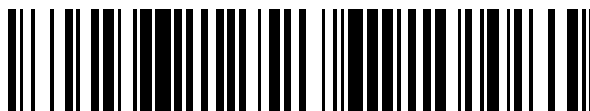


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 016 758**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.10.2021** **PCT/EP2021/077487**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.04.2022** **WO22074025**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2021** **E 21783547 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2024** **EP 4225347**

54 Título: **Conexina 43 para su uso en el tratamiento de un tipo de cáncer caracterizado por la activación de una proteína cinasa activada por mitógeno**

30 Prioridad:

**06.10.2020 EP 20382883**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.05.2025**

73 Titular/es:

**FUNDACIÓN PROFESOR NOVOA SANTOS**  
**(50.00%)**

**Avda. Xubias de Arriba, 84**  
**15006 A Coruña, ES y**  
**SERVIZO GALEGO DE SAÚDE (50.00%)**

72 Inventor/es:

**MAYÁN SANTOS, MARÍA DOLORES;**  
**VARELA VÁZQUEZ, ADRIÁN;**  
**GUITIÁN CAAMAÑO, AMANDA;**  
**CARPINTERO FERNÁNDEZ, PAULA;**  
**VARELA EIRÍN, MARTA;**  
**FONSECA CAPDEVILA, EDUARDO;**  
**QUINDÓS VARELA, MARÍA y**  
**CALLEJA CHUCLA, TERESA**

74 Agente/Representante:

**MARTÍNEZ, Miguel Ángel**

### Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 3 016 758 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Conexina 43 para su uso en el tratamiento de un tipo de cáncer caracterizado por la activación de una proteína cinasa activada por mitógeno

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo médico. Particularmente, la presente invención se refiere a conexina 43 (Cx43) para su uso en el tratamiento de cáncer en la que el cáncer está caracterizado por la activación de una proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) seleccionada de la lista que consiste en: BRAF, RAS, MEK o ERK. La presente invención también se refiere a un producto terminado de combinación que comprende Cx43 y un inhibidor de una proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) seleccionada de la lista que consiste en: BRAF, RAS, MEK o ERK.

**Estado de la técnica**

Se detectan mutaciones de MAPK, por ejemplo mutaciones de BRAF, en muchos tipos de cáncer. BRAF es un potente oncogén que está activado en más del 8 % de todos los tipos de cáncer. Aproximadamente alrededor del 30 - 50 % de cáncer de tiroides, el 3 % de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), del 5 % al 10 % de pacientes con cáncer colorrectal metastásico, el 100 % de leucemia de células pilosas y más del 50 % de pacientes con melanoma tienen una mutación del proto-oncogén BRAF, que conduce a una activación constitutiva de las serina/treonina cinasas de la cascada de MAPK.

Inicialmente se describieron mutaciones en BRAF en 2002, siendo V600E la mutación más común. Estas mutaciones conducen a la activación constitutiva de BRAF y la cascada de señalización de RAS-RAF-MEK-ERK, que fomenta el crecimiento de cáncer potenciando la proliferación celular y la supervivencia al tiempo que se inhibe la muerte celular por apoptosis. Tras el descubrimiento de la mutación V600E, se desarrollaron terapias dirigidas incluyendo inhibidores de molécula pequeña específicos de BRAF tales como dabrafenib, y posteriormente los inhibidores de MEK tales como trametinib, para el tratamiento de enfermedad metastásica. Los inhibidores de BRAF/MEK (BRAF/MEKi) están indicados para pacientes con melanoma no resecable o metastásico debido a su eficacia, y la combinación de estos inhibidores ha mejorado la supervivencia libre de progresión. A diferencia de pacientes con melanoma metastásico con mutación de BRAF, tan sólo el 5 % de los pacientes con cáncer colorrectal con mutación de BRAF respondieron a monoterapia con inhibidores de BRAF. Esfuerzos por definir los mecanismos de resistencia a la inhibición de BRAF han conducido a nuevos ensayos clínicos usando terapias combinadas con el fin de evitar la resistencia primaria y adquirida a inhibidores de BRAF.

Tal como se mencionó anteriormente, la selección como diana de la ruta de MAPK con BRAF/MEKi específicos mostró altas respuestas iniciales en la mayoría de los pacientes con melanoma mutante para BRAF. Sin embargo, más del 50 % de los pacientes adquieren resistencia a los fármacos y, por consiguiente, recidiva de cáncer. Además, algunos pacientes con melanomas mutantes para BRAF no responden al tratamiento debido a mecanismos de resistencia intrínsecos.

Como resultado, existe una necesidad médica no cubierta de encontrar nuevas estrategias farmacéuticas para reducir la resistencia a inhibidores de MAPK y, por consiguiente, de mejorar la recidiva de pacientes.

La presente invención resuelve este problema usando Cx43, preferiblemente en combinación con inhibidores de MAPK.

**Descripción de la invención**

**Breve descripción de la invención**

Tal como se explicó anteriormente, la presente invención se refiere a Cx43, preferiblemente en combinación con un inhibidor de una proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) seleccionada de la lista que consiste en: BRAF, RAS, MEK o ERK, para su uso en el tratamiento de cáncer en la que el cáncer está caracterizado por la activación de proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) seleccionada de la lista que consiste en: BRAF, RAS, MEK o ERK.

Obsérvese que los tipos de cáncer caracterizados por la activación de MAPK están bien establecidos en la técnica anterior, tal como se indica, por ejemplo, en este documento: [A S Dhillon, *et al.*, 2007. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, volumen 26, páginas 3279-3290(2007). Publicado: 14 de mayo de 2007].

Particularmente, los inventores de la presente invención han encontrado que Cx43 induce senescencia celular en tumor con mutación de BRAF y potencia la senescencia inducida por BRAF/MEK (figura 1e y figura 5c) y sensibiliza células cancerosas senescentes frente a muerte celular por apoptosis mediada por activación de caspasa 3 (figuras 1f y figura 5d). La reactivación de Cx43 evita la adquisición de resistencia a fármacos en células tumorales (figura

- 6d) y, de manera más importante, vuelve a sensibilizar células tumorales resistentes frente a tratamiento con BRAF/MEKi induciendo muerte celular por apoptosis (figura 6e). Además, el tratamiento con vesículas extracelulares (EV) enriquecidas en Cx43, cambió radicalmente el contenido en ARN pequeño y proteínas (figura 3) y cambió la función de estos vehículos de progresión tumoral en células diana a supresores tumorales, reduciendo la capacidad de proliferar y formar colonias (figura 4c y figura 7). Estas EV que contienen Cx43 aumentan la eficacia de BRAF/MEKi en ensayos *in vitro* (figura 7 c-d). Los resultados proporcionados en la presente invención demuestran una nueva función para Cx43 para evitar la resistencia a fármacos, cuya activación (usando un vector de expresión o EV) tiene potencial para mejorar la terapia con BRAF/MEKi.
- La proteína de canal Cx43, de una manera independiente de canal (figura 1d), induce senescencia celular (figura 1e) y reactiva el efecto proapoptótico de BRAF/MEKi en células cancerosas senescentes (figura 1f). Los resultados proporcionados en la presente invención indican que la reactivación de Cx43 en células mutantes para BRAF usando un vector para sobreexpresar Cx43 o EV que contienen Cx43 (figura 1a y figura 2 y figura 7b) aumenta la eficiencia de BRAF/MEKi (figura 5b y figura 7c-d) reforzando la senescencia celular (figura 5c) y reactiva el efecto proapoptótico de BRAF/MEKi (figura 5d). Además, cuando se aplicó el fármaco senolítico navitoclax (ABT-263) en paralelo a BRAF/MEKi y en presencia de Cx43 (EV que contienen Cx43, figura 7e-f o vector de sobreexpresión, figura 5d), se aumentó significativamente la eficacia de BRAF/MEKi en células tumorales resistentes frente a fármacos (figura 7f), proporcionando un fundamento para aplicación de productos terapéuticos de combinación con el fin de sensibilizar células cancerosas metastásicas resistentes frente a terapia.
- La restauración de Cx43, usando un vector o mediante EV, aumenta la eficiencia de BRAF/MEKi, previniendo y revirtiendo la resistencia a fármacos (figura 6d-e y figura 7d). Navitoclax es un fármaco senolítico actualmente usado en ensayos clínicos en combinación con los BRAF/MEKi dabrafenib y trametinib para mejorar su eficacia y evitar la resistencia a fármacos (identificador de ClinicalTrials.gov: NCT01989585). Los resultados proporcionados en la presente invención demuestran que EV que contienen Cx43, o la reactivación de Cx43 usando un vector (terapia génica), también mejoran la eficiencia de BRAF/MEKi cuando se combinan esos inhibidores con navitoclax (figura 5d y figura 7f).
- Por tanto, la primera realización de la presente invención se refiere a Cx43 para su uso en el tratamiento de cáncer en la que el cáncer está caracterizado por la activación de proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) seleccionada de la lista que consiste en: BRAF, RAS, MEK o ERK.
- En una realización preferida, el cáncer está caracterizado por la activación de BRAF o NRAS.
- En una realización preferida, el cáncer se selecciona de: melanoma, cáncer de colon, cáncer de pulmón o cáncer de mama.
- En una realización preferida, se administra Cx43 antes de, después de o simultáneamente con un tratamiento con un inhibidor de una proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) seleccionada de la lista que consiste en: BRAF, RAS, MEK o ERK.
- En una realización preferida, se administra Cx43 antes de, después de o simultáneamente con un tratamiento con un inhibidor de BRAF y/o MEK.
- En una realización preferida, se administra Cx43 antes de, después de o simultáneamente con un tratamiento con dabrafenib, trametinib, vemurafenib, encorafenib, cobimetinib y/o binimetinib.
- En una realización preferida, se administra Cx43 antes de, después de o simultáneamente con un tratamiento con un agente senolítico, preferiblemente navitoclax.
- La segunda realización se refiere a un producto terminado de combinación que comprende Cx43 y un inhibidor de una proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) seleccionada de la lista que consiste en: BRAF, RAS, MEK o ERK.
- En una realización preferida, el producto terminado de combinación comprende Cx43 y un inhibidor de BRAF y/o MEK.
- En una realización preferida, el producto terminado de combinación comprende Cx43 y dabrafenib, trametinib, vemurafenib, encorafenib, cobimetinib y/o binimetinib.
- En una realización preferida, el producto terminado de combinación comprende además un agente senolítico, preferiblemente navitoclax.
- La tercera realización de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el producto terminado de combinación de la invención y, opcionalmente, excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.

La cuarta realización de la invención se refiere a la composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento de cáncer en la que el cáncer está caracterizado por la activación de proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) seleccionada de la lista que consiste en: BRAF, RAS, MEK o ERK, en la que se administra Cx43 usando un vehículo de administración.

En una realización preferida, el vehículo de administración es una nanopartícula, una vesícula extracelular o un vector de expresión que codifica para Cx43. Particularmente, cualquiera de las vesículas extracelulares conocidas en la técnica anterior puede usarse con este fin [Guillaume van Niel, *et al.*, 2018. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, volumen 19, páginas 213-228 (2018)] [Oscar P. B. Wiklander *et al.*, 2019. Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles. *Science Translational Medicine*, 15 de mayo de 2019, vol. 11, número 492, eaav8521. DOI: 10.1126/scitranslmedaav8521].

La última realización de la presente invención se refiere a un método para tratar cáncer, en el que el cáncer está caracterizado por la activación de proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) seleccionada de la lista que consiste en: BRAF, RAS, MEK o ERK, que comprende la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de Cx43, preferiblemente en combinación con cualquiera de los inhibidores de proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) anteriormente definidos, y lo más preferiblemente, también en combinación con un agente senolítico (tal como se definió anteriormente), o una composición farmacéutica que comprende los mismos.

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

- El término “que comprende” significa que incluye, pero no se limita a, lo que siga al término “que comprende”. Por tanto, el uso del término “que comprende” indica que los elementos indicados se requieren o son obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden estar presentes o no.
- Por “que consiste en” quiere decirse que incluye, y se limita a, lo que siga a la expresión “que consiste en”. Por tanto, la expresión “que consiste en” indica que los elementos indicados se requieren o son obligatorios, y que no puede estar presente ningún otro elemento.
- “Excipiente o portador farmacéuticamente aceptable” se refiere a un excipiente que puede incluirse opcionalmente con la suspensión celular de la invención y que no provoca ningún efecto toxicológico adverso significativo en el paciente.
- Por “cantidad o dosis terapéuticamente eficaz” de una composición que comprende la suspensión celular de la invención quiere decirse una cantidad que, cuando se administra tal como se describe en el presente documento, produce una respuesta terapéutica positiva en un sujeto que tiene cáncer. La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro, dependiendo de la edad, y del estado general del sujeto, la gravedad del estado que esté tratándose, el modo de administración, y similares. Una cantidad “eficaz” apropiada en cualquier caso individual puede determinarse por un experto habitual en la técnica usando experimentación de rutina, basándose en la información proporcionada en el presente documento.

### Descripción de las figuras

Figura 1. La restauración de la expresión génica de conexina 43 (Cx43) en células cancerosas con una mutación en BRAF y NRAS tiene efectos antitumorales. (a) La transfección de la línea celular de melanoma humana A375 con una mutación en BRAF con un vector para restaurar la expresión génica de Cx43 conduce a niveles aumentados de proteína Cx43 detectados mediante inmunotransferencia de tipo Western (izquierda, n=3) y citometría de flujo (derecha, n=1). En la imagen, células de tipo natural (A375) transfectadas con un vector vacío (EV, control) y transfectadas con el vector que contiene gen de Cx43 bajo el promotor de citomegalovirus humano (Cx43). Se usó tubulina como control de carga. Parte inferior: niveles de ARNm de Cx43 detectados mediante RT-qPCR en tiempo real (n=2) en células transfectadas con EV y Cx43. Parte inferior a la derecha: ensayo de inmunofluorescencia para estudiar los niveles de Cx43 y ubicación subcelular en células tumorales de control (A375) transfectadas con el EV (A375-EV) y con el vector que expresa el gen de Cx43 (A375-Cx43). Las flechas rojas indican puntos positivos para Cx43 en el margen de células (membrana). (b) Se usaron experimentos de carga de raspaduras (parte inferior) y transferencia de colorante (parte inferior) para estudiar la comunicación intercelular por uniones comunicantes (GJIC) en células tumorales, en ausencia (EV) o presencia de Cx43 (Cx43) en la línea celular A375. La cuantificación de la transferencia de colorante mediante carga de raspaduras se muestra a la derecha (n=6). (c) Se sometió a prueba la proliferación celular usando el sistema xCELLigence (n=1) y se cuantificó mediante ensayo de proliferación de CCK-8 (n=3), así como se confirmó mediante ensayo de formación de colonias (n=3). La presencia de Cx43 restaura la GJIC (b) y conduce a capacidad reducida de formación de colonias y reduce los niveles de proliferación. (d) No se detectó ningún cambio en la capacidad de formación de colonias cuando se trataron células con 100  $\mu$ M del inhibidor de canales de conexinas carbenoxolona (CBX) durante 7 días. Las imágenes muestran la capacidad de proliferación y formación de colonias de células de control (EV) y células que sobreexpresan Cx43 (Cx43) (n=3, valor de p de Cx43 = 0,2820). Células no tratadas (UT). Estos resultados indican que los efectos

antitumorales de Cx43 no dependen de la actividad de canal (semicanales o uniones comunicantes). (e) La nueva expresión de Cx43 en la línea de células tumorales A375 aumenta la senescencia celular, detectada mediante actividad  $\beta$ -galactosidasa (n=4) y mediante citometría de flujo (izquierda, n =5), así como mediante un aumento en los biomarcadores de senescencia p53 (n=2) y p16 (n=1) medidos mediante inmunotransferencia de tipo Western (derecha). Se usó tinción de Ponceau como control de carga. (f) La presencia de proteína Cx43, aumenta la muerte de células tumorales por apoptosis medida mediante citometría de flujo y tinción doble de PI/YO-PRO-1 (n=3). (g) La transfección de la línea celular de melanoma humana Sk-Mel-147 (mutación de NRAS) con un vector para restaurar la expresión génica de Cx43, conduce a niveles aumentados de proteína Cx43 detectados mediante inmunotransferencia de tipo Western (izquierda, n=1). La presencia de Cx43 reduce significativamente la capacidad de formar colonias en células tumorales de melanoma Sk-Mel147. (h) Además de melanoma, se transfectaron diferentes tipos de tumor con mutación de BRAF, incluyendo cáncer de mama (línea celular MDA-MB-231) y cáncer colorrectal (línea celular HT29), con un EV y Cx43, y se detectaron los niveles de proteína mediante inmunotransferencia de tipo Western (izquierda, n=1). La presencia de Cx43 reduce significativamente la capacidad de formar colonias en células tanto HT29 (n=3) como MDA-MB-231 (n=5) cuando se transfectan con un vector para sobreexpresar Cx43.

Se presentan los datos como media  $\pm$  EEM. Se usaron prueba de la t de Student bilateral o de Mann-Whitney para calcular la significación y se representa de la siguiente manera: \* p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\*\* p<0,0001.

Figura 2. Se encuentran los niveles de Cx43 en vesículas extracelulares (EV), incluyendo exosomas. (a) Se aislaron EV a partir de la línea de células tumorales A375 mediante ultracentrifugación y se caracterizaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Se muestran imágenes representativas del análisis de SEM a la izquierda. El aumento de la imagen muestra el tamaño de las vesículas. Un análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) muestra la cuantificación y distribución de las partículas, cuyo tamaño oscila entre 0 nm - 200 nm (media de tamaño: 104,6 nm  $\pm$  3,8 D.E., concentración: 1,58e+11  $\pm$  1,69e+09 partículas/ml (n=3)). (b) Los ensayos de inmunotransferencia de tipo Western muestran los niveles de proteína Cx43 en lisados de células tumorales de melanoma (A375, derecha) y en EV derivadas a partir de células tumorales de control transfectadas con el vector vacío (EV) o con un vector para sobreexpresar Cx43 (Cx43). Se usó CD9 para confirmar el aislamiento satisfactorio de exosomas (n=1). (c) El análisis mediante inmunotransferencia de tipo Western muestra niveles de Cx43 en lisado de células completas y EV derivadas a partir de diferentes líneas celulares de melanoma (A375, BLM, SK-MEL-28) transfectadas con el vector vacío (EV) o con el vector para volver a expresar Cx43 (Cx43).

Figura 3. La presencia de Cx43 en EV cambia el contenido en proteína y ARN pequeño. (a) Análisis de proteómica de vesículas extracelulares (EV) aisladas a partir de línea celular de melanoma A375 (Cx43-) y células A375 transfectadas con el vector de Cx43 (Cx43+). Se analizaron los datos teniendo en cuenta una tasa de falsos descubrimientos (FDR)  $\geq 0,82$  para EV Cx43- y FDR  $\geq 0,79$  para EV Cx43+ (n=4). El diagrama de Venn muestra el número de proteínas comunes para ambos grupos (1141), proteínas detectadas únicamente en EV Cx43- (160) y proteínas detectadas únicamente en EV positivas para Cx43 (482). (b) Los proteomapas (Liebermeister W. et al. 2014) ilustran la ortología de KEGG y el proceso biológico asociado con una abundancia baja y alta de proteínas observadas en EV Cx43- y a partir de EV Cx43+. En estos diagramas de Voronoi, cada polígono individual representa una proteína, en los que el área de polígono es una función de la abundancia en masa. Cada polígono está codificado por color según el término de ortología de KEGG asociado con el mismo, y los polígonos que representan el mismo término de ortología de KEGG se agrupan para dar polígonos más grandes para formar el mapa. (c) Se usaron análisis de enriquecimiento de conjuntos génicos (GSEA), ontología génica (GO), ortología de KEGG y base de datos de Reactome para identificar rutas y procesos biológicos significativamente enriquecidos en EV aisladas a partir de células tumorales A375 (Cx43-, naranja) y A375 que sobreexpresaban Cx43 (Cx43+, azul). El análisis se realizó únicamente con proteínas exclusivamente encontradas en cada grupo (n=4); los valores de p se muestran a la derecha. (d) Diagrama de dispersión que ilustra la relación entre varianza y correlación para la media de log10 y la desviación estándar de log10 de todas las proteínas identificadas en ambos grupos (Cx43- y Cx43+). Los círculos rojos representan proteínas identificadas en Cx43-, y los cuadrados azules son equivalentes a proteínas identificadas en Cx43+ (n=4). (e) Datos de secuenciación de ARN de EV Cx43- y de EV Cx43+. Se analizaron los datos teniendo en cuenta un valor de p<0,05 y cambio en veces < -3,8 y > 3,8 (n=3). Se usó MiRNet 2.0 (Xia Lab, McGill) para identificar rutas y procesos biológicos enriquecidos en EV Cx43- (azul) y Cx43+ (verde). Se seleccionaron rutas basándose en genes diana enriquecidos de ARN pequeños mapeados en ambos grupos. Los valores de p se muestran a la derecha. (f) Los datos muestran el porcentaje y la distribución de lecturas de secuenciación que se mapean al contenido de ARN pequeño en EV negativas para Cx43 y EV positivas para Cx43. Se realizó el análisis usando GraphPad Prism 7.0. (g) Matriz cromática generada a partir de datos de sec. de ARN que muestran la expresión de miARN en EV Cx43- y Cx43+. Algunos de los miARN encontrados regulados por incremento en EV Cx43+ en comparación con EV Cx43- están implicados en procesos tales como regulación negativa de proliferación celular (hsa-mir-30c-2, hsa-mir-24-2), migración (hsa-mir-30c-2, hsa-mir-34a-5p, hsa-mir-24-2) y angiogénesis (hsa-mir-34a-5p, hsa-mir-125b-5p) y regulación positiva de muerte celular (hsa-mir-34a-5p). (h) La imagen muestra las abundancias relativas de transcritos y cambios en veces entre EV Cx43- y Cx43+. La imagen representa la expresión génica diferencial en ambos grupos: las barras verdes representan genes sobreexpresados en Cx43+ y las barras rojas representan genes sobreexpresados en Cx43-. Se aceptaron identificaciones de péptidos si podían establecerse a una probabilidad mayor del 95,0 % mediante el algoritmo de FDR local de Scaffold. Se aceptaron identificaciones de proteínas si podían establecerse a una probabilidad mayor del 99,9 % y

contenían al menos 2 péptidos identificados. Se asignaron probabilidades de proteínas mediante el algoritmo de Protein Prophet (Nesvizhskii, Al *et al* Anal. Chem. 2003; 75(17): 4646-58).

Figura 4. La presencia de Cx43 en EV cambia la función de estas vesículas fomentando la actividad antitumoral. (a) Un análisis de inmunotransferencia de tipo Western para estudiar los niveles de Cx43 en EV derivadas a partir de A375 (Cx43-) y de A375 que sobreexpresan Cx43 (Cx43+) muestra altos niveles de Cx43 en lisado celular (panel superior) y EV (panel inferior) de A375 cuando las células tumorales sobreexpresan Cx43 (Cx43) (n=1). (b) Se marcaron EV purificadas (aisladas a partir de medios de cultivo celular) con Dil (tinción de membrana lipófila), para realizar un seguimiento de su captación por células. Se usó DAPI como tinción nuclear. (c) Un ensayo de formación de colonias muestra una reducción en la proliferación celular de líneas de células tumorales A375 y BLM después de 7 días de tratamiento con EV que contenían altos niveles de Cx43 (Cx43+) o sin (Cx43-). Se muestra la cuantificación a la derecha (A375, n=1 y BLM, n=1). (c) Inmunotransferencia de tipo Western para detectar proteína Cx43 en línea celular A375 no tratada (UT) en comparación con células que sobreexpresan Cx43 (A375-Cx43) y células A375 tratadas con medio condicional durante 48 horas (h) que contiene EV derivadas a partir de células A375 que sobreexpresan Cx43 (EV Cx43+). Se usó tubulina como control de carga. Se muestra la cuantificación a la derecha (n= 1). Se confirmó el efecto del medio condicional sobre los niveles de Cx43 en células A375 mediante RT-qPCR. Se muestran los niveles de ARNm de Cx43 en células de melanoma A375 tratadas con EV de A375 (Cx43-) y con EV de A375 que sobreexpresan Cx43 (Cx43+) (n=1). Se usó una prueba de la t de Student bilateral para calcular la significación representada de la siguiente manera: \*\*\* p < 0,001, \*\*\*\* p < 0,0001.

Figura 5. Los niveles de Cx43 aumentan cuando se tratan células tumorales con inhibidores de BRAF/MEK. (a) Inmunotransferencia de tipo Western que muestra los niveles de proteína Cx43 en células tumorales A375 tratadas con diferentes concentraciones del inhibidor de BRAF dabrafenib y el inhibidor de MEK trametinib durante 72 h. Se usó tubulina como control de carga. Se muestra la cuantificación mediante RT-qPCR (expresión génica) a la derecha: RT-qPCR para detectar el aumento de ARNm de Cx43 cuando se trataron células tumorales con 0,5 nM de trametinib y dabrafenib 100 nM, durante 72 h. Se normalizan datos con respecto a sin tratamiento (n= 2). (b) La presencia de Cx43 reduce significativamente la capacidad para formar colonias en células tumorales de melanoma A375 cuando se transfectaron las células con un vector para sobreexpresar Cx43 y se trataron con diferentes concentraciones de dabrafenib y trametinib durante 7 días. Se muestra la cuantificación del ensayo de formación de colonias a la derecha (n=1). (c) Análisis de citometría de flujo para detectar actividad SA-β-galactosidasa (compuesto FDG) en A375 que contienen el vector vacío (EV) o el vector para sobreexpresar Cx43 (Cx43) y tratadas con dabrafenib 100 nM y trametinib 1 nM (100D/1T) durante 5 días. Se midió la apoptosis mediante tinción doble PI/YO-PRO-1 y se analizó usando citometría de flujo (n=3). (d) Se trataron A375-EV y A375-Cx43 con NAV 3,5 μM (navitoclax) durante 24 h o con 1/100 nM de trametinib/dabrafenib (T/D) durante 5 días. También se trataron células con la combinación de T/D durante 4 días seguido por 24 h de tratamiento con NAV 3,5 μM. Se estudió la caspasa 3 escindida para detectar la apoptosis mediante inmunotransferencia de tipo Western. Se usó tubulina como control de carga. Se presentan los datos como media ± EEM. Se usó una prueba de la t de Student bilateral para calcular la significación representada de la siguiente manera: \* p<0,05, \*\* p<0,01.

Figura 6. Las células tumorales A375 resistentes frente a BRAF/MEKi pierden Cx43 y adquieren un fenotipo de tipo mesenquimatoso. (a) Ensayo de formación de colonias que demuestra que las células A375 resistentes (DR) casi no responden a BRAF/MEKi en comparación con control de A375. Los gráficos a la derecha muestran la cuantificación (n=3). Para obtener células tumorales resistentes frente a BRAF/MEKi, se trataron células durante de 1 a 4 meses con 100 nM y 1 nM de dabrafenib y trametinib. (b) Niveles de proteína Cx43 en células A375 no tratadas y células A375 resistentes (DR) después de 2 meses de exposición a dabrafenib 100 nM y trametinib 1 nM en comparación con células A375 sensibles BRAF/MEKi (S) tratadas con 100D/1T durante 72 h. Se muestra la cuantificación a la derecha (n = 3). Se usó tubulina como control de carga. Se analizó la expresión génica de Cx43 mediante RT-qPCR (derecha). Cuantificación de niveles de ARN (n= 3). Parte inferior: la inmunofluorescencia que muestra proteína Cx43 en células A375 sensibles y resistentes frente a BRAF/MEKi muestra cambios en el fenotipo celular entre células sensibles y resistentes. (c) Se analizó un extracto de células completas, y extracto de proteínas nucleares y de citoplasma mediante inmunotransferencia de tipo Western en células A375 no tratadas y tratadas con dabrafenib 5 nM durante 72 h (S) y durante 2 meses, en presencia de dabrafenib 20 nM (R). Los marcadores de epitelial a mesenquimatoso (EMT) indican que, cuando las células son sensibles a los tratamientos (5 μM), el aumento de Cx43 se correlaciona con niveles inferiores de Twist-1 nuclear y N-cadherina citoplasmática, mientras que cuando las células se vuelven resistentes, después de 2 meses en cultivo, hay un aumento de Twist-1 nuclear y N-cadherina citoplasmática que se correlaciona con pérdida de proteína Cx43. Se usaron tubulina y lamina A nuclear como controles de carga. (d) Las células A375 que sobreexpresan Cx43 tras la transfección con un vector (Cx43) muestran significativamente menos capacidad de proliferación celular y formación de colonias después de 1 - 2 semanas y 4 meses en tratamiento con BRAF/MEKi (T 1 nM / D 100 nM). La presencia de Cx43 aumenta la eficacia de la terapia y evita la adquisición de resistencia a fármacos (n = 3). No se detectó casi ninguna célula después de 2 semanas de tratamientos en presencia de Cx43. (e) La restauración de niveles de Cx43 en células tumorales A375 resistentes (DR) usando un vector sensibiliza las células tumorales frente a muerte celular por apoptosis. Se midió la apoptosis mediante tinción doble de PI/YO-PRO-1 y se analizó mediante citometría de flujo. Se muestra la cuantificación a la derecha. Se muestra el fenotipo celular a la izquierda (n = 1). Se presentan los datos como media ± EEM. Se usó una prueba de la t de Student bilateral o prueba de Mann-Whitney para calcular la significación representada de la siguiente manera: \* p<0,05, \*\* p<0,01 y \*\*\*p<0,001.

Figura 7. Las EV que contienen altos niveles de Cx43 tienen actividad antitumoral y mejoran la eficacia de inhibidores de BRAF/MEK. (a) Inmunotransferencia de tipo Western que muestra niveles de Cx43 en células de melanoma A375 y en EV derivadas a partir de células A375 en tratamiento con BRAF/MEKi (trame 0,5 nM y dabra 30 nM) durante 72 h. Se usaron tubulina (Tub) y CD9 como controles de carga. Se muestran las cuantificaciones a la derecha (n = 1). (b) Inmunotransferencia de tipo Western a partir de lisado celular y EV derivadas a partir de células HEK293. Se usaron CD9 y CD63 como controles de carga (n = 2). EV de HEK293 que contienen altos niveles de Cx43. (c) Ensayo de formación de colonias de células de melanoma A375 tratadas con dabra 30 nM y trame 0,5 nM y EV-Cx43+ aisladas a partir de HEK293 durante 5 días (n = 4). La presencia de EV enriquecidas en Cx43 reduce significativamente la capacidad para formar colonias y aumenta la eficacia del tratamiento. Se renovaron los tratamientos y las EV cada 48 h. UT (sin tratar), Cx43+ (EV derivadas a partir de HEK293). (d) Se expusieron células tumorales A375 resistentes frente a BRAF/MEKi a trame 2 ó 0,5 nM y dabra 200 ó 30 nM, en presencia o ausencia de EV enriquecidas en Cx43 aisladas a partir de HEK293 (Cx43+). El tratamiento de células de melanoma resistentes frente a BRAF/MEKi con EV Cx43+ no tiene ningún efecto significativo sobre la formación de colonias (izquierda), mientras que la combinación de EV Cx43+ con ambos inhibidores vuelve a sensibilizar las células resistentes frente al tratamiento. Se realizó un ensayo de formación de colonias durante 5 días y se renovaron los tratamientos cada 48 h (n = 4). (e) Ensayo de formación de colonias de línea celular de melanoma A375 tratada con el compuesto senolítico NAV (ABT-263, 3,5 µM) y EV Cx43+ durante 5 días. Se renovaron los tratamientos cada 48 h. Se muestra la cuantificación a la derecha (n = 4). (f) Se trataron células de melanoma A375 resistentes frente a BRAF/MEKi con NAV 0,5 µM en combinación con trametinib 2 nM y dabrafenib 200 nM, en presencia y ausencia de EV positivas para Cx43 durante 5 días. Se renovaron los tratamientos cada 48 h. Se muestra la cuantificación a la derecha (n = 4). Se presentan los datos como media ± EEM. Se usaron una prueba de la t de Student bilateral y ANOVA de un factor para calcular la significación representada de la siguiente manera: \* p<0,05, \*\* p<0,0, \*\*\*p<0,001.

## Descripción detallada de la invención

La presente invención se ilustra por medio de los ejemplos expuestos a continuación sin la intención de limitar su alcance de protección.

### Ejemplo 1. Materiales y métodos.

#### Ejemplo 1.1. Cultivo celular.

También se usaron las líneas de células tumorales con mutación de BRAF A375 (melanoma), SK-Mel-28 (melanoma), MDA-MB-231 (cáncer de mama humano) y HT-29 (adenocarcinoma colorrectal humano) para someter a prueba la función de Cx43 en la resistencia a fármacos. Se seleccionó la línea celular con mutación de NRAS SK-Mel147 (melanoma) para comparar los resultados con líneas celulares mutantes para BRAF. Se cultivaron células en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Lonza) complementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific) y penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml (Gibco, Thermo Fisher Scientific). Se cultivaron HT-29 en medio 5A de McCoy (Sigma-Aldrich) complementado con suero bovino fetal al 10 % (FBS) (Gibco, Thermo Fisher Scientific) y penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml (Gibco, Thermo Fisher Scientific). Se mantuvieron las líneas celulares en condiciones estériles bajo una campana de flujo laminar (Telstar BIO II A). Se mantuvieron las células a 37 °C en una incubadora humidificada con CO<sub>2</sub> al 5 % (SANYO CO<sub>2</sub>). Se cambió el medio cada 2-3 días. Para desprender las células, se retiró el medio, y se lavaron las células con una solución salina (Fresenius Kabi). Se añadió tripsina (Gibco, Thermo Fisher Scientific) a la placa y se incubó a 37 °C durante varios minutos (min). Tras añadir DMEM complementado con FBS al 10 %, se transfirieron las células a un tubo Falcon y se contaron usando el método de cámara de Neubauer en un microscopio óptico. Se centrifugaron las células a 1800 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 min a temperatura ambiente (TA) antes de sembrar en nuevas placas para usarlas para análisis experimental o para tratarlas con diferentes fármacos. Se disolvió el inhibidor de BRAF dabrafenib (D) (Tafinlar® 75 mg, Novartis) en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final de 1 mM y se almacenó a -20 °C. Se disolvió el inhibidor de MEK trametinib (T) (Mekinist® 2 mg, Novartis) en DMSO (1 mM) y se almacenó a -20 °C. Para obtener células con doble resistencia (DR) frente a T y D, se trataron células tumorales durante de 1 a 6 meses en presencia de ambos inhibidores (empezando con una dosis baja (T 0,5 nM + D 30 nM) y aumentando cuando las líneas celulares eran confluentes (T 2 nM + D 200 nM). Las concentraciones (inicial y de mantenimiento) usadas dependieron de la sensibilidad de las líneas celulares a los tratamientos. Se disolvió sal de disodio de carbenoxolona (CBX) (Sigma-Aldrich) en agua destilada (dH<sub>2</sub>O) a una concentración final de 20 mM y se almacenó a -4 °C.

#### Ejemplo 1.2. Transfección celular.

Se transfectaron líneas celulares mediante electroporación. Se usó el kit V Nucleofector® de líneas celulares de Amaxa® (Lonza) para transfectar células en un dispositivo Nucleofector™ de líneas celulares (Lonza). Se recogió un millón de células y volvieron a suspenderse en 100 µl de disolución de Nucleofector®. Se añadieron 3 µg del plásmido correspondiente, y se transfirió la mezcla a una cubeta de electroporación usando el programa U-28. Se transfectaron líneas celulares con constructo de plásmido pIRESpuo2 (Clontech) que contenía la secuencia de

Cx43 humana, donada por Arantxa Tabernero (Instituto de Neurociencia de Castilla y León, Universidad de Salamanca, España). Se sembraron las células transfectadas en medio de cultivo y 24 horas (h) tras la transfección se sustituyó el medio por medio completo que contenía clorhidrato de puomicina (Tocris, Bioscience) a diferentes concentraciones dependiendo de la línea celular (de 0,5 µg/ml a 2 µg/ml).

#### Ejemplo 1.3. Inmunotransferencia de tipo Western.

Se recogieron células y se lavaron dos veces con solución salina antes del aislamiento de proteínas. Se obtuvieron lisados celulares totales mediante disgregación de las células con una jeringa de calibre 30 de insulina (Omnican, Braun) en tampón de lisis helado compuesto por NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM (pH 8), Nonidet P-40 al 0,5 % (v/v), dodecilsulfato de sodio (SDS) al 0,1 % (p/v), sarcosilo al 0,5 % (v/v) (todos de Merck) complementado con fluoruro de fenilmetilsulfonilo 0,1 mM (PMSF) y cóctel de inhibidores de proteasa 1X (Sigma-Aldrich). Se añadió tampón de carga (β-mercaptoetanol al 10 % (v/v) (Merk); SDS al 10 %, glicerol al 50 % (v/v); Tris-HCl 200 mM pH 6,8, bromofenol azul al 0,1 %) a extractos de proteína y se sometió a ebullición a 99 °C durante 10 min. Se midieron las concentraciones de proteínas usando un dispositivo Nanodrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) y se usaron 30 µg de muestras de proteínas para realizar la electroforesis en SDS-PAGE en geles de acrilamida-bis-acrilamida al 10 % o al 15 % y posteriormente se transfirieron a membranas de poli(fluoruro de vinilideno) (PVDF) (Immobilon-P, Millipore) usando el sistema Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad Laboratories). Se realizó la transferencia a 100 V durante 1 ó 2 h en condición helada. Tras la transferencia, se tiñeron las membranas con disolución de tinción roja de ATX Ponceau S (Merk) durante 15 min a TA y después se eliminó la tinción con varios lavados con agua destilada. Se bloquearon las membranas con leche desnatada al 5 % (Merck) en solución salina tamponada con Tris con Tween-20 al 0,05 % (TBS-T) durante 1 h a TA. Se diluyeron anticuerpos primarios y anticuerpos secundarios en leche desnatada al 5 % TBS-T incubados durante la noche (O/N) a 4 °C o 1 h a TA, respectivamente. Los anticuerpos secundarios conjugados con HRP usados eran anticuerpos anti-ratón (NA-931, Sigma-Aldrich) y anti-conejo (A6154, Sigma-Aldrich). Se reveló la señal usando sustrato de inmunotransferencia de tipo Western de ECL Pierce™ (Thermo Fisher Scientific) o bien en un dispositivo LAS-3000 Imager (Fujifilm) o bien en un dispositivo Amersham Imager 600 (GE Healthcare). Se usó el software Image J para cuantificar las intensidades de bandas de proteínas.

Para el aislamiento de proteínas nucleares, se usó el kit de extracción nuclear y citoplasmática NE-PER™ (Thermo Fisher Scientific) siguiendo el protocolo del fabricante. Para proteínas de membrana (insolubles)/citosol (solubles), se sometieron a lisis células sedimentadas en Triton X-100 al 1 % (v/v) en solución salina tamponada con fosfato (PBS: MP Biomedicals) complementada con 0,1 PMSF y cóctel de inhibidores de proteasa 1X. Se agitaron las células con vórtex de manera intermitente y se mantuvieron en hielo durante 1 h. Se centrifugaron los lisados a 10.000 g durante 15 min a 4 °C y se recogió el sobrenadante (proteínas solubles citosólicas). Volvió a suspenderse la fracción insoluble en tampón de lisis (membrana). Los anticuerpos primarios usados fueron: anticuerpo anti-Cx43 (#C6219), Sigma-Aldrich 1:1000; anticuerpo anti-tubulina (T9026), Sigma-Aldrich 1: 5000; anticuerpo anti-N-cadherina (#13116), Cell Signaling 1:1000; anticuerpo anti-CDKN2A/p16INK4a (ab108349), Abcam 1:1000; anticuerpo anti-p53 (Sc-126, Santa Cruz) 1: 500; anticuerpo anti-p44/42 MAPK (Erk1/2) (#9102), Cell Signaling 1:1000; anticuerpo anti-Twist-1 (Sc-81417), Santa Cruz 1:100; anticuerpo anti-lamina A (Sc-20680), Santa Cruz 1:1000; anticuerpo anti-CD9 (Sc-9148), Santa Cruz 1:1000; anticuerpo anti-CD63 (Sc-15363), Santa Cruz 1:1000. Los anticuerpos secundarios usados fueron: anticuerpo de cabra anti-conejo (A6154), Sigma-Aldrich de 1:1000 a 1:5000; anticuerpo de oveja anti-ratón (NA-931), Sigma-Aldrich de 1:1000 a 1:10000.

#### Ejemplo 1.4. Inmunofluorescencia en células fijadas.

Se cultivaron 1×10<sup>4</sup> células en cubreobjetos (Thermo Fisher Scientific) hasta una confluencia del 80 - 90 %, se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 2 % (p/v) (PFA: Sigma-Aldrich) en PBS durante 15 min a TA. Se incubaron las células dos veces durante 10 min cada vez con glicina 0,1 M (Sigma-Aldrich), se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,2 % (Sigma-Aldrich) en PBS durante 10 min, se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con albúmina de suero bovino al 1 % (BSA; Sigma-Aldrich) a TA durante 30 min. Se incubaron células fijadas con anticuerpo primario diluido en BSA al 1 % en PBS complementada con Tween 10 al 0,1 % (v/v) (PBS-T) O/N a 4 °C. Después se lavaron las células tres veces con PBS y se incubaron con anticuerpos secundarios conjugados con Alexa (diluidos en BSA al 1 % en PBS-T) a TA durante 1 h en la oscuridad. Se lavaron las células tres veces con PBS y se sometieron a contratinción de núcleos con 1 µg/ml de diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma-Aldrich) durante 5 min a TA en la oscuridad y se aclararon tres veces con PBS. El montaje de los cubreobjetos se realizó con una gota de medio de montaje acuoso Glycergel (Dako) en un portaobjetos de microscopio de vidrio. Se obtuvieron controles negativos omitiendo el anticuerpo primario. El anticuerpo primario usado fue: anticuerpo anti-Cx43 (#C6219), Sigma-Aldrich 1:500; el anticuerpo secundario usado fue: anticuerpo de cabra anti-conejo (F-2765), Thermo Fisher Scientific 1:100.

#### Ejemplo 1.5. Ensayo de carga de raspaduras.

Se sembraron células en 6 ó 12 pocillos y se cultivaron hasta el 80 - 100 % de confluencia y se aclararon dos veces con PBS caliente. Se añadió sal de dilutio de CH de amarillo Lucifer (1 mg/ml) (LY: Cell Projects Ltd® Kent) en PBS a las células y se realizaron cortes paralelos (3 cortes por pocillo) con una hoja quirúrgica (Swann-Mortonscalpel®).

Después de 3 - 5 min a 37 °C, se lavaron las células con PBS y se fijaron en PFA al 2 % en PBS. LY pasa a incorporarse por las células a lo largo del corte y se mueve desde las células cargadas con colorante a las adyacentes conectadas mediante canales de unión comunicante funcionales. Se seleccionaron aleatoriamente las zonas para carga de LY en la parte central de pocillos para obtener las imágenes para cuantificación. Se captaron imágenes con un objetivo de 10x usando un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse Ti. Se usaron las exposiciones constantes para todas las imágenes para un experimento dado. Se cuantificaron diez imágenes por muestra. Se calculó la puntuación como la razón del número de células positivas para LY no dañadas en el borde y el número de células positivas para LY fuera del borde.

#### Ejemplo 1.6. Acoplamiento de colorante.

Se sembraron células en placas de 12 pocillos y se cultivaron hasta el 80-100 % de confluencia. Se llenaron micropipetas de vidrio con 133 mM de 5 ó 6-carboxifluoresceína con una carga negativa (-2) (Sigma-Aldrich) diluida en acetato de potasio 0,1 M (Sigma-Aldrich). Se realizó inyección en una célula y se aplicaron pulsos de hiperpolarización con una intensidad de 0,25-1 nA. Se excitaron las células con 488 nm en un microscopio confocal y se registró la imagen en Lasersharp (MRC-1024, BioRad). En el procedimiento de adquisición de imágenes, se definieron regiones de interés (o ROI) para detectar la célula en la que se realizó inyección, las células donadoras y las células receptoras adyacentes. Antes de realizar la inyección en la célula, se redujo la ganancia de los fotomultiplicadores por debajo del 20 % del intervalo de detección dinámico (desde 0-250), que se tomó como el valor basal. Se midió la fluorescencia emitida a 640/40 nm y 540/40 nm con dos fotodetectores, se estudió el transcurso de tiempo del paso de colorante desde la célula en la que se realizó la inyección hasta las células adyacentes.

#### Ejemplo 1.7. Aislamiento de ARN y reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-qPCR).

Se aisló ARN total a partir de células usando TRI Reagent® RT (Vitro Bio) según el protocolo del fabricante. Se recogieron de  $5 \times 10^5$  a  $10^6$  células y se sometieron a lisis en 1 ml de reactivo TRIzol. Se añadieron 230 µl de cloroformo a los tubos y se agitaron con vórtex durante 1 min. Se incubaron muestras durante 10 min a 4 °C y después se centrifugaron a 14.000 g durante 15 min a 4 °C. Tras la centrifugación, se recogió la fase acuosa (superior) y se transfirió a un nuevo tubo con 500 µl de isopropanol y se agitaron las muestras con vórtex durante 15 s. Se incubaron los tubos durante 30 min a -20 °C seguido por centrifugación a 14.000 g durante 15 min a 4 °C. Se desechó el sobrenadante, y se lavaron los sedimentos de ARN con 1 ml de etanol al 70 % y se centrifugaron durante 5 min a 7.000 g a 4 °C. Se desecharon los sobrenadantes, y se secaron los sedimentos de ARN al aire durante 2 h a 4 °C. Se trató el ARN con ADNasa I, libre de ADNasa (Thermo Fisher Scientific) siguiendo el protocolo del fabricante. Se cuantificaron las muestras de ARN en un dispositivo Nanodrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Se usó 1 µg de ARN para sintetizar ADN complementario (ADNc) con la mezcla maestra Superscript™ IV VILO™ (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific). Se desnaturalizaron las muestras durante 10 min a 65 °C, y se añadieron 2 µl de la mezcla maestra. Se incubaron las muestras usando un termociclador (Veriti, Applied Biosystems) durante 10 min a 25 °C, seguido por 60 min a 42 °C y 5 min a 85 °C. Finalmente, se cuantificaron las muestras de ADNc en un dispositivo Nanodrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) y volvieron a suspenderse en agua libre de ADNasa/ARNasa/proteasa (Sigma-Aldrich).

#### Ejemplo 1.8. PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).

Se mezclaron 5 µl de ADNc (1 µg) con 0,5 µl de mezcla de cebadores (10 µM de cada cebador), 10 µl de mezcla maestra verde Applied Biosystems™ PowerUP™ SYBR™ (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) y se completaron con dH<sub>2</sub>O hasta 20 µl por pocillo en un sistema LightCycler® 480 (Roche). El programa consistió en un primer ciclo de desnaturalización de 10 min a 95 °C seguido por 30 - 55 ciclos de amplificación durante 10 segundos (s) a 95 °C, 30 s a 60 °C para hibridación y 12 s a 72 °C para extensión. Los cebadores usados fueron: GJA1 (Cx43): directo: SEQ ID NO: 1; inverso: SEQ ID NO: 2. HPRT1: directo: SEQ ID NO: 3; inverso: SEQ ID NO: 4.

#### Ejemplo 1.9. Kit de recuento celular 8 (CCK-8).

Se reduce sal de tetrazolio altamente soluble en agua de Dojindo (WST-8) mediante actividad deshidrogenasa en células para dar un colorante de formazán de color amarillo, que es soluble en los medios de cultivo tisular. La cantidad del colorante de formazán generada por dehidrogenasas es directamente proporcional al número de células vivas. Se sembró un número igual de células (1000 - 2000 células) por triplicado en placas de 96 pocillos y se cultivaron en las diferentes condiciones. Se substituyó el medio por 100 µl de medio reciente y se añadieron 10 µl de reactivo de CCK-8 por pocillo. Tras una incubación durante de 1 a 4 h a 37 °C, se midió la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas NanoQuant Infinite M200 (TECAN). Se calcularon los resultados como densidad óptica (DO) 450 nm = DO de muestra - DO de blanco.

#### Ejemplo 1.10. Sistema xCelligence.

Se prepararon las placas de E8 xCELLigence mediante adición de 100 µl de medios completos a cada pocillo. Tras incubación a 37 °C, se insertaron las placas en la estación de xCELLigence, y se midió la impedancia de línea basal

para garantizar que todos los pocillos y conexiones estaban funcionando. Tras la recogida y el recuento, se diluyeron las células hasta la densidad de siembra seleccionada y se añadieron 100 µl de células en medio de cultivo a cada pocillo. Para los ensayos de proliferación celular para cada condición, se sembraron  $1 \times 10^3$  -  $5 \times 10^3$  células/pocillo en 100 µl de medios en el dispositivo E-Plate L8 (Acea Biosciences). Se monitorizó la unión y proliferación de las células cada 30 min. Se monitorizó la proliferación celular durante 48 - 72 h. El índice celular en cada punto de tiempo se define como  $(R_n - R_b)/15$ , donde  $R_n$  es la impedancia de célula-electrodo del pocillo cuando contiene células y  $R_b$  es la impedancia de fondo del pocillo con el medio solo. Para los ensayos de adhesión celular, para cada condición, se sembraron  $1 \times 10^3$  -  $5 \times 10^3$  células/pocillo en 100 µl de medios en un dispositivo E-Plate L8 (Acea Biosciences). Se monitorizó la proliferación celular durante 1 h cada 10 s. Se monitorizó el grado de adhesión y dispersión celular cada min durante 1 - 3 h. El índice celular en cada punto de tiempo se define como  $(R_n - R_b)/15$ , donde  $R_n$  es la impedancia de célula-electrodo del pocillo cuando contiene células y  $R_b$  es la impedancia de fondo del pocillo con medio solo.

#### Ejemplo 1.11. Ensayo Click-iT.

Se realizó proliferación celular mediante seguimiento de síntesis de nuevo ADN con el kit de ensayo Alexa Fluor 647™ Click-iT® (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, se cultivaron previamente células en un medio libre de suero y se incubaron con 10 µM de 5-etinil-2'-desoxiuridina (EdU), un análogo de nucleósido para timidina, durante 2 h para incorporarse en ADN durante la fase S (síntesis de ADN). Se recogieron las células, se fijaron, y se incubaron con la picolil-azida Alexa 647™. Se analizó la incorporación de EdU mediante citometría de flujo usando un dispositivo FACs Scalibur y adquiriendo 20.000 acontecimientos por triplicado. Se analizaron los datos usando el software FCS Express 6 Flow.

#### Ejemplo 1.12. Ensayo de clonogénica.

Se realizaron ensayos de formación de colonias sembrando de  $5 \times 10^3$  a  $5 \times 10^4$  células por pocillo en placas de 6 - 12 pocillos y haciendo crecer durante 7 - 15 días. Se sustituyó el medio de cultivo cada 48 h. Se lavaron las células con solución salina templada y se fijaron con PFA al 2 % frío durante 15 min. Se lavaron las células con 1 x PBS y se tiñeron con el 0,1 % de violeta cristal (Sigma-Aldrich) durante 15 min. Tras la tinción, se lavaron las células con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente. Se cuantificaron las colonias diluyendo violeta cristal en ácido acético al 5 % y se recogieron 100 µl de la disolución para medir la absorbancia a 570 nm usando un lector de microplacas NanoQuant Infinite M200 (TECAN).

#### Ejemplo 1.13. Ensayo de senescencia celular.

Se midió la detección de actividad SA-β-Gal usando el kit de tinción histoquímica de células en senescencia (Sigma-Aldrich). Se aclararon las células con PBS templada y se fijaron durante 7 min a TA con un tampón de fijación compuesto por paraformaldehído al 2 % y glutaraldehído al 0,2 %. Después de tres lavados con PBS, se incubaron las células durante 6 h o O/N a 37 °C sin CO<sub>2</sub> en una disolución de tinción que contenía X-gal. Este análogo de lactosa puede escindirse mediante β-galactosidasa produciendo un producto insoluble azul. Finalmente, se lavaron las células con PBS y se captaron imágenes usando un microscopio óptico.

#### Ejemplo 1.14. Detección de SA-β-Gal mediante citometría de flujo.

Se analizó la actividad SA-β-Gal con el sustrato de β-galactosidasa fluorogénico di-β-D-galactopiranosido (FDG, Thermo Fisher Scientific), que se hidroliza por la β-galactosidasa endógena para dar fluoresceína (FITC). Se recogieron las células y se incubaron en un medio de tinción (PBS, FBS al 4 %, HEPES 10 mM, pH 7,2) a 37 °C durante 10 min. Se inició el ensayo de β-galactosidasa añadiendo FDG 2 mM templado a la suspensión celular y tras incubación durante 3 min a 37 °C en la oscuridad. Se detuvo la reacción con la adición de medio de tinción helado a las células, que se mantuvieron sobre hielo protegidas de la luz. Se usó un láser de 515 nm para fluoresceína y se adquirieron 20.000 acontecimientos por triplicado. Se analizaron los datos usando el software FCS Express 6 Flow.

#### Ejemplo 1.15. Ensayo de apoptosis.

Se aspiraron sobrenadantes (células muertas) y se recogieron células unidas. Se mezclaron sobrenadantes y células, se contaron y volvieron a suspenderse 1 millón de células en 1 ml en tampón de citometría de flujo (FC). Se realizó un análisis de viabilidad de membrana mediante tinción doble PVYO-PRO-1. Se añadió YO-PRO-1 (Invitrogen) a las células (150 nM) y se incubaron 10 min en la oscuridad a 4 °C. Se añadió PI (Invitrogen) (2 µg/ml) y se incubó durante 5 min en la oscuridad a 4 °C. Tras el tiempo de incubación (PI/YO-PRO) se analizaron muestras en un dispositivo FACs Scalibur adquiriendo 20.000 acontecimientos por triplicado. Se detectó la fluorescencia roja emitida por PI a 610 nm y se detectó la fluorescencia verde emitida por YO-PRO a 515 nm. Se analizaron los datos usando el software FCS Express 6 Flow.

#### Ejemplo 1.16. Purificación de vesículas extracelulares (EV).

Se sembraron células en matraces de cultivo de 162 cm<sup>2</sup> (Corning, Sigma-Aldrich) hasta la confluencia (80 % -

90 %). Se lavaron las células tres veces con PBS y se cultivaron durante 48 h en DMEM con FBS al 0 %. Se recogieron los sobrenadantes y se centrifugaron a 1800 rpm durante 5 min. Se desechó el sedimento y se filtraron los sobrenadantes a través de un filtro de 0,22 µm y después se centrifugaron los sobrenadantes filtrados a 100.000 g durante 90 min a 4 °C (ultracentrifuga OptimaL-90K) usando un rotor 70 Ti (Beckman Coulter). Se desecharon los sobrenadantes y se lavó el sedimento que contenía EV con PBS y se centrifugó a 100.000 g durante 90 min a 4 °C. Volvió a suspenderse el sedimento con EV en medio de cultivo, PBS o tampón de lisis, dependiendo del análisis realizado. Se caracterizaron las EV mediante microscopía electrónica de barrido y mediante el dispositivo NTA Nanosight NS300.

#### Ejemplo 1.17. Inmunooro y microscopía electrónica de barrido.

Se fijaron EV purificadas en PFA al 2 %, y se depositaron 5 µl rejillas con Formvar-carbono y se dejaron secar al aire durante 1 h. Después se lavaron las rejillas tres veces con PBS, seguido por una incubación de 10 min con glicina 0,1 M. Se incubaron las rejillas con BSA al 1 % en PBS durante 10 min a TA. Se fijaron las rejillas con glutaraldehído al 1 % durante 5 min, seguido por varios lavados con agua destilada. Se tiñeron las rejillas en oxalato de uranilo a pH 7 durante 5 min y después se contrastaron en una mezcla de acetato de uranilo al 4 % y metilcelulosa al 2 % durante 5 min en hielo. Se secaron las rejillas y se almacenaron hasta la visualización usando un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM 1010.

#### Ejemplo 1.18. Marcado de EV.

Se tiñeron EV aisladas en 100 µl de PBS con Dil 1 µM durante 1 h a 37 °C. Después de eso, se lavaron las EV en 10 ml de PBS y se centrifugaron a 100.000 g durante 90 min a 4 °C. Volvió a suspenderse el sedimento en medio de cultivo para diferentes experimentos.

#### Ejemplo 1.19. Proteómica.

Se recogieron EV a partir de líneas de células tumorales A375-EV y A375-Cx43 en tampón de lisis (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM (pH 8), Nonidet P-40 al 0,5 % (v/v), SDS al 0,1 % (p/v), sarcosilo 0,5 % (v/v)) para aislamiento de proteínas. Con el fin de obtener una identificación de proteínas global, se cargó una cantidad igual de proteína (100 µg) de todas las condiciones en un gel del 10 % de SDS-PAGE. Se detuvo la corrida cuando el frente había penetrado 3 mm en el gel de resolución. Se visualizó la banda de proteína mediante tinción fluorescente con Sypro-Ruby (Lonza), se excitó, y se sometió a digestión trípica manual en gel siguiendo el protocolo definido por Shevchenko (Shevchenko) con modificaciones minoritarias. Se extrajeron los péptidos tres veces mediante incubación en 40 µl de una disolución que contenía ACN al 60 % y ácido fórmico al 0,5 % (HCOOH) durante 20 min. Se combinaron los extractos peptídicos resultantes, se concentraron en un dispositivo SpeedVac y se almacenaron a -20 °C<sup>3</sup>. Para la identificación de proteínas mediante CL-EM/EM, se separaron 4 µl (aproximadamente 4 µg) de péptidos digeridos de cada muestra usando cromatografía en fase inversa. Se desarrolló un gradiente usando un sistema de microcromatografía de líquidos (Eksigent Technologies nanoLC 400, SCIEX) acoplado a un espectrómetro de masas de alta velocidad Triple TOF 6600 (SCIEX) con una fuente de micro-flujo. La columna analítica usada era una columna en fase inversa basada en sílice Chrom XP C18 150 × 0,30 mm, tamaño de partícula de 3 µm y tamaño de poro de 120 Å (Eksigent, SCIEX). La columna de trampa era una YMC-TRIART C18 (YMC Technologies) con un tamaño de partícula de 3 µm y tamaño de poro de 120 Å, cambiada en línea con la columna analítica. La bomba de carga suministró una disolución de ácido fórmico al 0,1 % en agua a 10 µl/min. La micro-bomba proporcionó una velocidad de flujo de 5 µl/min y se hizo funcionar en condiciones de elución en gradiente, usando ácido fórmico al 0,1 % en agua como fase móvil A, y ácido fórmico al 0,1 % en acetonitrilo como fase móvil B. Se separaron los péptidos usando un gradiente de 90 min que oscilaba desde el 2 % hasta el 90 % de fase móvil B (fase móvil A: acetonitrilo al 2 %, ácido fórmico al 0,1 %; fase móvil B: acetonitrilo al 100 %, ácido fórmico al 0,1 %). Se llevó a cabo la adquisición de datos en un sistema TripleTOF 6600 (SCIEX) usando un flujo de trabajo dependiente de datos (DDA). Las condiciones de fuente y de interfaz fueron las siguientes: flotación de tensión de pulverización de iones (ISVF) 5500 V, cortina de gas (CUR) 25, energía de colisión (CE) 10 y gas de fuente de iones 1 (GS1) 25. Se hizo funcionar el instrumento con el software Analyst TF 1.7.1 (SCIEX). Se establecieron los criterios de cambio a iones mayores que una razón de masa con respecto a carga (m/z) de 350 y menores que 1400 (m/z) con un estado de carga de 2-5, tolerancia de masa de 250 ppm y un umbral de abundancia de más de 200 cuentas (cps). Se excluyeron iones objetivo anteriores durante 15 s. Se calibró automáticamente el instrumento cada 4 h usando como agente de calibración externo péptidos tríplicos de pepcalMix. Se realizó el análisis de espectrometría de masas en la instalación de proteómica del Instituto de Investigación Sanitaria de Santiago de Compostela (IDIS). Tras el análisis de EM/EM, se procesaron los archivos de datos usando el software ProteinPilot<sup>™</sup> 5.01 (SCIEX), que usa el algoritmo Paragon<sup>™</sup> para la búsqueda de bases de datos y Progroup<sup>™</sup> para el agrupamiento de datos. Se buscaron datos usando una base de datos de Uniprot específica de seres humanos. Se realizó una tasa de falsos descubrimientos (FDR) usando un método de ajuste no lineal que presentaba únicamente los resultados que notificaron una tasa de falsos descubrimientos global del 1 % o mejor (Shilov IV y Tang WH).

#### Ejemplo 1.20. Análisis de datos de proteómica.

Se estimaron niveles de expresión génica diferencial entre las EV derivadas a partir de control de A375 (EV Cx43-) y

EV derivadas a partir de A375 que sobreexpresaban Cx43 (EV Cx43+) basándose en la tasa de falsos descubrimientos (FDR). Se realizó un análisis de proteómica considerando FDR  $\geq 0,82$  para EV Cx43- y FDR  $\geq 0,79$  para EV Cx43+. Todos los cálculos se realizaron usando GraphPad Prism 7.0. Se construyeron proteomapas usando una herramienta en la web basándose en los valores de diferencia de la prueba de la t (Liebermeister *et al.*, 2014). Se realizó el análisis de enriquecimiento usando el software GSEA versión 4.0.3 (Subramanian *et al.* 2005) (ontología génica (GO), ortología de KEGG y base de datos de Reactome). Para el presente estudio, se realizó el análisis de enriquecimiento basándose en FDR del conjunto de datos de cada grupo de proteínas específicas (EV Cx43- y EV Cx43+). Se muestran las matrices cromáticas de análisis de GSEA mediante Prism basándose en la puntuación de enriquecimiento normalizada (NES) y FDR. Se usó Scaffold (versión Scaffold\_4.11.0, Proteome Software Inc., Portland, OR) para validar las identificaciones de péptidos y proteínas basadas en EM/EM. Se aceptaron identificaciones de péptidos si podían establecerse a una probabilidad de más del 95,0 % mediante el algoritmo de FDR local de Scaffold. Se aceptaron identificaciones de proteínas si podían establecerse a una probabilidad de más del 99,9 % y contenían al menos 2 péptidos identificados. Se asignaron probabilidades de proteínas mediante el algoritmo de Protein Prophet (Nesvizhskii, Al *et al* Anal. Chem. 2003; 75(17): 4646-58). Las proteínas que contenían péptidos similares y no pudieron diferenciarse basándose en el análisis de EM/EM por sí solo se agruparon para satisfacer los principios de moderación. Las proteínas que compartían evidencias de péptidos significativas se agruparon en agrupaciones.

#### Ejemplo 1.21. Sec. de ARN.

Se cultivaron células tumorales A375-EV y A375-Cx43 en matraces de 175 cm<sup>2</sup> hasta una confluencia del 80 %. Se recogieron 10 ml de medios de cultivo celular y se centrifugaron a 1500 x g durante 5 min para eliminar células y residuos. Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo cónico de 50 ml para aislamiento de exosomas (EV). Se añadió ExoQuick-TC (System Biosciences) al sobrenadante a una razón de 1:5 (ExoQuick:sobrenadante), se mezcló suavemente, y se dejó incubar O/N a 4 °C. Al día siguiente, se centrifugó la mezcla a 1500 x g durante 30 min para recuperar exosomas para aislamiento de ARN total. Los exosomas restantes de las muestras se procesaron para aislamiento de ARN total usando el kit de columna de purificación de ARN de exosomas SeraMir (System Biosciences) según las instrucciones del fabricante. Para cada muestra, se usó 1 µl del eluato de ARN final para la medición de la concentración de ARN pequeño mediante ensayo de ARN pequeño de Agilent Bioanalyzer usando el instrumento Bioanalyzer 2100 Expert (Agilent Technologies). Se construyeron bibliotecas de ARN pequeño con el kit de preparación de bibliotecas de ARN pequeño Clean Tag (TriLink) según el protocolo del fabricante. Se cuantificó la biblioteca purificada final con reactivos de ADN de alta sensibilidad (Agilent Technologies). Se combinaron las bibliotecas, y se seleccionó por tamaño la región de 140 pb a 300 pb en un gel de TBE al 8 % (Invitrogen, Life Technologies). Se cuantificó la biblioteca sometida a selección de tamaño con 1000 Screen Tape para ADN de alta sensibilidad (Agilent Technologies). Reactivos D1000 de alta sensibilidad (Agilent Technologies), y el ensayo de qPCR TailorMix HT1 (SeqMatic), seguido por una secuenciación de un único extremo de alto rendimiento NextSeq realizada a SR75 usando el kit NextSeq 500/550 High Output v2 (Illumina) según las instrucciones del fabricante. El kit de análisis de sec. de ARN pequeño de exosoma empieza con una comprobación de calidad de datos de la secuencia de entrada usando FastQC, una herramienta de control de calidad (QC) de código abierto para datos de secuencias de alto rendimiento. FastQC ejecuta análisis de las lecturas de secuencia sin procesar subidas para calidad de los datos e informa a las etapas de procesamiento previo posteriores en el análisis. Después de QC, el análisis pasa al procesamiento previo de las lecturas de sec. de ARN para mejorar la calidad de los datos introducidos para el mapeo de lecturas. Las herramientas de código abierto usadas son FastqMcf, parte del paquete de EA-utilis, y PRINSEQ. El procesamiento previo de datos detecta y retira N en los extremos de las lecturas, recorta los adaptadores de secuenciación, y filtra las lecturas en cuanto a calidad y longitud. Después vuelve a ejecutarse FastQC para analizar las lecturas recortadas, permitiendo una comparación antes y después. El informe de resumen generado proporciona una comprobación de garantía de calidad para validar el conjunto procesado de datos de entrada usados en la etapa de mapeo de lecturas posterior. El conjunto mejorado de lecturas de secuencias se mapea al genoma de referencia usando Bowtie, un alineador de lecturas cortas ultrarrápido, con eficiencia de memoria, seguido por la generación de un informe de resumen de mapeo para su revisión. Usando el software de código abierto SAMtools y análisis de expresión de Picard se llevan a cabo determinación de la abundancia de ARNnc y análisis de expresión diferencial a lo largo de muestras. Se calculan datos estadísticos de expresión y se visualizan usando el software R para cálculo estadístico y gráficos. El kit de análisis de sec. de ARN pequeño de exosoma identifica y mapea miARN, ARNt, ARNr pequeños, elementos de repetición, transcritos antisentido y una variedad de ARNnc pequeños. El análisis de sec. de ARN pequeño de exosoma produce un resumen de resultados, incluyendo datos estadísticos y distribución de cromosoma, así como pistas de explorador de genoma de alineación de lecturas y cobertura de lecturas para análisis en un contexto genómico.

#### Ejemplo 1.22. Análisis de datos de sec. de ARN.

Se analizaron datos considerando un valor de p <0,05 y cambio en veces <-3,8 y >3,8. Se consideró que los genes se expresaban de manera diferencial si la comparación de la abundancia relativa entre ambos grupos es positiva o negativa. La lista de genes expresados de manera diferencial en EV Cx43- y EV Cx43+, que contiene identificadores génicos y valores de expresión correspondientes (cambios en veces), se subió a la herramienta en línea miRNet 2.0 (Xia Lab, McGill). El análisis incluyó procesos biológicos, rutas canónicas, procesos biológicos, funciones moleculares y redes génicas. Se realizaron gráficos usando GraphPad Prism 7.0.

## Ejemplo 2. Resultados.

Ejemplo 2.1. La restauración de la expresión génica de Cx43 en células cancerosas con una mutación en BRAF y NRAS tiene efectos antitumorales.

La línea celular de melanoma A375 primaria se derivó a partir de tejido de melanoma humano. Se ha observado una expresión reducida de conexinas (Cx) en líneas celulares de melanoma. Se analizó la expresión de Cx43 en línea celular de melanoma metastásico humana A375. Para abordar el efecto directo de Cx43 en melanoma, se transfectó vector de expresión con Cx43 (Cx43) o vector vacío (EV) en células A375. Se confirmó la sobreexpresión de Cx43 mediante inmunotransferencia de tipo Western, análisis de citometría de flujo, RT-qPCR y tinción de inmunofluorescencia (IF) (figura 1a). Se asoció la sobreexpresión de Cx43 con la presencia de Cx43 en la membrana formando la placa de unión comunicante (GJ) en la superficie de contacto célula-célula (flechas rojas en IF, figura 1a). Según estos resultados, las células transfectadas con Cx43 mostraron niveles aumentados de acoplamiento de colorante en comparación con EV de control (figura 1b), demostrando que las células forman canales de GJ funcionales. Estos resultados se comprobaron con dos técnicas diferentes, mediante transferencia de colorante y mediante carga de raspaduras (figura 1b). La sobreexpresión de Cx43 induce una reducción significativa en la tasa de proliferación de células A375 con una mutación en BRAF (figura 1c). Se analizaron estos resultados mediante xCelligence, ensayo de formación de colonias y ensayo de CCK8. Cx43 tiene funciones dependientes de canales (semicanales y GJ) e independientes de canales. Para saber si el bloqueo de canales conduce a una reducción significativa en la razón de proliferación, se usó el agente de bloqueo de canales carbenoxolona (CBX) para inhibir las funciones de canales de Cx43. Cuando se trataron las células (EV y Cx43) con CBX, no se detectaron cambios en la proliferación celular cuando se sobreexpresaba Cx43 (figura 1d). Este hallazgo indica que la función de Cx43 en la proliferación celular es independiente de canales. La senescencia celular se define de manera amplia como el programa fisiológico de parada de crecimiento terminal. Las células que experimentan senescencia no pueden dividirse aunque se estimulen mediante mitógenos, pero parecen metabólicamente y sintéticamente activas y muestran cambios característicos en cuanto a morfología. El marcador más ampliamente usado para células en senescencia es SA- $\beta$ -gal, que podía detectarse mediante citometría de flujo y tinción en células con EV y Cx43 (figura 1e). En la figura 1e, se confirmó mediante inmunotransferencia de tipo Western que las células con Cx43 expresaban niveles superiores de los biomarcadores de senescencia p53 y p16 que las células de control (transfectadas con EV). Para determinar si Cx43 está implicado en el control de la supervivencia celular en células de melanoma humanas, se midió el porcentaje de células apoptóticas cuando se sobreexpresaba Cx43. El porcentaje basal de células apoptóticas tempranas era significativamente superior en células que sobreexpresaban Cx43 en comparación con células transfectadas con el EV (figura 1f). Estos resultados en conjunto indican que Cx43 reduce la proliferación celular y potencia la senescencia y la muerte celular por apoptosis en células de melanoma mutantes para BRAF (A375). La desregulación de la ruta de MAPK está principalmente provocada por mutaciones en BRAF y en NRAS. Con el fin de investigar la función de Cx43 en líneas celulares mutantes para NRAS, se transfectaron las líneas celulares de melanoma Sk-Mel-147 con una mutación de NRAS con el vector para sobreexpresar Cx43. En la figura 1g se observa que esta línea celular forma colonias más pequeñas y muestra niveles inferiores de células cuando se sobreexpresa Cx43. Con el fin de confirmar la función de Cx43 en otros cánceres con una mutación en BRAF, se transfectaron diferentes líneas celulares humanas a partir de cáncer colorrectal y de mama con una mutación en BRAF con el vector que sobreexpresaba Cx43. La sobreexpresión de Cx43 en ambas líneas de células tumorales redujo significativamente la proliferación celular y la capacidad para formar colonias (figura 1h). Estos resultados demostraron que Cx43 actúa como supresor tumoral reduciendo la proliferación celular en células tumorales con BRAF y NRAS mutantes. Sin embargo, la función de Cx43 en la reducción de la proliferación y el aumento de la senescencia y apoptosis parece producirse independientemente de su actividad de canal tal como se muestra en la figura 1d. Dado que se encontró Cx43 en EV que incluían exosomas y estas partículas se han implicado en la progresión tumoral, se decidió investigar la función de Cx43 dentro de estas vesículas.

Ejemplo 2.2. Se encuentran niveles de Cx43 en vesículas extracelulares (EV) que incluyen exosomas.

Se ha notificado que EV que incluyen exosomas participan en el desarrollo y la progresión de malignidad de cáncer fomentando la proliferación de cáncer, estableciendo un nicho premetastásico, y regulando la resistencia a fármacos. Se aislaron EV a partir de la línea celular A375 y se caracterizaron mediante microscopía electrónica y mediante análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) confirmando que los tamaños de estas partículas están entre 20-100 nm (figura 2a). Se estudió la presencia de Cx43 mediante inmunotransferencia de tipo Western y se detectó que las células que sobreexpresan Cx43 contienen esta proteína en sus EV (figura 2b). Se usó el marcador de EV de tetraspanina CD9 como control. Se confirmaron los mismos resultados en otras líneas de células tumorales transfectadas con el mismo vector para sobreexpresar Cx43 (figura 2c).

Ejemplo 2.3. La presencia de Cx43 en EV cambia el contenido en proteína y ARN pequeño.

Cx43 puede interactuar con diferentes proteínas y probablemente con diferentes moléculas de ARN y ADN. Por este motivo, se decidió investigar si la presencia de Cx43 en las EV podía cambiar el contenido en proteína y ARN de las EV secretadas por células tumorales que sobreexpresan esta proteína de canal. Las EV tienen la capacidad

de portar cargamentos específicos de célula de proteínas, lípidos, y materiales genéticos, y pueden captarse de manera selectiva por células contiguas o distantes y modificar su señalización y funciones. Con el fin de estudiar si la presencia de Cx43 en EV puede afectar a su contenido, se realizó un análisis proteómico (CL-EM/EM) y de secuencia de ARN. Para determinar el perfil de proteínas de las EV (EV negativas para Cx43(-) y positivas para Cx43(+)), se separaron proteínas exosómicas totales mediante SDS-PAGE. Se identificó un total de 1141 proteínas para ambos grupos de EV (Cx43- y Cx43+), 160 proteínas eran exclusivas de EV negativas para (Cx43-) y 482 proteínas eran exclusivas para EV que contenían (Cx43+) (figura 3a). Se representaron estas proteínas en un proteomapa (figura 3b), en el que se muestran la ortología de KEGG y los términos de procesos biológicos asociados con una abundancia baja y alta de proteínas observadas en EV Cx43- y en EV Cx43+. Se usaron análisis de enriquecimiento de conjuntos génicos (GSEA), ontología génica (GO), ortología de KEGG y base de datos de Reactome para identificar rutas y procesos biológicos significativamente enriquecidos en EV aisladas a partir de células Cx43- (figura 3c, naranja) y Cx43+ (figura 3c, azul). Se observó un incremento significativo en algunas de las proteínas identificadas en EV que contenían Cx43 mediante análisis de enriquecimiento (véase la puntuación de enriquecimiento normalizada (NES) y valores de p, figura 3c). Los resultados proteómicos indican que la presencia de Cx43 aumenta el número de proteínas que se reclutan a las EV (482 proteínas en EV Cx43+ y 160 proteínas en EV Cx43-) y también cambia radicalmente el contenido en proteínas que está ahora enriquecido en rutas tales como unión a ácido nuclear, reparación de ADN, matriz mitocondrial, unión a ARN, regulación de motilidad celular, regulación de producción de citocinas o regulación de migración celular (figura 3d). Estos resultados demuestran que Cx43 cambia radicalmente el contenido en proteínas de las EV. Proteínas tales como CELF1, CPSF2 (implicadas en corte y empalme de ARN); DCTN2, FAM105B (procesos de sistema inmunitario); SMARCA4, SMARCC1 (desensamblaje de cromatina); MCM7, CDK1, CDK6 (transición G1/S de ciclo celular mitótico); LIMS1, MAP2K1(envejecimiento celular) o MGEA5, PGAM5 (muerte celular necrótica), sólo se encontraron en EV que contenían Cx43.

Por otro lado, el análisis de enriquecimiento del contenido en ARN pequeño se analizó usando MiRNet 2.0. Las matrices cromáticas muestran rutas y procesos biológicos significativamente enriquecidos en EV aisladas a partir de células Cx43- (figura 3e, azul) y Cx43+ (figura 3e, verde). Se clasifican las rutas según el número de genes que están enriquecidos en cada una de ellas (recuentos génicos observados) y su FDR. Se observaron varios ARN pequeños implicados en rutas tales como muerte celular, autofagia y parada del ciclo celular en EV que contienen Cx43.

La presencia de Cx43 también cambia los patrones de ARN pequeños que modifican la función celular en células receptoras. El análisis de secuenciación de ARN mostró (figura 3f) un cambio radical en los tipos de ARN que se transportan en estas vesículas dependiendo de la presencia de Cx43. EV que contienen Cx43 están principalmente enriquecidas en miARN y ARNr que representan el 28,2 % y el 20,2 % de todas las lecturas sin procesar, respectivamente. En EV negativas para Cx43, los ARN más abundantes fueron ARNr y miARN tales como hsa-mir-24-2, hsa-miR-34a-5p, hsa-mir-30c-2, hsa-miR-140-5p, hsa-miR-19a-3p y hsa-miR-125b-5p que se regularon por incremento en más de 400 veces en EV positivas para Cx43 en comparación con EV negativas para Cx43 con cambios en veces diferenciales entre un intervalo de 448,77 (hsa-miR-125b-5p) y 8550,33 (hsa-mir-24-2) (figura 3g). Estos miARN están implicados en procesos tales como regulación negativa de la de proliferación celular (hsa-mir-30c-2, hsa-mir-24-2), migración (hsa-mir-24-2, hsa-miR-34a-5p, hsa-mir-30c-2), angiogénesis (hsa-miR-34a-5p, hsa-miR-125b-5p) y regulación positiva de la muerte celular (hsa-miR-34a-5p). Cuando se analizaron las abundancias relativas de transcritos y cambios en veces entre EV negativas para Cx43 y positivas para Cx43 y se detectaron varios ARN pequeño sobrerrepresentados en EV positivas para Cx43, tales como un enriquecimiento de miARN (mostrados en la figura 3g), piARN (por ejemplo piR-30112, piR-31447 o piR-31703), CDBox (HBII-2020, U58A) o HacaBox (ACA3, HBI-6 o ACA53) (figura 3h). Estos datos sugieren que la presencia de Cx43 en EV cambia el contenido de ARN pequeños y proteínas, probablemente cambia su mensaje y señalización en células diana.

Ejemplo 2.4. La presencia de Cx43 en EV cambia la función de estas vesículas fomentando la actividad antitumoral.

Con el fin de investigar la función de Cx43 en EV, se trataron células tumorales con EV que contenían o no contenían Cx43 y liberadas por células de melanoma que sobreexpresaban Cx43 o por células de melanoma normales que casi no expresaban Cx43 (figura 4a). La presencia de Cx43 en las EV de células donadoras (figura 4a) se confirmó mediante inmunotransferencia de tipo Western (lisado celular y EV) y la capacidad para entrar en las células diana se estudió mediante IF (se marcaron EV con DIL y se detectaron dentro de las células receptoras mediante microscopía de fluorescencia) (figura 4b). Para estudiar el efecto de estas EV, se usaron dos líneas de células tumorales diferentes (A375 y BLM) como células receptoras en ensayos de formación de colonias. Se trataron ambas líneas celulares con EV a partir de A375-EV y A375-Cx43. Tal como se muestra en la figura 4c, se observó una reducción significativa en la capacidad para formar colonias y proliferación celular cuando se trataron células tumorales con EV que contenían Cx43. El tratamiento con EV positivas para Cx43 también reguló por incremento los niveles de proteína Cx43 y ARNm en células diana y detectados mediante inmunotransferencia de tipo Western y RT-qPCR (figura 4d).

Ejemplo 2.5. Los niveles de Cx43 aumentan cuando se tratan células tumorales con inhibidores de BRAF/MEK.

La selección como diana de BRAF y MEK usando inhibidores específicos ha pasado a ser las normas asistenciales

para pacientes con melanoma y tumores con una mutación en BRAF. Sin embargo, los beneficios terapéuticos con frecuencia están limitados debido al desarrollo de resistencia a fármacos. Para examinar el posible efecto de Cx43 sobre la respuesta de células tumorales frente a tratamiento con inhibidores de BRAF/MEK (BRAF/MEKi) (dabrafenib/trametinib), se trató una línea celular de melanoma A375 con dabrafenib y trametinib (figura 5a). Durante los tratamientos, se observó mediante RT-qPCR e inmunotransferencia de tipo Western un aumento en los niveles de Cx43 en la línea celular A375 cuando estas células eran sensibles a tratamientos (figura 5a). Además, cuando se sobreexpresaba Cx43 usando un vector, las células tumorales respondían de manera más eficiente a diferentes concentraciones de BRAF/MEKi reduciendo la proliferación celular y la capacidad para formar colonias (figura 5b, izquierda). La presencia de Cx43 en tratamientos potenció la senescencia celular detectada mediante citometría de flujo y mediante tinción de  $\beta$ -Gal (figura 5c). Para confirmar que ahora las células son más sensibles a apoptosis, se realizó un análisis de inmunotransferencia de tipo Western para detectar la escisión de caspasa 3 (figura 5f). Cx43 aumenta la senescencia celular y la apoptosis en células tumorales en estos tratamientos. Con el fin de someter a prueba si la combinación con una molécula senolítica podía aumentar la eficacia de los tratamientos, se combinaron BRAF/MEKi con sobreexpresión de Cx43 y navitoclax (NAV). Tal como se muestra en la figura 5f, las células que sobreexpresaban Cx43 en combinación con BRAF/MEKi (recuadro rojo) y Cx43 en combinación con BRAF/MEKi más NAV, mostraron los niveles más altos de escisión de caspasa 3 (recuadro verde) indicando que la combinación da como resultado un tratamiento más eficiente para activar la muerte celular de células tumorales en tratamiento con BRAF/MEKi (figura 5f).

Ejemplo 2.6. Las células tumorales A375 resistentes frente a BRAF/MEKi pierden Cx43 y adquieren un fenotipo de tipo mesenquimatoso.

Para someter a prueba si Cx43 también está implicado en la resistencia adquirida de células de melanoma frente a BRAF/MEKi, se seleccionaron células para determinar su resistencia frente a dabrafenib y trametinib mediante exposición prolongada a altas concentraciones de estos fármacos. Después de 4 meses, las células con doble resistencia (DR) casi no respondían a altas concentraciones de ambos fármacos (figura 6a). Cuando las células eran DR frente a BRAF/MEKi, la proteína Cx43 se reguló por disminución (figura 6b) en comparación con su homólogo parental y con células sensibles a tratamientos (S). También se observó una reducción en los niveles de ARNm de Cx43 (figura 6b). Las células DR regularon por disminución Cx43 y experimentaron un cambio fenotípico que correspondió a una transición de epitelial a mesenquimatoso (EMT) tal como se detectó mediante inmunotransferencia de tipo Western (figura 6c). Se mostró que el factor de transcripción de EMT Twist-1 estaba regulado por incremento en células DR y localizado en la fracción nuclear. El aumento en Twist-1 estuvo acompañado por niveles elevados de marcador de EMT N-cadherina en el citoplasma (figura 6c) y se correlaciona con una pérdida de Cx43. El siguiente punto fue ver cómo la sobreexpresión de Cx43 afectaba a la resistencia frente a BRAF/MEKi en diferentes momentos (1 semana, 2 semanas y 4 meses). De manera interesante, cuando se hicieron crecer células en presencia de Cx43 durante 1 y 2 semanas y durante 4 meses, los ensayos de formación de colonias (figura 6d) mostraron que la sobreexpresión de Cx43 evitaba la adquisición de resistencia a fármacos (figura 6d). Además, cuando se transfectaron células resistentes frente a BRAF/MEKi (DR) con un vector para sobreexpresar la proteína, las células DR se volvieron sensibles a tratamientos y la nueva expresión de Cx43 en células DR aumenta la razón de MFI de células apoptóticas (figura 6e).

Ejemplo 2.7. EV que contienen altos niveles de Cx43 tienen actividad antitumoral y mejoran la eficacia de BRAF/MEKi.

Cuando se trataron células tumorales de melanoma (A375) con BRAF/MEKi se detectó un aumento en los niveles de proteína Cx43 cuando las células son sensibles a estos tratamientos (figura 7a). El tratamiento con ambos inhibidores también aumenta los niveles de proteína Cx43 en las EV liberadas por estas células (figura 7a), indicando que ahora estas partículas pueden tener una función diferente (figura 4c). Con el fin de estudiar el efecto de Cx43 dentro de las EV, se aislaron EV a partir de la línea celular HEK 293 que contenían altos niveles de Cx43 tal como se muestra mediante inmunotransferencia de tipo Western en la figura 7b. Para confirmar que las EV positivas para Cx43 tienen un efecto antiproliferativo, se trataron células A375 con EV derivadas de HEK 293 (figura 7c). Cuando se trataron células A375 con EV positivas para Cx43, se observó una reducción en la formación de colonias y un aumento en la eficacia del tratamiento con BRAF/MEKi, cuando se trataron conjuntamente las células con EV positivas para Cx43 y con BRAF/MEKi (figura 7c). Además, cuando se trataron células con doble resistencia con BRAF/MEKi (DR) con EV que contenían Cx43, se observó una reducción en la capacidad para formar colonias, y, de manera importante, estas células DR ahora son más sensibles a tratamientos con BRAF/MEKi (figura 7d). Estos inhibidores aumentan la senescencia celular y este estado de parada del ciclo celular se ha implicado en la resistencia a fármacos y la progresión tumoral. De hecho, la combinación con un fármaco senolítico que selecciona específicamente como diana células senescentes, tal como navitoclax (NAV), está actualmente en ensayos clínicos en EE. UU. (identificador de ClinicalTrials.gov: NCT01989585). Los presentes resultados indican que la combinación de NAV con EV que contienen Cx43 reduce significativamente la capacidad de formar colonias de células tumorales (figura 7e). De manera importante, la combinación de EV positivas para Cx43 con NAV y BRAF/MEKi selecciona eficazmente como diana células DR, reduciendo significativamente su capacidad para formar colonias (figura 7f).

Estos resultados demuestran que Cx43 dentro de EV da como resultado (i) una estrategia terapéutica eficaz para reducir la proliferación celular en células tumorales mutantes para BRAF; (ii) aumenta la eficacia de BRAF/MEKi y

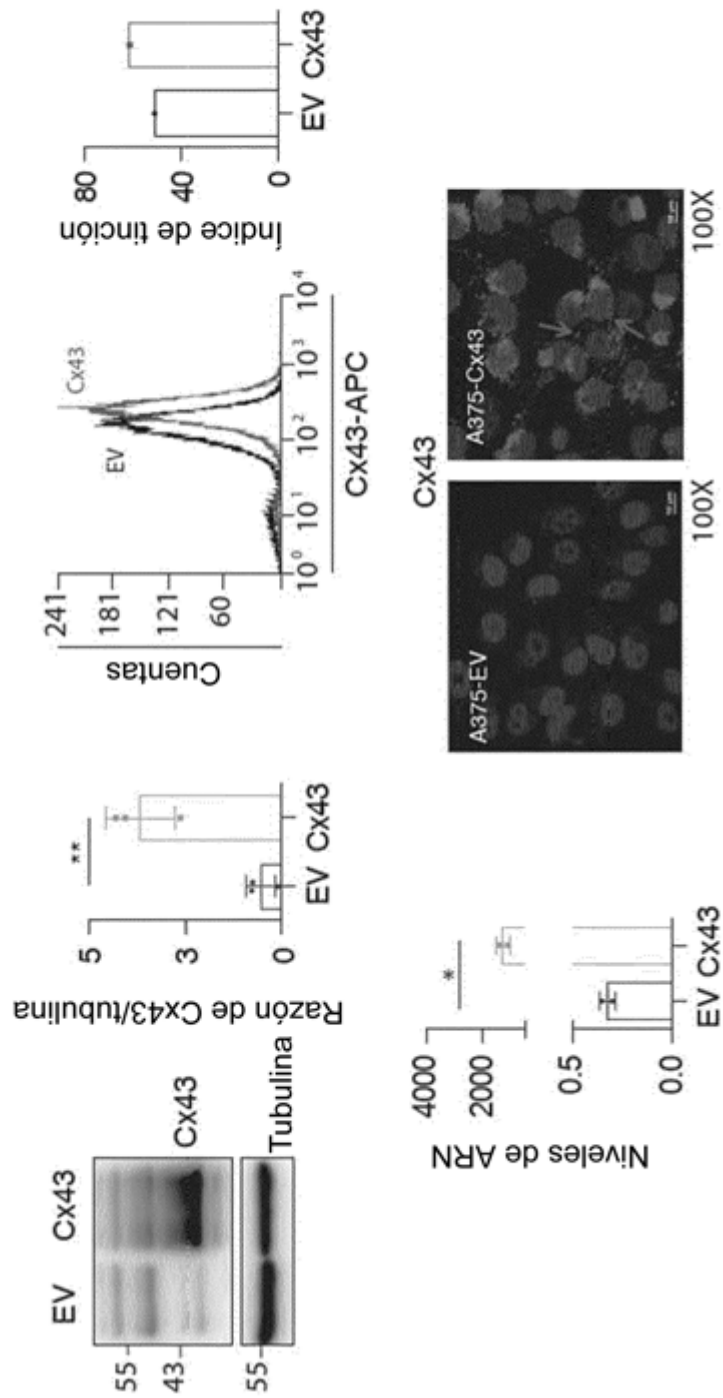
(iii) la combinación con navitoclax y BRAF/MEKi selecciona como diana células tumorales resistentes y vuelve sensibles nuevamente células DR frente a BRAF/MEKi (figura 7c-f) evitando la resistencia a fármacos.

# REIVINDICACIONES

1. Conexina 43 para su uso en el tratamiento de cáncer, en la que el cáncer está caracterizado por la activación de una proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) seleccionada de la lista que consiste en: BRAF, RAS, MEK o ERK.
2. Conexina 43 para su uso, según la reivindicación 1, en el tratamiento de cáncer en la que el cáncer está caracterizado por la activación de BRAF o NRAS.
3. Conexina 43 para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el tratamiento de un tipo de cáncer seleccionado de: melanoma, cáncer de colon, cáncer de pulmón o cáncer de mama.
4. Conexina 43 para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, antes de, después de o simultáneamente con un tratamiento con un inhibidor de una proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) seleccionada de la lista que consiste en: BRAF, RAS, MEK o ERK.
5. Conexina 43 para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, antes de, después de o simultáneamente con un tratamiento con un inhibidor de BRAF y/o MEK.
6. Conexina 43 para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, antes de, después de o simultáneamente con un tratamiento con dabrafenib, trametinib, vemurafenib, encorafenib, cobimetinib y/o binimetinib.
7. Conexina 43 para su uso, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, antes de, después de o simultáneamente con un tratamiento con un agente senolítico, preferiblemente navitoclax.
8. Producto terminado de combinación que comprende conexina 43 y un inhibidor de una proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) seleccionada de la lista que consiste en: BRAF, RAS, MEK o ERK.
9. Producto terminado de combinación, según la reivindicación 8, que comprende conexina 43 y un inhibidor de BRAF y/o MEK.
10. Producto terminado de combinación, según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, que comprende conexina 43 y dabrafenib, trametinib, vemurafenib, encorafenib, cobimetinib y/o binimetinib.
11. Producto terminado de combinación, según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, que comprende además un agente senolítico, preferiblemente navitoclax.
12. Composición farmacéutica que comprende el producto terminado de combinación según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11 y, opcionalmente, excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables.
13. Composición farmacéutica para su uso, según la reivindicación 12, en el tratamiento de cáncer en la que el cáncer está caracterizado por la activación de proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) seleccionada de la lista que consiste en: BRAF, RAS, MEK o ERK, en la que se administra conexina 43 usando un vehículo de administración.
14. Composición farmacéutica para su uso, según la reivindicación 13, en la que el vehículo de administración es una nanopartícula, una vesícula extracelular o un vector de expresión que codifica para conexina 43.

**Figura 1**

**A**



**Figura 1 (cont.)**

**B**

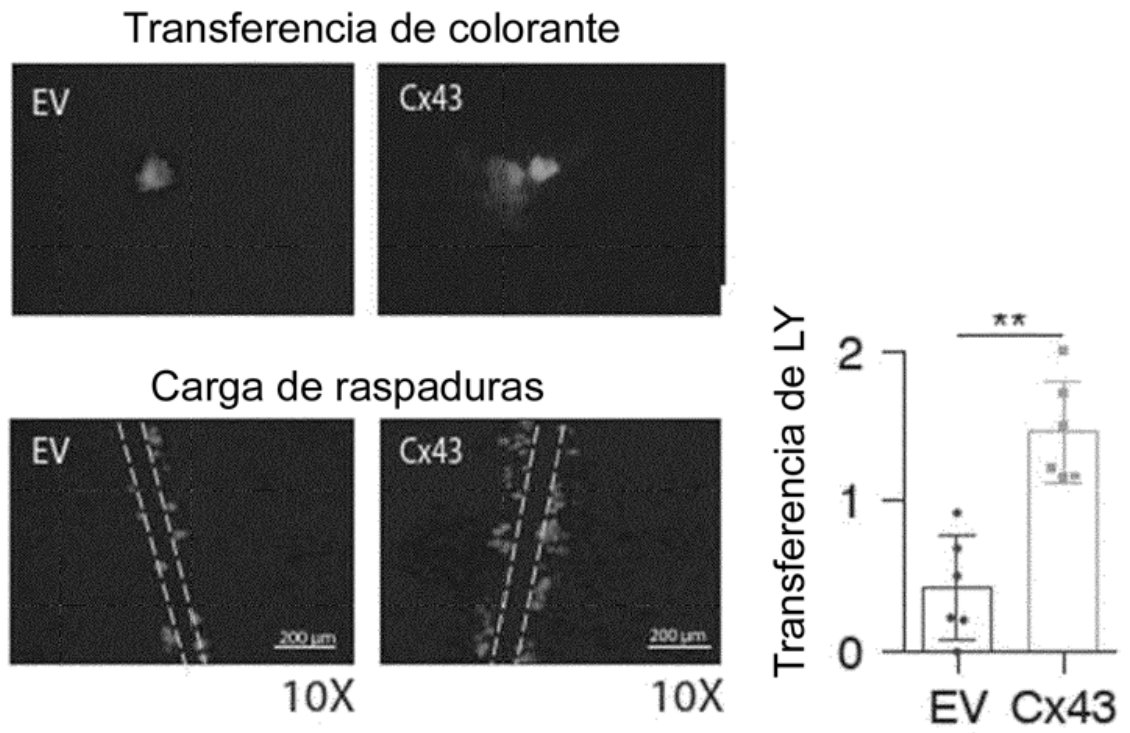
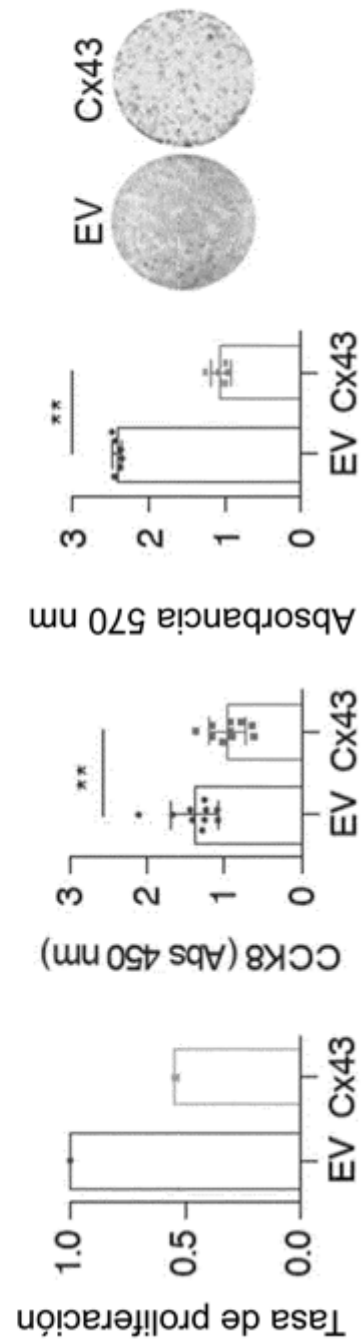


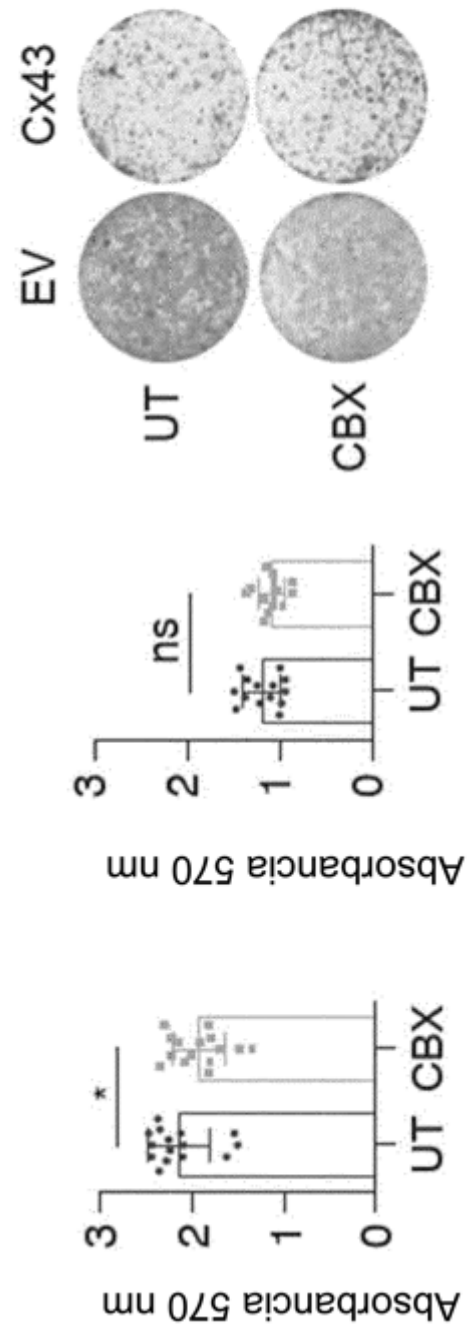
Figura 1 (cont.)

c



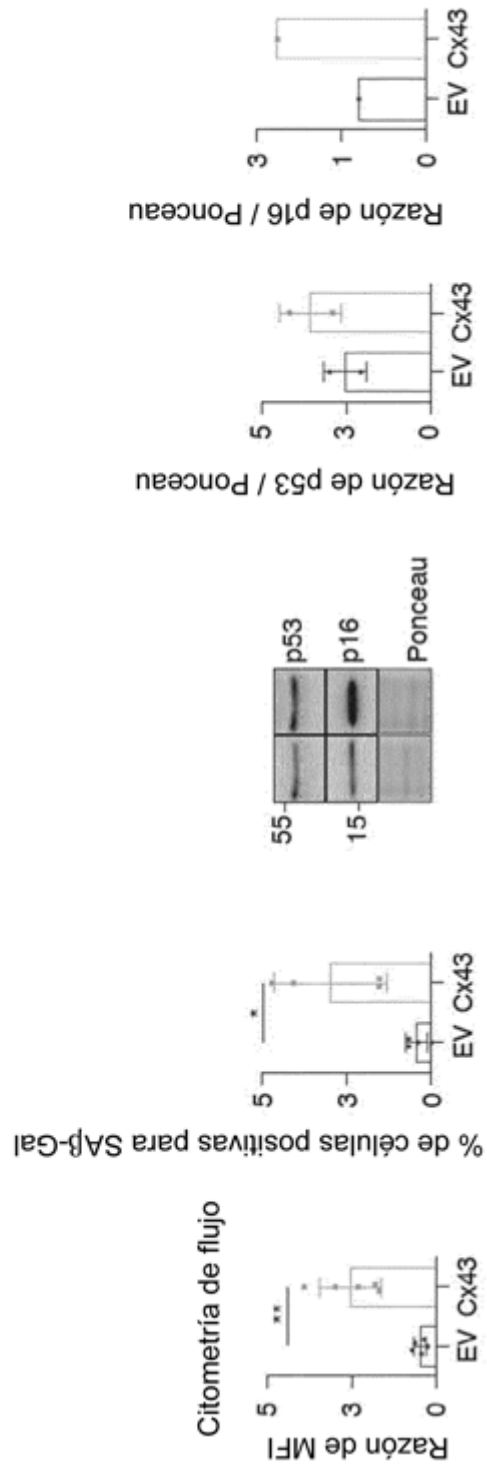
**Figura 1 (cont.)**

**D**



**Figura 1 (cont.)**

**E**



**Figura 1 (cont.)**

**F**

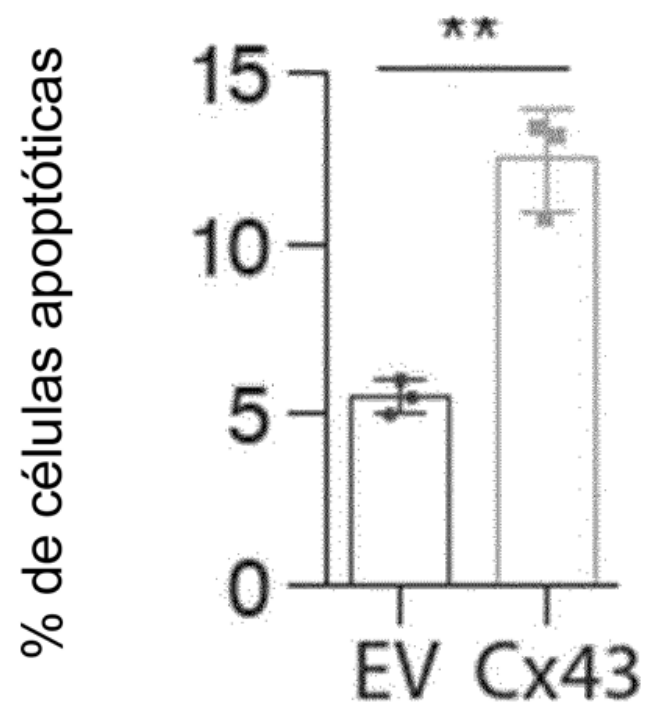


Figura 1 (cont.)

G

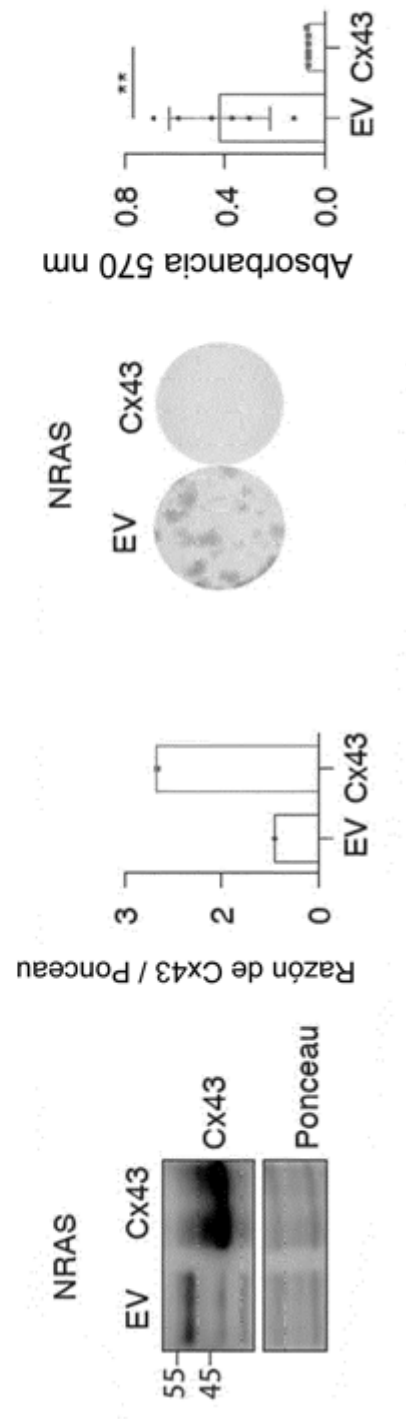
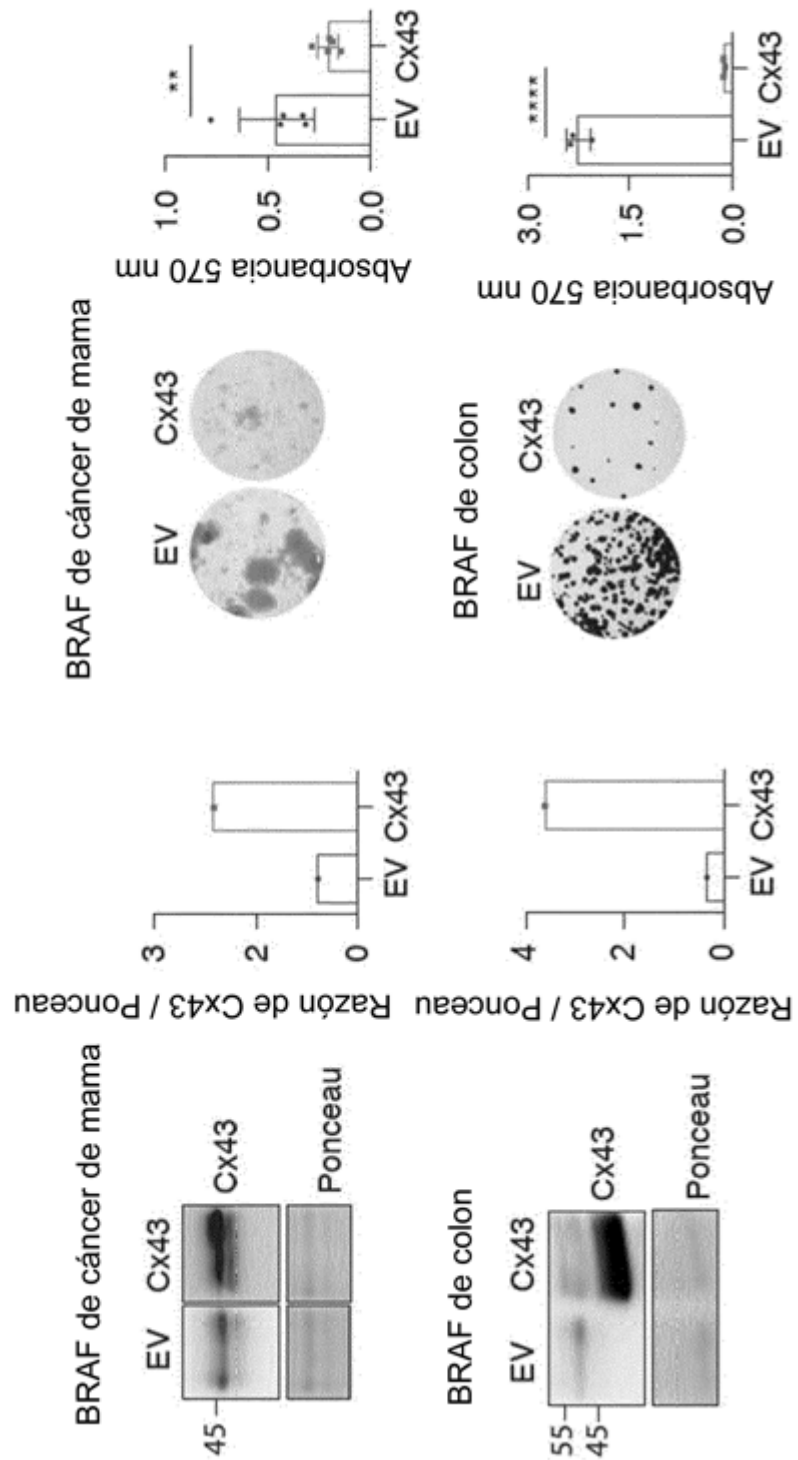


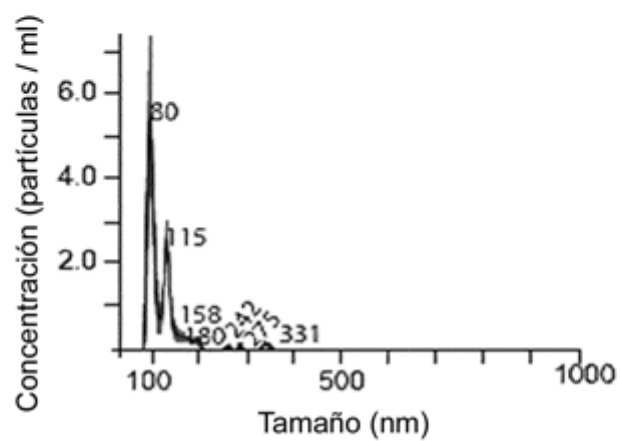
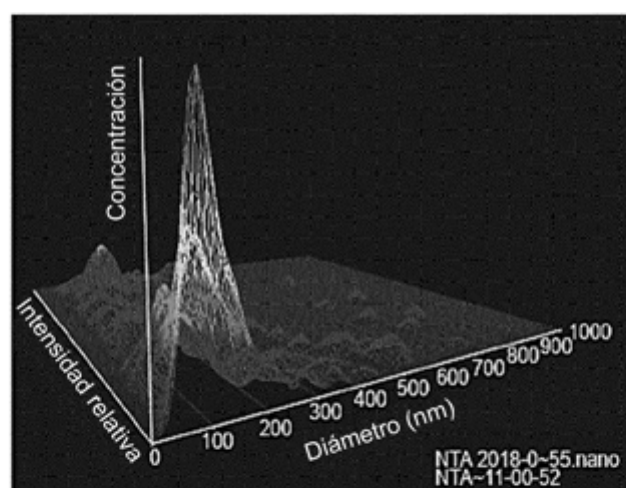
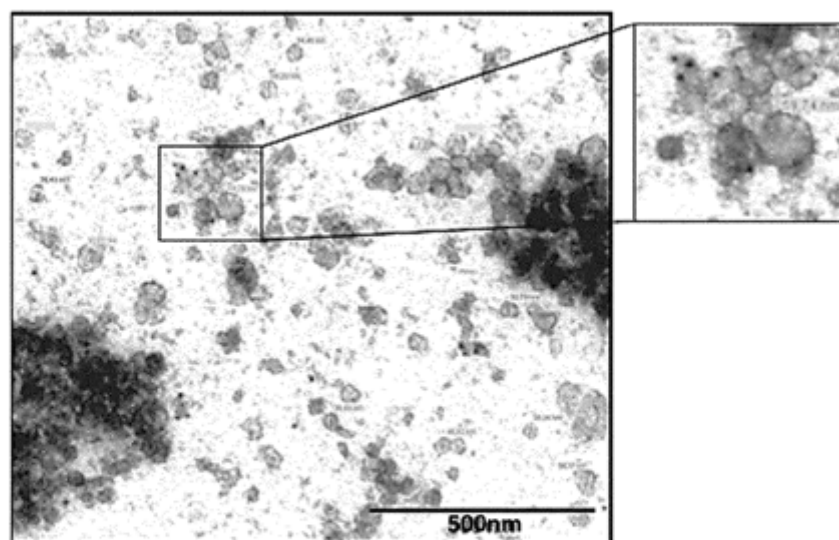
Figura 1 (cont.)

H



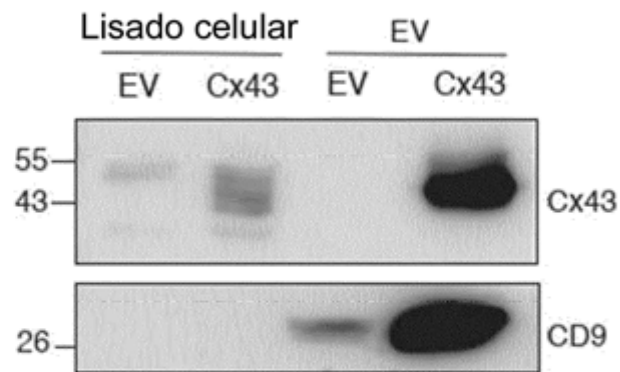
**Figura 2**

**A**



**Figura 2 (cont.)**

**B**



**C**

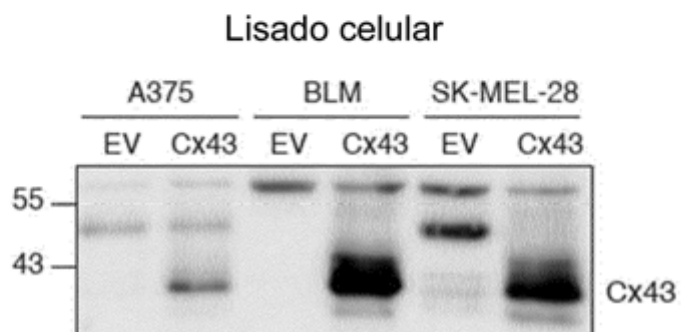
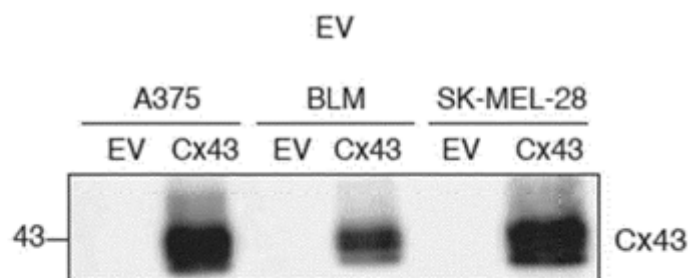


Figura 3

A

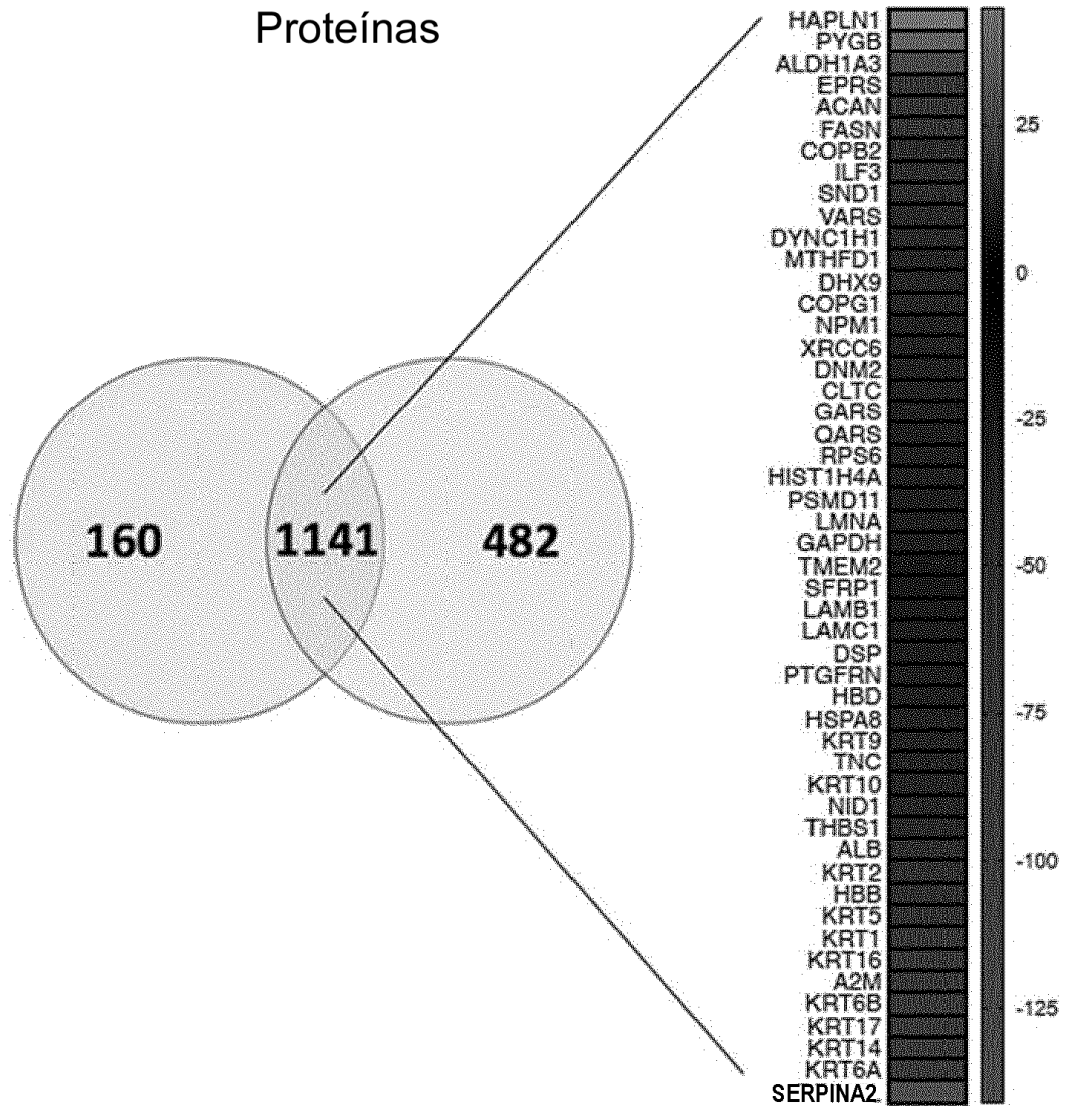
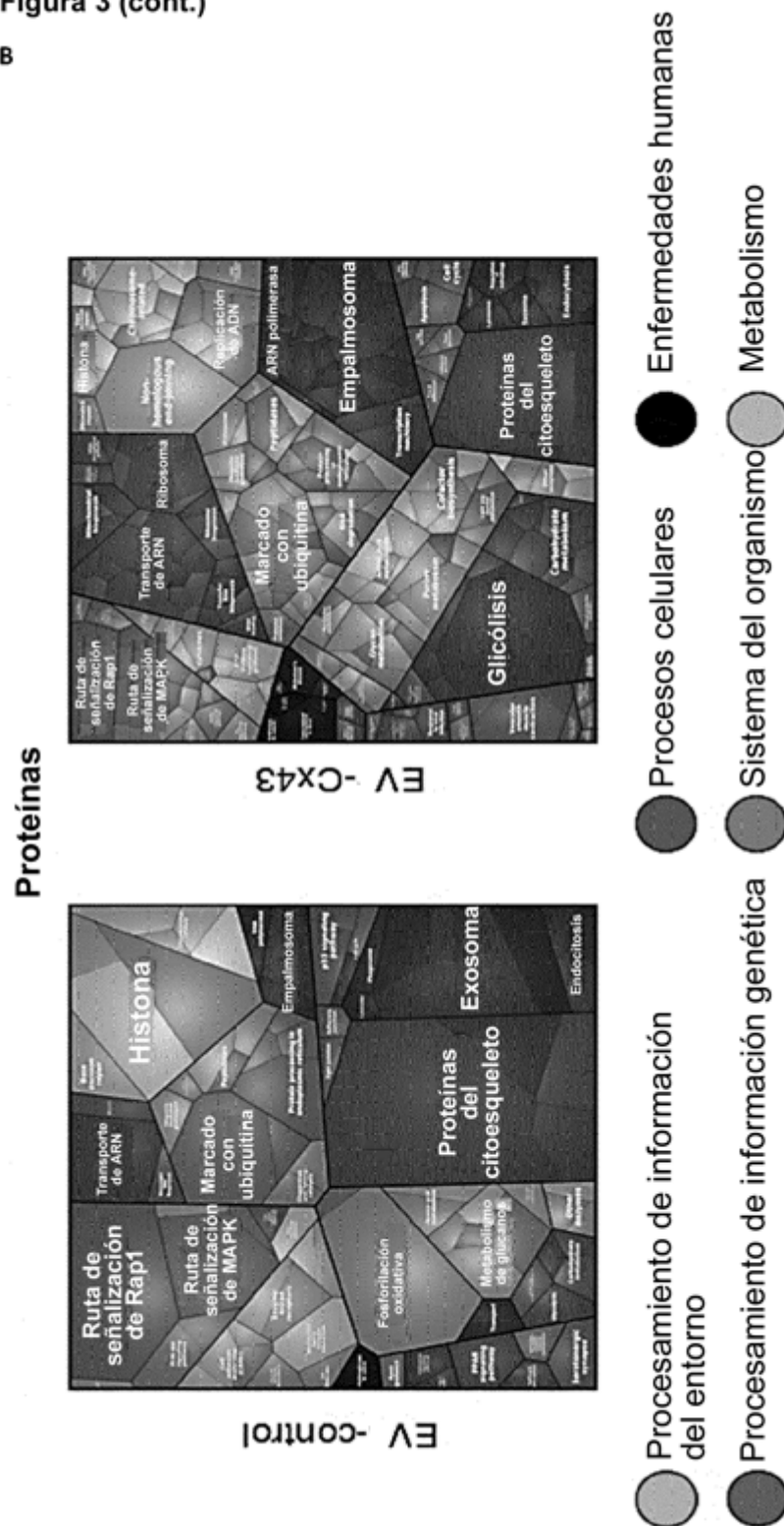


Figura 3 (cont.)

**B**



**Figura 3 (cont.)**

**C**

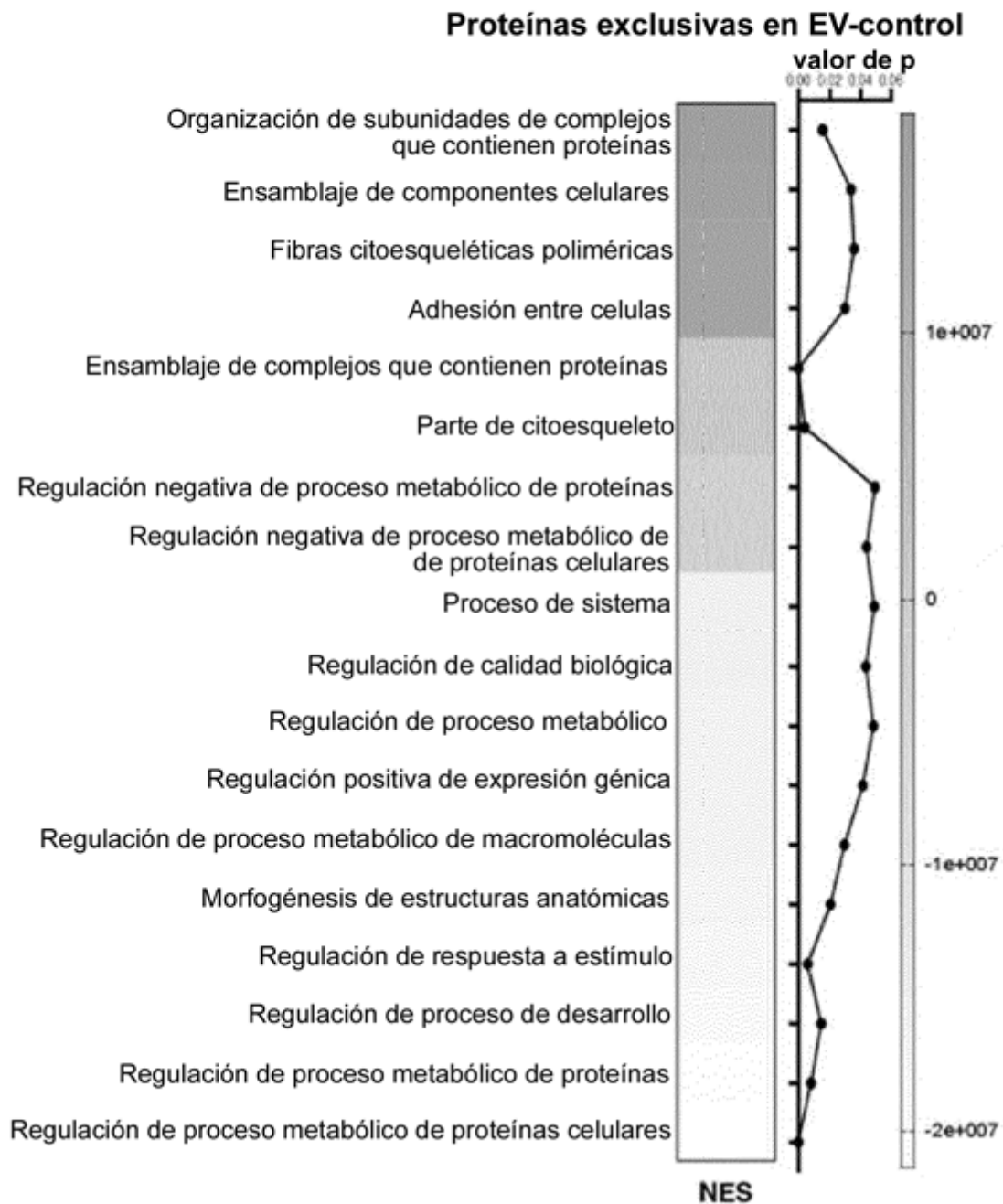


Figura 3 (cont.)

C

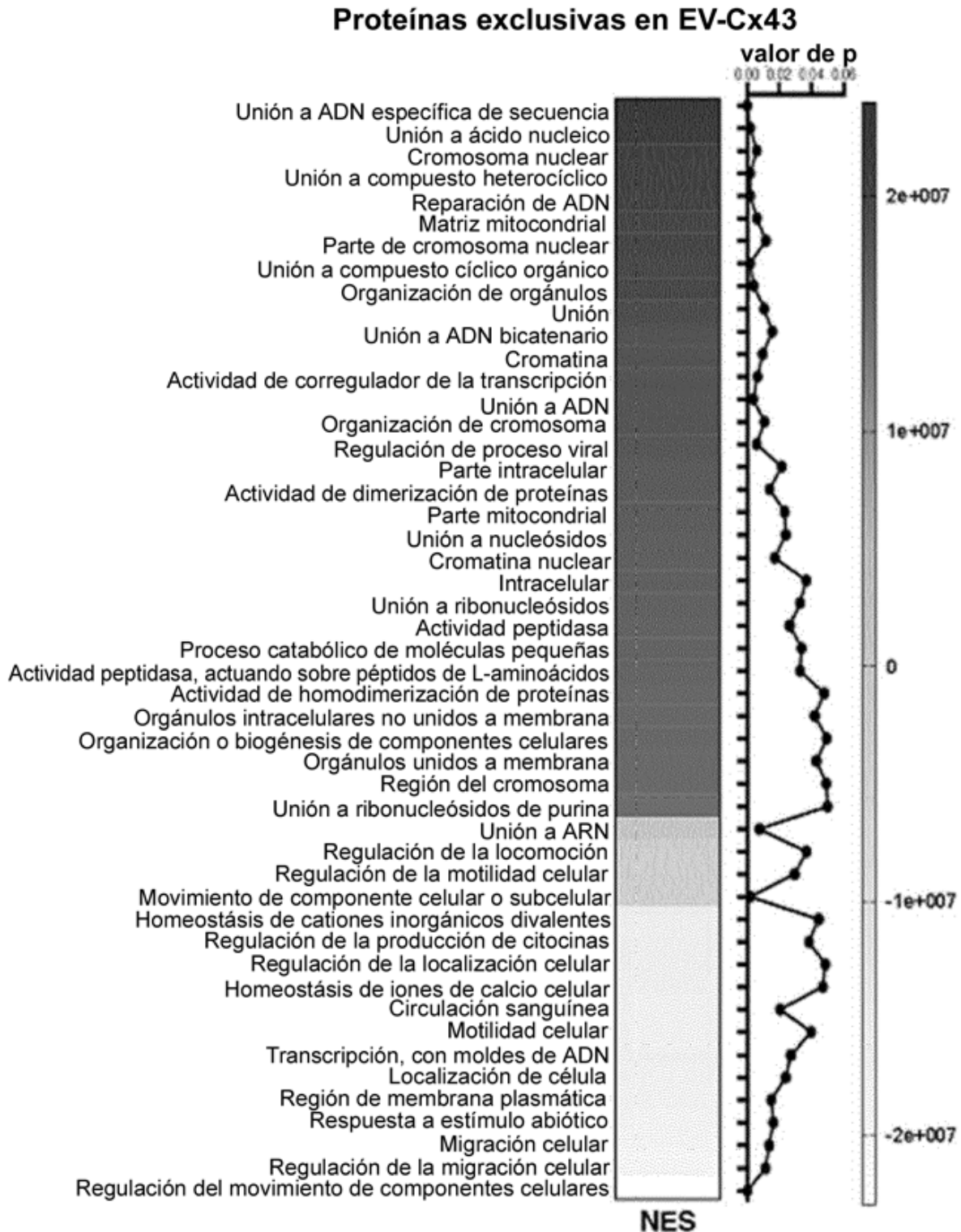


Figura 3 (cont.)

D

## Proteínas

Diagrama de dispersión de Log10(media) frente a Log(desv. est.)

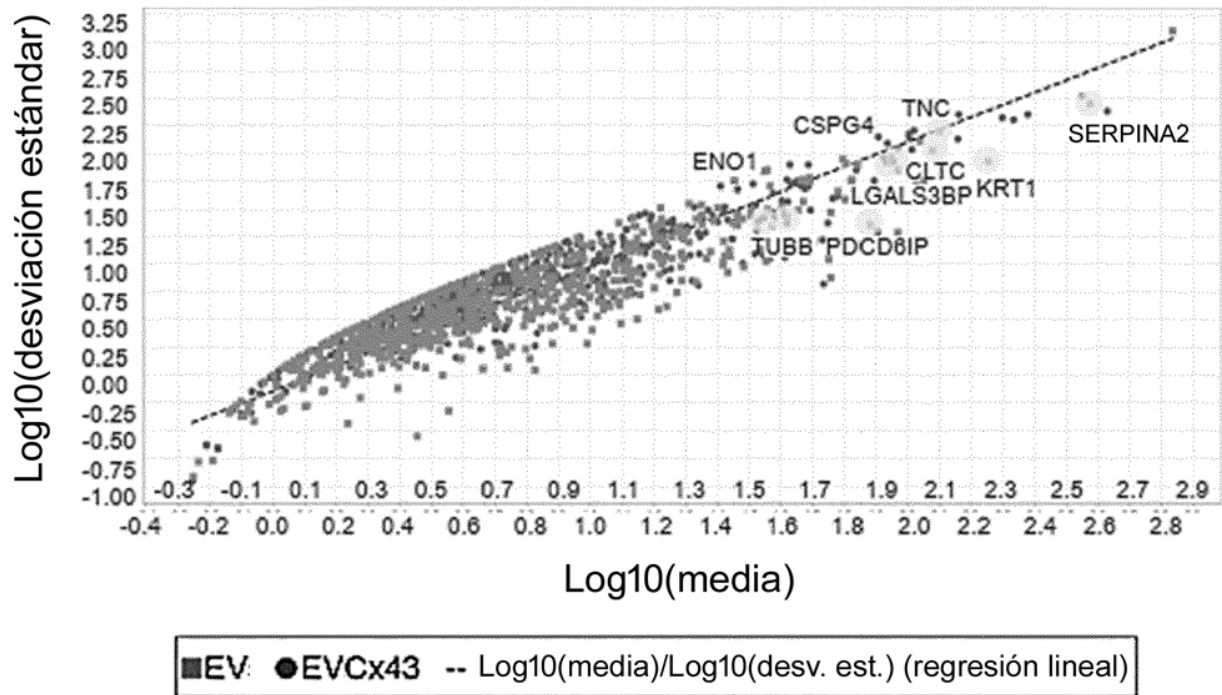


Figura 3 (cont.)

E

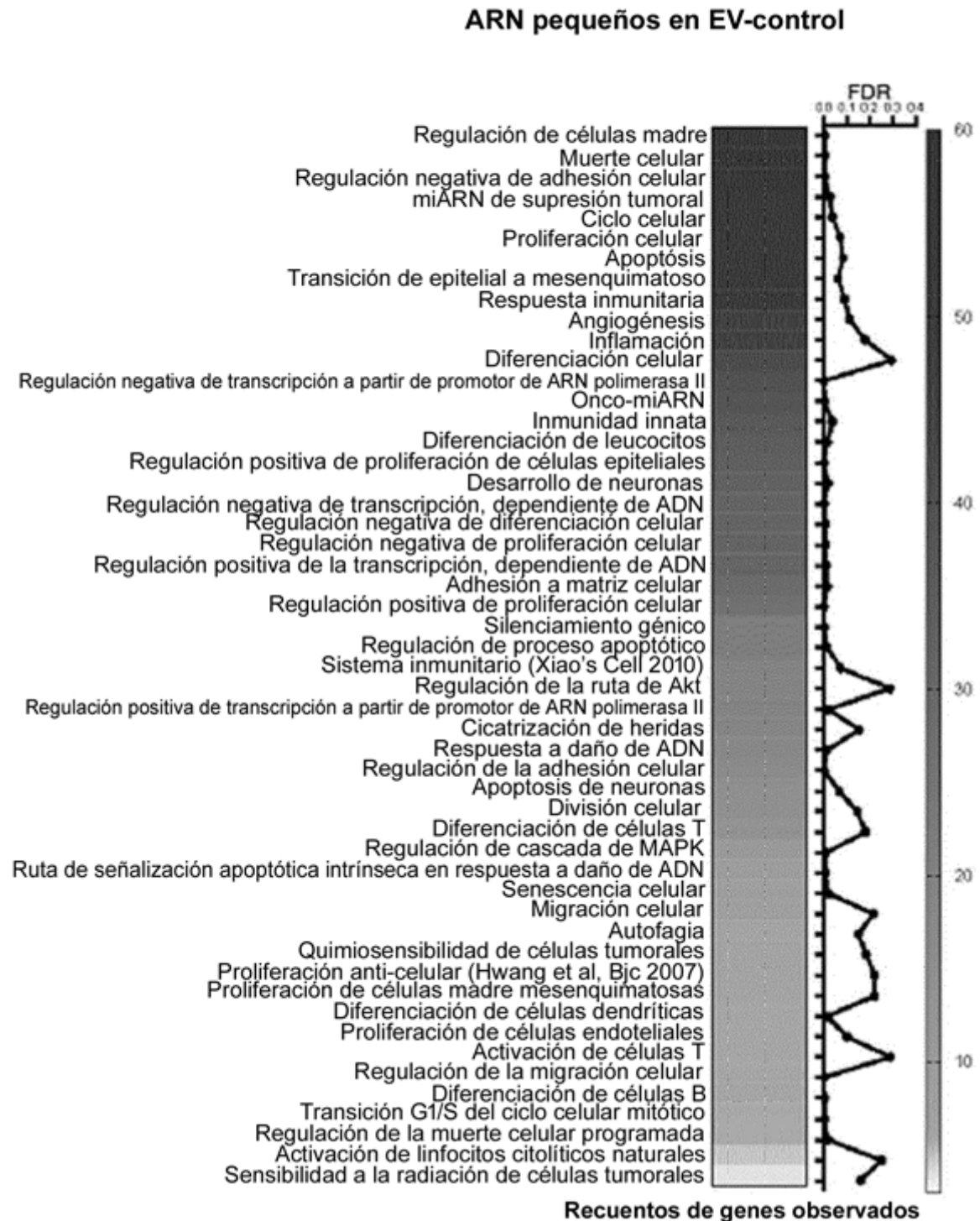


Figura 3 (cont.)

E

ARN pequeños en EV-Cx43

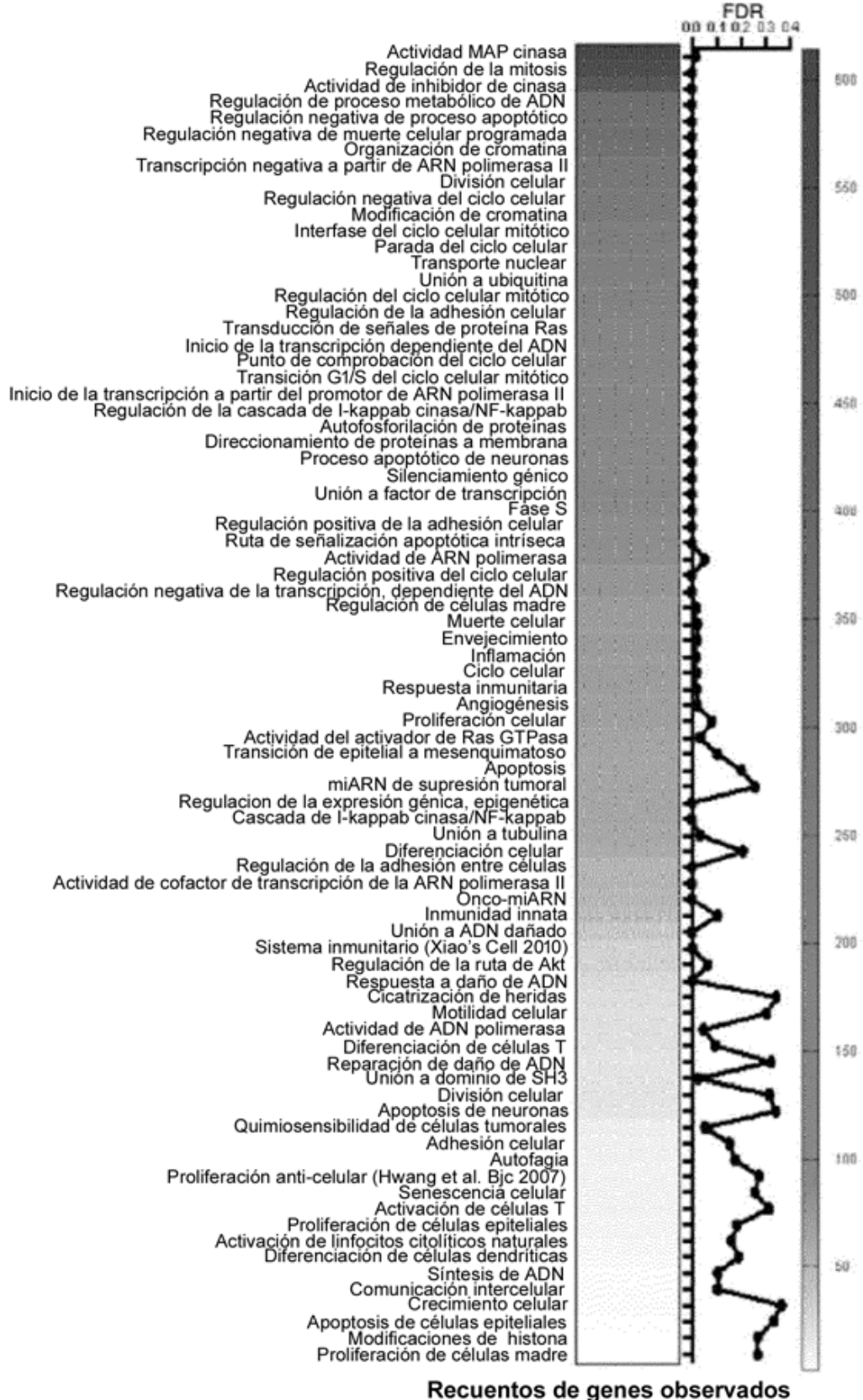
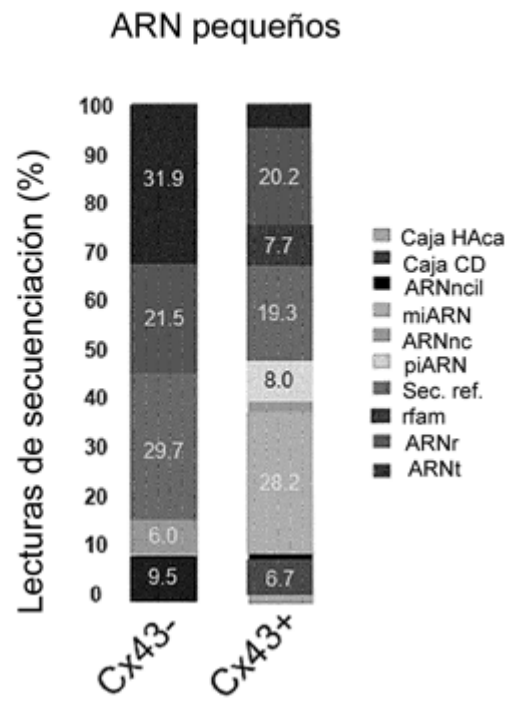
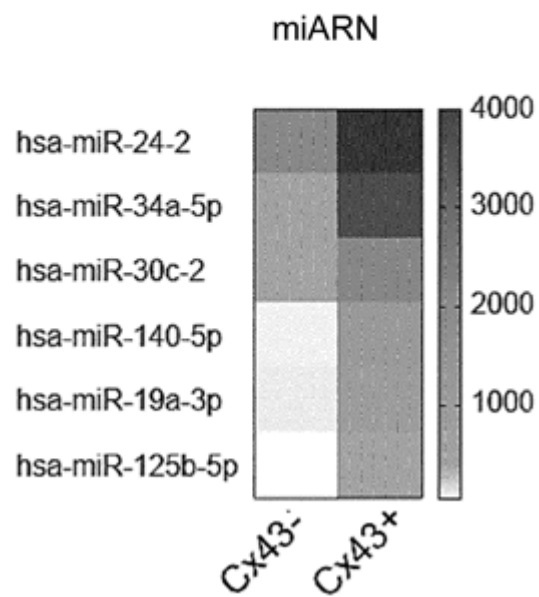


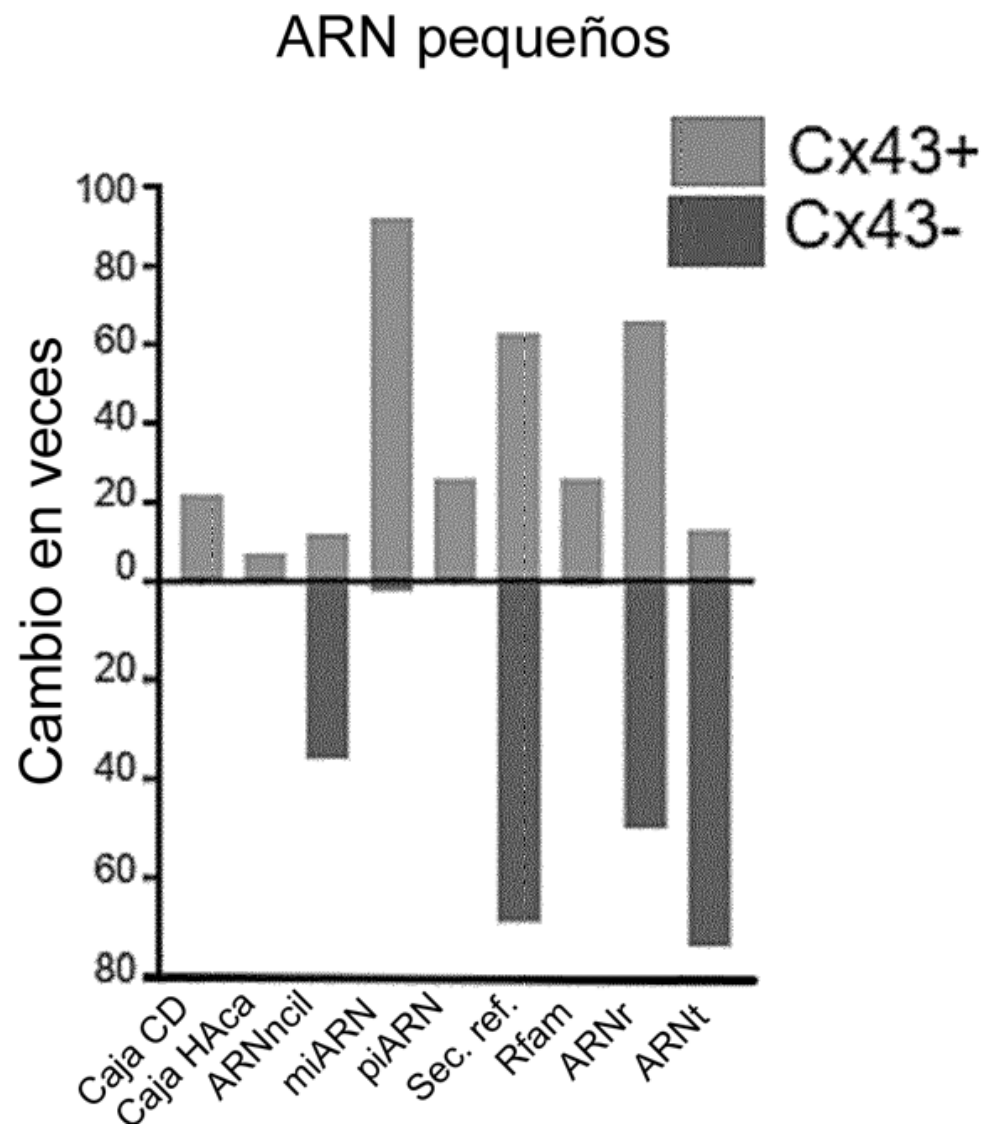
Figura 3 (cont.)

F



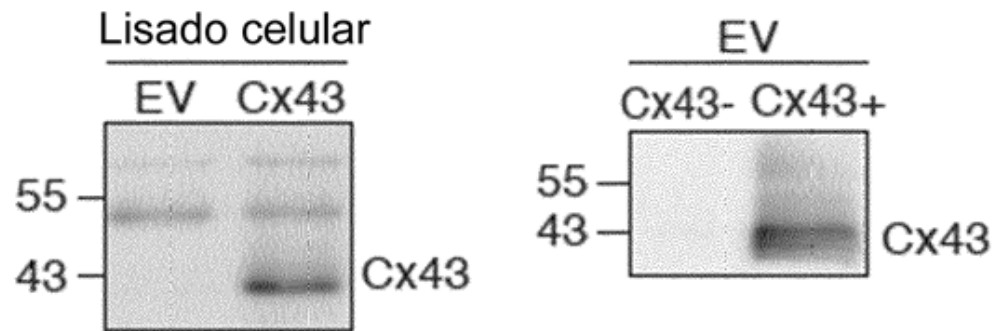
G



**Figura 3 (cont.)****H**

## Figura 4

A



B

### Captación de EV

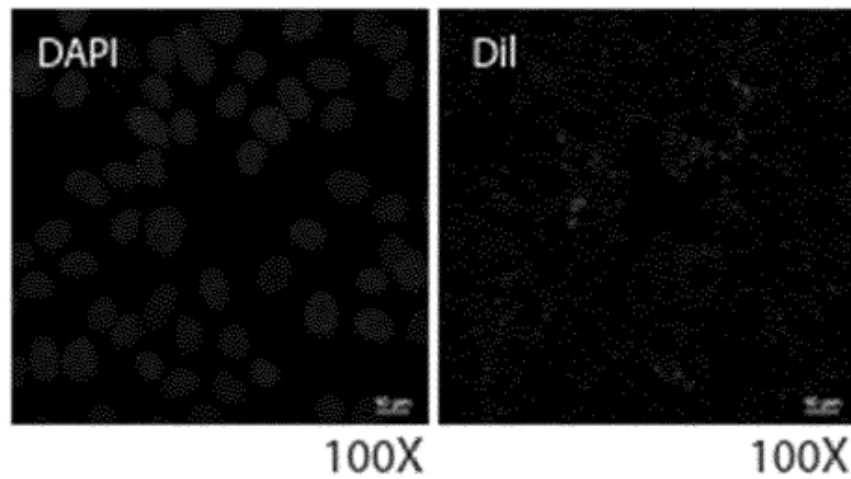
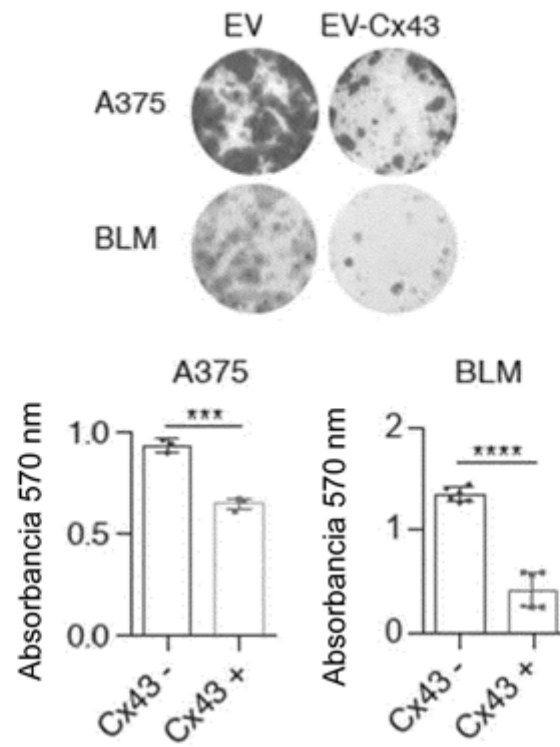
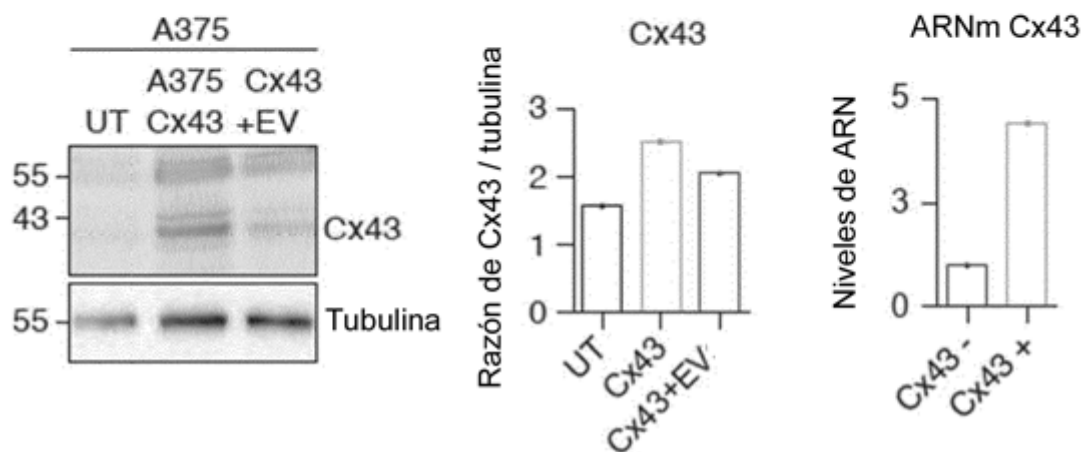


Figura 4 (cont.)

C



D



**Figura 5**

**A**

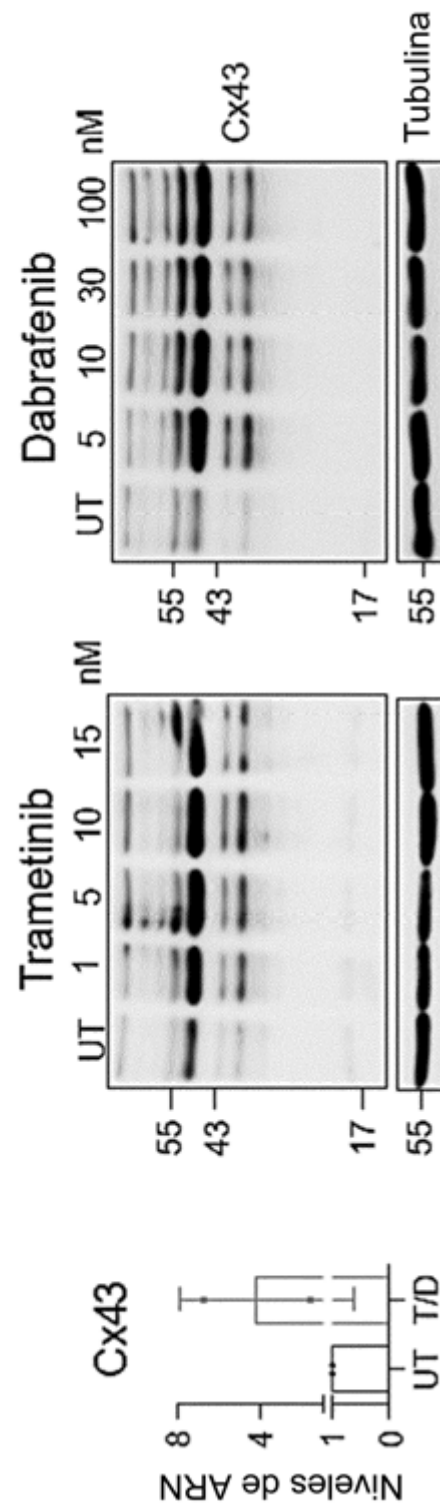


Figura 5 (cont.)

B

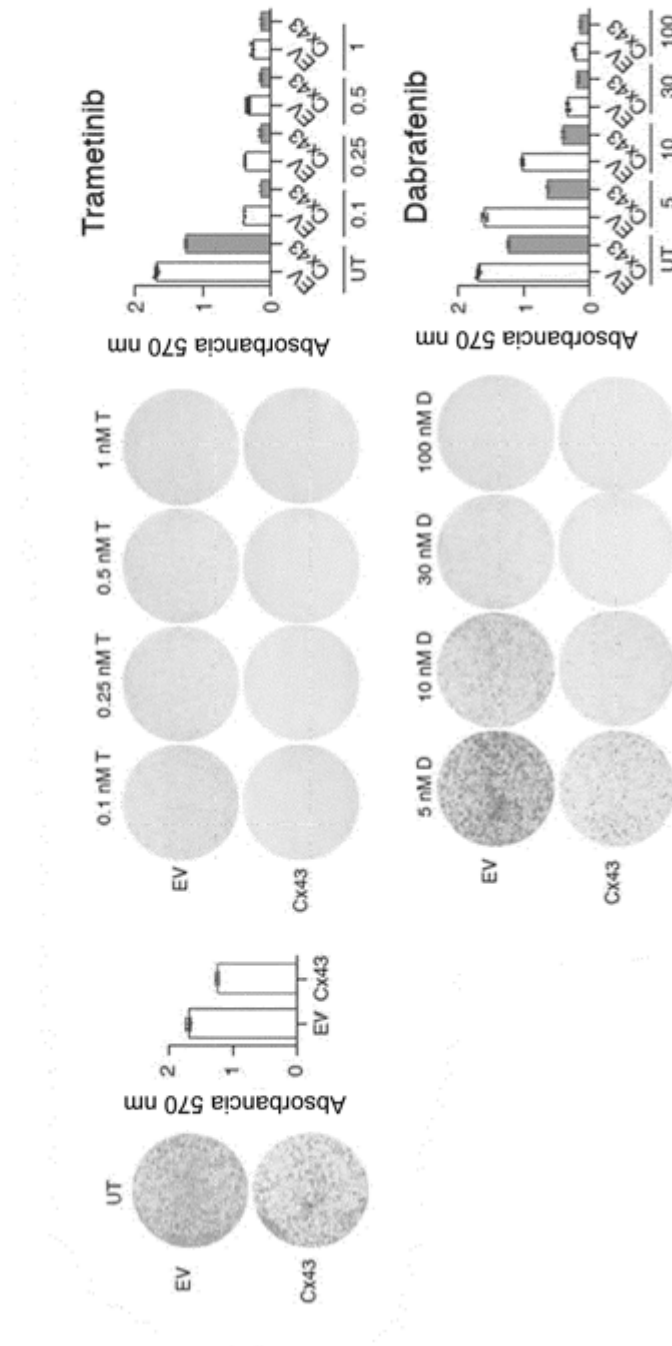
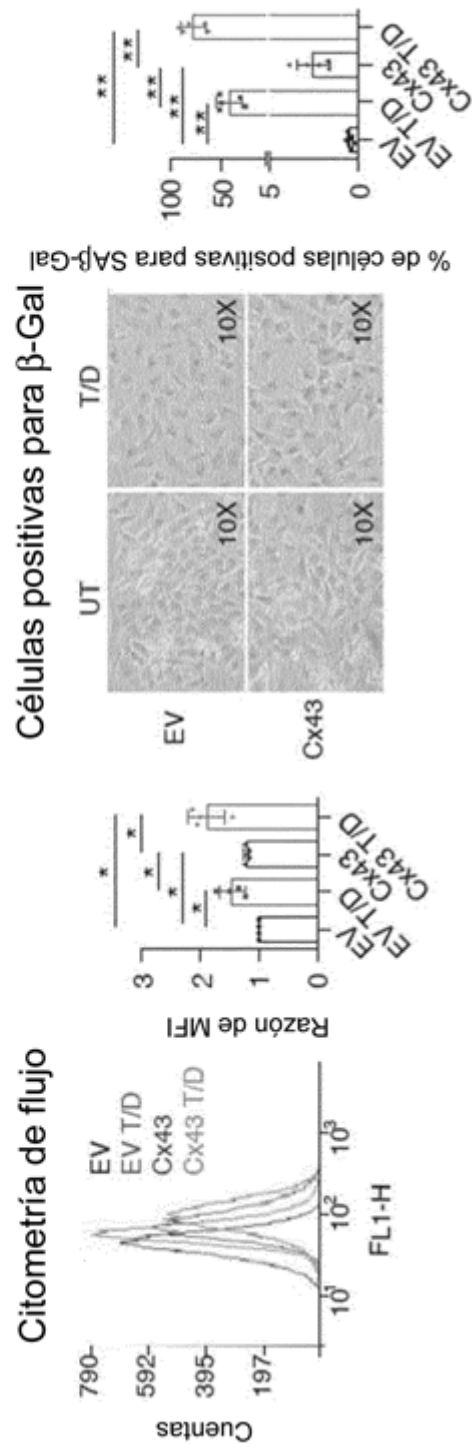


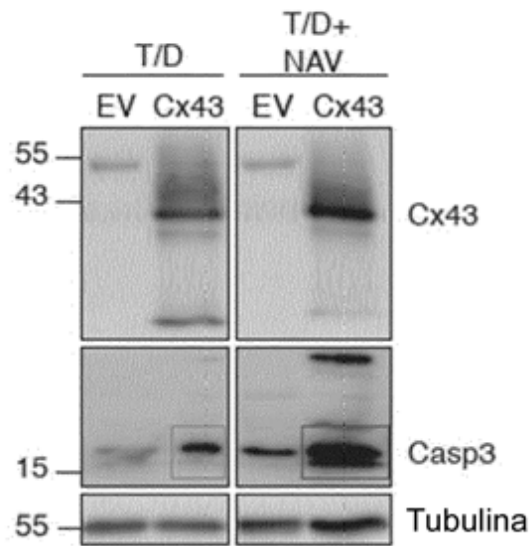
Figura 5 (cont.)

C



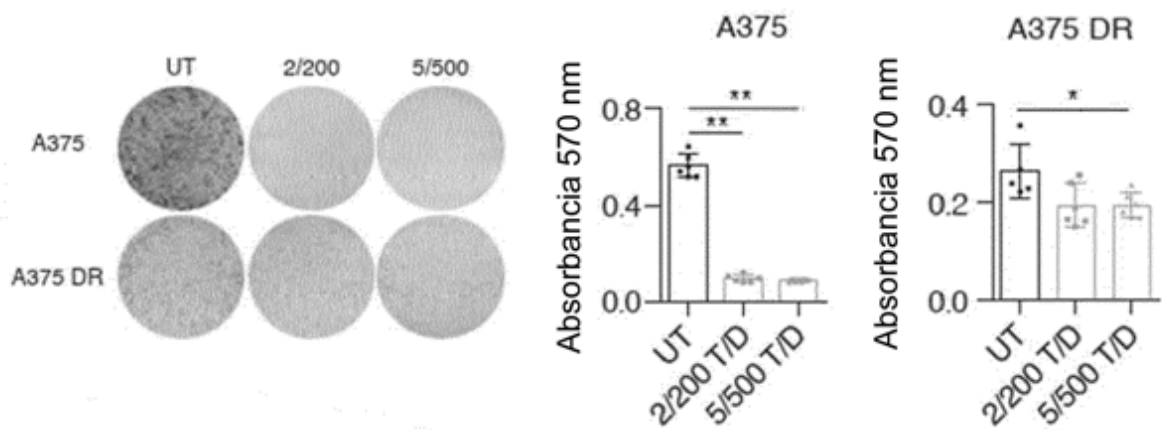
**Figura 5 (cont.)**

**D**



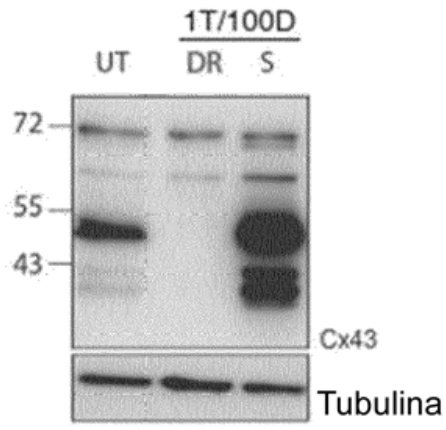
**Figura 6**

**A**



**Figura 6 (cont.)**

**B**



Razón de Cx43 / tubulina

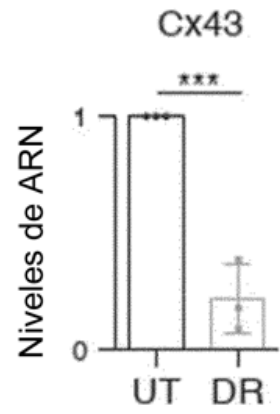
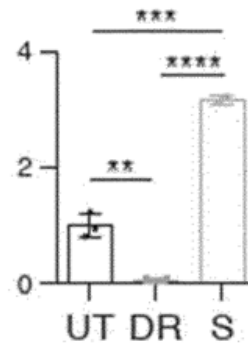


Figura 6 (cont.)

c

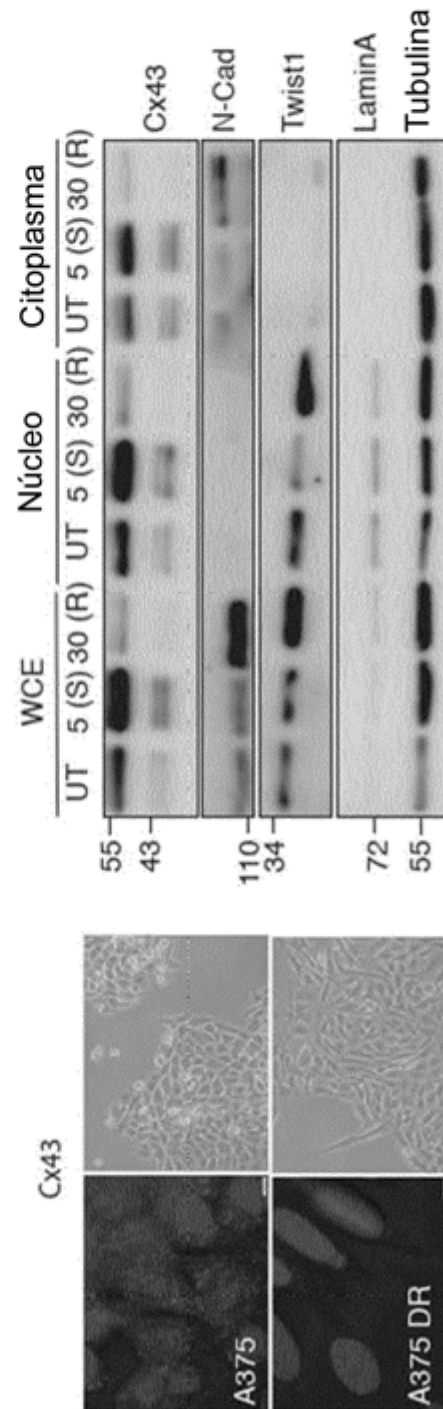


Figura 6 (cont.)

D

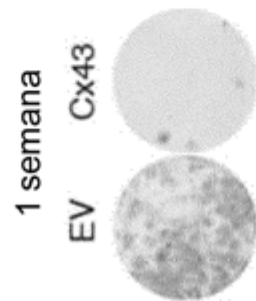
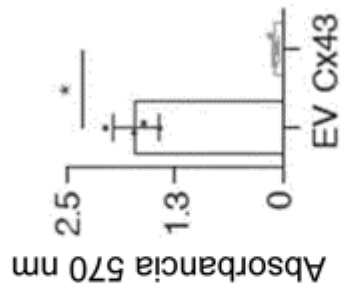
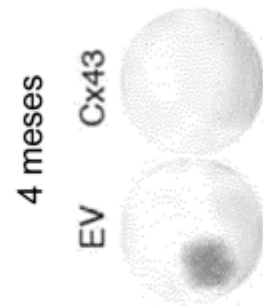
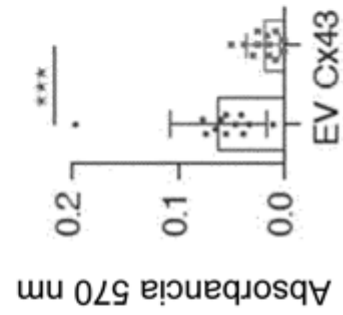
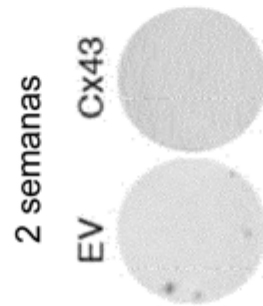
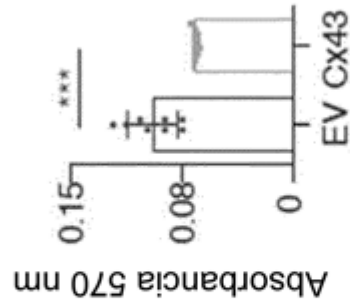


Figura 6 (cont.)

E

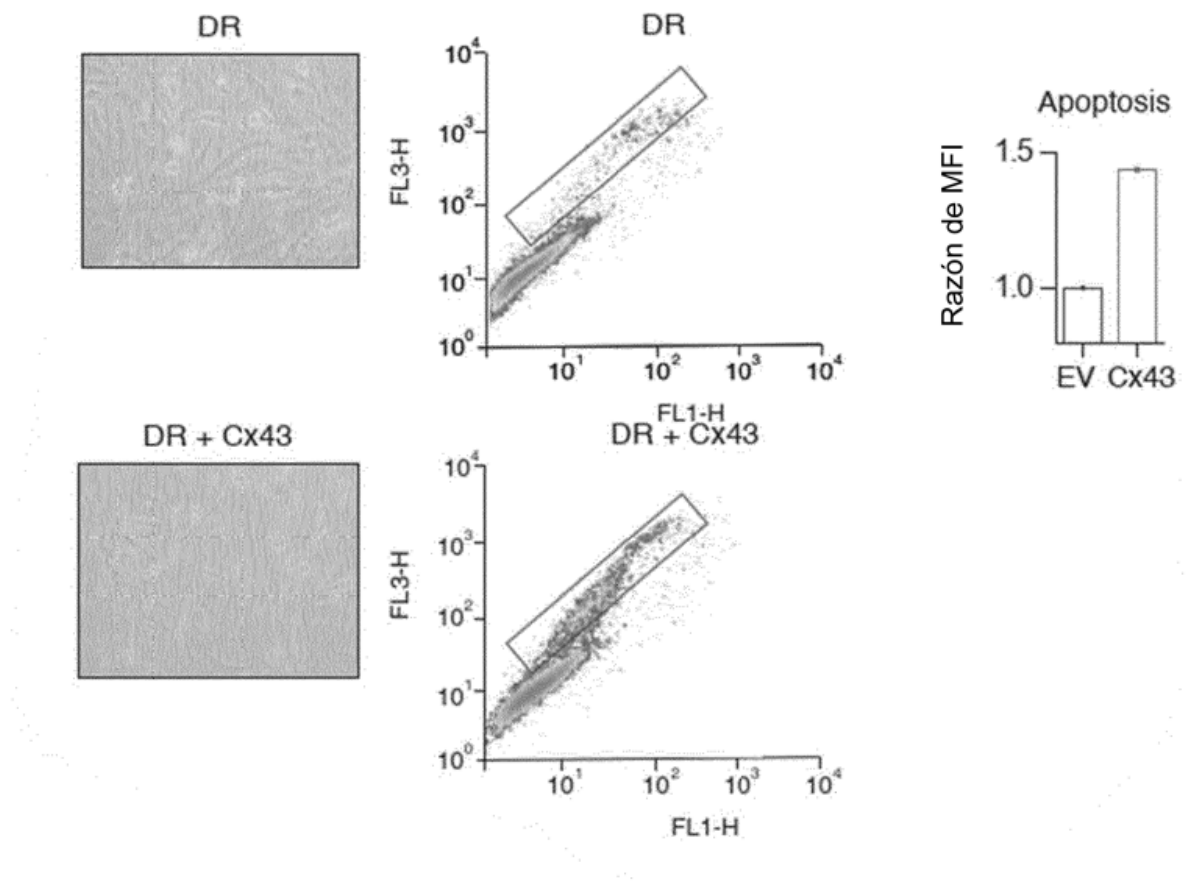


Figura 7

A

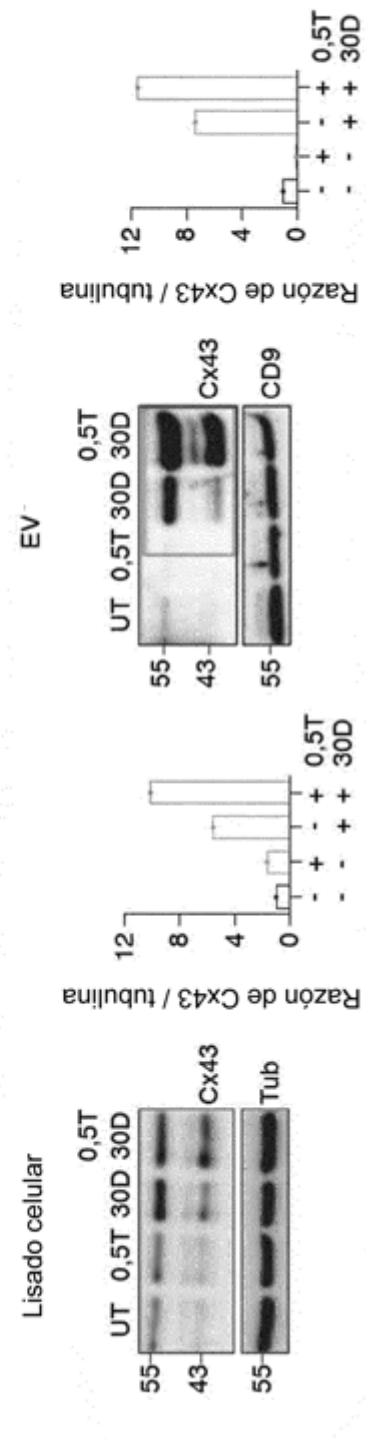
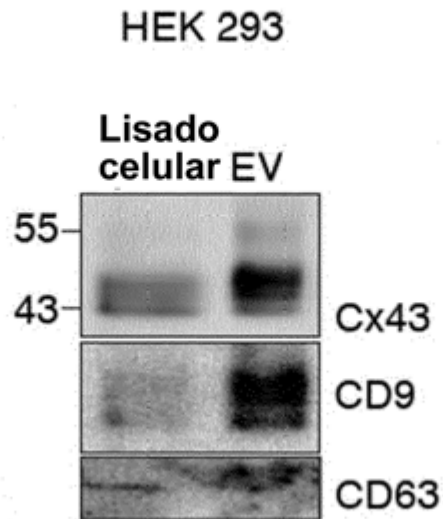


Figura 7 (cont.)

B



C

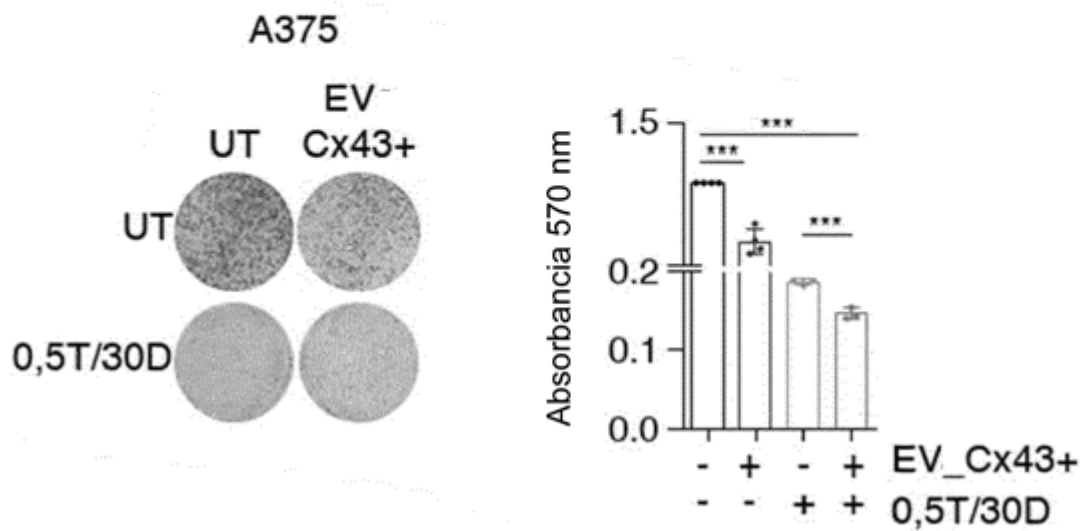
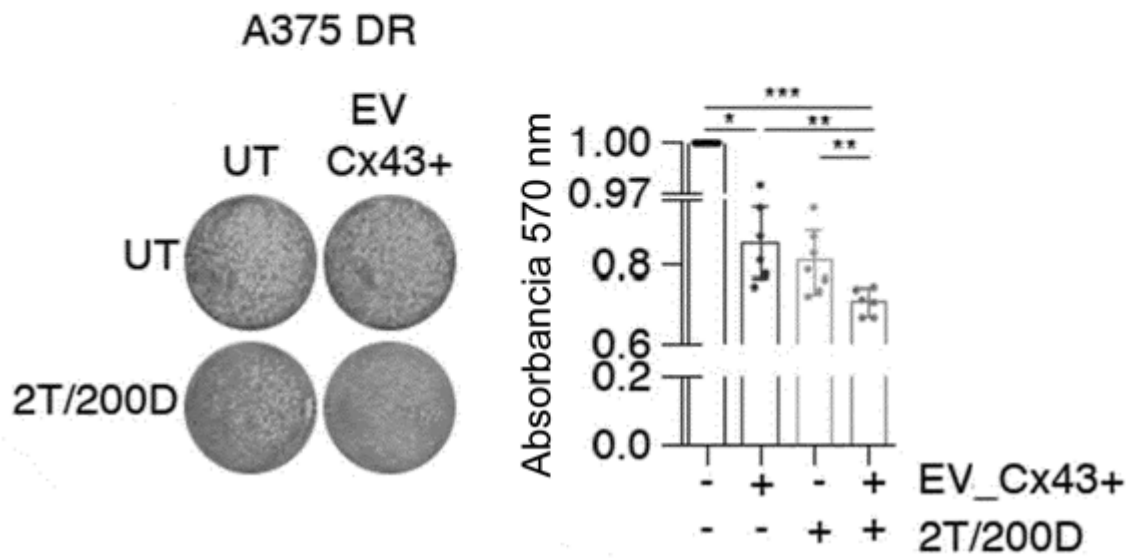


Figura 7 (cont.)

D



E

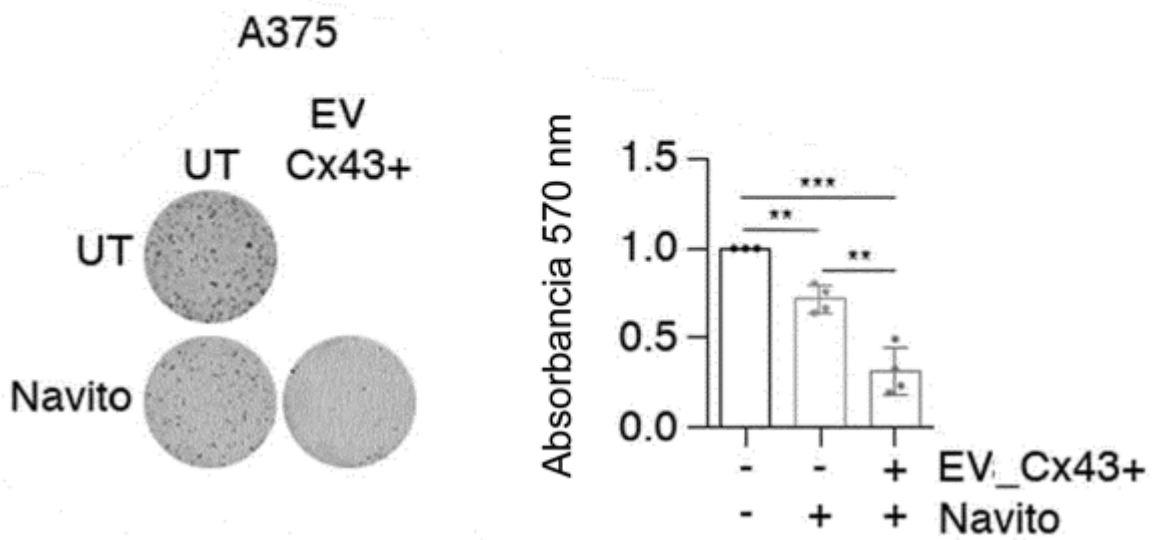


Figura 7 (cont.)

F

