

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 616 444**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.09.2011 PCT/EP2011/067114**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.04.2012 WO2012042021**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.09.2011 E 11778540 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016 EP 2621513**

54 Título: **Expresión del receptor Eph en las células madre tumorales**

30 Prioridad:

01.10.2010 EP 10185930

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

13.06.2017

73 Titular/es:

**STEMGEN S.P.A. (100.0%)
Corso Sempione 32/A
20154 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**VESCOVI, ANGELO LUIGI y
BINDA, ELENA**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 616 444 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

Expresión del receptor Eph en las células madre tumorales

5 **Campo de la invención**

La presente descripción se refiere al campo de los tumores malignos del sistema nervioso central y proporciona composiciones farmacéuticas adecuadas para el tratamiento terapéutico y para el tratamiento profiláctico de los tumores cerebrales y para la inhibición del crecimiento de la masa tumoral.

10

Estado de la técnica

Los gliomas son los tumores cerebrales más comunes, y, en particular, el glioma de grado IV, también llamado glioblastoma multiforme (GBM), representa el tipo más grave. Este tumor sumamente agresivo se desarrolla *de novo* (GBM primario) o como consecuencia de la progresión maligna del glioma de bajo grado (GBM secundario). En ambos casos, debido a la característica intrínseca de este tumor, el pronóstico no es alentador y la supervivencia media cuando se combina la radioterapia y la quimioterapia es de 14,6 meses (12.).

15

El glioblastoma multiforme es un tumor muy heterogéneo, que muestra claras diferencias celulares y tisulares, demostrando un fuerte componente hemorrágico y amplias áreas de necrosis, que, a nivel microscópico, coinciden con la presencia de patrones de proliferación microvascular y con pseudoempalizada masivos (9.).

20

Más importante aún, GBM se caracteriza por un patrón de distribución tisular difuso, con una gran difusión de las células tumorales en el cerebro que entorpece la resección quirúrgica completa. Por lo tanto, la recurrencia de la enfermedad se produce en la mayoría de los pacientes. Además, la progresión de GBM también se acompaña por una extensa angiogénesis.

25

La necesidad y la importancia reflejan cada vez con más intensidad el desarrollo de nuevos marcadores, y la identificación de dianas moleculares específicas para el desarrollo de una terapia que sirva para bloquear el crecimiento y la difusión del GBM, así como su tratamiento.

30

En la última década, varios estudios seminales han tratado sobre la identificación y el aislamiento de células madre cancerosas (CMCs), que podrían ser responsables del inicio, mantenimiento y progresión de diferentes tipos de tumores. Se ha sugerido que el crecimiento persistente de cánceres, la diversificación y la evolución clonales, la metástasis tumoral y la recurrencia después de la terapia pueden ser la consecuencia del mantenimiento por parte de las células tumorales del potencial proliferativo de las células madre de las que puede haberse originado el tumor, denominadas células madre cancerosas. Se han hallado asimismo células tipo madre transformadas en tumores malignos hematopoyéticos, cáncer de mama y progenitores neurales tipo madre en los tejidos cerebrales humanos.

35

El hallazgo de que los tumores cerebrales malignos, o al menos algunos de ellos, comprendan células madre cancerosas ofrece nuevas oportunidades a nivel tanto experimental como clínico. De hecho, incluso si la hipótesis de las células madre cancerosas sugiere que estas células constituyen un agregado celular menor en la masa tumoral total, este pequeño agregado, será el verdadero responsable de establecer y expandir el tumor y perpetuarlo tras la cirugía.

40

Las células madre cancerosas (CMCs) con capacidad proliferativa a largo plazo se han estudiado en el GBM (CMCs derivadas de GBM), que poseen tanto el complemento completo de las características funcionales de las células madre neurales (13.) como la capacidad de producir tumores que se asemejan bastante a las características principales histológicas, citológicas y arquitectónicas de la patología del GBM humano (5.). Debido a su capacidad para generar verdaderas fenocopias de la enfermedad en humanos con el tiempo, estas CMC derivadas de GBM representan uno de los modelos más adecuados para el estudio *in vitro* e *in vivo* de la fisiología de GBM, y podrían facilitar el descubrimiento de genes/vías implicados directamente en la regulación del comportamiento invasivo y angiogénico del propio GBM. Los marcadores moleculares que se encuentran específicamente en las células tumorales o están muy sobreexpresados en las células malignas y casi ausentes o disminuidos en las células normales, son dianas terapéuticas atractivas para los enfoques, tales como la administración dirigida de fármacos.

50

55

Los receptores Eph comprenden la mayor familia de las tirosina quinasas codificadas en el genoma humano y desempeñan un papel importante en el desarrollo y la enfermedad, recibiendo un estímulo externo y que responden transmitiendo una señal al interior de la célula, iniciando numerosos procesos que son vitales para el mantenimiento de la función del organismo. Se pueden distinguir de otros RTK, pues todos reconocen ligandos, conocidos como efrinas, que se anclan a la membrana de las células yuxtapuestas. La unión al ligando desencadena normalmente la fosforilación de la tirosina de los receptores Eph (4.).

60

Hasegawa *et al.* (14.) y Wykosky *et al* (2007) (15.) describen respectivamente un anticuerpo anti-EphA2 y un conjugado de efrinaA1-toxina dirigidos a proporcionar efectos citotóxicos a las células que expresan EphA2 a través de EphA2 endógena.

65

Wykosky *et al* (2005) (16.) divulgan que efrinaA1 puede inducir un efecto inhibitor en el crecimiento independiente del anclaje y la invasividad de estirpes celulares cancerosas establecidas en glioblastoma multiforme (GBM) que sobreexpresan altamente EphA2, que no se apreció en las células que expresaban bajos niveles de EphA2.

5 Cheng *et al* (17.) describen el uso de receptores EphA solubles para inhibir la angiogénesis y la progresión tumoral en ratones *in vivo* en el modelo de ratón transgénico RIP-Tag del carcinoma de células de islote pancreáticos de ratón en múltiples estadios dependiente del factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV).

10 Dobrzanski *et al* (18.) describen experimentos que implican la inhibición de EphA2/Fc de la formación de microvasos en un ensayo de anillo aórtico de rata. Se observó la supresión del crecimiento de una estirpe celular pancreática humana establecida inyectada subcutáneamente en ratones desnudos.

Un objeto de la presente invención es el desarrollo de estrategias terapéuticas nuevas y más específicas para cánceres cerebrales, en particular, para identificar un inhibidor del crecimiento y la proliferación del glioblastoma.

15 **Sumario de la invención**

La presente invención se refiere a un precursor de EphA2 para su uso en el tratamiento de un tumor cerebral que comprende una población de células madre cancerosas mediante la inhibición de la proliferación y/o migración de células madre cancerosas, donde dicho precursor de EphA2 es la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO.3.

20 En la presente memoria, se divulga asimismo una composición farmacéutica que comprende al menos un inhibidor de la expresión y/o un inhibidor de la actividad de un receptor de efrina y un medio bioactivo farmacéuticamente aceptable. Como se describirá adicionalmente en la presente memoria, la composición farmacéutica tiene las ventajas de ser específica para la diana molecular del receptor de efrina, que está muy expresado en el desarrollo del sistema nervioso, es crítico para la transmisión de señales y la regulación de muchos procesos en las células cerebrales.

25 Un aspecto adicional divulgado acorde con la presente invención es un inhibidor de la expresión y/o un inhibidor de la actividad de un receptor de efrina para su uso en el tratamiento de un tumor cerebral.

30 **Breve descripción de los dibujos**

Las características y ventajas de la presente descripción resultarán evidentes a partir de la descripción detallada descrita a continuación, a partir de los ejemplos dados con fines ilustrativos y no limitantes, y a partir de las Figuras anexas 1-12, donde:

35 **Figura 1: muestra la expresión de receptores Eph y ligandos de efrina en CMCs derivadas de GBM humano, como se describe en el Ejemplo 2.**

40 Figura 1(A). Niveles relativos de la expresión de ARNm de los receptores de efrina (Eph) y ligandos de efrina (efrinas o EFNs) en CMCs derivadas de GBM analizados por RT-PCR.
 Figura 1(B). (a) Análisis citofluorimétrico de la expresión de los receptores Eph en CMCs derivadas de GBM.
 45 Figura 1(B). (b) Análisis por CCAF que confirma la expresión potenciada del receptor de EphA2 en varias líneas de CMCs derivadas de GBM.
 Figura 1(C). Imágenes confocales del marcado por inmunofluorescencia confirman la expresión del receptor EphA2 y del ligando de efrinaA1 en una línea de CMCs derivadas de GBM representante en diversas ampliaciones.

50 **Figura 2: Niveles de expresión potenciada de EphA2 también en los tejidos tumorales de pacientes con GBM primario, como se describe en el Ejemplo 3.**

Figura 2. (a) Inmunolocalización de los niveles proteicos de EphA2 en GBM primario congelado en el núcleo del tumor.
 55 Figura 2. (b) Inmunolocalización de los niveles proteicos de EphA2 en GBM primario congelado en la periferia del tumor.
 Figura 2. (c) Análisis citofluorimétrico de la proteína del receptor EphA2 en CMCs derivadas de GBM.

60 **Figura 3: La influencia del tratamiento con efrinaA1-Fc o EphA2-Fc en la fosforilación y disminución del receptor de EphA2 en CMCs derivadas de GBM, como se describe en el Ejemplo 4.**

Figura 3(A). (a) Curva dosis-respuesta y análisis por CCAF del tratamiento con efrinaA1-Fc o EphA2-Fc en la expresión y fosforilación del receptor EphA2 en CMCs derivadas de GBM en las concentraciones indicadas.
 65 Figura 3(A). (b) Curva tiempo-ciclo y análisis por CCAF del tratamiento con efrinaA1-Fc o EphA2-Fc en la expresión y fosforilación del receptor EphA2 en CMCs derivadas de GBM en los periodos de tiempo indicados.

Figura 3(B). (a) Panel superior: La inmunofluorescencia para EphA2 humano realizada en CMCs derivadas de GBM confirma que la mayor parte de las células fueron positivas para el receptor.

Figura 3(B). (b-c) Panel superior: La inmunofluorescencia para Eph2 humano realizada en CMCs derivadas de GBM tras, respectivamente, efrinaA1-Fc, 1,0 µg/ml y 5,0 µg/ml, confirma que solo algunas células se marcaron para el mismo antígeno.

Figura 3 (B). Panel medio: Inmunoelctrotransferencia en lisados celulares totales del receptor EphA2 en CMCs derivadas de GBM tratadas con efrinaA1-Fc. Las células se cultivaron en ausencia (-) o presencia (+) de efrinaA1-Fc en los periodos de tiempo indicados.

Figura 3 (B). Panel inferior: Inmunoelctrotransferencia de lisados celulares totales con anticuerpo (4G10) específico para fosfotirosina de los niveles de EphA2 inmunoprecipitada.

Figura 3(C). El análisis de membrana de Western muestra la expresión del receptor EphA2 en CMCs derivadas de GBM tras el tratamiento con EphA2-Fc.

Figura 4: El tratamiento con efrinaA1-Fc y EphA2-Fc reduce la proliferación *in vitro* de las células madre cancerosas derivadas de GBM, como se describe en el Ejemplo 5.

Figura 4(A). (a-c) Curvas de cinética de crecimiento tras la adición de efrinaA1-Fc en las concentraciones indicadas a las CMC derivadas de GBM en cultivo.

Figura 4(A). (d) Curvas de cinética de crecimiento tras la adición de efrinaA1-Fc a las células madre neurales humanas.

Figura 4(A). (e) Curvas de cinética de crecimiento tras la adición de efrinaA1-Fc a las células de glioma humano U87.

Figura 4(A). (f) Curvas de cinética de crecimiento tras la adición de efrinaA1-Fc o EphA2-Fc a las CMC derivadas de GBM en cultivo.

Figura 4 (B). (a) Índice de proliferación de células estimado por el ensayo de proliferación celular BrdU.

Figura 4(B). (b) Índice de proliferación de células estimado por la cuantificación de células inmunorreactivas positivas para KI67.

Figura 4 (C). (a, c) Imágenes por microscopía de fase brillante de neuroesferas a partir de dos líneas de CMCs derivadas de GBM disociadas completamente en ausencia de EphA2-Fc.

Figura 4 (C). (b, d) Imágenes por microscopía de fase brillante de neuroesferas a partir de dos líneas de CMC derivadas de GBM disociadas completamente cultivadas en presencia de EphA2-Fc.

Figura 5: El ligando y el receptor solubles empobrecen la población celular que inicia el tumor cerebral de GBM *in vitro*, como se describe en el Ejemplo 6.

Figura 5 (A). Ensayos clonogénicos en serie en CMCs derivadas de GBM.

Figura 5 (B). (a, d) Microfotografías por fase brillante de neuroesferas de dos cultivos de líneas de CMCs derivadas de GBM que muestran los efectos de efrinaA1-Fc en el tamaño del clon de los controles en reposo.

Figura 5 (B). (b, e) Microfotografías por fase brillante de neuroesferas derivadas de dos líneas de CMCs derivadas de GBM cultivadas con 0,5 µg/ml de efrinaA1-Fc que muestran los efectos de efrinaA1-Fc en el tamaño del clon.

Figura 5 (B). (c, f) Microfotografías por fase brillante de neuroesferas de dos cultivos de líneas de CMCs derivadas de GBM que muestran los efectos de 1,0 µg/ml de efrinaA1-Fc en el tamaño del clon.

Figura 5 (C). (a) La purificación basada en un clasificador de dos poblaciones celulares diferentes, que difieren del nivel de expresión de EphA2, indicó que la expresión proteica de EphA2 se correlaciona directamente con la eficiencia clonal de las CMC derivadas de GBM. Diagrama esquemático del diseño experimental.

Figura 5 (C). (b) Porcentaje clonogénico de EphA2 ++ y EphA2 de CMCs derivadas de GBM.

Figura 6: Muestra el análisis de las poblaciones laterales (PL), como se describe en el Ejemplo 7. Perfiles de tinción con colorante Hoechst 33342 (2 µg/ml) de CMCs derivadas de GBM en reposo humanas y tratadas con 5,0 ug/ml de EphA2-Fc o efrinaA1-Fc durante 48 horas.

Figura 7: EfrinaA1-Fc provoca un efecto pro-diferenciación en CMCs derivadas de GBM, como se describe en el Ejemplo 8. La cuantificación citofluorimétrica de la frecuencia de las neuronas (ME-PE βtubIII), astrocitos (ME-FITC GFAP) y oligodendrocitos (ME-PE GalC) en el control tratado con Fc frente a CMCs derivadas de GBM tratadas con efrinaA1-Fc.

Figura 8: Activación de EphA2 por efrinaA1-Fc o EphA2-Fc soluble induce la reorganización del citoesqueleto e inhibe la propagación y la migración de CMCs derivadas de GBM *in vitro*, como se describe en el Ejemplo 10.

Figura 8 (A). (Inserciones a, b-d) Localización confocal de la proteína actina F (tinción con faloidina) en las CMCs derivadas de GBM no tratadas, que tienen un fenotipo altamente migratorio.

Figura 8 (A). (e-f) La localización confocal de la proteína actina F (tinción con faloidina) cambia 5 min tras, respectivamente, el tratamiento con efrinaA1-Fc o EphA2-Fc. Las células se mantuvieron redondeadas y no pudieron propagarse.

Figura 8 (B). Panel superior: El análisis de membrana Western muestra que la estimulación de efrinaA1-Fc

induce una rápida inactivación y desfosforilación de FAK. Las células se cultivaron en ausencia (-) o en presencia (+) de efrinaA1-Fc durante los periodos de tiempo indicados, y luego se lisaron.

Figura 8 (B). (a) Panel inferior: Los ensayos de invasión cultrex muestran que las células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (CEMDHs) migran a la superficie inferior de la membrana fija y teñida. Las CEMDH se sembraron en la parte superior de la cámara en un medio basal como control.

Figura 8 (B). (b, c) Las CEMDH se sembraron en la parte superior de la cámara en un medio basal y en el compartimento inferior se añadió FCEV (20 ng/ml) o medio condicionado de CMCs derivadas de GBM.

Figura 8 (B). (e, f) Las CEMDH se sembraron en la parte superior de la cámara en presencia de EphA2-Fc (5,0 ug/ml) y en el compartimento inferior se añadió FCEV (20 ng/ml) o medio condicionado de CMCs derivadas de GBM.

Figura 8 (B). (d) Las IgG humanas control se utilizaron como control en la cara superior y no afectaron a la migración celular en respuesta a FCEV en el compartimento inferior.

Figura 8 (C). (a) La inmunofluorescencia confocal muestra la positividad al control tratado con Fc en CMCs derivadas de GBM para ERK1/2 fosforilado.

Figura 8 (C). (b) Inmunolocalización confocal de ERK1/2 fosforilado en CMCs derivadas de GBM tras un inhibidor químico del tratamiento de activación con MEK1 (UO126).

Figura 8 (C). (c-d) La inmunofluorescencia confocal muestra la frecuencia de la positividad a ERK1/2 fosforilado en CMCs derivadas de GBM 6 horas después, respectivamente, de la adición de EphA2-Fc o efrinaA1-Fc.

Figura 8 (C). Panel inferior: El análisis de membrana de Western de los lisados celulares igualados con ERK1/2 fosforilado confirmó que las concentraciones crecientes de efrinaA1-Fc potencian ERK1/2 en CMCs derivadas de GBM.

Figura 9: El tratamiento de CMCs derivadas de GBM con rhBMP4 potencia los efectos inhibidores de efrinaA1-Fc, como se describe en el Ejemplo 11.

Figura 9. (a) Análisis por RT-PCR utilizando cebadores específicos para la medición de los niveles promedios de EphA2 en líneas de CMCs derivadas de GBM con Fc de control o rhBMP4 en la concentración indicada durante 48 horas antes del aislamiento del ARNm.

Figura 9. (b) Curvas de cinética de crecimiento de CMCs derivadas de GBM cultivadas con efrinaA1-Fc en ausencia o presencia de rhBMP4. Las curvas de crecimiento son representativas de una línea de CMC derivadas de GBM.

Figura 10: El tratamiento con efrinaA1-Fc y EphA2-Fc inhibe el crecimiento tumoral *in vivo* en un modelo de xenoinjerto, como se describe en el Ejemplo 12.

Figura 10. (a) Comparación de la morfología tumoral asociada con diferentes tratamientos, 35 días después de la inyección de células.

Figura 10. (b) Medición de los tamaños tumorales relativos. La gráfica muestra la media \pm EEM en cuatro grupos de seis ratones.

Figura 11: El reclutamiento de EphA2 por un ligando o receptor soluble inhibe la tumorigenicidad de CMCs derivadas de GBM en un modelo ortotópico de GBM humano, como se describe en el Ejemplo 13.

Figura 11. (A) La monitorización de la bioluminiscencia de xenoinjertos tumorales en CMCs derivadas de GBM infectadas con el gen indicador de luc muestra un aumento de la señal correspondiente de los tumores.

Figura 11. (B) Diferencias en el crecimiento tumoral y en el tamaño tumoral detectadas *in vivo* tras la inyección intracraneal de CMCs derivadas de GBM en reposo y pretratadas con EphA2-Fc o efrinaA1-Fc.

Figura 11. (C) (a) Las imágenes confocales muestran los tumores derivados de CMCs derivadas de GBM por luc no tratadas seis semanas después del implante ortotópico.

Figura 11. (C) (b-c) Las imágenes confocales muestran los tumores derivados de, respectivamente, CMCs derivadas de GBM infectadas con el gen indicador de luc tratadas con efrinaA1-Fc o EphA2-Fc, seis semanas después del implante ortotópico.

Figura 12: La administración de EphA2-Fc y efrinaA1-Fc inhibe el crecimiento tumoral primario establecido en un modelo ortotópico de GBM humano, como se describe en el Ejemplo 14.

Monitorización de la bioluminiscencia de xenoinjertos tumorales de CMCs derivadas de GBM infectadas con el gen indicador de luc post-tratadas durante 14 días con efrinaA1-Fc o EphA2-Fc.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un precursor de EphA2 para su uso en el tratamiento de un tumor cerebral que comprende una población de células madre cancerosas mediante la inhibición de la proliferación y/o migración de células madre cancerosas, donde dicho precursor de EphA2 es la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO.3.

En la presente memoria, se divulga asimismo una composición farmacéutica que comprende al menos un inhibidor de la expresión y/o un inhibidor de la actividad de un receptor de efrina y un medio bioactivo farmacéuticamente aceptable.

- 5 Por inhibidor de la actividad de un receptor de efrina, se pretende que un tipo de ligando receptor no provoque una respuesta biológica, sino que bloquee o reduzca las respuestas mediadas por agonistas.

Por inhibidor de la expresión de un receptor de efrina, se pretende una disminución de la expresión y/o de la actividad del receptor.

- 10 Las composiciones farmacéuticas tienen las ventajas de ser específicas para la diana molecular del receptor de efrina, que está muy expresado en el desarrollo del sistema nervioso, es crítico para la transmisión de señales y la regulación de muchos procesos en las células cerebrales.

- 15 Una composición farmacéutica específica que actúa sobre la diana molecular del glioblastoma multiforme (GBM) evita la necesidad de una resección quirúrgica y, por lo tanto, la amplia diseminación de células tumorales en el cerebro después de tales operaciones, que, a menudo, dan lugar a una recurrencia tumoral.

- 20 Una ventaja adicional de la composición farmacéutica es que es menos tóxica y más eficaz y específica que la radioterapia y la quimioterapia utilizadas habitualmente solas o combinadas, se orienta selectivamente a las verdaderas células iniciadoras de tumores, en lugar de a la masa tumoral total.

- 25 Este enfoque representa un escenario mediante el cual se intenta "reprogramar" la célula iniciadora del tumor para adquirir un fenotipo no patógeno, en lugar de intentar destruir las células por medios citotóxicos.

- En un aspecto adicional, la composición farmacéutica comprende al menos un inhibidor de la expresión y/o un inhibidor de la actividad de un receptor de efrina, donde dicho inhibidor de la expresión y/o actividad de un receptor de efrina es un inhibidor de la proliferación de células madre cancerosas.

- 30 Dado que se ha demostrado la presencia de células madre cancerosas proliferantes en GBM, ha aumentado la necesidad de una composición específica que actúe sobre la proliferación y el crecimiento persistente de cánceres, también debido a las células madre cancerosas presentes en los tumores.

- 35 La composición farmacéutica puede actuar sorprendentemente en el potencial proliferativo de las células madre.

En un aspecto aún adicional, la composición farmacéutica comprende al menos un inhibidor de la expresión y/o un inhibidor de la actividad de un receptor de efrina, donde dicho inhibidor de la expresión y/o actividad de un receptor de efrina es un inhibidor de la migración de células madre cancerosas.

- 40 Las ventajas de la presente descripción se pueden demostrar aún más por la inhibición no solo del establecimiento, sino también de la expansión de las células madre cancerosas cuyas capacidades migratorias están bloqueadas.

- 45 En un aspecto aún adicional, la composición farmacéutica que comprende al menos un inhibidor de la expresión y/o un inhibidor de la actividad de un receptor de efrina, donde dicha célula madre cancerosa es una célula madre cancerosa cerebral maligna.

GBM representa un tipo muy grave de tumor cerebral, sumamente agresivo y con una progresión maligna.

- 50 La composición farmacéutica tiene la ventaja de actuar específicamente en la diana molecular del glioblastoma multiforme inhibiendo la progresión de las células madre cancerosas malignas.

- 55 En un aspecto aún adicional, la composición farmacéutica comprende al menos un inhibidor de la expresión y/o un inhibidor de la actividad de un receptor de efrina, donde dicho inhibidor de la expresión y/o actividad de un receptor de efrina se selecciona entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO. 1 y la SEQ ID NO. 3.

Para fines de la presente divulgación, cada inhibidor de la expresión y de la actividad de los receptores de efrina tiene una SEQ ID NO. correspondiente de la siguiente manera:

- 60 SEQ ID NO. 1 corresponde a la secuencia de aminoácidos de efrinaA1, secuencia de aminoácidos gi[333596] ref[NP_004419.2], un precursor de la isoforma de efrina-A1 [Homo sapiens];

SEQ ID NO. 2 corresponde a la secuencia de nucleótidos de efrinaA1, secuencia de nucleótidos gi[33359681] ref[NM_004428.2], efrina-A1 Homo sapiens (EFNA1), variante 1 del transcrito de ARNm;

SEQ ID NO. 3 corresponde a la secuencia de aminoácidos de EphA2, secuencia de aminoácidos gi[32967311] ref[NP_004422.2], precursor del receptor 2 de efrina tipo A [Homo sapiens];

- 65 SEQ ID NO. 4 corresponde a la secuencia de nucleótidos de EphA2, secuencia de nucleótidos gi[296010835] ref[NM_004431.3], ARNm del receptor EPHA2 (EPHA2) Homo sapiens. Un aspecto adicional de la presente

invención es un inhibidor de la expresión y/o un inhibidor de la actividad de un receptor de efrina para su uso en el tratamiento de un tumor cerebral.

5 Las ventajas proporcionadas por la presente invención se deben a la utilización de inhibidores específicos que actúan sobre la diana molecular involucrada en el desarrollo y la progresión de los tumores cerebrales.

10 En una realización preferente, la presente divulgación proporciona un inhibidor de la expresión y/o un inhibidor de la actividad de un receptor de efrina para su uso en el tratamiento de un tumor cerebral, donde dicho inhibidor de la expresión y/o actividad de un receptor de efrina se selecciona entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO. 1 y la SEQ ID NO. 3.

Para fines de la presente divulgación, cada inhibidor de la expresión y de la actividad de los receptores de efrina tiene una SEQ ID NO. Correspondiente, como se ha descrito previamente.

15 La sobreexpresión no regulada de los receptores de efrina se correlaciona con la tumorigénesis, en relación con el crecimiento y la supervivencia tumoral, y se asocia con la angiogénesis y la metástasis en la progresión del cáncer humano. La inhibición de la expresión y actividad de los receptores de efrina resulta, por lo tanto, ventajosa para el bloqueo de la progresión del tumor.

20 Un aspecto aún adicional de la presente divulgación es el uso de un inhibidor de la expresión y/o un inhibidor de la actividad de un receptor de efrina, donde dicho tumor cerebral es un glioblastoma, y en un aspecto aún adicional, donde dicho tumor cerebral es el glioblastoma multiforme.

25 Un aspecto aún adicional de la presente divulgación es el uso de un inhibidor de la expresión y/o un inhibidor de la actividad de un receptor de efrina, donde dicho tratamiento es el tratamiento profiláctico de una recurrencia de un tumor cerebral tras una intervención quirúrgica.

30 Un aspecto aún adicional de la presente divulgación es el uso de un inhibidor de la expresión y/o un inhibidor de la actividad de un receptor de efrina, donde dicho tratamiento es el tratamiento terapéutico de una recurrencia de un tumor cerebral tras una intervención quirúrgica.

35 El receptor de efrina, expresado en los vasos sanguíneos tumorales, también desempeña un papel importante en la angiogénesis y la neovascularización tumoral a través de la asociación con su ligando endógeno, efrinaA1. Su señalización en los tumores favorece la migración de células endoteliales y su montaje en estructuras capilares mediante la regulación de la plasticidad del citoesqueleto, unión a la matriz, y/o adhesión intercelular.

40 Los inhibidores de la expresión y los inhibidores de la actividad de un receptor de efrina de acuerdo con la presente divulgación bloquean sorprendentemente la angiogénesis y la neovascularización tumoral, inhibiendo el crecimiento y la recurrencia del tumor tras una intervención quirúrgica.

Un aspecto aún adicional es el uso de un inhibidor de la expresión y/o un inhibidor de la actividad de un receptor de efrina, donde dicho tratamiento inhibe el crecimiento de la masa tumoral cerebral.

45 Un aspecto aún adicional es el uso de un inhibidor de la expresión y/o un inhibidor de la actividad de un receptor de efrina, donde dicho inhibidor de la expresión y/o actividad de un receptor de efrina es un inhibidor de la proliferación de células madre cancerosas.

50 La ventaja de la presente invención puede ser demostrada por el hecho de que la inhibición del receptor de efrina bloquea la migración y la proliferación de las células madre cancerosas.

55 Una ventaja adicional de la composición farmacéutica acorde con la presente invención es la de ser capaz de proporcionar terapias selectivas para pacientes, diseñadas efectivamente para orientarse selectivamente a una población de células madre cancerosas específica en un tumor sólido y adaptadas para empobrecer el agregado de células madre cancerosas y la tumorigenicidad.

Ejemplos

Ejemplo 1

60 Aislamiento de células madre cancerosas derivadas a partir de glioblastoma multiforme (CMCs derivadas de GBM) procedentes de muestras tumorales.

65 Los especímenes tumorales se obtuvieron de la Unidad de Neurocirugía, después de las correspondientes resecciones quirúrgicas realizadas a los pacientes. Las muestras tisulares de glioblastoma (GBM) adulto humano se obtuvieron y se clasificaron de acuerdo con las directrices de la Organización Mundial de la Salud. Cada tejido neoplásico se dividió en dos fragmentos. El primero se utiliza para el análisis histopatológico: con detalle, el tejido se

sumergió en paraformaldehído al 4 % durante 24 horas para la inclusión en parafina e inmunohistoquímica, o se colocó en una solución de sacarosa en concentraciones decrecientes que comienzan en el 40 % para obtener secciones flotantes para microscopía confocal. El segundo fragmento se utilizó para obtener líneas de células madre cancerosas en GBM. Los tejidos se cortaron en fragmentos de 1 mm³ y luego se trituraron mecánicamente y enzimáticamente como en Gritti A, 1996 y Galli R, 2004 (6. y 5.) de la siguiente manera: los fragmentos se transfirieron a 4 ml de una solución de SSEE con 0,8 mg/ml de papaína (20 U/ml, Worthington), 0,2 mg/ml de L-cisteína (Sigma), 0,2 mg/ml de EDTA (Sigma) en una placa de 6 pocillos (Nunc) y se incubaron durante 45 min a 37 °C. Las secciones tisulares se trituraron posteriormente de forma cuidadosa con una pipeta Pasteur pulida al fuego. Las células se recogieron por centrifugación y las células individuales se sembraron en matraces para cultivo tisular de 25 cm² (Nunc) a una densidad de 8.000/cm² en el llamado medio completo, un medio exento de suero DMEM/F12 (1:1 v/v Gibco). El medio completo contiene 2 mM de L-glutamina, glucosa al 0,6 %, 9,6 µg/ml de putrescina, 6,3 ng/ml de progesterona, 5,2 ng/ml de selenito de sodio, 0,025 mg/ml de insulina, 0,1 mg/ml de transferrina (sal de sodio, grado II, Sigma), en presencia de 20 ng/ml de factor de crecimiento epidérmico (FCE, Peprotech) y factor de crecimiento de fibroblastos (FCF2, Peprotech). El medio fresco se añadió cada 4 días.

El número de esferas primarias generadas en cada matraz se evaluó a los 10-20 días después de la siembra. Las esferas se recogieron posteriormente en un tubo de 15 ml (BD) mediante centrifugación durante 10 min a 192 xg. Las esferas primarias se disociaron mecánicamente a una suspensión de una única célula y se volvieron a sembrar para el cultivo. Durante los días típicos (2-7) para cada línea se formaron nuevas esferas que podrían someterse a un pase adicional.

Estas estirpes celulares se identificaron con las llamadas células madre cancerosas derivadas de glioblastoma (o células iniciadoras de tumores) (CMCs derivadas de GBM).

Parte de las CMC derivadas de GBM procedentes de estirpes celulares establecidas se congelaron con éxito en cada tercera, cuarta etapa de subcultivo secuencial en medio completo más DMSO al 10 % (Sigma) y se depositaron. El resto se amplió.

Resultados: Los tumores cerebrales, en particular, los glioblastomas, incorporan células dotadas de una capacidad iniciadora de tumores y definidas con características funcionales de las células madre neurales (CMCs derivadas de GBM). Por tanto, el estudio de los mecanismos de regulación de la neurogénesis normal puede conducir a la identificación de nuevos inhibidores de CMCs derivadas de GBM y puede dar lugar al desarrollo de estrategias terapéuticas más específicas para los cánceres cerebrales.

Ejemplo 2.

Determinación de la expresión de los receptores Eph en líneas de CMCs derivadas de GBM por RT-PCR y

Análisis citofluorimétrico.

Los receptores Eph no regulados o sobreexpresados pueden fomentar la transformación, el crecimiento tumoral y la supervivencia. Se estudió la expresión y la regulación de efrinas y sus receptores análogos en especímenes de GBM humano y CMCs derivadas de GBM incluidas en este, tanto aisladas completamente o subcultivadas en serie.

Extracción de ARN y preparación de ADNc:

ARN total se extrajo a partir de: líneas de CMCs derivadas de GBM aisladas procedentes de diferentes pacientes con diagnóstico de glioblastoma, especímenes recientes de GBM primario, células U87 no invasivas (una estirpe celular de astrocitoma humano disponible comercialmente) y de células madre neuronales humanas normales (CMNhs, disponibles en nuestro laboratorio, 13.) utilizando el mini kit RNeasy (Qiagen).

ADNc se obtuvo utilizando transcriptasa inversa RNasa H de Superscript (Gibco), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Un µg del ARN total se cebó con oligo-dT para la síntesis del ADNc.

Amplificación por PCR

Los ADNc se amplificaron individualmente con los cebadores de PCR diseñados para la identificación de los receptores EphA1, EphA2, EphA3, EphA4, EphA5, EphA7, EphA8, EphA10, EphB1, EphB2, EphB3, EphB4, EphB6 y los ligandos de EFNA1, EFNA2, EFNA3, EFNA4, EFNA5, EFNB1, EFNB2, EFNB3.

Todos los ADNc utilizados como plantillas se normalizaron previamente a través de una β-actina por RT-PCR utilizando el siguiente par de cebadores para 22 ciclos de amplificación: β-ActinaF1 (5'-GGCATCGTGATGGACTCCG-3') y β-actinaR1 (5'-GCTGGAAGGTGGACAGCGA-3'). Los 610 pb de los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 2 % y se compararon para la intensidad de la señal frente al mismo producto de PCR obtenido a partir de un ADNc derivado de un µg de ARN total cerebral humano (Ambion). Se diseñaron cebadores específicos:

ES 2 616 444 T3

- EphA1

directo: 5'- GCC TGA CAC CAC ATA CAT CG - 3'
inverso: 5'- ATA TGC GGG TGG CTA AAC TG - 3'

5

- EphA2

directo: 5'- AAA GCC GGC TAC ACA GAG AA - 3'
inverso: 5'- TTG GAC AAC TCC CAG TAG GG - 3'

10

- EphA3 directo: 5'- GAG TTT GCC AAG GAA TTG GA - 3' inverso: 5'- TTG GGA TCT TCC CTC CTC TT - 3'
- EphA4 directo: 5'- ACC AAG CAG TGC GAG AGT TT - 3' inverso: 5'- CTC CCC GTA CGA CAT CAC TT - 3'
- EphA5 directo: 5'- CAA GCC TAA TAT GGC GGT GT - 3' inverso: 5'- GTG AAC TGC CCA TCG TTT TT - 3'
- EphA7 directo: 5'- ATC ATT GGG AGA AGG CAC TG - 3' inverso: 5'- ATG GAC AAC ATT TGG GTG GT - 3'
- EphA8 directo: 5'- GAG AAC GGC TCT CTG GAC AC - 3' inverso: 5'- CCT CCA CAG AGC TGA TGA CA - 3'
- EphA10 directo: 5'- CGA CTA ATG CTC GAC TGC TG - 3' inverso: 5'- TGA TCA AGC AAC TGC CAC TC - 3'
- EphB1 directo: 5'- CAG GGT ACT CGG AGA AGC AG - 3' inverso: 5'- CCA GCA TGA GCT GGT GTA GA - 3'
- EphB2 directo: 5'- AGT TCG GCC AAA TTG TCA AC - 3' inverso: 5'- AGG CAG GTG AAT GTC AAA CC - 3'
- EphB3 directo: 5'- AGC AAC CTG GTC TGC AAA GT - 3' inverso: 5'- GGA TGA GCT TGT CCA GGG TA - 3'
- EphB4 directo: 5'- GAG AGC TGT GTG GCA ATC AA - 3' inverso: 5'- TGT AGG TGG GAT CGG AAG AG - 3'
- EphB6 directo: 5'- TCA TTG CAC ATG GAA AGC AT - 3' inverso: 5'- GGG TGA GTC CAG ACA AGG AA - 3'
- EFNA1 directo: 5'- GGT GAC TGT CAG TGG CAA AA - 3' inverso: 5'- AGT GGA AGG AGC AGC ACAT - 3'
- EFNA2

25

directo: 5'- ATC TAC TGC CCG CAC TAT GG - 3'
inverso: 5'- AGG CGT GGC AGA GAT GTA GT - 3'

- EFNA3

30

directo: 5'- CAT GCG GTG TAC TGG AAC AG - 3'
inverso: 5'- GTG GAA CTC GTA GCC CAG AG - 3'

- EFNA4

35

directo: 5'- ACA TTG TCT GCC CCC ACT AC - 3'
inverso: 5'- TGG GCT GAC TCA GAC TTC CT - 3'

- EFNA5

40

directo: 5'- AGG ACT CCG TCC CAG AAG AT - 3'
inverso: 5'- ATC TGG GAT TGC AGA GGA GA - 3'

- EFNB1

45

directo: 5'- GCC TGG AGT TCA AGA AGC AC - 3'
inverso: 5'- GAA CAA TGC CAC CTT GGA GT - 3'

- EFNB2

50

directo: 5'- GTG CCA AAC CAG ACC AAG AT - 3'
inverso: 5'- GAT GTT GTT CCC CGA ATG TC - 3'

- EFNB3

55

directo: 5'- AGG CAG AGG GTG GTT ATG TG - 3'
inverso: 5'- TCT CTT TCC ATG GGC ATT TC - 3'

Análisis de citometría de flujo con estirpes celulares:

60 Para determinar la expresión de receptores Eph en diferentes líneas de CMCs derivadas de GBM, las preparaciones celulares (500.000 células por cada tubo) se centrifugaron y se volvieron a suspender en 0,2 ml de medio completo. Las células se expusieron durante 30 minutos en la oscuridad a 4 °C a los anticuerpos primarios. Células U87 como control de referencia para las células tumorales y CMNhs para las células madre neurales.

65 Para las tinciones intracelulares, las preparaciones celulares (500.000 células por tubo) se permeabilizaron

alternativamente con 0,5 ml de solución de Cytofix/Cytoperm (BD Biosciences) a temperatura ambiente durante 30 min. Las células se lavaron con 2 ml de BD Perm/Wash 1X (BD) y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. Después de la centrifugación, se volvieron a suspender en 0,2 ml de solución de BD Perm/Wash 1X (BD) que contenía la mezcla de un anticuerpo primario apropiado.

5

Los anticuerpos primarios empleados fueron:

- anticuerpo policlonal de cabra anti-EphA1 (0,3 µg, R&D)
- anticuerpo policlonal de cabra anti-EphA2 (0,5 µg, R&D)
- 10 • anticuerpo policlonal de cabra anti-EphA3 (0,3 µg, Gene Tex)
- anticuerpo policlonal de conejo anti-EphA5 (0,5 µg, Abcam)
- anticuerpo policlonal de conejo anti-EphA7 (0,5 µg, Abcam)
- anticuerpo policlonal de cabra anti-EphA8 (0,5 µg, Santa Cruz)
- anticuerpo policlonal de conejo anti-EphB1 (0,5 µg, Abcam)
- 15 • anticuerpo policlonal de conejo anti-EphB2 (0,5 µg, Abcam)
- anticuerpo policlonal de conejo anti-EphB6 (0,5 µg, Santa Cruz)

Tras haber realizado extensos lavados se añadieron 0,3 ml de anticuerpo secundario apropiado:

- 20 • anticuerpo de burro anti-Ig de cabra marcado con PE (0,2 µg, Jackson Immunoresearch)
- anticuerpo de cabra anti-Ig de conejo marcado con FITC (0,5 µg, Jackson Immunoresearch)

Cada muestra se incubó durante 30 min en la oscuridad a 4 °C. Después de dos lavados, las células se volvieron a suspender en 0,5 ml de medio completo y se analizaron por citometría de flujo. Los controles de autofluorescencia y de isotipo se llevaron a cabo de forma rutinaria para todos estos ensayos.

25

Para todos los ensayos anteriores, los análisis se realizaron por citometría de flujo Cyan (Coulter) utilizando el software Summit 4.3. La fluorescencia de fondo se estimó mediante la sustitución de los anticuerpos primarios específicos con controles específicos de isotipo. La medición de la autofluorescencia también se llevó a cabo de forma rutinaria para cada condición ensayada.

30

Resultados: Los receptores de efrina y la sobreexpresión de sus ligandos análogos se pueden asociar a muchos tipos de progresión de cáncer humano. Como se muestra en la Figura 1A, la mayoría de los receptores de efrina (13 analizados) y los ligandos (8 analizados) del transcrito de ARN mensajero pueden recuperarse por PCR convencional. La totalidad del ADNc se normalizó previamente a través de una β -actina. Una estirpe celular de astrocitoma humano (U87) se empleó como referencia para las células tumorales, y las células humanas madre neuronales (CMNhs) como referencia para las células madre neurales normales. Curiosamente, a diferencia de las células madre normales y cancerosas, el ligando de efrinaA1 no puede recuperar ni el transcrito de ARN mensajero ni el nivel proteico en las células U87. De manera notable, la expresión de los receptores de efrina en CMCs derivadas de GBM se confirmó a nivel proteico por análisis citofluorimétrico, como se muestra en la Figura 1 B (a). Además, como se apunta en la Figura 1 B (b), EphA2 aumenta ampliamente las líneas de células madre cancerosas derivadas de GBM (n=6). Los histogramas muestran medias \pm EEM de tres ensayos distintos.

35

40

Un ejemplo de la expresión generalizada de tanto el receptor de EphA2 como del ligando de efrinaA1 en una línea representativa de CMCs derivadas de GBM se demostró igualmente en la Figura 1C. Las imágenes confocales de marcaje por inmunofluorescencia confirman la presencia e identifican una tinción positiva débil del receptor de EphA2 (a y su ampliación mayor local b-c) y el ligando de efrinaA1 (d y su ampliación mayor local e) en las células tumorales. Barra de escala, 40 μ m (a, d); 20 μ m (b, c); 13 μ m (e).

45

50 **Ejemplo 3.**

Determinación de la expresión del receptor de EphA2 en tejidos de GBM primario.

Después de la demostración de que los niveles potenciados de EphA2 se recuperaron en las líneas de CMCs derivadas de GBM, la identificación de la presencia de EphA2 inmunorreactiva también en los tejidos tumorales recientes, lo que excluye la posibilidad de que el receptor podría desarrollarse como una mera consecuencia del cultivo *in vitro* a largo plazo.

55

Inmunohistoquímica con tejidos primarios:

Para tinciones inmunohistoquímicas, los tejidos tumorales de GBM primario se fijaron posteriormente en paraformaldehído durante 24 h. Los tejidos se crioprotegieron en soluciones de sacarosa al 10 %, 20 % y 30 % en TFS durante la noche a 4 °C, seguido por una etapa de inclusión durante la noche en una mezcla de compuesto con inclusión de sacarosa al 20 %/Tissue-Tek OCT 2:1 (v/v). Secciones en serie de diez micrómetros de grosor se cortaron en un criostato y se montaron en un portaobjetos de vidrio recubierto de gelatina para un doble inmunomarcaje. Brevemente, las secciones se secaron al aire y se enjuagaron en tampón Tris-HCl 0,1 M (pH 7,6)

60

65

que contenía SAB al 0,005 % y Triton al 0,1 % y se incubaron con el anticuerpo primario durante la noche a 4 °C. (13.).

5 Las secciones tisulares se tiñeron con cabra anti-EphA2 de humano (1:50, R&D) o clon D7 del monoclonal de ratón IgG1 de anti-EphA2 humano (1:100, Sigma).

Citometría de flujo con tejidos primarios:

10 Poco después de la digestión enzimática y mecánica descrita anteriormente, las suspensiones celulares aisladas de los especímenes tumorales primarios se sometieron a un análisis por CCAF para la expresión del receptor de EphA2. Brevemente, las células derivadas de la disociación tisular de GBM se tiñeron con LDS 751 (10 ng/ml, Molecular Probes) 15 min a temperatura ambiente para identificar las células nucleadas intactas. Las células se analizaron por citometría de flujo (FACSAria, BD Biosciences), y utilizando una técnica de selección de poblaciones alternativa (células positivas LDS751), se creó una región (P1) que identifica las células nucleadas intactas en el gráfico de puntos FSC frente a SSC. Para identificar las células nucleadas intactas y vivas, una puerta lógica combinada se creó mediante la región de adición (P1) a una región que contenía células negativas 7AAD. Después, las CMCs derivadas de la disociación tisular de GBM se incubaron con un cabra anti-EphA2 humano (0,5 µg, R&D) y 7AAD (5 µg/ml, Coulter), con el fin de identificar las células tanto positivas como muertas.

20 **Resultados:** La inmunohistoquímica se empleó para examinar la localización del receptor de EphA2 en los gliomas primarios y sus homólogos "normales" vecinos (periféricos) de pacientes con glioma. Los resultados mostrados en el panel superior de la Figura 2 revelaron con claridad una señal de EphA2 más elevada en el núcleo del tumor (a) en relación a su periferia menos maligna (b) (al menos 2 cm de distancia del núcleo). *Barra de escala*, 50 µm. Como se muestra en el panel inferior de la misma figura, también se detectó la proteína del receptor de EphA2 en CMCs derivadas de GBM completamente disociadas, constitutivamente recuperables dentro de tumor del paciente, por análisis citofluorimétrico (n=4) (flechas).

Ejemplo 4.

30 Efecto del receptor de efrinaA1-Fc soluble (R&D) y EphA2-Fc soluble (R&D) en la expresión y la fosforilación de EphA2 en las CMC derivadas de GBM humano.

35 Debido a la degradación del receptor inducida por el ligando, se puede producir una expresión disminuida de EphA2, que se traduce en un aumento de la adhesión celular a la matriz extracelular (MEC), una disminución de la migración y la inhibición celular del crecimiento maligno. Por tanto, la sobreexpresión de este receptor en las CMC derivadas de GBM podría verse reflejada en el comportamiento maligno y su compromiso mediante la efrinaA1-Fc podría contrarrestar la tumorigenicidad.

40 Desde este punto de vista, se determinaron los efectos de la disminución de la expresión forzada o de la actividad de EphA2 en las propiedades tumorigénicas de CMCs derivadas de GBM. El receptor de EphA2 se comprometió para disminuir su expresión y determinar cómo esto contribuye a la regulación de las propiedades funcionales generales de estas células, tanto *in vitro* como *in vivo*. EphA2 se comprometía utilizando una efrinaA1-Fc soluble, una proteína quimérica Fc de ratón IgG1 de efrinaA1 humana. Además, EphA2 parece ser única entre los receptores Eph en que su actividad quinasas puede no ser totalmente dependiente de la unión del ligando. Estos efectos independientes de ligando de EphA2 son importantes en los procesos influyentes que son críticos en la progresión maligna.

50 Los efectos de la prevención de la fosforilación de EphA2 endógeno se analizaron alternativamente por medio de una proteína quimérica del receptor de EphA2-Fc con un dominio de unión a ligando extracelular del receptor fusionado a la porción Fc de IgG1 humana que se une competitivamente al ligando disponible.

Análisis citofluorimétrico:

55 Para el análisis de dosis-respuesta, poco después de la disociación mecánica, las células se sembraron en presencia de efrinaA1-Fc (0,001, 0,01, 0,1, 0,5, 1,0 µg/ml) durante 24 horas. Para el análisis del tiempo-ciclo, las células se incubaron con efrinaA1-Fc (1,0 µg/ml) durante 6, 24, 48, 72 horas.

60 Las preparaciones celulares (500.000 células/muestra) se centrifugaron y se volvieron a suspender en 0,2 ml de medio completo. A continuación, se expusieron a un anticuerpo policlonal de cabra anti-EphA2 (0,5 µg, R&D) durante 30 minutos en la oscuridad a 4 °C. Después de haber realizado extensos lavados, se añadió un anticuerpo de burro anti-Ig de cabra marcado con FITC (0,56 µg/muestra, Jackson Immunoresearch) y cada tubo se incubó durante 30 min en la oscuridad a 4 °C. Después de dos lavados, las células se volvieron a suspender en 0,5 ml de medio completo y se analizaron por citometría de flujo. Los controles de autofluorescencia y de isotipo se llevaron a cabo de forma rutinaria para todos estos ensayos.

65

Inmunocitoquímica:

5 Las células se sembraron a una densidad de $2,5 \times 10^4$ células/cm² en cubreobjetos de vidrio con un diámetro de 12 mm recubiertos de Cultrex (Trevigen) en medio completo como control o en presencia de efrinaA1-Fc (0,5, 1,0 µg/ml) durante 24 horas. Las células se lavaron, se fijaron con paraformaldehído al 4 % en TFS, pH 7,4, y se llevó a cabo la inmunotinción. Los cubreobjetos se incubaron durante la noche a 4 °C en TFS que contenía suero normal de cabra (SNC) al 10 % o suero bovino fetal al 10 % (SBF), Triton X-100 al 0,3 %, y los anticuerpos o antisueros primarios apropiados (conejo anti-efrinaA1 humano, 1:50 Abcam, cabra anti-EphA2 humano, 1:50 R&D). Alternativamente, las células se inmunotificaron con un clon D7 del monoclonal de ratón IgG1 EphA2 (1:100, Sigma).

10 Tras lavar a fondo con TFS, las células se hicieron reaccionar durante 45 min en la oscuridad a temperatura ambiente (TA) con el anticuerpo secundario apropiado:

- 15 • Cabra anti-conejo conjugado con cianina Cy2 o Alexa-Fluor 488 (1:200, Jackson Immunoresearch, 1:2000, Invitrogen)
- Cabra anti-burro conjugado con cianina Cy3 o Alexa-Fluor 546 (1:500, Jackson Immunoresearch, 1:2000 Invitrogen)
- Cabra anti-ratón conjugado con cianina Cy3 (1:800, Jackson Immunoresearch)

20 Tras haber realizado el lavado, los núcleos celulares se contratiñeron 10 min a temperatura ambiente con 4,6-diamidina-2-fenilindol dihidrocloruro (DAPI, 50 g/ml en TFS, Sigma), se enjuagaron tres veces en TFS y una vez en agua destilada y se montaron en un portaobjetos de vidrio con Fluorsave (Calbiochem).

25 Los controles apropiados para los anticuerpos primarios y secundarios no revelaron ni la tinción no específica ni la reactividad cruzada de los anticuerpos.

El diagnóstico por imágenes se analizó por un microscopio de Zeiss Axioplan2 y un microscopio confocal Leica DMIRE2.

30 Membrana de Western:

Poco después de la disociación, las células se sembraron en medio completo en presencia de 5,0 µg/ml de efrinaA1-Fc o 5,0 µg/ml de EphA2-Fc durante 10, 30, 60 min y 24 horas. Las células también se sembraron en matraces recubiertos de Cultrex (Trevigen) y su diferenciación se indujo mediante la eliminación de EGF/FGF2 y la adición del factor inhibidor de la leucemia (FIL 10 ng/ml) durante 7-10 días. Las células se volvieron a suspender, se centrifugaron y se lisaron. El tampón de lisis estaba compuesto por 50 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 1 mM de EDTA y Triton X-100 al 1 % suplementado con cóctel inhibidor de la proteasa al 1 % (Sigma) y cóctel inhibidor de la fosfatasa al 10 % (Roche). Las células se recogieron, se lavaron en TFS y se centrifugaron a 14.460 xg. La cuantificación proteica se realizó por el ensayo proteico DC (Bio-Rad), utilizando una serie de estándares de albúmina. El tampón de carga de gel se añadió a 70 µg de cada lisado, y las proteínas se resolvieron con geles de poliacrilamida al 10 % y se transfirieron a la membrana de nitrocelulosa Hybond ECL (GE), de acuerdo con los protocolos convencionales. Las membranas se bloquearon con solución salina tamponada con Tris (SST)-T (SST más Tween 20 al 0,02 %) y leche al 5 %, y se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios durante la noche a 4 °C:

- 45 • IgG de cabra anti-EphA2 humano (1:750, R&D)
- clon D7 de IgG1 de ratón anti-EphA2 humano (1:500, Sigma)

Esta etapa fue seguida de la incubación con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano picante (PRP) (1:10.000; Bio-Rad) durante 30 min:

- 50 • IgG de burro anti-cabra (1:5000, Promega)
- IgG de conejo anti-ratón (1:10.000, GE)

55 La actividad de la peroxidasa se detectó utilizando el sistema potenciado de quimioluminiscencia (GE) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Como control de carga, se utilizó el anticuerpo de ratón anti-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (1:500, Zymed).

Inmunoprecipitación:

60 Las células se cultivaron en ausencia o presencia de efrinaA1 (1,0, 5,0 µg/ml) o del control de isotipo monoclonal de ratón IgG1 (R&D) durante 24 horas y luego se lisaron como se ha descrito previamente. Para determinar los niveles de fosforilación de EphA2, los lisados celulares que contenían 100 µg de proteína total se incubaron con ratón anti-Eck/EphA2 humano, (1:500, Upstate) durante la noche a 4 °C con rotación suave. Siguiendo las instrucciones de los fabricantes, las microesferas (separación de microesferas Dynal Invitrogen) se lavaron ampliamente con tampón de lisis, y los complejos inmunes se eluyeron con 2x tampón de muestra LDS (Invitrogen), se hirvieron y se centrifugaron brevemente. Las proteínas se determinaron y se detectaron por inmunoelectrotransferencia utilizando

ratón, 4G10 platinum, anti-fosfotirosina humano (1:1000, Upstate).

Resultados: La disminución de la internalización y de la degradación del receptor inducido por el ligando podrían aumentar la estabilidad de la proteína y contribuir a la sobreexpresión de EphA2. Se muestra un papel supresor tumoral potencial doble para efrinaA1-Fc que consiste en la represión de la señalización oncogénica como resultado de la fosforilación del receptor, así como la disminución del receptor posterior.

El análisis citofluorométrico de la Figura 3A muestra con claridad que efrinaA1-Fc reprime la señalización oncogénica a través de la disminución del receptor de EphA2 en CMCs derivadas de GBM humano. El efecto inhibitorio de efrinaA1-Fc es cualquiera dependiente de la dosis o del tiempo. Los valores representan las medias \pm EEM de la medición por duplicado.

Además, como se indica en el panel superior de la Figura 3B, la inmunofluorescencia para EphA2 humano realizada en CMCs derivadas de GBM confirma que la mayor parte de las células fueron positivas para el receptor (a), mientras que después de 1,0 μ g/ml de efrinaA1-Fc (b) y 5,0 μ g/ml de efrinaA1-Fc (c) solo se marcaron unas cuantas células para el mismo antígeno. *Barra de escala*, 20 μ m. En el panel central de la misma Figura, la disminución en la expresión del receptor de EphA2 en CMCs derivadas de GBM tratadas con efrinaA1-Fc se confirmó a nivel proteico por inmunoelectrotransferencia en lisados celulares totales. Especialmente, la membrana confirma que el reclutamiento mediado por efrinaA1-Fc del receptor de EphA2 disminuye notablemente la expresión de EphA2 en CMCs derivadas de GBM de una manera dependiente de la concentración/tiempo. Las células se cultivaron en ausencia (-) o presencia (+) de efrinaA1-Fc en los periodos de tiempo indicados. El nivel de proteína inmunorreactiva cuantificado se abolió completamente en 60 minutos. Esto sugiere que el compromiso de EphA2 por su ligando análogo corresponde con una rápida internalización del receptor. Estirpe celular de fibroblastos humanos (FH) como control negativo para el anticuerpo EphA2. GAPDH se incluye como control para la carga idéntica de lisados. Los datos presentados son un único representante de tres líneas diferentes de CMCs derivadas de GBM.

EfrinaA1-Fc desencadena la fosforilación y la degradación del receptor de EphA2 en CMCs derivadas de GBM. Según la evaluación por inmunoprecipitación, en el tratamiento con efrinaA1-Fc (Figura 3B, panel inferior), los niveles de EphA2 fosforilada con tirosina aumentaron drásticamente durante la concentración en las CMCs derivadas de GBM, una indicación de la activación del receptor mediada por efrinaA1. Poco después de la disociación, las células se trataron con concentraciones crecientes de efrinaA1-Fc o control de isotipo Fc durante 48 horas. La inmunoelectrotransferencia de lisados celulares totales con un anticuerpo (4G10) específico de fosfotirosina de los niveles de EphA2 inmunoprecipitada confirman un aumento en la activación y la fosforilación de EphA2 por efrinaA1-Fc.

Por último, como se muestra en la Figura 3C, el tratamiento con EphA2-Fc puede prevenir la fosforilación de EphA2 endógena en lugar de la disminución de la expresión proteica de EphA2 en CMCs derivadas de GBM. Las CMC derivadas de GBM en estado de reposo y las CMC derivadas de GBM activadas con EphA2-Fc (5,0 μ g/ml) en los periodos indicados se sometieron a un análisis de membrana Western.

Obsérvese que no se detectó un nivel de expresión del receptor de EphA2 en CMCs derivadas de GBM diferenciadas, lo que indica su implicación putativa en la regulación del comportamiento oncogénico de las células madre de cancerosas en GBM, tal como la proliferación y la migración aberrantes. La inmunoelectrotransferencia presentada es un representante de tres membranas analizadas en diferentes momentos.

Ejemplo 5.

Efectos del receptor de efrinaA1-Fc o EphA2-Fc en la proliferación de CMCs derivadas de GBM *in vitro*.

Para determinar si la aplicación de la disminución/fosforilación de EphA2 o la unión competitiva con su ligando análogo puede afectar a las propiedades tumorigénicas de CMCs derivadas de GBM, en este caso, se analizaron los efectos citostáticos de efrinaA1-Fc y EphA2-Fc en el primer parámetro crítico de células madre, tales como la simetría general de división.

Las CMCs derivadas de GBM en su estado activo de crecimiento se expusieron a efrinaA1-Fc soluble o a EphA2-Fc y luego se evaluó la desviación de la cinética.

Curvas de crecimiento:

Para analizar el índice de proliferación de las CMCs derivadas de GBM, las suspensiones de neuroesferas se transfirieron a tubos de 15 ml (BD), se centrifugaron a 192 xg durante 10 minutos y se disociaron mecánicamente a una suspensión de una célula individual. Las células se contaron por el método de exclusión con azul de tripano y 8×10^3 células/cm² de células viables se sembraron en presencia de control de isotipo monoclonal de ratón IgG1 (R&D), efrinaA1 (0,5, 1,0, 2,0, 3,0 o 5,0 μ g/ml) o EphA2-Fc (5,0 μ g/ml). Se representó el número total de células obtenido en la siguiente etapa de subcultivo (0 DIV). En cada pase de subcultivo (cada 4-6 días) se obtuvo una suspensión de una única célula y el número total de células viables se contó por exclusión con azul de tripano. Se

volvieron a sembrar 8×10^3 células viables/cm² en las mismas condiciones. Esto condujo a la definición de los parámetros cinéticos (pendiente de la curva de crecimiento, como en Gritti A, 2001) (7.) que proporciona indicaciones de la función de las proteínas recombinantes mencionadas anteriormente en la determinación de la tasa de expansión de CMCs-CMNhs. Células U87 como control de referencia para las células tumorales y CMNhs para las células madre neurales.

Para evaluar si el resultado de los tratamientos con efrinaA1-Fc y EphA2-Fc se basaba en criterios de buena fe de las células madre, el análisis de la proliferación de células disociadas completamente se realizó por un subcultivo de CMCs derivadas de GBM poco después del aislamiento a partir de los especímenes de tumores primarios (como se ha descrito previamente) en presencia de EphA2-Fc (5,0 µg/ml).

Inmunorreactividad ante KI67:

La investigación se complementó por medio de la definición del índice de proliferación con el análisis con KI67 (1.). Brevemente, las células se sembraron en cubreobjetos de vidrio recubiertos de Cultrex (Trevigen) en presencia de EGF/FGF2 y se expusieron a efrinaA1-Fc (0,5, 1,0 µg/ml) durante 24 horas. Las células en crecimiento se cuantificaron mediante inmunocitoquímica indirecta utilizando un policlonal de conejo anti-IgG Ki67 (1:1000, Novocastra). Se utilizó un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo con Cy2, como se ha descrito previamente (1:200, Jackson Immunoresearch). El número total de células en cada campo se determina por la contratinción de núcleos celulares con 4,6-diamidina-2-fenilindol dihidrocloruro (DAPI; Sigma; 50 g/ml en TFS) durante 10 min a temperatura ambiente.

Ensayos BrdU:

La proliferación también se controló mediante el kit de ensayo colorimétrico mediante BrdU de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por los fabricantes (Roche). En resumen, las CMCs derivadas de GBM se sembraron en microplacas de 96 pocillos, a una densidad de 5000 células/pocillo. Las células se expusieron a efrinaA1 (0,001, 0,01, 0,1, 0,5, 1,0 µg/ml) durante 24 horas y después 24 horas a BrdU (1:10). El índice de proliferación celular se evaluó por triplicado.

Resultados: Como se mostró con claridad por los estudios de cinética de crecimiento en la Figura 4A, la activación y la rápida internalización del receptor de EphA2 causadas por el ligando de efrinaA1-Fc redujeron en gran medida el índice de proliferación de líneas de CMCs derivadas de GBM. En relación con las células cultivadas con un control de isotipo (Fc), se detectaron diferencias en la cinética de crecimiento después de la adición de efrinaA1-Fc a las CMCs derivadas de GBM en cultivo (a-c), similares a las células madre neuronales humanas (d), pero diferentes a las líneas de glioma humano U87 (e). La efrinaA1-Fc atenúa la proliferación de CMCs derivadas de GBM de manera dependiente de la concentración. Las curvas de crecimiento son representativas de tres líneas de CMCs derivadas de GBM. (f) En relación con las células cultivadas con efrinaA1-Fc, EphA2-Fc mostró inducir una gran reducción de la cinética de crecimiento de las CMCs derivadas de GBM. Estos datos podrían sugerir una vez más un papel funcional para efrinaA1-Fc y EphA2-Fc en el empobrecimiento del agregado de CMCs derivadas de GBM. Todas las gráficas mostradas son representativas de tres experimentos. Las curvas de crecimiento en f son representativas de una línea de CMCs derivadas de GBM.

Como se apunta en la Figura 4B, la incorporación de BrdU (a) o las células inmunorreactivas ante KI67 (b) se redujo en gran medida en presencia del ligando soluble en las concentraciones indicadas. La efrinaA1-Fc no provoca ningún efecto inhibitorio sobre la proliferación de las células U87. a es representante de una línea de CMCs derivadas de GBM. Los datos representados son la media \pm EEM de cuatro experimentos independientes.

La Figura 4C muestra con claridad que la exposición de las CMCs derivadas de GBM a EphA2-Fc (5,0 µg/ml) poco después del aislamiento del espécimen del tumor primario previno su expansión en cultivo. Las imágenes de microscopía de fase brillante de neuroesferas a partir de dos líneas de CMCs derivadas de GBM disociadas completamente en ausencia (a, c) o presencia (b, d) de EphA2-Fc muestran claras diferencias en la morfología del clon. Los clones derivados de CMCs derivadas de GBM sin tratar exhiben la morfología típica redondeada, mientras que las neuroesferas obtenidas después del tratamiento con EphA2-Fc se formaron de forma irregular y se caracterizaron por la presencia de muchas células alargadas que sobresalen, lo que sugiere probablemente el aumento y la diferenciación de la adhesión celular (n=4). Bar, 50 µm.

Ejemplo 6.

Efectos del receptor de efrinaA1-Fc soluble o EphA2-Fc soluble en la clonogenicidad y la capacidad de autorrenovación de CMCs derivadas de GBM.

La capacidad de las CMC derivadas de GBM para autorrenovarse, que puede definirse como la capacidad de una célula madre cancerosa para producir múltiples copias de sí misma en un tiempo dado, es un índice prospectivo de lo agresivo que puede ser su comportamiento. En este caso, se analizó un parámetro de células madre crítico relacionado con la simetría global de la división, tal como la actividad de autorrenovación relacionada. El índice de

autorrenovación después de la exposición a efrinaA1-Fc o a EphA2-Fc se evaluó por medio de ensayos clonogénicos y clasificación celular de CMCs derivadas de GBM.

Ensayo clonogénico:

5 Las líneas de CMCs derivadas de GBM derivadas de la disociación de clones individuales se contaron y 1.000 células viables/pocillo se sembraron en placas de 24 pocillos recubiertas con L-poli-lisina (0,1 mg/ml, Sigma). El número de esferas secundarias generadas se evaluó después de 7-10 días (7.). Las células se sembraron en presencia de control de isotipo monoclonal de ratón IgG1 (R&D), efrinaA1-Fc (0,5, 1,0, 2,0, 3,0, 5,0 µg/ml) o EphA2-Fc (5,0 µg/ml). Las CMNhs se emplearon como control de células madre.

Clasificación celular:

15 2×10^6 de CMCs derivadas de GBM se centrifugaron y se volvieron a suspender en 0,5 ml de medio completo con DNasa (1:1000, 1 µg/ml de concentración final, Sigma).

20 Las células positivas o negativas del receptor de EphA2 derivada de GBM se clasificaron y se analizaron (FACSaria, BD Biosciences) utilizando el modo de clasificación de única célula y UDCA (unidad de deposición de células automatizado) para clasificar una única célula en cada pocillo de placas de 96 pocillos múltiples.

25 FACS Aria estaba equipado con láseres 488, 633 y violeta. Se identificaron las células y se seleccionaron las poblaciones electrónicamente en las señales de dispersión de luz directa y ortogonal. Los acontecimientos que representan la unión de las células a anti-EphA2 se identificaron por su difusión de la luz (FSC y SSC) y las firmas de fluorescencia (FITC). Se clasificaron simultáneamente hasta tres poblaciones de células. Los datos brutos del instrumento se almacenaron electrónicamente para su posterior archivo y procesamiento de datos.

El número de esferas primarias generado (eficiencia clonal) en cada pocillo se evaluó 10-14 días después de la siembra (DAP).

30 Resultados: Como se muestra en la Figura 5A, la efrinaA1-Fc afecta a la simetría general de la división y a la actividad relacionada con la autorrenovación de CMCs derivadas de GBM humano *in vitro*.

35 Por medio de los ensayos clonogénicos en serie descritos en los métodos, en relación con las células cultivadas con el control-Fc, las CMC derivadas de GBM estimuladas con la concentración indicada de efrinaA1-Fc soluble mostraron una eficiencia clonal inferior, similar a las CMNh pero al contrario de las células U87. La activación mediada por el ligando de EphA2 redujo de manera dependiente de la dosis el porcentaje del formador del clon precursor neural (eficiencia clonal). Columnas, con una media de tres ensayos separados, bares, EEM.

40 Además, la efrinaA1-Fc induce cambios morfológicos en las células en GBM *in vitro*. Las microfotografías de fase brillante de neuroesferas de dos cultivos de líneas de CMCs derivadas de GBM, expuestas en la Figura 5B, muestran con claridad los efectos de la efrinaA1-Fc en el tamaño de clon. (a, d) controles en estado de reposo, (b, e) 0,5 µg/ml de efrinaA1-Fc, (c, f) 1,0 µg/ml de efrinaA1-Fc. Esto podría confirmar la implicación putativa de efrinaA1-Fc en el empobrecimiento de los agregados de CMCs derivadas de GBM. En particular, la dosis de saturación de efrinaA1-Fc (5 µg/ml) abolió completamente la formación de neuroesferas de CMNhs (datos no mostrados). *Barra de escala*, 100 µm (a-c); 50 µm (d-f). Por último, como se apunta en la Figura 5C, se realizó la clasificación celular de EphA2 y la subpoblación positiva a EphA2 fue notablemente más clonogénica en relación a las células negativas de EphA2 *in vitro*. Columnas, media de cinco ensayos distintos, barras, EEM.

Ejemplo 7.

50 Efectos del ligando de efrinaA1-Fc soluble o receptor de EphA2-Fc soluble en el agregado de CMCs derivadas de GBM tumorigénicas.

55 Para evaluar si el resultado del tratamiento con efrinaA1-Fc y EphA2-Fc afecta al criterio de buena fe de las células madre, en lugar comprometer las células progenitoras, se investigaron los efectos de efrinaA1-Fc y EphA2-Fc en la población lateral (PL) de CMCs derivadas de GBM.

60 Además, CMCs derivadas de GBM estimuladas con EphA2-Fc (5,0 µg/ml durante 24 horas) se caracterizaron por la expresión de los marcadores de la población de las células madre neuronales putativas, células madre tumorales cerebrales y células madre cancerosas/células iniciadoras del tumor por CCAF.

Población lateral:

65 Se identificó la PL de las células como una cola de fluorescencia de baja características en el gráfico de puntos del análisis de doble longitud de onda y detectó en nuestras CMCs derivadas de GBM (1,41 % de las células seleccionadas de la población vivas frente a 0,03 % de la médula ósea). El tratamiento con verapamilo, que es

conocido por inhibir transportadores específicos ABC que median la expulsión de Hoechst 33342, abolió esta población. Las células se analizaron en MoFlo (Coulter) utilizando el análisis de doble longitud de onda (azul, 450-465 nm; rojo, 630-730 nm) después de la excitación con luz UV de 350 nm.

- 5 Las células se cultivaron en presencia de 5,0 µg/ml de efrinaA1-Fc o EphA2-Fc durante 24 horas y después se volvieron a suspender en una concentración final de 2×10^6 /ml en DMEM/F12 más DNasa (1 µg/ml, Sigma), SAB (2 mg/ml, Sigma), heparina (4 µg/ml, Sigma) y EDTA (200 µg/ml, Sigma). Las CMC derivadas de GBM se marcaron con 2 µg/ml de colorante Hoechst 33342 (Invitrogen) a 37 °C durante 2 horas con mezcla intermitente. Como control inhibidor, se añadió verapamilo, bloqueador del canal de calcio, (Sigma) a una concentración final de 50 µM durante 10 min a temperatura ambiente antes de su marcaje con Hoechst 33342.

15 Al final de la incubación, las células se centrifugaron en frío y se volvieron a suspender en TFS enfriado con hielo. El yoduro de propidio (YP) (2 µg/ml de concentración final, Sigma) se añadió 5 min a temperatura ambiente antes del análisis de clasificación celular activado con fluorescencia (CCAF), que permite la discriminación de las células muertas frente a las vivas.

20 El gen transportador ABC, *ABCG2* (también conocido como *Bcrp1*), es uno de los mediadores principales del fenotipo de PL en médula ósea de ratón y otros tejidos. Se detectó la proteína ABCG2 en CMCs derivadas de GBM que realizan la tinción de inmunofluorescencia utilizando el anticuerpo monoclonal IgG2b de ratón (1:50, eBioscience) y un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con Alexa Fluor 488 (1:2000, Invitrogen), como se ha descrito previamente.

Perfil del inmunofenotipo por citometría de flujo:

25 Se realizó un análisis de citometría de flujo como se ha descrito previamente. Se emplearon los siguientes anticuerpos primarios conjugados:

- ratón anti-CD133 conjugado con PE (0,25 µg, MACS)
- ratón anti-CD44 conjugado con PE (20 µl/1 x 10^6 células, BD)
- 30 • ratón anti-CD184, CXCR4, conjugado con APC (20 µl/1 x 10^6 células, BD)
- ratón anti-CD81, TAPA1, conjugado con FITC (20 µl/1 x 10^6 células, BD)
- ratón anti-CD15, SSEA1, conjugado con FITC (20 µl/1 x 10^6 células, BD)
- ratón anti-CD117, cKit, conjugado con PE (0,2 µg, BD)

35 Las células se incubaron durante 30 min en la oscuridad a temperatura ambiente, se lavaron y se volvieron a suspender en 0,5 ml de medio completo y se analizaron por citometría de flujo. Los controles de autofluorescencia y de isotipo se llevaron a cabo de forma rutinaria para todos estos ensayos.

40 **Resultados:** Como se apunta con claridad en la Figura 6, la PL de CMCs derivadas de GBM desapareció completamente o se redujo en gran medida por el tratamiento con efrinaA1-Fc y EphA2-Fc.

45 Las células se marcaron con Hoechst 33342 solo o en combinación con 100 µmol/L de verapamilo y después se analizaron por citometría de flujo. Las CMC derivadas de GBM tratadas con ligando o receptor soluble mostraron una población lateral de células de que no eran detectables, al igual que en presencia de verapamilo. Los datos mostrados son gráficos de puntos representativos de al menos 2 experimentos independientes.

50 EphA2-Fc podría tener una implicación en las células madre tumorales o un enriquecimiento de la subpoblación de células iniciadoras del tumor. La cantidad o el patrón de la expresión de algunos marcadores disminuyó después de la estimulación de EphA2-Fc (datos no mostrados).

Ejemplo 8.

Efectos del receptor de efrinaA1-Fc soluble o EphA2-Fc soluble en la multipotencialidad de CMCs derivadas de GBM.

55 Para poder calificarse como células madre, las CMCs derivadas de GBM han de ser multipotentes. En este caso, se realizaron estudios de diferenciación para determinar la adquisición de un candidato de un fenotipo más diferenciado de CMCs derivadas de GBM tras el tratamiento con efrinaA1-Fc o EphA2-Fc. Las esferas clonales cultivadas en ausencia o presencia de efrinaA1 o EphA2-Fc se sometieron a una medición citofluorimétrica de la intensidad de la señal de fluorescencia.

Citometría de flujo:

65 Las esferas clonales del ensayo de autorrenovación se sometieron a análisis de CCAF y la expresión de los marcadores neuronales se evaluó mediante marcadores específicos de linaje.

Para la cuantificación de los astrocitos (proteína ácida glial fibrilar, GFAP), las neuronas (β III-tubulina) y los oligodendrocitos (galactocerebrosidaC, GalC), una mezcla de partículas de calibración rainbow (8 picos), 3,0-3,4 μ m (BD Bioscience) se utilizó para la calibración y la intensidad del marcaje celular se expresó como moléculas de ficoeritrina equivalente (MEPE) o moléculas de fluoresceína equivalente (MEFL). En resumen, para la tinción intracelular, las células se sembraron en presencia de 1,0 o 5,0 μ g/ml de efrinaA1 durante 24 horas, después se volvieron a suspender y se permeabilizaron por medio de 0,5 ml de solución de Cytotfix/Cytoperm (BD) a temperatura ambiente durante 30 min. Las células se lavaron con 2 ml de BD Perm/Wash 1X (BD) y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. Después de la centrifugación, se volvieron a suspender en 0,2 ml de solución de BD Perm/Wash 1X (BD) que contenía la mezcla de anticuerpo primario apropiado. Para antígenos de membrana, las células se volvieron a suspender en 0,2 ml de medio de crecimiento y después se incubaron durante 30 min a 4 °C con los siguientes anticuerpos primarios: policlonal de conejo anti-GFAP (1:400, Dako Corporation), monoclonal de ratón anti-tubulina β III (1:400, Babco) y monoclonal de ratón anti-GalC (1:400, Chemicon). Las células se lavaron y se expusieron durante 30 min a + 4 °C al anticuerpo secundario. En el caso de antígenos intracelulares, estos fueron anticuerpo de cabra anti-Ig de conejo marcado con FITC o anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón marcado con PE (BD) 1:800, mientras que para antígenos de membrana se utilizó F(ab')₂ de IgM de cabra anti-ratón conjugada con FITC o IgM de cabra anti-ratón conjugada con FITC (Jackson ImmunoResearch) 1:1000. Después de un extenso lavado, las células se volvieron a suspender y se analizaron por citometría de flujo.

Resultados: Como se muestra en la Figura 7, con relación a Fc de control, el ligando y el receptor solubles se indujeron por los cambios morfológicos evidentes de CMCs derivadas de GBM. Mediante el uso de la medición por citofluorimetría de la intensidad de la señal de fluorescencia, las células estimuladas con efrinaA1-Fc revelaron un aumento dependiente de la dosis en las moléculas de fluoresceína equivalente (MEFL) para la inmunorreactividad de glial (GFAP). La efrinaA1-Fc y EphA2-Fc desencadenan la adquisición de un fenotipo más maduro *in vitro*, que adquiere predominantemente un alcance similar astrogial y empobrece el agregado de CMCs derivadas de GBM tumorigénicas. El histograma muestra la media \pm EEM de la medición por triplicado.

Ejemplo 9.

Efectos del receptor de efrinaA1-Fc soluble o EphA2-Fc soluble en la apoptosis o ciclo celular de CMCs derivadas de GBM humano.

Análisis del ciclo celular: análisis y detección de BrdU/ADN

Para el análisis del ciclo celular, 1×10^6 células/muestra se cultivaron en presencia de efrinaA1-Fc (5 μ g/ml) o EphA2 (5 μ g/ml) durante 6, 24, 48 horas. Las células se expusieron a 20 μ M de 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU, 1:500, Sigma) durante 20 min a 37 °C., se fijaron en etanol al 70 % en TFS y se mantuvieron a 4 °C antes de la tinción (3.). El ADN se desnaturalizó con 1 ml de HCl 3N durante 20 min a TA y después el sedimento se incubó con 1 ml de Tween-20 al 0,5 % (Sigma) que contenía SAB al 1 % (Sigma) durante 15 min a TA. Las células se incubaron con anticuerpo monoclonal anti-BrdU (1:10, BD) durante 60 minutos a TA en la oscuridad. El anticuerpo secundario empleado fue IgG de cabra anti-ratón conjugada con Alexa 488 (1:500, Invitrogen). Las células se volvieron a suspender en 2,5 μ g/ml de yoduro de propidio (YP) en TFS y 7 μ l de ARNasa (3 mg/ml) en agua, y se tiñeron durante la noche a 4 °C en la oscuridad. Se realizó un análisis de BrdU/ADN biparamétrico con al menos 30.000 células para cada muestra por FACS-Calibur (BD Biosciences) y se analizaron los datos utilizando el software Summit 4.3.

Ensayo del marcado del extremo libre FITC por desoxi-transferasa terminal dUTP (TUNEL)

La apoptosis se midió utilizando el kit de ensayo TUNEL (Roche Diagnostics) siguiendo las instrucciones del fabricante para el parámetro de doble citometría de flujo. El análisis se realizó en un equipo FACSCalibur (BD Biosciences) y los datos se analizaron utilizando el software Summit 4.3 (Coulter).

Resultados: Como se ha medido por CCAF-Tunel y BrdU, en relación con las células control, ni el ligando soluble ni el receptor soluble indujeron la muerte/apoptosis celular o cambiaron las fases del ciclo de CMCs derivadas de GBM y CMNh (datos no mostrados).

Ejemplo 10.

Efectos del receptor de efrinaA1-Fc soluble o EphA2-Fc soluble en la propagación, migración y en las vías intracelulares relacionadas implicadas de CMCs derivadas de GBM.

La sobreexpresión de EphA2 o la falta de activación es un jugador esencial también en la invasión de CMCs derivadas de GBM, provocando modificaciones del citoesqueleto o el mantenimiento de la fosforilación y la actividad de la quinasa FAK y de otras vías intracelulares.

Desde que la motilidad celular depende de las modificaciones del citoesqueleto, el papel de supresión oncogénico de efrinaA1-Fc y EphA2-Fc en el bloqueo de los reordenamientos del citoesqueleto y los cambios morfológicos de

CMCs derivadas de GBM se evaluó midiendo la frecuencia de las células que muestran los fascículos de anillos de actina F por faloidina.

5 También se determinó la eficacia del ligando o receptor soluble en la regulación de la motilidad y la capacidad de invasión de las células vasculares.

Inmunotinción para marcadores del citoesqueleto:

10 CMCs derivadas de GBM se sembraron a una densidad de $2,5 \times 10^4$ células/cm² en un cubreobjetos de vidrio recubierto con Cultrex (12 mm de diámetro) en ausencia o presencia de efrinaA1-Fc (5,0 µg/ml) o EphA2-Fc (5,0 µg/ml) durante 5 y 30 min. Para la tinción con F-actina, las células se fijaron en paraformaldehído al 4 % durante 20 minutos, se permeabilizaron con Triton-X 100 al 0,1 % (v/v) y se incubaron con faloidina marcada con Alexa555 (1:40, Invitrogen) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

15 Ensayos de migración:

Los ensayos de invasión se realizaron en cámaras Transwell de 24 pocillos (tamaño de poro de 8 µm, 6,5 mm, 0,33 cm², Corning Costar) como en Pennacchetti 2003 (10.). El lado superior de los filtros se recubrió con Cultrex y 1×10^5 células endoteliales microvasculares dérmicas humanas (CEMDHs) se sembraron en 1,5 ml de DMEM/F12 en ausencia o presencia de EphA2-Fc (5,0 µg/ml). En el compartimento inferior, como estímulos positivos de migración, se añadió el factor de crecimiento endotelial vascular (FCEV, 20 ng/ml) o las CMC derivadas de GBM en medio condicionado (1 ml de 1×10^6 células 1 día después de la siembra). Se añadieron estímulos en 2,6 ml de medio basal DMEM/F12 en ausencia o presencia de EphA2-Fc en el lado superior del filtro.

25 7-14 días después de la siembra, las células en el lado superior de los filtros se eliminaron mecánicamente, y las que migraron hacia el lado inferior se fijaron y tiñeron utilizando DiffQuick (Dade Behring) siguiendo las instrucciones del fabricante. La migración de las células se evaluó por valores de densidad de volumen adquiridos por un escáner densitómetro.

30 Membrana de Western:

Para determinar el resultado del tratamiento con efrinaA1-Fc o EphA2-Fc en el comportamiento maligno de las CMC derivadas de GBM, las células se sembraron en presencia de efrinaA1-Fc (1,0 o 5,0 µg/ml) o EphA2-Fc (5,0 µg/ml) durante el tiempo apropiado y después se lisaron. Se realizaron todos los procedimientos como se ha descrito previamente.

35 Se emplearon los siguientes anticuerpos primarios:

- conejo anti-fosfo FAK (Tyr576/577, Tyr925) (1:1000, Cell Signaling)
- 40 • conejo anti-p42/p44 MAPK total humano (ERK1/2) (1:1000, Cell Signaling)
- conejo anti-fosfo-ERK1/2 humano (Thr202/Tyr204) (1:1000, Cell Signaling)
- conejo anti-fosfo-Akt (Ser473) (1:1000; Cell Signaling)
- conejo anti-fosfo-mTOR (Ser2481) (1:1000, Cell Signaling)
- conejo anti-fosfo-PI3K p85 (Tyr458)/p55 (Tyr199) (1:1000, Cell Signaling)
- 45 • conejo anti-E-cadherina humano (1:1000, Cell Signaling)
- ratón anti-gelsolina humano (1:1000, Sigma)

Esta etapa fue seguida de la incubación con burro anti-conejo-HRP (1:10.000, GE) y conejo anti-ratón-HRP (1:10.000, GE).

50 La mezcla proteica cerebral humana (70 µg, Clontech) o el lisado proteico total de tumores cerebrales LYS054 humanos (70 µg, Abserotec) se utilizaron como controles tisulares.

Se detectaron asimismo las formas fosforiladas de ERK1/2 por inmunocitoquímica. Las células se sembraron en cubreobjetos de vidrio recubiertos de Cultrex (Trevigen) en ausencia o presencia de efrinaA1-Fc (5,0 µg/ml) o EphA2-Fc (5,0 µg/ml) durante 1, 6 y 24 horas. Células en estado de reposo o células pre-tratadas con el inhibidor MEK1/2 UO126 (10 µM durante 2 horas, Cell Signaling) como control. La inmunocitoquímica se realizó con un policlonal de conejo anti-fosfo MAPK (t202/y204) (1:1000, Cell Signaling) e IgG con Alexa Fluor 488 (1:2000, Invitrogen) como se ha descrito previamente.

60 Resultados: Ni el receptor soluble ni el ligando soluble evitan la propagación celular. La adhesión y la propagación continúan de forma simultánea con cambios tanto en la actina como en el citoesqueleto de microtúbulos. El análisis de los reordenamientos del citoesqueleto expuestos en la Figura 8A, muestran con claridad que las CMCs derivadas de GBM no tratadas (a), que tienen un fenotipo altamente migratorio y se propagan bien en Cultrex, se caracterizan por una morfología plana y poligonal, con un citoesqueleto de actina bien organizado, más filamentos de actina F

65

organizados densamente en las fibras de estrés y una morfología similar a fibroblastos. (Inserciones b-d) Los fascículos de actina similares a un anillo reúnen las características del comportamiento de las CMC derivadas de GBM. Por el contrario, las células tratadas con efrinaA1-Fc (e) y EphA2-Fc (f) se mantuvieron redondeadas, caracterizadas por células bipolares y alargadas y que no pueden propagarse, revelando microtúbulos menos organizados con la positividad a actina F focal en los contactos célula-célula. Barra en paneles más grandes, 5 µm; Barra en paneles más pequeños, 10 µm.

Los datos que se muestran en el panel superior de la Figura 8B, confirman que la activación de EphA2 podría inhibir la adhesión celular, la propagación y la migración *in vitro*, induciendo la inactivación rápida y desfosforilación de FAK. Las células se cultivaron en ausencia (-) o presencia (+) de efrinaA1-Fc durante los periodos de tiempo indicados, y luego se lisaron. La disminución de la expresión de FAK fosforilada en los residuos de tirosina 576/577 o 925 en las células tratadas se evaluó a nivel proteico por membrana de Western. El nivel más marcado se observó 60 minutos después del tratamiento y tras 24 horas, FAK es una tirosina fosforilada de nuevo. Control de carga: GAPDH.

En particular, como se indica por ensayos de invasión de cultrex expuestos en la Figura 8B (panel inferior), también la migración *in vitro* de las células endoteliales que expresan EphA2 se inhibió de forma severa por la administración de EphA2-Fc recombinante. Las CEMDHs privadas de suero se sembraron en la parte superior de la cámara y se les permitió migrar al lado inferior de los filtros durante 6 horas. (a) CEMDHs en medio basal como control. En el compartimento inferior se añadió FCEV (20 ng/ml) o CMCs derivadas de GBM en medio condicionado, respectivamente, en ausencia (b, c) o presencia (e, f) de EphA2-Fc (5,0 µg/ml) en el lado superior de la cámara. IgG humana de control en el lado superior no afectó a la migración celular en respuesta a FCEV (d). Las células que migraron a la superficie inferior de la membrana se fijaron y se tiñeron como se describe en los métodos. Barra de escala, 200 µm.

Por último, se ha demostrado que la efrinaA1-Fc y EphA2-Fc pueden provocar la activación de las vías dependientes de MAP quinasa por la fosforilación de ERK1/2 en CMCs derivadas de GBM. Según se expone por inmunofluorescencia confocal en la Figura 8C, con relación al control tratado con Fc (a), se pudo detectar un aumento inmediato específico en la frecuencia de la positividad a ERK1/2 fosforilada 6 horas después de la adición de EphA2-Fc (c) o efrinaA1-Fc (d) en el medio de crecimiento. El nivel promedio de positividad observada se mantuvo estable durante 24 horas. (b) La fosforilación mediada por el receptor y el ligando solubles en los sitios de sustrato de ERK es abolida por el pre-tratamiento de las células con UO126, un inhibidor químico de la activación de MEK1. *Barra de escala*, 20 µm. El análisis por membrana de Western expuesto en el panel inferior de la misma Figura confirma que las concentraciones crecientes de efrinaA1-Fc potencian la activación de ERK1/2 en CMCs derivadas de GBM. GAPDH proporcionó un control para la carga de la muestra. La efrinaA1-Fc podría incluso potenciar la señalización aguas abajo de MAPK, como una intensa activación de Akt y se detectó mTOR (datos no mostrados).

Ejemplo 11.

BMP4 impulsa una cascada pro-diferenciación de acontecimientos que conducen a el empobrecimiento de agregados de células madre cancerosas en GBM, tanto *in vitro* como *in vivo* (11.). A continuación, se muestra el efecto de los tratamientos con BMP4 y efrinaA1-Fc combinados.

PCR en tiempo real:

Las CMC derivadas de GBM se expusieron cuarenta y ocho horas a BMP4 humano recombinante (100 ng/ml, R&D). El ARN ADnc total y se obtuvieron como se ha descrito previamente y, posteriormente se realizó un análisis cuantitativo para la expresión de EphA2. Las reacciones de RT-PCR cuantitativa se realizaron por triplicado utilizando un *SYBR Verde Green QPCR Core Reagent Kit* (Stratagene). El colorante SYBR Green se une a cualquier producto de PCR, y, por lo tanto, no requiere el uso de sondas específicas para la secuencia. La emisión fluorescente se registró en tiempo real (Chromo 4 Four-Color Real-Time PCR Detector, MJ). El perfil de expresión génica se completó utilizando el método comparativo Ct de cuantificación relativa. Las cantidades relativas de ARN se normalizaron con dos controles endógenos, GAPDH y ARN ribosomal 18S (ARNr 18S).

Curvas de crecimiento:

CMCs derivadas de GBM se sembraron en presencia de efrinaA1-Fc (1,0 µg/ml o 5,0 µg/ml) y en presencia de respectivamente BMP4 (100 ng/ml, R&D) o factor inhibidor de leucemia (FIL, 10 ng/ml, Chemicon), un fuerte regulador de la diferenciación neuronal en la progenie de células madre del SNC humano. El índice de proliferación celular se evaluó con el análisis de las curvas de crecimiento, como se ha descrito previamente.

Resultados: Como se muestra en la Figura 9, la exposición de rhBMP4 incita a la disminución proteica de EphA2 en CMCs derivadas de GBM a través de la diferenciación y el empobrecimiento del agregado de CMCs derivadas de GBM. (a) Análisis de QRT-PCR con cebadores específicos reveló la disminución del transcrito de EphA2, normalizado con GAPDH, en las células tratadas con rhBMP4 en comparación con los controles emparejados. El

histograma muestra medias normalizadas \pm EEM cuantificadas a partir de 3 experimentos diferentes representativos de dos líneas de CMCs derivadas de GBM. Además, como se apunta en la Figura 9(b), rhBMP4 provoca efectos inhibidores en efrinaA1-Fc en CMCs derivadas de GBM y la proliferación de CMNhs. No se detectaron diferencias en la cinética de crecimiento entre CMCs derivadas de GBM cultivadas con efrinaA1-Fc en ausencia o presencia de

5 rhBMP4, siendo la primera caracterizada por una tasa de crecimiento más rápido y el último comprende CMCs derivadas de GBM que se dividen gradualmente. Las curvas de crecimiento en b son representativas de una línea de CMCs derivadas de GBM.

Los mismos resultados se recogieron después de la estimulación con FIL (datos no mostrados).

10 **Ejemplo 12.**

Efectos de la administración de efrinaA1-Fc y EphA2-Fc en el crecimiento de xenoinjertos tumorales subcutáneos (SC) de CMCs derivadas de GBM humano.

15 Se sabe que la sobreexpresión de EphA2 causa tumorigénesis. Además, los parámetros críticos de células madre de CMCs derivadas de GBM analizados previamente, tales como la simetría general de división y la actividad relacionada con la autorrenovación, están linealmente correlacionados con la capacidad iniciadora del tumor de estas células. Los efectos de la disminución de EphA2 de la expresión o de la actividad por medio de efrinaA1-Fc o

20 EphA2-Fc se ensayaron *in vivo*.

En este caso, se ha evaluado si la reducción *in vitro* del agregado de CMCs derivadas de GBM tumorigénicas se relaciona con un descenso similar en la capacidad de las células tratadas con efrinaA1-Fc o EphA2-Fc para formar tumores *in vivo* en xenoinjertos subcutáneos (SC).

25 Para las inyecciones SC, se emplearon ratones *nu/nu* atímicos inmunocomprometidos (hembra con 3-4 semanas de vida, Charles River). Los xenoinjertos tumorales subcutáneos de GBM humano se establecieron mediante la inyección de 3×10^6 de CMCs derivadas de GBMh en el flanco derecho de los ratones como receptores, utilizando una aguja de calibre 23, en 100 μ l de TFS mezclado con un volumen equitativo de Cultrex (Trevigen).

30 Los ratones se vigilaron 7-35 días, los reactivos se administraron 1x/día durante 35 días cerca del sitio de la inyección de CMCs derivadas de GBM (inyección peritumoral).

35 Para ensayar la capacidad del ligando/receptor soluble para reducir CMCs derivadas de GBM con capacidad de iniciación tumoral y prevenir el establecimiento y crecimiento de tumores, los animales se asignaron al azar en:

- Control del vehículo: tras el trasplante de células, estas recibieron una inyección peritumoral de 100 μ l de solución salina;
- EfrinaA1-Fc (grupo co-tratado): el trasplante de células se acompañó al mismo tiempo por una inyección peritumoral de 100 μ l de efrinaA1-Fc en solución salina (10 μ g/dosis);
- EphA2-Fc (grupo co-tratado): el trasplante de células se acompañó por una inyección peritumoral de 100 μ l de EphA2-Fc en solución salina (10 μ g/dosis);
- EphA2-Fc (grupo post-tratado): el tumor se dejó crecer 7-10 días después del trasplante de células, a continuación, los ratones recibieron una inyección peritumoral con 100 μ l de EphA2-Fc (formación post-tumoral)

45 (10 μ g/dosis).
Las mediciones tumorales se determinaron con un calibrador pie de rey una vez por semana y se expresaron como volúmenes absolutos, así como volúmenes tumorales normalizados a individuales en el día 1, el inicio de la dosificación (volúmenes tumorales relativos) para evaluar los cambios en la tasa de crecimiento tumoral en relación con el tratamiento.

$$V (\text{mm}^3) = \pi/6 \times a \times b \times c$$

55 Los pesos corporales de los animales se determinaron y se analizaron sobre un curso temporal similar. Los xenoinjertos tumorales de CMCs derivadas de GBM de los animales tratados con efrinaA1-Fc y EphA2-Fc del control se extirparon, se post-fijaron y se crioprotegieron como se ha descrito posteriormente. Las secciones en serie de diez micrómetros de grosor se inmunomarcaron con los siguientes anticuerpos/antisueros: IgG1 de ratón anti-núcleos humano (1:100, Chemicon), IgG1 de ratón anti-mitocondria humano (1:50, Chemicon) e IgG2a de ratón anti-HLA-abc humano (1:100, Dako) para confirmar la naturaleza del tumor en humanos. IgG de conejo anti-Ki67 (1:1000, Novocastra) para la detección del índice de proliferación. Después de un enjuague minucioso, las secciones se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario apropiado: IgG de cabra anti-ratón o anti-conejo con Alexa Fluor 488-546 (1:1000, Invitrogen). Las secciones se lavaron y se cubrieron con Fluorsave.

65 Se realizaron tinción de hematoxilina y eosina e inmunohistoquímica. Las muestras se vieron y fotografiaron con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiophot-2 y microscopio confocal Leica DMIRE2. No se observó marcado

alguno en los experimentos de control cuando se omitieron los anticuerpos o antisueros primarios o, alternativamente, cuando se utilizó suero normal no inmune.

Resultados: Como se muestra con claridad en la Figura 10, La administración de efrinaA1-Fc o EphA2-Fc inhibió fuertemente la capacidad tumorigénica de CMCs derivadas de GBM humano y la progresión tumoral en el modelo murino subcutáneo. La administración de efrinaA1-Fc/EphA2-Fc *in vivo* impide el establecimiento y el crecimiento de tumores subcutáneos. El tratamiento de tumores preestablecidos con un receptor soluble produjo una caída importante de su crecimiento *in vivo*. Las CMC derivadas de GBM se inyectaron en el flanco derecho de ratones *nu/nu*. La solución salina (vehículo de control) o reactivos (co-tratamiento con efrinaA1-Fc o EphA2-Fc) se administraron diariamente alrededor del tapón (100 µl/dosis) desde la inyección de las células. Para el análisis del post-tratamiento hasta conseguir los volúmenes (7 días), los ratones desnudos portadores de un tumor recibieron 100 µl/dosis diaria. La gráfica muestra la media ± EEM en los cuatro grupos de seis ratones.

Ejemplo 13.

Efectos de la exposición de CMCs derivadas de GBM a efrinaA1-Fc y EphA2-Fc *in vitro* sobre su capacidad para iniciar xenoinjertos de tumores ortotópicos.

Para evaluar la eficacia antitumoral de las moléculas del receptor y del ligando solubles (por disminución de la expresión o actividad de EphA2) en el crecimiento tumoral, se empleó un modelo tumoral ortotópico clínicamente más relevante.

Con el fin de confirmar y ampliar los resultados obtenidos en el modelo SC, se realizaron experimentos de pre-tratamiento. Después de cuarenta y ocho horas de exposición al ligando o receptor soluble (5,0 µg/ml), CMCs derivadas de GBM (infectadas con el gen indicador de la luciferasa, CMCs derivadas de GBM infectadas con el gen indicador de luc) se inyectaron en el cuerpo estriado de los ratones *idcs/bg*. Esto permitió determinar si la exposición transitoria al ligando de efrina podría reducir/suprimir la tumorigenicidad en CMCs derivadas de GBM.

Infección lentiviral de CMCs derivadas de GBM.

Las CMC derivadas de GBM se infectaron con un gen indicador de luciferasa de luciérnaga.

Se emplearon recientemente vectores lentivirales generados en los que los promotores bidireccionales sintéticos median la transcripción coordinada de dos ARNm y permiten una transferencia eficaz del gen doble. (2.).

Este vector proviral consiste en un promotor bidireccional realizado por elementos del promotor del núcleo mínimo de citomegalovirus humano (CMVm) unido aguas arriba, y en orientación opuesta, de un promotor eficiente, de la fosfoglicerato quinasa humana (PGK). El diseño del vector pone a disposición la luciferasa de luciérnaga (*luc f*) y la proteína fluorescente verde (PFV) como genes promotores, que se explotarán i) *in vitro*, para enriquecer las células que expresan transgenes por CCAF, por dilución limitante o por análisis *lvis Imaging Xenogen In vivo*; ii) *in vivo*, para controlar con facilidad la distribución de las células tumorales en el cerebro. LV de tercera generación pseudotipado con VEV se producirá por una co-transfección transitoria con 4 plásmidos en células 293T y se concentró por ultracentrifugación.

El título de la expresión de los vectores se estimó en células HeLa mediante dilución limitante. Las partículas del vector se midieron por inmunocaptura del antígeno gag p24 del VIH-1. La infectividad del vector se calculó como la relación entre el título y las partículas de cada vector. Las CMC derivadas de GBM se expusieron al sobrenadante, condicionado de las células 293T transfectadas durante la noche, durante 16 horas. A continuación, el virus que contenía el medio se eliminó y se reemplazó por medio fresco (CMCs derivadas de GBM infectadas con el gen indicador de luc).

La eficacia de la infección se evaluó mediante el recuento del número de células que expresan PVF o por análisis de Lumina *in vivo*.

Las células bioluminiscentes se diluyeron en serie a partir de 5.000 a 100 células en medio completo en placas de 96 pocillos con fondo transparente, negro (Nunc). Se añadió D-luciferina (ONE-Glo, sistema de ensayo de luciferasa, Promega) 1:1 (v/v) a cada pocillo (que contenía las células individuales suspendidas de nuevo en 100 µl de medio completo) 3 minutos antes del diagnóstico por imágenes. El tiempo del diagnóstico por imágenes fue de 1 min/placa.

Trasplante de CMCs derivadas de GBM en el cuerpo estriado de ratones *idcs/bg*.

Las CMCs derivadas de GBM infectadas con el gen indicador de luc se sembraron en ausencia o presencia de efrinaA1-Fc (5 µg/ml) o EphA2-Fc (5 µg/ml) 48 horas antes de la inyección ortotópica. 3 µl de una suspensión de 1×10^5 células/ul en DMEM con DNasa (1:1000, Sigma) se administraron al cuerpo estriado derecho (0,2 µl/min) mediante una inyección estereotáctica a través de un electrodo de vidrio conectado a una jeringa Hamilton. Todas las inyecciones se realizaron durante un periodo de 6 minutos para asegurar el cumplimiento del parénquima óptimo.

Los animales se anestesiaron con 0,2 ml/kg de una solución madre que contenía clorhidrato de ketamina (8 mg/ml), xilacina (0,8 mg/ml), y alcohol etílico al 14,25 % en solución salina normal inyectada por vía intraperitoneal.

5 Las cabezas de los ratones anestesiados se desinfectaron con una solución de alcohol etílico al 70 % y povidona yodada. Se realizó una incisión en la línea media del aspecto dorsal de la cabeza y el pericráneo se retiró lateralmente para exponer el bregma.

Se realizó una perforación de 2 mm. Se tuvo cuidado de no alterar la duramadre.

10 Se utilizaron las siguientes coordenadas (mm de bregma): anteroventral (AV) = 0; medio-lateral (ML) = + 2,5 mm; dorso-ventral (DV) = -3,0 mm desde la superficie del cráneo. La aguja microinyectora se retrajo y la piel se cerró con Vicryl 4-0. Los animales se vigilaron diariamente para detectar cualquier signo de disfunción neurológica.

Evaluación del crecimiento tumoral por el sistema Xenogen IVIS Lumina.

15 La formación, la extensión y el volumen tumoral se calcularon indirectamente por semana por imágenes secuenciales tomadas con el análisis Lumina *in vivo* (Xenogen) y se compararon con los de los animales de control que recibieron células derivadas de GBM sin tratamiento.

20 De acuerdo con la instrucción del fabricante, para el diagnóstico por imágenes *in vivo*, a los animales se les dio el sustrato D-luciferina (Caliper) por inyección intraperitoneal de 150 mg/Kg en TFS 15 minutos antes del diagnóstico por imágenes y luego se anestesiaron (isoflurano al 2,5 %) (8.).

25 Los ratones se colocaron a continuación en la fase calentada en la caja de la cámara hermética a la luz con la exposición continua a isoflurano al 2 %. Los tiempos del diagnóstico por imágenes variaron de 20 s a 1 min en modo automático, en función del crecimiento del tumor y punto temporal.

Se realizaron medidas luminiscentes una vez a la semana, comenzando en el final de la primera semana después de la inoculación de las células hasta la sexta semana.

30 Los bajos niveles de luz emitidos de los tumores bioluminiscentes se detectaron por el sistema de cámaras de IVIS™, se integraron, se digitalizaron, y se mostraron. Las regiones de interés (RDI) de las imágenes mostradas se identificaron cerca de los sitios tumorales y se cuantificaron como el flujo total (fotones/s) utilizando el software de Living Image (Xenogen).

35 Inmunohistoquímica en secciones tisulares:

40 Después de 6 semanas se sacrificaron los ratones. Los animales sacrificados se sometieron a perfusión transcardiaca/fijación con 100 ml de NaCl 0,15 M seguido por 250 ml de tampón fosfato de potasio 0,1 M (KBS) que contenía PFA al 4 % infundida a una presión de 120 mmHg, utilizando una bomba peristáltica Watson-Marlow. Los cerebros se post-fijaron y crioprotegieron como se ha descrito previamente.

45 Se realizaron tinción de hematoxilina y eosina (H y E) e inmunohistoquímica. Se procesaron secciones en serie de diez micrómetros de grosor como se ha descrito previamente. Para recuperar las células tumorales humanas en las secciones tumorales, se emplearon anticuerpos específicos humanos como IgG1 de ratón anti-mitocondria humano (1:50, Chemicon), IgG1 de ratón anti-núcleos humano (1:100, Chemicon), IgG2a de ratón anti-HLA-abc humano (1:100, Dako) o se aprovechó la luciferasa (IgG1 de ratón 1:25, Invitrogen) o el gen indicador de la proteína verde fluorescente (PVF, 1:500, Mol Probes), presente en el vector.

50 La proliferación, la diferenciación y la neovascularización de células tumorales se evaluaron por inmunohistoquímica utilizando anticuerpos/sueros como: conejo anti-GFAP (1:500, Dako), anti-KI67 (1:200, Novocastra), ratón anti-PCNA humano (1:1500, Sigma), rata anti-CD147 (1:600, Serotech), conejo anti-NG2 (1:300, Chemicon). El volumen y la extensión tumorales se calcularon por medio de la reconstrucción en serie.

55 Las secciones tisulares también se tiñeron con los siguientes anticuerpos primarios:

60 cabra anti-EphA2 humano (1:50, R&D), clon D7 del monoclonal IgG1 de ratón anti-EphA2 humano (1:100, Sigma), policlonal de conejo anti-efrinaA1 humano (1:50, Abcam), conejo anti-fosfo-efrinaB humano (Tyr324/329) (1:100, Cell Signaling), cabra anti-efrinaB2 (1:10, R&D), cabra anti-efrinaB3 humano (1:10, R&D), conejo anti-fosfo (S339) CXCR4 (1:100, Abcam), cabra anti-Wnt5a humano (1:10, R&D), conejo anti-E-cadherina humano (1:100, Cell Signaling).

65 Resultados: Como se muestra en la Figura 11, la exposición de 48 horas de las CMC derivadas de GBM infectadas con el gen indicador de luc a efrinaA1-Fc o a EphA2-Fc (5,0 µg/ml) *in vitro*, antes del trasplante en el cuerpo estriado de los ratones idcs/bg, reduce drásticamente la capacidad de iniciación de tumor. El seguimiento de bioluminiscencia expuesto en la Figura 11A muestra con claridad un aumento de la señal correspondiente de los tumores. El

crecimiento tumoral de GBM está fuertemente inhibido en líneas bioluminiscentes de CMCs derivadas de GBM infectadas con el gen indicador de luc tratadas con EphA2-Fc o efrinaA1-Fc. Los tumores se siguieron una vez por semana, a partir de 7 días después de la inyección de células utilizando el diagnóstico por imágenes *in vivo*. La gráfica muestra la media \pm EEM de los tres grupos de seis ratones. Además, la Figura 11B muestra las diferencias en el crecimiento tumoral y el tamaño tumoral detectados *in vivo* después de la inyección intracraneal de CMCs en reposo derivadas de GBM y pre-tratadas con EphA2-Fc o efrinaA1-Fc. Se muestran las imágenes dorsales tomadas con el tiempo de tres ratones idcs/bg representativos inyectados. Las barras de escala pseudocolor fueron uniformes con todas las imágenes de las vistas dorsales con el fin de mostrar los cambios relativos en el sitio del tumor con el tiempo.

Por medio de imágenes confocales, expuestas en la Figura 11C, seis semanas después del implante ortotópico, los tumores derivados de CMCs derivadas de GBM infectadas con el gen indicador de luc no tratadas (a) fueron más prolongados e invadieron el parénquima cerebral de manera más eficiente que los generados por las células tratadas con efrinaA1-Fc (b) y EphA2-Fc (c), como se muestra por inmunotinción específica de luciferasa. El tamaño del tumor a partir de las imágenes inmunohistoquímicas de las secciones registradas en serie se compararon con las correspondientes mediciones de BLI para determinar el grado de correlación (datos no mostrados). *Barra de escala*, 1 mm.

Ejemplo 14.

Efectos de la microperfusión localizada y directa de efrinaA1-Fc y EphA2-Fc en tumores ortotópicos preestablecidos.

Un enfoque similar se utilizó para estudiar el crecimiento tumoral en la modulación de EphA2 *in vivo*. Esto podría definir una clara relación entre el estado de activación o expresión de los receptores de EphA2 y las propiedades oncogénicas de CMCs derivadas de GBM y, en particular, una correlación inversa entre estos dos parámetros. Esto también podría determinar la posibilidad de utilizar la modulación de EphA2 *in vivo* como herramienta terapéutica candidata para hacer frente al agregado de CMCs derivadas de GBMh en el tumor del paciente.

Implante de mini-bombas Alzet que infunden efrinaA1-Fc o EphA2-Fc en el cuerpo estriado de ratones idcs/bg.

Diez días después de la inyección ortotópica con CMCs derivadas de GBM infectadas con el gen indicador de luc, cuando el tumor tiene un tamaño sustancial sin causar anomalías motoras o conductuales, el catéter intracerebral de una bomba mini-osmótica (Alzet) se colocó a través del mismo orificio de trépano en el cuerpo estriado de los ratones.

Las bombas Alzet operan debido a una diferencia de presión osmótica entre un compartimento dentro de la bomba, llamado el manguito de sales, y el entorno tisular donde se implanta la bomba. La elevada osmolaridad del manguito de sales hace que el agua entre en la bomba a través de la membrana semipermeable, que cubre la superficie externa de la bomba. A medida que el agua entra en el manguito de sales, se comprime el depósito flexible, desplazando la solución de ensayo de la bomba a una velocidad controlada y predeterminada. De acuerdo a las instrucciones del fabricante (kit de infusión cerebral), 100 μ l de una solución de EphA2-Fc (30 μ g) o efrinaA1-Fc (30 μ g) en TFS se colocaron en el depósito y se infundieron durante 14 días (0,25 μ l/hora). Las dosis administradas fueron de 1,8 μ g/día.

Los animales se vigilaron estrechamente para detectar cualquier signo de toxicidad. La formación, extensión y el volumen tumoral se calcularon indirectamente por semana por medio de imágenes secuenciales tomadas con el análisis Lumina *in vivo* (Xenogen) como se ha descrito previamente. Los ratones infundidos se compararon con los animales del control que recibieron células en GBM sin tratamiento (100 μ l de solución de TFS).

Dos semanas después de la colocación de catéteres, se sacrificaron los ratones (4 semanas después de la inyección de CMCs derivadas de GBM). Se describieron la perfusión transcárdica/fijación, post-fijación e inclusión tisular e inmunohistoquímica en experimentos intracraneales previos al tratamiento.

Resultados: La Figura 12 muestra que la administración continua de efrinaA1-Fc o EphA2-Fc con mini-bombas Alzet, implantadas en el cuerpo estriado de los ratones idcs/bg en el sitio de la inyección celular 7-10 días después del trasplante de CMCs derivadas de GBM (post-tratamiento) inhibe el crecimiento tumoral. Las CMC derivadas de GBM infectadas con el gen indicador de luc se inyectaron en el cuerpo estriado derecho de los ratones idcs/bg y 14 días a partir de entonces, los tumores alcanzaron el volumen, el catéter intracerebral de una bomba mini-osmótica se colocó a través del mismo orificio de trépano en el cuerpo estriado de los ratones (flechas: implante de la bomba osmótica). Los ratones portadores de tumores se infundieron con EphA2-Fc, efrinaA1-Fc o el vehículo de control durante 14 días con una dosis diaria administrada de 1,8 μ g/día. El seguimiento de bioluminiscencia se llevó a cabo una vez por semana, a partir de 7 días después del implante de las células tumorales. El grupo de tratamiento con EphA2-Fc o efrinaA1-Fc muestra un valor de luminiscencia normalizado disminuido en el día 21, en contraste con el valor de luminiscencia creciente del grupo de control. Las mediciones de bioluminiscencia para cada ratón se normalizaron contra lecturas correspondientes obtenidas al comienzo de la terapia. La gráfica muestra la media \pm EEM de los tres grupos de seis ratones.

A partir de la descripción anterior y los ejemplos indicados anteriormente, la ventaja alcanzada por el producto descrito y obtenido de acuerdo con la presente descripción resulta evidente.

Referencias

- 5 1. Alo PL, Visca P, Mazzaferro S, Serpieri DE, Mangoni A, Botti C, Monaco S, Carboni M, Zaraca F, Trombetta G, Di Tondo U (1999) *Immunohistochemical study of fatty acid synthase, Ki67, proliferating cell nuclear antigen, and p53 expression in hyperplastic parathyroids*. *Ann Diagn Pathol* 3:287-293.
- 10 2. Amendola M, Venneri MA, Biffi A, Naldini L (2005) *Coordinate dual-gene transgenesis by lentiviral vectors carrying synthetic bidirectional promoters*. *Nat Biotechnol* 23:108-16.
3. Erba E, Bergamaschi D, Bassano L, Damia G, Ronzoni S, Faircloth GT, D'Incalci M (2001) *Ecteinascidin-743 (ET-743), a natural marine compound, with a unique mechanism of action*. *Eur J Cancer*, 37:97-105.
4. Gale NW, Yancopoulos GD (1997) *Ephrins and their receptors: a repulsive topic?* *Cell Tissue Res* 290:227-41.
- 15 5. Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, et al. (2004) *Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma*. *Cancer Res*; 64(19): 7011-21.
6. Gritti A, Parati EA, Cova L, Frolichsthal P, Galli R, Wanke E, Faravelli L, Morassutti DJ, Roisen F, Nickel DD, Vescovi AL (1996) *Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor*. *J Neurosci* 16:1091-1100.
7. Gritti A, Galli R, A.L. V (2001) *Cultures of Stem Cells of the Central Nervous System*, Humana Press Edition: S. Fedoroff.
- 20 8. Jenkins DE, Hornig YS, Oei Y, Dusich J y Purchio T (2005) *Bioluminescent human breast cancer cell lines that permit rapid and sensitive in vivo detection of mammary tumors and multiple metastases in immune deficient mice*. *Breast Cancer Res*; 5:R444-54.
9. Holland EC (2000) *Glioblastoma multiforme: the terminator*. *Proc Natl Acad Sci EE. UU.* 97:6242-4.
- 25 10. Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S y Comoglio PM (2003) *Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met proto oncogene*. *Cancer Cell* 3:347-361.
11. Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N, Lamorte G, Binda E, Broggi G, et al. (2006) *Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumor-initiating cells*. *Nature*; 444(7120): 761-5.
12. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO (2005) *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. *N Engl J Med*; 352(10):987-96.
- 30 13. Vescovi AL, Parati EA, Gritti A, Poulin P, Ferrario M, Wanke E, Frolichsthal-Schoeller P, Cova L, Arcellana-Panlilio M, Colombo A, Galli R (1999) *Isolation and cloning of multipotential stem cells from the embryonic human CNS and establishment of transplantable human neural stem cell lines by epigenetic stimulation*. *Exp Neurol* 156:71-83.
- 35 14. Publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos 2010/183618 A1.
15. Wykosky J. et al, (2007) *A novel, potent, and specific ephrinA1-based cytotoxin against EphA2 receptor expressing tumor cells*. *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 6(12), 3208-3218.
- 40 16. Wykosky J. et al, (2005). *EphA2 as a novel molecular marker and target in glioblastoma multiforme*. *Molecular Cancer Research*, vol. 3(10), 541-551.
17. Cheng N. et al, (2003). *Inhibition of VEGF-dependent multistage carcinogenesis by soluble EphA receptors*. *Neoplasia*, vol. 5(5), 445-456.
18. Dobrzanski P. et al, (2004). *Antiangiogenic and antitumor efficacy of EphA2 receptor antagonist*. *Cancer Research*, vol. 64(3), 910-919.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 50 <110> STEMGEN S.p.A.
- <120> EXPRESIÓN DEL RECEPTOR EPH EN LAS CÉLULAS MADRE TUMORALES
- <130> 10442PTWO
- 55 <150> 10185930.4
- <151> 01-10-2010
- <160> 46
- 60 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 205
- <212> PRT
- 65 <213> *Homo sapiens*

ES 2 616 444 T3

<400> 1

Met Glu Phe Leu Trp Ala Pro Leu Leu Gly Leu Cys Cys Ser Leu Ala
 1 5 10 15

Ala Ala Asp Arg His Thr Val Phe Trp Asn Ser Ser Asn Pro Lys Phe
 20 25 30

Arg Asn Glu Asp Tyr Thr Ile His Val Gln Leu Asn Asp Tyr Val Asp
 35 40 45

Ile Ile Cys Pro His Tyr Glu Asp His Ser Val Ala Asp Ala Ala Met
 50 55 60

Glu Gln Tyr Ile Leu Tyr Leu Val Glu His Glu Glu Tyr Gln Leu Cys
 65 70 75 80

Gln Pro Gln Ser Lys Asp Gln Val Arg Trp Gln Cys Asn Arg Pro Ser
 85 90 95

Ala Lys His Gly Pro Glu Lys Leu Ser Glu Lys Phe Gln Arg Phe Thr
 100 105 110

Pro Phe Thr Leu Gly Lys Glu Phe Lys Glu Gly His Ser Tyr Tyr Tyr
 115 120 125

Ile Ser Lys Pro Ile His Gln His Glu Asp Arg Cys Leu Arg Leu Lys
 130 135 140

Val Thr Val Ser Gly Lys Ile Thr His Ser Pro Gln Ala His Asp Asn
 145 150 155 160

Pro Gln Glu Lys Arg Leu Ala Ala Asp Asp Pro Glu Val Arg Val Leu
 165 170 175

His Ser Ile Gly His Ser Ala Ala Pro Arg Leu Phe Pro Leu Ala Trp
 180 185 190

Thr Val Leu Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Gln Thr Pro
 195 200 205

5 <210> 2
 <211> 1590
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 2

ES 2 616 444 T3

gccagatctg tgagcccagc gctgactgcg ccgcgagaaa agccagtggg aaccagacc 60
 cataggagac ccgctcccc gctcggcctg gccaggcccc gcgctatgga gttcctctgg 120
 gccctctct tgggtctgtg ctgcagtctg gccgctgctg atcgccacac cgtcttctgg 180
 aacagttcaa atcccaagtt ccggaatgag gactacacca tacatgtgca gctgaatgac 240
 tacgtggaca tcatctgtcc gcactatgaa gatcactctg tggcagacgc tgccatggag 300
 cagtacatac tgtacctggt ggagcatgag gagtaccagc tgtgccagcc ccagtccaag 360
 gaccaagtcc gctggcagtg caaccggccc agtgccaagc atggcccgga gaagctgtct 420
 gagaagttcc agcgtctcac acctttcacc ctgggcaagg agttcaaaga aggacacagc 480
 tactactaca tctccaaacc catccaccag catgaagacc gctgcttgag gttgaagggtg 540
 actgtcagtg gcaaaatcac tcacagtctc caggcccatg acaatccaca ggagaagaga 600
 cttgcagcag atgaccaga ggtgcgggtt ctacatagca tcggtcacag tgctgcccc 660
 cgcctcttcc cacttgctg gactgtgctg ctcttccac ttctgctgct gcaaaccocg 720
 tgaagggtga tgccacacct ggccttaaag agggacaggc tgaagagagg gacaggcact 780
 ccaaacctgt cttggggcca ctttcagagc cccagccct ggaaccact cccaccacag 840
 gcataagcta tcacctagca gcctcaaac gggtcagtat taaggtttcc aaccggaagg 900
 aggccaacca gcccagacgt gccatcccc ccttcacctc ggagggatgg agaaagaagt 960
 ggagacagtc ctttcccacc attcctgcct ttaagccaaa gaaacaagct gtgcaggcat 1020
 ggtcccttaa ggcacagtgg gagctgagct ggaaggggccc acgtggatgg gcaaagcttg 1080
 tcaaagatgc ccctccagg agagagccag gatgccaga tgaactgact gaaggaaaag 1140
 caagaaacag tttcttgctt ggaagccagg tacaggagag gcagcatgct tgggctgacc 1200
 cagcatctcc cagcaagacc tcatctgtgg agctgccaca gagaagtttg tagccaggt 1260
 ctgcattctc tcccatcctg gggcagcact cccagagct gtgccagcag gggggctgtg 1320
 ccaacctgtt cttagagtgt agctgtaagg gcagtgccca tgtgtacatt ctgcctagag 1380

 tgtagcctaa agggcagggc ccacgtgtat agtatctgta tataagttgc tgtgtgtctg 1440
 tcctgatttc tacaactgga gtttttttat acaatgttct ttgtctcaa ataaagcaat 1500
 gtgttttttc ggacatgctt ttctgccact ccatattaaa acatagacc attgagctcc 1560
 tgctaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1590

<210> 3
 <211> 976
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

ES 2 616 444 T3

Met Glu Leu Gln Ala Ala Arg Ala Cys Phe Ala Leu Leu Trp Gly Cys
 1 5 10 15

Ala Leu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gln Gly Lys Glu Val Val Leu Leu
 20 25 30

Asp Phe Ala Ala Ala Gly Gly Glu Leu Gly Trp Leu Thr His Pro Tyr
 35 40 45

Gly Lys Gly Trp Asp Leu Met Gln Asn Ile Met Asn Asp Met Pro Ile
 50 55 60

Tyr Met Tyr Ser Val Cys Asn Val Met Ser Gly Asp Gln Asp Asn Trp
 65 70 75 80

Leu Arg Thr Asn Trp Val Tyr Arg Gly Glu Ala Glu Arg Ile Phe Ile
 85 90 95

Glu Leu Lys Phe Thr Val Arg Asp Cys Asn Ser Phe Pro Gly Gly Ala
 100 105 110

Ser Ser Cys Lys Glu Thr Phe Asn Leu Tyr Tyr Ala Glu Ser Asp Leu
 115 120 125

Asp Tyr Gly Thr Asn Phe Gln Lys Arg Leu Phe Thr Lys Ile Asp Thr
 130 135 140

Ile Ala Pro Asp Glu Ile Thr Val Ser Ser Asp Phe Glu Ala Arg His
 145 150 155 160

Val Lys Leu Asn Val Glu Glu Arg Ser Val Gly Pro Leu Thr Arg Lys
 165 170 175

Gly Phe Tyr Leu Ala Phe Gln Asp Ile Gly Ala Cys Val Ala Leu Leu
 180 185 190

ES 2 616 444 T3

Ser Val Arg Val Tyr Tyr Lys Lys Cys Pro Glu Leu Leu Gln Gly Leu
195 200 205

Ala His Phe Pro Glu Thr Ile Ala Gly Ser Asp Ala Pro Ser Leu Ala
210 215 220

Thr Val Ala Gly Thr Cys Val Asp His Ala Val Val Pro Pro Gly Gly
225 230 235 240

Glu Glu Pro Arg Met His Cys Ala Val Asp Gly Glu Trp Leu Val Pro
245 250 255

Ile Gly Gln Cys Leu Cys Gln Ala Gly Tyr Glu Lys Val Glu Asp Ala
260 265 270

Cys Gln Ala Cys Ser Pro Gly Phe Phe Lys Phe Glu Ala Ser Glu Ser
275 280 285

Pro Cys Leu Glu Cys Pro Glu His Thr Leu Pro Ser Pro Glu Gly Ala
290 295 300

Thr Ser Cys Glu Cys Glu Glu Gly Phe Phe Arg Ala Pro Gln Asp Pro
305 310 315 320

Ala Ser Met Pro Cys Thr Arg Pro Pro Ser Ala Pro His Tyr Leu Thr
325 330 335

Ala Val Gly Met Gly Ala Lys Val Glu Leu Arg Trp Thr Pro Pro Gln
340 345 350

Asp Ser Gly Gly Arg Glu Asp Ile Val Tyr Ser Val Thr Cys Glu Gln
355 360 365

Cys Trp Pro Glu Ser Gly Glu Cys Gly Pro Cys Glu Ala Ser Val Arg
370 375 380

Tyr Ser Glu Pro Pro His Gly Leu Thr Arg Thr Ser Val Thr Val Ser
385 390 395 400

Asp Leu Glu Pro His Met Asn Tyr Thr Phe Thr Val Glu Ala Arg Asn
405 410 415

Gly Val Ser Gly Leu Val Thr Ser Arg Ser Phe Arg Thr Ala Ser Val
420 425 430

Ser Ile Asn Gln Thr Glu Pro Pro Lys Val Arg Leu Glu Gly Arg Ser
435 440 445

ES 2 616 444 T3

Thr Thr Ser Leu Ser Val Ser Trp Ser Ile Pro Pro Pro Gln Gln Ser
450 455 460

Arg Val Trp Lys Tyr Glu Val Thr Tyr Arg Lys Lys Gly Asp Ser Asn
465 470 475 480

Ser Tyr Asn Val Arg Arg Thr Glu Gly Phe Ser Val Thr Leu Asp Asp
485 490 495

Leu Ala Pro Asp Thr Thr Tyr Leu Val Gln Val Gln Ala Leu Thr Gln
500 505 510

Glu Gly Gln Gly Ala Gly Ser Lys Val His Glu Phe Gln Thr Leu Ser
515 520 525

Pro Glu Gly Ser Gly Asn Leu Ala Val Ile Gly Gly Val Ala Val Gly
530 535 540

Val Val Leu Leu Leu Val Leu Ala Gly Val Gly Phe Phe Ile His Arg
545 550 555 560

Arg Arg Lys Asn Gln Arg Ala Arg Gln Ser Pro Glu Asp Val Tyr Phe
565 570 575

Ser Lys Ser Glu Gln Leu Lys Pro Leu Lys Thr Tyr Val Asp Pro His
580 585 590

Thr Tyr Glu Asp Pro Asn Gln Ala Val Leu Lys Phe Thr Thr Glu Ile
595 600 605

His Pro Ser Cys Val Thr Arg Gln Lys Val Ile Gly Ala Gly Glu Phe
610 615 620

Gly Glu Val Tyr Lys Gly Met Leu Lys Thr Ser Ser Gly Lys Lys Glu
625 630 635 640

Val Pro Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Ala Gly Tyr Thr Glu Lys Gln
645 650 655

Arg Val Asp Phe Leu Gly Glu Ala Gly Ile Met Gly Gln Phe Ser His
660 665 670

His Asn Ile Ile Arg Leu Glu Gly Val Ile Ser Lys Tyr Lys Pro Met
675 680 685

Met Ile Ile Thr Glu Tyr Met Glu Asn Gly Ala Leu Asp Lys Phe Leu

ES 2 616 444 T3

690						695										700
Arg	Glu	Lys	Asp	Gly	Glu	Phe	Ser	Val	Leu	Gln	Leu	Val	Gly	Met	Leu	
705					710					715					720	
Arg	Gly	Ile	Ala	Ala	Gly	Met	Lys	Tyr	Leu	Ala	Asn	Met	Asn	Tyr	Val	
				725					730					735		
His	Arg	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Asn	Ile	Leu	Val	Asn	Ser	Asn	Leu	Val	
			740					745					750			
Cys	Lys	Val	Ser	Asp	Phe	Gly	Leu	Ser	Arg	Val	Leu	Glu	Asp	Asp	Pro	
		755					760					765				
Glu	Ala	Thr	Tyr	Thr	Thr	Ser	Gly	Gly	Lys	Ile	Pro	Ile	Arg	Trp	Thr	
	770						775					780				
Ala	Pro	Glu	Ala	Ile	Ser	Tyr	Arg	Lys	Phe	Thr	Ser	Ala	Ser	Asp	Val	
785					790					795					800	
Trp	Ser	Phe	Gly	Ile	Val	Met	Trp	Glu	Val	Met	Thr	Tyr	Gly	Glu	Arg	
				805					810					815		
Pro	Tyr	Trp	Glu	Leu	Ser	Asn	His	Glu	Val	Met	Lys	Ala	Ile	Asn	Asp	
			820					825						830		
Gly	Phe	Arg	Leu	Pro	Thr	Pro	Met	Asp	Cys	Pro	Ser	Ala	Ile	Tyr	Gln	
		835					840					845				
Leu	Met	Met	Gln	Cys	Trp	Gln	Gln	Glu	Arg	Ala	Arg	Arg	Pro	Lys	Phe	
	850					855						860				
Ala	Asp	Ile	Val	Ser	Ile	Leu	Asp	Lys	Leu	Ile	Arg	Ala	Pro	Asp	Ser	
865					870					875					880	
Leu	Lys	Thr	Leu	Ala	Asp	Phe	Asp	Pro	Arg	Val	Ser	Ile	Arg	Leu	Pro	
				885					890					895		
Ser	Thr	Ser	Gly	Ser	Glu	Gly	Val	Pro	Phe	Arg	Thr	Val	Ser	Glu	Trp	
			900					905						910		
Leu	Glu	Ser	Ile	Lys	Met	Gln	Gln	Tyr	Thr	Glu	His	Phe	Met	Ala	Ala	
		915					920					925				
Gly	Tyr	Thr	Ala	Ile	Glu	Lys	Val	Val	Gln	Met	Thr	Asn	Asp	Asp	Ile	
	930					935						940				

ES 2 616 444 T3

Lys Arg Ile Gly Val Arg Leu Pro Gly His Gln Lys Arg Ile Ala Tyr
 945 950 955 960

Ser Leu Leu Gly Leu Lys Asp Gln Val Asn Thr Val Gly Ile Pro Ile
 965 970 975

<210> 4
 <211> 3970
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 4

ggttctcacc caacttccat taaggactcg gggcaggagg ggcagaagtt gcgcgcaggc 60
 cggcggggcgg gagcggacac cgaggccggc gtgcaggcgt gcgggtgtgc gggagccggg 120
 ctccggggga tcggaccgag agcggagaagc gcggcatgga gctccaggca gcccgccct 180
 gcttcgccct gctgtggggc tgtgcgctgg ccgcggccgc ggcggcgag ggcaaggaag 240
 tggactgct ggactttgct gcagctggag gggagctcgg ctggctcaca caccgctatg 300
 gcaaaggggtg ggacctgatg cagaacatca tgaatgacat gccgatctac atgtactccg 360
 tgtgcaacgt gatgtctggc gaccaggaca actggctccg caccaactgg gtgtaccgag 420
 gagaggctga gcgtatcttc attgagctca agtttactgt acgtgactgc aacagcttcc 480
 ctggtggcgc cagctcctgc aaggagactt tcaacctcta ctatgccgag tcggacctgg 540
 actacggcac caacttccag aagcgcctgt tcaccaagat tgacaccatt gcgcccgatg 600
 agatcaccgt cagcagcgac ttcgaggcac gccacgtgaa gctgaacgtg gaggagcgt 660
 ccgtggggcc gctcaccgc aaaggcttct acctggcctt ccaggatata ggtgcctgtg 720
 tggcgctgct ctccgtccgt gtctactaca agaagtgcc cgagctgctg cagggcctgg 780
 cccacttccc tgagaccatc gccggctctg atgcacctc cctggccaact gtggccggca 840
 cctgtgtgga ccatgccgtg gtgccaccgg ggggtgaaga gcccctatg cactgtgcag 900
 tggatggcga gtggtggtg ccattgggc agtgccctgtg ccaggcaggc tacgagaagg 960
 tggaggatgc ctgccaggcc tgctcgctg gatTTTTTaa gtttgaggca tctgagagcc 1020
 cctgcttgga gtgccctgag cacacgctgc catcccctga gggtgccacc tctgagagt 1080
 gtgaggaagg cttcttccgg gcacctcagg acccagcgtc gatgccttgc acacgacccc 1140
 cctccgcccc aactacctc acagccgtgg gcatgggtgc caaggtggag ctgcgctgga 1200
 cggccccctca ggacagcggg ggccgcgagg acattgtcta cagcgtcacc tgcgaacagt 1260
 gctggcccga gtctgggaa tgcgggcccgt gtgaggecag tgtgcgctac tcggagcctc 1320
 ctcacggact gaccgcacc agtgtgacag tgagcgacct ggagccccac atgaactaca 1380
 ccttaccgt ggaggcccgc aatggcgtct caggcctggt aaccagccgc agcttccgta 1440
 ctgccagtgt cagcatcaac cagacagagc cccccaaggt gaggctggag ggccgcagca 1500

10

ES 2 616 444 T3

ccacctcgct tagcgtctcc tggagcatcc ccccgccgca gcagagccga gtgtggaagt 1560
 acgaggtcac ttaccgcaag aagggagact ccaacagcta caatgtgcgc cgcaccgagg 1620
 gtttctccgt gacctggac gacctggccc cagacaccac ctacctggtc caggtgcagg 1680
 cactgacgca ggagggccag ggggcccggca gcaaggtgca cgaattccag acgctgtccc 1740
 cggagggatc tggcaacttg gcggtgattg gcggcgtggc tgtcgggtgtg gtcctgcttc 1800
 tggtgctggc aggagtggc ttctttatcc accgcaggag gaagaaccag cgtgcccgcc 1860
 agtccccgga ggacgtttac ttctccaagt cagaacaact gaagcccctg aagacatacg 1920
 tggacccccca cacatatgag gacccccacc aggctgtggt gaagttcact accgagatcc 1980
 atccatcctg tgtcactcgg cagaaggtga tcggagcagg agagtttggg gaggtgtaca 2040
 agggcatgct gaagacatcc tcggggaaga aggaggtgcc ggtggccatc aagacgctga 2100
 aagccggcta cacagagaag cagcgagtgg acttccctcg cgaggccggc atcatgggcc 2160
 agttcagcca ccacaacatc atccgcctag agggcgtcat ctccaaatac aagcccatga 2220
 tgatcatcac tgagtacatg gagaatgggg ccctggacaa gttccttcgg gagaaggatg 2280
 gcgagttcag cgtgctgcag ctggtgggca tgetgcgggg catcgcagct ggcataaagt 2340
 acctggccaa catgaactat gtgcaccgtg acctggctgc ccgcaacatc ctcgtcaaca 2400
 gcaacctggt ctgcaagggtg totgactttg gcctgtcccg cgtgctggag gacgaccccc 2460
 aggccaccta caccaccagt ggcggcaaga tccccatccg ctggaccgcc ccggaggcca 2520
 tttcctaccg gaagttcacc tctgccagcg acgtgtggag ctttggcatt gtcatagtgg 2580
 aggtgatgac ctatggcgag cggccctact gggagttgtc caaccacgag gtgatgaaag 2640
 ccatcaatga tggcttccgg ctccccacac ccatggactg ccctccgcc atctaccagc 2700
 tcatgatgca gtgctggcag caggagcgtg cccgcggccc caagttcgct gacatcgtca 2760
 gcatcctgga caagctcatt cgtgcccctg actccctcaa gaccctggct gactttgacc 2820
 cccgcgtgtc tatccggctc cccagcacga gcggtcggga ggggtgccc ttccgcacgg 2880
 tgtccgagtg gctggagtcc atcaagatgc agcagtatac ggagcacttc atggcggccc 2940
 gctacactgc catcgagaag gtggtgcaga tgaccaacga cgacatcaag aggattgggg 3000
 tgcggotgcc cggccaccag aagcgcacg cctacagcct gctgggactc aaggaccagg 3060
 tgaacactgt ggggatcccc atctgagcct cgacagggcc tggagcccca tcggccaaga 3120
 atacttgaag aacagagtg gcctccctgc tgtgcoatgc tgggccactg gggactttat 3180
 ttatttctag ttctttctc cccctgcaac ttccgctgag ggtctcggga tgacaccctg 3240
 gcctgaactg aggagatgac cagggatgct gggtggggc ctctttccct gcgagacgca 3300
 cacagctgag cacttagcag gcaccgccac gtcccagcat ccctggagca ggagccccgc 3360

ES 2 616 444 T3

```

cacagccttc ggacagacat atgggatatt cccaagccga ccttccctcc gccttctccc      3420
acatgaggcc atctcaggag atggagggct tggcccagcg ccaagtaaac agggtaacctc      3480
aagccccatt tcctcacact aagagggcag actgtgaact tgactgggtg agacccaaag      3540
cggtccctgt ccctctagtg ccttctttag accctcgggc cccatcctca tcctgactg      3600
gccaaaacct tgctttcctg ggcccttgca agatgcttgg ttgtgttgag gtttttaaat      3660
atatattttg tactttgtgg agagaatgtg tgtgtgtggc agggggcccc gccagggtg      3720
gggacagagg gtgtcaaaca ttcgtgagct ggggactcag ggaccggtgc tgcaggagtg      3780
tcctgcccat gccccagtgc gccccatctc tcatcctttt ggataagttt ctattctgtc      3840
agtgttaaag attttgttt gttggacatt ttttctgaat cttaatat tattttttt      3900
atatttattg ttagaaaatg acttatttct gctctggaat aaagttgcag atgattcaaa      3960
ccgaaaaaaaaa                                                                3970

```

5 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> primer_bind
 <222> (1)..(20)
 <223> EphA1 directo

15 <400> 5
 gcctgacacc acatacatcg 20

20 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

25 <220>
 <221> primer_bind
 <220> (1)..(20)
 <223> EphA1 inverso

30 <400> 6
 atatgctgggt ggctaaactg 20

35 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

40 <220>
 <221> primer_bind

45 <220> (1)..(20)
 <223> EphA2 directo

50 <400> 7
 aaagccggct acacagagaa 20

55 <210> 8
 <211> 20
 <212> ADN

ES 2 616 444 T3

<213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> primer_bind
 5 <220> (1)..(20)
 <223> EphA2 inverso
 <400> 8
 10 ttgacaact cccagtaggg 20
 <210> 9
 <211> 20
 <212> ADN
 15 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> primer_bind
 20 <220> (1)..(20)
 <223> EphA3 directo
 <400> 9
 25 gagtttgcca aggaattgga 20
 <210> 10
 <211> 20
 <212> ADN
 30 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> primer_bind
 35 <220> (1)..(20)
 <223> EphA3 inverso
 <400> 10
 ttgggatctt ccctcctctt 20
 40 <210> 11
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 45 <220>
 <221> primer_bind
 <220> (1)..(20)
 <223> EphA4 directo
 50 <400> 11
 accaagcagt gcgagagttt 20
 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 60 <220>
 <221> primer_bind
 <220> (1)..(20)
 <223> EphA4 inverso
 65 <400> 12
 ctccccgtac gacatcactt 20

ES 2 616 444 T3

<210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <220>
 <221> primer_bind
 <220> (1)..(20)
 10 <223> EphA5 directo
 <400> 13
 caagccta atggcgggtg 20
 15 <210> 14
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 20 <220>
 <221> primer_bind
 <220> (1)..(20)
 25 <223> EphA5 inverso
 <400> 14
 gtgaactgcc catcgtttt 20
 30 <210> 15
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 35 <220>
 <221> primer_bind
 <220> (1)..(20)
 <223> EphA7 directo
 40 <400> 15
 atcattggga gaaggcactg 20
 45 <210> 16
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 50 <220>
 <221> primer_bind
 <220> (1)..(20)
 <223> EphA7 inverso
 55 <400> 16
 atggacaaca tttgggtggt 20
 60 <210> 17
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> primer_bind
 65 <220> (1)..(20)
 <223> EphA8 directo

ES 2 616 444 T3

	<400> 17 gagaacggct ctctggacac	20
5	<210> 18 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<220> <221> primer_bind	
	<220> (1)..(20) <223> EphA8 inverso	
15	<400> 18 cctccacaga gctgatgaca	20
20	<210> 19 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<220> <221> primer_bind	
	<220> (1)..(20) <223> EphA10 directo	
30	<400> 19 cgactaatgc tcgactgctg	20
35	<210> 20 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<220> <221> primer_bind	
	<220> (1)..(20) <223> EphA10 inverso	
45	<400> 20 tgatcaagca actgccactc	20
50	<210> 21 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
55	<220> <221> primer_bind	
	<220> (1)..(20) <223> EphB1 directo	
60	<400> 21 caggtactc ggagaagcag	20
65	<210> 22 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220> <221> primer_bind	

ES 2 616 444 T3

<220> (1)..(20)
 <223> EphB1 inverso

 <400> 22
 5 ccagcatgag ctggtgtaga 20

 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <221> primer_bind

 <220> (1)..(20)
 <223> EphB2 directo

 <400> 23
 20 agttcggcca aattgtcaac 20

 <210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <221> primer_bind

 <220> (1)..(20)
 <223> EphB2 inverso

 <400> 24
 30 aggcaggtga atgtcaaacc 20

 <210> 25
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <221> primer_bind

 <220> (1)..(20)
 <223> EphB3 directo

 <400> 25
 45 agcaacctgg tctgcaaagt 20

 <210> 26
 <211> 20
 <212> ADN
 50 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <221> primer_bind

 <220> (1)..(20)
 <223> EphB3 inverso

 <400> 26
 60 ggatgagctt gtccagggta 20

 <210> 27
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> *Homo sapiens*

ES 2 616 444 T3

```

<220>
<221> primer_bind

5  <220> (1)..(20)
    <223> EphB4 directo

    <400> 27
    gagagctgtg tggcaatcaa      20

10  <210> 28
    <211> 20
    <212> ADN
    <213> Homo sapiens

15  <220>
    <221> primer_bind

    <220> (1)..(20)
    <223> EphB4 inverso

20  <400> 28
    tgtagtgagg atcggaagag      20

25  <210> 29
    <211> 20
    <212> ADN
    <213> Homo sapiens

30  <220>
    <221> primer_bind

    <220> (1)..(20)
    <223> EphB6 directo

35  <400> 29
    tcattgcaca tggaaagcat      20

40  <210> 30
    <211> 20
    <212> ADN
    <213> Homo sapiens

45  <220>
    <221> primer_bind

    <220> (1)..(20)
    <223> EphB6 inverso

50  <400> 30
    gggtagtcc agacaaggaa      20

55  <210> 31
    <211> 20
    <212> ADN
    <213> Homo sapiens

    <220>
    <221> primer_bind

60  <220> (1)..(20)
    <223> EFNA1 directo

    <400> 31
    ggtgactgtc agtgcaaaa      20

65  <210> 32

```

ES 2 616 444 T3

	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
5	<220>	
	<221> primer_bind	
	<220> (1)..(19)	
10	<223> EFNA1 inverso	
	<400> 32	
	agtggaagga gcagcacat	19
15	<210> 33	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<220>	
	<221> primer_bind	
	<220> (1)..(20)	
	<223> EFNA2 directo	
25	<400> 33	
	atctactgcc cgcactatgg	20
30	<210> 34	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
35	<220>	
	<221> primer_bind	
	<220> (1)..(20)	
	<223> EFNA2 inverso	
40	<400> 34	
	aggcgtggca gagatgtagt	20
45	<210> 35	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<220>	
	<221> primer_bind	
	<220> (1)..(20)	
	<223> EFNA3 directo	
55	<400> 35	
	catgcggtgt actggaacag	20
60	<210> 36	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
65	<220>	
	<221> primer_bind	
	<220> (1)..(20)	
	<223> EFNA3 inverso	

ES 2 616 444 T3

	<400> 36 gtggaactcg tagcccagag	20
5	<210> 37 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<220> <221> primer_bind	
	<220> (1)..(20) <223> EFNA4 directo	
15	<400> 37 acattgtctg cccccactac	20
20	<210> 38 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<220> <221> primer_bind	
	<220> (1)..(20) <223> EFNA4 inverso	
30	<400> 38 tgggctgact cagactcct	20
35	<210> 39 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<220> <221> primer_bind	
	<220> (1)..(20) <223> EFNA5 directo	
45	<400> 39 aggactccgt cccagaagat	20
50	<210> 40 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
55	<220> <221> primer_bind	
	<220> (1)..(20) <223> EFNA5 inverso	
60	<400> 40 atctgggatt gcagaggaga	20
65	<210> 41 <211> 20 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<220> <221> primer_bind	

ES 2 616 444 T3

<220> (1)..(20)
 <223> EFNB1 directo

 <400> 41
 5 gcctggagtt caagaagcac 20

 <210> 42
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <221> primer_bind
 15 <220> (1)..(20)
 <223> EFNB1 inverso

 <400> 42
 20 gaacaatgcc accttgagtt 20

 <210> 43
 <211> 20
 <212> ADN
 25 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <221> primer_bind
 30 <220> (1)..(20)
 <223> EFNB2 directo

 <400> 43
 gtgccaaacc agaccaagat 20
 35
 <210> 44
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 40
 <220>
 <221> primer_bind

 <220> (1)..(20)
 <223> EFNB2 inverso
 45
 <400> 44
 gatgtgttc cccgaatgc 20

 <210> 45
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 50
 <220>
 <221> primer_bind
 55
 <220> (1)..(20)
 <223> EFNB3 directo
 60
 <400> 45
 aggcagaggg tggttatgtg 20

 <210> 46
 <211> 20
 <212> ADN
 65 <213> *Homo sapiens*

ES 2 616 444 T3

<220>

<221> primer_bind

<220> (1)..(20)

5 <223> EFNB3 inverso

<400> 46

tctcttcca tgggcatttc 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un precursor de EphA2 para su uso en el tratamiento de un tumor cerebral que comprende una población de células madre cancerosas mediante la inhibición de la proliferación y/o migración de células madre cancerosas, donde dicho precursor de EphA2 es la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 3.
2. El precursor de EphA2 para su uso según la reivindicación 1, donde dichas células madre cancerosas son células de glioblastoma.
- 10 3. El precursor de EphA2 para su uso según la reivindicación 2, donde dichas células de glioblastoma son células de glioblastoma multiforme.
- 15 4. El precursor de EphA2 para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho inhibidor de la proliferación y/o migración de células madre cancerosas resulta útil en el tratamiento terapéutico de una recurrencia de un tumor cerebral tras una intervención quirúrgica.
- 20 5. El precursor de EphA2 para su uso según la reivindicación 1, donde dicho inhibidor de la proliferación de células madre cancerosas se utiliza en el tratamiento profiláctico de una recurrencia de un tumor cerebral tras una intervención quirúrgica.
6. El precursor de EphA2 para su uso según la reivindicación 1, donde el inhibidor induce con eficacia un efecto pro-diferenciación sobre las células madre cancerosas.
- 25 7. El precursor de EphA2 para su uso según la reivindicación 1, donde el inhibidor empobrece con eficacia una población de células potenciadoras del tumor.

	Genes	Controles		CMCs de GBM	
		U87	CMNHs	n.º 1	n.º 7
RECEPTORES	EphA1	-	+	+	-
	EphA2	+	+	+	+
	EphA3	-	+	apenas visible	+
	EphA4	+	+	+	+
	EphA5	+	-	-	-
	EphA7	+	+	-	-
	EphA8	-	-	-	-
	EphA10	-	-	-	-
	EphB1	-	-	-	-
	EphB2	+	+	+	+
	EphB3	+	+	+	+
	EphB4	+	+	+	+
	EphB6	+	+	+	-
	LIGANDOS	EFNA1	-	+	+
EFNA2		-	apenas visible	+	-
EFNA3		+	+	+	+
EFNA4		+	+	+	+
EFNA5		-	-	-	-
EFNB1		+	+	+	+
EFNB2		+	+	+	apenas visible
EFNB3		-	+	+	apenas visible

Figura 1A

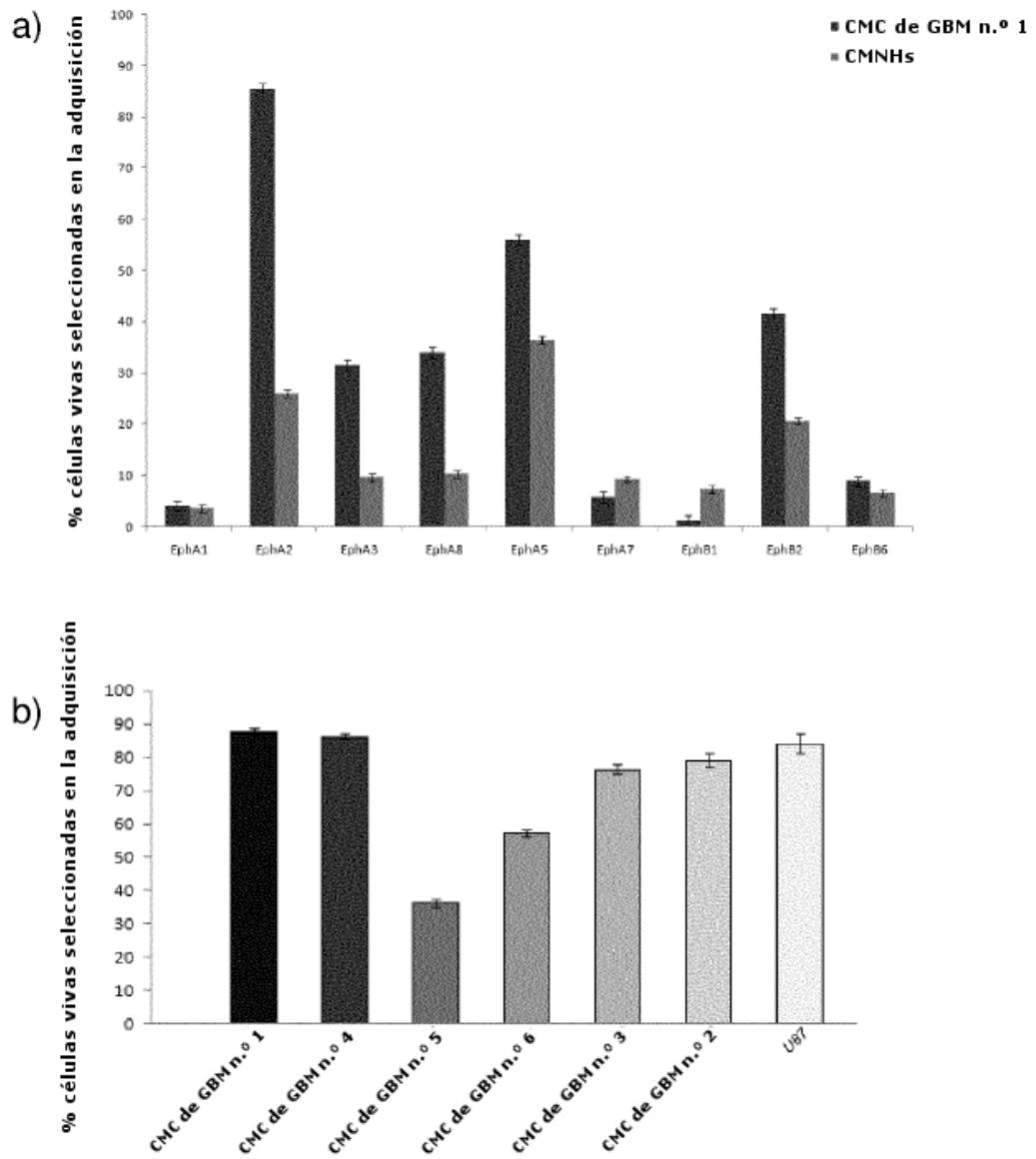


Figura 1B

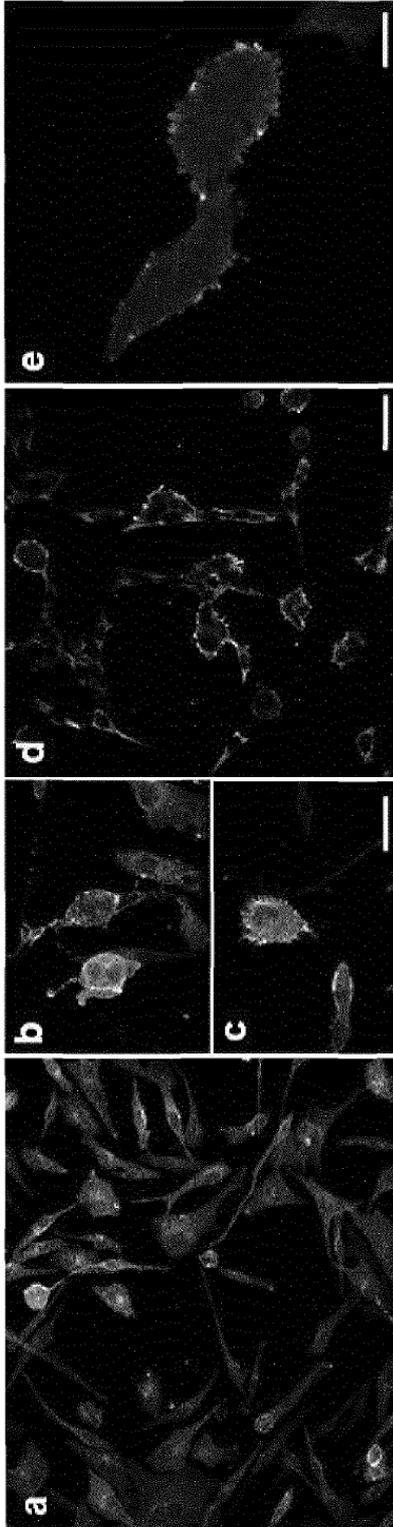


Figura 1C

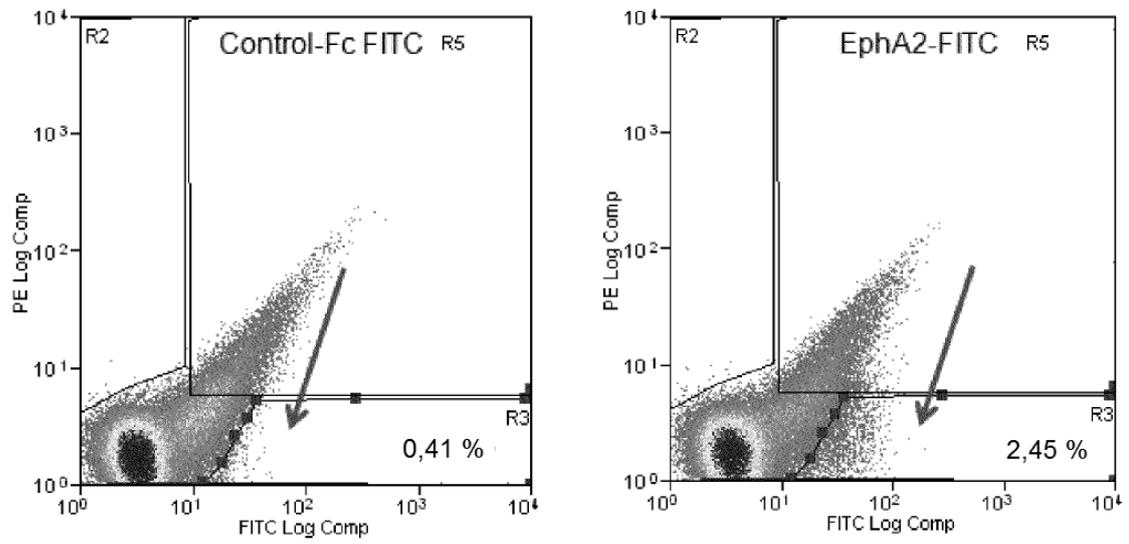
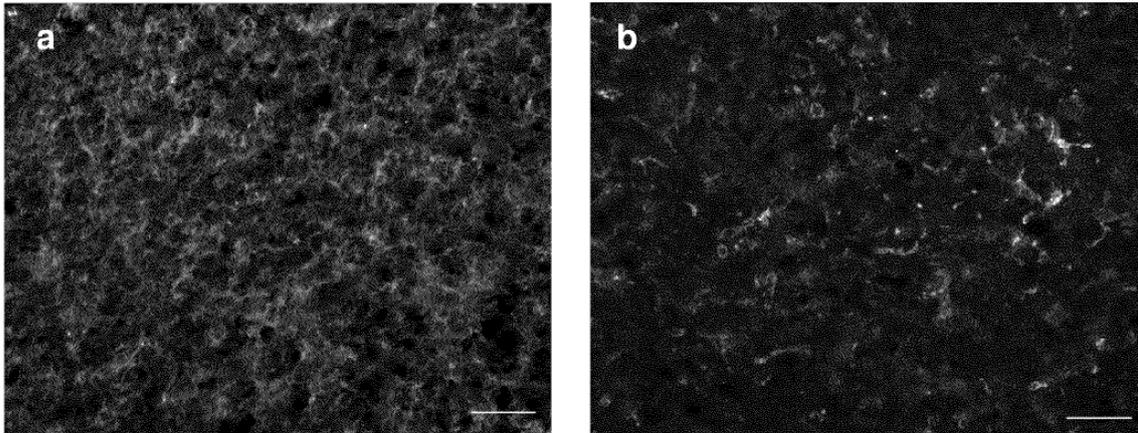


Figura 2

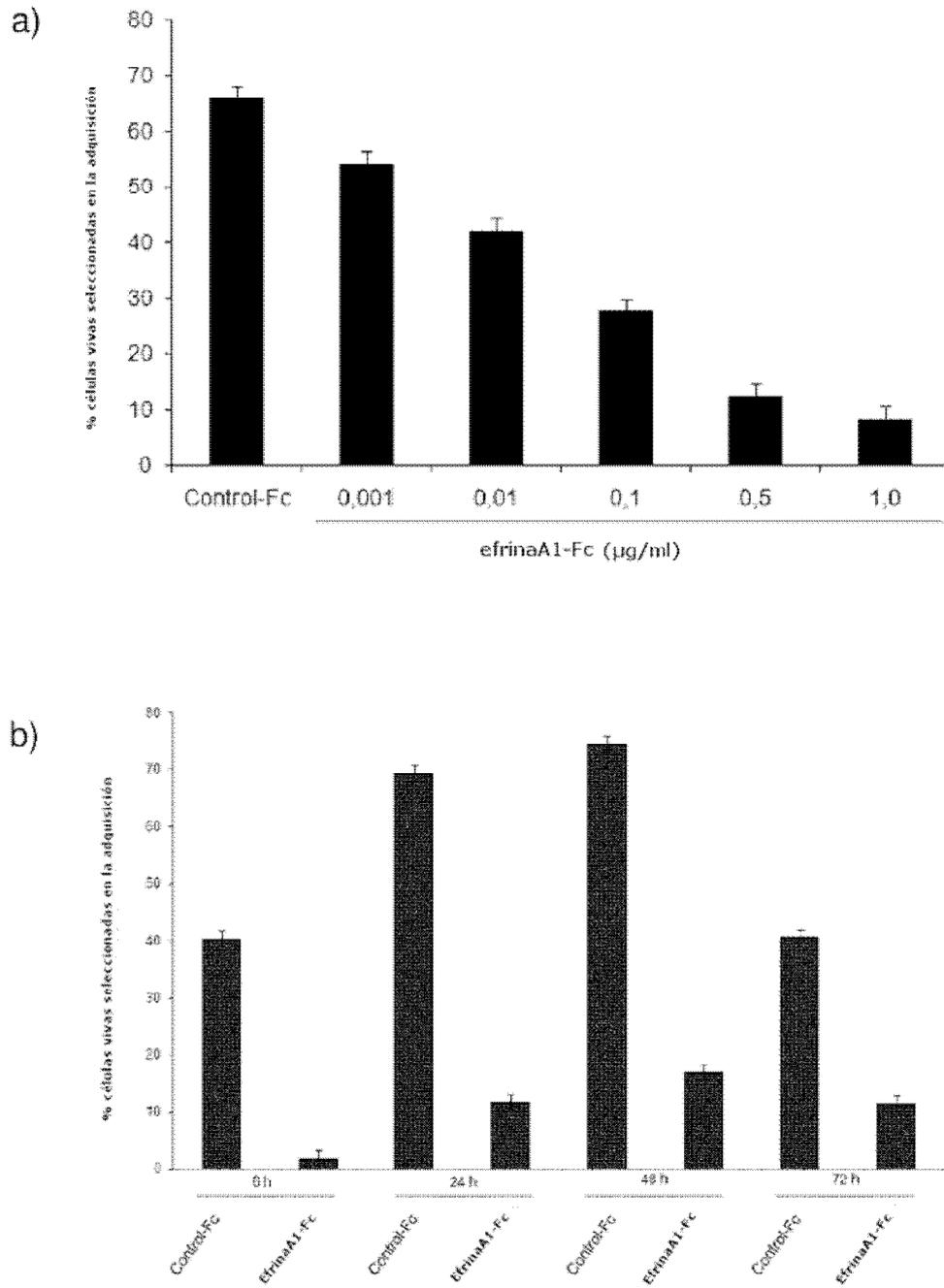


Figura 3A

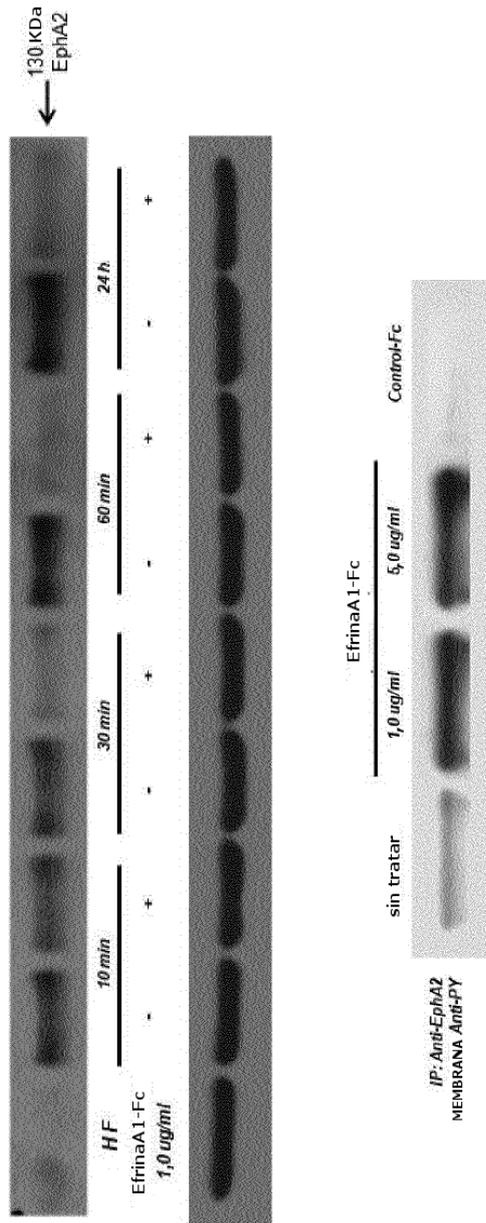
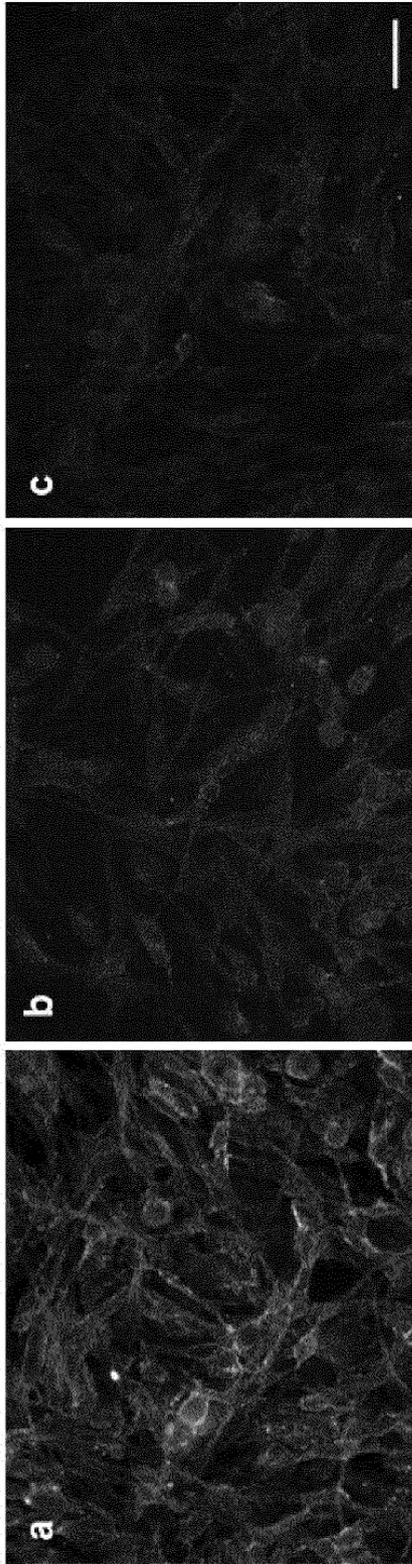


Figura 3B

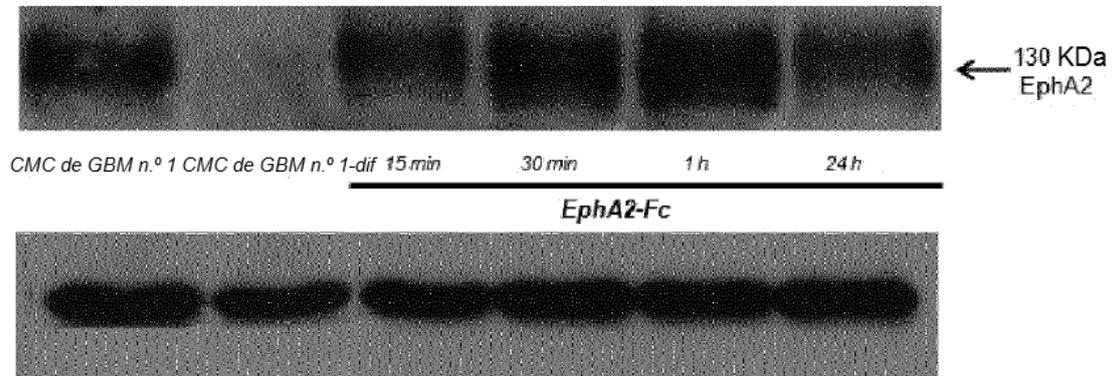


Figura 3C

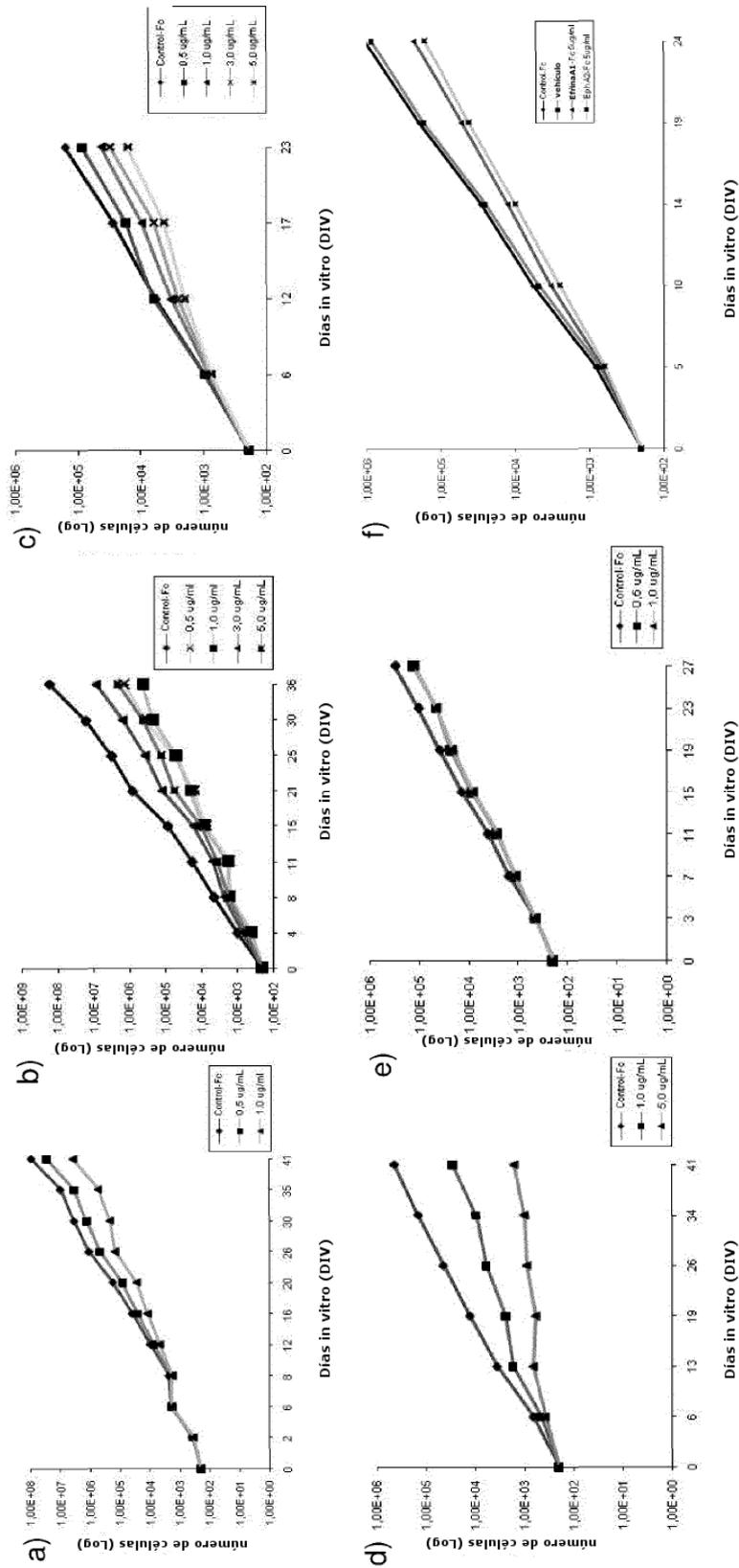


Figura 4A

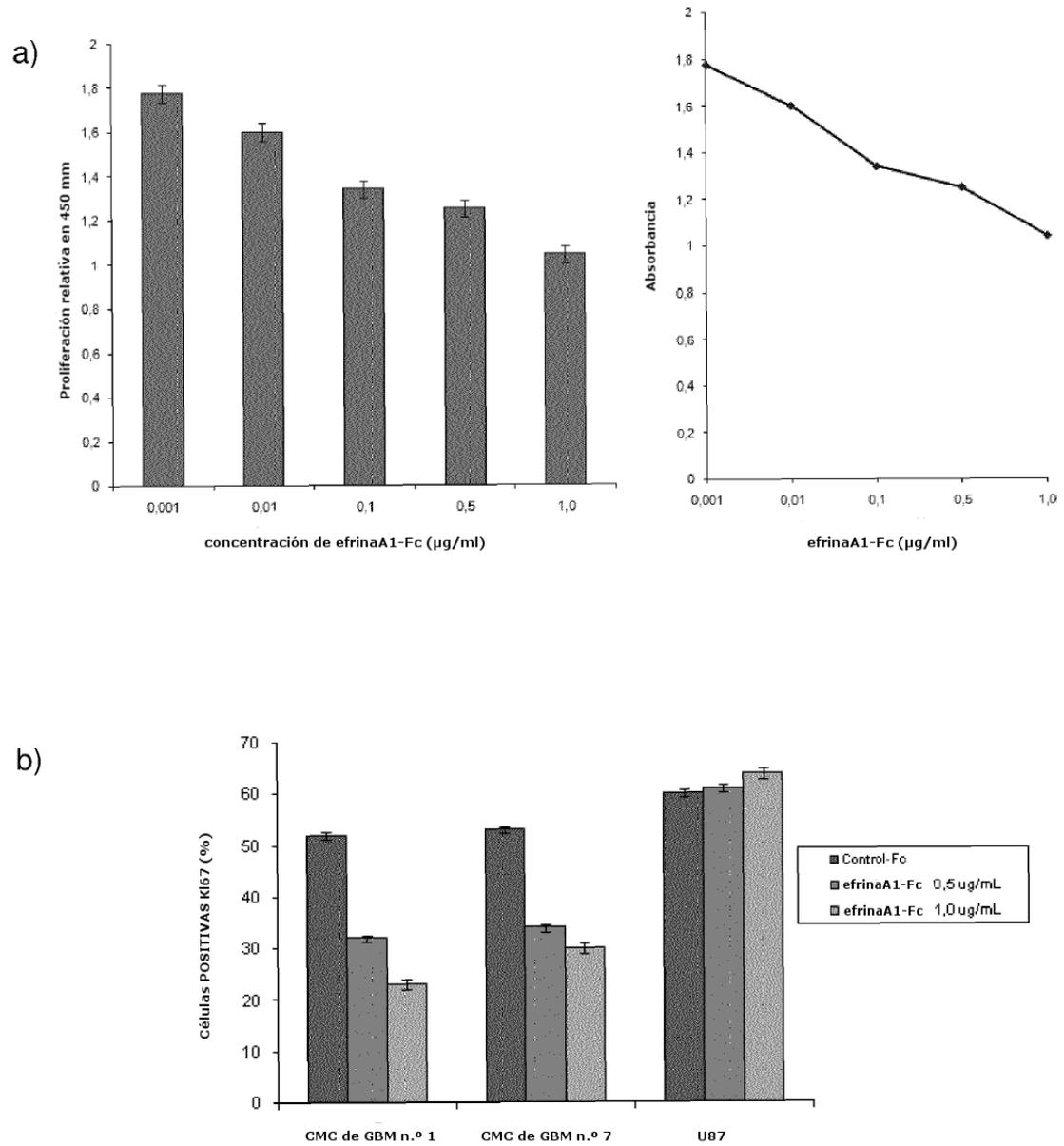


Figura 4B

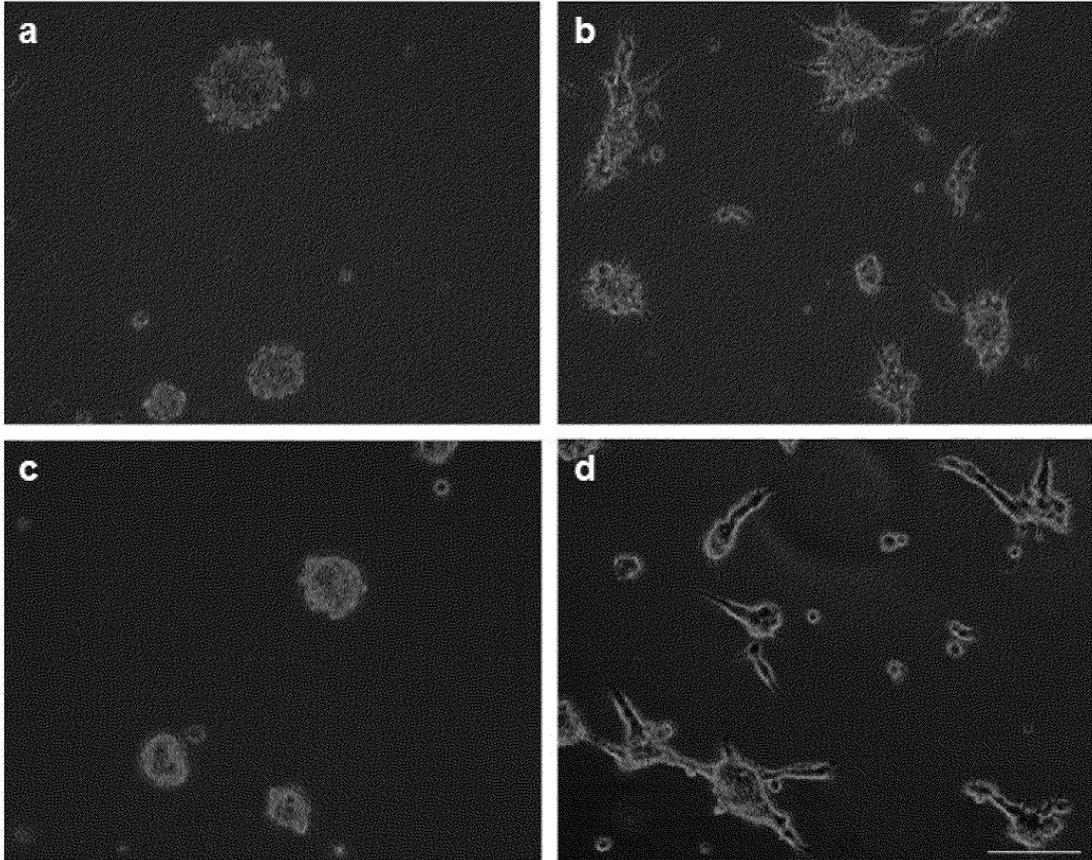


Figura 4C

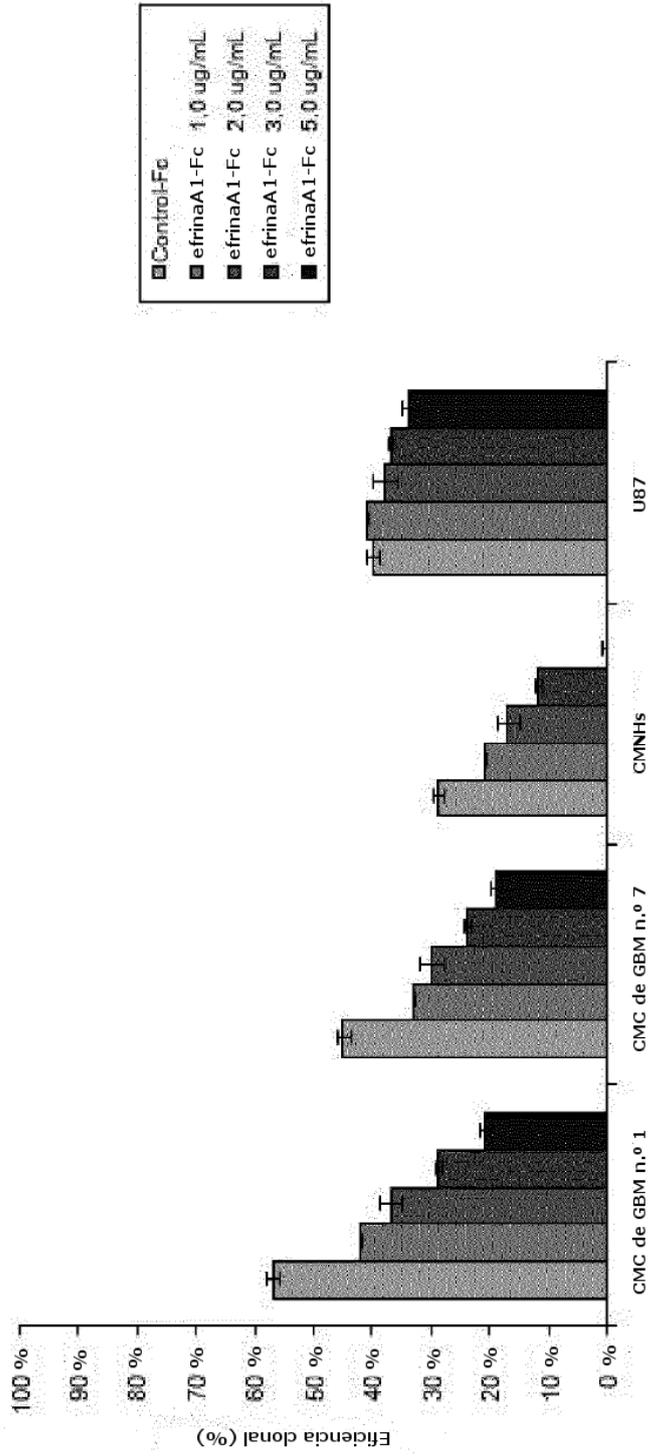


Figura 5A

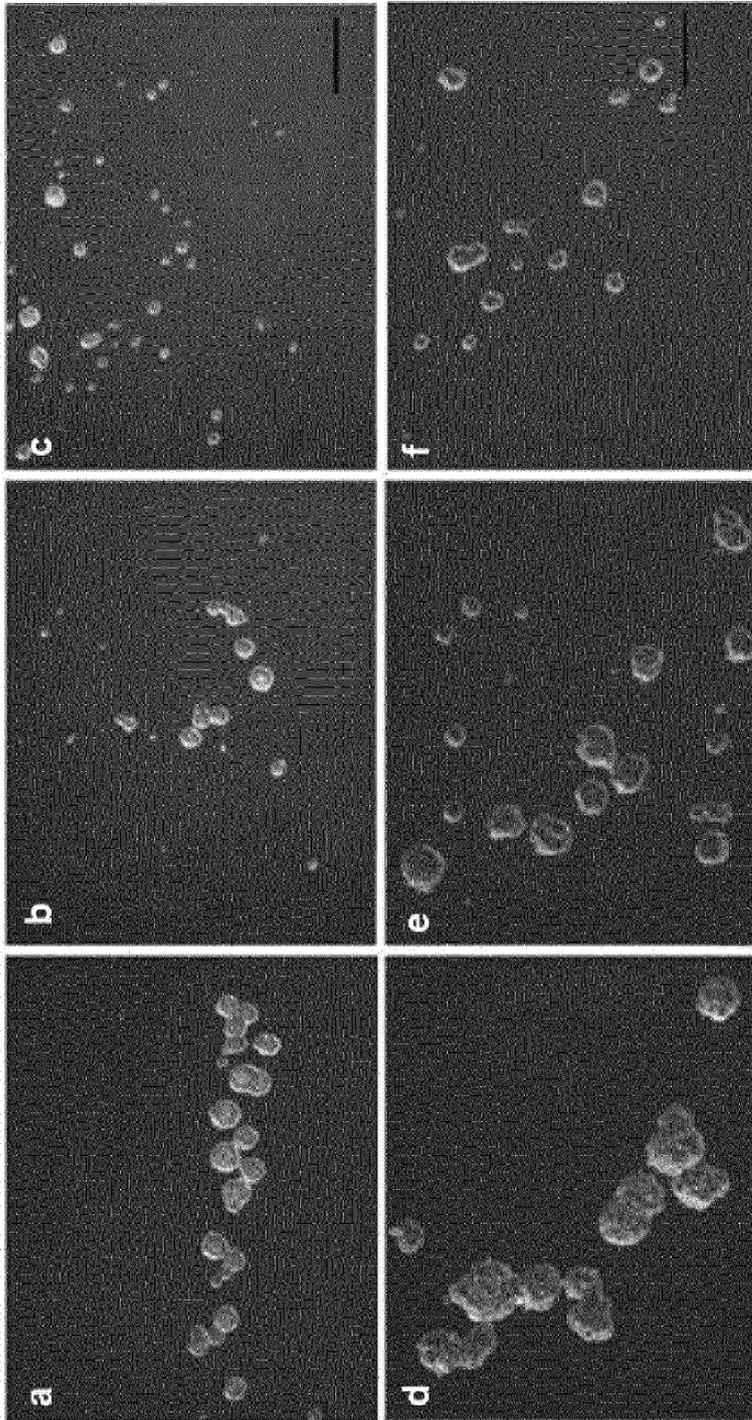


Figura 5B

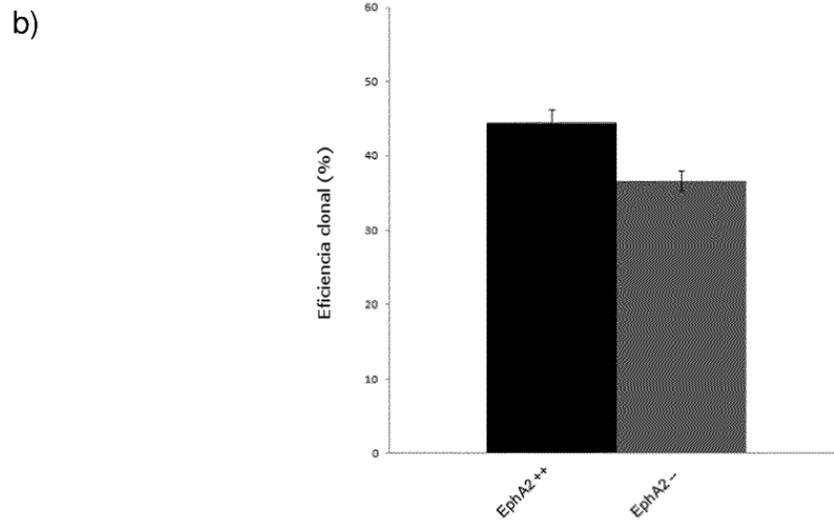
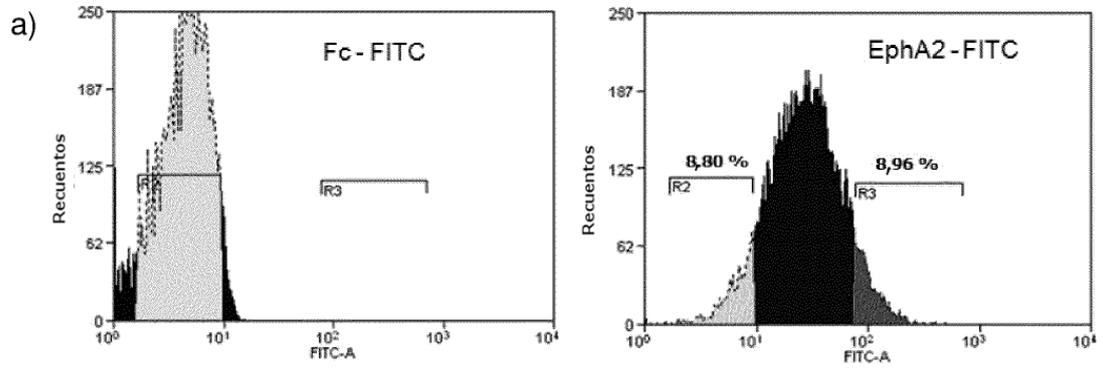


Figura 5C

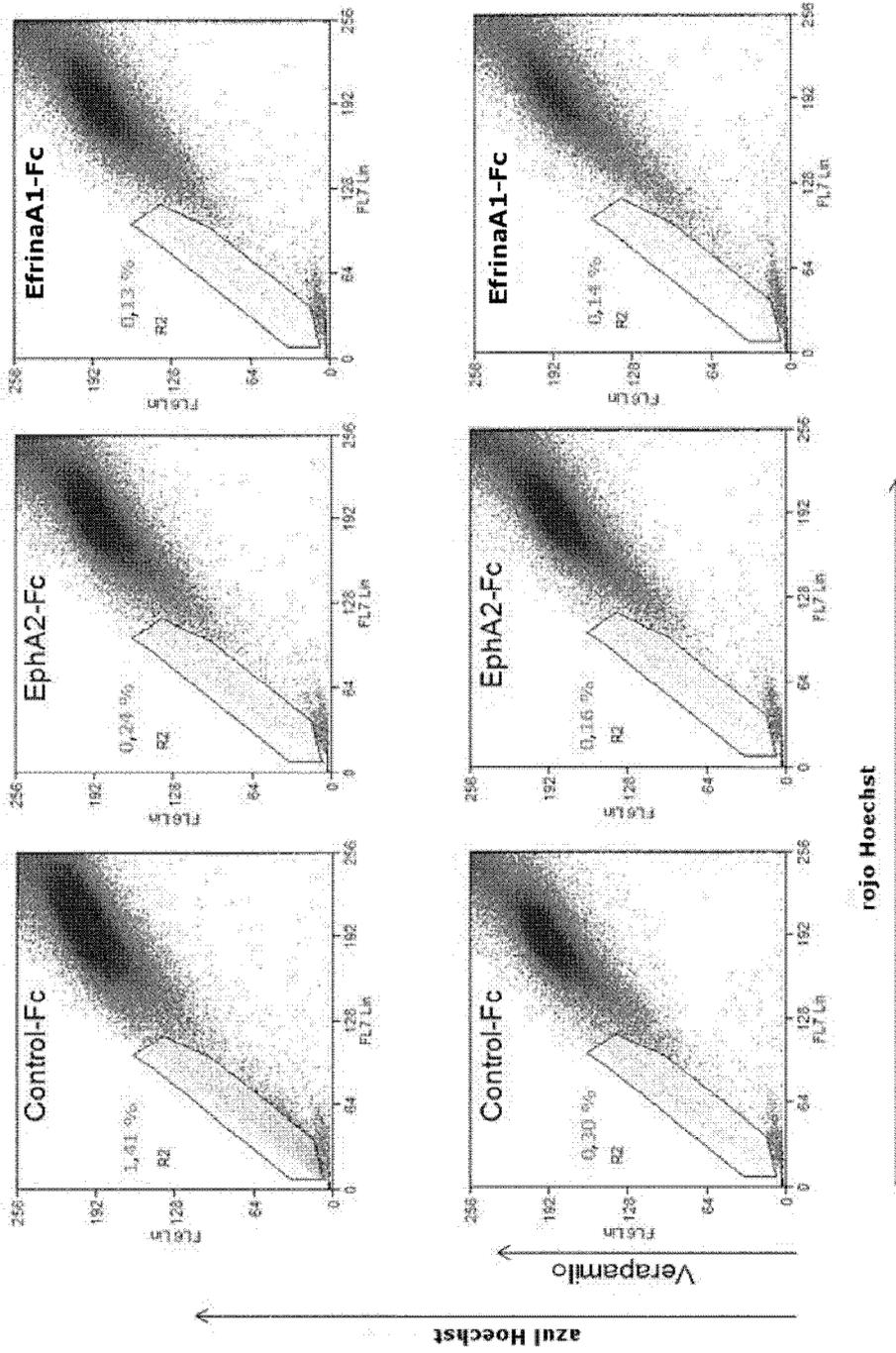


Figura 6

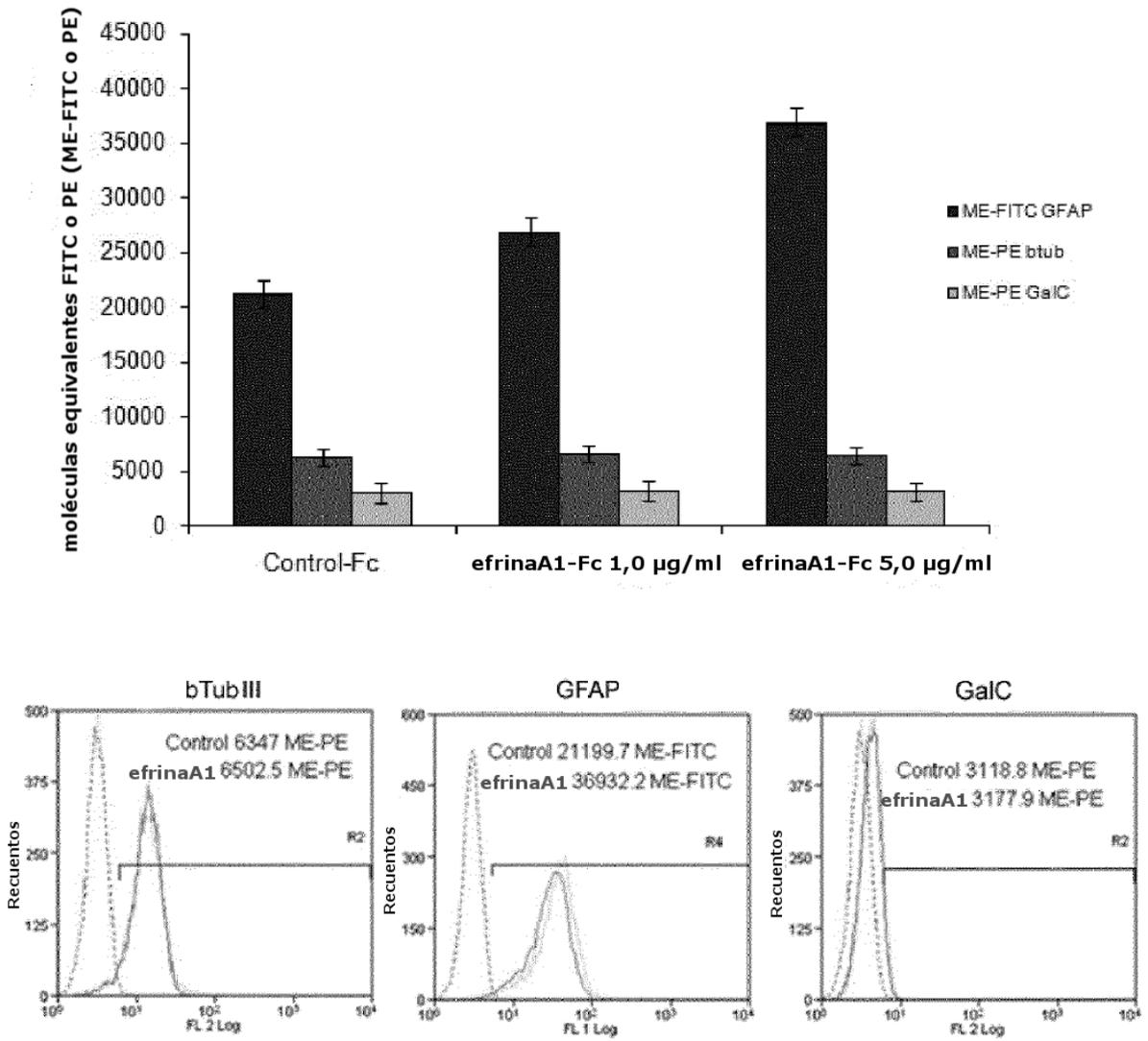


Figura 7

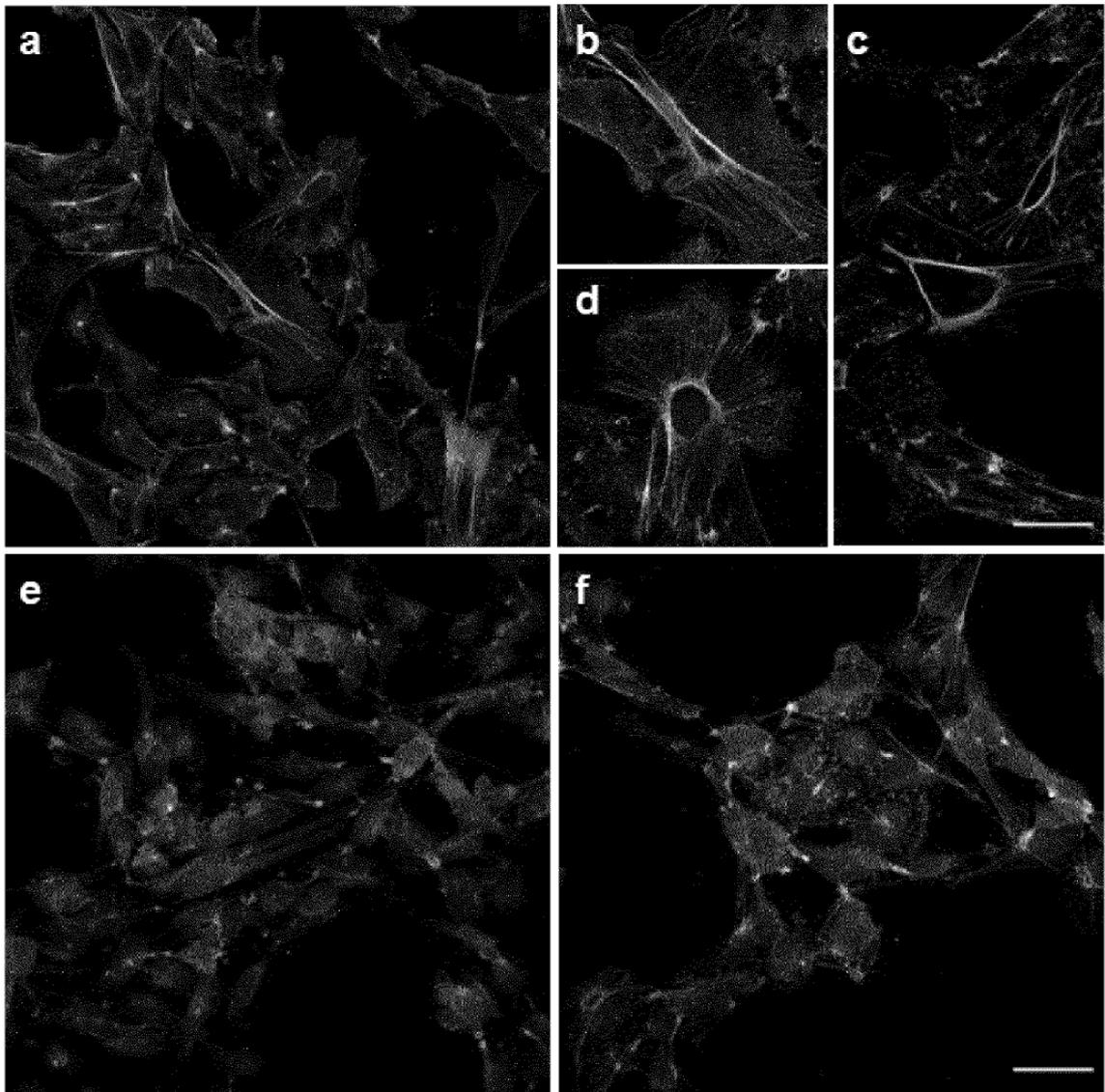


Figura 8A

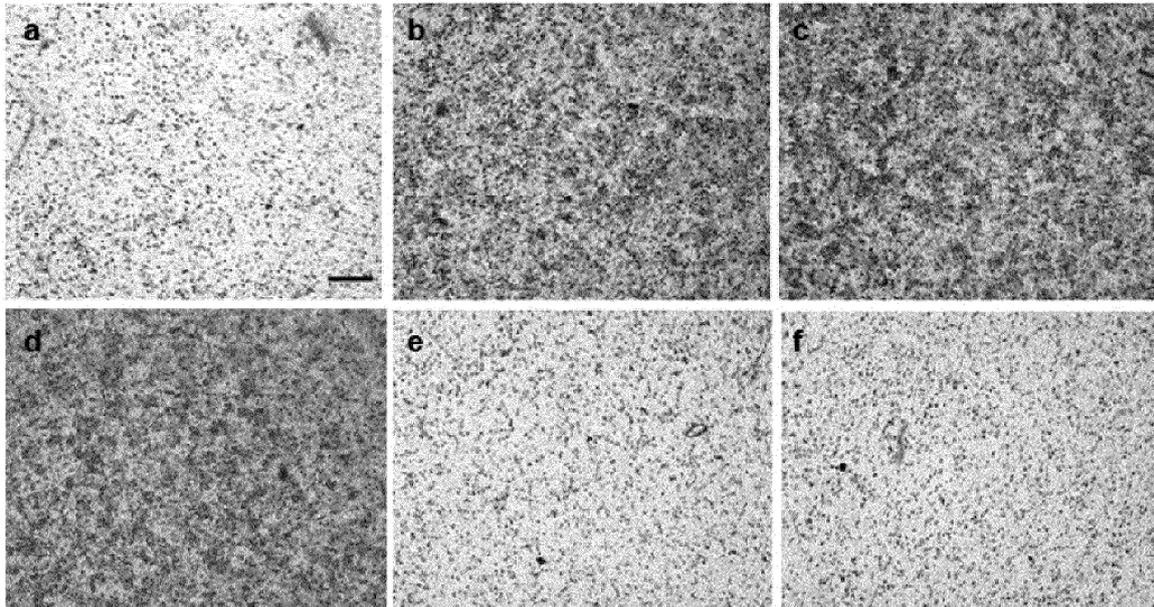
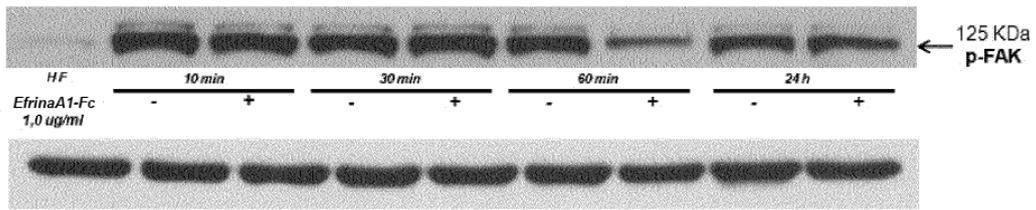


Figura 8B

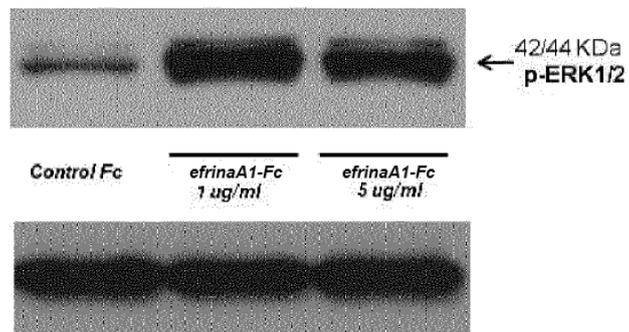
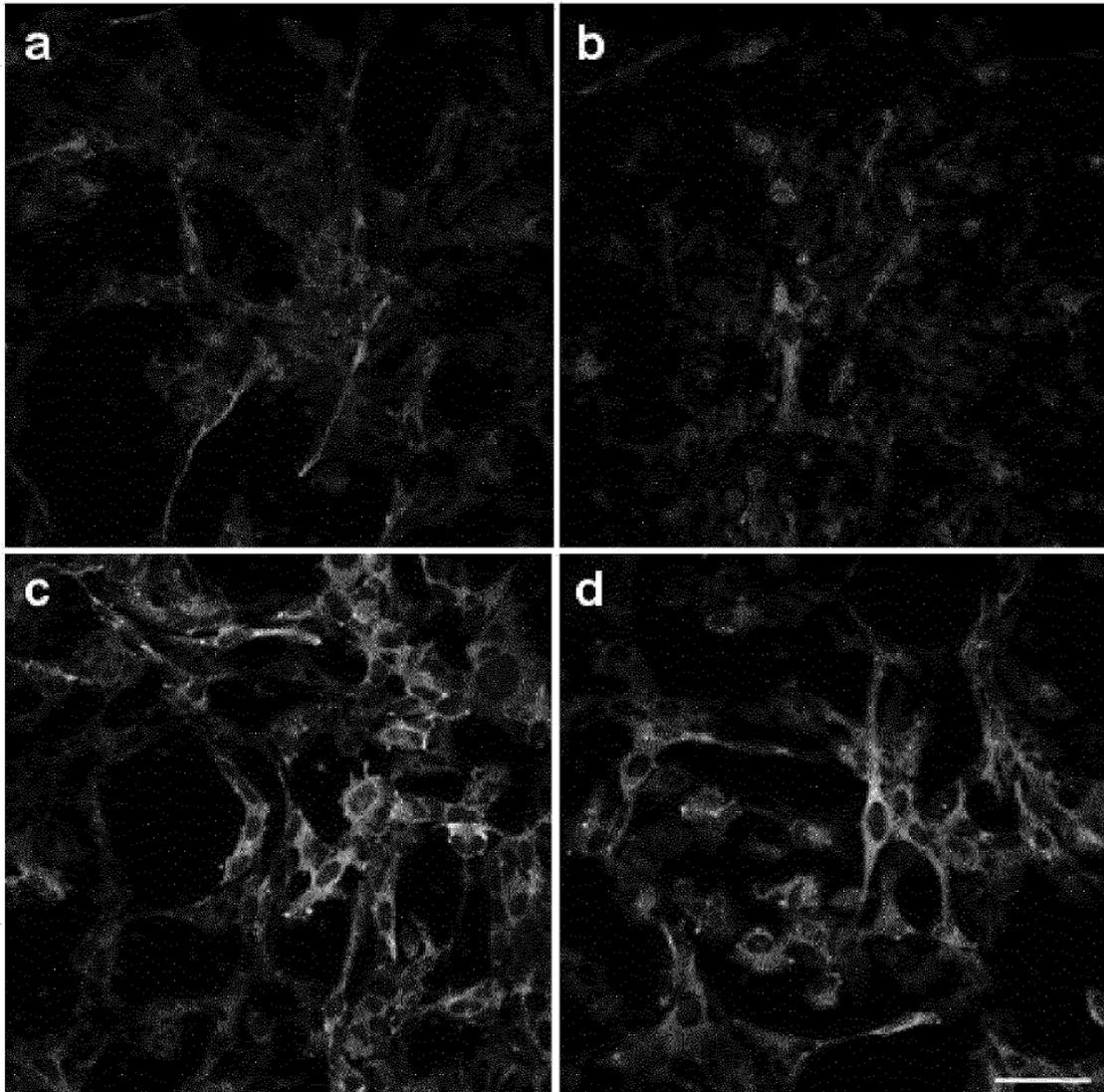
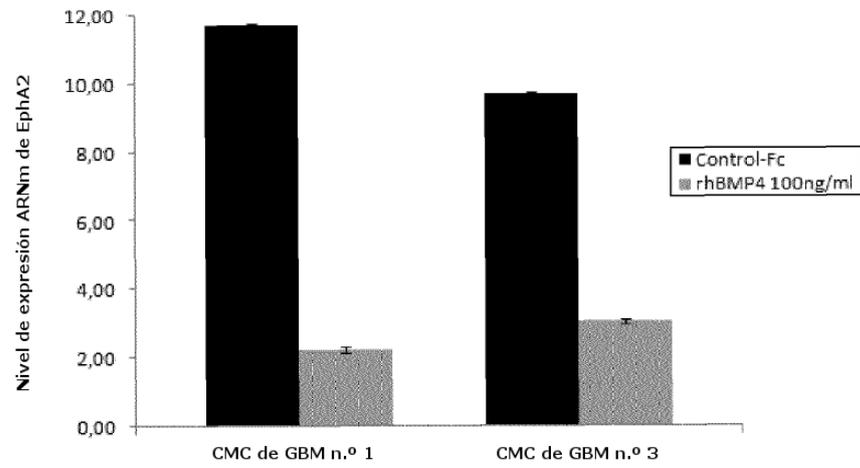


Figura 8C

a)



b)

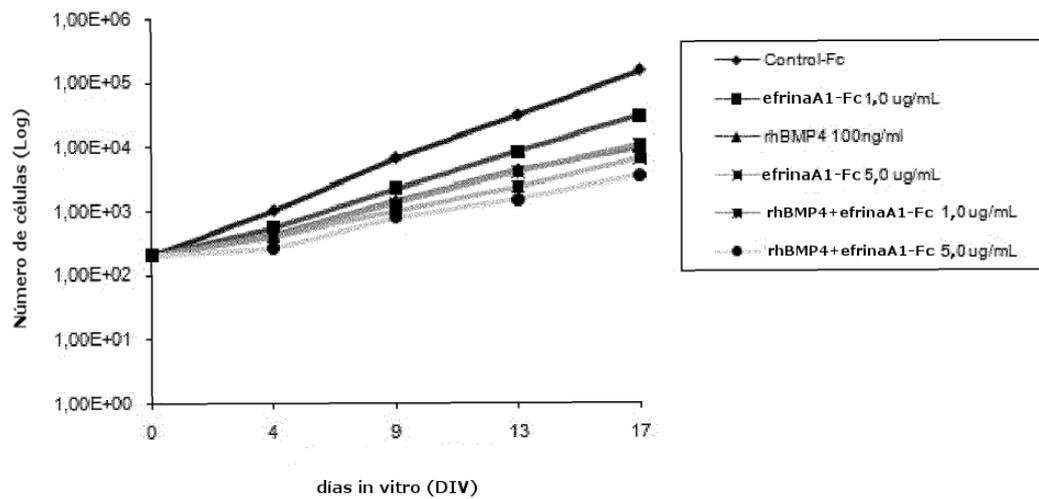


Figura 9

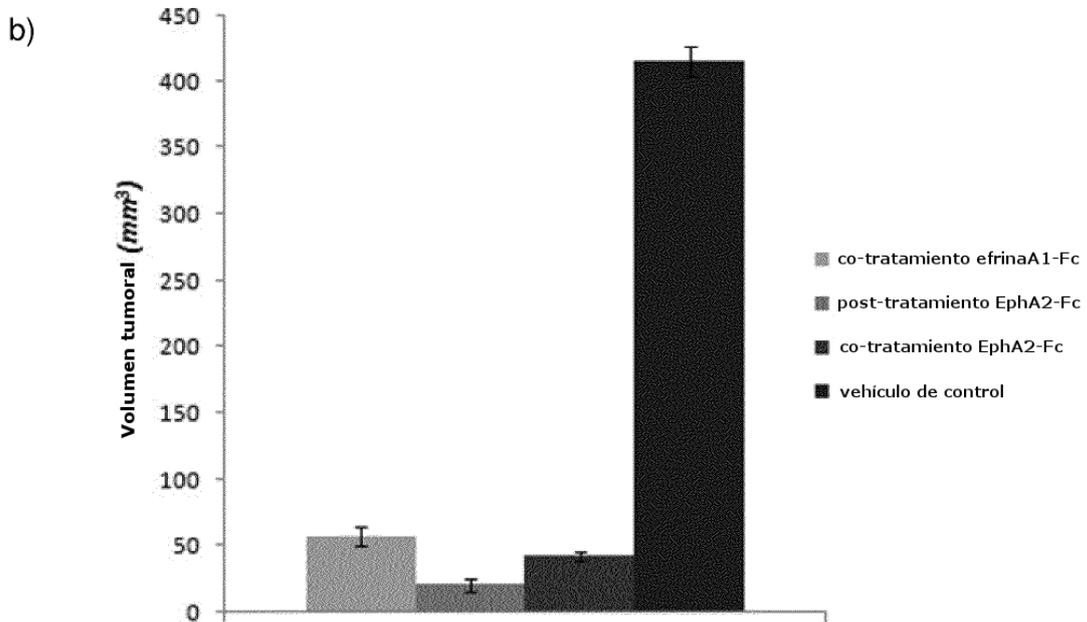
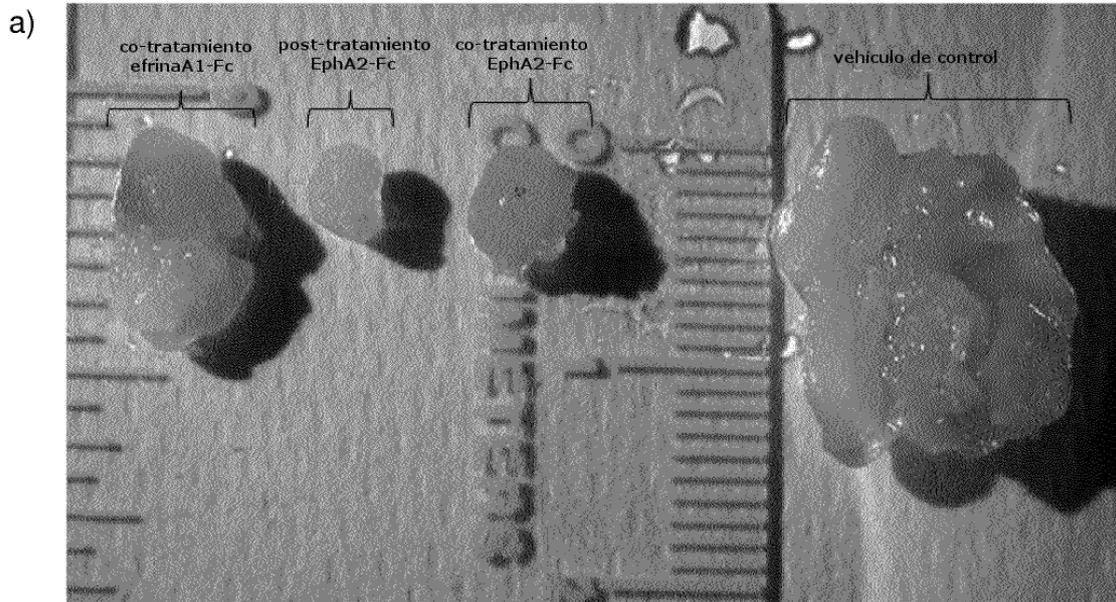


Figura 10

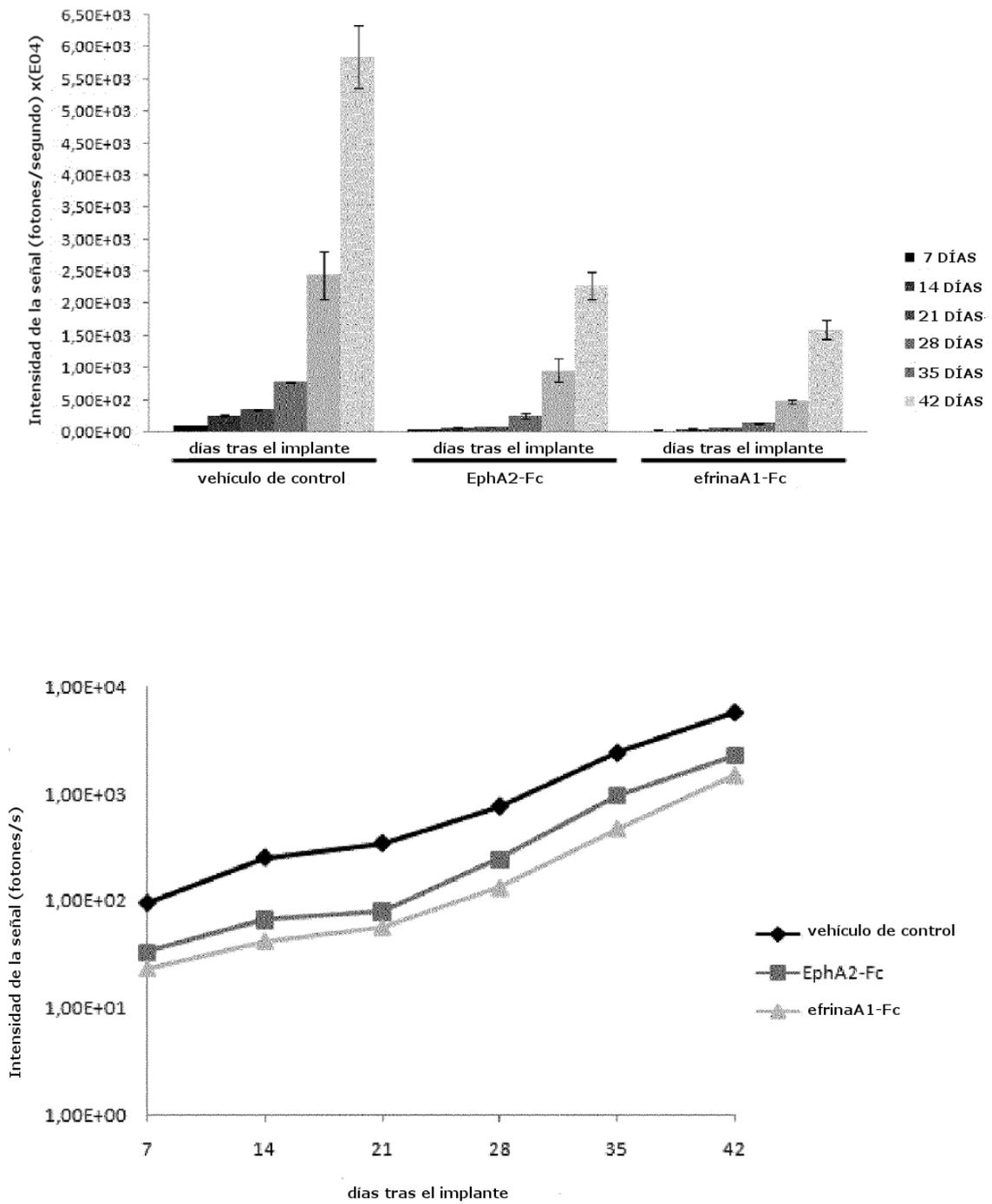


Figura 11A

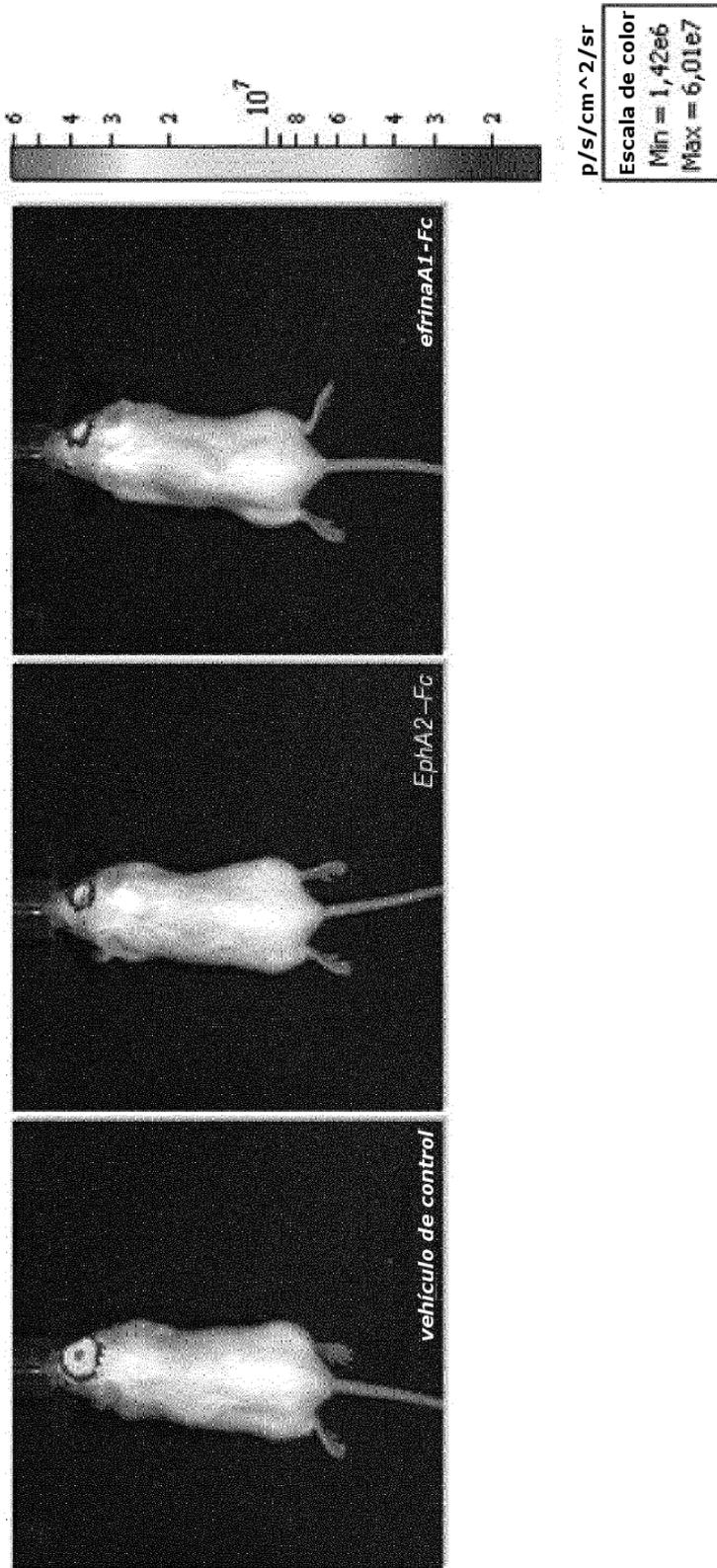


Figura 11B

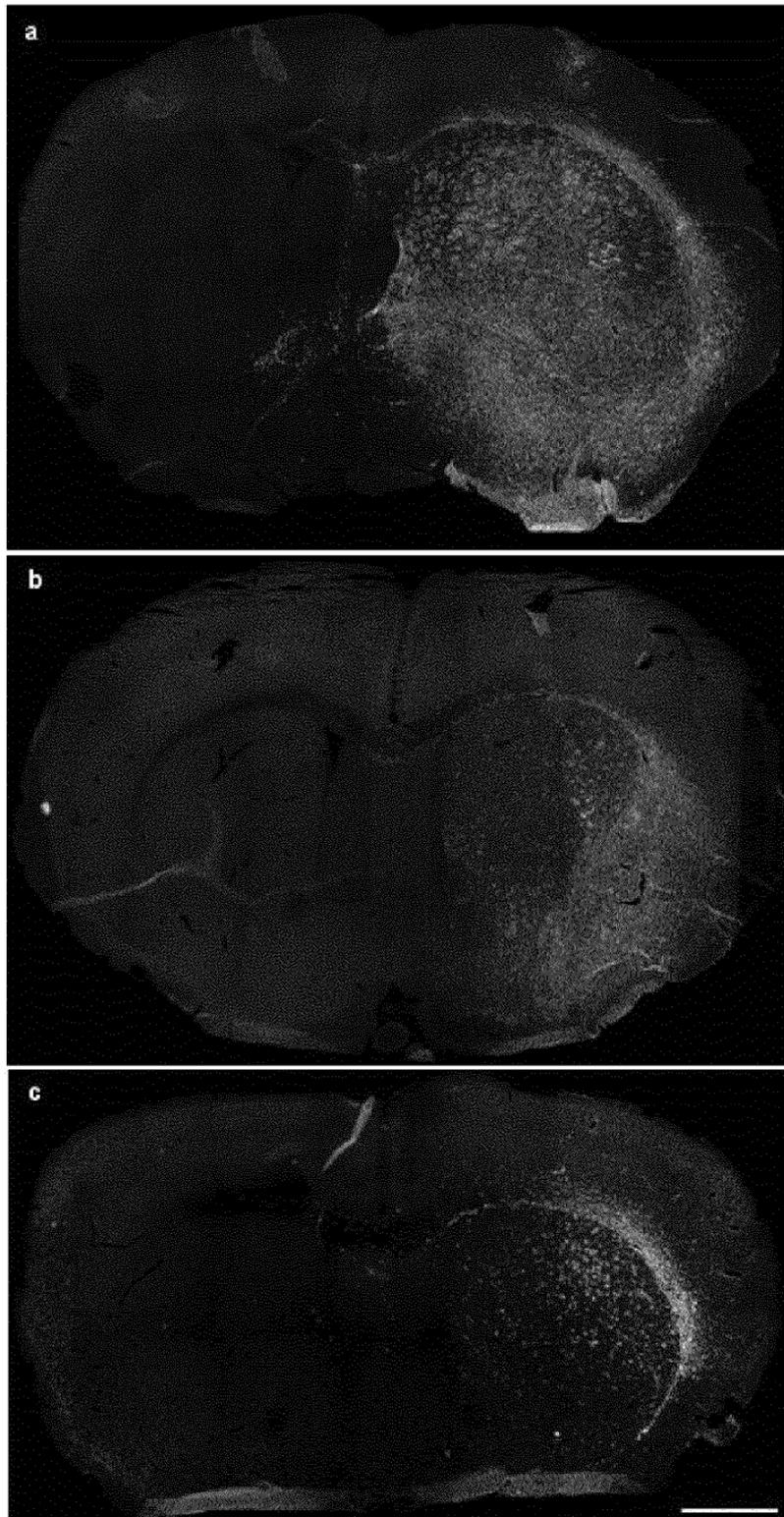


Figura 11C

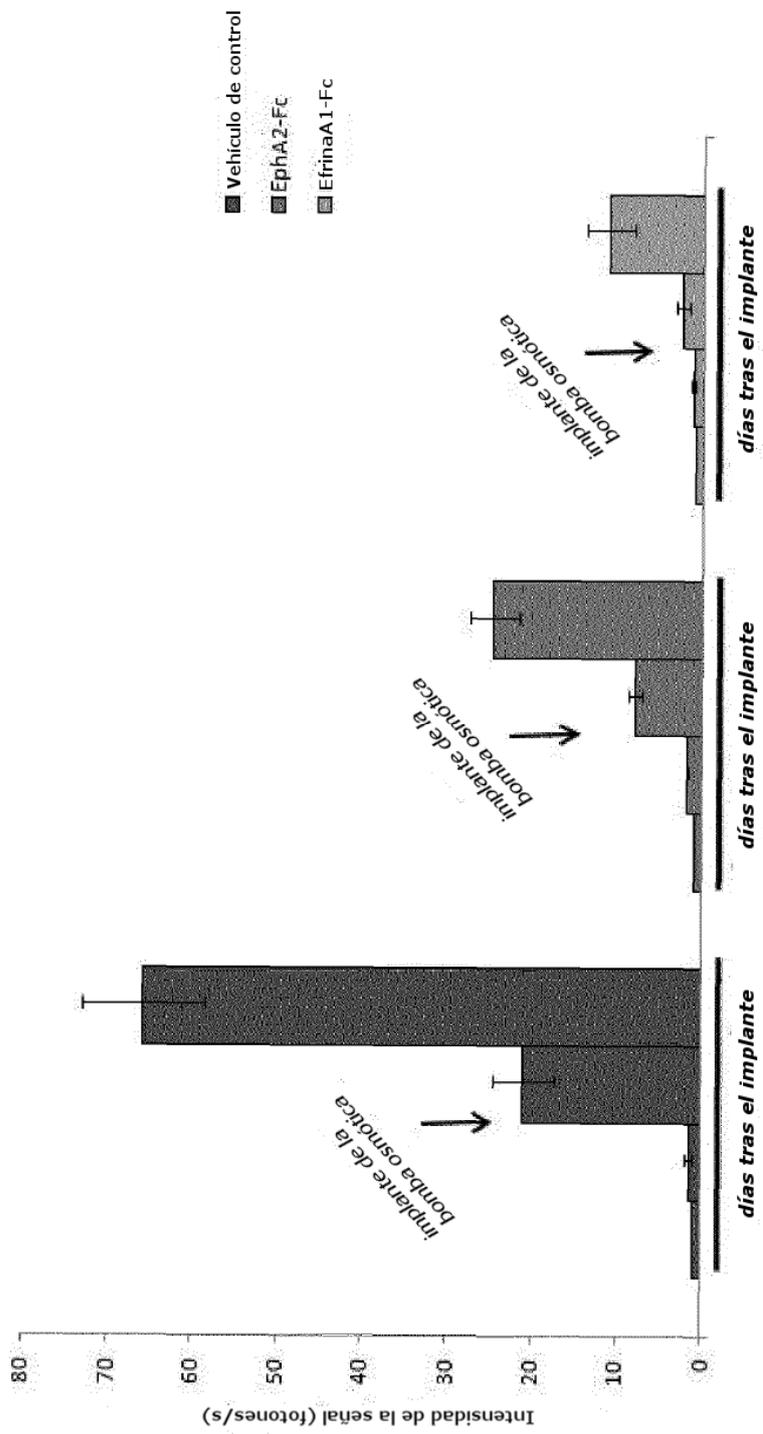


Figura 12