

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 840**

21 Número de solicitud: 201030942

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación: **18.06.2010**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **10.01.2012**

43 Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
10.01.2012

71 Solicitante/s:
Hospital Sant Joan de Deu (Titular al 60 %)
Paseo Sant Joan de Déu, 2
08950 Esplugues de Llobregat, Barcelona, ES
Fundación de Investigación del Cáncer de la
Universidad de Salamanca (Titular al 40 %)

72 Inventor/es: **Ordóñez García, José Luis;**
Otero Mota, Ana Pastora;
Sayagués Manzano, José María;
Sevillano González, María Victoria;
Álava Casado, Enrique de y
Torres Gómez-Pallete, Carmen de

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

54 Título: **Método para el pronóstico de tumores del desarrollo y uso de inhibidores de la metilación génica para el tratamiento de los mismos.**

57 Resumen:

Método para el pronóstico de tumores del desarrollo y uso de inhibidores de la metilación génica para el tratamiento de los mismos.

La presente invención pertenece al campo del pronóstico y la terapia de tumores pediátricos o del desarrollo. En concreto, se refiere a un método para establecer el pronóstico de los tumores del desarrollo basado en el análisis de los mecanismos de inactivación del gen del receptor sensor de calcio (*CaR*) que incluyen la determinación del estado de metilación de su promotor 2 y el análisis del estado alélico del locus del gen *CaR*, así como al uso de inhibidores de DNA metiltransferasas y de la desacetilación de las histonas para el tratamiento de los tumores pediátricos.

ES 2 371 840 A1

DESCRIPCIÓN

Método para el pronóstico de tumores del desarrollo y uso de inhibidores de la metilación génica para el tratamiento de los mismos.

5

Campo de la invención

La presente invención pertenece al campo del pronóstico y la terapia de tumores pediátricos o del desarrollo. En concreto, se refiere a un método para establecer el pronóstico de los tumores del desarrollo basado en el análisis de los mecanismos de inactivación del gen del receptor sensor de calcio (*CaR*) que incluyen la determinación del estado de metilación de su promotor 2 y el análisis del estado alélico del locus del gen *CaR*, así como al uso de inhibidores de DNA metiltransferasas y de la desacetilación de las histonas para el tratamiento de los tumores pediátricos.

10

Antecedentes de la invención

15

Se conocen como tumores del desarrollo aquellos que se manifiestan principalmente durante la edad pediátrica o que únicamente se manifiestan en esta etapa. Por esta razón a veces se les denomina también como tumores pediátricos. En el contexto de la presente invención se usará indistintamente el término tumor del desarrollo o tumor pediátrico.

20

Dentro del grupo de los tumores del desarrollo están los neuroblastomas (NB), los ganglioneuroblastomas (GNB) y ganglioneuomas (GN) que conforman a su vez el grupo de los tumores neuroblásticos (TN).

25

Los TN son los tumores sólidos extracraneales más frecuentes de la infancia y se desarrollan a partir de células de la cresta neural ya comprometidas en la formación del sistema nervioso periférico, por lo que se localizan en la médula suprarrenal o en los ganglios nerviosos de la cadena simpática paravertebral. Se trata de un grupo de tumores muy heterogéneo desde el punto de vista clínico, anatomopatológico, genético y biológico (Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3(3):203-16). Su presentación clínica incluye un variado espectro que abarca la regresión espontánea, el crecimiento exclusivamente loco-regional y la proliferación agresiva local acompañada de diseminación metastásica (Ambros PF, *et al.* Regression and progression in neuroblastoma. *Eur J Cancer* 1995; 31:510-15). Los dos primeros grupos presentan índices de supervivencia excelentes, pero los NB metastásicos, pese a ser sometidos a terapias intensivas multimodales, tienen aún hoy día índices de supervivencia no superiores al 30%. Los esfuerzos dirigidos en los últimos años a modificar los protocolos de tratamiento apenas han alterado estas cifras.

35

Las bases biológicas responsables de la diversidad clínica de los TN se conocen sólo parcialmente. Entre ellas, destacan las alteraciones de la ploidía, las translocaciones desequilibradas, las deleciones o ganancias de regiones cromosómicas recurrentes y la amplificación del oncogén *MYCN* (Ambros IM *et al.* Role of ploidy, chromosome 1p and Schwann cells in the maturation of NB. *N Engl J Med* 1996; 334:1505-11. Brodeur GM, *et al.* Amplification of *MYCN* in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stages. *Science* 1984; 224:1121-4; Bown N, *et al.* Gain of chromosome arm 17q and adverse outcome in patients with neuroblastoma. *N Engl J Med* 1999; 340:1954-61). Estas alteraciones genético-moleculares, aunque cruciales para el comportamiento biológico de los TN, apenas pueden ser modificadas terapéuticamente. Antes de que se describieran muchas de ellas, se sabía que los TN más diferenciados y con mayor proporción de componente estromal tipo Schwann (NB en diferenciación, GNB y GN) se asociaban a mejor pronóstico que los NB indiferenciados. Se han descubierto algunas de las vías moleculares responsables de los procesos de diferenciación celular en TN. Estas rutas son de gran importancia terapéutica ya que son modulables farmacológicamente. Así, por ejemplo, el ácido retinoico induce diferenciación en líneas celulares de NB (Pahlman S, *et al.* Retinoic acid-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells: a comparison with phorbol ester-induced differentiation. *Cell Differ*. 1984; 14:135-144) y en los tumores de los pacientes, mejorando la supervivencia global de un subgrupo de ellos (Matthay KK, *et al.* Long-term results for children with high-risk neuroblastoma treated on a randomized trial of myeloablative therapy followed by 13-cis-retinoic acid. *J Clin Oncol*. 2009; 27:1007-13). Sin embargo, algunos NB son resistentes a la acción de este fármaco, pero la falta de un conocimiento detallado de los mecanismos moleculares responsables de la diferenciación de los TN dificulta el diseño de nuevos agentes diferenciadores que puedan beneficiar a un mayor número de pacientes.

55

El gen del receptor sensor de calcio (*CaR*) fue clonado en 1993 a partir de células paratiroides bovinas (Brown EM, *et al.* Cloning and characterization of an extracellular Ca(2+)-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* 1993; 366: 575-80) y forma parte de la familia C de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR). Su principal función es detectar las fluctuaciones del Ca²⁺ extracelular y regular consecuentemente la secreción de hormona paratiroidea (PTH) en las glándulas paratiroides y de calcitonina en las células C del tiroides, hormonas encargadas de normalizar la calcemia. *CaR* detecta también cambios extracelulares de otros cationes (Gd³⁺, Mg²⁺), L-aminoácidos y poliaminas, entre otros (Hu J, Spiegel AM. Structure and function of the calcium-sensing receptor: insights from natural and engineered mutations and allosteric modulators. *J Cell Mol Med* 2007; 11:908-922).

65

El gen humano *CaR* se localiza en la región cromosómica 3q13.3-21. Está compuesto por 6 exones codificantes y dos exones 1 alternativos y no codificantes, 1A y 1B, bajo el control respectivamente de los promotores 1 y 2.

La proteína CaR se compone de un gran dominio extracelular, donde tiene lugar la interacción con el Ca^{2+} , un dominio transmembrana de 7 *loops* (característico de los GPCR) y una cola carboxilo-terminal intracitoplasmática (Hu J, Spiegel AM. Structure and function of the calcium-sensing receptor: insights from natural and engineered mutations and allosteric modulators. *J Cell Mol Med* 2007; 11:908-922). Este receptor, en forma de homodímero, es capaz de reclutar distintas proteínas G ($G_{q/11}$, $G_{12/13}$ y G_i), activando como consecuencia diferentes vías de señalización. Existen enfermedades causadas por mutaciones inactivadoras o activadoras de CaR. En el caso de las primeras, tanto en humanos como en ratones *CaR* $-/-$, se produce, además de sobreproducción de PTH, hiperplasia de paratiroides, por lo que se cree que, en condiciones normales, CaR restringe la proliferación de las células paratiroides (Brown EM. Clinical lessons from the calcium-sensing receptor. *Nat Clin Pract* 2007; 3:122-133).

CaR se halla expresado en otros órganos implicados en el metabolismo del Ca^{2+} (riñón, hueso, intestino) y en la piel, en la cual juega un papel fundamental para que tenga lugar la diferenciación de los queratinocitos (Tu CL, *et al.* The extracellular calcium-sensing receptor is required for calcium-induced differentiation in human keratinocytes. *J Biol Chem.* 2001; 276:41079-41085). También se halla expresado en el sistema nervioso central y periférico, y la expresión de *CaR* se incrementa en células precursoras del sistema nervioso central cuando se diferencian hacia oligodendrocitos (equivalentes a las células de Schwann del sistema nervioso periférico) (Chattopadhyay N, *et al.* Calcium-sensing receptor expression and function in oligodendrocyte commitment and lineage progression: Potential impact on reduced myelin-basic protein in CaR-null mice. *J Neurosci Res.* 2008; 86:2159-2167).

Se ha hallado también expresión de CaR en distintas neoplasias (revisado en Rodland KD. The role of the calcium-sensing receptor in cancer. *Cell Calcium.* 2004; 35(3):291-5) con la particularidad de que parece ejercer una función muy distinta dependiendo del contexto celular en el que se halla. Así, por ejemplo, la activación de CaR promueve proliferación y metástasis en carcinoma de próstata (Liao J, *et al.* Extracellular calcium as a candidate mediator of prostate cancer skeletal metástasis. *Cancer Res.* 2006; 66: 9065-73), mientras que participa en los procesos de diferenciación en carcinoma de colon (Chakrabarty S, *et al.* Extracellular calcium and calcium-sensing receptor function in human colon carcinomas: promotion of E-cadherin expression and suppression of beta-catenin/TCF activation. *Cancer Res.* 2003; 63: 67-71).

Los autores de la presente invención describieron (de Torres C, *et al.* The calcium-sensing receptor and parathyroid hormone-related protein are expressed in differentiated, favorable neuroblastic tumors. *Cancer* 2009; 115(12):2792-803) una nueva vía molecular involucrada en la diferenciación de los TN en la que participan CaR y PTHrP. En concreto, describieron por primera vez en la literatura que el gen *CaR* se halla expresado en los TN con algún grado de diferenciación (NB pobremente diferenciados y en diferenciación, GNB y GN), pero no se expresa en los NB indiferenciados. En la cohorte analizada, la expresión de *CaR* correlacionaba con factores de buen pronóstico en TN (edad al diagnóstico <1 año, estadio 1, 2 y 4S, bajo riesgo clínico y clasificación anatómo-patológica favorable). Asimismo, la expresión de *PTHrP* era significativamente más elevada en GNB y GN que en NB ($P < 0.0001$). Mas aún, CaR y PTHrP no se hallaban sólo expresados en TN en proceso espontáneo de diferenciación, sino que su expresión se incrementaba en procesos de diferenciación inducida, tanto en los pacientes (NB indiferenciados al diagnóstico que presentaban morfología diferenciada tras ser sometidos a quimioterapia) como en modelos *in vitro*. En este último caso, la expresión de *CaR* se hallaba significativamente incrementada en líneas celulares de NB expuestas brevemente a ácido retinoico, lo cual concordaba con su expresión en NB en inicio de diferenciación, mientras que *CaR* y sobre todo *PTHrP* se hallaban sobre-expresados en modelos de inducción de diferenciación glial, en paralelismo con su sobre-expresión en tumores ricos en estroma de Schwann, GNB y GN.

A continuación, los autores de la presente invención han investigado los mecanismos moleculares que regulan la expresión de CaR tanto en TN como en otros tipos de tumores del desarrollo y han llegado a resultados que son la base de la presente invención. Los inventores han descubierto que la inactivación del gen *CaR* mediante hipermetilación de su promotor 2, acompañada o no por la pérdida de uno de los alelos mediante delección del locus de *CaR* o mediante monosomía del cromosoma 3, correlaciona con todos los factores de mal pronóstico conocidos de los TN. Asimismo, los autores de la presente invención han descubierto la utilidad de los inhibidores de DNA metiltransferasas y de la desacetilación de las histonas como estrategia terapéutica para la restauración de la expresión de *CaR* como parte de las posibles estrategias terapéuticas para el tratamiento de los tumores del desarrollo.

El documento US 6296833 relaciona a la proteína CaR con diferentes tipos de cáncer. El documento menciona que el cáncer se puede tratar con compuestos capaces de unirse al receptor CaR. Este documento, sin embargo, no se refiere a tumores pediátricos y tampoco hace referencia a que el grado de metilación del promotor 2 del gen *CaR* pueda servir para el pronóstico de tumores pediátricos. Este documento tampoco hace referencia alguna a que los tumores pediátricos se puedan tratar con inhibidores de la metilación génica.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: A) Banda citogenética 3q13-21 en la que se localiza el gen *CaR* B) Esquema que representa la localización de la isla CpG y la organización de los promotores 1 y 2 y los exones alternativos 1A y 1B.

Figura 2: Esquema de la localización de los cebadores utilizados para amplificar la isla CpG mediante PCR específica de bisulfito (BSP-1, BSP-2, BSP-3 y BSP-4).

Figura 3: A) Resultado del análisis del promotor 2 (P2) mediante BSP en un tejido no neoplásico que tiene expresión de *CaR* (riñón), una línea celular de NB sin expresión de *CaR* y sin hipermetilación del P2 (SH-SY5Y), una línea celular de NB sin expresión de *CaR* y con hipermetilación del P2 (SK-N-JD) y un tumor neuroblástico sin expresión de *CaR* y con el promotor 2 metilado (NT#7). Cada fila de círculos representa el análisis de secuencia de un clon. Cada círculo representa una citosina de un dinucleótido GC del fragmento de P2 analizado. Los círculos blancos indican citosinas no metiladas y los negros, citosinas metiladas. B) Resultado del análisis del P2 mediante BSP en el tumor de un paciente (NT#1) que presentaba un NB indiferenciado al diagnóstico en el que no se detectaba expresión de *CaR* y en el cual se halló un 47% de citosinas metiladas. Tras la quimioterapia, el tumor (NT#49) mostró signos morfológicos de diferenciación, restauración de la expresión de *CaR* mRNA y proteína, y disminución del porcentaje de citosinas metiladas (39%). C) Resultado del análisis del P2 mediante BSP en la línea celular de NB LA-1-55n en la que no se detectaba expresión de *CaR* y en cuyo P2 se halló un 75% de citosinas metiladas. Se muestra el resultado de la BSP tras el tratamiento con el inhibidor de DNA metiltransferasas 5'-aza-2'-deoxicitidina (ADC), con el inhibidor de la desacetilación de histonas tricostatina A (TSA) y combinado (ADC y TSA).

Figura 4: Análisis del estado de metilación del P2 de *CaR* mediante PCR específica de metilación en un tejido no neoplásico que tiene expresión de *CaR* (riñón), un ADN tratado con *Sss* I metilasa, dos tumores en estudio (NT#1 y NT#3) y controles negativos (NTC: *non-template control*). U: “*unmethylated*” indica la PCR para detección de alelos no metilados. M: “*methylated*” indica la PCR para detección de alelos metilados.

Figura 5: A) Análisis de expresión de *CaR* y el gen control *TATA-binding protein* (TBP) en líneas celulares de NB mediante RT-PCR y electroforesis. Carril 1: Riñón; 2: LA-1-55n; 3: IMR32; 4: LA-N-1; 5: SK-N-JD; 6: SH-SY5Y; 7: SK-N-BE-2-C; 8: SK-N-LP; 9: SK-N-AS; 10: LA-1-5s; 11: Control negativo. B) Análisis de expresión de *CaR* mediante RT-PCR cuantitativa en las dos líneas celulares de NB que tenían expresión de *CaR*, tomando muestras de RNA en pases tempranos y al cabo de 10 pases. Se objetiva una disminución de la expresión con los pases sucesivos, lo cual es indicativo de un mecanismo dinámico, epigenético, de regulación de expresión. C) Análisis de expresión de *CaR* mediante RT-PCR cuantitativa en la línea celular LA-1-55n, que no presentaba expresión de *CaR*, tras el tratamiento con 5'-aza-2'-desoxicitidina (ADC) y/o con tricostatina A (TSA), o con los respectivos vehículos de ambos fármacos. D) Resultados del mismo experimento con la línea celular LA-N-1 en la cual sí se detectaba expresión de *CaR* mRNA antes del tratamiento con ADC y/o TSA. Los agentes desmetilantes inducen un incremento del nivel pre-existente de expresión de *CaR*.

Figura 6: Imagen del análisis mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) realizado en una sección parafinada de un tumor de la cohorte analizada (NT#18). A partir de la imagen principal, se amplifica la imagen de un núcleo con monosomía del cromosoma 3 (superior) y un núcleo con pérdida del locus de *CaR* (inferior). Señal roja: Sonda del locus del gen *CaR*. Señal verde: Sonda comercial del centrómero del cromosoma 3.

Descripción detallada de la invención

El primer objeto de la invención es un método para el pronóstico de tumores del desarrollo en un paciente que padece un tumor del desarrollo o tumor pediátrico. Dicho método comprende la determinación del estado de metilación del promotor 2 del gen *CaR* en muestras del tumor del paciente. La hipermetilación de dicho promotor 2 del gen *CaR* indica que el tumor del desarrollo tiene un mal pronóstico.

En el contexto de la presente invención se entiende que el promotor 2 del gen *CaR* se encuentra hipermetilado cuando un porcentaje mayor del 6% de las citosinas de dicho promotor se encuentran metiladas.

Por otro lado, un tumor del desarrollo, o tumor pediátrico, es aquel que se manifiesta principal o exclusivamente durante la infancia. Por ejemplo, se consideran tumores del desarrollo los tumores neuroblásticos como neuroblastomas, ganglioneuroblastomas o ganglioneuromas, sarcomas de Ewing, rhabdomyosarcomas alveolares y embrionarios, osteosarcomas, sarcomas sinoviales, fibrosarcomas, miofibromatosis y otros tumores fibro-histiocitarios, tumores del sistema nervioso central como gliomas, ependimomas, meduloblastomas, meningiomas, gangliogliomas o xantastrocitomas, tumores de Wilms y otros tumores renales, histiocitosis, schwannomas, neurofibromas, neurofibrosarcomas, leucemias, linfomas, teratomas, angiomas y otras anomalías vasculares, melanomas, melanocitomas, retinoblastomas, adenomas y carcinomas de tiroides y de paratiroides, tumores rhabdoides malignos y tumores teratoides-rhabdoides, tumores germinales, hepatoblastomas, hepatocarcinomas, adenomas y carcinomas suprarrenales, paragangliomas y feocromocitomas.

Como se mencionaba anteriormente, el método de pronóstico de la presente invención se basa en la determinación del estado de metilación del promotor 2 del gen *CaR*. Dicha determinación del estado de metilación se puede llevar a cabo por cualquier método apropiado para este fin. En una realización particular y preferida de la invención se realiza por PCR específica de bisulfito y/o por PCR específica de metilación. Otra realización contempla el uso del Análisis Combinado Bisulfito Restricción (COBRA) para la determinación del estado de metilación del promotor 2 del gen *CaR*.

Cuando la determinación del estado de metilación del promotor 2 del gen *CaR* se lleva a cabo por PCR específica de bisulfito el método pronóstico de la presente invención comprende preferiblemente:

ES 2 371 840 A1

- a) Extracción del ADN de las muestras tumorales y tratamiento con bisulfito de dicho ADN
- b) Amplificación del ADN de la etapa a) con los pares de cebadores SEQ ID NO 1/SEQ ID NO 2 para la amplificación del fragmento BSP-1 de la isla CpG del gen *CaR*, SEQ ID NO 3/SEQ ID NO 4 para la amplificación del fragmento BSP-2 de la isla CpG del gen *CaR*, SEQ ID NO 5/SEQ ID NO 6 para la amplificación del fragmento BSP-3 de la isla CpG del gen *CaR*
- c) Secuenciación de los productos obtenidos en b),
- d) Identificación en las secuencias secuenciadas en b) de aquellas timinas que no estén presentes en la secuencia génica del tumor analizado antes del tratamiento con bisulfito, donde dichas timinas en las secuencias amplificadas se corresponden con citosinas no metiladas en la secuencia génica de la muestra del tumor analizada.
- e) Cálculo del porcentaje de metilación del promotor 2 del gen *CaR* donde un porcentaje de metilación superior al 6% implica hipermetilación y mal pronóstico del tumor.

El método basado en la PCR específica de bisulfito comienza con la extracción del ADN del tumor sobre el cual se desee obtener el pronóstico. Para la extracción del ADN es preciso tomar una muestra del tumor del paciente normalmente en forma de biopsia. La muestra tumoral es entonces tratada por técnicas comúnmente aplicadas para la extracción de ADN tal y como las descritas en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd. edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Una vez realizada la extracción se realiza el tratamiento con bisulfito de acuerdo con las especificaciones de las casas comerciales de los kits. El tratamiento con bisulfito transforma las citosinas no metiladas del ADN en uracilos mientras que aquellas citosinas que se hallan metiladas en el ADN de partida permanecen inalteradas. El fundamento es que cuando estas secuencias tratadas se sometan a amplificación por PCR las citosinas no metiladas en la secuencia original aparecerán como timinas en las secuencias amplificadas mientras que las metiladas seguirán siendo citosinas en el producto amplificado.

La etapa de amplificación se lleva a cabo en diferentes alícuotas y con diferentes pares de cebadores diseñados específicamente para amplificar diferentes regiones de la isla CpG que engloba al promotor 2 del gen *CaR*. Los diferentes productos de amplificación abarcan toda la extensión de la isla CpG descrita, la cual como se decía antes engloba el promotor 2 del gen *CaR*. De este modo se podrá determinar el grado de metilación del promotor 2 y las demás regiones incluidas en la isla CpG.

El fragmento BSP-1 tiene una extensión de 546 pb y está situado entre los nucleótidos 1864 y 2409 de la secuencia *Homo sapiens calcium-sensing receptor gene, alternative promoters and exons 1A and 1B* (GenBank AY116081, GI 21898671), y abarca parte del exón 1A y prácticamente toda la extensión del promotor 2.

El fragmento BSP-2 tiene una extensión de 306 pb, está situado entre los nucleótidos 2104 y 2409 de la misma secuencia y abarca la mayor parte del promotor P2.

El fragmento BSP-3 tiene una extensión de 345 pb, está situado entre los nucleótidos 2385 y 2729 de la misma secuencia y abarca una parte del promotor 2 y parte del exón 1B.

El fragmento BSP-4 tiene una extensión de 389 pb y está situado entre los nucleótidos 2704 y 3093 de la misma secuencia y abarca parte del exón 1B y la región 3'UTR englobada en la isla CpG del gen *CaR*.

La siguiente etapa implica la secuenciación de los fragmentos amplificados. La secuenciación se puede realizar por cualquier método de secuenciación conocido preferentemente por secuenciación automática. Dado que el producto de amplificación puede contener distintos alelos, dicho producto de amplificación debe clonarse preferiblemente para poder amplificar y analizar separadamente los diferentes alelos (metilados en diferentes proporciones y no metilados) presentes en la misma muestra tumoral. Normalmente existe una heterogeneidad en los alelos de la muestra tumoral inicial y sólo mediante clonación de los fragmentos amplificados se puede analizar separadamente diferentes alelos. La variedad de los alelos se debe a la heterogeneidad de las células tumorales, por el hecho de que la metilación es un proceso dinámico que tiene lugar a lo largo de la evolución del tumor y por la presencia indeseada de células no tumorales acompañantes en la muestra tumoral (células sanguíneas, vasos sanguíneos, tejido estromal o de soporte etc.)

Después de la secuenciación es preciso identificar las nuevas timinas presentes en las secuencias amplificadas pero no en la secuencia génica original del tumor, es decir aquella antes de ser sometida la muestra al tratamiento con bisulfito. Es decir, es preciso comparar la secuencia génica del promotor 2 del gen *CaR* original, la del tumor analizado, frente a la de los diferentes fragmentos obtenidos tras amplificación y secuenciación.

A partir de la comparación de las citosinas presentes en la secuencia original frente a las citosinas presentes en las secuencias amplificadas se puede inferir el grado de metilación de promotor 2 del gen *CaR*. Si el grado de metilación es superior al 6% la conclusión es que el tumor del desarrollo en cuestión tiene mal pronóstico.

ES 2 371 840 A1

El otro método preferido para llevar a cabo el pronóstico de un tumor pediátrico de acuerdo con la presente invención se basa en la PCR específica de metilación. La PCR específica de metilación se basa en el diseño de sendas parejas de cebadores para PCR capaces de producir amplificación en un caso sólo cuando el fragmento a amplificar está metilado y en el otro sólo cuando el fragmento a amplificar no está metilado.

5 Cuando la determinación del estado de metilación del promotor 2 del gen *CaR* se lleva a cabo por PCR específica de metilación el método comprende:

- 10 a) Extracción del ADN de las muestras tumorales y tratamiento con bisulfito de dicho ADN
- b) amplificación del ADN de la etapa a) con los pares de cebadores SEQ ID NO 9/SEQ ID NO 10 para amplificar los alelos no metilados y SEQ ID NO 11/SEQ ID NO 12 para amplificar los alelos metilados,
- 15 c) Someter a electroforesis los productos amplificados en la etapa b)
- d) Visualización de los productos de amplificación donde la visualización de producto de amplificación para el ADN amplificado con los pares de cebadores SEQ ID NO 11/SEQ ID NO 12 implica la hipermetilación del promotor 2 del gen *CaR*.

20 La extracción del ADN y el tratamiento con bisulfito se llevan a cabo del mismo modo que en el método basado en la PCR específica de bisulfito.

25 La siguiente etapa es la amplificación. Esta se lleva a cabo en dos alícuotas diferentes, una con los cebadores específicos de alelos no metilados (SEQ ID NO 9 y SEQ ID NO 10) y la otra con los cebadores específicos de alelos metilados (SEQ ID NO 11 y SEQ ID NO 12).

30 Después de llevar a cabo ambas reacciones de amplificación, el producto de las mismas se somete a una electroforesis y tinción con bromuro de etidio, para en el caso de que exista producto de amplificación poder visualizarlo con rayos UV.

35 La visualización es precisamente la etapa final de este método. En realidad para determinar la hipermetilación sólo es necesario poder visualizar la existencia del producto de amplificación con los cebadores SEQ ID NO 11 y SEQ ID NO 12. No obstante, en ciertas ocasiones puede darse amplificación tanto para la PCR específica de alelos hipermetilados como en la de alelos no metilados. Esto se debe a tres razones: la heterogeneidad de clones dentro del tumor (con diversos grados de metilación), el hecho que la metilación es un proceso dinámico que está teniendo lugar en diferentes tiempos dentro de los millones de células que compone cada tumor y a la existencia de células no tumorales en el fragmento analizado, como por ejemplo células sanguíneas, vasos o tejidos adyacentes.

40 Con la finalidad de aumentar la fiabilidad del pronóstico de un tumor del desarrollo basado en la determinación del grado de metilación del promotor 2 del gen *CaR*, los inventores han desarrollado un método para la confirmación del mal pronóstico de un tumor del desarrollo que representa otro objeto de la invención. Dicho método de confirmación del mal pronóstico comprende en la determinación de la presencia o ausencia de algún alelo del gen *CaR* en el cromosoma 3 de las células tumorales. La ausencia de un alelo del gen *CaR* puede deberse a la delección de una región cromosómica donde se localiza el gen o de todo el cromosoma 3. Este mecanismo molecular se ha evidenciado en diferentes porcentajes de núcleos de todos los tumores neuroblásticos analizados, cualquiera que sea su pronóstico. Sin embargo cuando, además de hallarse un alelo inactivado por delección o monosomía, el segundo alelo del gen tiene hipermetilado el promotor 2 del gen, entonces los inventores de la presente invención han observado el tumor del desarrollo se confirma como un tumor de mal pronóstico.

50 Por tanto como se adelantaba más arriba es un objeto de la presente invención un método para la confirmación del mal pronóstico de un tumor del desarrollo que comprende:

- 55 a) la determinación de hipermetilación en el promotor 2 del gen *CaR* de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos anteriormente, es decir por PCR específica de bisulfito y por PCR específica de metilación, y
- b) la determinación de la pérdida de una copia del gen *CaR* del cromosoma 3 en el genoma del tumor.

60 El análisis de este mecanismo genético de inactivación puede llevarse a cabo por cualquier método apropiado para el fin de determinar la presencia o ausencia del gen *CaR* en el cromosoma 3 aunque en una realización particular y preferida de la invención dicha determinación se lleva a cabo por hibridación *in situ* fluorescente (FISH). El FISH es una tecnología que utiliza sondas de ADN marcadas con un fluoróforo para detectar o confirmar anomalías génicas o cromosómicas que generalmente están más allá de la capacidad de resolución de la citogenética de rutina. En primer lugar, la muestra de ADN (cromosomas metafásicos o núcleos en interfase) se desnaturaliza, proceso que separa las hebras complementarias de la estructura en doble hélice del ADN. A la muestra desnaturalizada se le añade entonces la sonda de interés, marcada con un fluoróforo, que se unirá al ADN de la muestra en el sitio diana, en el proceso denominado hibridación, donde se vuelve a formar una doble hélice. La señal emitida por la sonda se observa mediante

ES 2 371 840 A1

un microscopio de fluorescencia y así la muestra de ADN se puede clasificar según la presencia o ausencia de la señal. Se utiliza siempre una sonda marcada con un fluoróforo distinto para el centrómero del cromosoma donde mapa el citado gen como control.

5 El gen *CaR* se encuentra en la región cromosómica 3q13.3-21 por lo que si esta región del cromosoma está ausente totalmente o está presente sólo en monosomía en una muestra tumoral se puede inferir que el gen *CaR* tampoco estará presente en dicha muestra o estará sólo presente en monosomía.

10 En este sentido los autores de la presente invención han utilizado como sonda para detectar la presencia o ausencia de los diferentes alelos de *CaR* en el cromosoma 3 de las muestras tumorales la sonda BAC RP11-79M2. Esta sonda es específica de la región 3q13.3-21 del cromosoma 3 por lo que sirve para detectar de manera indirecta la presencia o ausencia del gen *CaR*.

15 La sonda BAC RP11-79M2 está descrita en: http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Location/View?r=3:121924785-122006033.

En el siguiente enlace también se describe una secuencia parcial de la sonda BAC RP11-79M2 que también sirve para los fines de la presente invención: <http://www.ebi.ac.uk/cgi-bin/dbfetch?db=emblsva:id=AC068754.16>.

20 El BAC RP11-79M2 tiene un tamaño de 186.945 pares de bases (posiciones 121868425 a 122055369) y engloba el locus del gen *CaR* de la especie *Homo sapiens* dentro de la región cromosómica 3q13.33-3q21.1.

25 Cuando el análisis de la metilación del promotor 2 del gen *CaR* confirma la hipermetilación del mismo y el análisis FISH permite deducir la delección o monosomía del gen *CaR*, el método de la invención permite confirmar que el pronóstico del tumor del desarrollo analizado es malo.

Otro de los objetos de la presente invención se basa en la nueva estrategia terapéutica que los autores de la presente invención han descubierto y probado efectiva. Dicho objeto viene representado por un inhibidor de la metilación génica para su uso en el tratamiento de tumores pediátricos.

30 Dicho inhibidor de la metilación génica se puede seleccionar entre inhibidores de DNA metiltransferasa (DNMTi), como 5'-aza-2'-deoxicidina, 5'-azacitidina, zebularine, 5-fluoro-2'-deoxicidina y S110; o entre inhibidores de la desacetilasa de histonas (HDACi) como tricostatina A, valproato sódico, MS-275 (entinostato), LHB589 (panobinostato), depsipeptide (romidepsin), PXD101 (belinostato), MGCD0103 o *suberoylanilide hydroxamic acid* (SAHA o vorinostato).

35 Los inhibidores de la metilación génica como los inhibidores de la metiltransferasa y los inhibidores de la desacetilasa de histonas han mostrado su efectividad en el tratamiento de tumores del desarrollo. Los autores han observado que el tratamiento con estos compuestos produce la restauración de la expresión del gen *CaR*. La restauración mediante estos fármacos de la expresión del gen *CaR*, que los autores han descubierto como un gen implicado en la diferenciación de los tumores del desarrollo y más especialmente en tumores neuroblásticos, supone una nueva terapia inductora de diferenciación para este grupo de tumores. Adicionalmente, junto con el uso de inhibidores de la metilación génica como los inhibidores de la metiltransferasa y los inhibidores de la desacetilasa de histonas se pueden usar de manera opcional activadores alostéricos de CaR una vez restaurada su expresión.

40 Por tanto, la presente invención proporciona una nueva y valiosa estrategia terapéutica para el tratamiento de los tumores del desarrollo como los tumores neuroblásticos como neuroblastomas, ganglioneuroblastomas o ganglioneuromas, sarcomas de Ewing, rhabdomyosarcomas alveolares y embrionarios, osteosarcomas, sarcomas sinoviales, fibrosarcomas, miofibromatosis y otros tumores fibro-histiocitarios, tumores del sistema nervioso central como gliomas, ependimomas, meduloblastomas, meningiomas, gliogliomas o xantastrocitomas, tumores de Wilms y otros tumores renales, histiocitosis, schwannomas, neurofibromas, neurofibrosarcomas, leucemias, linfomas, teratomas, angiomas y otras anomalías vasculares, melanomas, melanocitomas, retinoblastomas, adenomas y carcinomas de tiroides y de paratiroides, tumores rabdoideos malignos y tumores teratoides-rabdoideos, tumores germinales, hepatoblastomas, hepatocarcinomas, adenomas y carcinomas suprarrenales, paragangliomas y feocromocitomas.

45 Un último objeto de la presente invención es un kit para el pronóstico de tumores pediátricos que comprende los pares de cebadores SEQ ID NO 1/SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3/SEQ ID NO 4 y SEQ ID NO 5/SEQ ID NO 6, útiles para llevar a cabo la PCR específica de bisulfito o los pares de cebadores SEQ ID NO 9/SEQ ID NO 10 y SEQ ID NO 11/SEQ ID NO 12 útiles para llevar a cabo la PCR específica de metilación de acuerdo con el método de pronóstico de la presente invención.

50 Asimismo, el kit puede contener como sonda FISH marcada el BAC RP11-79M2.

65

Ejemplos

Ejemplo 1

5 *Búsqueda de islas CpG en los promotores 1 y 2 del gen CaR*

Mediante el software MethylPrimer, se realizó una búsqueda de islas CpG en la secuencia *Homo sapiens calcium-sensing receptor gene, alternative promoters and exons 1A and 1B* (GenBank AY116081, GI 21898671). Los criterios utilizados fueron: Tamaño de la isla >200 bp, contenido GC > 50% y ratio de contenido CpG observado versus contenido CpG esperado > 0.6.

Se identificó así una isla CpG de 1189 pb que engloba una parte del exón 1A (1944-2078), el promotor 2 completo (2079-2538), el exón 1B (2539-2798) y un fragmento de la región 3'UTR (2799-3132) (Figura 1B). No se identificaron islas CpG en el promotor 1.

Ejemplo 2

20 *Determinación del estado de metilación del promotor 2 del gen CaR mediante PCR específica de bisulfito (BSP)*

Se aisló el ADN genómico de tejidos no neoplásicos que muestran expresión de *CaR* (ganglio nervioso periférico, riñón y cerebro), 9 líneas celulares de neuroblastoma (LA-N-1, IMR32, LA1-55n, SH-SY5Y, SK-N-BE(2)-C, SK-N-JD, SK-N-LP, LA1-5s y SK-N-AS) y 51 tumores neuroblásticos mediante técnicas estándar (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd. edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Se realizó el tratamiento con bisulfito de 1 µg de cada ADN con kits comerciales (Qiagen y Applied Biosystems). Se diseñaron los pares de cebadores SEQ ID NO 1/SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 5/SEQ ID NO 6 y SEQ ID NO 7/SEQ ID NO 8 para amplificar la isla CpG completa en tres fragmentos (BSP-1, BSP-3 y BSP-4 ver figura 2). Se diseñó además una pareja de cebadores SEQ ID NO 3/SEQ ID NO 4 para amplificar más específicamente la región del promotor 2 (BSP-2 ver figura 2). Los cebadores cumplieron con los dos principales requisitos para la BSP: que no contengan dinucleótidos GCs, con el fin de amplificar sin sesgo tanto los alelos metilados como los no metilados, y que contengan tantas "C" que no formen parte de dinucleótidos GCs como sea posible para asegurar que la amplificación tiene lugar sólo a partir de ADN modificado por el bisulfito y no de ADN normal.

La PCR fue realizada en un volumen de 20 µL con Taq polimerasa en presencia de 1,5 mM MgCl₂ y 0.4 µM cebadores y a una temperatura de hibridación especificada en la tabla 1 para cada fragmento:

TABLA 1

40 *Temperatura de hibridación y tamaño del producto para la PCR específica de bisulfito (BSP)*

PCR	Temperatura de hibridación (°C)	Tamaño amplicón (bp)
BSP-1	56	546
BSP-2	56	306
BSP-3	56	345
BSP-4	56	389

Al finalizar la reacción, se comprobó el tamaño del producto amplificado mediante electroforesis en gel de agarosa de 7 µL de la reacción (ver tabla 1). A continuación, se procedió a su ligación y clonación (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd. edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Al menos 10 clones por producto fueron purificados, digeridos con *Eco RI* para verificar el tamaño del inserto y secuenciados. Se determinó el número y posición de las citosinas metiladas, así como el porcentaje de alelos metilados por muestra.

Debido a que el bisulfito transforma las citosinas no metiladas en uracilos, estas aparecen como timinas en la secuencia amplificada. Las citosinas que se hallaban metiladas en el ADN de partida, permanecen inalteradas tras el tratamiento con bisulfito y aparecen como citosinas en la secuencia final. Se cuantifica entonces el número de citosinas metiladas y no metiladas en cada muestra para cada región analizada. Se define hipermetilación cuando se halla más de un 6% de citosinas metiladas.

Los resultados obtenidos mediante BSP del promotor 2 en líneas celulares se muestran en la Tabla 2 y los resultados obtenidos en los tumores se detallan en la Tabla 3.

ES 2 371 840 A1

TABLA 2

Análisis del estado de metilación del promotor 2 de CaR (porcentaje de citosinas metiladas o mC) en 9 líneas celulares de neuroblastoma

Línea celular	MYCN	CaR mRNA	% mC en CaR P2
LA1-55n	A	0	56
SK-N-JD	A	0	51.2
SK-N-BE-2-C	A	0	25.6
SK-N-LP	A	0	39.4
LA1-5s	A	0	21
SH-SY5Y	NA	0	3.3
SK-N-AS	NA	0	4.3
IMR32	A	1	35.8
LA-N-1	A	1	25

Estado del oncogén MYCN: A indica amplificado; NA indica no amplificado.

Expresión del gen CaR (CaR mRNA): 1 indica expresión, 0 indica no expresión de CaR detectable mediante RT-PCR

TABLA 3

Cohorte de tumores neuroblásticos en los que se analizó el estado de metilación del P2 del gen CaR mediante PCR específica de bisulfito

Muestra	Anatomía Patológica	MYCN	INSS	Edad al diagnóstico (meses)	Riesgo clínico	CaR mRNA	Hipermetilación de P2
1	NB indiferenciado	NA	4	120	AR	0	1
2	NB indiferenciado	NA	4	24	AR	0	1
3	NB indiferenciado	A	4	48	AR	0	1
4	NB indiferenciado	A	4	24	AR	0	0
5	NB indiferenciado	A	3	24	AR	0	0
6	NB indiferenciado	NA	4s	2	BR	0	0
7	NB indiferenciado	A	3	24	AR	0	1
8	NB indiferenciado	A	4	18	AR	0	1
9	NB indiferenciado	A	4	21	AR	0	1
10	NB pobremente dif.	NA	4	72	AR	0	0
11	NB pobremente dif.	NA	4	72	AR	1	0
12	NB pobremente dif.	NA	1	12	BR	0	1
13	NB pobremente dif.	NA	3	15	AR	0	0
14	NB pobremente dif.	A	1	22	AR	0	0
15	NB pobremente dif.	NA	3	12	AR	0	0
16	NB pobremente dif.	NA	4	72	AR	0	1
17	NB pobremente dif.	NA	4s	0	BR	1	0
18	NB pobremente dif.	NA	4	12	BR	1	0
19	NB pobremente dif.	NA	3	8	BR	1	0
20	NB pobremente dif.	NA	1	12	BR	1	0
21	NB pobremente dif.	NA	3	1	AR	1	0
22	NB pobremente dif.	NA	3	6	BR	1	0
23	NB pobremente dif.	NA	4	39	AR	0	1
24	NB pobremente dif.	NA	4s	0	BR	1	0
25	NB pobremente dif.	NA	4s	0	BR	1	0

ES 2 371 840 A1

26	NB pobremente dif.	NA	1	5	BR	1	0
27	NB en dif.	NA	4s	4	BR	0	0
28	NB en dif.	NA	4s	6	BR	1	0
29	NB en dif.	NA	3	216	BR	0	0
30	GNB	NA	3	18	BR	0	0
31	GNB	NA	2	72	BR	0	1
32	GNB, nodular	NA	4	60	AR	1	0
33	GN	NA	1	39	BR	1	0
34	GN	NA	1	96	BR	1	0
35	GN	NA	2	75	BR	0	0
36	GN	NA	1	24	BR	1	0
37	GN	NA	1	11	BR	0	0
38	GN	NA	1	48	BR	1	0

Clasificación anatómo-patológica: Neuroblastoma (NB) indiferenciado, NB pobremente diferenciado, NB en diferenciación, ganglioneuroblastoma (GNB), ganglioneuroma (GN).

Estado del oncogén *MYCN*: A indica amplificado; NA indica no amplificado.

INSS: *International Neuroblastoma Staging System* (clasificación internacional para el estadije de los TN).

Riesgo clínico: AR indica alto riesgo (casos metastáticos y/o con amplificación de *MYCN*) y BR indica bajo riesgo (los demás casos).

CaR mRNA: 0 indica no expresión; 1 indica expresión de *CaR* detectable mediante RT-PCR.

Metilación de P2: 0 indica porcentaje de citosinas inferior o igual al 6%; 1 indica porcentaje de citosinas metiladas en P2 superior al 6%.

En los tejidos no neoplásicos y en la línea celular SH-SY5Y se halló menos de un 6% de citosinas metiladas en todas las áreas de la isla CpG. En la línea SK-N-AS, se detectó un 19% de citosinas metiladas en el exón 1A pero el porcentaje de metilación del promotor 2 fue de 4,3%.

Se halló hipermetilación del promotor 2 en LA-N-1, IMR32, LA1-55n, SK-N-BE(2)-C, SK-N-JD, SK-N-LP, LA1-5s (ver Tabla 2). En las demás regiones de la isla CpG se hallaron porcentajes variables de hipermetilación, algo que no se halló en los tumores primarios. La Figura 3A resume los resultados de BSP obtenidos en riñón, una línea celular sin hipermetilación del promotor 2 (SH-SY5Y), una línea celular (SK-N-JD) y un tumor con hipermetilación del promotor 2.

En la cohorte de tumores, la hipermetilación del promotor 2 se asoció de manera estadísticamente significativa con ausencia de expresión de *CaR* ($P = 0.002$) y las variables de mal pronóstico bien establecidas en tumores neuroblásticos: amplificación del oncogén *MYCN* ($P = 0.04$), edad al diagnóstico > 12 meses ($P = 0.026$), estadio 4 ($P = 0.002$), alto riesgo clínico ($P = 0.009$) y clasificación anatomopatológica de NB indiferenciado excluyendo los estadios 4s ($P = 0.002$).

Se examinó asimismo el estado de metilación del promotor 2 mediante BSP de 9 tumores obtenidos en la cirugía de second-look y 4 recaídas. Entre ellos, dos correspondían a pacientes que tenían en el momento del diagnóstico NB indiferenciados, sin expresión de *CaR* y con hipermetilación del P2 (NT#1 y #3). Tras la quimioterapia, sus respectivos tumores (NT#49 y #44) mostraron signos morfológicos de diferenciación, restauración de la expresión de *CaR* mRNA y proteína, así como un discreto descenso en el porcentaje de citosinas metiladas (ver Figura 3B).

Se examinó asimismo el porcentaje de citosinas metiladas en la línea celular LA-1-55n tras el tratamiento con ADC, TSA o ambos. Los resultados se resumen en la Figura 2C.

Ejemplo 3

Determinación del estado de metilación del promotor 2 del gen CaR mediante PCR específica de metilación (MSP)

Se diseñaron cebadores en la secuencia del promotor 2 para amplificar separadamente alelos no metilados (SEQ ID NO 9/SEQ ID NO 10) y metilados (SEQ ID NO 11/SEQ ID NO 12). Estos contenían 2-3 dinucleótidos CGs. Las condiciones de las PCR fueron optimizadas tal y como se muestra en la tabla 4 para obtener bandas específicas en los controles no metilados (DNA de sangre periférica, riñón, cerebro) y metilados (DNA de sangre periférica tratado con *Sss I* metilasa):

TABLA 4

Temperatura de hibridación y tamaño del producto para la PCR específica de metilación (MSP)

PCR	Temp de hibridación (°C)	Tamaño amplicón(bp)
MSP-U	58	140
MSP-M	68	151

MSP-U: amplificación de alelos no metilados

MSP-M: amplificación de alelos metilados

Tras la amplificación, los productos obtenidos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. La visualización de los productos amplificados se realizó entonces mediante iluminación con rayos UV.

La detección exclusiva de amplificación en la electroforesis de los productos amplificados con los cebadores para amplificar los alelos no metilados indica que el tumor en estudio no tiene hipermetilado el promotor 2 del gen *CaR*. La obtención de amplificación con los cebadores para amplificar alelos metilados indica que el tumor tiene hipermetilación del promotor 2 del gen *CaR*. Se amplificó una alícuota de ADN tratada con bisulfito de cada control metilado y no metilado junto con las de las líneas de neuroblastoma o tumores neuroblásticos (Fig. 4). Se validó así la correlación de la presencia de amplificación de alelos metilados y no metilados mediante MSP con los resultados observados en las secuencias de la BSP.

Ejemplo 4

La expresión de CaR se restaura en líneas celulares de neuroblastoma tratadas con 5'aza-2'-desoxicitidina y/o con tricostatina A

Nueve líneas celulares de neuroblastoma (LA-N-1, IMR32, LA1-55n, SH-SY5Y, SK-N-BE(2)-C, SK-N-JD, SK-N-LP, LA1-5s y SK-N-AS) fueron tratadas con 1-5 μ M 5'aza-2'-desoxicitidina (ADC) durante 72 horas y/o con 100 nM tricostatina A (TSA) durante 12 horas. Simultáneamente, se cultivaron las mismas líneas celulares en presencia de los vehículos respectivos de ambos fármacos. Se aisló el RNA total de las células tratadas con el/los fármaco(s) o sus vehículos. El RNA fue sometido a transcripción reversa mediante M-MLV y hexámeros al azar (2.5 μ M). Alícuotas de cDNA fueron amplificadas mediante qPCR con cebadores y sondas específicas para el mRNA de *CaR* y de *TATA-binding protein (TBP)* como gen control (Applied Biosystems). Se efectuó cuantificación relativa de la expresión (método delta-delta Ct) respecto a un calibrador, para cuantificar la restauración de la expresión.

En la Figura 5A, se muestra el análisis de expresión de *CaR* mediante RT-PCR convencional con respecto al gen control *TBP* antes del tratamiento *in vitro*. Sólo se detecta expresión de *CaR* en IMR32 y LA-1-N. En la Fig 5B, se muestra mediante qRT-PCR la disminución de los niveles del mRNA de *CaR* en estas dos líneas tras 10 y 7 pases en cultivo respectivamente, lo cual es indicativo de un mecanismo dinámico de silenciamiento génico (epigenético). Tras el tratamiento con ADC y/o TSA, el nivel de expresión de *CaR* se incrementó en ambas (resultado de LA-N-1 en Fig. 5D). Estas líneas habían mostrado metilación parcial de la isla CpG en el análisis de BSP.

En las líneas celulares en las cuales el mRNA de *CaR* era previamente indetectable y que tenían hipermetilada la isla CpG (LA1-55n en Figura 5C, SK-N-BE(2)-C, SK-N-JD, SK-N-LP y LA1-5s), el tratamiento con ADC y/o TSA restauró la expresión de *CaR*.

Ejemplo 5

Análisis del estado alélico del gen CaR mediante FISH

Se diseñó una sonda de FISH (Fluorescence *In situ* Hibridization) para la detección del locus del gen *CaR*. Para ello se seleccionó un clon BAC (cromosoma artificial bacteriano), concretamente el RP1-79M2, que contiene la región genómica del locus del gen *CaR*. Dicho clon tiene un tamaño de 186.945 pares de bases (posiciones 121868425 a 122055369 en el *genome browser* del UCSC) y engloba el locus del gen *CaR* de la especie *Homo sapiens* dentro de la región cromosómica 3q13.33-3q21.1 (ver figura 1 A).

El BAC RP11-79M2 fue extraído del hospedador bacteriano mediante midiprep ("QIAGEN Plasmid Midi Kit", Qiagen) y marcado mediante *nick-translation* (Vysis, Downers Grove, IL) utilizando como fluorocromo Spectrum red-dUTP (señal roja) (Vysis, Downers Grove, IL).

ES 2 371 840 A1

Para descartar cualquier posible hibridación inespecífica de la sonda, se realizaron inicialmente hibridaciones FISH sobre células de sangre periférica en interfase y en metafase procedentes de donantes sanos. Para ello estas células fueron co-hibridadas con la sonda locus específica del gen *CaR* que produce señal roja y con una sonda centromérica específica del cromosoma 3 que produce señal verde (Kreatech, Amsterdam, NL).

Posteriormente, y una vez que se comprobó la especificidad de la sonda, se realizó el FISH sobre secciones menores de 4 μm de espesor recogidas sobre portas de cristal, procedentes de bloques de parafina. Estos bloques de parafina contenían, bien tejido tumoral de pacientes con diversos tumores neuroblásticos y tejidos sanos, estos últimos utilizados como controles. La sonda locus específica y la centromérica del cromosoma 3 fueron diluidas 1:20 y 1:10 respectivamente en tDenHyb2 buffer (Insitus, Albuquerque, NM, USA). Un volumen de 10 μL de la mezcla de sondas diluidas se aplicó sobre los portas de cristal en las áreas de interés cubriéndose con un cubre de cristal de 22 x 22 mm y se selló con rubber cement (Royal Talens, Holland). Posteriormente, todos los portas fueron hibridados utilizando un hibridador (Hybrite machine, Vysis) sometiendo a las muestras a desnaturalización a 75°C durante 5 minutos y posterior hibridación a 37°C durante al menos 16 horas. Pasado este tiempo, se eliminaron los cubres de cristal, se realizaron lavados posthibridación a 46°C en 2XSSC, 50% formamida durante 5 minutos, se tiñó con DAPI y se procedió al montaje con Vectashield H-1000 médium (Vector Laboratories, Burlingame). Las imágenes digitales se obtuvieron utilizando un microscopio Zeiss Axioplan2 epifluorescence microscope (Cari Zeiss Oberkochen, Germany) conectado con una cámara digital (ORCA-ER-1394, Hamamatsu). En todos los casos, se contaron 100 núcleos identificándose el número de señales rojas (locus de *CaR*) y señales verdes (centrómero del cromosoma 3).

En las líneas celulares de NB, no se hallaron porcentajes elevados de núcleos con monosomía del cromosoma 3, desequilibrio (*imbalance*) o delección del locus de *CaR* (Tabla 5).

TABLA 5

Análisis del estado alélico del locus de CaR mediante hibridación in situ fluorescente (FISH) en 9 líneas celulares de neuroblastoma

Linea celular	FISH clon predominante	2V2R	1V1R	3V3R	4V4R	2V1R	5V5R	3V2R	3V1R	4V2R	4V3R
LA1-55n	89% 3V/3R	3		89	8						
SK-N-JD	89% 2V/2R	89		10							
SK-N-BE-2-C	88% 4V/4R	4		5	88		3				
SK-N-LP	99% 2V/2R	99		1							
LA1-5s	77% 3V/3R	15	1	77	4	1		1		1	
SH-SY5Y	84% 2V/2R	84	1	13	1			1			
SK-N-AS	85% 2V/2R	95		3		1		1			
IMR32	ND										
LA-N-1	ND										

Sin embargo, al analizar la cohorte de los tumores neuroblásticos, se observó que todos los tumores excepto uno (*vide infra*), tenían un porcentaje de núcleos con monosomía del cromosoma 3 (Tablas 6 y 7). Este porcentaje era similar entre los distintos subgrupos clínicos y anatomopatológicos. En general, los porcentajes de núcleos con delección del locus específico de *CaR* eran reducidos, salvo en el único caso en el que no se halló monosomía del cromosoma 3 (NT#27), que presentaba un 40% de núcleos con desequilibrio (*imbalance*) (3:2) y un 10% de núcleos con delección (3:1) del locus de *CaR*.

ES 2 371 840 A1

TABLA 6

*Cohorte de tumores neuroblásticos en los que se analizó el estado alélico del locus del gen CaR mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH)*

Muestra	Anatomía Patológica	INSS	Riesgo clínico	% núcleos con monosomía cr 3	% núcleos con monosomía cr 3 y pérdida locus CaR
1	NB indiferenciado	4	AR	41	41
2	NB indiferenciado	4	AR	NE	NE
3	NB indiferenciado	4	AR	16	21
4	NB indiferenciado	4	AR	33	34
5	NB indiferenciado	3	AR	21	25
6	NB indiferenciado	4s	BR	14	16
7	NB indiferenciado	3	AR	10	11
8	NB indiferenciado	4	AR	ND	ND
9	NB indiferenciado	4	AR	NE	NE
10	NB pobremente dif.	4	AR	36	36
11	NB pobremente dif.	4	AR	13	28
12	NB pobremente dif.	1	BR	22	26
13	NB pobremente dif.	3	AR	35	37
14	NB pobremente dif.	1	AR	27	31
15	NB pobremente dif.	3	AR	16	17
16	NB pobremente dif.	4	AR	31	39
17	NB pobremente dif.	4s	BR	16	16
18	NB pobremente dif.	4	BR	26	28
19	NB pobremente dif.	3	BR	NE	NE
20	NB pobremente dif.	1	BR	34	38
21	NB pobremente dif.	3	AR	22	29
22	NB pobremente dif.	3	BR	3	11
23	NB pobremente dif.	4	AR	25	25
24	NB pobremente dif.	4s	BR	NE	NE
25	NB pobremente dif.	4s	BR	36	39
26	NB pobremente dif.	1	BR	12	17
27	NB en dif.	4s	BR	0	50
28	NB en dif.	4s	BR	33	43
29	NB en dif.	3	BR	59	59
30	GNB	3	BR	16	30
31	GNB	2	BR	49	49
32	GNB, nodular	4	AR	38	38
33	GN	1	BR	34	38
34	GN	1	BR	21	21
35	GN	2	BR	39	42
36	GN	1	BR	33	33
37	GN	1	BR	27	27
38	GN	1	BR	ND	ND

Tabla 7: Análisis del estado de metilación del promotor 2 (P2) de *CaR* y su estado alélico analizado mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH) en una cohorte de tumores neuroblásticos obtenidos al diagnóstico (n=38), en la cirugía *second-look* (tras la quimioterapia de inducción, n=9) y en la recaída (n=4).

Muestras al diagnóstico	%mC en P2	2V2R	1V1R	3V3R	4V4R	2V1R	5V5R	3V2R	3V1R	4V2R	4V3R	Núcleos totales con partículas
1	47.1	57	41	2								41
2	11.7	NE										NE
3	45	74	16	4	1	5						21
4	2.5	58	33	7	1	1						34
5	4.3	65	21	10	0	2		1		1		25
6	1.6	65	14	16	3			2				16
7	16.4	80	10	8	1	1						11
8	9.8	NE										NE
9	12	NE										NE
10	3.6	61	36	3								36
11	4.1	61	13	7	4	8		5	1	1		28
12	60.4	64	22	9	1	4						26
13	1.8	45	35	9	7		2					37
14	5.8	61	27	8		4						31
15	5	55	16	24	4			1				17
16	10.6	38	31	18	5	8						39
17	2	72	16	8	4							16
18	2	64	26	7	1	2						28
19	2.1	NE										NE
20	3.3	60	34	2		4						38
21	0.5	60	22	9	2	5		2				29
22	2.1	79	3	7	3			3		5		11
23	20.5	68	25	7								25
24	2.6	NE										NE
25	3	57	36	4		3						39
26	1	77	12	6		5						17
27	5	20	0	30				40	10			50
28	3.75	51	33	6		7		3				43

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

29	5	32	59	6	3	1	3	1	1	59
30	1.5	45	16	22	2	1	2	1	1	30
31	11.5	45	49	4	2		4			49
32	3.75	43	38	17	2		17			38
33	5.8	54	34	8			8			38
34	5	77	21	2			2			21
35	ND	55	39	3			3			42
36	1.1	63	33	4			4			33
37	8.3	72	27	1			1			27
38	2	NE								NE

Muestras second look	% mC en P2	2V2R	1V1R	3V3R	4V4R	2V1R	5V5R	3V2R	3V1R	4V2R	4V3R	Núcleos totales con pérdidas
39	6	67	27			6						33
40	5.7	NE										NE
41	5	57	30	5	1	7						37
42	5	NE										NE
43	5.7	NE										NE
44	33.6	56	30	10		3	1					34
45	16	71	18	3		8						26
46	3.7	NE										NE
47	1	NE										NE

Muestras en la recaída	% mC en P2	2V2R	1V1R	3V3R	4V4R	2V1R	5V5R	3V2R	3V1R	4V2R	4V3R	Núcleos totales con pérdidas
48	6.5	66	29	5								29
49	39	60	30	8	2							30
50	0.5	NE										NE
51	1.2	NE										NE

Se detalla el porcentaje de citosinas metiladas hallado en P2 mediante BSP y el conteo pormenorizado de núcleos (100 por caso) en el FISH. La señal verde (V) indica sonda del centrómero 3 y la señal roja (R) indica sonda del locus del gen *CaR*. NE: no evaluable.

REIVINDICACIONES

1. Método para el pronóstico de tumores del desarrollo en un paciente que padece un tumor del desarrollo que
5 comprende la determinación del estado de metilación del promotor 2 del gen *CaR* en muestras de tumor del paciente
donde la hipermetilación de dicho promotor 2 del gen *CaR* indica que el tumor tiene un mal pronóstico.

2. Método de acuerdo con la reivindicación 1 donde la determinación del estado de metilación del promotor 2
10 del gen *CaR* se realiza por PCR específica de bisulfito, por PCR específica de metilación y/o por análisis combinado
bisulfito restricción.

3. Método de acuerdo con la reivindicación 2 donde la determinación del estado de metilación del promotor 2 del
gen *CaR* por PCR específica de bisulfito comprende:

- 15 a) Extracción del ADN de las muestras tumorales y tratamiento con bisulfito de dicho ADN
- b) Amplificación del ADN de la etapa a) con los pares de cebadores SEQ ID NO 1/SEQ ID NO 2 para la
amplificación del fragmento BSP-1 de la isla CpG del gen *CaR*, SEQ ID NO 3/SEQ ID NO 4 para la
20 amplificación del fragmento BSP-2 de la isla CpG del gen *CaR*, y SEQ ID NO 5/SEQ ID NO 6 para la
amplificación del fragmento BSP-3 de la isla CpG del gen *CaR*
- c) Secuenciación de los fragmentos amplificados en b),
- 25 d) Identificación en las secuencias amplificadas de aquellas timinas que no estén presentes en la secuencia
génica del tumor analizado antes del tratamiento con bisulfito, donde dichas timinas en las secuencias
amplificadas se corresponden con citosinas no metiladas en la secuencia génica de la muestra del tumor
analizada.
- 30 e) Cálculo del porcentaje de metilación del promotor 2 del gen *CaR* donde un porcentaje de metilación
superior al 6% implica hipermetilación y mal pronostico del tumor.

4. Método de acuerdo con la reivindicación 2 donde la determinación del estado de metilación del promotor 2 del
35 gen *CaR* por PCR específica de metilación comprende:

- 35 a) Extracción del ADN de las muestras tumorales y tratamiento con bisulfito de dicho ADN
- b) amplificación del ADN de la etapa a) con los pares de cebadores SEQ ID NO 9/SEQ ID NO 10 para
40 amplificar los alelos no metilados y SEQ ID NO 11/SEQ ID NO 12 para amplificar los alelos metilados,
- c) Someter a electroforesis los productos amplificados en la etapa b)
- 45 d) Visualización de los productos de amplificación donde la presencia de producto de amplificación para el
ADN amplificado con los pares de cebadores SEQ ID NO 11/SEQ ID NO 12 implica la hipermetilación
del promotor 2 del gen *CaR*.

5. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde los tumores del desarrollo se selec-
50 cionan entre los tumores neuroblásticos como neuroblastomas, ganglioneuroblastomas o ganglioneuomas, sarcomas
de Ewing, rabdomiosarcomas alveolares y embrionarios, osteosarcomas, sarcomas sinoviales, fibrosarcomas, miofi-
bromatosis y otros tumores fibro-histiocitarios, tumores del sistema nervioso central como gliomas, ependimomas,
meduloblastomas, meningiomas, gangliogliomas o xantastrocitomas, tumores de Wilms y otros tumores renales,
55 histiocitosis, schwannomas, neurofibromas, neurofibrosarcomas, leucemias, linfomas, teratomas, angiomas y otras ano-
malías vasculares, melanomas, melanocitomas, retinoblastomas, adenomas y carcinomas de tiroides y de paratiroides,
tumores rabdoides malignos y tumores teratoides-rabdoides, tumores germinales, hepatoblastomas, hepatocarcinomas,
adenomas y carcinomas suprarrenales, paragangliomas y feocromocitomas.

6. Kit para el pronóstico de tumores del desarrollo que comprende los pares de cebadores SEQ ID NO 1/SEQ ID
60 NO 2, SEQ ID NO 3/SEQ ID NO 4 y SEQ ID NO 5/SEQ ID NO 6 útiles para llevar a cabo la PCR específica de
bisulfito o los pares de cebadores SEQ ID NO 9/SEQ ID NO 10 y SEQ ID NO 11/SEQ ID NO 12 útiles para llevar a
cabo la PCR específica de metilación y opcionalmente la sonda marcada BAC RP11-79M2.

7. Kit de acuerdo con la reivindicación 6 que comprende los pares de cebadores SEQ ID NO 1/SEQ ID NO 2, SEQ
65 ID NO 3/SEQ ID NO 4 y SEQ ID NO 5/SEQ ID NO 6 útiles para llevar a cabo la PCR específica de bisulfito.

8. Kit de acuerdo con la reivindicación 6 que comprende los pares de cebadores SEQ ID NO 9/SEQ ID NO 10 y
SEQ ID NO 11/SEQ ID NO 12 útiles para llevar a cabo la PCR específica de metilación.

ES 2 371 840 A1

9. Kit de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 o 8 que comprende la sonda marcada BAC RP11-79M2.

10. Método para la confirmación del mal pronóstico de un tumor del desarrollo que comprende:

- 5
- a) la determinación de hipermetilación en el promotor 2 del gen *CaR* según un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,
 - b) la determinación de la pérdida de una copia del gen *CaR* del cromosoma 3 en el genoma del tumor.

10

11. Método de acuerdo con la reivindicación 10 que comprende llevar a cabo una hibridación fluorescente *in situ* (FISH) con la sonda marcada BAC RP11-79M2.

15

12. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 y 11 donde el tumor del desarrollo se selecciona entre los tumores neuroblásticos como neuroblastomas, ganglioneuroblastomas o ganglioneuromas, sarcomas de Ewing, rhabdomyosarcomas alveolares y embrionarios, osteosarcomas, sarcomas sinoviales, fibrosarcomas, miofibromatosis y otros tumores fibro-histiocitarios, tumores del sistema nervioso central como gliomas, ependimomas, meduloblastomas, meningiomas, gliogliomas o xantastrocitomas, tumores de Wilms y otros tumores renales, histiocitosis, schwannomas, neurofibromas, neurofibrosarcomas, leucemias, linfomas, teratomas, angiomas y otras anomalías vasculares, melanomas, melanocitomas, retinoblastomas, adenomas y carcinomas de tiroides y de paratiroides, tumores rabdoideos malignos y tumores teratoides-rabdoideos, tumores germinales, hepatoblastomas, hepatocarcinomas, adenomas y carcinomas suprarrenales, paragangliomas y feocromocitomas.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG.1

A)



B)

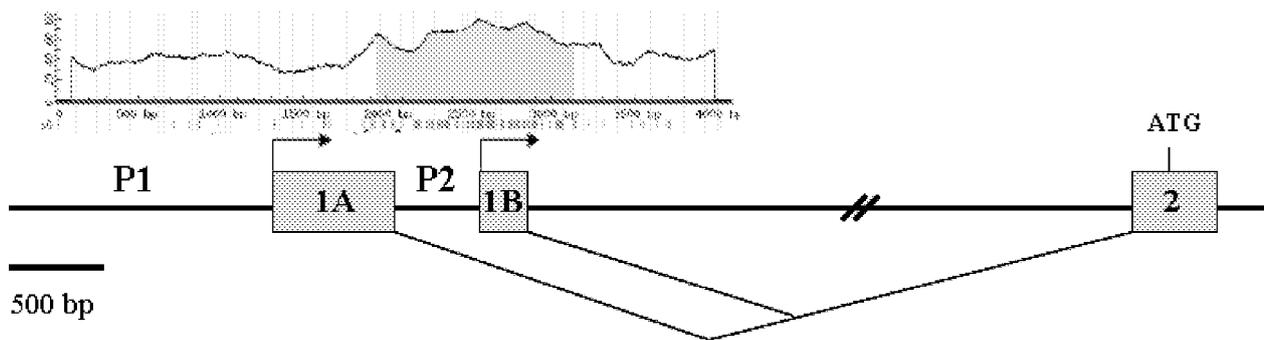


FIG.2

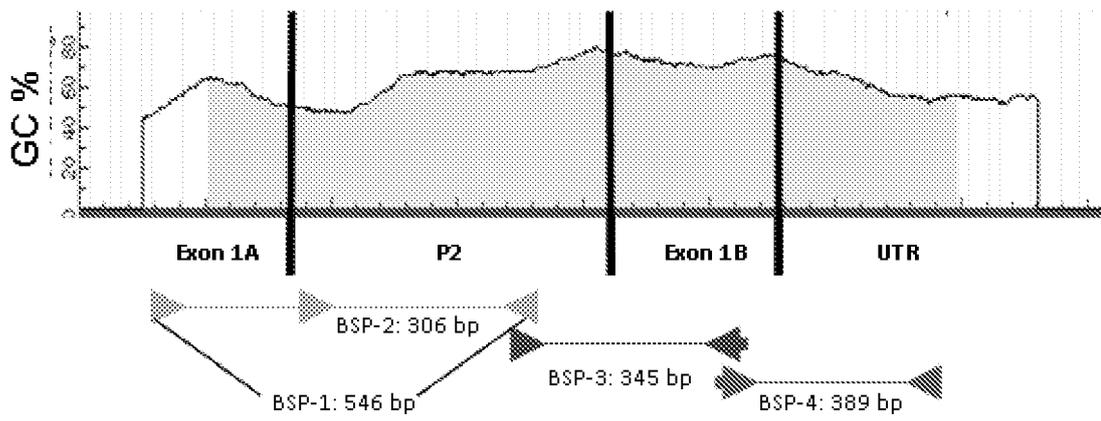
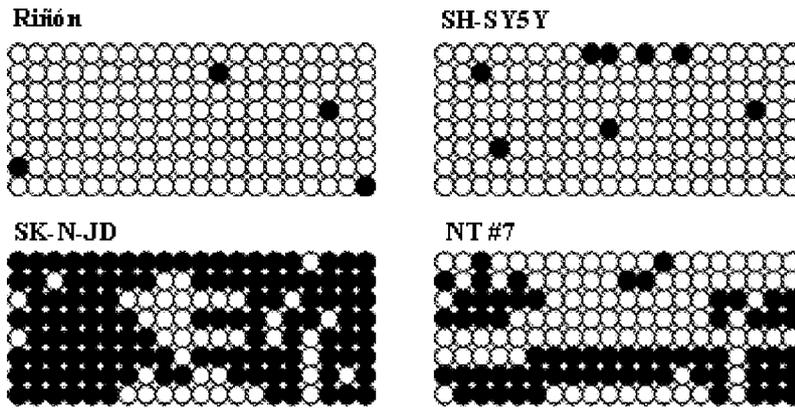
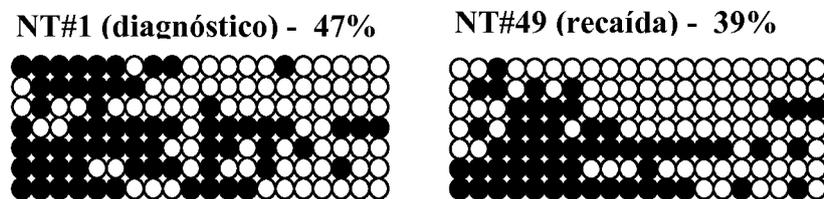


FIG. 3

A)



B)



C)

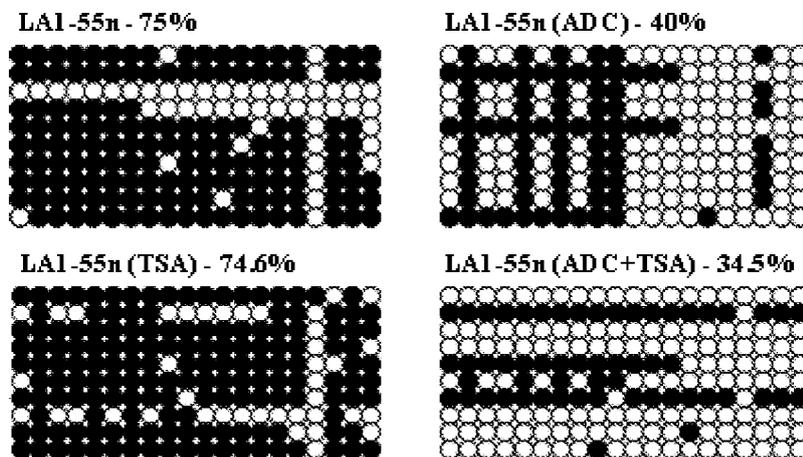


FIG. 4

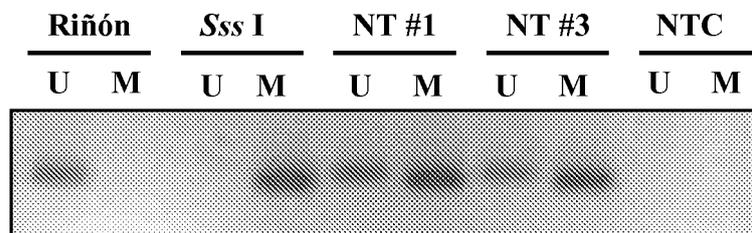


FIG. 5

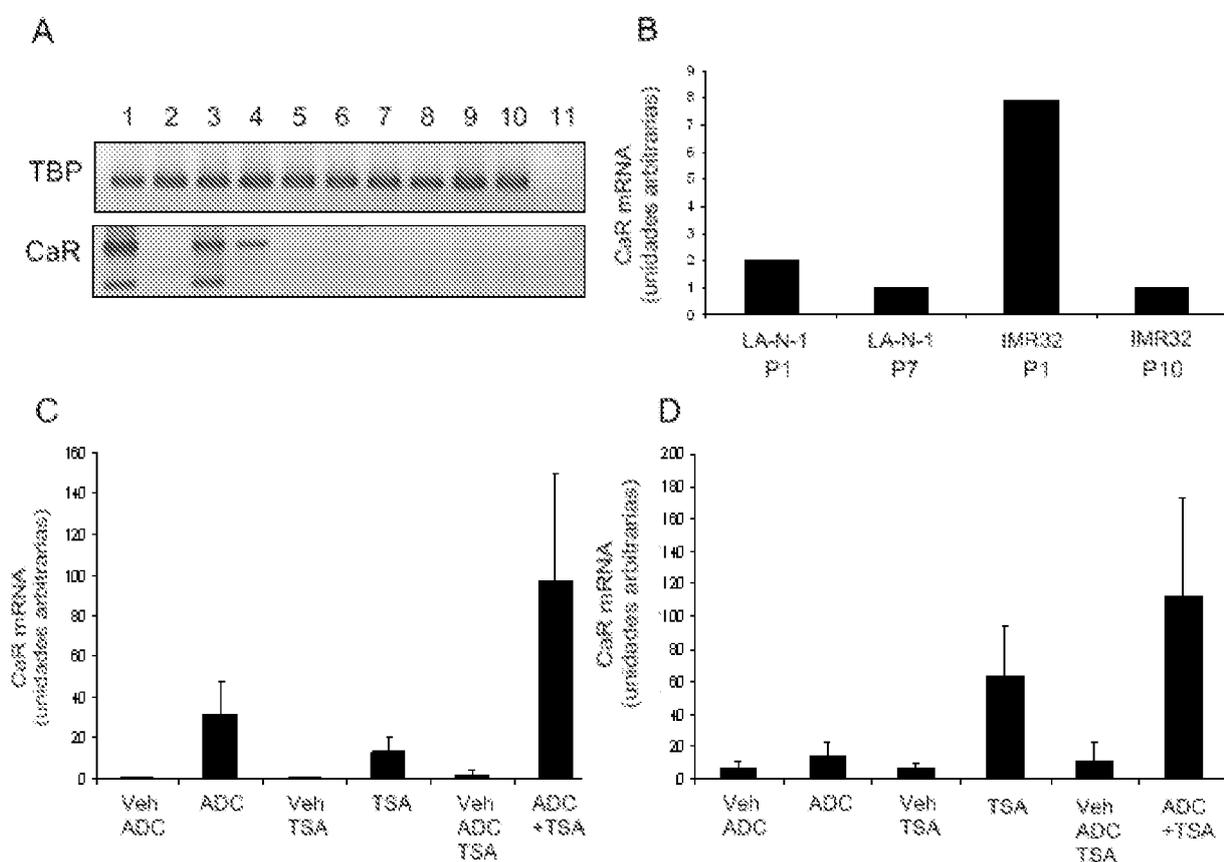
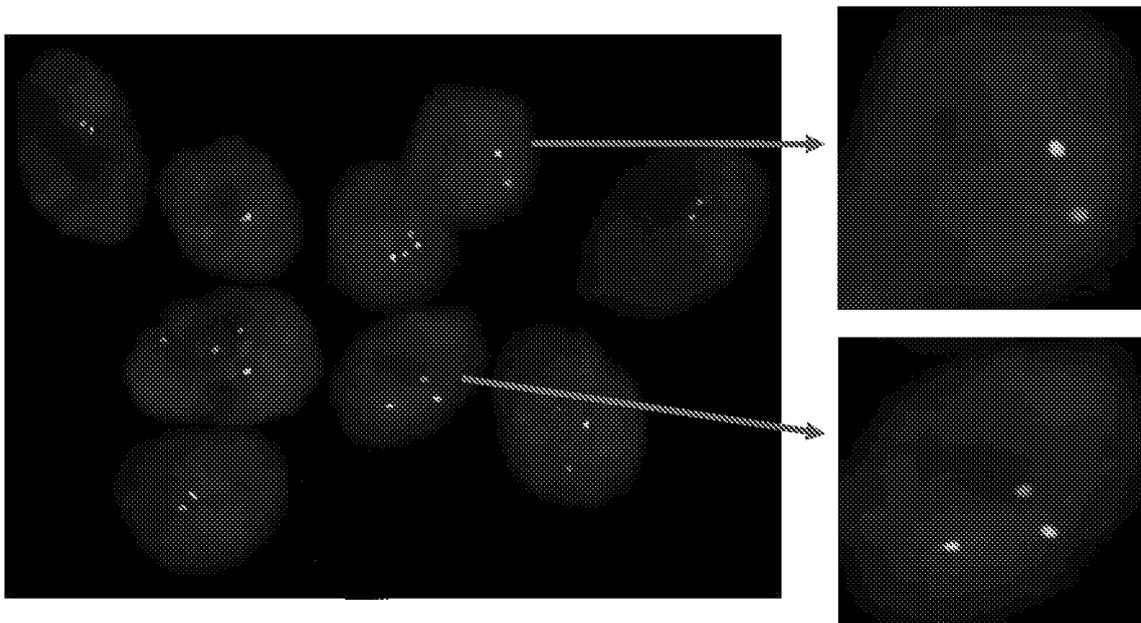


FIG. 6



ES 2 371 840 A1

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> HOSPITAL SANT JOAN DE DEU
FUNDACIÓN DE INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA (FICUS)
- <120> MÉTODO PARA EL PRONÓSTICO DE TUMORES DEL DESARROLLO Y USO DE INHIBIDORES DE LA METILACIÓN GÉNICA PARA EL TRATAMIENTO DE LOS MISMOS
- 10 <130> 156/10
- <160> 12
- 15 <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
<211> 22
20 <212> DNA
<213> Artificial
- <220>
25 <223> cebador para la amplificación de fragmento BSP-1
- <400> 1
30 gttaggggtt aggataagg at 22
- <210> 2
35 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial
- <220>
40 <223> cebador para la amplificación del fragmento BSP-1
- <400> 2
45 caaaaaactt aactaactct tcaaa 25
- <210> 3
50 <211> 24
<212> DNA
<213> Artificial
- <220>
55 <223> Cebador para la amplificación del fragmento BSP-2
- <400> 3
60 atttatttta ttgtgaattt ttgg 24
- <210> 4
65 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

ES 2 371 840 A1

<220>
<223> Cebador para la amplificación del fragmento BSP-2

5 <400> 4
caaaaaactt aactaactct tcaaaa 25

<210> 5
10 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

15 <220>
<223> cebador para la amplificación del fragmento BSP-3

20 <400> 5
tttgaagagt tagttaagtt ttttg 25

<210> 6
25 <211> 26
<212> DNA
<213> Artificial

30 <220>
<223> cebador para la amplificación del fragmento BSP-3

35 <400> 6
taaactctaa tctaacttca aaacta 26

<210> 7
40 <211> 29
<212> DNA
<213> Artificial

45 <220>
<223> cebador para la amplificación del fragmento BSP-4

50 <400> 7
agttttgaga ttagattaga gtttatttt 29

<210> 8
55 <211> 25
<212> DNA
<213> Artificial

60 <220>
<223> cebador para la amplificación del fragmento BSP-4

65 <400> 8
aaacacaaaa aactaccaac aacaa 25

ES 2 371 840 A1

<210> 9		
<211> 33		
<212> DNA		
5 <213> Artificial		
<220>		
<223> cebador para la amplificación de alelos no metilados		
10 <400> 9		
	gatttgagag ttgggaattt ttggtttggt atg	33
15 <210> 10		
<211> 34		
<212> DNA		
20 <213> Artificial		
<220>		
<223> cebador para la amplificación de alelos no metilados		
25 <400> 10		
	acttaactaa ctcttcaaaa tcactaaaaa caca	34
30 <210> 11		
<211> 23		
<212> DNA		
35 <213> Artificial		
<220>		
<223> cebador para la amplificación de alelos metilados		
40 <400> 11		
	gtcgggaatt ttggttcgg tac	23
45 <210> 12		
<211> 32		
<212> DNA		
50 <213> Artificial		
<220>		
<223> cebador para la amplificación de alelos metilados		
55 <400> 12		
	ttaactaact cttcaaaatc gctaaaaacg cg	32
60		
65		



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201030942

②② Fecha de presentación de la solicitud: 18.06.2010

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/68** (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	DE TORRES, C. et al. The Calcium-Sensing Receptor and Parathyroid Hormone-related Protein Are Expressed in Differentiated, Favorable Neuroblastic Tumors. Cancer. Junio 2009. Vol. 115, páginas 2792-2803, todo el documento.	1-12
A	ESTELLER M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. Oncogene. 2002. Vol. 21, páginas 5427-5440, todo el documento.	1-12
A	CHUNG W. et al. Identification of Novel Tumor Markers in Prostate, Colon and Breast Cancer by Unbiased Methylation Profiling. Public Library of Science Journal. Abril 2008. Vol. 3(4), páginas 1-10, todo el documento.	1-12
A	US 6596493 B1 (REEVES RH. et al.) 22.07.2003, columna 1, línea 60 – columna 2, línea 7; columna 4, líneas 33-58; reivindicaciones 4,7-9,14.	1-12
A	RODLAND KD. The role of the calcium-sensing receptor in cancer. Cell Calcium. 2004. Vol. 35, páginas 291-295, todo el documento.	1-12
A	MANNING AT. Roles for the calcium sensing receptor in primary and metastatic cancer. The Journal of Cancer Surgery. 2006. Vol. 32, páginas 693-697, todo el documento.	1-12

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
31.05.2011

Examinador
M. García Grávalos

Página
1/5

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

C12Q

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

INVENES, EPODOC, WPI, EBI, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, USPTO PATENT DATABASE, GOOGLE ACADEMICO.

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.05.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-12	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	DE TORRES, C. et al. Cancer. Junio 2009. Vol. 115, páginas 2792-2803.	15.06.2009
D02	ESTELLER M. Oncogene. 2002. Vol. 21, páginas 5427-5440.	2002
D03	CHUNG W. et al. Public Library of Science Journal. Abril 2008. Vol. 3(4), páginas 1-10.	2008
D04	US 6596493 B1	22.07.2003
D05	RODLAND KD. Cell Calcium. 2004. Vol. 35, páginas 291-295.	2004
D06	MANNING AT. The Journal of Cancer Surgery. 2006. Vol. 32, páginas 693-697.	2006

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención divulga un método *in vitro* de pronóstico de tumores pediátricos, o del desarrollo, basado en la determinación del estado de metilación del promotor 2 del gen receptor sensor del calcio, por PCR específica de bisulfito, de metilación y/o análisis combinado bisulfito restricción, donde una hipermetilación de dicho promotor del gen CaR indica un mal pronóstico (reivindicaciones 1-5). Se refiere también a un kit de pronóstico que incluye pares de cebadores útiles para llevar a cabo los dos tipos de PCR y opcionalmente la sonda marcada BAC RP11-70M2 (reivindicaciones 6-9), así como un método de confirmación de mal pronóstico determinando, además de la hipermetilación del promotor 2 del gen CaR, la pérdida de una copia del gen CaR del cromosoma 3 en el genoma del tumor (reivindicaciones 10-12).

El documento D01 divulga una vía molecular relacionada con la diferenciación de tumores neuroblásticos en la que intervienen el gen receptor sensor del calcio CaR y el factor paracrino PTHrP. La expresión del gen CaR, en tumores con algún grado de diferenciación, se asocia a factores de buen pronóstico en tumores neuroblásticos diagnosticados en edad pediátrica (ver todo el documento).

El documento D02 se refiere a la hipermetilación de las islas CpG localizadas en promotores de genes supresores de tumores como importante mecanismo de inactivación de genes, indicando que el desarrollo de perfiles de hipermetilación, para cada forma de tumor humano, puede constituir una valiosa base de datos, basada en el conocimiento de la metilación del ADN, para monitorización y tratamiento de pacientes con cáncer (ver todo el documento).

El documento D03 se refiere a la identificación de nuevos marcadores de tumores de próstata, colon y mama, mediante un método basado en la localización de las islas CpG en diferentes líneas celulares tumorales y la determinación de su perfil de metilación (ver todo el documento).

El documento D04 divulga un método de detección y/o pronóstico de cáncer asociado a genes supresores de cáncer de pulmón, basándose en el perfil de metilación del promotor de dicho gen, donde un incremento de la metilación, respecto a una célula normal, indica un proceso de cáncer de pulmón, hígado o páncreas (ver columna 1, línea 60 – columna 2, línea 7; columna 4, líneas 33-58; reivindicaciones 4, 7-9, 14).

El documento D05 divulga la función del gen receptor sensor del calcio en procesos de cáncer, refiriéndose a la expresión de CaR en diferentes tipos de neoplasias, siendo esta distinta según el contexto celular en el que se encuentra. En algunos tipos de células, principalmente epiteliales, cambios en los iones del calcio extracelular puede cambiar el comportamiento de la célula y hacer que pase de proliferación a diferenciación o quiescencia (ver todo el documento).

El documento D06 divulga la función del gen receptor sensor del calcio en tumores primarios (paratiroides, mama y colorectal), así como en metástasis óseas provenientes de un cáncer de mama (ver todo el documento).

1. NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986)

La presente invención divulga un método in vitro de pronóstico de tumores pediátricos, o del desarrollo, basado en la determinación del estado de metilación del promotor 2 del gen receptor sensor del calcio, donde una hipermetilación de dicho promotor del gen CaR indica un mal pronóstico. Se refiere también a un kit de pronóstico y a un método de confirmación de mal pronóstico, determinando también la pérdida de una copia del gen CaR del cromosoma 3 en el genoma del tumor.

1.1. REIVINDICACIONES 1-12

El documento D01 se considera el más cercano al estado de la técnica ya que anticipa la expresión del gen CaR, como un factor de buen pronóstico, en tumores neuroblásticos diagnosticados en edad pediátrica. Sin embargo, D01 no hace ninguna referencia a la determinación del estado de metilación del promotor 2 de este gen, ni a un kit de pronóstico, ni a un método de confirmación de mal pronóstico, debido a la pérdida de una copia del gen CaR del cromosoma 3 en el genoma del tumor.

Por otra parte, los documentos D02-D04 anticipan la hipermetilación de las islas CpG, localizadas en promotores de genes supresores de tumores, como importante mecanismo de inactivación de genes, así como el uso de perfiles de metilación de estas islas CpG para detección de distintos tipos de cáncer.

Aunque la expresión del gen CaR en tumores neuroblásticos es conocida en el estado de la técnica, así como el uso de perfiles de metilación de las islas CpG, localizadas en promotores de genes supresores de tumores, para detección de distintos tipos de cáncer; sin embargo, se considera que el método de la presente invención difiere de lo anticipado en los documentos citados, en el uso específico del estado de metilación del promotor 2 del gen receptor sensor del calcio en un método de pronóstico de tumores pediátricos, por lo que se considera que dicho método aporta una solución de un problema técnico que no resultaría evidente para un experto en la materia.

En consecuencia, según lo divulgado en los documentos D01-D04, las reivindicaciones 1-12 cumplen el requisito de novedad y actividad inventiva (Art. 6.1 y Art. 8.1 LP 11/1986).

Los documentos D05 y D06 se refieren al estado de la técnica y no se consideran relevantes en relación con el objeto de la invención.