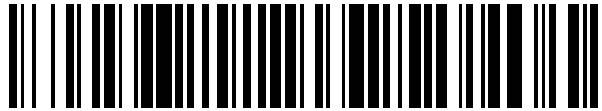


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 453 374**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/50** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12N 15/11** (2006.01)

**G01N 33/574** (2006.01)

**C12N 15/113** (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2007 E 07823920 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2014 EP 2082225**

54 Título: **Método para determinar si una célula tumoral presenta potencial invasivo y/o metastásico, y agentes moduladores de la transformación maligna**

30 Prioridad:

**20.09.2006 GB 0618486**

**20.12.2006 GB 0625379**

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

**07.04.2014**

73 Titular/es:

**THE QUEEN'S UNIVERSITY OF BELFAST**

**(100.0%)**

**University Road**

**Belfast BT7 1NN , GB**

72 Inventor/es:

**EL-TANANI, MOHAMED K. y**

**JOHNSTON, PATRICK GERARD**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 453 374 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

Método para determinar si una célula tumoral presenta potencial invasivo y/o metastásico, y agentes moduladores de la transformación maligna

### Campo de la invención

- 5 Un ensayo para identificar un agente modulador de la transformación maligna de células mediada por OPN y/o la vía de señalización de OPN.

### Antecedentes de la invención

La metástasis es la causa principal del fallo del tratamiento en diversos tipos de cáncer y, particularmente, en pacientes con cáncer de mama. La glicofosfoproteína osteopontina (OPN) de la matriz extracelular es normalmente secretada por osteoblastos y es utilizada como una molécula de adhesión extracelular. La osteopontina ha sido también asociada con ciertos aspectos de la transformación maligna (1) al potenciar la fijación y migración de células malignas y contribuir al crecimiento de células tumorales independiente del anclaje (2, 3). Se ha determinado que la transfección de células mamarias benignas y no metastásicas de rata con cDNA para OPN dota a los transfectantes de la capacidad para sobreproducir OPN *in vitro* y producir metástasis *in vivo* (4). Se ha asociado la sobreexpresión de OPN con un mal pronóstico en el cáncer primario humano de mama (5, 6) y se ha mostrado que la OPN es el factor individual de pronóstico más potente en un análisis multivariante frente a los resultados, en un futuro gran estudio sobre pacientes con cáncer de mama (7). Aunque se sabe que los niveles plasmáticos de OPN en circulación son mayores en los pacientes con cáncer metastásico de mama (8), sigue sin estar claro el mecanismo molecular exacto de la metástasis regulada por OPN.

### Sumario de la invención

La RAN GTPasa (RAN) es una pequeña proteína ligante de GTP (guanosina trifosfato) de la superfamilia RAS. Se ha determinado que RAN es esencial para la translocación de RNA y proteínas a través del complejo del poro nuclear. Se ha comunicado que una asociación directa entre RAN y oncoproteínas víricas, tales como E1A de adenovirus humano, E7 de papilomavirus humano y antígeno T grande de SV40, está estrechamente asociada con la transformación celular y la inestabilidad genómica inducidas por una infección vírica (27), y se ha determinado que la RAN GTPasa está muy expresada en la mayor parte de las examinadas líneas celulares de adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas procedentes de diversos órganos, incluyendo el estómago, los pulmones, la cabeza y el cuello, el páncreas y el colon, y también en células tumorales metastásicas (29), pero no en las células normales de esos tejidos tumorales (28). Se ha determinado también que la RAN regula la síntesis de DNA y la progresión del ciclo celular del huso (26).

Aunque se ha determinado que la RAN está asociada con un crecimiento celular incontrolado, la determinación del crecimiento celular no da una medida del proceso de metástasis, que es un proceso en gran medida independiente.

Al analizar la expresión génica entre la línea Rama 37 (R37) de células mamarias benignas de rata y las células R37 establemente transfectadas con un vector de expresión para OPN, denominadas células R37-OPN, en donde las células primeras producen bajos niveles de OPN y son no invasivas y no metastásicas (9) mientras que las células segundas producen niveles elevados de OPN y son invasivas, los inventores han determinado que la RAN desempeña un papel adicional en la invasión y la metástasis y que la RAN y la Proteína 1 Ligante de RAN (RANBP1; del inglés RAN Binding Protein 1) presentan una expresión sustancialmente aumentada en asociación con la OPN.

40 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un método para determinar si una célula tumoral presenta potencial invasivo/metastásico, que comprende las operaciones:

determinar el nivel de un marcador en una célula tumoral de una muestra, en donde el marcador es al menos un miembro seleccionado del grupo que comprende RAN, la Proteína 1 Ligante de RAN, un fragmento activo de un polipéptido de RAN, un fragmento activo de un polipéptido de la Proteína 1 Ligante de RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica la Proteína 1 Ligante de RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento activo de RAN y una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento activo de la Proteína 1 Ligante de RAN, y

comparar el nivel del marcador detectado en dicha célula tumoral con el nivel determinado para el marcador en una célula tumoral no invasiva y/o no metastásica,

50 en donde un aumento del nivel del marcador en la célula tumoral de la muestra es indicativo de que la célula tumoral presenta potencial invasivo y/o metastásico.

Adecuadamente, la muestra puede ser un tejido o células de un sujeto. En realizaciones, se puede aislar la muestra del sujeto, se puede aislar la célula tumoral de la muestra y/o se puede aislar el contenido de la célula, por ejemplo, mRNA o proteínas, antes de que se determine el nivel del marcador. En realizaciones, el nivel del marcador en una

célula tumoral invasiva y/o metastásica es al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 6 veces, al menos 7 veces, al menos 8 veces, al menos 9 veces, el nivel del marcador en una célula no invasiva y/o metastásica.

Por potencial invasivo y/o metastásico se quiere significar que la célula tumoral es invasiva y/o metastásica o está progresando hacia ser invasiva y/o metastásica.

- 5 Como se apreciará, este método puede ser empleado para determinar si un sujeto está aquejado de un tumor invasivo/metastásico.

También se describe un método para evaluar si un sujeto está aquejado de un tumor invasivo/metastásico, que comprende las operaciones:

- 10 determinar el nivel de un marcador en una célula tumoral de una muestra de un sujeto, en donde el marcador es al menos un miembro seleccionado del grupo que comprende RAN, la Proteína 1 Ligante de RAN y un derivado de las mismas, y

comparar el nivel del marcador detectado en dicha célula tumoral con el nivel determinado para el marcador en una célula tumoral no invasiva y/o no metastásica,

- 15 en donde un aumento del nivel del marcador en la célula tumoral de la muestra es indicativo de que el sujeto está aquejado de un tumor que presenta potencial invasivo/metastásico.

Además de permitir la medición del potencial invasivo y/o metastásico de una célula tumoral en un único punto temporal, se proporciona la medición del potencial invasivo y/o metastásico de una(s) célula(s) tumoral(es) en múltiples puntos temporales.

- 20 En consecuencia, un segundo aspecto de la presente invención proporciona un método *in vitro* para controlar una célula tumoral con objeto de determinar el potencial invasivo y/o metastásico de dicha célula tumoral, método que comprende las operaciones de:

- 25 a) detectar el nivel de un marcador en la célula tumoral en un primer punto temporal, en donde el marcador es al menos un miembro seleccionado del grupo que comprende RAN, la Proteína 1 Ligante de RAN, un fragmento activo de un polipéptido de RAN, un fragmento activo de un polipéptido de la Proteína 1 Ligante de RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica la Proteína 1 Ligante de RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento activo de RAN y una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento activo de la Proteína 1 Ligante de RAN,

b) repetir la operación a) en un punto temporal posterior, y

- 30 c) comparar los niveles del marcador en las operaciones a) y b), en donde un aumento del nivel del marcador desde un primer punto temporal hasta un posterior punto temporal es indicativo de que la célula tumoral está adquiriendo potencial invasivo y/o metastásico.

- 35 En el periodo entre el primer punto temporal y un punto temporal posterior, se puede aplicar un agente de ensayo a la célula tumoral para determinar si el nivel del marcador se ve afectado por dicho agente de ensayo. En realizaciones particulares, la célula tumoral puede ser sometida a una condición particular, tal como, por ejemplo, radiación, cirugía o similar, en el periodo entre la detección del nivel del marcador en el primer punto temporal y la detección en un punto temporal posterior.

También se describe un método para controlar la progresión de un cáncer en un sujeto, que comprende las operaciones de:

- 40 a) detectar, en un primer punto temporal, el nivel de un marcador en una muestra de un tumor de un sujeto, en donde el marcador es al menos un miembro seleccionado del grupo que comprende RAN, la Proteína 1 Ligante de RAN, un fragmento activo de un polipéptido de RAN, un fragmento activo de un polipéptido de la Proteína 1 Ligante de RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica la Proteína 1 Ligante de RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento activo de RAN y una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento activo de la Proteína 1 Ligante de RAN,

- 45 b) repetir la operación a) en un punto temporal posterior, y

c) comparar los niveles del marcador en las operaciones a) y b), en donde un aumento del nivel del marcador desde un primer punto temporal hasta un posterior punto temporal es indicativo de que la célula tumoral está adquiriendo potencial invasivo y/o metastásico y, por lo tanto, el cáncer está progresando en el sujeto.

- 50 Se puede proporcionar al sujeto una terapia, tal como, por ejemplo, un tratamiento farmacológico, una intervención quirúrgica o similar, entre el primer punto temporal y el punto temporal posterior, y el método proporcionará una indicación en cuanto a si la terapia está ejerciendo un efecto beneficioso sobre el sujeto (si el cáncer está adquiriendo potencial invasivo y/o metastásico). En aquellas circunstancias en que la terapia es un agente o

composición de ensayo, se apreciará que la invención proporciona un método mediante el cual se puede evaluar la capacidad de diferentes agentes de ensayo para afectar a la invasión y/o la metástasis.

- 5 En consecuencia, un tercer aspecto de la presente invención proporciona un método para seleccionar un agente para inhibir la invasión y/o la metástasis por una célula tumoral en una muestra, método que comprende las operaciones:
- obtener de la muestra al menos unas partes alícuotas primera y segunda, en donde cada parte alícuota comprende al menos una célula tumoral;
- exponer una primera parte alícuota de la muestra a un primer agente de ensayo;
- exponer una segunda parte alícuota de la muestra a un segundo agente de ensayo;
- 10 opcionalmente, exponer otra parte alícuota de la muestra a otro respectivo agente de ensayo;
- determinar el nivel de un marcador de una célula tumoral de cada parte alícuota, en donde el marcador es al menos un miembro seleccionado del grupo que comprende RAN, la Proteína 1 Ligante de RAN, un fragmento activo de un polipéptido de RAN, un fragmento activo de un polipéptido de la Proteína 1 Ligante de RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica la Proteína 1 Ligante de RAN, una
- 15 secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento activo de RAN y una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento activo de la Proteína 1 Ligante de RAN,
- comparar los niveles del marcador detectados en cada una de las partes alícuotas, y
- seleccionar el agente que proporciona un nivel más bajo de marcador en una parte alícuota con ese agente con respecto a los demás agentes.
- 20 Si quedara una porción de un tumor en el cuerpo de un sujeto, la selección del agente que proporciona un nivel más bajo de marcador en una parte alícuota con ese agente con respecto a los demás agentes podría ser utilizada para proporcionar un medicamento al sujeto.
- También se describe un método para inhibir la invasión o la metástasis de un tumor en un sujeto, método que comprende las operaciones:
- 25 obtener una muestra de un tumor de un sujeto;
- obtener de la muestra al menos unas partes alícuotas primera y segunda, en donde cada parte alícuota comprende al menos una célula tumoral;
- exponer una primera parte alícuota de la muestra a un primer agente de ensayo;
- exponer una segunda parte alícuota de la muestra a un segundo agente de ensayo;
- 30 opcionalmente, exponer otra parte alícuota de la muestra a otro respectivo agente de ensayo;
- determinar el nivel de un marcador de una célula tumoral de cada parte alícuota, en donde el marcador es al menos un miembro seleccionado del grupo que comprende RAN, la Proteína 1 Ligante de RAN y un derivado de las mismas,
- comparar los niveles del marcador detectados en cada una de las partes alícuotas,
- 35 seleccionar el agente que proporciona un nivel más bajo de marcador en una parte alícuota con ese agente con respecto a los demás agentes, y
- administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un agente que proporciona un nivel más bajo de marcador en una parte alícuota con ese agente con respecto a los demás agentes.
- 40 Los presentes inventores han determinado agentes que reducen el nivel de proteína RAN y/o Proteína 1 Ligante de RAN presentes en un tumor y que, por lo tanto, disminuirían el potencial invasivo y/o metastásico de una célula tumoral.
- Adecuadamente, dicho agente puede ser un anticuerpo con especificidad de unión hacia RAN (ID. SEC. nº 1) o la Proteína 1 Ligante de RAN (ID. SEC. nº 3) o un derivado de las mismas.
- 45 De acuerdo con un cuarto aspecto de la invención, se proporciona un ácido nucleico que es capaz de unirse bajo condiciones rigurosas a un polinucleótido que codifica RAN (ID. SEC. nº 1) o la Proteína 1 Ligante de RAN (ID. SEC. nº 3) o a un fragmento de dicho polinucleótido que codifica un fragmento activo de RAN o codifica un fragmento activo de la Proteína 1 Ligante de RAN, para uso en el tratamiento de un cáncer metastásico y/o invasivo.

Adecuadamente, la expresión o la actividad de RAN, la Proteína 1 Ligante de RAN o los derivados de las mismas son bloqueadas.

En realizaciones particulares, el método se emplea para tratar tumores o sujetos con tumores que son invasivos y/o son metastásicos. En realizaciones particulares, los tumores pueden ser células cancerosas del estómago, los pulmones, la cabeza y el cuello, el páncreas y el colon, la vejiga o la mama. En realizaciones particulares, los tumores pueden ser células cancerosas del colon, la vejiga o la mama. En realizaciones específicas, las células cancerosas pueden ser de tejido de mama.

También se describe una molécula de ácido nucleico que puede unirse por enlaces de hidrógeno e hibridarse con una secuencia poli nucleotídica que codifica RAN (ID. SEC. nº 1) o la Proteína 1 Ligante de RAN (ID. SEC. nº 3). Un ácido nucleico antisentido puede ser complementario de la cadena de codificación completa, de una porción de la misma, por ejemplo, toda, o parte de, la región de codificación de proteína, o de toda, o parte de, una región no codificadora (secuencias 5' y 3' que flanquean la región de codificación y no son traducidas a aminoácidos) de la cadena de codificación. Un ácido nucleico antisentido puede tener una longitud de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 o más nucleótidos. Un ácido nucleico antisentido puede ser sintéticamente sintetizado y puede incluir nucleótidos modificados para potenciar la estabilidad de la molécula antisentido o del dúplex formado por la molécula antisentido y la secuencia nucleotídica a la que se une.

También se describe un método que comprende proporcionar a un sujeto un polinucleótido o ácido nucleico antisentido utilizando un vector que expresa el ácido nucleico antisentido en células tumorales. La administración de ácido nucleico antisentido puede ser, por ejemplo, mediante inyección directa en el tumor, por medio de infusión sistémica de la molécula antisentido en el organismo, o mediante suministro a un sitio diana usando un vector. Como será apreciado por quienes tienen experiencia en la técnica, se pueden emplear diversos medios de direccionamiento, tales como, por ejemplo, productos de conjugación de péptido y/o anticuerpo y/o sistemas de expresión, para dirigir una secuencia polinucleotídica genética.

La invención también abarca ribozimas con especificidad hacia secuencias polinucleotídicas que codifican RAN o la Proteína 1 Ligante de RAN, ácidos nucleicos que forman estructuras helicoidales triples con secuencias polinucleotídicas que codifican RAN o la Proteína 1 Ligante de RAN, o dsRNAs que se pueden unir a secuencias polinucleotídicas que codifican RAN o la Proteína 1 Ligante de RAN.

En realizaciones particulares, las secuencias de ácido nucleico pueden ser seleccionadas de entre la ID. SEC. nº 5, la ID. SEC. nº 6, la ID. SEC. nº 7, la ID. SEC. nº 8, la ID. SEC. nº 9 y la ID. SEC. nº 10.

Además de determinar agentes que causan una disminución en los niveles de un marcador, la presente invención también proporciona un método para determinar agentes (compuestos de ensayo) que aumentan el nivel de RAN y/o la Proteína 1 Ligante de RAN o afectan a la actividad de RAN y/o la Proteína 1 Ligante de RAN.

De acuerdo con un quinto aspecto de la presente invención, se proporciona un método para identificar un agente modulador de la transformación maligna de células mediada por OPN, método que comprende las operaciones de:

- proporcionar un ensayo que comprende al menos un miembro seleccionado del grupo que comprende RAN, la Proteína 1 Ligante de RAN, un fragmento activo de un polipéptido de RAN, un fragmento activo de un polipéptido de la Proteína 1 Ligante de RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica la Proteína 1 Ligante de RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento activo de RAN y una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento activo de la Proteína 1 Ligante de RAN, poner un candidato a agente modulador en contacto con dicho ensayo bajo unas condiciones adecuadas; y
- detectar una variación en la actividad del ensayo al comparar la actividad del ensayo sin dicho candidato con la actividad del ensayo en presencia de dicho candidato.

Adecuadamente, un agente modulador candidato puede incluir, pero no se limita a, un anticuerpo, un péptido, una hormona, un ácido nucleico, un oligonucleótido, compuestos naturales o sintéticos y moléculas pequeñas.

Preferiblemente, la operación de puesta en contacto va seguida de una operación de incubación en la que la mezcla obtenida en la operación de puesta en contacto es incubada durante un período de tiempo y bajo unas condiciones adecuadas para permitir la interacción entre los componentes y/o la sustancia de ensayo.

En realizaciones de la invención, al menos un miembro seleccionado del grupo que comprende RAN, la Proteína 1 Ligante de RAN, un fragmento activo de un polipéptido de RAN, un fragmento activo de un polipéptido de la Proteína 1 Ligante de RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica la Proteína 1 Ligante de RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento activo de RAN y una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento activo de la Proteína 1 Ligante de RAN, puede ser inmovilizado, por ejemplo, al ser unido a una superficie sólida de un kit. En una realización específica, el método para identificar un agente modulador de la transformación maligna de células mediada por OPN puede ser llevado a cabo manteniendo Rama 37 y sus subclones y células MDA-MB-231 y MDA-MB 435S de cáncer de mama, que se pueden obtener de la American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, EE.UU.), en

una atmósfera humidificada de aire al 95% [volumen/volumen (v/v)] y CO<sub>2</sub> al 5% (v/v) a 37 °C en un medio rutinario (RM; del inglés, routine medium) [medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; del inglés, Dulbecco's Modified Eagle's Medium)] (Sigma, Poole, Reino Unido) que contiene suero de ternera fetal (FCS; del inglés, foetal calf serum) al 10% (v/v), 100 µg/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (Gibco BRL, Paisley, Reino Unido). Antes del tratamiento con un agente modulador candidato, las células pueden ser cultivadas durante la noche en medios rutinarios. Al día siguiente se puede añadir el agente modulador candidato en un intervalo de diferentes concentraciones en medios rutinarios, a menos que se especifique otra cosa. Las células son típicamente tratadas durante 48 horas antes de examinarlas usando, por ejemplo, pero sin limitarse a, transferencia Western para proteínas RAN, RANBP1 y/o OPN, ensayos de crecimiento celular, ensayos de adhesión celular, ensayos en agar blando, o ensayos de invasión en Matrigel como los descritos en esta memoria.

En realizaciones particulares del método, los ensayos de crecimiento celular se pueden llevar a cabo sembrando 1 x 10<sup>5</sup> células en un pocillo de una placa de seis pocillos. En los puntos temporales de 3, 6, 12, 24, 48, 72 y 96 horas, se pueden separar las células mediante tratamiento con tripsina y se pueden contar usando un hemocitómetro. Los ensayos se llevan típicamente a cabo por triplicado para permitir un análisis estadístico.

La operación de puesta en contacto (finalmente de incubación) puede ir ventajosamente seguida de una operación de separación con la que todo candidato no asociado es separado de la mezcla.

La detección de la variación de la actividad puede ser llevada a cabo mediante cualquier medio conveniente. Generalmente, la detección puede ser por medio de un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, cuya presencia se establece en un típico ensayo de estilo ELISA mediante exposición a un segundo anticuerpo monoclonal etiquetado. Alternativamente, el candidato puede ser etiquetado (por ejemplo, radiactiva, fluorescente o enzimáticamente) para determinar su unión al otro componente.

El ensayo anteriormente descrito puede ser también empleado para estudiar aspectos biológicos celulares de la ruta de transducción de señales de la osteopontina, lo que permitiría progresar en el conocimiento de la invasión tisular del cáncer y, más particularmente, de tejidos epiteliales tales como el cáncer de mama, y podría proporcionar nuevas posibles dianas para fármacos.

Se prefiere que el ensayo sea un ensayo celular que pueda comprender células cultivadas de una línea de células transformantes. Dicha línea celular puede ser el resultado de la transfección de una línea celular con un vector de expresión que comprende la secuencia, o una porción sustancial de la secuencia, de un polinucleótido de RAN y/o un polinucleótido de RANBP1. En realizaciones particulares, la línea de células transformantes puede sobreexpresar el polipéptido de RAN y/o el polipéptido de RANBP1 correspondientes. La línea de células transformantes puede ser adicionalmente transfectada mediante un vector de expresión que comprenda la secuencia de una porción sustancial de la secuencia de nucleótidos de OPN. Preferiblemente, las secuencias de nucleótidos de RAN, RANBP1 y opcionalmente la OPN son secuencias humanas.

Alternativamente, las células pueden proceder de una muestra de un tumor.

Adecuadamente, los agentes determinados por la invención, por ejemplo, los agentes moduladores determinados mediante el ensayo anterior, pueden ser útiles en usos terapéuticos o diagnósticos. Se entiende que la cantidad de un agente determinado mediante los métodos de la presente invención, proporcionada a un sujeto, dependerá de diversos factores presentes en el conocimiento de un médico, veterinario o investigador experto. La dosis de dicho agente variará, por ejemplo, dependiendo de la identidad, el tamaño y el estado del sujeto que se trata y la vía de administración. Adecuadamente, se puede administrar un agente a un sujeto en una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas pueden ser formuladas de modo que sean compatibles con su prevista vía de administración, por ejemplo, la administración intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, transdérmica, transmucosa o rectal.

De acuerdo con un sexto aspecto de la presente invención, se proporciona un método para evaluar el potencial de un agente de ensayo para causar invasión y/o metástasis por una célula tumoral, que comprende:

obtener de la muestra al menos unas partes alícuotas primera y segunda, en donde cada parte alícuota comprende al menos una célula tumoral;

exponer una primera parte alícuota de la muestra a un primer agente de ensayo;

determinar el nivel de un marcador de una célula tumoral de cada parte alícuota, en donde el marcador es al menos un miembro seleccionado del grupo que comprende RAN, la Proteína 1 Ligante de RAN, un fragmento activo de un polipéptido de RAN, un fragmento activo de un polipéptido de la Proteína 1 Ligante de RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica la Proteína 1 Ligante de RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento activo de RAN y una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento activo de la Proteína 1 Ligante de RAN, y

comparar los niveles del marcador detectados en cada una de las partes alícuotas,

en donde un nivel significativamente aumentado del marcador en la parte alícuota expuesta al agente de ensayo, con respecto a la parte alícuota no expuesta al agente de ensayo, es indicativo de que el agente de ensayo presenta potencial invasivo y/o metastásico.

5 Puede resultar ventajoso proporcionar/administrar dicho agente de ensayo a un sujeto. También se describe la administración de dicho agente a un sujeto.

La presente invención se refiere además a kits.

10 De acuerdo con un séptimo aspecto de la presente invención, se proporciona un kit para evaluar si una célula tumoral es invasiva y/o metastásica, kit que comprende un reactivo para evaluar el nivel de un marcador en una célula tumoral, en donde el marcador es al menos un miembro seleccionado del grupo que comprende RAN, la Proteína 1 Ligante de RAN y un derivado de las mismas.

15 En una realización de un kit, el reactivo puede ser un anticuerpo con especificidad de unión hacia RAN, la Proteína 1 Ligante de RAN o un derivado de las mismas. Adecuadamente, el reactivo puede ser empleado para la detección histológica in situ de RAN, la Proteína 1 Ligante de RAN o un derivado de las mismas. Como se apreciará, la detección in situ puede comprender aplicar el reactivo a una muestra extraída de un sujeto y utilizar luego un segundo anticuerpo etiquetado para visualizar la unión del reactivo. Dicho procedimiento permite la determinación de la presencia de RAN, la Proteína 1 Ligante de RAN o un derivado de las mismas y también la distribución en la muestra.

Alternativamente, en otras realizaciones, se pueden utilizar sondas de ácido nucleico etiquetadas para detectar mRNA de RAN o de la Proteína 1 Ligante de RAN.

20 También se describe un kit para evaluar un agente para inhibir la invasión y/o metástasis por una célula tumoral, kit que comprende:

a) una pluralidad de compuestos de ensayo, y

b) un reactivo para evaluar el nivel de un marcador en una célula tumoral, en donde el marcador es al menos un miembro seleccionado del grupo que comprende RAN, la Proteína 1 Ligante de RAN y un derivado de las mismas.

25 Adecuadamente, un kit puede comprender un indicador visual del reactivo, tal como, por ejemplo, un anticuerpo etiquetado capaz de unirse al reactivo o al complejo del reactivo y un marcador.

30 Un kit puede comprender opcionalmente líquidos, por ejemplo, tampones adecuados para detectar el nivel de marcador en una muestra, tales como, por ejemplo, tampones que proporcionan la hibridación rigurosa de un nucleótido de referencia con una secuencia de nucleótidos de un marcador, tampones que proporcionan la unión de un anticuerpo específico para una proteína marcadora, y similares. Opcionalmente, un kit puede comprender material instructivo que describa el modo en que se debe llevar a cabo un método de la invención, y/o un(os) compartimento(s) para muestras.

35 El nivel de expresión de un marcador de la invención, en donde el marcador es al menos un miembro seleccionado del grupo que comprende RAN, la Proteína 1 Ligante de RAN y un derivado de las mismas, puede ser determinado detectando la presencia de

40 a) la proteína marcadora que tiene la secuencia de aminoácidos ID. SEC. n° 1 o la proteína marcadora que tiene la secuencia de aminoácidos ID. SEC. n° 3 o un fragmento de dichas secuencias, utilizando un reactivo con especificidad de unión hacia al menos una de dichas secuencias de aminoácidos o fragmentos de las mismas; por ejemplo, dichos reactivos pueden incluir un anticuerpo, un derivado de anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo de cadena única;

b) los transcritos nucleotídicos que codifican una de las secuencias de aminoácidos ID. SEC. n° 1 e ID. SEC. n° 3, tal como la ID. SEC. n° 2 o la ID. SEC. n° 4 o un fragmento de las mismas, o

c) un metabolito u otro péptido que sea directa o indirectamente producido por una de las proteínas marcadoras.

45 Aunque sin pretender ninguna vinculación a la teoría, los inventores han determinado desde un punto de vista del mecanismo que RAN aumenta el receptor Met y la fosforilación de Akt (Figura 5) y que el inhibidor LY294002 de la fosfoinositol 3 cinasa (PI3K; del inglés, phosphoinositol 3 kinase) o la mutación de RAN en la cavidad ligante de GTP bloquean la invasión de células R37 mediada por RAN en aproximadamente un 70% y un 82%, respectivamente (Figura 5A). LY294002 en las concentraciones empleadas es específico para la inhibición de PI3K. Los inventores también consideran que receptores de la superficie celular ligados a PI3K pueden mediar en dichos efectos, siendo 50 c-Met uno de tales receptores.

Mediante el término "indicativo", puede haber una probabilidad de al menos un 10%, más preferiblemente un 20%, más preferiblemente un 30%, más preferiblemente un 50%, y lo más preferiblemente un 90%, de que la célula

tumoral sea invasiva y/o metastásica.

5 Un nivel aumentado del marcador en la célula tumoral de la muestra puede ser al menos dos veces, al menos tres veces, al menos cinco veces, al menos siete veces, al menos diez veces, al menos cien veces o al menos quinientas veces, mayor que el nivel de marcador presente en una célula tumoral no invasiva y/o metastásica. El nivel de marcador presente en un tumor no invasivo y/o no metastásico puede ser determinado evaluando el nivel de marcador en una muestra procedente de muestras objetivo archivadas o similares.

En realizaciones, el nivel de marcador puede ser comparado con una cantidad o concentración absoluta del marcador en una muestra de referencia patrón.

10 En una realización del método, el nivel del marcador se determina detectando un polinucleótido transcrito, o una porción del mismo, que codifica RAN o la Proteína 1 Ligante de RAN.

15 En realizaciones del método, el polinucleótido transcrito es mRNA. En otras realizaciones, el polinucleótido transcrito es cDNA. Adecuadamente, el polinucleótido transcrito puede ser multiplicado, por ejemplo, usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; del inglés, *polymerase chain reaction*) o RT-PCR. En realizaciones particulares de la invención, el nivel de un marcador se determina detectando la unión de una secuencia nucleotídica de referencia que se puede unir a un polinucleótido transcrito o a una porción del mismo bajo condiciones de hibridación rigurosas.

20 El polinucleótido de referencia puede ser unido a un sustrato sólido o ser etiquetado con, por ejemplo, un cromóforo, un fluoróforo, una enzima o un cofactor enzimático, para permitir la detección de la hibridación. Opcionalmente, se puede utilizar la reacción en cadena de la polimerasa para multiplicar el cDNA antes de la hibridación con un polinucleótido de referencia. En realizaciones alternativas, se puede utilizar la PCR u otras técnicas, por ejemplo, polimorfismos de un solo nucleótido, para medir el nivel de marcador presente.

25 En realizaciones alternativas, el nivel del marcador se determina detectando la presencia de proteína RAN o Proteína 1 Ligante de RAN o un fragmento de las mismas. Adecuadamente, la presencia de proteína se detecta usando un reactivo que se une específicamente a la proteína. En realizaciones de la invención, el reactivo es seleccionado de entre un anticuerpo, un derivado de anticuerpo y un fragmento de anticuerpo. En realizaciones particulares, un anticuerpo utilizado para medir el nivel de marcador puede estar etiquetado con, por ejemplo, una etiqueta radiactiva, una etiqueta fluorófora o una etiqueta enzimática, un derivado de anticuerpo puede estar conjugado con un sustrato o un ligando, y un fragmento de anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo de cadena única o un dominio hipervariable aislado de un anticuerpo.

30 En realizaciones, la célula tumoral puede proceder de diversos órganos y tejidos, incluyendo el estómago, los pulmones, la cabeza y el cuello, el páncreas y el colon y también la vejiga y la mama. En realizaciones particulares, la célula tumoral procede de la mama.

Las características y realizaciones preferidas de cada aspecto de la invención son para cada uno de los demás aspectos *mutatis mutandis*, a menos que el contexto exija otra cosa.

35 Se describirán ahora realizaciones de la presente invención, sólo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos, en los que:

40 Figura 1A – Unas transferencias Northern (parte superior) e inmune (parte inferior) que muestran niveles de proteína y mRNA de OPN en células R37, R37-pBK-CMV y R37-OPN. Se diluyeron lisados celulares y se cargaron 20 µg en un gel de poliacrilamida al 10% (peso/peso)-SDS del modo siguiente: carril 1: R37; carril 2: R37-pBK-CMV; carril 3: R37-OPN, y se detectaron proteínas específicas usando anticuerpos hacia OPN y β-actina. Las bandas fueron cuantificadas usando un análisis densitométrico y fueron normalizadas frente a β-actina. El factor medio de aumento para tres experimentos diferentes es: carril 1 = 1, carril 2 = 1 ± 0,2, y carril 3 = 10 ± 1,7.

Figura 1B – Se evaluó durante un periodo de 30 minutos la capacidad de líneas celulares transfectadas para adherirse a una superficie tratada con laminina y se cuantificó el número de células adherentes. Se muestran los resultados de la media ± error estándar de tres experimentos independientes.

45 Figura 1C – Se llevó a cabo un ensayo en agar blando para evaluar la capacidad de líneas celulares transfectadas estables para crecer en un entorno independiente del anclaje. Se evaluó el número de colonias después de 5 días. El vector pBK-CMV vacío no ejerció efecto alguno sobre el crecimiento celular independiente del anclaje. Se muestran los resultados de la media ± error estándar de tres experimentos independientes.

50 Figura 1D – Se sembraron células R37 y R37-OPN sobre filtros revestidos con ECM (500 µg/ml) en cámaras Boyden. Se determinó el número de células que migraron a través del filtro después de 48 horas mediante tinción y mediante un escaneo usando un sistema digital para obtención de imágenes (Procedimientos Experimentales). Se muestran los resultados de la media ± error estándar de tres experimentos independientes.

Figura 2A – Unas transferencias Northern (parte superior) e inmune (parte inferior) para proteína RAN en células R37 y R37-OPN y células establemente transfectadas con un vector de expresión para RAN. Expresión de niveles



de mRNA de OPN y RAN en el carril 1: R37, el carril 2: R37-RAN, el carril 3: R37-OPN, y el carril 4: R37-OPN-RAN. Como testigo se evaluó mRNA de  $\beta$ -actina. Las bandas de hibridación principales se muestran en kilobases (kb) (parte superior). El factor medio de aumento para tres experimentos diferentes para OPN es: carril 1 = 1, carril 2 =  $1,2 \pm 0,3$ , carril 3 =  $7,5 \pm 1,5$ , y carril 4 =  $8 \pm 1,1$ , y para RAN es: carril 1 = 1, carril 2 =  $6,5 \pm 0,5$ , carril 3 =  $6,3 \pm 0,5$ , y carril 4 =  $7,5 \pm 1,4$ . Se diluyeron lisados celulares y se cargaron 5  $\mu$ g para las inmunotransferencias de RAN y  $\beta$ -actina y 20  $\mu$ g para la inmunotransferencia de OPN en un gel de poliacrilamida al 10%-SDS, de la manera siguiente: carril 1: R37; carril 2: R37-RAN; carril 3: R37-OPN; carril 4: R37-OPN-RAN. Se detectaron proteínas específicas usando anticuerpos hacia OPN, RAN o  $\beta$ -actina. Las bandas fueron cuantificadas usando un análisis densitométrico y fueron normalizadas frente a  $\beta$ -actina. El factor medio de aumento para tres experimentos diferentes para OPN es: carril 1 = 1, carril 2 =  $1 \pm 0,2$ , carril 3 =  $5,8 \pm 0,4$ , y carril 4 =  $5,8 \pm 0,7$ , y para RAN es: carril 1 = 1, carril 2 =  $4,9 \pm 0,7$ , carril 3 =  $5,1 \pm 0,5$ , y carril 4 =  $5,6 \pm 0,7$ . Los resultados dados fueron representativos de 3 experimentos.

Figura 2B – Se evaluó durante un periodo de 30 minutos la capacidad de líneas celulares transfectadas para adherirse a una superficie tratada con laminina y se cuantificó el número de células adherentes. Los resultados fueron la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes.

Figura 2C – Se llevó a cabo un ensayo en agar blando para evaluar la capacidad de líneas celulares transfectadas estables para crecer en un entorno independiente del anclaje. Se evaluó el número de colonias después de 5 días. Los resultados fueron la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes.

Figura 2D – Se sembraron células R37 y R37-OPN establemente transfectadas con y sin RAN sobre filtros revestidos con ECM (500  $\mu$ g/ml) en cámaras Boyden. Se determinó el número de células que migraron a través del filtro después de 48 horas mediante la tinción de los insertos y un escaneo usando un sistema digital para obtención de imágenes (Procedimientos Experimentales). Los resultados fueron la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes.

Figura 3A – Una inmunotransferencia que muestra niveles de OPN y RAN en células que contienen as-OPN. El factor medio de aumento para tres experimentos diferentes para OPN es: carril 1 = 1, carril 2 =  $4,2 \pm 0,3$ , y carril 3 =  $0,8 \pm 0,15$ , y para RAN es: carril 1 = 1, carril 2 =  $2,8 \pm 0,3$ , y carril 3 =  $1 \pm 0,2$ .

Figura 3B – Inmunotransferencia que muestra niveles de OPN y RAN en células que contienen siRNA-RAN. Se diluyeron lisados celulares y se cargaron 20  $\mu$ g (para anti-OPN) o 5  $\mu$ g (para anti-RAN) en un gel de poliacrilamida al 10%-SDS, de la manera siguiente: carril 1: R37; carril 2: R37-RAN; carril 3: R37/siRNA-RAN; carril 4: R37-OPN; carril 5: R37-OPN-RAN; y carril 6: R37-OPN/siRNA-RAN. Se detectaron proteínas específicas usando anticuerpos hacia OPN o RAN o  $\beta$ -actina. Las bandas fueron cuantificadas usando un análisis densitométrico y fueron cuantificadas con respecto a las de  $\beta$ -actina. El factor medio de aumento para tres experimentos diferentes para RAN es: carril 1 = 1, carril 2 =  $3,8 \pm 0,4$ , carril 3 =  $0,8 \pm 0,2$ , carril 4 =  $2,6 \pm 0,2$ , carril 5 =  $3 \pm 0,3$ , y carril 6 =  $1 \pm 0,3$ , y para OPN es: carril 1 = 1, carril 2 =  $1 \pm 0,3$ , carril 3 =  $0,9 \pm 0,2$ , carril 4 =  $4,1 \pm 0,4$ , carril 5 =  $4,2 \pm 0,5$ , y carril 6 =  $4,3 \pm 0,6$ .

Figura 3C – Se evaluó durante un periodo de 30 minutos la capacidad de líneas celulares transfectadas para adherirse a una superficie tratada con laminina y se cuantificó el número de células adherentes. Los resultados fueron la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes.

Figura 3D – Se llevaron a cabo ensayos en agar blando para evaluar la capacidad de líneas celulares transfectadas estables para crecer en un entorno independiente del anclaje. Se evaluó el número de colonias después de 5 días. Los resultados fueron la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes.

Figura 3E – Células R37 y R37-OPN establemente transfectadas con vectores de expresión para siRNA-RAN, para as-OPN o una combinación para as-OPN y RAN (asOPN + RAN). Se sembraron las células sobre filtros revestidos con ECM (500  $\mu$ g/ml) en cámaras Boyden. Se determinó el número de células que migraron a través del filtro después de 48 horas mediante la tinción de los insertos y un escaneo usando un sistema digital para obtención de imágenes (Procedimientos Experimentales). Los resultados fueron la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes.

Figura 4A – Inmunotransferencia para proteína RAN con células transfectadas con oligonucleótidos siRNA-RAN individuales. Se diluyeron lisados celulares y se cargaron 5  $\mu$ g en un gel de poliacrilamida al 10% (peso/peso)-SDS, de la manera siguiente: carril 1: R37-OPN; carril 2: R37-OPN-oligo1; carril 3: R37-OPN-oligo2; carril 4: R37-OPN-oligo3; carril 5: R37-OPN-oligo1,2; carril 6: R37-OPN-oligo2,3; y carril 7: R37-OPN-oligo1,3. Se detectaron proteínas específicas usando anticuerpos hacia RAN o  $\beta$ -actina. Las bandas fueron cuantificadas usando un análisis densitométrico y fueron cuantificadas con respecto a las de  $\beta$ -actina. Los resultados fueron una muestra representativa de tres experimentos.

Figura 4B – Se evaluó durante un periodo de 30 minutos la capacidad de líneas celulares establemente transfectadas para adherirse a una superficie tratada con laminina y se cuantificó el número de células adherentes. Los tres oligonucleótidos de la mezcla de siRNA RAN fueron establemente transfectados separadamente en la línea celular R37-OPN.

Figura 4C – Se llevaron a cabo ensayos en agar blando para evaluar la capacidad de líneas celulares transfectadas estables para crecer en un entorno independiente del anclaje. Se evaluó el número de colonias después de 5 días. Los resultados fueron la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes.

5 Figura 5A – Células R37 transfectadas con vectores de expresión. Se trataron células R37-Wt.RAN, R37-Wt.RAN/siRNA-RANBP1 y R37-Mut.RAN con o sin inhibidor LY 294002 de fosfoinositol 3 cinasa (PI3K) en concentración 50  $\mu$ M durante 48 horas. Se sembraron las células sobre filtros revestidos con ECM (500  $\mu$ g/ml) en cámaras Boyden. Se determinó el número de células que migraron a través del filtro después de 48 horas mediante la tinción de los insertos y un escaneo usando un sistema digital para obtención de imágenes (Procedimientos Experimentales). Los resultados fueron la media  $\pm$  error estándar de tres experimentos independientes.

10 Figura 5B – Inmuno-detección del receptor Met en células R37 parentales, R37-CMV, R37-OPN y R37-RAN. Se cargaron 20  $\mu$ g de lisados celulares en un gel de poliacrilamida al 10% (peso/peso)-SDS, de la manera siguiente: carril 1: R37; carril 2: R37 – pBk-CMV; carril 3: R37-OPN; y carril 4: R37-RAN. Se detectaron proteínas en las inmunotransferencias usando anticuerpos específicos hacia Akt-fosfoserina 473. Las bandas fueron cuantificadas usando un análisis densitométrico y fueron cuantificadas con respecto a las de  $\beta$ -actina. Los resultados fueron una muestra representativa de tres experimentos. El factor medio de aumento para 3 experimentos diferentes para c-MET es: carril 1 = 1, carril 2 = 1,6  $\pm$  0,1, carril 3 = 3,6  $\pm$  0,2, y carril 4 = 10,4  $\pm$  0,8.

15 Figura 5C – Inmuno-detección e inhibición por LY290042 de Akt fosforilado en células R37 parentales, R37-CMV, R37-OPN y R37-RAN. Se cargaron 20  $\mu$ g de lisados celulares en un gel de poliacrilamida al 10% (peso/peso)-SDS, de la manera siguiente: carril 1: R37; carril 2: R37 – pBk-CMV; carril 3: R37-RAN; carril 4: R37-OPN; carril 5: R37-OPN tratadas con LY290042 50  $\mu$ M durante 18 horas (R37-OPN/LY); y carril 6: R37-RAN tratadas con LY290042 50  $\mu$ M durante 18 horas (R37-RAN/LY). Se detectaron proteínas en las inmunotransferencias usando anticuerpos específicos hacia Akt-fosfoserina 473. Las bandas fueron cuantificadas usando un análisis densitométrico y fueron cuantificadas con respecto a las de  $\beta$ -actina. Los resultados fueron una muestra representativa de tres experimentos. El factor medio de aumento para 3 experimentos diferentes para Akt fosforilado en ser473 es: carril 1 = 1, carril 2 = 2,2  $\pm$  0,4, carril 3 = 22,5  $\pm$  0,7, carril 4 = 21,1  $\pm$  0,5, carril 5 = 0  $\pm$  0, y carril 6 = 0  $\pm$  0.

20 Figura 5D – Inmuno-detección de Akt fosforilado en células que expresan RAN de tipo silvestre (wt; del inglés, *wild type*) y mutante. Se cargaron 20  $\mu$ g de lisados celulares en un gel de poliacrilamida al 10% (peso/peso)-SDS, de la manera siguiente: carril 1: R37-Wt.RAN; y carril 2: R37-Mut.RAN. Se detectaron proteínas en las inmunotransferencias usando anticuerpos específicos hacia fosfoserina 473 Akt. Las bandas fueron cuantificadas usando un análisis densitométrico y fueron cuantificadas con respecto a las de  $\beta$ -actina. Los resultados fueron una muestra representativa de tres experimentos. El factor medio de aumento para 3 experimentos diferentes para Akt fosforilado en ser473, normalizado con respecto a aquél en células R37 (= 1) es: carril 1 = 22,0  $\pm$  0,6, y carril 2 = 0  $\pm$  0.

### Descripción detallada

35 Marcadores

La expresión "RAN, Proteína 1 Ligante de RAN y derivados de las mismas" incluye el polipéptido RAN, un fragmento activo, un compuesto análogo y una variante del mismo junto con secuencias de ácido nucleico que codifican estas proteínas o polipéptidos y/o que se hibridan con al menos una de estas secuencias de ácido nucleico. Se prefiere emplear RAN humano o sus derivados. En las ID. SEC. números 1 y 2 se muestran, respectivamente, la secuencia de aminoácidos de RAN humano y su secuencia nucleotídica de codificación.

ID. SEC. nº 1

MAAQGEPQVQFKLVLVGDGGTGKTTFVKRHLTGEFEKKYVATLGVEVH  
 PLVFHTNRGPIKFNWWDTAGQEKFGLRDGYIQAQCAIIMFDVTSRVTY  
 KNVPNWHRLVRCENIPIVLCGNKVDIKDRKVKAKSIVFHRKKNLQYYD  
 ISAKSNYNFEKPFLLWLRKLGDPNLEFVAMPALAPPEVVMDPALAAQYE  
 HDLEVAQTTALPDEDDDL

ID. SEC. nº 2

1 cgcccctgct ctgcgcccgg cgtcggctgc gctcccggcg ttgaattgc gcttccgcca  
 61 tcttccagc ctcagtcgga cgggcgcgga ggcgctctg gaaggaacgc cgcgatggct  
 121 ggcagggag agccccaggt ccagttcaaa ctgtattgg ttggtgatgg tggactgga  
 181 aaaacgacct tcgtgaaacg tcattgact ggtgaattg agaagaagta ttagccacc  
 241 ttgggtgtg aggttcatcc cctagtgtc cacaccaaca gaggacctat taagtcaat  
 301 gtatgggaca cagccggcca ggagaaattc ggtggactga gagatggcta ttatatcaa  
 361 gccagtggt ccatcataat gttgatgta acatcgagag ttacttaca gaatgtgct  
 421 aactggcata gagatctgt acgagtgtg gaaaacatcc ccattgtgt gtgtggcaac  
 481 aaagggata ttaaggacag gaaagtgaag gcgaaatcca ttgtctcca  
 ccgaaagaag  
 541 aatcttcagt actacgacat ttctgcaaaa agtaactaca actttgaaa gcccttctc  
 601 tggcttgcta ggaagctcat tggagaccct aacttgaat ttgtgccat gcctgctctc  
 661 gccccaccag aagttgcat ggaccagct ttggcagcac agtatgagca cgacttagag  
 721 gttgctcaga caactgctct cccggatgag gatgatgacc tgtgagaatg aagctggagc  
 781 ccagcgtcag aagtctagt ttatagggcag ctgtcctgtg atgtcagcgg tgcagcgtg  
 841 gtccacctc attattatct agctaagcgg aacatgtgct ttatctgtgg gatgctgaag  
 901 gagatgagtg ggcttcggag tgaatgtgc agtttaaaaa ataactcat tgttggacc  
 961 tgcataatta gctgtttgga cgcagttgat tcttgagtt tcaatataa gactgctgca  
 1021 gtcacatcac aatattcagt ggtgaaatct tgttgttac tgcattccc attcctttc  
 1081 ttagaatca gaataaagt gtatttcaaa tatctaagca agtgaactca tccctgttt  
 1141 ataaatagca ttggaaacc actaaagtag ggaagttta tgccatgta atattgaa  
 1201 tgcctgctt ttactacta attgaaatc tattgggta atttccct atgttatt  
 1261 ttgtacatt gagccatgc acacaaactg atgatgacag gtcagcagta ttctattgg  
 1321 ttagaaggt tacatggtgt aatattagt gcagttaagc taaagcagtg ttgtctccac  
 1381 ctcatattg gctaggtagg gtcacctagg gaagcactg ctcaaatct gtgacctgc  
 1441 agaataaaaa tgtggttgt acatatcaaa tagatattt aagggaata tttcttta  
 1501 tggcaaaagt aatcatgtt taatgtagaa cctcaaacag gatggaacat cagtggatgg  
 1561 caggaggtg ggaattctg ctgttaaaaa taattacaaa ttgtcactt ttgtttgaa  
 1621 ttttagatgc ttagtgtgaa gttgatacgc aagccg

5 La secuencia de aminoácidos de RANBP1 humano y su secuencia nucleotídica de codificación se muestran como ID. SEC. números 3 y 4, respectivamente.

ID. SEC. nº 3: Secuencia proteica de RANBP1

MAAAKDTHEDHDTSTENTDESNHDPQFEPVSLPEQEIKTLEED  
 EEELFKMRAKLFRFASENDLPEWKERGTGDVKLLKHKEKGAIRLLMRRDKTLKI  
 CANHYITPMMELKPNAGSDRAWVWNTHADFADECPKPELLAIRFLNAENAQKF  
 KTKFEECRKEIEEREKKAGSGKNDHAEKVAEKLEALSVKEETKEDAEKQ"

ID. SEC. nº 4: Secuencia de nucleótidos de RANBP1

1 cgaggttcgg gtcgtggggc ggaggggaaga gcgggcgggc gggaggcgcc  
 ggcgccagac  
 61 gcgaggaggaa ggagctacga gtagccgccg agaggccgag gagccagcga  
 cgaccgaccc  
 121 agccgagccg ccgcccgcgc cgcgccccca tggcggccgc caaggacact  
 catgaggacc  
 181 atgatacttc cactgagaat acagacgagt ccaacatga ccctcagtt gagccaatag  
 241 tttctctcc tgagcaagaa attaaaacac tgaagaaga tgaagaggaa cttttaaaa  
 301 tgcgggcaaa actgttccga ttgcctctg agaacgatct cccagaaatgg aaggagcgag  
 361 gcactggtga cgtcaagctc ctgaagcaca aggagaaagg ggccatccgc  
 ctctcatgc  
 421 ggagggacaa gaccctgaag atctgtgcca accactacat cacgccgatg  
 atggagctga  
 481 agcccaacgc aggtagcgac cgtgcctggg tctggaacac ccacgctgac  
 ttcgccgacg  
 541 agtccccaa gccagagctg ctggccatcc gcttctgaa tgctgagaat gcacagaaat  
 601 tcaaaacaaa gttgaagaa tgcaggaaag agatcgaaga gagagaaaag  
 aaagcaggat  
 661 caggcaaaaa tgatcatgcc gaaaaagtgg cggaaaagct agaagctctc  
 tcggtgaagg  
 721 aggagaccaa ggaggatgct gaggagaagc aataaatcgt cttatttat tttctttcc  
 781 tctcttctc ttcttttt taaaaattt tacctgccc ctcttttcg gttgtttt  
 841 attcttcat tttacaagg gacgttatat aaagaactga actc

- 5 En realizaciones, la expresión "fragmento activo" se refiere a una porción de la secuencia de longitud completa que ha conservado al menos una de las actividades o funciones de la RAN o RANBP1 de origen natural. Se prefiere que la porción activa conserve la mayor parte de las actividades biológicas de la proteína RAN o RANBP1 con respecto a la vía de señalización mediada por OPN, su papel en la transformación de una célula en una célula maligna y/o su papel en la metástasis.
- 10 En realizaciones particulares de la invención, el fragmento activo es un fragmento que presenta propiedades antigénicas. La longitud de dicho fragmento comprende de al menos 6 hasta 15, preferiblemente 25 y más preferiblemente 50, aminoácidos contiguos de la ID. SEC. nº 1 o la ID. SEC. nº 3 o derivados de las mismas. Se puede determinar un fragmento activo de RAN o RANBP1 utilizando, por ejemplo, una supresión C-terminal consecutiva de cDNA de RAN o cDNA de RANBP1. Dichas construcciones con supresión de cDNA de RAN pueden

ser luego clonadas en plásmidos adecuados, incluyendo, por ejemplo, pero sin limitarse a, el plásmido pcDNA6/HisC. La actividad biológica de estos mutantes por supresión puede ser luego examinada del modo descrito en esta memoria. En realizaciones específicas, el fragmento activo puede proceder de al menos 10 aminoácidos consecutivos de RAN, la Proteína 1 Ligante de RAN o un derivado de las mismas.

- 5 Las expresiones "compuesto análogo" y "variante" abarcan una secuencia polipeptídica de RAN o secuencia polipeptídica de RANBP1 que incluye sustitución de aminoácidos, especialmente una(s) sustitución(es) que es/son conocida(s) por tener una elevada probabilidad de no conducir a ninguna modificación significativa de la actividad biológica ni la configuración, ni la plegadura, de la proteína. Estas sustituciones son conocidas en la técnica. Por ejemplo, el grupo de la arginina, la lisina y la histidina es de aminoácidos básicos intercambiables conocidos. Un
- 10 compuesto análogo o una variante puede comprender una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 70% de homología con respecto a la ID. SEC. nº 1, más preferiblemente al menos un 80% de homología con respecto a la ID. SEC. nº 1, más preferiblemente al menos un 90% de homología con respecto a la ID. SEC. nº 1, aún más preferiblemente al menos un 95% de homología con respecto a la ID. SEC. nº 1, y lo más preferiblemente al menos un 97% de homología con respecto a la ID. SEC. nº 1.
- 15 Un compuesto análogo o una variante puede comprender una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 70% de homología con respecto a la ID. SEC. nº 3, más preferiblemente al menos un 80% de homología con respecto a la ID. SEC. nº 3, más preferiblemente al menos un 90% de homología con respecto a la ID. SEC. nº 3, aún más preferiblemente al menos un 95% de homología con respecto a la ID. SEC. nº 3, y lo más preferiblemente al menos un 97% de homología con respecto a la ID. SEC. nº 3.
- 20 Los derivados del polipéptido RAN o del polipéptido RANBP1 también incluyen polipéptidos RAN o polipéptidos RANBP1 unidos a una pareja de copulación, tal como, por ejemplo, una molécula efectora, una etiqueta, un fármaco, una toxina y/o una molécula portadora o de transporte. Las técnicas para copular los polipéptidos de la invención con parejas de copulación tanto peptídicas como no peptídicas son bien conocidas en este campo técnico.
- 25 Los derivados de RAN o derivados de RANBP1 incluyen además péptidos de fusión. Se pueden fusionar derivados de RAN o un polipéptido RANBP1 o sus compuestos análogos con el dominio constante de inmunoglobulinas (IgA, IgE, IgG, IgM), o con porciones del mismo (CH1, CH2, CH3 o cualquier combinación de los mismos), para dar lugar a polipéptidos quiméricos. Estos polipéptidos o proteínas de fusión pueden facilitar la purificación y mostrar una semivida *in vivo* aumentada. Dichas proteínas de fusión pueden ser más eficaces en cuanto a unirse a, y neutralizar, otras moléculas que los polipéptidos monómeros o los fragmentos de los mismos solos. Véase, por ejemplo,
- 30 Fountoulakis et al., J. Biochem. 270: 3958-3964 (1995).
- Las proteínas de fusión de la invención también incluyen polipéptidos RAN o polipéptidos RANBP1 fusionados con albúmina, por ejemplo, con albúmina sérica humana recombinante o con fragmentos o variantes de la misma (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. nº 5876969, la Patente Europea 0413622 y la Patente de EE.UU. nº 5766883).
- 35 El uso de polinucleótidos que codifican tales proteínas de fusión descritas en esta memoria está también abarcado por la invención.
- Los compuestos análogos para uso en la presente invención incluyen además compuestos análogos inversos o retroanálogos de proteínas RAN o proteína RANBP1 naturales, porciones de las mismas o sus derivados sintéticos.
- 40 Los polipéptidos RAN o polipéptidos RANBP1 pueden estar también en forma de multímeros. De esta manera, se pueden utilizar multímeros (de 2, 3 o más unidades monómeras de polipéptido RAN o polipéptido RANBP1 individuales) en el método o ensayo de acuerdo con la invención. Dichos multímeros pueden ser empleados para preparar un péptido monómero preparando un péptido multímero que incluya la unidad monómera y un sitio escindible (es decir, un sitio enzimáticamente escindible) y escindiendo luego el multímero para obtener un monómero deseado.
- 45 En realizaciones particulares, las secuencias de ácido nucleico proporcionadas por la expresión "RAN, Proteína 1 Ligante de RAN y derivados de las mismas" comprenden las secuencias de ácido nucleico mostradas en la ID. SEC. nº 2 y la ID. SEC. nº 4, y ácidos nucleicos que se hibridan con estas secuencias bajo condiciones rigurosas.
- Como se utilizan en esta memoria, las condiciones de rigor elevado pueden ser fácilmente determinadas por el técnico experto basándose en, por ejemplo, la longitud del DNA. Estas condiciones pueden ser, por ejemplo, una hibridación llevada a cabo en una disolución que contiene 6\*SSC (20\*SSC representa citrato sódico 333 mM y NaCl 333 mM), SDS al 0,5% y formamida al 50% a 42 °C, y los productos hibridados son luego lavados en una disolución de 0,1\*SSC y SDS al 0,5% a 68 °C, o en unas condiciones como las descritas en Nakayama et al., Bio-Jikken-Illustrated, volumen 2, "Idenshi-Kaiseki-No-Kiso (A Basis for Gene Analysis)", páginas 148-151, Shujunsha, 1995.
- 50 Las secuencias de ácido nucleico que se pueden utilizar en los aspectos de la invención comprenden secuencias de nucleótidos que tienen una identidad de al menos 70%, al menos 80%, con respecto a las secuencias ID. SEC. nº 2 e ID. SEC. nº 4 presentes en la naturaleza. También se contemplan realizaciones en que las moléculas de ácido nucleico comprenden una secuencia con una identidad de al menos 90%, preferiblemente al menos 95%, más
- 55

preferiblemente al menos 99%, o incluso al menos 99,8%, con respecto a las secuencias ID. SEC. n° 2 e ID. SEC. n° 4 presentes en la naturaleza o nativas. El porcentaje de identidad puede ser determinado mediante una inspección visual y un cálculo matemático o comparando la información secuencial usando programas informáticos conocidos tales como el programa informático GAP.

5 La proteína o los polipéptidos RAN o RANBP1 se pueden producir mediante el uso de los correspondientes polinucleótidos de codificación en un sistema de expresión. En dichos sistemas, el polinucleótido es insertado en un vector apropiado en donde el polinucleótido está operativamente unido a una secuencia de control que es capaz de proporcionar la expresión del ácido nucleico en una célula huésped. Se puede utilizar una diversidad de vectores. Por ejemplo, los vectores adecuados pueden incluir virus (por ejemplo, virus vaccinia, adenovirus, baculovirus, etc.),  
10 vectores de levadura, fagos, cromosomas, cromosomas artificiales, plásmidos y DNA de cósmido. En el ejemplo siguiente de la invención, el vector utilizado es pcDNA6/HisC (Invitrogen).

Se pueden utilizar los vectores para introducir el polinucleótido en una célula huésped para uso en los métodos de la invención. Se puede utilizar una gran variedad de células huésped. Las células huésped pueden ser procarióticas o eucarióticas. Incluyen bacterias, por ejemplo, *E. coli*, levaduras, células de insecto y células de mamífero. Las líneas celulares de mamífero que se pueden utilizar incluyen células de ovario de hámster chino, células renales de hámster recién nacido, células de melanoma NSO de ratón, líneas celulares de mono y ser humano y derivados de las mismas y muchas otras. La línea celular que se ha empleado en el ejemplo siguiente como particularmente adecuada es Rama 37 y sus subclones.

Se puede utilizar una cepa de célula huésped que module la expresión de, modifique y/o procese específicamente el producto génico. Dicho procesamiento puede implicar glicosilación, ubiquitinación, formación de enlaces disulfuro y una modificación postraduccional general.

Para más detalles relativos a técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, en la preparación de construcciones de ácido nucleico, la mutagénesis, la secuenciación, la introducción de DNA en células y la expresión génica, y el análisis de proteínas, véanse, por ejemplo, "Current Protocols in Molecular Biology", 2ª edición, redactado por Ausubel et al., John Wiley & Sons, 1992, y "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3ª edición, Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000.

En realizaciones de métodos de la invención, los métodos pueden ser llevados a cabo usando un modelo animal útil para la exploración de agentes capaces de modular los efectos de los polipéptidos RAN o los polipéptidos RANBP1. Un animal genéticamente modificado útil puede comprender secuencias del gen RAN o el gen RANBP1 presentes en la naturaleza o secuencias genéticamente alteradas que incluyan inserciones, supresiones, adiciones y sustituciones. Preferiblemente, los animales usados son animales transgénicos que tienen inserciones en la línea germinal que son establemente transmitidas a todas las células de los animales de la progenie. Los animales genéticamente modificados pueden producir cantidades mayores de polipéptido RAN o polipéptido RANBP1 y serían modelos útiles para enfermedades. La referencia a una cantidad mayor incluye un factor de aumento de hasta  
30 aproximadamente 2, 3 y, más preferiblemente, de 4 a 5 con respecto a la cantidad normal.

Preferiblemente, el animal genéticamente modificado es un ratón, una rata, una cobaya, un conejo, un cerdo, una oveja o una cabra. Más preferiblemente, el animal genéticamente modificado es un ratón o una rata. Lo más preferiblemente, el animal genéticamente modificado es un ratón.

Los modelos animales de la presente invención pueden estar en forma de los animales o pueden estar, por ejemplo, en forma de embriones para trasplante. Los embriones se mantienen preferiblemente en un estado congelado y pueden ser opcionalmente vendidos con instrucciones para su uso.

Estos animales se pueden obtener usando métodos de recombinación que son estándares en la técnica. La recombinasa Cre y la recombinasa flp del bacteriófago P1 procedentes de plásmidos de levadura son dos ejemplos no restrictivos de enzimas DNA recombinasas específicas del sitio que dejan DNA en sitios diana específicos (sitios lox P para la recombinasa Cre y sitios fit para la recombinasa flp).

#### Moduladores

Un modulador del nivel de RAN o de la Proteína 1 Ligante de RAN puede ser un DNA de doble cadena (dsRNA) o un polinucleótido sentido o antisentido, una ribozima, una desoxirribozima, agentes inductores de metilación o desmetilación y también agentes de tipo RNAi, tal como siRNA.

50 En realizaciones particulares, el siRNA puede ser seleccionado de entre las ID. SEC. números, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

Estos agentes genéticos pueden ser adecuadamente conjugados con otras moléculas, tales como péptidos o moléculas pequeñas que pueden permitir un paso más fácil a través de la membrana celular o facilitar la hibridación. Dichos agentes genéticos pueden ser empleados solos o en combinación entre sí.

La presente invención también contempla proteínas presentes en la naturaleza, compuestos miméticos de péptidos, anticuerpos y elementos químicos no proteicos (especialmente moléculas químicas pequeñas).

Se puede elegir un modulador de RAN y/o de la Proteína 1 Ligante de RAN de entre anticuerpos policlonales o monoclonales generados contra una proteína RAN o una proteína RANBP1 o ciertas porciones antigénicas concretas de las mismas. Se prefieren los anticuerpos monoclonales generados contra polipéptidos RAN o polipéptidos RANBP1 humanos. Alternativamente, el anticuerpo puede ser humanizado o puede ser un anticuerpo quimérico, un fragmento Fab, etc. Además, los anticuerpos pueden ser ventajosamente conjugados con otra molécula, tal como una etiqueta o un compuesto citotóxico.

Se pueden escoger candidatos del grupo que consiste en proteínas, o derivados de las mismas, que se conocen por interactuar biológicamente de forma natural con la proteína RAN, la proteína RANBP1 o la osteopontina.

Además, un modulador adecuado puede ser una molécula pequeña (que tiene normalmente un peso molecular inferior a 1000) que se puede obtener mediante un diseño farmacológico facilitado por ordenador o, alternativamente, mediante bancos químicos combinatorios.

#### Materiales y métodos

##### Líneas celulares y cultivo celular

Se preparó una línea celular derivada de un tumor benigno no metastásico mamario (R37) de rata del modo previamente descrito (9) y se cultivaron subclones de células derivadas establemente transformadas, en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suero de ternera fetal al 10% (v/v), 100 µg/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin (Invitrogen). Se obtuvo la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7 de ECACC (Wiltshire, Reino Unido) y se propagó en DMEM, FCS al 5% (v/v), 50 ng/ml de insulina y estradiol  $10^{-8}$  M. Se obtuvieron las líneas celulares MDA-MB 231 y MDA-MB 435S de cáncer de mama humano de ECACC (Wiltshire, Reino Unido) y se cultivaron en medio RPMI complementado con suero de ternera fetal al 20% (v/v), piruvato sódico 1 mM y 100 µg/ml de penicilina-estreptomycin.

##### Plásmidos y oligonucleótidos

Se prepararon vectores de expresión para OPN de rata, OPN-pBK-CMV (Stratagene) (13), y para RAN GTPasa humana, RAN-pcDNA6 (Invitrogen), del modo previamente descrito (13). Se prepararon los vectores de expresión para pequeño RNA de interferencia a RAN y proteína 1 ligante de RAN (RANBP1), pRETROSUPER-siRNA RAN o siRNA-RAN, y para antisentido a RNA de OPN, antisentido-OPN-pcDNA4 o as-OPN, del modo descrito más adelante. La secuenciación del DNA confirmó su autenticidad. Los transcritos de siRNA específicos dirigidos contra RAN y RANBP1 humanas se obtuvieron de un banco SUPER RNAi previamente descrito (Cancer Research, Reino Unido) (14). En resumen, las secuencias de 19 monómeros del gen RAN y los genes RANBP1 fueron convertidas en pares de oligonucleótidos complementarios en horquilla de 59 monómeros. Tres conjuntos de oligonucleótidos complementarios de 59 monómeros que se dirigían al mismo gen fueron hibridados y ligados en el vector pRETROSUPER y utilizados para transfectar bacterias DH5α competentes. El vector pRETROSUPER contiene un promotor de fosfoglicerato cinasa que dirige la expresión del gen de resistencia PURO para selección en células eucarióticas (15).

El vector pRETROSUPER procede del virus de células madre embrionarias murinas (pMSCV) y contiene el casete de expresión pSUPER shRNA. Los oligonucleótidos en horquilla para el banco SUPER RNAi™ son clonados cadena abajo del promotor de polimerasa III histona H1-RNA (H1). Tras la transfección en una línea celular empaquetadora, pRETROSUPER expresa un transcrito que contiene la señal de empaquetamiento vírica, el casete H1-shRNA y el gen de resistencia a puomicina. El vector pRETROSUPER tiene una 3'LTR específicamente diseñada que tiene una delección en los elementos promotores de LTR. Esta delección da lugar a la inactivación de la transcripción mediada por LTR tras la integración retroviral. El promotor de fosfoglicerato cinasa (PGK; del inglés, phosphoglycerate kinase) conduce la expresión del gen de resistencia a puomicina (puro) para selección en células eucarióticas. El plásmido pRETROSUPER puede ser propagado en *E. coli* bajo selección por ampicilina (AMP).

Se prepararon reservas de transformantes en glicerol, conteniendo cada pocillo bacterias con las 3 diferentes construcciones de RNA corto de interferencia (siRNA; del inglés, short interfering RNA) que se dirigen al mismo gen. Se aisló DNA de las tres construcciones de siRNA. Se determinó mediante secuenciación el DNA correspondiente a cada construcción de siRNA. Las secuencias oligonucleotídicas de siRNA para RAN (siRNA-RAN), diseñadas de acuerdo con la secuencia de mRNA humano (números de acceso de GenBank: NM\_006325, BC000852), fueron las siguientes:

(1) secuencia diana 1 (5'-AAAACGACCTTCGTGAAACGTCAT-3') - ID. SEC. nº 5

(2) secuencia diana 2 (5'-AAGCCAGTGTGCCATCATAAT-3') - ID. SEC. nº 6

(3) secuencia diana 3 (5'-AAGTATGTAGCCACCTTGGGT-3') - ID. SEC. nº 7 (la más eficaz, particularmente cuando está en combinación con la ID. SEC. nº 3),

y para siRNA-RANBP1 (número de acceso de GenBank: NM-002882) fueron las siguientes:

(1) secuencia diana 1 (5'-TACAGACGAGTCCAACCAT-3') - ID. SEC. nº 8

(2) secuencia diana 2 (5'-CCACTACATCACGCCGATG-3') - ID. SEC. nº 9

(3) secuencia diana 3 (5'-GGACTCATGAGGACCAT-3') - ID. SEC. nº 10.

5 La secuencia diana 1 mostró una homología de 76% con respecto a RAN de rata mientras que las secuencias diana 2 y 3 mostraron una homología de 95% con respecto a RAN de rata. Estos vectores de expresión fueron denominados siRNA-RAN (1), siRNA-RAN (2) y siRNA-RAN (3), respectivamente, y similarmente los vectores para siRNA RANBP1.

#### Generación de RAN mutado

10 Se generó el plásmido pcDNA-RAN con glicocola (G19) mutada a valina (V) y glutamina (Q69) mutada a leucina (L) (Ren et al., 1995) con el kit QuikChange para mutagénesis dirigida al sitio (Stratagene, La Jolla, California, EE.UU.) (El-Tanani et al., 2004). Se generó un mutante de G19V usando los cebadores directo e inverso

5' AAC TTG TAT TGG T TGG TGA TGt TGG TAC TGG AAA A 3' ID. SEC. nº 11

y

5' T TTT CCA GTA CCA aCA TCA CCA A CCA ATA CAA GTT 3' ID. SEC. nº 12,

15 respectivamente.

Se generó un mutante Q69L usando los cebadores directo e inverso

5' GGG ACA CAG CCG GCC tGG AGA AAT TCG GTG GAG TGA 3' ID. SEC. nº 13

y

5' TCA GTC CAC CGA ATT TCT CCa GGC CGG CTG TGT CCC 3' ID. SEC. nº 14,

20 respectivamente. Este vector de expresión fue denominado Mut.RAN.

#### Producción de líneas celulares transformantes estables

25 Se cultivaron la línea R37 y líneas celulares derivadas, del modo anteriormente esbozado. Se recolectaron las células y se sembraron en placas de múltiples pocillos en una cantidad de  $2,5 \times 10^5$ /pocillo de 3,5 cm de diámetro, en 1 ml de medio exento de suero. Inicialmente, las células R37 fueron transfectadas con vectores de expresión para OPN, RAN y Mut.RAN, o con ambos vectores de expresión para OPN y RAN, del modo previamente descrito usando como medio selectivo 1,0 mg/ml de geneticina (Invitrogen) para las transfecciones con OPN o 5 µg/ml de blasticidina (Invitrogen) para las transfecciones con RAN (16), para generar las líneas celulares R37-OPN, R37-RAN y R37-OPN-RAN, respectivamente. Se transfectaron estable y separadamente las líneas celulares R37, R37-RAN, R37-Mut.RAN y R37-OPN con los plásmidos de siRNA que contenían una mezcla de cada siRNA individual usando Lipofectamine y reactivo PLUS-C (Invitrogen); estas líneas celulares fueron denominadas R37/siRNA-RAN, R37-RAN/siRNA-RAN y R37-OPN/siRNA-RAN, respectivamente. Las líneas celulares R37-RAN fueron también transfectadas separadamente con los plásmidos de siRNA que contenían la mezcla de los tres siRNA individuales a RANBP1; estas líneas celulares fueron denominadas R37-RAN/siRNA-. Se seleccionaron las células usando 5 µg/ml de puomicina. Se transfectaron separadamente las líneas celulares R37, R37-RAN, R37-OPN y R37-OPN-RAN con la construcción de as-OPN y se seleccionaron establemente usando 250 µg/ml de zeocina (23); estas líneas celulares fueron denominadas R37/as-OPN, R37-OPN/as-OPN, R37-RAN/as-OPN y R37-OPN-RAN/as-OPN. Se establecieron las líneas celulares clonales reunidas combinando todas las colonias celulares sobrevivientes después de la transfección y el crecimiento bajo presión selectiva.

#### Transferencia Northern

40 Se extrajo el RNA total de las células y se sometió a un análisis por transferencia Northern, del modo previamente descrito (21). Las membranas se hibridaron separadamente y una tras otra con sondas de cDNA de OPN y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPD) y se sometieron a autorradiografía.

#### Transferencia Western para proteínas OPN y RAN

45 Se establecieron los niveles de proteínas OPN y RAN y RANBP1 en las células establemente transfectadas, mediante transferencia Western de la manera previamente descrita (17). Se sometieron 20 µg y 5 µg de proteína total, respectivamente, de lisados celulares completos de células transfectadas con OPN y transfectadas con RAN a electroforesis a través de geles de poliacrilamida al 10% [peso/volumen (p/v)] y SDS al 1% (p/v) y se transfirieron mediante transferencia Western a membranas de nitrocelulosa (Millipore Corporation, Watford, Reino Unido). Las membranas fueron bloqueadas mediante una incubación con Tris 0,02 M-HCl (pH de 7,0), NaCl al 0,9% (p/v) y



Tween 20 al 0,1% (v/v) que contenía Marvel al 5% (p/v), durante 1 hora. Se añadieron durante la noche, a 4 °C, anticuerpos monoclonales hacia OPN (1/500) (Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa City, Iowa, EE.UU.), RAN (8 ng/ml, BD Biosciences Pharmingham, Oxford, Reino Unido), RANBP1 (Santa Cruz) y  $\beta$ -actina (1/5000) (Sigma). Los anticuerpos unidos fueron localizados mediante una incubación más con Ig 1:5000 anti-ratón generada en conejo y conjugada con peroxidasa de rábano picante, visualizados con reactivo luminol (Santa Cruz Biotechnology, Inc., California, EE.UU.) y expuestos a una película Kodak XAR5 (Sigma, Poole, Reino Unido). Las bandas de las películas fueron cuantificadas usando un sistema digital para obtención de imágenes (Syngene, Genetool, Cambridge, Inglaterra).

#### Ensayos *in vitro* para transformación maligna/metastásica

- Se llevaron a cabo ensayos de adhesión celular del modo previamente descrito (18). En resumen, se sembraron las células en una densidad conocida ( $2 \times 10^5$  células por pocillo) en una placa de 6 pocillos con medios acondicionados y se dejó que se adhirieran durante 30 minutos a 37 °C, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% (v/v), a placas revestidas con laminina. Las células fueron luego lavadas con PBS y, después de su separación mediante tratamiento con tripsina/EDTA, fueron contadas, y la adhesión celular se expresó como un porcentaje de las células adheridas con respecto al número total de células añadidas.

#### Formulación de colonias

- Se examinó la formación de colonias en agar blando del modo previamente descrito para el agar de fondo, se sembraron 5 ml de agarosa al 1,6% (p/v) en una placa para cultivo tisular de 100 mm de diámetro y se dejó que se endureciera la agarosa. Las células fueron separadas mediante tratamiento con tripsina y fueron resuspendidas en una concentración de  $1,0 \times 10^6$  células/ml en medio normal. Se añadieron nueve ml de medio normal (DMEM 1x con FCS al 10% (v/v), L-glutamina 200 mM, 100  $\mu$ g/ml de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de estreptomina) a la parte superior del agar de fondo y se sembraron 1,0 ml de células por placa. Las placas fueron incubadas a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% (v/v) durante 5-7 días y fueron teñidas con 1 ml de violeta cristal al 0,2% (p/v). Las placas fueron escaneadas en cuanto a colonias y fueron sometidas a recuento usando un sistema digital para obtención de imágenes (Syngene, Genetool, Cambridge, Inglaterra) (19).

#### Invasión a través de Matrigel

- Se midió la invasión a través de Matrigel en una cámara Boyden del modo previamente descrito. Se utilizaron cámaras de invasión de Biocoat 250  $\mu$ g/ml Matrigel de 6,4 mm de diámetro (Falcon-Ulster Anaesthetics, Moneyrea, NI, Reino Unido) para evaluar la capacidad de invasión de células R37 adecuadamente transfectadas, del modo previamente descrito (19). En resumen, se resuspendieron  $1 \times 10^6$  células en 1 ml de DMEM exento de suero y se añadieron 100  $\mu$ l a los insertos para cultivo celular de las cámaras de invasión superiores sobre la parte superior de una cámara de invasión revestida con Biocoat 250  $\mu$ g/ml Matrigel. Se añadió a las cámaras inferiores un agente quimioatrayente, 5  $\mu$ g de fibronectina de rata (Gibco-BRL, Reino Unido) por ml en DMEM y FCS al 10% (v/v). Se incubaron los cultivos a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% (v/v) y se dejó que durante 48 horas invadieran la matriz y los poros (8  $\mu$ m) de la membrana inferior fijada. Las superficies superiores de los filtros fueron limpiadas de células y los filtros fueron fijados mediante inmersión en metanol al 100% (v/v) y fueron teñidos mediante eosina de Gurr y azul de metileno, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (BDH Laboratory Supplies, Pool, Reino Unido). Los insertos fueron escaneados en cuanto a densidad de células usando un sistema digital para obtención de imágenes (Syngene, Genetool, Cambridge, Inglaterra) (19). El inhibidor LY294002 [2-(4-morfolinil)-8-fenil-4H-1-benzopirán-4-ona] de PI3 cinasa (PI3K) fue adquirido a Calbiochem Beeston, Nottingham, Reino Unido. En concentración 50  $\mu$ M es específico para PI3K sin inducir apoptosis (38).

#### Ensayos para metástasis

- Las células reunidas fueron recolectadas mediante tratamiento con disoluciones de EDTA/tripsina, lavadas y resuspendidas en PBS en una concentración de  $10^7$  células/ml. Se inyectaron s.c.  $2 \times 10^6$  células en 0,2 ml, a través de la piel, en las almohadillas grasas inguinales derechas de hembras singénicas de rata Furth-Wistar de 6-10 semanas de edad (cepa Ludwig-Wistar OLA), con 20 ratas/grupo (12). Se realizó la autopsia de las ratas después de 12 semanas y se examinaron los tumores y los tejidos relevantes, particularmente los pulmones y los ganglios linfáticos, en cuanto a una metástasis densa. Los tumores primarios y otros tejidos de aspecto anormal, incluyendo todos los pulmones, fueron fijados en Methacam (metanol, Inhibisol, ácido acético : 6, 3, 1) embebido en parafina-cera, seccionados y teñidos con hematoxilina y eosina. Dos observadores independientes evaluaron cinco campos microscópicos de dos cortes, del modo descrito por B. R. Davies, R. Barraclough y P. S. Rudland, "Induction of metastatic ability in a stably diploid benign rat mammary epithelial cell line by transfection with DNA from human malignant breast carcinoma cell lines", *Cancer Res.* 54: 2785-2793 (1994), y por S. Jamieson, R. Barraclough y P. S. Rudland, "Generation of metastatic variants by transfection of a nonmetastatic rat mammary epithelial cell line with DNA from a metastatic rat mammary cell line", *Pathobiology* 58: 329-342 (1990).

#### Aislamiento de mRNA

Se recolectaron células en una fase exponencial para el aislamiento de RNA. Se aisló el RNA total con el reactivo

TriZol (Life Technologies, Paisley, Escocia, Reino Unido) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se aisló mRNA del RNA total con un kit NucleoTrap para extracción de mRNA (BD Clontech, Oxford, Reino Unido) siguiendo el protocolo del fabricante.

RT-PCR cuantitativa en tiempo real

- 5 Se usó una PCR cuantitativa (QPCR; del inglés, quantitative PCR) como un método independiente para sondear la asociación de genes identificados con las líneas celulares R37-OPN invasiva y R37 no invasiva benigna de rata y para extender las observaciones a células de cáncer de mama humano (Tabla 1).

Tabla 1. RT-PCR cuantitativa para 3 líneas celulares de cáncer de mama

Tipo celular	TPT1	ARNT	ATM	RAN	OPN
MCF-7	1	1	ND	1	1
MDA-MB 231	269	16,6	1	765	60
MDA-MB 435S	159	4,1	ND	13.191	9785
ZR-75	–	–	–	1	1

ND: no detectable.

- 10 Se calculó para cada línea celular la expresión diferencial de los genes de la proteína tumoral, traduccionalmente controlada 1 (TPT1; del inglés, tumor protein, translationally-controlled 1), el translocador nuclear del receptor de hidrocarburos arílicos (ARNT; del inglés, aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator), ataxia telangiectasia mutado (ATM; del inglés, ataxia telangiectasia mutated) y RAN GTPasa (RAN) frente al gen ribosómico constitutivo S18 usando la expresión:  $\Delta Ct = Ct_{\text{gen diana}} - Ct_{S18}$ . A continuación, se calcularon relaciones de células no invasivas MCF-7:otras células a partir de los valores de  $\Delta Ct$  del modo siguiente:  $2^{-(\Delta Ct \text{ de células tumorales} - \Delta Ct \text{ de MCF-7})}$ .

15 Se llevó a cabo el análisis por QPCR usando un kit QuantiTect SYBR® Green para RT-PCR (Qiagen) que contenía un tampón QuantiTect SYBR Green para RT-PCR, colorante SYBR Green I y colorante pasivo ROX de referencia. Al comparar las diferenciales de expresión cuantitativas, se utilizaron tres diferentes líneas celulares humanas. Cada muestra se examinó por triplicado para asegurar una exactitud cuantitativa. Los datos de QPCR se presentan como una relación entre las células MCF-7 no invasivas de cáncer de mama humano y las células invasivas MDA MB 231 o MDA MB 435S y se calculan utilizando el método comparativo del ciclo umbral (Ct) (39). En resumen, se calculó en primer lugar la expresión diferencial de diferentes genes diana frente al gen constitutivo, RNA ribosómico (S18), para todas las muestras usando la expresión:  $\Delta Ct = Ct \text{ del gen diana} - Ct \text{ de la referencia (S18)}$ . Se compararon células MCF-7 con las líneas celulares indicadas usando la fórmula siguiente:  $\Delta\Delta Ct = \text{valor de } \Delta Ct \text{ para el gen diana} - \text{valor de } \Delta Ct \text{ para las células MCF-7}$ . Los valores se presentaron como  $2^{\Delta\Delta Ct}$  (Ponchet et al., 2003). Todas las reacciones QPCR presentadas se llevaron a cabo y se analizaron usando un sistema termociclador rápido LightCycler (Roche, East Sussex, Inglaterra).

25 En resumen, se sometió 1 µg de RNA total a transcripción inversa con la transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen, Life Technologies Ltd., Paisley, Reino Unido). Luego se diluyó el cDNA para obtener 200 µg/µl antes de la multiplicación por PCR. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 10 µl utilizando 200 µg de cDNA y 5 µl de mezcla maestra QuantiTect SYBR Green para PCR (Qiagen, West Sussex, Reino Unido). Para cada tipo celular se incluyeron muestras testigo sin enzima transcriptasa inversa. Se cuantificó la expresión de TPT1, ARNT y ATM usando los siguientes cebadores:

directo 5'-GATCGCGGACGGGTTGT-3' ID. SEC. nº 15,

35 inverso 5'-TTCAGCGGAGGCATTTCC-3' ID. SEC. nº 16,

directo 5'-GCTGCTGCCTACCCTAGTCTCA-3' ID. SEC. nº 17,

inverso 5'-GCTGCTCGTGTCTGGAATTGT-3' ID. SEC. nº 18, y

directo 5'-CAGGGTAGTTTAGTTGAGGTTGACAG-3' ID. SEC. nº 19,

inverso 5'-CTATACTGGTGGTCAGTGCCAAAGT-3' ID. SEC. nº 20.

40 La expresión de RAN se cuantificó usando los cebadores siguientes:

directo 5'-TACTGGAAAAACGACCTT-3' ID. SEC. nº 21,

inverso 5'-TCCCATACATTGAACTTA-3' ID. SEC. nº 22.

También se incluyeron cebadores del RNA ribosómico (S18) para control interno, y fueron los siguientes:

directo 5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3' ID. SEC. nº 23,

inverso 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3' ID. SEC. nº 24.

5 El protocolo incluía una operación de activación de 15 minutos a 95 °C, seguida de 40 ciclos de 15 segundos de desnaturalización a 94 °C, 30 segundos de temperatura predeterminada óptima para hibridación, y extensión durante 30 segundos a 72 °C. Se trazó un gráfico de multiplicación, de señal de fluorescencia frente al número de ciclo. En los ciclos iniciales de la PCR hubo poco cambio en la señal de fluorescencia, y ésta definió la línea de base para el gráfico de multiplicación. Un aumento de fluorescencia por encima de la línea de base indicaba la detección del producto de PCR acumulado. Se ajustó un umbral de fluorescencia fijo de 0,1 por encima de la línea de base en la fase exponencial de la PCR. Para confirmar la especificidad de la multiplicación, los productos de PCR de cada par de cebadores fueron sometidos a un análisis de curvas de fusión y fueron examinados usando una electroforesis en gel de agarosa.

Multiplicación rápida de extremos de cDNA para la clonación de cDNA de longitud completa de RAN

15 Se llevó a cabo la clonación del cDNA de RAN de longitud completa mediante la multiplicación rápida de extremos de cDNA (RACE; del inglés, *rapid amplification of cDNA ends*) usando un kit Marathon para multiplicación de cDNA (Clontech) sobre 2 mg de RNA que contenía poli(A)+, procedente de la línea celular MDA-MB-435S. Se usó el resultante ds cDNA ligado a adaptador, que representaba un banco de ds cDNA no clonado, para llevar a cabo reacciones RACE 5' y 3' con los siguientes cebadores específicos del gen RAN para reacciones RACE 5' y 3', respectivamente:

20 5'-ATGGCTGCGCAGGGAGAG-3' ID. SEC. nº 25,

5'-GGGGCGAGAGCAGGCATG-3' ID. SEC. nº 26,

basados en el número de acceso NM\_63258 de GenBank.

Preparaciones *in vitro* de proteína mutante y RAN recombinante

25 Se generaron productos en un lisado de reticulocitos sintetizadores de proteína, exento de células, de transcripción-traducción acopladas, para el vector de expresión de RAN silvestre (Wt.) o mutante (Mut.), y un lisado no programado para el pcDNA vector vacío, como hemos descrito previamente (17, 40). Las proteínas sintetizadas fueron confirmadas mediante una transferencia Western.

Ensayo de GTPasa

30 El ensayo se llevó a cabo del modo descrito en las instrucciones del fabricante midiendo la liberación de fosfato inorgánico usando el ensayo colorimétrico de fosfomolibdato y verde de malaquita (Innova Biosciences, Reino Unido) (41). En resumen, el ensayo se llevó a cabo por triplicado en placas de poliestireno de fondo redondo, de 96 pocillos, que fueron mantenidas sobre hielo mientras se preparaban las mezclas de reacción. Cada mezcla de reacción consistía en un tampón de ensayo completo (Tris 0,5 M, HCl, pH de 7,4/MgCl<sub>2</sub> 0,1 M)/sustrato (GTP 0,5 mM). Se añadió el lisado de reticulocitos que contenía proteína RAN Wt. o Mut. a cada pocillo. Se añadió mezcla Gold fresca/acelerador [1/100 (v/v)] y luego se añadió estabilizador. También se incluyeron muestras testigo con el tampón de ensayo completo pero sin proteína RAN en lisados celulares no programados, para tener en cuenta la hidrólisis espontánea de GTP. Después de 30 minutos y 60 minutos, las placas fueron analizadas espectrofotométricamente a una longitud de onda de 600 nm. Se incluyó en el ensayo una serie de diluciones estándar de concentraciones de fosfato conocidas, para cuantificar el grado de hidrólisis de GTP a partir de las absorciones de fosfomolibdato.

Autofosforilación de c-Met

45 Monocapas confluentes (placas Petri de 19 cm de diámetro) de células R37, R37-pBK-CMV (R37-CMV), R37-OPN y R37-RAN fueron privadas de suero durante la noche a 37 °C, lisadas en tampón RIPA para anti-fosfotirosina (Tris 20 mM-HCl, NaCl 150 mM, EDTA 2,5 mM, NaF 10 mM, pirofosfato sódico 10 mM, vanadato sódico 1 mM, Nonidet P-40 al 1%, más inhibidores de proteasas, pH de 7,5) e inmunoprecipitadas con el anticuerpo monoclonal 4G10 anti-fosfotirosina unido a glóbulos de agarosa (50 µl de glóbulos/lisado; Upstate Biotechnology, Inc., EE.UU.). Las proteínas inmunoprecipitadas fueron resueltas mediante SDS-PAGE al 7,5% (p/v) y fueron inmunotransferidas con anti-c-Met de ratón (Santa Cruz, sc-161), del modo previamente descrito (42).

Fosforilación de Akt

50 Se recolectaron las células R37, R37-CMV, R37-RAN y R37-OPN con un 80% de confluencia, de placas de 7 cm. Las células fueron lisadas en 300 µl de tampón de carga 2X [glicerol al 20% (v/v), SDS al 4% (p/v), 2-mercaptoetanol al 10% (v/v), Tris 126 mM, pH de 6,8, y coloreado con azul de bromofenol]. Los lisados fueron

sometidos a sonicación, hervidos a 100 °C durante 5 minutos y luego centrifugados a 15.000 rpm durante 10 minutos. Las proteínas fueron resueltas mediante SDS-PAGE al 7,5% y fueron inmunotransferidas para Akt fosforilado en ser473, igual que antes (43).

Tratamiento estadístico de los resultados

- 5 Todos los experimentos biológicos se llevaron a cabo al menos tres veces. Se calcularon el valor medio y el error estándar, y los valores de  $p$  inferiores a 0,05 fueron considerados significativos según se calcularon usando la prueba  $t$  de Student.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

- 10 Efecto de la expresión génica de osteopontina sobre la invasión celular

Los inventores generaron diversas líneas celulares estables a partir de células R37. Fueron establemente transfectadas mediante el vector vacío pBK-CMV (R37-pBK-CMV) o mediante el vector de expresión constitutivamente activo OPN-pBK-CMV (células R37-OPN), como se describe en esta memoria. Se reunieron clones individuales de los transformantes para un análisis subsiguiente. Un análisis por inmunotransferencia usando un anticuerpo monoclonal (mAb; del inglés, monoclonal antibody) hacia OPN, que reconoce tanto la OPN humana como la de rata, mostró que la proteína OPN se expresaba con bajo nivel en las células R37 y R37-pBK-CMV (Figura 1A). En las células R37, R37-pBK-CMV y R37-OPN, el mAb hacia OPN reconocía una proteína con un  $M_r$  de 65.000 (Figura 1A, carriles 1-3), consistente con el tamaño de la OPN de líneas celulares de rata (9, 19). La expresión de la proteína OPN estaba aumentada 10 veces en las células R37-OPN en comparación con las células R37 y R37-pBK-CMV (Figura 1A). El aumento de proteína OPN en la línea celular R37-OPN sugiere que el vector OPN-pBK-CMV sobreexpresa consistentemente OPN, no ejerciendo el vector vacío pBK-CMV efecto alguno sobre la expresión de OPN en células R37.

#### Ejemplo 2

Efecto de OPN sobre la adhesión celular, el crecimiento dependiente del anclaje, y la invasión

- 25 Se examinó la adhesión de células a superficies revestidas con laminina usando un sistema basado en colorantes. Las células R37-OPN mostraron un factor de aumento de adhesión celular a placas revestidas con laminina de 9,2 y 8 en comparación con las células R37 y R37-pBK-CMV, respectivamente ( $p < 0,01$ ) (Figura 1B). Se examinó la formación de colonias en agar blando. Las células R37-OPN indujeron un factor de aumento en el número de colonias por placa de 1,8 y 2,3 en comparación con las células R37 y R37-pBK-CMV, respectivamente ( $p < 0,01$ ) (Figura 1C). Como un ensayo para invasión celular, se examinó la capacidad de las células para migrar a través de un gel tridimensional reconstituido de colágeno (Matrigel) y aparecer en la cara inferior de una membrana de policarbonato. Las células de la cara inferior de la membrana fueron teñidas, escaneadas y contadas usando el sistema digital para obtención de imágenes de Procedimientos Experimentales (19). La migración de los transformantes R37-OPN fue 913 y 1006 veces mayor que la de las células parentales R37 y R37-pBK-CMV, respectivamente ( $p = 0,002$ ) (Figura 1D). Estos resultados sugieren que niveles elevados de OPN inducen adhesión celular, crecimiento independiente del anclaje e invasión *in vitro*.

#### Ejemplo 3

PCR cuantitativa en tiempo real y expresión de RAN

- 40 Se escogieron cuatro de los genes más diferencialmente expresados que estaban además asociados con invasión y/o malignidad de un número total de 1686 (datos no mostrados) para una validación mediante un análisis por PCR cuantitativa en tiempo real (QPCR) (Tabla 1) usando las líneas celulares MCF-7 relativamente no invasiva y MDA-MB-231 y MDA-MB-435S muy invasivas de cáncer de mama humano (Nam et al., 2004). Los cuatro genes codifican la proteína tumoral traduccionalmente controlada 1 (TPT1), el translocador nuclear del receptor de hidrocarburos arílicos (ARNT), ataxia telangiectasia mutado (ATM) y RAN GTPasa (RAN). Se calcularon las relaciones de células MCF-7: otras células usando el método comparativo del ciclo umbral (Ct) (29) después de una normalización con respecto a un gen constitutivo testigo para RNA ribosómico S18. Las líneas celulares MDA-MB-231 y MDA-MB-435S malignas muy invasivas mostraron un factor de aumento de la expresión de TPT1 de 269 y 159, respectivamente, en comparación con la línea celular MCF-7 maligna relativamente no invasiva. Las células MDA-MB-231 y MDA-MB-435S mostraron un factor de aumento de la expresión de ARNT de 16,6 y 4,1, respectivamente, en comparación con las células MCF-7. El ATM resultó indetectable tanto en MCF-7 como en MDA-MB-435S, pero se detectó una pequeña cantidad en células MDA-MB-231 (Tabla 1). Sin embargo, el gen más diferencialmente expresado de los cuatro fue RAN GTPasa. De esta manera, las líneas celulares invasivas MDA-MB-435S y MDA-MB-231 mostraron, respectivamente, un factor de aumento de la expresión de RAN de 13.191 y 765 en comparación con las células MCF-7 y también mostraron un factor de aumento de los niveles de OPN de 9785 y 60 (Tabla 1). La línea celular relativamente no invasiva ZR-75 de cáncer de mama mostró niveles de baja expresión de RAN y OPN casi idénticos a los de la línea celular MCF-7 (Tabla 1).

## Ejemplo 4

## Efecto de RAN sobre células R37 benignas y células R37-OPN invasivas

La transfección estable de células R37 con un vector de expresión para RAN aumentó las expresiones de RAN y proteína RAN en unos factores de 6 y 5, respectivamente, pero no afectó a los niveles de OPN, usando un análisis mediante transferencias Northern y Western. Además, la transfección estable de células R37-OPN con un vector de expresión para RAN apenas afectó a los niveles de mRNA y proteína de RAN y OPN (Figura 2A). Por contraste, la transfección de células R37 con el vector de expresión para OPN aumentó el mRNA y la proteína para RAN en unos factores similares de 6 y 5, respectivamente. Todos los resultados fueron normalizados usando un gen constitutivo, beta-actina, y fueron cuantificados usando lecturas de densitometría. Se examinó la adhesión de las células transfectadas con RAN a superficies revestidas con laminina mediante un sistema basado en colorantes. La transfección de RAN en células R37, denominadas R37-RAN, produjo un factor de aumento ( $p < 0,01$ ) de la adhesión a placas revestidas con laminina de 3,1, mientras que la transfección del vector de expresión para OPN en células R37, denominadas R37-OPN, produjo un factor de aumento de 11 ( $p < 0,01$ ). Por contraste, RAN no produjo más aumento en la adhesión de las células R37-OPN (Figura 2B). Se examinó la formación de colonias en agar blando para probar el crecimiento independiente del anclaje. La transfección estable del vector de expresión de RAN en células R37 y R37-OPN, denominadas R37-RAN y R37-OPN-RAN, indujo un aumento significativo de 1,6 ( $p < 0,01$ ) y un aumento no significativo de 1,1 ( $p > 0,05$ ) en el número de colonias por placa en comparación con los respectivos testigos R37 y R37-OPN (Figura 2C). Se examinó la capacidad de las células para invadir Matrigel como un ensayo para invasión celular. La migración de transfectantes R37-RAN resultó aumentada en un factor de 907 ( $p < 0,01$ ) con respecto a las células R37 parentales, aproximándose a la de las células R37-OPN, pero una sobreexpresión de RAN no ejerció en células R37-OPN efecto significativo alguno sobre la migración celular ( $p = 0,5$ ) (Figura 2D).

## Ejemplo 5

## Efecto de cDNA antisentido de OPN (as-OPN) y siRNA-RAN sobre la expresión de las proteínas osteopontina y RAN

Un análisis por inmunotransferencia usando mAbs hacia OPN y RAN que reconocen tanto OPN y RAN de ser humano como de rata demostró que las proteínas OPN y RAN estaban reducidas en las células R37-OPN/as-OPN con respecto a las células testigo, R37-OPN (Figura 3A), en unos factores de 5 y 3, respectivamente. Por contraste, sólo los niveles de proteína RAN estaban significativamente reducidos en las células R37-OPN/siRNA-RAN con respecto a las células R37-OPN en un factor de 13, no habiendo reducción significativa alguna de proteína OPN (Figura 3B). Se llevaron a cabo transferencias Western a partir de una colección de extractos de células clonadas, y los mAbs hacia OPN y RAN reconocieron proteínas con unos Mr de 65.000 y 25.000 Da, respectivamente (Figuras 3A y B), consistentes con el tamaño de la OPN (5, 16) y la RAN de líneas celulares de rata (22). Estos resultados sugieren que la inhibición de la expresión de OPN inhibe la de RAN, pero que la inhibición de la expresión de RAN no inhibe la de OPN. En células R37-RAN en que la proteína ligante para RAN, RANBP1, estaba inhibida por la transfección con siRNA-RANBP1, el nivel de la propia proteína RAN resultaba relativamente inafectado (factor de reducción de 1,0) mientras que el de RANBP1 estaba reducido en un factor de 8 en las células R37-RAN/siRNA-RANBP1 (datos no mostrados).

## Ejemplo 6

## Efecto de la inhibición de la expresión de RAN y OPN sobre propiedades celulares

La transfección de células R37-OPN con vectores de expresión para siRNA-RAN y as-OPN redujo significativamente la adhesión celular en unos factores de 8 y 5,3, respectivamente ( $p < 0,01$ ), hasta niveles próximos a los de las células R37 solas. Hubo poco o ningún efecto de estas transfecciones sobre las células R37 solas (Figura 3C). Cuando el vector de expresión para RAN fue establemente cotransfectado en células R37/as-OPN, denominadas R37-RAN/as-OPN, la adhesión celular aumentó en un factor de 3,7 con respecto a las células R37/as-OPN ( $p = 0,0004$ ). Cuando el vector de expresión para RAN fue cotransfectado con aquél para as-OPN en células R37-OPN, denominadas R37-OPN-RAN/as-OPN, la adhesión celular aumentó significativamente en un factor de 3,6 con respecto a las células R37-OPN/as-OPN ( $p < 0,01$ ), superando el efecto inhibitorio de expresión de as-OPN (Figura 3C). La transfección estable de células R37-OPN separadamente con vectores de expresión para siRNA-RAN y as-OPN redujo significativamente la formación de colonias en agar blando en unos factores de 3,4 y 6,9, respectivamente ( $p < 0,01$ ). Hubo poco efecto de la expresión de siRNA-RAN sobre el crecimiento celular de colonias de R37, pero una significativa reducción en un factor de 2 en las células R37/as-OPN ( $p = 0,02$ ) (Figura 3D). Cuando se cotransfectó establemente RAN en células R37/as-OPN, denominadas R37-RAN/as-OPN, la formación de colonias resultó aumentada en un factor de 1,9 con respecto a las células R37/as-OPN ( $p = 0,02$ ), ascendiendo casi a la de las células R37 originales. La reintroducción del vector de expresión de RAN en células R37-OPN/as-OPN, conocidas como células R37-OPN-RAN/as-OPN, causó que la formación de colonias aumentara en un factor de 6 con respecto a la de las células R37-OPN/as-OPN ( $p < 0,01$ ), similar al nivel original en las células R37-OPN. La transfección estable de R37 con el vector de expresión para siRNA o as-OPN ejerció poco o ningún efecto sobre la invasión en células R37. La transfección estable de células R37-OPN con vectores de expresión para siRNA-RAN o as-OPN redujo la invasión de células R37-OPN en unos factores de 4,4 y 2,5, respectivamente (Figura

3E). Además, la transfección estable de células R37-RAN con un vector de expresión para siRNA-RANBP1 redujo la invasión de células R37 en un 70%. Cuando el vector de expresión para RAN fue establemente cotransfectado en células R37/as-OPN, denominadas R37-RAN/as-OPN, la invasión aumentó en un factor de 3,2 con respecto a las células R37/as-OPN ( $p = 0,04$ ). Por contraste, la transfección de R37 con el vector de expresión para Mut.RAN ejerció poco efecto sobre la invasión en células R37 en comparación con Wt.RAN (Figura 5A). Cuando se sobreexpresaba RAN con as-OPN en células R37-OPN, denominadas R37-OPN-RAN/as-OPN, la invasión celular aumentó significativamente en un factor de 1,5 en comparación con las células R37-OPN/as-OPN, superando el efecto inhibitorio de as-OPN (Figura 3E).

Ejemplo 7

10 Efecto de la transfección permanente de RAN sobre la metástasis *in vivo*

La transfección de células Rama 37 con construcción de RAN, construcción de RAN-as-OPN, OPN-pBKCMV/siRNA-RAN o vector pBKCMV solo produjo colonias de células, de 1 a 5 mm de diámetro, que eran visibles después de 10 días. Primero se seleccionaron las colonias de transfectantes R37-OPN, R37-OPN/siRNA-RAN, R37-RAN y R37-RAN/as-OPN y luego se reunieron las colonias restantes. Las colonias celulares reunidas e individuales continuaron creciendo en medio selectivo durante hasta 12 subcultivos, mientras que todas las células Rama 37 parentales no transfectadas murieron en 4 días en este medio. La inyección de cada colección de los transfectantes anteriores a 20 hembras de rata indujo tumores en 14/17 (64%), 0/20 (0%), 10/20 (50%) y 10/19 (53%) animales, respectivamente, de los animales que portaban tumores (test exacto de Fisher: AvB,  $P = 0,00003$ ; AvC,  $P = 1$ ; AvD,  $P = 0,0005$ ; AvE,  $P = 0,0004$ ; BvC,  $P = 0,00001$ ; DvE,  $P = 1$ ; Tabla 2).

20 Tabla 2. Comparación de la incidencia de metástasis producidas por líneas celulares permanentemente transfectadas

Transformantes	Incidencia de tumores <sup>a</sup> (100%)	Incidencia de metástasis <sup>b</sup> (100%)
R37-pBK-CMV	18/20 (90%)	0/18 (0%)
R37-OPN	17/20 (85%)	11/17 <sup>c</sup> (65%)
R37-OPN/siRNA-RAN	20/20 (100%)	0/20 (0%)
R37-RAN	20/20 (100%)	10/20 <sup>c</sup> (50%)
R37-RAN/as-OPN	19/20 (95%)	10/19 <sup>c</sup> (53%)

<sup>a</sup> Número de tumores/número de animales que recibieron inyección.

<sup>b</sup> Número de animales con metástasis/número de animales con tumores primarios.

25 <sup>c</sup> R37-OPN, R37-RAN y R37-RAN/as-OPN fueron muy significativamente diferentes de R37-pBK-CMV y R37-OPN/siRNA-RAN (test exacto de Fisher) ( $p \leq 0,00003$ ), mientras que no hubo diferencia significativa alguna entre R37-pBK-CMV y R37-OPN/siRNA-RAN ( $p = 1$ ) ni entre R37-OPN y R37-RAN y R37-RAN/as-OPN ( $p \geq 0,51$ ).

30 La mayoría de las metástasis se produjeron en los pulmones, con unas pocas metástasis en los ganglios linfáticos, pero no se observaron depósitos metastásicos en otros órganos. Los aspectos histológicos de los tumores primarios de los cuatro grupos fueron similares, consistiendo esencialmente en células en uso mezcladas con células más de forma cúbica, de tipo epitelial.

Ejemplo 8

Establecimiento de la secuencia oligonucleotídica activa en una mezcla de RAN y siRNA

35 El siRNA-RAN consistía en una mezcla de tres secuencias oligonucleotídicas diferentes. Cuando se analizó cada uno de los tres oligonucleótidos por transferencia Western en cuanto a la expresión de proteína RAN, mostraron unos factores de reducción de la expresión de proteína RAN de 1,6, 2,6 y 9,6 en comparación con las células R37-OPN para los oligonucleótidos 1 (ID. SEC. n° 5), 2 (ID. SEC. n° 6) y 3 (ID. SEC. n° 7), respectivamente, ejerciendo el oligonucleótido 3 el mayor efecto (Figura 4A, carriles 2-4). Las combinaciones de los oligonucleótidos 1 y 2, los oligonucleótidos 2 y 3 y los oligonucleótidos 1 y 3 mostraron unos factores de reducción de expresión proteica de 33,4, 9,5 y 21,8, respectivamente (Figura 4A, carriles 5-7). Cada oligonucleótido fue examinado separadamente para evaluar su efecto sobre la adhesión celular. Se transfectaron establemente células R37-OPN con cada uno, separadamente o en combinación, denominándose células R37-OPN-oligo 1; R37-OPN-oligo 2; R37-OPN-oligo 3; R37-OPN-oligo 1, 2; R37-OPN-oligo 2, 3; y R37-OPN-oligo 1, 3. R37-OPN-oligo 1 disminuyó la adhesión celular en un factor de 1,5, R37-OPN-oligo 2 en un factor de 1,4, y R37-OPN-oligo 3 en un factor de 2,5. Los tres oligonucleótidos fueron capaces de disminuir significativamente la adhesión celular, ejerciendo el oligonucleótido 3 el

mayor efecto ( $p = 0,01$ ,  $p = 0,02$  y  $p < 0,005$ , respectivamente). Las células R37-OPN-oligo 1, 2, R37-OPN-oligo 2, 3, y R37-OPN-oligo 1, 3 mostraron una significativa disminución de la adhesión celular en unos factores de 2,6, 2,1 y 14,3, respectivamente, en comparación con las células R37-OPN ( $p = 0,002$ ,  $p = 0,001$  y  $p < 0,005$ , respectivamente). La combinación de los oligonucleótidos 1 y 3 mostró una reducción de adhesión hasta un nivel igual al de la transfección con la construcción siRNA-RAN combinada ( $p < 0,005$ ) (Figura 4B).

Cada oligonucleótido fue también examinado separadamente y en combinación en cuanto a su capacidad para causar una disminución de la formación de colonias en células R37-OPN. Las células R37-OPN-oligo 1 y R37-OPN-oligo 2 causaron una significativa disminución de la formación de colonias (factores de disminución de 2,3 y 2,0,  $p < 0,005$ , respectivamente). Todas las combinaciones de oligonucleótidos causaron una significativa reducción de la formación de colonias. Las células R37-OPN-oligo 1, 2 mostraron un factor de reducción de 2,0 y las células R37-OPN-oligo 2, 3 un factor de reducción de 4,0, mostrando las células R37-OPN-oligo 1, 3 la mayor reducción de la formación de colonias en un factor de 23 ( $p < 0,005$ ) (Figura 4C). Estos resultados sugieren que la capacidad de los oligonucleótidos anteriores para inhibir la formación de colonias y la adhesión celular mediadas por RAN está relacionada con su capacidad para inhibir la expresión de RAN.

### Ejemplo 9

Efecto de RAN sobre la invasión *in vitro* desde un punto de vista del mecanismo

Para examinar si el fenotipo invasivo inducido por RAN era mediado a través de sus proteínas ligantes específicas y/o a través de su actividad GTPasa (41, 44), se inhibieron separadamente ambas actividades en células R37-RAN. En células R37-RAN en que la proteína ligante para RAN, RANBP1, estaba inhibida por transfección con siRNA-RANBP1, el nivel de la propia proteína RAN estaba relativamente inafectado (nivel de  $1,0 \pm S.D.$  en comparación con las células R37-RAN no transfectadas), mientras que el de la proteína RANBP1 estaba reducido en un factor de  $8 \pm S.D.$  en las células R37-RAN/siRNA-RANBP1 (datos no mostrados). También se construyó un doble mutante en la cavidad de RAN que se une a GTP, Mut.RAN (Materiales y Métodos), el cual, cuando se expresaba en un sistema de reticulocitos sintetizador de proteínas, exento de células, producía un menor factor de aumento de la velocidad de hidrólisis de GTP, de 6-8, con respecto a la RAN de tipo silvestre (Wt.), siendo su actividad apenas detectable por encima de la actividad en lisados celulares no programados (Tabla 3).

Tabla 3. Fosfato liberado por lisados que contienen Wt. y Mut.RAN GTPasa

	30 minutos	60 minutos
No programados	1	1
Wt.RAN	$20 \pm 2$	$30 \pm 3,5$
Mut.RAN	$2,5 \pm 0,5$	$5 \pm 1,5$

Se examinaron las cinéticas de reacción para Wt. y Mut.RAN midiendo el fosfato inorgánico liberado tras la hidrólisis de GTP. Los valores de fosfato inorgánico ( $P_i$ ) se obtuvieron de curvas patrón y son los valores medios de tres determinaciones independientes.

Las células R37-RAN/siRNA-RANBP1 y R37-Mut.RAN produjeron reducciones del nivel de invasión de 68% y 82%, respectivamente, en comparación con las células R37-RAN (Figura 5A). Para examinar si RAN/RANBP1 señalizaba una invasión aumentada a través del receptor c-Met y la activación de Akt (44), se midieron los niveles de fosforilación de estas dos proteínas en células R37-RAN y R37-OPN usando una combinación de anticuerpos anti-fosfotirosina y anti-c-Met o un anticuerpo específico hacia fosfoserina 473 de Akt (Materiales y Métodos). Ambas fosfoproteínas de 145 kDa y 65 kDa, correspondientes a la subunidad B de c-Met y a Akt, estaban presentes en niveles mucho mayores en las células R37-OPN (factor de aumento de c-Met de  $3,6 \pm 0,2$ , factor de aumento de Akt de  $21,1 \pm 0,5$ ) y R37-RAN (factor de aumento de c-Met de  $10,4 \pm 0,8$ , factor de aumento de Akt de  $22,5 \pm 0,7$ ) que en las células Rama 37 no transfectadas (c-Met = factor de 1, Akt = factor de 1) o las células Rama 37 transfectadas con vector solo (factor de aumento de c-Met de  $1,6 \pm 0,1$ , factor de aumento de Akt de  $2,2 \pm 0,4$ ) cuando los valores se normalizaban con respecto a la proteína total y la  $\beta$ -actina, respectivamente (Figuras 5B, C). Las células R37-Mut.RAN contenían un nivel indetectable de Akt fosforilado, similar a aquél en las células Rama 37 parentales (factor de aumento = 1) (Figura 5D). La inhibición de la PI3 cinasa (PI3K) por exposición de las células R37-RAN y R37-OPN a LY294002  $50 \mu M$  (38) suprimió completamente los niveles detectables de Akt fosforilado (Figura 5C) y redujo la invasión de células R37-RAN en un 71% hasta un nivel similar al que se ve en las células R37-Wt.RAN/siRNA-RANBP1 (Figura 5A).

### Ejemplo 10

Efecto de una mutación de RAN sobre la actividad GTPasa

Se cebaron lisados de reticulocitos, sintetizadores de proteínas, con vectores de expresión para Wt.RAN y un doble mutante en la cavidad ligante de GTP, Mut.RAN. Se determinó la actividad Wt. y Mut. RAN GTPasa usando el ensayo colorimétrico de verde de malaquita-fosfomolibdato (Innova Biosciences, Reino Unido) (41), que permite medir el fosfato inorgánico liberado tras la hidrólisis de GTP. Se midió la hidrólisis de GTP durante periodos de 30 y 60 minutos. La hidrólisis del Mut.RAN doble fue 6-8 veces menor que la del Wt.RAN (Tabla 3).

La línea celular mamaria R37 benigna de rata, establemente transfectada con un vector de expresión para OPN, células denominadas R37-OPN, aumentó la expresión de OPN en un factor de 10 con respecto a la expresión en las células R37 parentales. Una expresión aumentada de esta magnitud es suficiente para inducir el fenotipo invasivo *in vitro* (1), potenciar la migración celular a través de Matrigel (24) e inducir metástasis en ratas singénicas *in vivo* en este sistema R37 (4). En el presente estudio, la sobreexpresión de cDNA de OPN en células R37-OPN está asociada con una adhesión celular potenciada a superficies revestidas con laminina, un potenciado crecimiento independiente del anclaje en agar blando y una invasión celular potenciada a través de Matrigel. Por lo tanto, las células R37 proporcionan un sistema robusto para el estudio de cambios inducidos por OPN en las células R37 parentales, que conducen al fenotipo invasivo *in vitro* y, por analogía, al estado metastásico *in vivo* (4). Los inventores han identificado la proteína G RAN como un posible efector aguas abajo de la red de señalización inducida por OPN, que puede conducir a la invasión y finalmente a la metástasis. Además, los inventores han identificado genes diferencialmente expresados cuyas proteínas pueden interactuar con, y poseer cierta función de, RAN; éstas incluyen p27 y RAG-1, MDM 2, la proteína 5 ligante de RAN, la oncoproteína E1A de adenovirus, la proteína Spl activada por el promotor de RAN, HLA-A, y la proteína 24 asociada con el receptor de andrógenos.

Cuando se transfectó siRNA-RAN en las células R37-OPN, se determinó que inhibía la producción de OPN, mientras que la transfección del vector de expresión para as-OPN en células R37 que expresan RAN falló a la hora de inhibir la expresión de RAN. Además, cuando se transfectó un vector de expresión para RAN en células R37 independientemente de OPN, tuvo también la capacidad para transformar su fenotipo del mismo modo que el vector de expresión para OPN al inducir una adhesión celular aumentada a superficies revestidas con laminina, un aumentado crecimiento celular independiente del anclaje y una invasión celular aumentada a través de Matrigel, propiedades identificadas con el estado maligno *in vitro* y asociadas con una metástasis aumentada *in vivo*. La transfección permanente de células Rama 37 y R37-as-OPN con el cDNA de RAN en su vector de expresión causa un nivel elevado de proteínas RAN y confiere la capacidad para producir metástasis en ratas singénicas. Puesto que las líneas celulares MCF-7 y ZR-75 relativamente no invasivas expresan niveles bajos tanto de OPN como de RAN y ambos niveles están aumentados en las líneas celulares invasivas MDA MB 435S y MDA MB 231 de cáncer de mama, esto sugiere que sus niveles están coordinadamente regulados.

Los inventores han determinado que la transfección estable de células R37 no invasivas con un vector de expresión para RAN induce el fenotipo invasivo/metastásico, caracterizado en cultivo por una adhesión celular, un crecimiento independiente del anclaje y una invasión a través de Matrigel aumentados, y caracterizado *in vivo* por metástasis en ratas singénicas. En cambio, la transfección estable de células R37-OPN invasivas con siRNA de RAN infrarregula la expresión de RAN e inhibe el fenotipo invasivo/metastásico. Además, la transfección estable de células R37 con Mut.RAN inhibe significativamente la invasión.

Los resultados de los inventores muestran que RAN puede desencadenar que las células produzcan metástasis *in vivo* independientemente de OPN y es la molécula intermedia clave de OPN. De este modo, la expresión de RAN solo es capaz de convertir células R37 en un fenotipo metastásico maligno *in vitro* e *in vivo*. El hecho de que la expresión de tres oligonucleótidos de siRNA dirigidos contra RAN inhiba las tres propiedades asociadas con el estado metastásico maligno en células R37-OPN y que la sobreexpresión de RAN en células R37-OPN con OPN silenciado recree el estado metastásico maligno es consistente con que RAN sea un efector aguas abajo del mismo estado metastásico maligno inducido por OPN. Esta conclusión es confirmada por las similares disminuciones graduales en la expresión de proteína RAN (Figura 4A) y en la adhesión celular (Figura 4B) y en el crecimiento independiente del anclaje (Figura 4C) cuando las células R37-OPN son transfectadas individualmente o en combinaciones binarias con los tres oligonucleótidos de siRNA dirigidos contra RAN. Además, la expresión de RAN en células R37-OPN con OPN silenciado restablece completamente su potencial invasivo *in vitro* e *in vivo*, respectivamente (Figura 3E, Tabla 2), sugiere que RAN solo y también desempeña un papel importante en la inducción de invasión por OPN en el sistema de células R37.

Además, se determinó que la sobreexpresión de RAN en células R37 aumentaba tanto el receptor MET como la fosforilación de Akt y que el tratamiento de células R37-RAN con el inhibidor LY 294002 de la fosfoinositol 3 cinasa (PI3K) suprimía completamente la fosforilación de Akt y reducía la invasión celular.

Los inventores han determinado además que un inhibidor de la invasión por células R37, mediada por RAN, es el inhibidor LY 294002 de la fosfoinositol 3 cinasa (PI3K). Los inventores han determinado también que el tratamiento de células R37-RAN con LY 294002 inhibe la fosforilación de Akt.

Se pueden realizar diversas modificaciones en la invención descrita en esta memoria sin desviarse del alcance de la invención.

## Referencias



1. Behrend, E. I., Craig, A. M., Wilson, S. M., Denhardt, D. T. y Chambers, A. F. Reduced malignancy of ras-transformed NIH 3T3 cells expressing antisense osteopontin RNA. *Cancer Res.*, *54*: 832-837, 1994.
2. Euer, N., Schwirzke, M., Evtimova, V., Burtscher, H., Jarsch, M., Tarin, D. y Weidle, U. H. Identification of genes associated with metastasis of mammary carcinoma in metastatic versus non-metastatic cell lines. *Anticancer Res.*, *22*: 733-740, 2002.
3. Tuck, A. B., Hota, C. y Chambers, A. F. Osteopontin (OPN)-induced increase in human mammary epithelial cell invasiveness is urokinase (uPA)-dependent. *Breast Cancer Res. Treat.*, *70*: 197-204, 2001.
4. Oates, A. J., Barraclough, R. y Rudland, P. S. The identification of osteopontin as a metastasis-related gene product in a rodent mammary tumour model. *Oncogene*, *13*: 97-104, 1996.
5. Rudland, P. S., Platt-Higgins, A., Renshaw, C., West, C. R., Winstanley, J. H., Robertson, L. y Barraclough, R. Prognostic significance of the metastasis-inducing protein S100A4 (p9Ka) in human breast cancer. *Cancer Res.*, *60*: 1595-1603, 2000.
6. Tuck, A. B., O'Malley, F. P., Singhal, H., Harris, J. F., Tonkin, K. S., Kerkvliet, N., Saad, Z., Doig, G. S. y Chambers, A. F. Osteopontin expression in a group of lymph node negative breast cancer patients. *Int. J. Cancer*, *79*: 502-508, 1998.
7. Rudland, P. S., Platt-Higgins, A., El-Tanani, M., De Silva Rudland, S., Barraclough, R., Winstanley, J. H., Howitt, R. y West, C. R. Prognostic significance of the metastasis-associated protein osteopontin in human breast cancer. *Cancer Res.*, *62*: 3417-3427, 2002.
8. Singhal, H., Bautista, D. S., Tonkin, K. S., O'Malley, F. P., Tuck, A. B., Chambers, A. F. y Harris, J. F. Elevated plasma osteopontin in metastatic breast cancer associated with increased tumor burden and decreased survival. *Clin. Cancer Res.*, *3*: 605-611, 1997.
9. Dunnington, D. J., Hughes, C. M., Monaghan, P. y Rudland, P. S. Phenotypic instability of rat mammary tumor epithelial cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, *71*: 1227-1240, 1983.
13. Liu, D., Rudland, P. S., Sibson, D. R. y Barraclough, R. Identification of mRNAs differentially-expressed between benign and malignant breast tumour cells. *Br. J. Cancer*, *87*: 423-431, 2002.
14. Berns, K., Hijmans, E. M., Mullenders, J., Brummelkamp, T. R., Velds, A., Heimerikx, M., Kerkhoven, R. M., Madiredjo, M., Nijkamp, W., Weigelt, B., Agami, R., Ge, W., Cavet, G., Linsley, P. S., Beijersbergen, R. L. y Bernards, R. A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature*, *428*: 431-437, 2004.
15. Brummelkamp, T. R., Bernards, R. y Agami, R. Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell*, *2*: 243-247, 2002.
16. El-Tanani, M., Barraclough, R., Wilkinson, M. C. y Rudland, P. S. Metastasis-inducing DNA regulates the expression of the osteopontin gene by binding the transcription factor Tcf-4. *Cancer Res.*, *61*: 5619-5629, 2001.
17. El-Tanani, M., Platt-Higgins, A., Rudland, P. S. y Campbell, F. C. Ets gene, PEA3 cooperates with beta-Catenin-Lef-1 and c-jun in regulation of Osteopontin transcription. *J. Biol. Chem.*, *5*: 5, 2004.
18. Mayo, M. W. y Baldwin, A. S. The transcription factor NF-kappaB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Biochim. Biophys. Acta*, *1470*: M55-62, 2000.
19. Fenrick, R., Wang, L., Nip, J., Amann, J. M., Rooney, R. J., Walker-Daniels, J., Crawford, H. C., Hulboy, D. L., Kinch, M. S., Matrisian, L. M. y Hiebert, S. W. TEL, a putative tumor suppressor, modulates cell growth and cell morphology of ras-transformed cells while repressing the transcription of stromelysin-1. *Mol. Cell. Biol.*, *20*: 5828-5839, 2000.
20. Davies, B. R., Barraclough, R. y Rudland, P. S. Induction of metastatic ability in a stably diploid benign rat mammary epithelial cell line by transfection with DNA from human malignant breast carcinoma cell lines. *Cancer Res.*, *54*: 2785-2793, 1994.
21. Jamieson, S., Barraclough, R. y Rudland, P. S. Generation of metastatic variants by transfection of a nonmetastatic rat mammary epithelial cell line with DNA from a metastatic rat mammary cell line. *Pathobiology*, *58*: 329-342, 1990.
23. Chen, H., Ke, Y., Oates, A. J., Barraclough, R. y Rudland, P. S. Isolation of and effector for metastasis-inducing DNAs from a human metastatic carcinoma cell line. *Oncogene*, *14*: 1581-1588, 1997.
24. Su, L., Mukherjee, A. B. y Mukherjee, B. B. Expression of antisense osteopontin RNA inhibits tumor promoter-

- induced neoplastic transformation of mouse JB6 epidermal cells. *Oncogene*, 10: 2163-2169, 1995.
26. Lounsbury, K. M., Richards, S. A., Carey, K. L. y Macara, I. G. Mutations within the Ran/TC4 GTPase. Effects on regulatory factor interactions and subcellular localization. *J. Biol. Chem.*, 271: 32.834-32.841, 1996.
- 5 27. Pihan, G. A. y Doxsey, S. J. The mitotic machinery as a source of genetic instability in cancer. *Semin. Cancer Biol.*, 9: 289-302, 1999.
28. Azuma, K., Sasada, T., Takedatsu, H., Shomura, H., Koga, M., Maeda, Y., Yao, A., Hirai, T., Takabayashi, A., Shichijo, S. e Itoh, K. Ran, a small GTPase gene, encodes cytotoxic T lymphocyte (CTL) epitopes capable of inducing HLA-A33-restricted and tumor-reactive CTLs in cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, 10: 6695-6702, 2004.
- 10 29. Hao, X., Sun, B., Hu., L., Lahdesmaki, H., Dunmire, V., Feng, Y., Zhang, S. W., Wang, H., Wu, C., Fuller, G. N., Symmans, W. F., Shmulevich, I. y Zhang, W. Differential gene and protein expression in primary breast malignancies and their lymph node metastases as revealed by combined cDNA microarray and tissue microarray analysis. *Cancer*, 100: 1110-1122, 2004.
30. De Luca, A., Mangiacasale, R., Severino, A., Malquori, L., Baldi, A., Palena, A., Mileo, A. M., Lavia, P. y Paggi, M. G. E1A deregulates the centrosome cycle in a Ran GTPase-dependent manner. *Cancer Res.*, 63: 1430-1437, 15 2003.
31. Frisch, S. M. y Mymryk, J. S. Adenovirus-5 E1A: paradox and paradigm. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 3: 441-452, 2002.
32. Teodoro, J. G., Shore, G. C. y Branton, P. E. Adenovirus E1A proteins induce apoptosis by both p53-dependent and p53-independent mechanisms. *Oncogene*, 11: 467-474, 1995.
- 20 33. Moye, V. E., Barraclough, R., West, C., Rudland, P. S., Jenkinson, S. R. y West, C. R. Osteopontin expression correlates with adhesive and metastatic potential in metastasis-inducing DNA-transfected rat mammary cell lines.
34. Aplin, A. E. y Juliano, R. L. Regulation of nucleocytoplasmic trafficking by cell adhesion receptors and the cytoskeleton. *J. Cell Biol.*, 155: 187-191, Epub 15 de octubre de 2001, 2001.
- 25 35. Bamba, C., Bobinsec, Y., Fukuda, M. y Nishida, E. The GTPase Ran regulates chromosome positioning and nuclear envelope assembly in vivo. *Curr. Biol.*, 12: 503-507, 2002.
36. Moore, J. D. The Ran-GTPase and cell-cycle control. *Bioessays*, 23: 77-85, 2001.
37. Denti, S., Sirri, A., Cheli, A., Rogge, L., Innamorati, G., Putignano, S., Fabbri, M., Pardi, R. y Bianchi, E. RanBPM is a phosphoprotein that associates with the plasma membrane and interacts with the integrin LFA-1. *J. Biol. Chem.*, 279: 13.027-13.034, 2004.
- 30 38. Davies, S. P., Reddy, H., Cairano, Mond y Cohen, P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.*, 351: 95-105, 2000.
39. Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F. T., Douglas, S. H., Field, S. L., Bell, S. M., Combaret, V., Puisieux, A., Mighell, A. J., Robinson, P. A., Inglehearn, C. F., Isaacs, J. D. y Markham, A. F. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene 35 rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnol.*, 3: 18, 2003.
40. El-Tanani, M. K., Barraclough, R., Wilkinson, M. C. y Rudland, P. S. Regulatory region of metastasis-inducing DNA is the binding site for T cell factor-4. *Oncogene*, 20: 1793-7, 2001.
41. Margalit, D. N., Romberg, L., Mets, R. B., Hebert, A. M., Mitchison, T. J., Kirschner, M. W. y RayChaudhuri, D. Targeting cell division: small-molecule inhibitors of FtsZ GTPase perturb cytokinetic ring assembly and induce 40 bacterial lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101: 11.821-6, 2004.
42. Sakata, H., Stahl, S. J., Taylor, W. G., Rosenberg, J. M., Sakaguchi, K., Wingfield, P. T. y Rubin, J. S. Heparin binding and oligomerization of hepatocyte growth factor/scatter factor isoforms. Heparan sulfate glycosaminoglycan requirement for Met binding and signaling. *J. Biol. Chem.*, 272: 9457-63, 1997.
43. Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. y Sabatini, D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307: 1098-101, 2005.
- 45 44. Wang, D., Li, Z., Messing, E. M. y Wu, G. Activation of Ras/Erk pathway by a novel MET-interacting protein RanBPM. *J. Biol. Chem.*, 277: 36.216-22, 2002.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> The Queen's university of Belfast  
 <120> ENSAYO  
 <130> P45896.WO.01  
 10 <150> GB 0618486.5  
 <151> 20-09-2006  
 <150> GB0625379.3  
 <151> 20-12-2006  
 15 <160> 26  
 <170> PatentIn versión 3.3  
 20 <210> 1  
 <211> 216  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 1  
  
 Met Ala Ala Gln Gly Glu Pro Gln Val Gln Phe Lys Leu Val Leu Val  
 1 5 10 15  
 Gly Asp Gly Gly Thr Gly Lys Thr Thr Phe Val Lys Arg His Leu Thr  
 20 25 30  
 Gly Glu Phe Glu Lys Lys Tyr Val Ala Thr Leu Gly Val Glu Val His  
 35 40 45  
 Pro Leu Val Phe His Thr Asn Arg Gly Pro Ile Lys Phe Asn Val Trp  
 50 55 60  
 Asp Thr Ala Gly Gln Glu Lys Phe Gly Gly Leu Arg Asp Gly Tyr Tyr  
 65 70 75 80  
 Ile Gln Ala Gln Cys Ala Ile Ile Met Phe Asp Val Thr Ser Arg Val  
 85 90 95  
 Thr Tyr Lys Asn Val Pro Asn Trp His Arg Asp Leu Val Arg Val Cys  
 100 105 110  
 Glu Asn Ile Pro Ile Val Leu Cys Gly Asn Lys Val Asp Ile Lys Asp  
 115 120 125  
 Arg Lys Val Lys Ala Lys Ser Ile Val Phe His Arg Lys Lys Asn Leu  
 130 135 140  
 Gln Tyr Tyr Asp Ile Ser Ala Lys Ser Asn Tyr Asn Phe Glu Lys Pro  
 145 150 155 160  
 25 Phe Leu Trp Leu Ala Arg Lys Leu Ile Gly Asp Pro Asn Leu Glu Phe  
 165 170 175

ES 2 453 374 T3

Val Ala Met Pro Ala Leu Ala Pro Pro Glu Val Val Met Asp Pro Ala  
 180 185 190  
 Leu Ala Ala Gln Tyr Glu His Asp Leu Glu Val Ala Gln Thr Thr Ala  
 195 200 205  
 Leu Pro Asp Glu Asp Asp Asp Leu  
 210 215

5

<210> 2  
 <211> 1656  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 2  
 cgcccctgct ctccgcccgg cgtcggctgc gtctccggcg tttgaattgc gcttccgcca 60  
 tctttccagc ctcagtcgga cgggcgcgga ggcgcttctg gaaggaacgc cgcgatggct 120  
 gcgcagggag agccccaggt ccagttcaaa cttgtattgg ttggtgatgg tggactgga 180  
 aaaacgacct tcgtgaaacg tcatttgact ggtgaatttg agaagaagta tgtagccacc 240  
 ttgggtgttg aggttcatcc cctagtgttc cacaccaaca gaggacctat taagttcaat 300  
 gtatgggaca cagccggcca ggagaaattc ggtggactga gagatggcta ttatatcaa 360  
 gcccagtgtg ccatcataat gtttgatgta acatcgagag ttacttaca gaatgtgctc 420  
 aactggcata gagatctggt acgagtgtgt gaaaacatcc ccattgtgtt gtgtggcaac 480  
 aaagtggata ttaaggacag gaaagtgaag gcgaaatcca ttgtcttcca ccgaaagaag 540  
 aatcttcagt actacgacat ttctgcaaa agtaactaca actttgaaa gcccttctc 600  
 tggcttgcta ggaagctcat tggagacct aacttggat ttgttgccat gcctgctctc 660  
 gccccaccag aagttgctat ggaccagct ttggcagcac agtatgagca cgacttagag 720  
 gttgctcaga caactgctct cccggatgag gatgatgacc tgtgagaatg aagctggagc 780  
 ccagcgtcag aagctagtgt ttataggcag ctgtcctgtg atgtcagcgg tgcagcgtgt 840  
 gtgccacctc attattatct agctaagcgg aacatgtgct ttatctgtgg gatgctgaag 900  
 gagatgagtg ggcttcggag tgaatgtggc agtttaaaa ataacttcat tgtttggacc 960  
 tgcataatgta gctgtttgga cgcagttgat tccttgagtt tcatatataa gactgctgca 1020  
 gtcacatcac aatattcagt ggtgaaatct tgtttgttac tgcattccc attccttttc 1080  
 tttagaatca gaataaagtt gtatttcaaa tatctaagca agtgaactca tcccttgttt 1140  
 ataataagca tttggaaacc actaaagtag ggaagtttta tgccatgta atatttgaat 1200  
 tgccttgctt ttatcactta atttgaaatc tattgggta atttctccct atgtttattt 1260  
 ttgtacattt gagccatgct acacaaactg atgatgacag gtcagcagta ttctatttgg 1320  
 ttagaagggt tacatggtgt aatattagt gcagttaagc taaagcagtg tttgctccac 1380  
 cttcatattg gctaggtagg gtcacctagg gaagcacttg ctcaaaatct gtgacctgtc 1440  
 agaataaaaa tgtggtttgt acatatcaaa tagatatttt aagggttaata ttttctttta 1500

10

ES 2 453 374 T3

tggcaaaagt aatcatgttt taatgtagaa cctcaaacag gatggaacat cagtggatgg 1560  
 caggaggttg ggaattcttg ctgttaaaaa taattacaaa tttgacactt tttgtttgaa 1620  
 tgttagatgc ttagtgtgaa gttgatagcg aagccg 1656

5

<210> 3  
 <211> 201  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10

<400> 3  
 Met Ala Ala Ala Lys Asp Thr His Glu Asp His Asp Thr Ser Thr Glu  
 1 5 10 15  
 Asn Thr Asp Glu Ser Asn His Asp Pro Gln Phe Glu Pro Ile Val Ser  
 20 25 30  
 Leu Pro Glu Gln Glu Ile Lys Thr Leu Glu Glu Asp Glu Glu Glu Leu  
 35 40 45  
 Phe Lys Met Arg Ala Lys Leu Phe Arg Phe Ala Ser Glu Asn Asp Leu  
 50 55 60  
 Pro Glu Trp Lys Glu Arg Gly Thr Gly Asp Val Lys Leu Leu Lys His  
 65 70 75 80  
 Lys Glu Lys Gly Ala Ile Arg Leu Leu Met Arg Arg Asp Lys Thr Leu  
 85 90 95  
 Lys Ile Cys Ala Asn His Tyr Ile Thr Pro Met Met Glu Leu Lys Pro  
 100 105 110  
 Asn Ala Gly Ser Asp Arg Ala Trp Val Trp Asn Thr His Ala Asp Phe  
 115 120 125  
 Ala Asp Glu Cys Pro Lys Pro Glu Leu Leu Ala Ile Arg Phe Leu Asn  
 130 135 140  
 Ala Glu Asn Ala Gln Lys Phe Lys Thr Lys Phe Glu Glu Cys Arg Lys  
 145 150 155 160  
 Glu Ile Glu Glu Arg Glu Lys Lys Ala Gly Ser Gly Lys Asn Asp His  
 165 170 175  
 Ala Glu Lys Val Ala Glu Lys Leu Glu Ala Leu Ser Val Lys Glu Glu  
 180 185 190  
 Thr Lys Glu Asp Ala Glu Glu Lys Gln  
 195 200

15

<210> 4  
 <211> 884  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 453 374 T3

cgaggttcgg gtcgtggggc ggaggggaaga gcggggcgggc gggaggcgcc ggcgccagac 60  
 gcgggaggaa ggagctacga gtagccgccg agaggccgcg gagccagcga cgaccgaccc 120  
 agccgagccg ccgccgccgc cgcgccccca tggcggccgc caaggacact catgaggacc 180  
 atgatacttc cactgagaat acagacgagt ccaacatga ccctcagttt gagccaatag 240  
 tttctcttcc tgagcaagaa attaaaacac tggagaaga tgaagaggaa ctttttaaaa 300  
 tgcgggcaaa actgttccga tttgcctctg agaacgatct cccagaatgg aaggagcgag 360  
 gcactgggta cgtcaagctc ctgaagcaca aggagaaagg ggccatccgc ctctcatgc 420  
 ggagggacaa gaccctgaag atctgtgcc aaccactacat cacgccgatg atggagctga 480  
 agcccaacgc aggtagcgac cgtgcctggg tctggaacac ccacgctgac ttcgccgacg 540  
 agtgcctcaa gccagagctg ctggccatcc gcttctgaa tgctgagaat gcacagaaat 600  
 tcaaaacaaa gtttgaagaa tgcaggaaag agatcgaaga gagagaaaag aaagcaggat 660  
 caggcaaaaa tgatcatgcc gaaaaagtgg cggaaaagct agaagctctc tcggtgaagg 720  
 aggagaccaa ggaggatgct gaggagaagc aataaatcgt cttattttat tttcttttcc 780  
 tctcttttct ttcctttttt taaaaaattt taccctgccc ctctttttcg gtttgttttt 840  
 attctttcat ttttacaagg gacgttatat aaagaactga actc 884

5  
 <210> 5  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10  
 <220>  
 <223> siRNA

<400> 5  
 aaaaacgacc ttcgtgaaac gtcac 25

15  
 <210> 6  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20  
 <220>  
 <223> siRNA

<400> 6  
 aagcccagtg tgccatcata at 22

25  
 <210> 7  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

30  
 <220>  
 <223> siRNA

35  
 <400> 7  
 aagtatgtag ccacctggg t 21

40  
 <210> 8  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> siRNA

	<400> 8 tacagacgag tccaacat	19
5	<210> 9 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> siRNA	
15	<400> 9 ccactacatc acgccgatg	19
20	<210> 10 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> siRNA	
30	<400> 10 ggacactcat gaggacat	19
35	<210> 11 <211> 35 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> oligonucleótido	
45	<400> 11 aactgtatt ggtggtgat gttggtactg gaaaa	35
50	<210> 12 <211> 35 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> oligonudeotide	
60	<400> 12 tttccagta ccaacatcac caaccaatac aagtt	35
65	<210> 13 <211> 36 <212> ADN <213> Artificial	
70	<220> <223> oligonucleótido	
75	<400> 13 gggacacagc cggcctggag aaattcggtg gactga	36
80	<210> 14 <211> 36 <212> ADN <213> Artificial	
85	<220> <223> oligonucleótido	

ES 2 453 374 T3

	<400> 14 tcagtcacc gaattctcc aggccgctg tgtccc	36
5	<210> 15 <211> 17 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> oligonucleótido	
15	<400> 15 gatcgcgac gggttgt	17
20	<210> 16 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> oligonucleótido	
30	<400> 16 ttcagcgag gcattcc	18
35	<210> 17 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> oligonucleótido	
45	<400> 17 gctgctcct accctagtct ca	22
50	<210> 18 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> oligonucleótido	
60	<400> 18 gctgctcgtg tctggaattg t	21
65	<210> 19 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial	
70	<220> <223> oligonucleótido	
75	<400> 19 cagggtagtt tagttgaggt tgacag	26
80	<210> 20 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	



ES 2 453 374 T3

	<220>	
	<223> oligonucleótido	
	<400> 20	
5	ctatactggt ggtcagtgcc aaagt	25
	<210> 21	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
10		
	<220>	
	<223> oligonucleótido	
	<400> 21	
15	tactggaaaa acgacctt	18
	<210> 22	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20		
	<220>	
	<223> oligonucleótido	
	<400> 22	
25	tcccatacat tgaactta	18
	<210> 23	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30		
	<220>	
	<223> oligonucleótido	
	<400> 23	
35	gtaaccggtt gaacccatt	20
	<210> 24	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40		
	<220>	
	<223> oligonucleótido	
	<400> 24	
45	ccatccaatc ggtagtagcg	20
	<210> 25	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
50		
	<220>	
	<223> oligonucleótido	
	<400> 25	
55	atggctgctc agggagag	18
	<210> 26	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60		
	<220>	
	<223> oligonucleótido	
	<400> 26	
65		

<220>  
<223> oligonucleótido  
<400> 26  
ggggcgagag caggcatg

5

18

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método para identificar un agente modulador de la transformación maligna de células mediada por la glicofosfoproteína osteopontina (OPN), en donde hay una fijación y una migración potenciadas de células malignas y una contribución potenciada al crecimiento de células tumorales independiente del anclaje, método que comprende las operaciones de:
- proporcionar un ensayo que comprende al menos un miembro seleccionado del grupo que comprende RAN, la Proteína 1 Ligante de RAN, un fragmento activo de un polipéptido de RAN, un fragmento activo de un polipéptido de la Proteína 1 Ligante de RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica la Proteína 1 Ligante de RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento activo de RAN y una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento activo de la Proteína 1 Ligante de RAN,
  - poner un candidato a agente modulador en contacto con dicho ensayo bajo unas condiciones adecuadas; y
  - detectar una variación en la actividad del ensayo al comparar la actividad del ensayo sin dicho candidato con la actividad del ensayo en presencia de dicho candidato.
- 15 2. Un método para determinar si una célula tumoral presenta potencial invasivo y/o metastásico, que comprende las operaciones:
- determinar el nivel de un marcador en una célula tumoral de una muestra, en donde el marcador es al menos un miembro del grupo que comprende RAN, la Proteína 1 Ligante de RAN, un fragmento activo de un polipéptido de RAN, un fragmento activo de un polipéptido de la Proteína 1 Ligante de RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica la Proteína 1 Ligante de RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento activo de RAN y una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento activo de la Proteína 1 Ligante de RAN, y
- 20 comparar el nivel del marcador detectado con el nivel determinado para el marcador en una célula tumoral no invasiva y/o no metastásica,
- en donde un aumento del nivel del marcador en la célula tumoral de la muestra es indicativo de que la célula tumoral presenta potencial invasivo y/o metastásico.
- 25 3. Un método *in vitro* para controlar un tumor con objeto de determinar el potencial invasivo y/o metastásico de dicho tumor, método que comprende las operaciones de:
- a) detectar el nivel de un marcador en la célula tumoral en un primer punto temporal, en donde el marcador es al menos un miembro del grupo que comprende RAN, la Proteína 1 Ligante de RAN, un fragmento activo de un polipéptido de RAN, un fragmento activo de un polipéptido de la Proteína 1 Ligante de RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica la Proteína 1 Ligante de RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento activo de RAN y una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento activo de la Proteína 1 Ligante de RAN,
  - b) repetir la operación a) en un punto temporal posterior, y
  - c) comparar los niveles del marcador en las operaciones a) y b), en donde un aumento del nivel del marcador desde un primer punto temporal hasta un posterior punto temporal es indicativo de que la célula tumoral está adquiriendo potencial invasivo y/o metastásico.
- 35 4. Un método para la identificación de un agente que inhibe la invasión y/o la metástasis por una célula tumoral en una muestra, método que comprende las operaciones:
- 40 obtener de una muestra al menos unas partes alícuotas primera y segunda, en donde cada parte alícuota comprende al menos una célula tumoral;
- exponer una primera parte alícuota de la muestra a un primer agente de ensayo;
- exponer una segunda parte alícuota de la muestra a un segundo agente de ensayo;
- opcionalmente, exponer otra parte alícuota de la muestra a otro respectivo agente de ensayo;
- 45 determinar el nivel de un marcador de una célula tumoral de cada parte alícuota, en donde el marcador es al menos un miembro del grupo que comprende RAN, la Proteína 1 Ligante de RAN, un fragmento activo de un polipéptido de RAN, un fragmento activo de un polipéptido de la Proteína 1 Ligante de RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica la Proteína 1 Ligante de RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento activo de RAN y una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento activo de la Proteína 1 Ligante de RAN,
- 50

comparar los niveles del marcador detectados en cada una de las partes alícuotas, e

identificar el agente que proporciona un nivel más bajo de marcador en una parte alícuota con ese agente con respecto a los demás agentes.

5. Un método para la identificación de un agente que puede causar invasión y/o metástasis por una célula tumoral, método que comprende las operaciones:

obtener de la muestra al menos unas partes alícuotas primera y segunda, en donde cada parte alícuota comprende al menos una célula tumoral;

exponer una primera parte alícuota de la muestra a un primer agente de ensayo;

10 determinar el nivel de un marcador de una célula tumoral de cada parte alícuota, en donde el marcador es al menos un miembro del grupo que comprende RAN, la Proteína 1 Ligante de RAN, un fragmento activo de un polipéptido de RAN, un fragmento activo de un polipéptido de la Proteína 1 Ligante de RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica la Proteína 1 Ligante de RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento activo de RAN y una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento activo de la Proteína 1 Ligante de RAN, y

15 comparar los niveles del marcador detectados en cada una de las partes alícuotas,

en donde un nivel aumentado del marcador en la parte alícuota expuesta al agente, con respecto a la parte alícuota no expuesta al agente, es indicativo de que el agente presenta potencial invasivo y metastásico.

6. Los métodos según cualquiera de las Reivindicaciones 2 a 5, en donde el nivel del marcador se determina detectando un polinucleótido transcrito, o una porción del mismo, que codifica RAN o la Proteína 1 Ligante de RAN.

20 7. El método según cualquiera de las Reivindicaciones 2 a 5, en donde el nivel del marcador se determina detectando la unión de un anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo con especificidad de unión hacia un polipéptido de RAN, un polipéptido de la Proteína 1 Ligante de RAN, un fragmento activo de RAN o un fragmento activo de la Proteína 1 Ligante de RAN.

8. Uso de un kit que comprende un reactivo seleccionado de entre:

25 a) un anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo con especificidad de unión hacia RAN, la Proteína 1 Ligante de RAN, un fragmento activo de RAN o un fragmento activo de la Proteína 1 Ligante de RAN, o

b) una sonda de ácido nucleico capaz de hibridarse con un ácido nucleico que codifica RAN, la Proteína 1 Ligante de RAN o un fragmento activo de RAN o un fragmento activo de la Proteína 1 Ligante de RAN,

30 en el diagnóstico *in vitro* de si una célula tumoral es invasiva o metastásica, en donde se evalúa el nivel de al menos un miembro del grupo que comprende RAN, la Proteína 1 Ligante de RAN, un fragmento activo de un polipéptido de RAN, un fragmento activo de un polipéptido de la Proteína 1 Ligante de RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica la Proteína 1 Ligante de RAN, una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento activo de RAN, y una secuencia de ácido nucleico que codifica un fragmento activo de la Proteína 1 Ligante de RAN.

35 9. Un ácido nucleico que es capaz de unirse, bajo condiciones rigurosas, con un polinucleótido que codifica RAN (ID. SEC. nº 1) o con un polinucleótido que codifica la Proteína 1 Ligante de RAN (ID. SEC. nº 3) o un fragmento de dicho polinucleótido que codifica un fragmento activo de RAN o codifica un fragmento activo de la Proteína 1 Ligante de RAN, para uso en el tratamiento de un cáncer metastásico y/o invasivo.

40 10. Un ácido nucleico para uso en el tratamiento de un cáncer metastásico y/o invasivo según la Reivindicación 9, en donde dicho ácido nucleico es seleccionado de entre la ID. SEC. nº 5, la ID. SEC. nº 6, la ID. SEC. nº 7, la ID. SEC. nº 8, la ID. SEC. nº 9 y la ID. SEC. nº 10.

11. Un ácido nucleico para uso en el tratamiento de un cáncer metastásico y/o invasivo según la Reivindicación 9 o la Reivindicación 10, caracterizado por que dicho cáncer es cáncer de mama.

12. Un kit que comprende un reactivo seleccionado de entre:

45 a) un anticuerpo, derivado de anticuerpo o fragmento de anticuerpo con especificidad de unión hacia RAN, la Proteína 1 Ligante de RAN, o un fragmento activo de RAN o un fragmento activo de la Proteína 1 Ligante de RAN, o

b) una sonda de ácido nucleico capaz de hibridarse con un ácido nucleico que codifica RAN, la Proteína 1 Ligante de RAN o un fragmento activo de RAN o de la Proteína 1 Ligante de RAN,

para uso en un método para el diagnóstico *in vivo* de si una célula tumoral es invasiva o metastásica.

Figura 1

Fig.1A

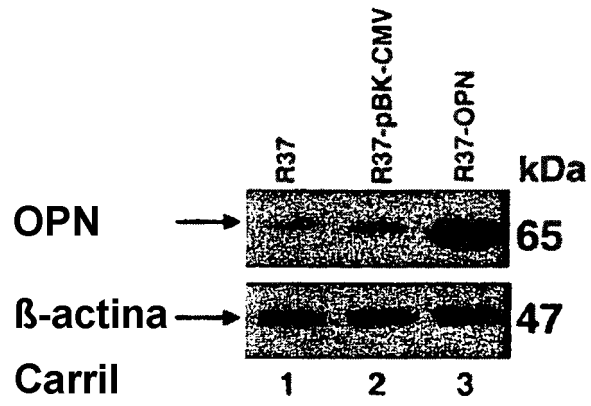
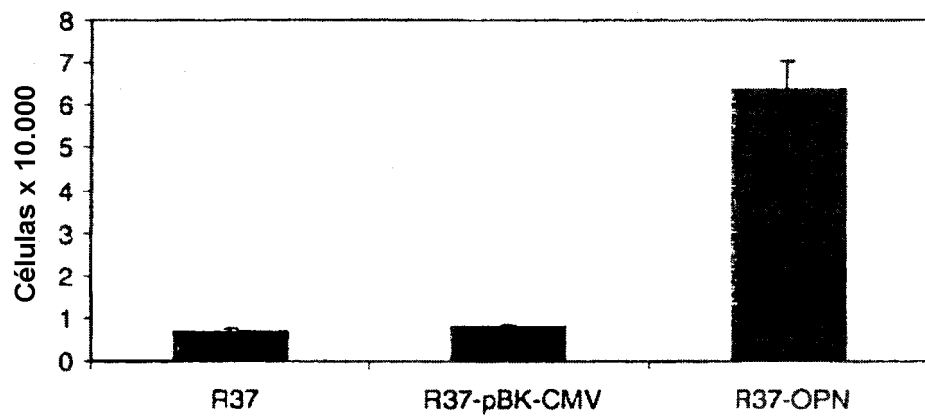
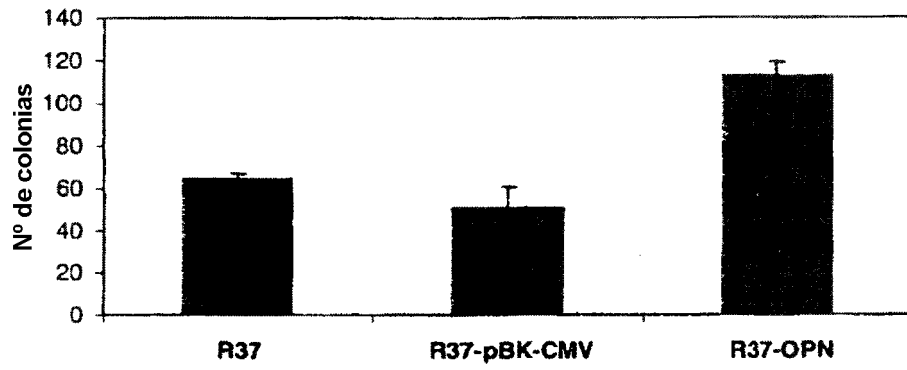


Fig.1B



**Fig. 1C**



**Fig.1D**

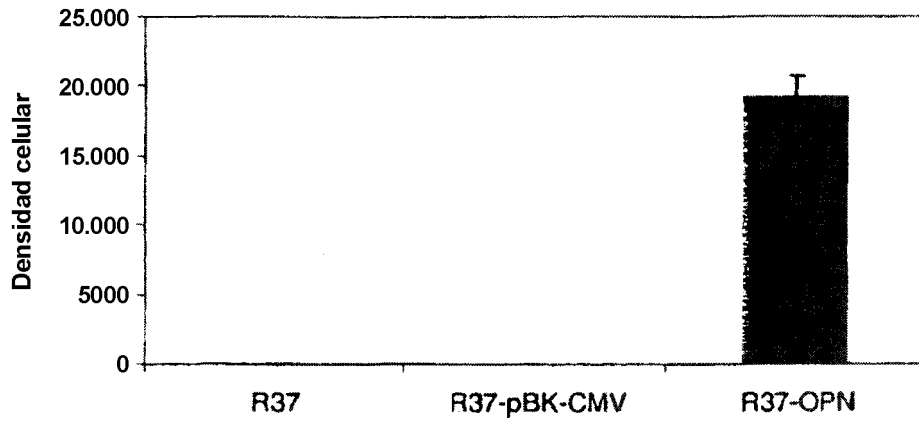


Figura 2

Fig.2A

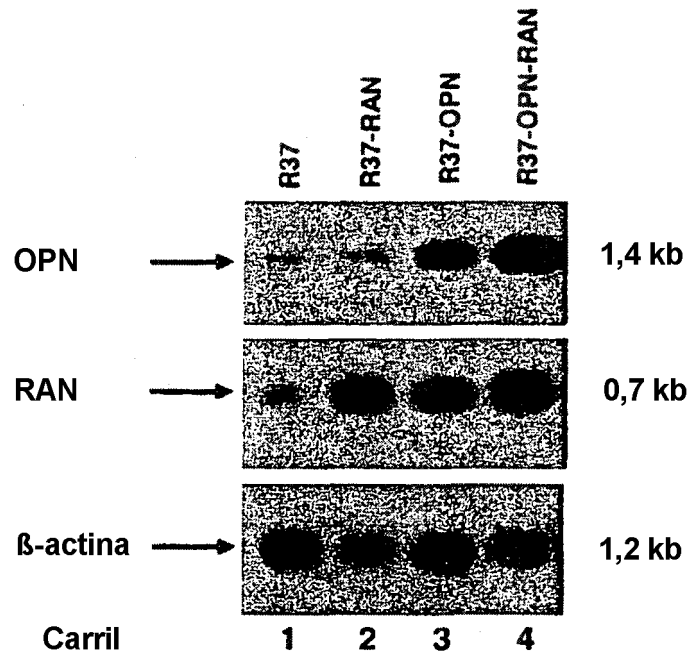


Fig.2B

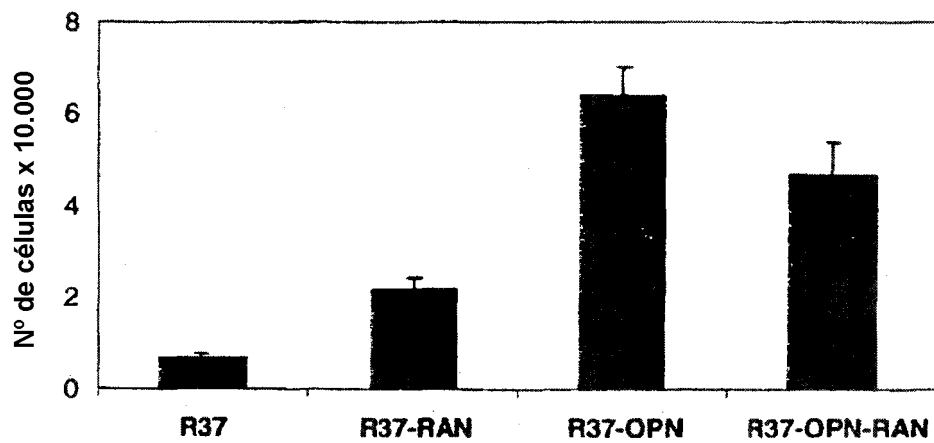


Fig.2C

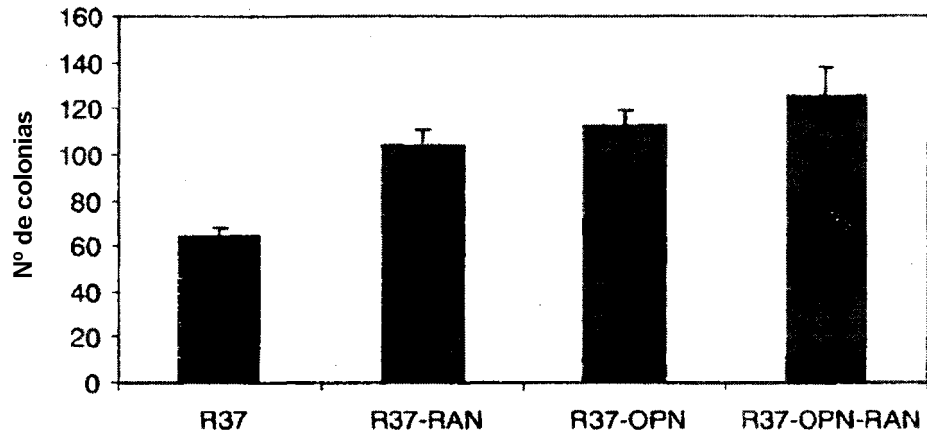


Fig.2D

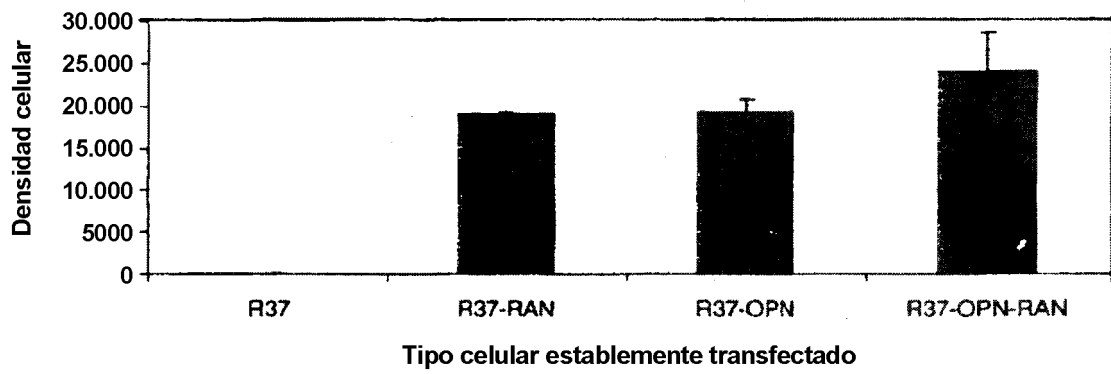




Figura 3

Fig.3A

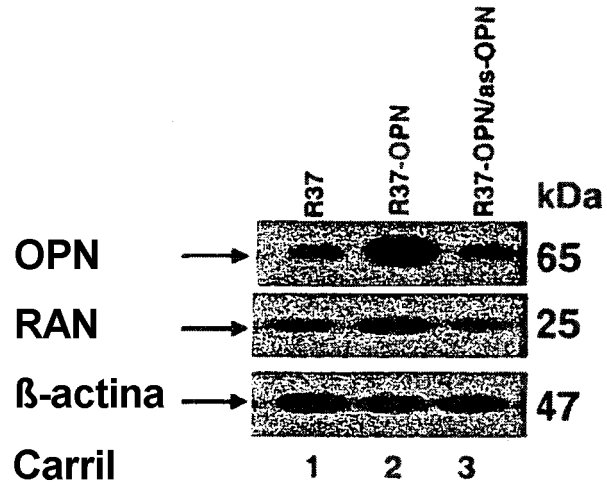


Fig.3B

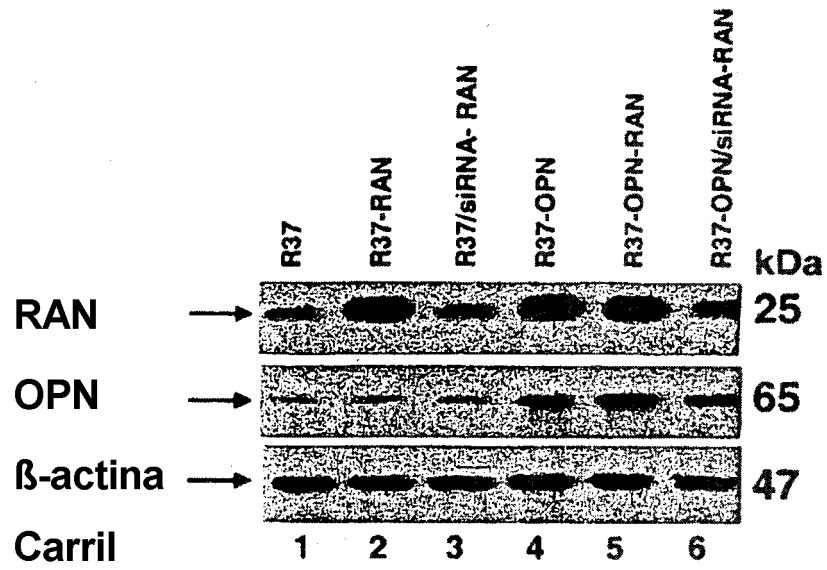


Fig.3C

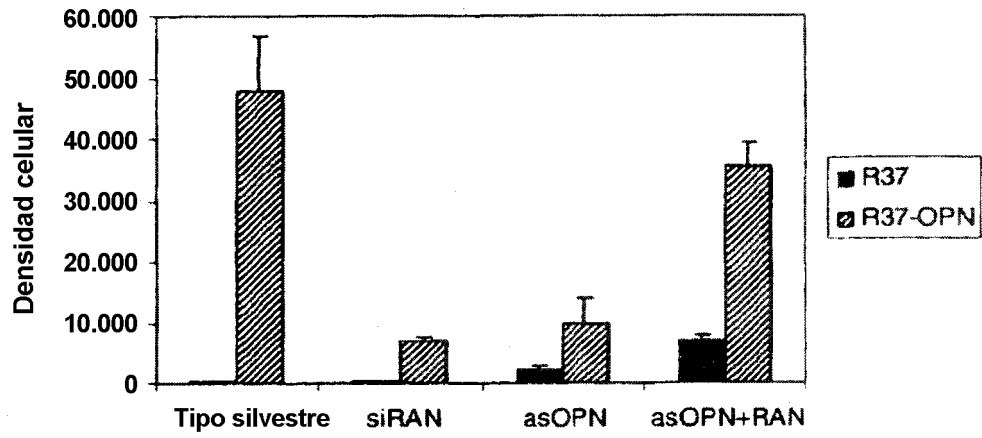


Fig.3D

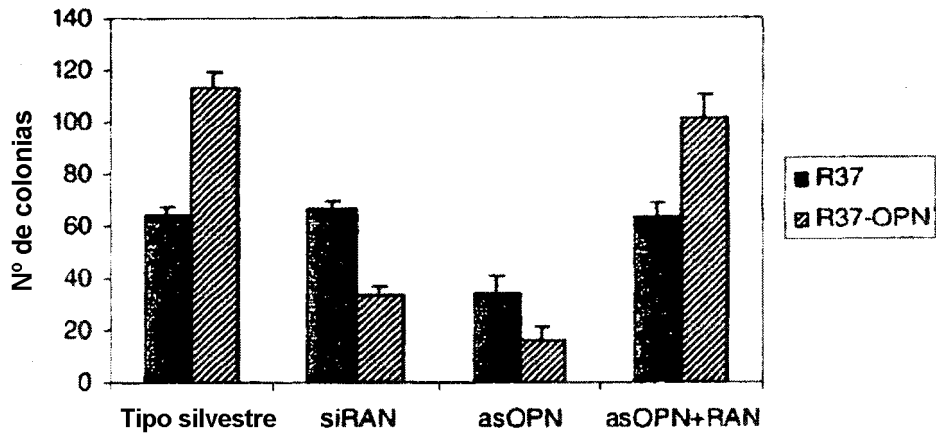


Fig.3E

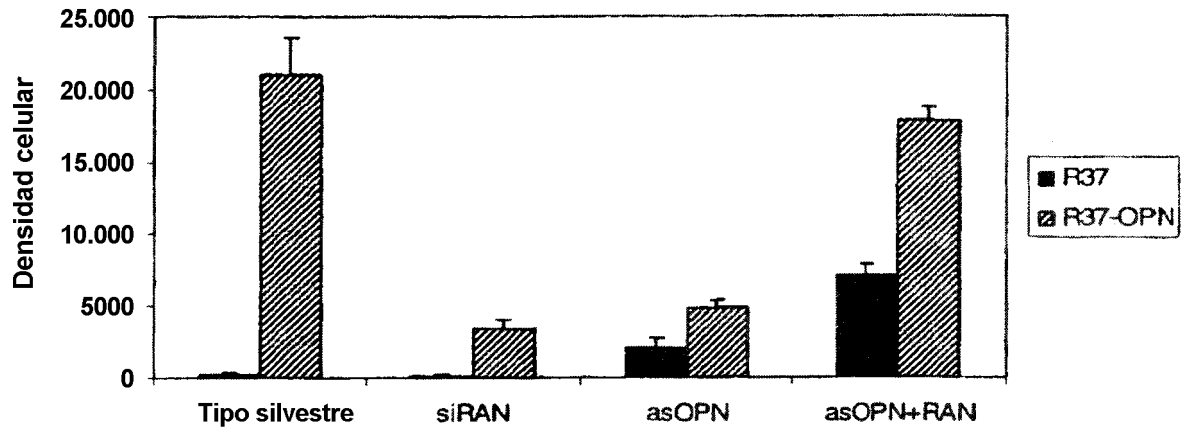


Figura 4

Fig 4A

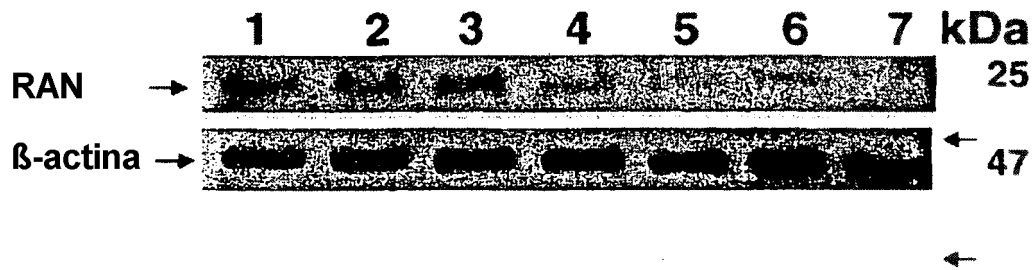


Fig 4B

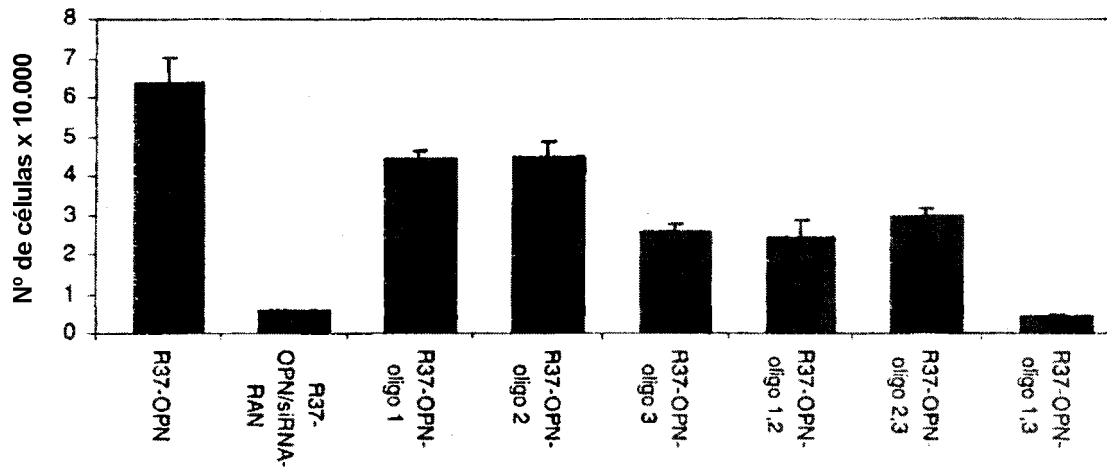


Fig 4C.

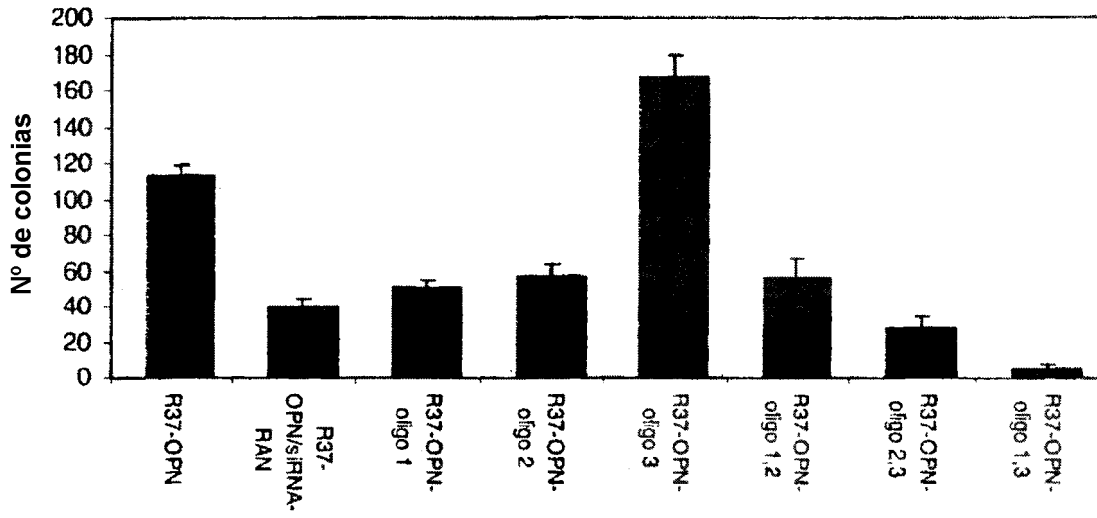


Figura 5

Fig.5A

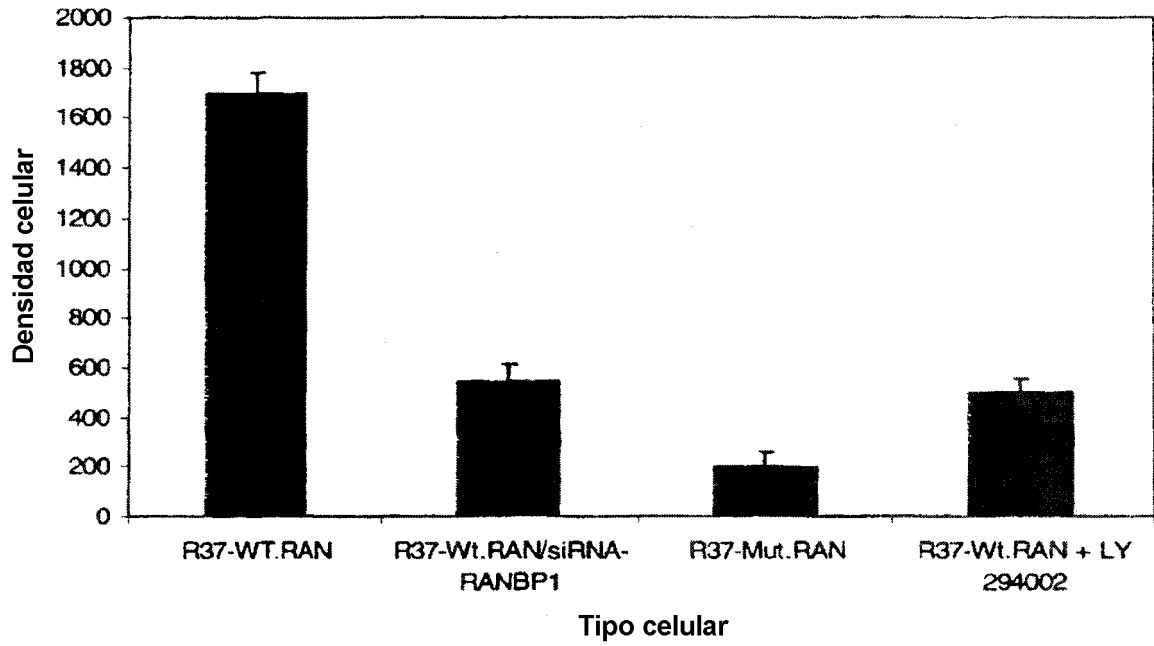


Fig.5B

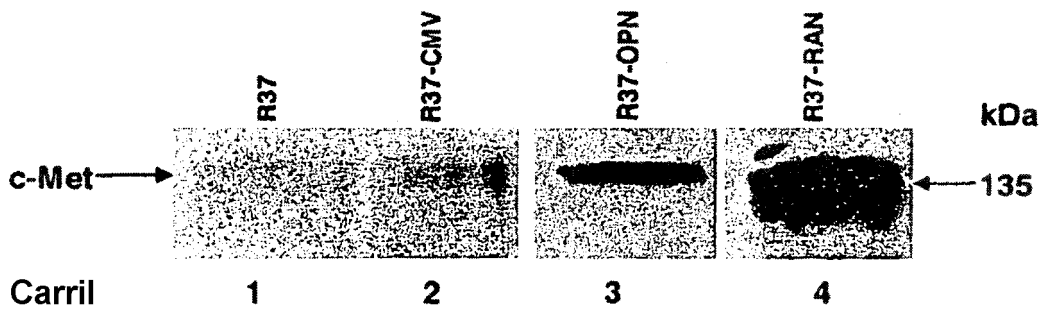


Fig.5C

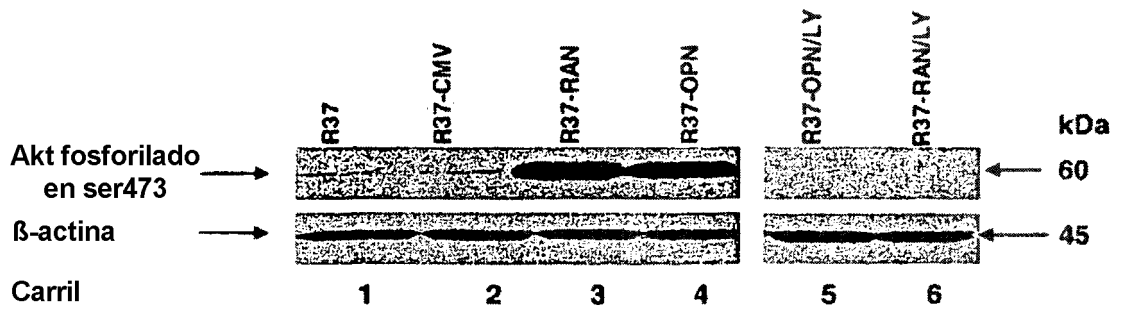


Fig.5D

