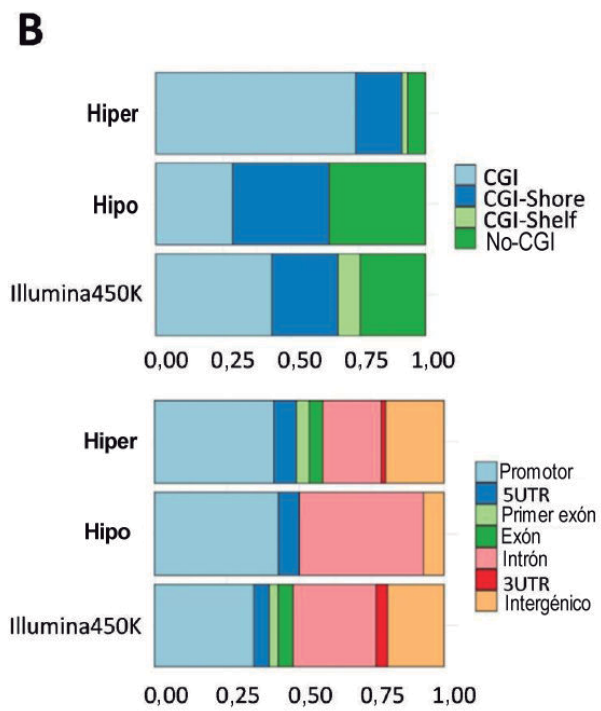
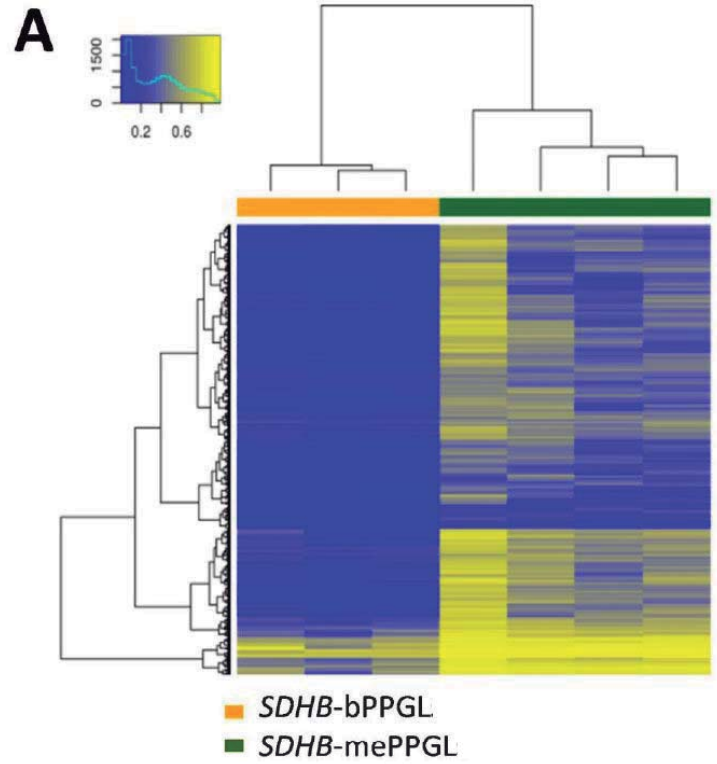


FIG. 1

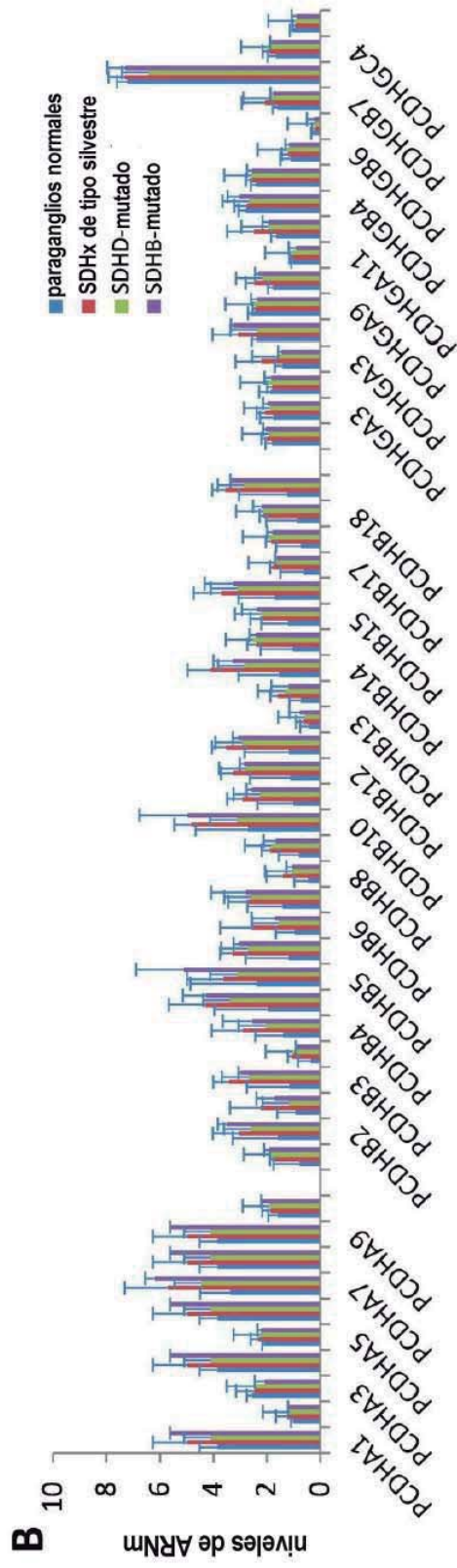


FIG. 2 (CONTINUACIÓN)

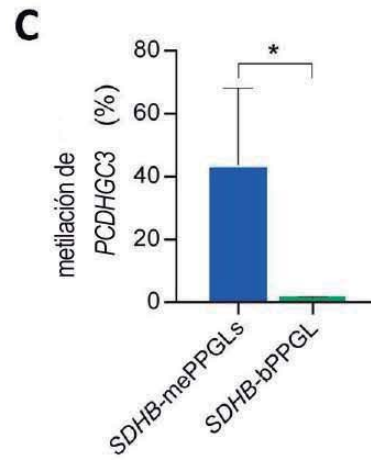


FIG. 2 (CONTINUACIÓN)

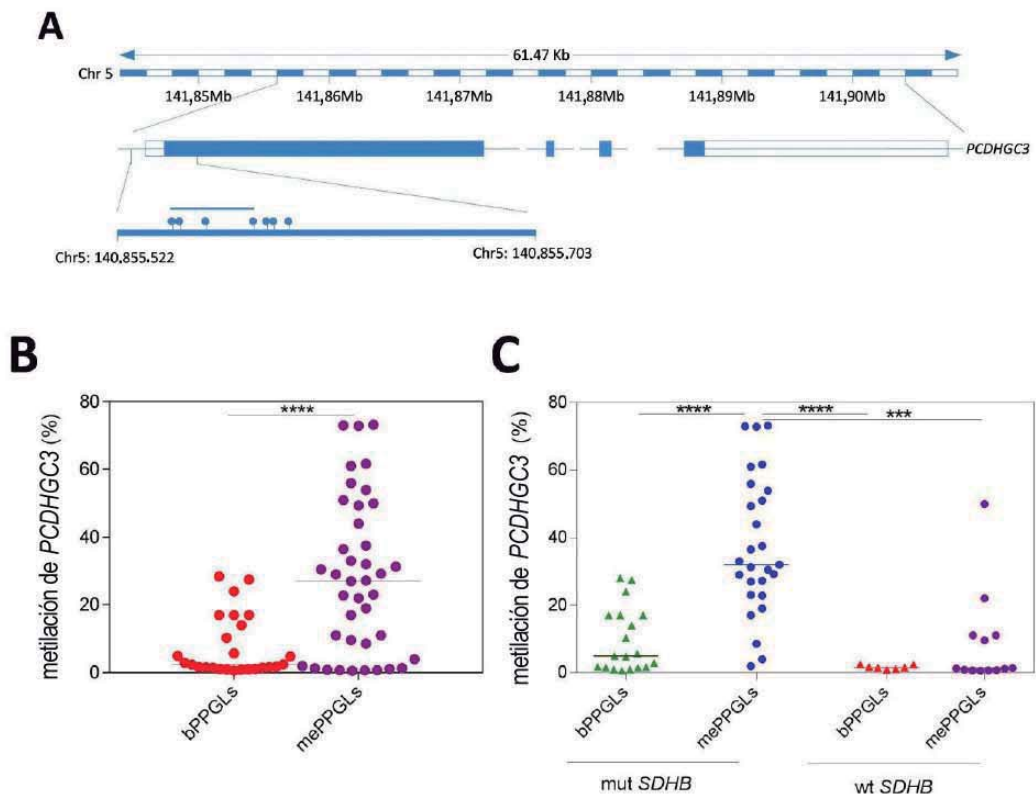
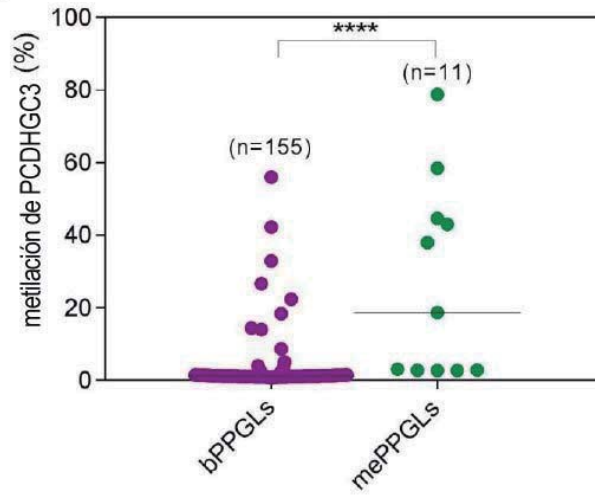
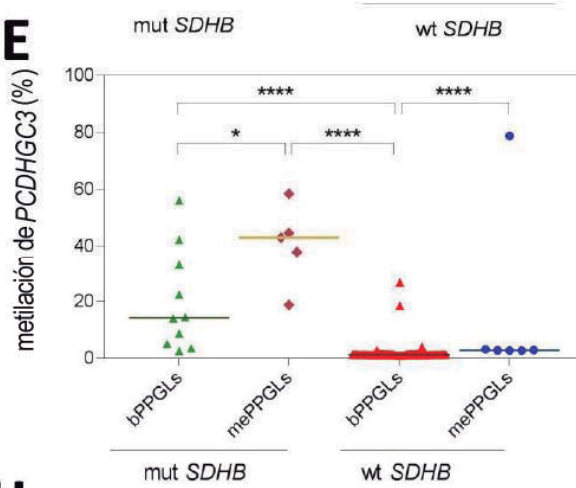


FIG. 3

D



E



F

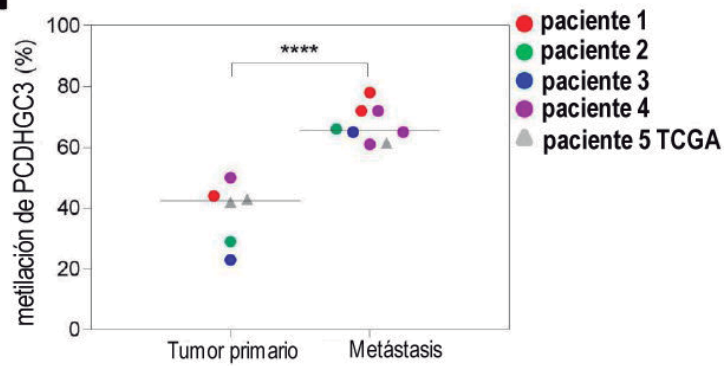
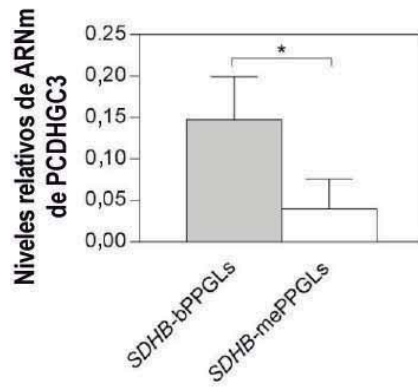
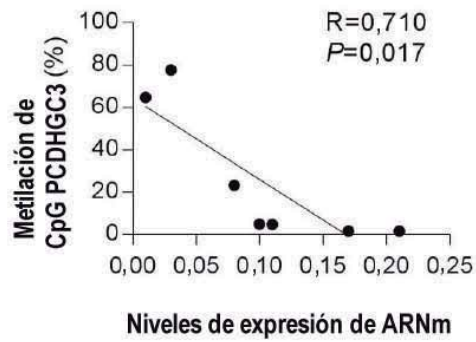


FIG. 3 (CONTINUACIÓN)

G



H



I

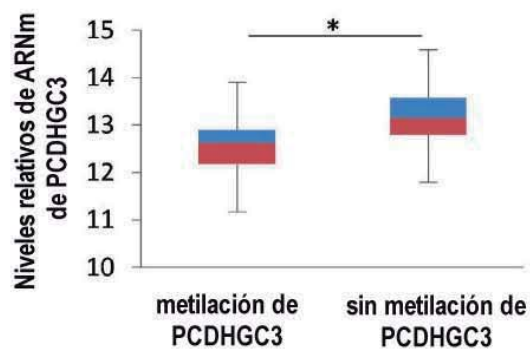


FIG. 3 (CONTINUACIÓN)

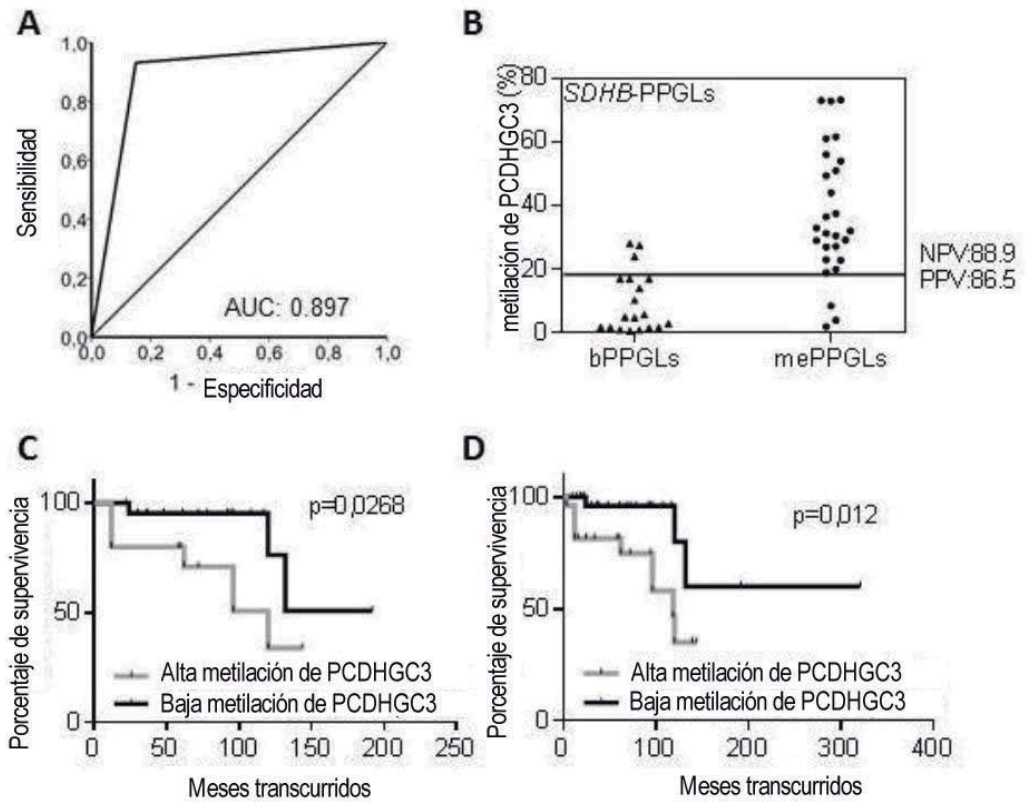


FIG. 4

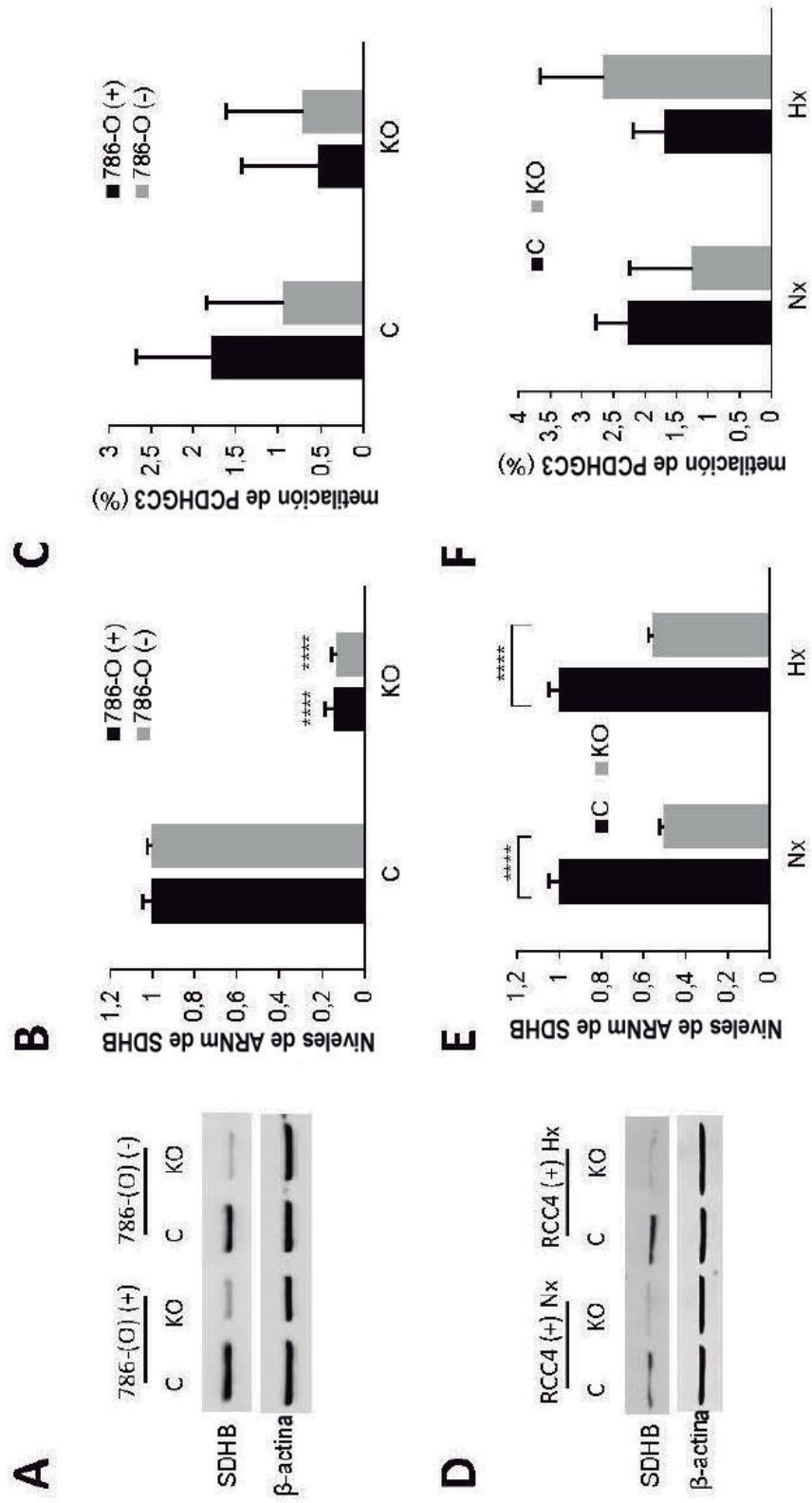


FIG. 5

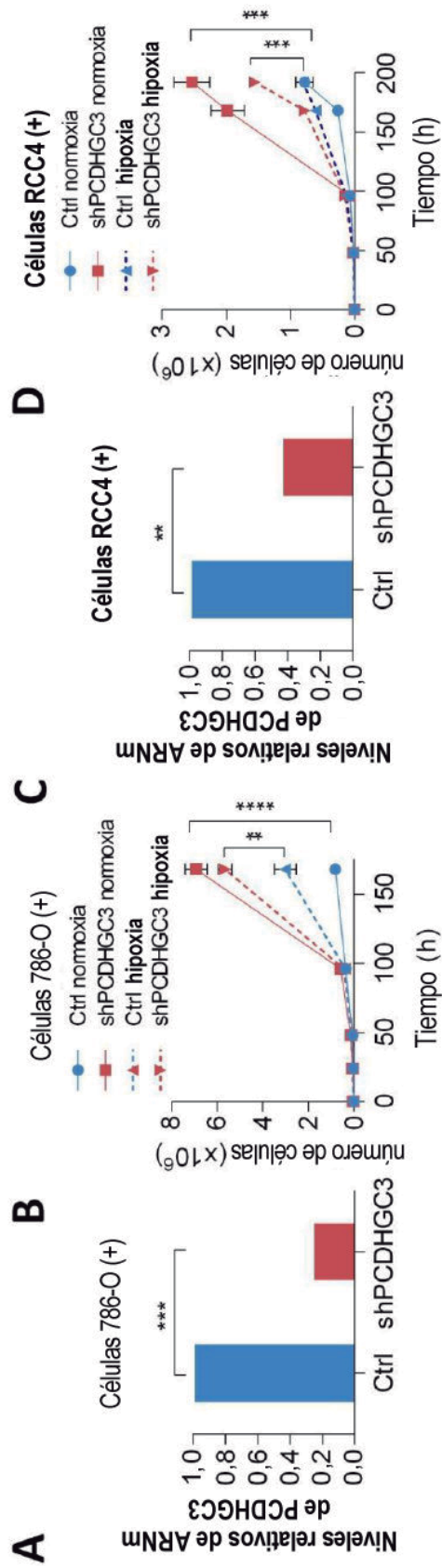


FIG. 6

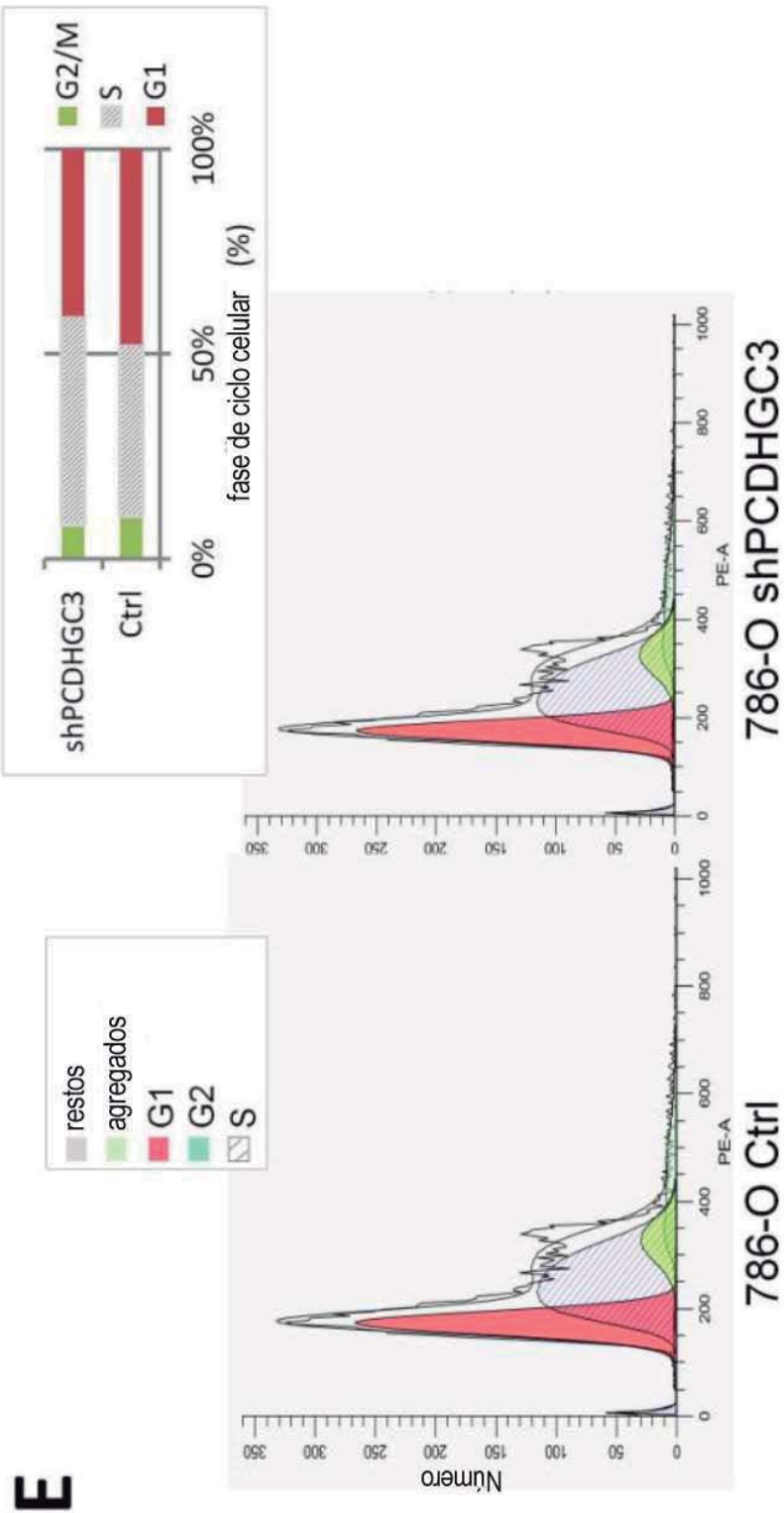


FIG. 6 (continuación)

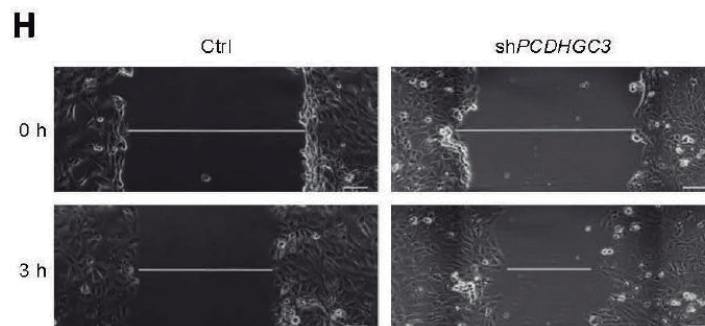
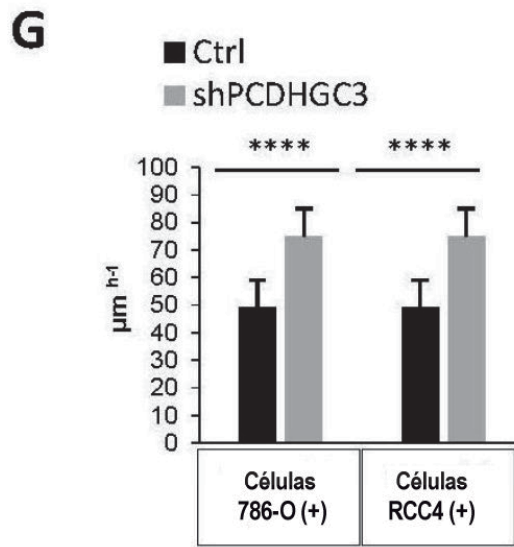
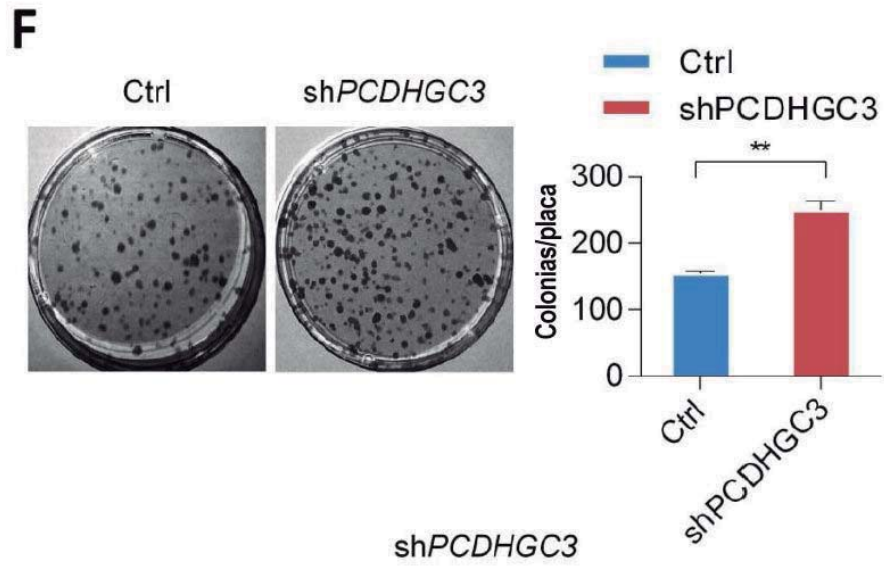


FIG. 6 (CONTINUACIÓN)

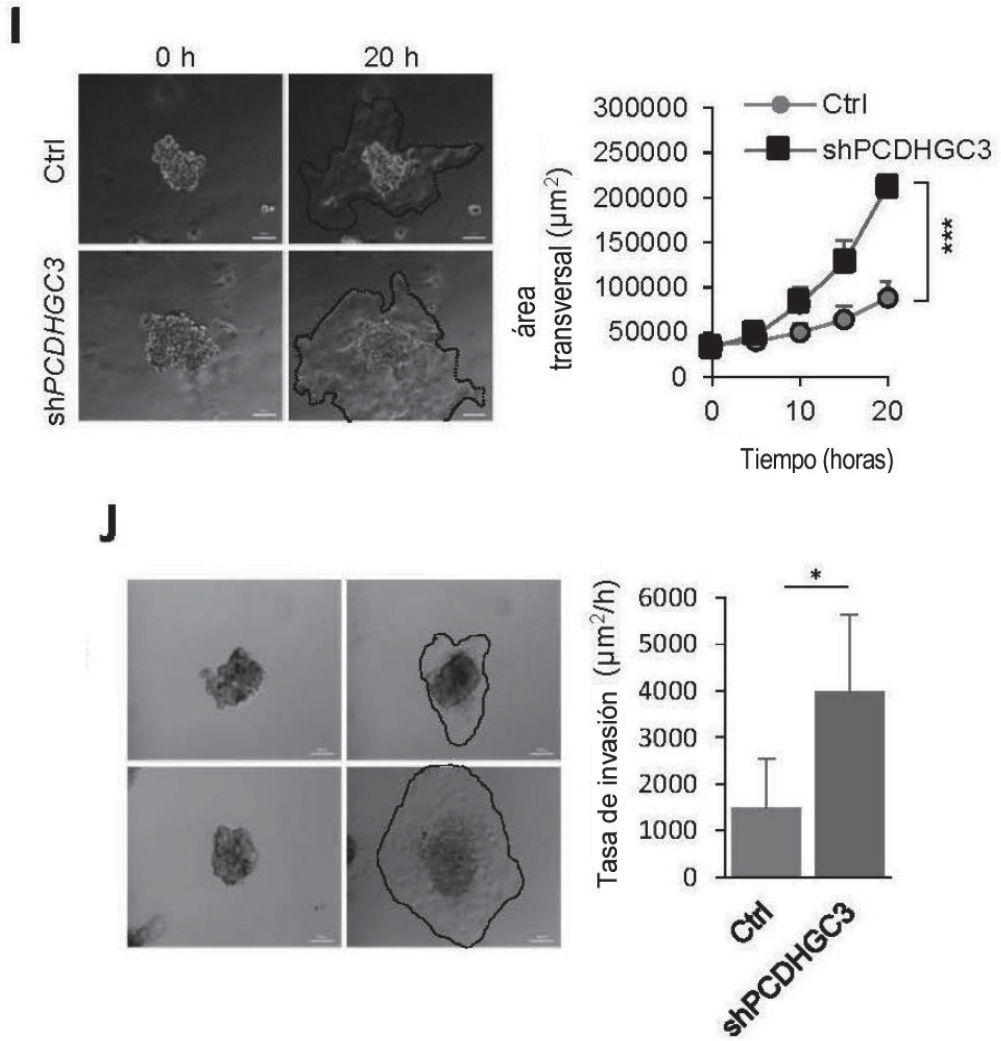


FIG. 6 (continuación)

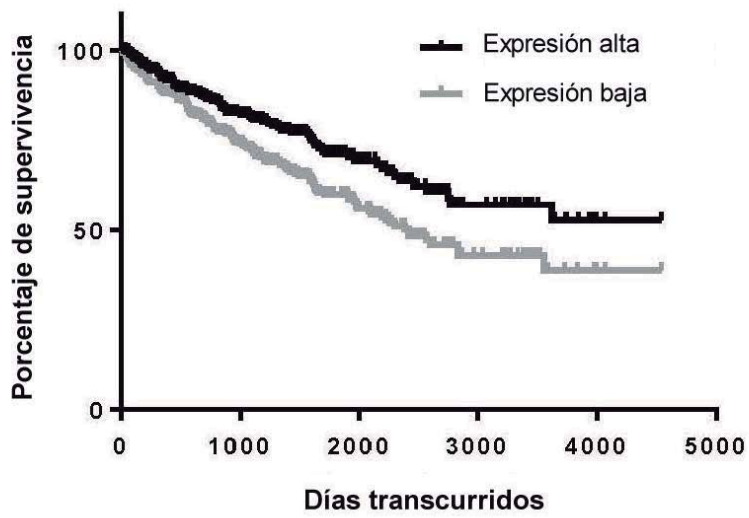


FIG. 7

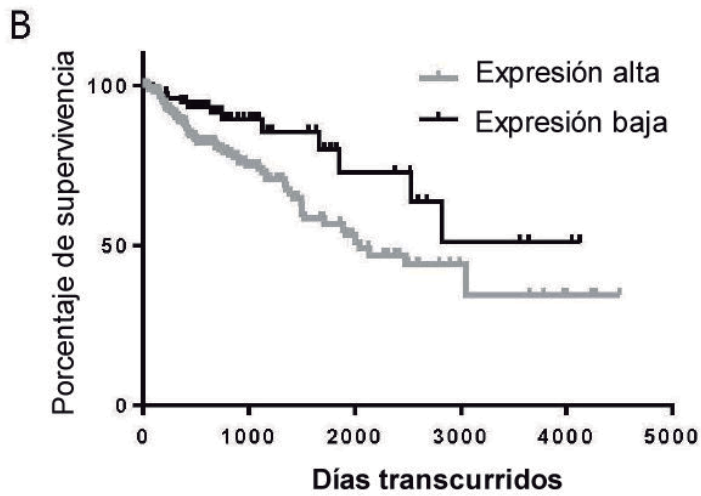
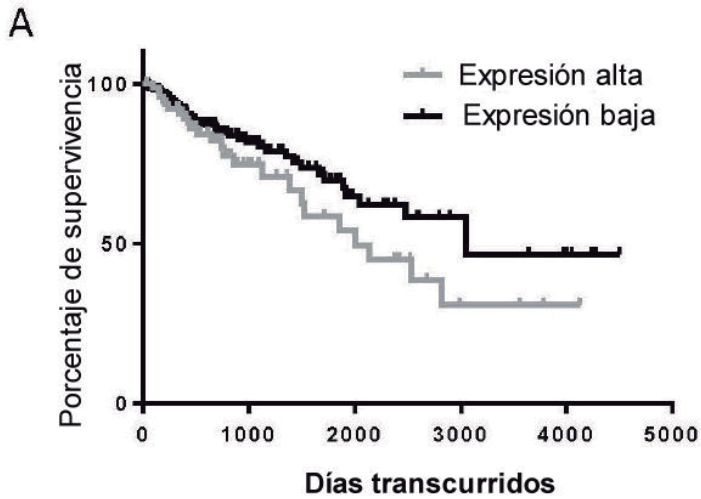


FIG. 8



- ②① N.º solicitud: 201930398
②② Fecha de presentación de la solicitud: 06.05.2019
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2018.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	EP 2253714 A1 (GENOMIC TREE, INC.) 24/11/2010, Párrafos 1, 6, 8, 11-15, 19-32, 40-42, 50-51, 54-57, 105-106, ejemplos 1, 4-6 y reivindicaciones 1, 7, 9-14.	1, 3-5, 10-17.
A	WO 2008/122447 A2 (EPIGENOMICS AG.) 16/10/2008, Páginas 1, 3, 6-10 reivindicaciones 1, 4 y 9.	1-20
A	WANG, KAIHUNG, et al. Global methylation silencing of clustered proto-cadherin genes in cervical cancer: serving as diagnostic markers comparable to HPV. Cancer medicine, 2015, Vol. 4, Nº 1, Páginas 43-55. Todo el documento.	1-20
A	DALLOSSO, A. R., et al. Long-range epigenetic silencing of chromosome 5q31 protocadherins is involved in early and late stages of colorectal tumorigenesis through modulation of oncogenic pathways. Oncogene, 2012, Vol. 31, Nº 40, Páginas 4409. Todo el documento.	1-20

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

<p>Fecha de realización del informe 13.01.2020</p>	<p>Examinador M. J. García Bueno</p>	<p>Página 1/2</p>
---	---	------------------------------

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, XPESP, NPL, MEDLINE, BIOSIS, EMBASE, EMBL ALL, STN, INTERNET.