

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 366**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C07H 21/00 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.02.2012 PCT/US2012/024697**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.08.2012 WO12109567**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2012 E 12745124 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2673363**

54 Título: **Tratamiento de trastornos de la angiogénesis**

30 Prioridad:

11.02.2011 US 201161441738 P

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

05.12.2017

73 Titular/es:

**THE ROCKEFELLER UNIVERSITY (100.0%)
1230 York Avenue
New York, NY 10021 , US**

72 Inventor/es:

**TAVAZOIE, SOHAIL;
HALBERG, NILS y
PNG, KIM**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 645 366 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

Tratamiento de trastornos de la angiogénesis

5 **Referencia cruzada a solicitud relacionada**

Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud estadounidense provisional n.º 61/441.738, presentada el 11 de febrero de 2011.

10 **Cláusula gubernamental**

Esta invención se realizó con respaldo gubernamental con la subvención W81XWH-10-1-0535 concedida por el DoD (Departamento de Defensa). El gobierno ostenta ciertos derechos con respecto a la invención.

15 **Campo de invención**

Esta invención se refiere a tratamientos para trastornos de la angiogénesis.

20 **Antecedentes de invención**

La angiogénesis es un proceso de crecimiento de nuevos vasos sanguíneos y remodelación de vasos sanguíneos preexistentes. Es vital para el crecimiento y desarrollo normales, así como otros procesos fisiológicos, tales como la cicatrización de heridas. Por otro lado, la angiogénesis también es importante en diversos procesos patológicos. Por ejemplo, la angiogénesis patológica es una etapa fundamental en la transición de tumores de un estado latente a uno maligno, caracterizado por las propiedades de anaplasia, invasividad y metástasis.

La evolución metastásica del cáncer constituye un reto clínico formidable. Los avances tecnológicos han permitido la detección y el tratamiento de algunas neoplasias de estadio temprano, sin embargo, las tasas de mortalidad total debido a cánceres malignos epiteliales han permanecido esencialmente inalteradas a lo largo de los últimos cuarenta años (seer.cancer.gov/csr/1975_2007/, Instituto Nacional de Salud, 2007). Generalmente se cree que esto se debe a varios factores, incluyendo heterogeneidad molecular dentro de los tipos de cáncer, regímenes quimioterápicos de eficacia moderada que se derivaron históricamente de manera empírica, y una atención de larga tradición en los elementos impulsores moleculares del crecimiento de tumor primario en vez de evolución metastásica.

La prevención o el tratamiento eficaces de metástasis exige la comprensión de eventos moleculares y celulares, incluyendo la angiogénesis, subyacentes a este proceso complejo (Talmadge, J. E. *et al.*, *Cancer Res* 70 (14), 5649 (2010); Sleeman, J. *et al.*, *Eur J Cancer* 46 (7), 1177 (2010); y Hurst, D. R., *et al.*, *Cancer Res* 69 (19), 7495 (2009)). Se ha descubierto VEGF como promotor de la tumorigénesis en tumores primarios (Kim, K. J. *et al.*, *Nature* 362 (6423), 841 (1993)). Algunos ensayos clínicos han mostrado que la inhibición de VEGF puede prolongar, en combinación con quimioterapia, la supervivencia en 2-3 meses en pacientes con cáncer de pulmón o colorrectal de estadio IV (Hurwitz, H. *et al.*, *N Engl J Med* 350 (23), 2335 (2004); Giantonio, B. J. *et al.*, *J Clin Oncol* 25 (12), 1539 (2007); y Sandler, A. *et al.*, *N Engl J Med* 355 (24), 2542 (2006)). Sin embargo, no se ha probado que la inhibición de VEGF sea beneficiosa para la prevención de metástasis en la práctica de terapia adyuvante (Barugel, M. E., *et al.*, *Expert Rev Anticancer Ther* 9 (12), 1829 (2009) y en recientes modelos de metástasis preclínicos (Paez-Ribes, M. *et al.*, *Cancer Cell* 15 (3), 220 (2009) y Ebos, J. M. *et al.*, *Cancer Cell* 15 (3), 232 (2009)). Aunque se ha propuesto que la compensación por otros factores desconocidos que fomentan la angiogénesis metastásica subyace a estos desenlaces, varios investigadores han tratado de abordar la metástasis mediante rutas distintas a la angiogénesis. Por ejemplo, el documento WO 2009082744 describió genes sobre expresados en metástasis en hueso y pulmón de cáncer de mama, en los que los genes no estaban relacionados con la angiogénesis. Otros se esforzaron por identificar factores que medien en la angiogénesis metastásica. Sin embargo, han tenido un éxito limitado.

Por tanto, existe la necesidad de agente y métodos para regular la angiogénesis y para tratar trastornos caracterizados por angiogénesis patológica, incluyendo cáncer.

55 **Sumario de invención**

Esta invención se basa, al menos en parte, en un descubrimiento inesperado de una nueva ruta que regular el reclutamiento endotelial y, a su vez, la angiogénesis.

Por consiguiente, un aspecto de esta invención presenta un método para inhibir el reclutamiento endotelial, así como la angiogénesis, en un sujeto que lo necesita. El método incluye una etapa de administrar al sujeto un primer agente que inhibe la expresión o actividad de una primera proteína seleccionada del grupo que consiste en IGFBP2, MERTK y PTPN1. En una realización, el sujeto tiene un trastorno de la angiogénesis, es decir, un trastorno caracterizado por angiogénesis patológica, tales como cáncer, un trastorno ocular o un trastorno inflamatorio. Los ejemplos del cáncer incluyen cáncer metastásico. El método mencionado anteriormente puede incluir además una

etapa de administrar al sujeto un segundo agente que inhibe la expresión o actividad de una segunda proteína seleccionada del grupo que consiste en IGFBP2, IGF1, IGF1R, MERTK, PTPN11, ABCB9, PSAT1, PYGB, SHMT2 y VIPR. El primer agente o el segundo agente mencionados anteriormente pueden ser un anticuerpo (o una parte de unión a antígeno del mismo), un ácido nucleico, un polipéptido o un compuesto de molécula pequeña. En un ejemplo, el anticuerpo anterior es uno monoclonal que contiene una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 mostradas a continuación.

En un segundo aspecto, esta invención presenta un método para tratar cáncer metastásico en un sujeto que lo necesita. El método incluye una etapa de administrar al sujeto un primer agente que inhibe la expresión o actividad de una primera proteína seleccionada del grupo que consiste en IGFBP2, MERTK y PTPN11, en el que el primer agente inhibe la angiogénesis. Los ejemplos del cáncer incluyen cáncer de mama. El método puede incluir además una etapa de administrar al sujeto un segundo agente que inhibe la expresión o actividad de una segunda proteína seleccionada del grupo que consiste en IGFBP2, IGF1, IGF1R, MERTK, PTPN11, ABCB9, PSAT1, PYGB, SHMT2 y VIPR. El primer agente o segundo agente pueden ser un anticuerpo (o una parte de unión a antígeno del mismo), un ácido nucleico, un polipéptido o un compuesto de molécula pequeña. En un ejemplo, el anticuerpo anterior es uno monoclonal que contiene una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 mostradas a continuación.

En un tercer aspecto, esta invención presenta un ácido nucleico aislado que tiene una secuencia que codifica para un agente de iARN que puede inhibir la expresión de una proteína seleccionada del grupo que consiste en IGFBP2, MERTK y PTPN11. En una realización, el agente de iARN tiene una estructura bicatenaria que tiene una primera hebra y una segunda hebra; cada una de las hebras primera y segunda tiene entre 19 y 30 nucleótidos de largo; y la primera hebra está codificada por una cualquiera de SEQ ID NO: 1-6 tal como se enumera en la tabla 5 a continuación.

En un cuarto aspecto, esta invención proporciona una composición que tiene un agente que inhibe la expresión o actividad de una proteína seleccionada del grupo que consiste en IGFBP2, MERTK y PTPN11, en el que el agente puede ser un anticuerpo (o una parte de unión a antígeno del mismo), un ácido nucleico, un polipéptido o un compuesto de molécula pequeña. En un ejemplo, el agente es el ácido nucleico aislado mencionado anteriormente. En otros casos, el agente es un anticuerpo o una parte de unión a antígeno del mismo.

En un quinto aspecto, esta invención presenta un método para diagnosticar el potencial metastásico de cáncer en un sujeto. El método incluye las etapas de obtener un primer nivel de expresión para un primer gen del sujeto seleccionado del grupo que consiste en IGFBP2, MERTK y PTPN11, y comparar el primer nivel de expresión con un primer nivel predeterminado para el primer gen seleccionado. Se determina que el sujeto tiene o es propenso a desarrollar cáncer metastásico si el primer nivel de expresión es mayor que el primer nivel predeterminado. El primer nivel predeterminado puede obtenerse a partir de un sujeto de control que está libre de cáncer. En un ejemplo, el método incluye además las etapas de obtener un segundo nivel de expresión para un segundo gen del sujeto seleccionado del grupo que consiste en IGFBP2, IGF1, IGF1R, MERTK, PTPN11, ABCB9, PSAT1, PYGB, SHMT2 y VIPR; y comparar el segundo nivel de expresión con un segundo nivel predeterminado para el segundo gen seleccionado. Se determina que el sujeto tiene o es propenso a desarrollar cáncer metastásico si tanto el primer nivel de expresión como el segundo nivel de expresión son mayores que el primer nivel predeterminado y el segundo nivel predeterminado, respectivamente. El segundo nivel predeterminado también puede obtenerse a partir de un sujeto de control que está libre de cáncer.

La invención también presenta un método para inhibir el reclutamiento endotelial en un sujeto que lo necesita. El método incluye una etapa de administrar al sujeto un primer agente que aumenta la expresión o actividad de GAS6 (es decir, un agente de activación de GAS6). La invención presenta además una composición que tiene un agente que aumenta la expresión o actividad de GAS6. En un ejemplo, el agente mencionado anteriormente tiene GAS6 actividad. En otros casos, el agente es un anticuerpo (o una parte de unión a antígeno del mismo), un ácido nucleico, un polipéptido o un compuesto de molécula pequeña. En una realización, el agente es un polipéptido que tiene la secuencia de GAS6.

En aún otro aspecto, la invención presenta un kit para diagnosticar el potencial metastásico de cáncer en un sujeto. El kit incluye un primer reactivo que se une específicamente a un primer producto de expresión (por ejemplo, polipéptido o ARNm) de un primer gen seleccionado del grupo que consiste en IGFBP2, MERTK y PTPN11. El kit puede incluir además un segundo reactivo que se une específicamente a un segundo producto de expresión de un segundo gen seleccionado del grupo que consiste en IGFBP2, IGF1, IGF1R, MERTK, PTPN11, ABCB9, PSAT1, PYGB, SHMT2 y VIPR.

En un aspecto adicional, la invención presenta un método para identificar genes y ARN no codificantes que regulan la colonización por cáncer metastásico de cualquier tejido corporal. El método incluye una primera etapa de generar una población de células cancerosas de mamífero con un potencial aumentado de colonización tisular metastásica realizando tandas en serie de a) trasplante de una población de células cancerosas marcadas o no marcadas en

cualquier tejido vivo del cuerpo y luego b) realización del aislamiento de dichas células cancerosas marcadas del tejido después de haberse producido la colonización metastásica y luego c) realización de un trasplante repetido de células cancerosas marcadas aisladas en tejido vivo del cuerpo. Al realizar tandas en serie de trasplante, aislamiento y trasplante repetido de células cancerosas marcadas tal como se describió anteriormente, se genera una población de células cancerosas marcadas o no marcadas con alto potencial de colonización tisular metastásica. La segunda etapa del método incluye transducir, transfectar o introducir de otro modo una población de una o más moléculas de ARNhc en la población de células cancerosas con alto potencial de colonización tisular metastásica para generar una población de células cancerosas modificadas por ingeniería con alto potencial metastásico que expresan una o más moléculas de ARNhc que reducen la expresión de uno o más genes o ARN no codificantes. Esta población de células cancerosas modificadas por ingeniería con alto potencial metastásico que expresan una o más moléculas de ARNhc luego a) se trasplantan en cualquier tejido vivo y luego b) se aíslan del tejido vivo después de haberse producido la colonización metastásica. La presencia, ausencia o abundancia de uno o más de los ARNhc transfectados, transducidos o introducidos de otro modo en la población de células cancerosas modificadas por ingeniería tras el trasplante aisladas se evalúa luego mediante o bien análisis de microalineamientos, tecnología de secuenciación de ADN, tecnología de secuenciación masiva o bien clonación. La reducción de los niveles de cualquier ARNhc individual en la población de células aisladas con relación a su representación antes de la inyección indica que se requiere el gen diana de ARNhc para la colonización metastásica del tejido. El aumento de los niveles de cualquier ARNhc individual en la población de células aisladas con relación a su representación antes de la inyección indica que la diana de ARNhc antagoniza la colonización metastásica del tejido. La segunda etapa de este método también podría incluir transducir, transfectar o introducir de otro modo una población de una o más moléculas de iARN, microARN o ARN no codificantes. Adicionalmente, la segunda etapa también podría incluir transducir, transfectar o introducir de otro modo una población de uno o más secuencias que codifican para genes codificantes de proteínas. La población de células cancerosas modificadas por ingeniería con alto potencial metastásico que expresan uno o más genes codificantes de proteínas luego a) se trasplantan en cualquier tejido vivo y luego b) se aíslan del tejido vivo después de haberse producido la colonización metastásica. La presencia, ausencia o abundancia de uno o más de los genes codificantes transfectados, transducidos o introducidos de otro modo en la población de células cancerosas modificadas por ingeniería tras el trasplante aisladas se evalúa luego mediante o bien análisis de microalineamientos, tecnología de secuenciación de ADN, tecnología de secuenciación masiva o bien clonación. El aumento de los niveles de cualquier gen individual en la población de células aisladas con relación a su representación antes de la inyección indica que el gen representa un gen diana requerido para la colonización metastásica del tejido. La disminución de los niveles de cualquier gen individual en la población de células aisladas con relación a su representación antes de la inyección indica que el gen representa un gen diana que antagoniza la colonización metastásica del tejido.

En un aspecto adicional, la invención presenta un anticuerpo monoclonal (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal humanizado o humano) o una parte de unión a antígeno del mismo que neutraliza la función de IGFBP2 inhibiendo la unión de IGFBP2 a IGF1. Este anticuerpo puede inhibir el reclutamiento endotelial por células cancerosas, tales como células de cáncer de mama metastásicas o inhibir la angiogénesis patológica. Este anticuerpo también puede inhibir la evolución tumoral o metástasis tumoral de células cancerosas, tales como de cáncer de mama humanas, *in vivo*. En un ejemplo, el anticuerpo monoclonal contiene una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 mostradas a continuación.

Se exponen los detalles de una o más realizaciones de la invención a continuación en la descripción. Otras características, objetos y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y de las reivindicaciones.

Descripción de dibujos

Las figuras 1a-f son diagramas y fotografías que muestran que miR-126 endógeno suprime la colonización metastásica. a, obtención de imágenes de bioluminiscencia de metástasis en pulmón por células de cáncer de mama escasamente metastásicas tras la inhibición de miR-126. Se les inyectaron 4×10^4 células MDA-MB-231 que expresan un miR-126 de selección como diana en horquilla corto (miR-Zip) o la horquilla de control por vía intravenosa a ratones NOD-SCID inmunodeficientes. Los ratones representativos mostrados corresponden al conjunto MDA-MB-231/miR-126KD (parte superior) y al conjunto MDA-MB-231/reordenadas (parte inferior) en el día 49. Se cuantificó la colonización pulmonar a través de la obtención de imágenes de bioluminiscencia. $n=5$; las barras de error representan el e.e.m.; valor de p basado en una prueba de la t de Student unilateral en el día 49. Se extirparon los pulmones en el día 49 y se tiñeron de manera inmunohistoquímica para vimentina humana (parte derecha). b, obtención de imágenes de bioluminiscencia de metástasis sistémica por células de cáncer de mama escasamente metastásicas con expresión de miR-126 inhibida. Se les inyectaron 4×10^4 células MDA-MB-231 que expresan un miR-126 de selección como diana en horquilla corto o la horquilla de control a través de la vía intracardiaca a ratones desnudos atímicos. Los ratones representativos mostrados corresponden al conjunto MDA-MB-231/miR-126KD (parte superior) y al conjunto MDA-MB-231/reordenado (parte inferior) en el día 34. Se midió la colonización en cuerpo entero mediante bioluminiscencia y se cuantificó. $n=4$; las barras de error representan el e.e.m.; valor de p basado en una prueba de la t de Student unilateral en el día 34. c, se contó el número total de focos metastásicos en ratones a los que se les inyectó por vía intracardiaca células MDA-MB-231/miR-126KD y

MDA-MB-231/reordenadas (parte superior). Se muestran imágenes representativas de nódulos metastásicos en hueso y cerebro (parte inferior). d, se les inyectaron 5×10^5 células MDA-MB-231 que expresan un miR-126 de selección como diana en horquilla corto o la horquilla de control a los panículos adiposos mamarios de ratones inmunodeficientes. Se midieron los volúmenes tumorales a lo largo del tiempo. $n=15$; las barras de error indican el e.e.m.; valores de p basados en una prueba de la t de Student unilateral en el día 35. e, se tiñeron los pulmones extirpados de (a) para vimentina humana y se midió el tamaño de cada nódulo metastásico a través de análisis de imágenes usando ImageJ. f, se les inyectaron 4×10^4 células Lm2 que expresan un casete de pre-miR-126 inducible por doxiciclina a través de la vena de la cola a ratones NOD-SCID en el día 0. En el día 3, se añadieron doxiciclina (2 mg/ml) y sacarosa (5%) al agua para beber en un grupo de ratones y sólo sacarosa al 5% en el otro. En el día 48, se extirparon los ratones y se tiñeron de manera inmunohistoquímica para vimentina humana (parte derecha). Se muestra el número total de nódulos en cada pulmón en la parte izquierda.

Las figuras 2a-2J son diagramas y fotografías que muestran que miR-126 endógeno suprimió de manera autónoma no celular la angiogénesis metastásica por células de cáncer de mama metastásicas. a, se tiñeron doblemente de manera histológica secciones de pulmón de la figura 1a para vimentina humana y MECA-32 o b, para vimentina y se inyectó lectina por vía intravenosa. Se delimitó el borde de cada nódulo basándose en la tinción de vimentina y la tinción de lectina/MECA-32 en el interior del nódulo metastásico destacó en negro (paneles inferiores). Luego se determinó el área positiva para la tinción de lectina/MECA-32 dentro de cada nódulo usando el software ImageJ y se presentó como el área cubierta por la tinción de lectina/MECA-32 por área del nódulo dado (% de densidad de vasos). La distribución del % de densidad de vasos entre las células miR-126 KD y el control de MDA-MB-231 inyectado se muestra en una representación gráfica de fracción acumulada. $n=8$ /grupo (dando como resultado un total 18 nódulos metastásicos en el control, y 68 en las células miR-126 KD), valor de p basado en la prueba de Kolmogorov-Smirnov. c, se sembraron 5×10^4 células LM2 que expresan miR-126 o una horquilla de control sobre una monocapa de HUVEC y se cuantificó la adhesión. Se obtuvieron imágenes de células que se habían adherido a la monocapa de HUVEC y se analizaron usando el software ImageJ. $n=4$; las barras de error representan el e.e.m. d, se obtuvieron medios condicionados a partir de 5×10^5 células LM2 que expresan miR-126 o una horquilla de control incubando las células con medios EGM-2 durante 24 h. Se sembraron $2,5 \times 10^4$ células HUVEC por triplicado, se hicieron crecer en los medios condicionados y se contaron las células viables a los 5 días tras la siembra. $n=3$; las barras de error representan el e.e.m. e, se mezclaron 2×10^4 células HUVEC con 1×10^4 células LM2 que se transdujeron con miR-126 o una horquilla de control, y se sometió a ensayo la formación de tubos por las células HUVEC. Se obtuvieron imágenes de cada pocillo y se cuantificó el número de puntos de ramificación en cada imagen usando el software MetaMorph. $n=3$; las barras de error representan el e.e.m. La barra de escala representa $250 \mu\text{m}$. f, se sembraron $2,5 \times 10^4$ células MDA-MB-231 y células LM2 por cuadruplicado. Luego se evaluó la migración en Transwell de 5×10^4 células HUVEC hacia las células cancerosas contando el número de células que habían migrado al lado basal de los insertos Transwell en imágenes obtenidas usando ImageJ. $n=4$; las barras de error representan el e.e.m., se obtuvieron valores de p usando la prueba de la t de Student. g, se sometieron células LM2 que expresan miR-126 o la horquilla de control, así como células MDA-MB-231 que expresan un miR-126 de selección como diana en horquilla corto o la horquilla de control al ensayo de reclutamiento de HUVEC. Se obtuvieron imágenes del lado basal de los insertos y se contaron las células usando el software ImageJ. $n=4$; las barras de error representan el e.e.m., se obtuvieron valores de p usando la prueba de la t de Student. Las imágenes representativas mostradas corresponden al conjunto LM2/miR-126OE o de control (parte superior) y al conjunto MDA-MB-231/miR-126KD o de control (parte inferior). La barra de escala representa $100 \mu\text{m}$. h, se sometieron células parentales CN34 y células CN34 LM1a al ensayo de reclutamiento de HUVEC. $n=4$; las barras de error representan el e.e.m., valores de p obtenidos usando la prueba de la t de Student. i, se sometieron células CN34 LM1a que expresan miR-126 o la horquilla de control, así como células parentales CN34 que expresan un miR-126 de selección como diana en horquilla corto o la horquilla de control, al ensayo de reclutamiento de HUVEC. $n=4$; las barras de error representan el e.e.m., valores de p obtenidos usando la prueba de la t de Student. Se muestran imágenes representativas. La barra de escala representa $100 \mu\text{m}$. j, se mezclaron 5×10^5 células Lm2 que sobreexpresan miR-126 o la horquilla de control, así como 5×10^5 células MDA-MB-231 que expresan un miR-126 de selección como diana en horquilla corto o la horquilla de control, 1:1 con Matrigel y se inyectaron en el panículo adiposo mamario. Se analizaron tumores de tamaño coincidente para determinar la densidad de vasos sanguíneos mediante tinción inmunohistoquímica para MECA-32. se tomaron 5 campos individuales para cada tumor y se facilita el porcentaje de cada campo cubierto por una tinción de MECA-32 seleccionada como umbral como el % de densidad de vasos. Se muestra la cuantificación en la parte superior y se muestran a continuación imágenes representativas. $n=4$; las barras de error representan el e.e.m., valores de p obtenidos usando la prueba de la t de Student.

Las figuras 3a-3f son diagramas y fotografías que muestran la identificación sistemática de una red reguladora de miR-126 que media en el reclutamiento endotelial metastásico. a, El rasgo distintivo de metástasis de miR-126 se compone de genes sobreexpresados en células metastásicas, regulados por disminución por miR-126 OE, e inducidos por miR-126 KD. El mapa de calor representa niveles de expresión normalizados según la varianza basados en análisis de microalineamientos y de qPCR. El mapa de colores corresponde al cambio de desviaciones estándar con respecto a la media. b-d, curvas de Kaplan-Meier para la (b) cohorte de cáncer de mama UCSF (117 tumores), (c) cohorte NKI (295 tumores), y (d) la cohorte combinada NKI/MSK/UCSF (494 tumores) que representa la supervivencia libre de metástasis de aquellos pacientes cuyos cánceres primarios sobreexpresaron el rango distintivo de ocho genes de miR-126 (positivos) y los que no lo hicieron (negativos). Valores de p basados en la

prueba de rangos logarítmicos de Mantel-Cox. e, Ensayos de indicador de luciferasa de genes de metástasis de miR-126 en células MDA-MB-231 que expresan un miR-126 de selección como diana en horquilla corto o la horquilla KD de control. Se transfectaron constructos de indicador que contenían el gen de luciferasa en el sentido de 5' de las secuencias de 3'UTR o codificantes (CDS) de cada gen regulado por miR-126 en las diversas líneas celulares y se sometió a ensayo la actividad luciferasa a las 30 horas tras la transfección. n=4; las barras de error representan el e.e.m.; se obtuvieron valores de p usando la prueba de la t de Student. f, se mutaron las regiones complementarias de miR-126 de los constructos 3'UTR/CDS y se repitió el ensayo de indicador de luciferasa con estos constructos en células MDA-MB-231 que expresan un miR-126 de selección como diana en horquilla corto o la horquilla de control (parte derecha). n=4; las barras de error representan el e.e.m.; se obtuvieron valores de p usando la prueba de la t de Student.

Las figuras 4a-4e son un conjunto de diagramas y fotografías que muestran que la angiogénesis y colonización metastásica fomentada por IGFBP2, PITPNC1 y MERTK. a, se sembraron $2,5 \times 10^4$ células LM2 que expresan horquillas que seleccionan como diana IGFBP2, MERTK, PITPNC1, SHMT2 o la horquilla de control por cuadruplicado. Luego se evaluó la migración en Trans-well de 5×10^4 células HUVEC hacia las células cancerosas. Se obtuvieron imágenes de las células que migraron a través de los insertos Transwell y se analizaron usando el software ImageJ. n=4; las barras de error representan el e.e.m., valores de p obtenidos usando a la prueba de la t de Student. Se muestran imágenes representativas. La barra de escala representa 100mm. b, se cuantificaron los niveles de expresión relativos de IGFBP2, MERTK o PITPNC1 en muestras de tumor de mama humano de pacientes en estadio I/II (n=53) en comparación con el estadio III (n=29) o el estadio IV (n=9) a partir de los microalineamientos de cáncer de mama OriGene TissueScan usando qPCR. Las barras de error representan el e.e.m., valores de p obtenidos usando la prueba de la t de Student. c-e, obtención de imágenes de bioluminiscencia de metástasis en pulmón por células de cáncer de mama metastásicas en pulmón con expresión inhibida de los diversos genes regulados por miR-126. Se les inyectaron 4×10^4 células LM2 que expresan la horquilla de control u horquillas cortas independientes que seleccionan como diana IGFBP2 (c), Se les inyectaron PITPNC1 (d) y MERTK (e) por vía intravenosa a ratones NOD-SCID inmunodeficientes. Se midió la colonización en pulmón mediante obtención de imágenes de bioluminiscencia y se cuantificó. n=5; las barras de error representan el e.e.m.; valor de p basado en una prueba de la t de Student unilateral.

Las figuras 5a-5g son diagramas y fotografías que muestran que IGFBP2 medió en el reclutamiento endotelial activando la señalización de IGF1/IGF1R en células endoteliales. a, se cuantificaron mediante ELISA los niveles de IGFBP2 en medios condicionados a partir de los ensayos de reclutamiento de HUVEC usando células MDA-MB-231 y células LM2 (figura 2f). n=4; las barras de error representan el e.e.m., valores de p obtenidos usando la prueba de la t de Student. b, se sembraron $2,5 \times 10^4$ células MDA-MB-231 que expresan un miR-126 de selección como diana en horquilla corto o la horquilla de control, así como células LM2 que expresan miR-126 o la horquilla de control, por cuadruplicado. Luego se evaluó el reclutamiento en Trans-well de 5×10^4 células HUVEC en presencia de Ac contra IGFBP2 50 ng/ml o Ac contra IgG 50 ng/ml hacia las células cancerosas. Se obtuvieron imágenes del lado basal de los insertos Transwell y se cuantificó el número de células que habían migrado usando ImageJ. n=4; las barras de error representan el e.e.m., valores de p obtenidos usando la prueba de la t de Student. La barra de escala representa 100 μ m. c, se sembraron $2,5 \times 10^4$ células CN34 Par que expresan un miR-126 de selección como diana en horquilla corto o la horquilla de control, así como células CN34 Lmla que expresan miR-126 o la horquilla de control, por cuadruplicado. Luego se evaluó la migración en Trans-well de 5×10^4 células HUVEC en presencia de Ac contra IGFBP2 50 ng/ml o Ac contra IgG 50 ng/ml hacia las células cancerosas. n=4; las barras de error representan el e.e.m., valores de p obtenidos usando la prueba de la t de Student. d, e, se sometió a ensayo el reclutamiento en Trans-well de células HUVEC incubadas con Ac de bloqueo de IGF-1 20 μ g/ml (d), Ac de bloqueo de IGF-2 20 μ g/ml (d), Ac de bloqueo de IGF1R 20 μ g/ml (e), Ac de bloqueo de IGF2R 5 μ g/ml (e) o IgG de control (d, e) hacia células MDA-MB-231 que expresan un miR-126 de selección como diana en horquilla corto o la horquilla de control. n=4; las barras de error representan el e.e.m., valores de p obtenidos usando la prueba de la t de Student. f, se pretrataron células HUVEC y cancerosas con Ac de bloqueo de IGF1R 20 μ g/ml o Ac contra IgG de control durante 1 hora antes de evaluarse el reclutamiento en Transwell de células HUVEC hacia células cancerosas. n=4; las barras de error representan el e.e.m., valores de p obtenidos usando la prueba de la t de Student g, se simuló un gradiente de IGFBP2 mezclando las cantidades dadas de proteína IGFBP2 recombinante con Matrigel (1:1) en el fondo de un pocillo. Luego se evaluó la quimiotaxia de $1,5 \times 10^5$ células HUVEC a lo largo del gradiente de IGFBP2 contando el número de células que habían migrado al lado basal de insertos Trans-well después de 20 h usando el software ImageJ. n=4; las barras de error representan el e.e.m., valores de p obtenidos usando la prueba de la t de Student.

Las figuras 6a-6e son diagramas y fotografías que muestran que MERTK medió en el reclutamiento a través de GAS6. a, se cuantificaron los niveles de IGFBP2 en medios condicionados a partir de Lm2 células que expresan la horquilla de control o 2 horquillas independientes contra PIP3 tal como se determina mediante ELISA. b, se sembraron $2,5 \times 10^4$ células MDA-MB-231 que expresan una horquilla de control o una horquilla que selecciona como diana miR-126 por cuadruplicado. Luego se evaluó la migración en Trans-well de 5×10^4 células HUVEC hacia las células cancerosas en presencia de GAS6 1 ng/ml y/o MerFc 10 μ g/ml contando el número de células que habían migrado al lado basal de insertos porosos en imágenes obtenidas usando ImageJ. n=4; las barras de error representan el e.e.m., se obtuvieron valores de p usando la prueba de la t de Student. c, simuló un gradiente de

- IGFBP2 en presencia de Gas6 y MERTK secretado mezclando proteína rhIGFBP2 (520 ng), Gas6 (5 ng) y MerFc (10 ug) con Matrigel (1:1) en el fondo de un pocillo. Luego se evaluó la quimiotaxia de $1,5 \times 10^5$ células HUVEC a lo largo del gradiente contando el número de células que habían migrado al lado basal de insertos Trans-well después de 20 h usando el software ImageJ. n=4; las barras de error representan el e.e.m., valores de p obtenidos usando la prueba de la t de Student. d, Se tiñeron doblemente secciones de pulmón para vimentina y MECA-32. Se trazó el borde de cada nódulo basándose en la tinción de vimentina humana y la tinción de MECA-32 en el interior del nódulo metastásico destacado en negro (paneles inferiores). Luego se determinó el área positiva para la tinción de MECA-32 dentro de cada nódulo usando ImageJ y se presentó como el área cubierta por la tinción de MECA-32 por área del nódulo dado (% de densidad de vasos). La distribución de % de densidad de vasos entre las células LM2 inyectadas que expresan horquillas que seleccionan como diana IGFBP2, PTPNC1, MERTK o una horquilla de control se muestra en una representación gráfica de fracción acumulada. n=4, valor de p basado en la prueba de Kolmogorov-Smirnov. e, esquema de la regulación por miR-126 de reclutamiento endotelial y colonización metastásica a través de interacción con IGFBP2, PTPNC1 y MERTK.
- 15 La figura 7 es un diagrama que muestra que el sistema de miARN-ARNhc antisentido miR-Zip inhibió de manera estable la expresión de miR-126 en células MDA-MB-231. Se transdujeron células MDA-MB-231 con lentivirus que expresan o bien un constructo de miR-Zip que selecciona como diana miR-126 o una versión reordenada del constructo que no selecciona como diana ningún microARN conocido (SYSTEM BIOSCIENCES, Mountain View, CA). Luego se sometieron a prueba los niveles de expresión de miR-126 maduro usando qPCR.
- 20 La figura 8 es un conjunto de fotografías y un diagrama que muestran que miR-126 expresado en células de cáncer de mama regula la perfusión en nódulos metastásicos. Se les inyectaron 4×10^4 células MDA-MB-231 que expresan un miR-126 de selección como diana en horquilla corto o la horquilla de control por vía intravenosa a ratones NOD-SCID inmunodeficientes. En el día 59, se le inyectó por vía intravenosa una disolución de dextrano de bajo peso molecular (MW de 10.000) marcado con FITC. Se permitió que circularan las moléculas de dextrano durante 15 min antes de sacrificarse los ratones y extirparse los pulmones. Se prepararon secciones congeladas y se tiñeron para vimentina humana con el fin de localizar nódulos metastásicos, y se cuantificó la señal de FITC en el interior de los nódulos con un umbral constante usando ImageJ. n=5; las barras de error representan el e.e.m., valores de p obtenidos usando la prueba de la t de Student.
- 30 Las figuras 9a-9b son un conjunto de diagramas que muestran que miR-126 endógeno no suprimió la adhesión, proliferación o formación de tubos endoteliales. a, se sembraron 5×10^4 MDA células que expresan miR-126 KD o un vector KD de control sobre una monocapa de HUVEC y se evaluó la adhesión. Se obtuvieron imágenes de células que se habían adherido a la monocapa de HUVEC y se analizaron usando el software ImageJ. n=4; las barras de error representan el e.e.m. b, se obtuvieron medios condicionados a partir de 5×10^5 células MDA miR-126 KD o MDA control KD incubando las células con medios EGM-2 durante 24 h. Se sembraron $2,5 \times 10^4$ células HUVEC por triplicado, se hicieron crecer en los medios condicionados y se contaron las células viables a los 5 días después de la siembra. n=3; las barras de error representan el e.e.m. c, se mezclaron 2×10^4 células HUVEC con 1×10^4 MDA miR-126 KD o MDA control KD células, y se sometió a ensayo la formación de tubos por células HUVEC. Se obtuvieron imágenes de cada pocillo y se analizó el número de puntos de ramificación en cada imagen usando el software MetaMorph. n=3; las barras de error representan el e.e.m.
- 40 Las figuras 10a-10c son un conjunto de diagramas y diagramas que muestran que miR-126 endógeno reguló la angiogénesis, pero no el reclutamiento de linfocitos positivos para CD45 y de macrófagos positivos para Mac-2. a-c, se mezclaron 5×10^5 células MDA que expresan la horquilla de control o una horquilla que selecciona como diana miR-126 en una razón 1:1 con Matrigel y se inyectaron en el panículo adiposo mamario. 5 min antes del sacrificio, se inyectó lectina biotilada en la vena de la cola. Se extirparon tumores de tamaño coincidente y se detectaron vasos sanguíneos funcionales mediante tinción de la lectina inyectada (a), se detectaron linfocitos CD45+ mediante el anticuerpo anti-CD45 (b) y se detectaron macrófagos Mac-2+ mediante el anticuerpo anti-Mac-2 (c).
- 50 La figura 11 es un diagrama de Venn que muestra la ruta experimental integradora que dio como resultado la identificación de supuestos genes diana de miR-126. Se solaparon perfiles de transcriptomas de genes regulados por disminución en más de 1,6 veces tras la sobreexpresión de miR-126 con genes regulados por incremento en más de 1,4 veces en células LM2 metastásicas en comparación con las células MDA parentales. Esto condujo a la identificación de 23 posibles genes diana de miR-126. Mediante qPCR, 8 de estos 23 genes se vieron modulados por miR-126 tanto en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 como en la línea celular primaria CN34. Se sometieron estos 8 genes a pruebas funcionales para determinar la regulación directa por miR-126 a través de ensayos de indicador de luciferasa.
- 60 Las figuras 12a-12b son diagramas que muestran que miR-126 reguló IGFBP2 y MERTK a través de interacciones de 3'UTR y PTPNC1 y SHMT2 a través de interacciones de CDS. a, b, ensayos de indicador de luciferasa del conjunto de genes de metástasis de miR-126 en células MDA-MB-231 que expresan un miR-126 de selección como diana en horquilla corto así como la horquilla KD de control. Se transfectaron constructos de indicador que contenían el gen de luciferasa en el sentido de 5' de 3'UTR (a) o CDS (b) de ABCB9, IGFBP2, MERTK, PTPNC1, PSAT1, PYBG, SHMT2 y VIPR1 en las diversas líneas celulares y se sometió a ensayo la actividad luciferasa a las 30 horas tras la transfección. n=4; las barras de error representan el e.e.m.; se obtuvieron valores de p usando la prueba de la

t de Student.

Las figuras 13a-13d son un conjunto de diagramas que muestran que horquillas independientes regularon por
 5 disminución los niveles de expresión de IGFBP2, PITPNC1 y MERTK en células LM2. Se transdujeron células LM2
 con lentivirus que expresan una horquilla de control o un constructo de horquilla corta que selecciona como diana
 IGFBP2, PITPNC1 o MERTK. Se analizaron los niveles de expresión de los genes diana a través de qPCR.

La figura 14 es un diagrama que muestra el análisis de proliferación de genes diana de miR-126. Se sembraron 2,5
 10 $\times 10^4$ células LM2 que expresan una horquilla de control u horquillas cortas que seleccionan como diana IGFBP2,
 PITPNC1 o MERTK por triplicado y se contaron las células viables a los 5 días después de la siembra. n=3; las
 barras de error representan el e.e.m.

La figura 15 es un diagrama que muestra que IGFBP2 fomentó la migración de HUVEC. Se estimularon células
 15 HUVEC con las cantidades dadas de proteína IGFBP2 humana recombinante y Ac anti-IGF1R (10 μ g/ml) durante 40
 min, se tripsinizaron y se sembraron 5×10^4 células en un inserto Transwell poroso. Se permitió que las células
 migrasen durante 24 horas antes de cuantificarse el número de células que migraron a través de la membrana. n=6;
 las barras de error representan el e.e.m.; se obtuvieron valores de p usando la prueba de la t de Student.

La figura 16 es una fotografía del análisis de inmunotransferencia de tipo Western de MERTK en lisado celular de
 20 MDA-MB-231 y medios condicionados, que muestra que se escindió el ectodominio de MERTK y se secretó por
 células MDA-MB-231.

La figura 17 es un conjunto de fotografías y diagramas que muestran que IGFBP2, PITPNC1 y MERTK fomentaron la
 25 angiogénesis metastásica. Se tiñeron doblemente de manera histológica secciones de pulmón para vimentina
 humana y se inyectó lectina por vía intravenosa. Se delimitaron los bordes de nódulo basándose en la tinción de
 vimentina y la tinción de lectina en el interior de los nódulos metastásicos. Se usó ImageJ para determinar el área
 positiva para la tinción de lectina dentro de cada nódulo. % de densidad de vasos representa el área cubierta por la
 tinción de lectina por área de un nódulo dado. La distribución de % de densidad de vasos entre las células LM2
 30 inyectadas que expresan la horquilla de control u horquillas cortas que seleccionan como diana IGFBP2, PITPNC1 o
 MERTK se muestra en una representación gráfica de fracción acumulada. n=5. Valor de p basado en la prueba de
 Kolmogorov-Smirnov.

La figura 18 es un diagrama que muestra que la expresión de miR-126 endógeno en células HUVEC no suprimió el
 35 reclutamiento de otras células HUVEC. Se transfectaron un antagomiR que selecciona como diana miR-126 o un
 antagomiR de control en células HUVEC antes de someterse al ensayo de reclutamiento de HUVEC. Se obtuvieron
 imágenes del lado basal de los insertos y se contaron las células usando el software ImageJ. n=4; las barras de error
 representan el e.e.m.

La figura 19 es un diagrama que muestra la expresión de posibles dianas de miR-126 en células HUVEC con niveles
 40 de miR-126 suprimidos. Se transfectaron un antagomiR que selecciona como diana miR-126 o un antagomiR de
 control en células HUVEC y se cuantificó la expresión relativa de posibles dianas en células transfectadas usando
 qPCR. Las barras de error representan el e.e.m., valores de p obtenidos usando la prueba de la t de Student.

La figura 20 es un conjunto de diagramas que muestran datos de ensayos ELISA de captura de anticuerpo usados
 45 para caracterizar las propiedades de unión de anticuerpos neutralizantes de IGFBP2. La figura muestra que el
 sobrenadante de una de las bibliotecas de hibridomas (wo6663-1) generadas a partir de animales inoculados con
 péptido total de IGFBP2 recombinante, contiene anticuerpos que se unen a IGFBP2 con alta afinidad.

La figura 21 es un conjunto de diagramas que muestran datos de ensayos ELISA de captura de anticuerpo usados
 50 para caracterizar las propiedades de unión de anticuerpos neutralizantes de IGFBP2. La figura muestra que el
 sobrenadante del hibridoma wo6663-1 contiene anticuerpos que se unen a IGFBP2 para neutralizar la unión de IGF1
 a IGFBP2. Obsérvese también que los anticuerpos procedentes del hibridoma wo6663-1 se unen específicamente a
 IGFBP2, y no se unen a otros miembros de la familia de IGFBP (IGFBP3, IGFBP4).

La figura 22 es un conjunto de diagramas que muestran datos de ensayos ELISA de captura de anticuerpo usados
 55 para caracterizar las propiedades de unión de anticuerpos neutralizantes de IGFBP2 monoclonales recuperados a
 partir de clones de hibridomas individuales aislados de la biblioteca de hibridomas wo6663-1. Varios de los
 anticuerpos monoclonales neutralizantes de IGFBP2, incluyendo M1, M4, M6, M9, M13, M14, M15 y M16, pudieron
 unirse a IGFBP2 con alta afinidad y neutralizar su unión a IGF1.
 60

La figura 23 es un diagrama que muestra que una composición que contiene concentraciones fisiológicas del
 anticuerpo monoclonal M14 puede inhibir el reclutamiento endotelial por células de cáncer de mama metastásicas.
 Como en los experimentos descritos anteriormente, se usó un ensayo de migración en Trans-well para cuantificar el
 reclutamiento endotelial por células metastásicas. Se pusieron células de cáncer de mama humanas LM2 altamente
 65 metastásicas en la parte inferior de una cámara de Boyden, en la que pudo someterse a ensayo su capacidad para
 reclutar HUVECS a través de un inserto Trans-well poroso. La adición de una pequeña concentración fisiológico de

M14 al Transwell pudo inhibir significativamente el reclutamiento y la migración (células migradas por campo) de células HUVEC (reducción del 50% de las células migradas) frente a los controles negativos (anticuerpos contra IgG y M5). Las barras de error representan el e.e.m.

- 5 La figura 24 es un diagrama que muestra que una composición que contiene concentraciones fisiológicas del anticuerpo monoclonal M14 puede inhibir la evolución tumoral de cáncer de mama *in vivo* en un modelo de ratón. Obtención de imágenes de bioluminiscencia del crecimiento de tumor de mama por 2000 células de cáncer de mama humanas MDA-MB-231 en animales tratados con o bien PBS o bien anticuerpo monoclonal M14. En el día 14, se inhibió significativamente la evolución tumoral mediante el tratamiento con M14 (reducción de 7 a 11 veces de la evolución tumoral) en comparación con los ratones tratados con PBS. Se normaliza la señal con respecto a la señal del día 0. La significación se basa una prueba de la t de Student bilateral.

Descripción detallada de la invención

- 15 La invención descrita proporciona reactivos y métodos para tratar trastornos caracterizados por angiogénesis patológica, tales como metástasis.

Tal como se da a conocer en el presente documento, un análisis sistemático y la atención centrada en la metástasis y angiogénesis metastásica condujo a la identificación de varias moléculas, incluyendo IGFBP2 secretado, la transferasa PITPNC1, la cinasa MERTK y miR-126, como dianas para la inhibición terapéutica con el potencial para tratar cáncer metastásico. Una ruta recién descubierta coordina los genes proangiogénicos de IGFBP2, PITPNC1 y MERTK que se correlacionan en la expresión con metástasis humana. Estos genes representan reguladores de la angiogénesis y el reclutamiento endotelial metastásicos. Por ejemplo, IGFBP2, una proteína secretada por células metastásicas, recluta endotelios modulando la actividad mediada por IGF1 del receptor de tipo I de IGF en células endoteliales.

El reclutamiento endotelial es un proceso en el que se movilizan células endoteliales o sus células progenitoras y el anidamiento (*homing*) en un sitio o una región en un sujeto para generar nuevos vasos sanguíneos o la remodelación de vasos sanguíneos preexistentes, es decir, angiogénesis. La inhibición de este proceso a través de la nueva ruta mencionada anteriormente puede usarse para inhibir la angiogénesis patológica, y tratar de ese modo trastornos caracterizados por angiogénesis patológica, tales como metástasis.

Para el inhibir reclutamiento endotelial y la angiogénesis resultante en un sujeto que lo necesita, puede administrarse al sujeto un agente que inhibe la expresión o actividad de una proteína seleccionada de IGFBP2, IGF1, IGF1R, MERTK, PITPNC1, ABCB9, PSAT1, PYGB, SHMT2 y VIPR. Se enumeran a continuación las secuencias de aminoácidos de estas proteínas. El agente puede ser un ácido nucleico, un polipéptido, un anticuerpo o un compuesto de molécula pequeña.

IGFBP2

40 MLPRVGC PALPLPPP LLLPL LLLLLL LGASGGGGARAEVLFRCPPCTPERLAACGPPP
VAPPA AVAAVAGGARMPCAELVREPGCGCCSVCARLEGEACGVYTPRCGQGLRCYPHPS
ELPLQALVMGEGTCEKRRDAEY GASPEQVADNGDDHSEGGGLVENHVDSTMNMLGGGG SAG
RKPLKSGMKELAVFREKVTEQHRQMKGKGGKHHLGLLEPKKLRPPPARTPCQQLDQVLER
I STMRLPDERGPLEHLYSLHIPNCDKHGLYNLQCKMSLNGQRGECWCVNPNNTGKLIQGA
PTIRGDPECHLFYNEQQEARGVHTQRMQ

IGF1 (isoforma 1)

45 MGKISSLPTQLFKCCFCDFLKV KMHMTSSSHLFYLALCLLTFTSSATAGPETLCGAE LVD
ALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAKSARS
VRAQRHTDMPKTQKYQPPSTNKNTKSQRRKGSTFEERK

IGF1 (isoforma 2)

50 MITPTVKMHMTSSSHLFYLALCLLTFTSSATAGPETLCGAE LVDALQFVCGDRGFYFNK P
TGYGSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAKSARSVRAQRHTDMPKTQKEV
HLKNASRGSAGNKNYRM

IGF1 (isoforma 3)

MGKISSLPTQLFKCCFCDFLKV KMHMTSSSHLFYLALCLLTFTSSATAGPETLCGAE LVD
ALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAKSARS
VRAQRHTDMPKTQKYQPPSTNKNTKSQRRKGWPKTHPGGEQKEGTEASLQIRGKKKEQRR
EIGSRNAECRGGKKG

IGF1 (isoforma 4)

MGKISSSLPTQLFKCCFCDFLKVKMHTMSSSHLFYLALCLLTFTSSATAGPETLCGAELVD
ALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSARS
VRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM

5 IGF1R

MKSGSGGGSPTSLWGLLFLSAALSLWPTSGETICGPGIDIRNDYQQLKRENTVIEGYLH
ILLISKAEDYRSYRFPKLTVITEYLLFRVAGLESGLDFPNLTVIRGWKLFYNYALVIF
EMTNLKDIGLYNLRNITRGAIRIEKNADLCYLSTVDWLSLILDAVSNNYIVGNKPPKECGD
LCPGTMEEEKPMCEKTTINNEYNYRCWTTNRCQKMCPTCCKRACTENNECCHPECLGSCS
APDNDTACVACRHYYYAGVCPACPPNTYRFEGWRCVDRDFCANILSAESSDSEGFVIHD
GECMQECPSGFIRNGSQSMYCIPCEGCPKVCSEEEKTKTIDSVTSAQMLQGCTIFKGNL
LINIRRGNNIASELENFMGLIEVVTGYVKIRHSHALVLSLFLKNLRLILGEEQLEGNYSF
YVLDNQNQLQQLWDWDHRLNLIKAGKMYFAFNPKLCVSEIYRMEEVTGTGKRQSKGDINTR
NNGERASCESDVLHFTSTTTSKNRITITWHRYRPPDYRDLISFTVYYKEAPFKNVTEYDG
QDACGSNSWNMVDVLDLPPNKDVEPGILLHGLKPWTQYAVYVKAVTLTMVENDHIRGAKSE
ILYIRTNASVPSIPLDVLASNSSSQLIVKWNPPSLPNGNLSSYIVRWQRQPQDGYLYRH
NYCSKDKIPIRKYADGTIDIEEVTENPKTEVCGGEGKGPCCACPKTEAEKQAEKEEAERYK
VFENFLHNSIFVPRPERKRRDVMQVANTTMSRSRNTTAADTYNITDPEELETEYPPFES
RVDNKERTVISNLRPFTLYRIDIHSCNHEAEKLGCSASNFFVARTMPAEGADDIPGPVTV
EPRPENSIFLKWPEPENPNGLILMYEIKYGSQVEDQRECVSRQEYRKYGGAKLNRLNPGN
YTARIQATSLSGNGSWTDPVFFYVQAKTGYENFIHLIALPVAVLLIVGGLVIMLYVFR
KRNSRLGNGVLYASVNPEYFSAADVVPDEWEVAREKITMSRELQGSFGMVYEGVAKG
VVKDEPETRVAIKTVNEAASMRERIEFLNEASVMKEFNCHHVRLGCVSQQPTLVIME
LMTRGDLKSYLRLSREMEMNPNVLPAPSLSKMIQMAEADGMAYLNANKFVHRDLAARN
CMVAEDFTVKIGDFGMTRDIYETDYRKGKGLLPVRWMSPELKDGVFTTYSVWVSFGV
VLWEIATLAEQPYQGLSNEQVLRVMEGGLLDKPDNCPDMLFELMRMCWQYNPKMRPSFL
EIISSIKEEMEPGFREVFSYYSEENKLPEPEELDLEPENMESVPLDPSASSSSSLPLPDRH
SGHKAENGPVGLVLRASFDERQPYAHMNGGRKNERALPLPQSSTC

10 MERTK

MGPAPLPLLLGLFLPALWRRAITEAREEAKPYPLFPGPFPGSLQTDHTPLLSLPHASGYQ
PALMFSPQGRPHGTGNVAIPQVTSVESKPLPPLAFKHTVGHILSEHKGVKFNCSISVP
NIYQDTTISWWDKGKELLGAHHAITQFYPDDEVTAIIASFSITSVQRSDNGSYICKMKIN
NEEIVSDPIYIEVQGLPHFTKQPESMNVRNTAFNLTCQAVGPPEPVNIFWVQNSSRVNE
QPEKSPSVLTVPGLTEMAVFSCEAHNDKGLTVSKGVINIKAIKAIKAIKAIKAIKAIKAIKAI
LISWVPGFDGYSPPFRNCSIQVKEADPLSNGSVMIFNTSALPHLYQIKQLQALANYSIGVS
CMNEIGWSAVSPWILASTTEGAPSVAPLNVTVFLNESSDNVDIRWMKPPTKQDQDGLVGY
RISHVWQSAGISKELLEEVGQNGSRARISVQVHNATCTVRIAAVTRGGVGPFSDPVKIFI
PAHGWDYAPSSTPAPGNADPVLIFGCFCGFILIGLILYISLAIRKRVQETKFGNAFTE
EDSELVVNYIAKKSFCRAIELTLHSLGVSEELQNKLEDVVIDRNLILGKILGEGEFGS
VMEGNLQKQEDGTSLKVAVKTMKLDNSSQREIEEFLSEAACMKDFSHPNVIRLLGVCIEMS
SQGIPKPMVILPFMKYGDLHTYLLYSRLETGPKHIPLQTLKFMVDIALGMEYLSNRNFL
HRDLAARNCLMRDDMTVCVADFGLSKKIYSGDYRQGRGRIAKMPVKWIAIESLADRVTYSK
SDVWAFGVTMWEIATRGMTPYPGVQNHEDYLLHGHRLKQPEDCLDELYEIMYSCWRD
PLDRPTFSVLRQLLEKLES LDPVNRQADVIVNTQLLESSEGLAQGSTLAPLDLNDP
SIIASCTPRAAISVVTAEVHDSKPHEGRYI LGGSEEWEDLTSAPSAAVTAEKNSVLPGE
RLVRNGVSWSHSSMLPLGSSLPDELLFADDSSEGSEVLM

PTTPNC1 (isoforma a)

15

MLLKEYRICMPLTVDEYKIGQLYMISKHSHEQSDRGEGVEVVQNEPFEDPHHGNGQFTEK
RVYLNSKLPSTARAVVPKIFYVTEKAWNYPYTITEYTCFLPKFSIHIEETKYEDNKGSN
DTIFDNEAKDVEREVCFDIACDEIPERYYKESDPKHFSEKTRGRQLREGWRDQHP
MCSYKLVTVKFEVWGLQTRVEQFVHKVVRDILLIGHRQAFVAVDEWYDMTMEVREFERA
TQEATNKKIGIFPPAISISSIPLPSSVRSAPSSAPSTPLSTDAPEFLSVPKDRPRKKA
PETLTLDPPEKKATLNLPGMHSSDKPCRPKSE

PITPNC1 (isoforma b)

MLLKEYRICMPLTVDEYKIGQLYMIKHSHEQSDRGEGVEVVQNEPFEDPHHGNGQFTEK
RVYLNSKLPSSWARAVVPKIFVYTEKAWNYYPYTTITEYTCFSLPKFSIHETKYEDNKGSN
DTIFDNEAKDVEREVECFIDIACDEIPERYKESSEDPKHFKSEKTGRGQLREGWRDASHQPI
MCSYKLVTVKFEVWGLQTRVEQFVHKVVRDILLIGHRQAFVWDEWYDMTMDVREYEKN
MHEQTNIKVCNQHSSPVDDIESHAQTST

ABCB9

5 MRLWKAVVVTLAEMSVDICVTTAIYVFSHLDRSLEDIRHFNIFDSVLDLWAACLYRSC
LLGATIGVAKNSALGPRRLRASWLVI TLVCLFVGIYAMVKLLLFSEVRRPIRDPFWALF
VWTYISL GASFLWLLSTVRPGTQALEPGAATEAEGFPGSGRPPPEQASGATLQKLLSY
TKPDVAFVLAASFLLIVAALGETFLPYTGRAIDGIVIQKSMQDFSTAVVIVCLLAIGSS
FAAGIRGGIFTLIFARLNI RLNCLFRSLVSQETSFFDENRTGDLSRLTSDTTMVS
DLV SQNINVFRLRNTVKVTGVVFMFSLSWQLSLVTFMGFPIIMMVSNIYGKYYKRLSKEVQNA
LARASNTAEETISAMKTVRSFANEAEVYLRKLQVYKLNKRAAAAYMYVWGSGLTTL
LVVQVSI LYYGGHLV ISGQMTSGNLI AFIIYEFVLGDCMESVGSVYSGLMQGVGAAEKVF
EFIDRQPTMVHDGSLAPDHLGRVDFENVFTYRTRPHTQVLQNVFSLSLSPGKVTALVGP
SGSGKSSCVNILENFYPLEGGRVLLDGKPI SAYDHKYLHRVIVSLVSQEPVLFARSITDNI
SYGLPTVPFEMVVEAAQKANAHGFIMELQDGYSTETGEKGAQLSGGQKQVAMARALVRN
PPVLI LDEATSALDAESEYLIQQAIHGNLQKHTVLI IAHRLSTVEHAHLIVVLDKGRVVQ
QGTHQQLLAQGGLYAKLVQRQMLGLQPAADFTAGHNEPVANGSHKA

PSAT1 (isoforma 1)

10 MDAPRQVVNF GPGPAKLPHSVLLEIQKELLDYKGVGIVSLEM SHRS SDFAKI INNTENLV
RELLAVPDNYKVI FLQGGGCGQF SAVPLNL IGLKAGRCADYVVTGAWSAKAAEEAKKFGT
INIVHPKLGSYTKIPDPSTWNLNPDAS YVYYCANETVHGVEFDFIPDVKGAVLVCDMS
SN FLSKPV DVSKFGVIFAGA QKNVGSAGVTVVIVRDDL LGFALRECP SVLEYKVQAGNS
SLY NTPPCFSIYVMGLVLEWIKNNGGAAAMEKLSSIKSQT IYEI IDNSQGFYVCPVEP
QNRSK MNIPFRIGNAKGDDALEKRF LDKALELNMLSLKGHR SVGGIRASLYNAV
TIEDVQKLAAF MKKFLEMHQL

PSAT1 (isoforma 2)

15 MDAPRQVVNF GPGPAKLPHSVLLEIQKELLDYKGVGIVSLEM SHRS SDFAKI INNTENLV
RELLAVPDNYKVI FLQGGGCGQF SAVPLNL IGLKAGRCADYVVTGAWSAKAAEEAKKFGT
INIVHPKLGSYTKIPDPSTWNLNPDAS YVYYCANETVHGVEFDFIPDVKGAVLVCDMS
SN FLSKPV DVSKFGVIFAGA QKNVGSAGVTVVIVRDDL LGFALRECP SVLEYKVQAGNS
SLY NTPPCFSIYVMGLVLEWIKNNGGAAAMEKLSSIKSQT IYEI IDNSQGFYVSVGG
IRASLY NAVTIEDVQKLAAFMKKFLEMHQL

PYGB

MAKPLTDSEKRKQISVRGLAGLDVAEVRKSFNRHLHFTLVKDRNVATPRDYFFALAH
TVDHLVGRWIRTQQHYERDPKRIYYLSLEFYMGRTLQNTMVNLG LQACDEAIYQLGLDL
EEL EIEEDAGLGNGLGR LAACFLDSMATLGLAAYGYGIRYEF GFI NQKIVNGWQVEEA
DDWLRYGNPWEKARPEYMLPVHFYGRVEHTPDGKWLDTQVVLAMPYDTPVPGYKNNTVN
TMRLWSAKAPNDFKLQDFNVGDYIEAVLDRNLAENI SRVLYPNDNFFEGKELRLKQ
EYFV VAATLQDI IRRFKSSKFGCRDPVRTCFETFPDKVAIQ LNDTHPALS IPELMRIL
VDVEKV DWKAW EITKKT CAYTNHTV LPEALERWPVSMFEKLLPRHLEI IYAINQRH
LDHVAALFP GDVDRLRRMSVIEEGDCRINMAHL CVIGSHAVNGVARIHSEIVKQSVF
KDFYELEPEKF QNKTNGITPRRWLLCNPGLADTIVEKIGEEFLTDSLQ LKLLPLV
SDEVFIRDVAKVKQ ENKLFSAFLEKEYKVKINPSSMFDVHV KRIHEYKRQLLNCLH
VVTLYNRIKRDPAKAFV PRTVMIGGKAAPGYHMAKLI IKLVTSIGDVVNHD
PVVGDR LKVI FLENYRVSLAEKVIPA ADLSQQI STAGTEASGTNMKFM LN
GALTIGTMDGANVEMAE EAGAENLFI FGLRVEDVE ALDRKGYNAREYDHLPEL
KQAVDQISSGFFSPKEPDCFKDIVNMLMHHDRFKVFADYEA YMOCQAQVDQLY
RNPKEWTKKVI RN IACSGKFS SDRITITEYAREI WGV EPSDLQIPPPNI PRD

20 **SHMT2 (isoforma 1)**

MLYFSLFWAARPLQRCGQLVRMAIRAQHSNAAQTQTGEANRGWTGQESLSDSDPEMWELL
 QREKDRQCRGLELIAENFCSRAALEALGSCLNKYSEGYPGKRYGGAEVVDIEILLCQ
 RRALEAFDLDPAQWGVNVQPYSGSPANLAVYTALLQPHDRIMGLDLPDGGHLTHGYMSDV
 KRISATSIFFESMPYKLNPKTGLIDYNQLALTARLFRPRLI IAGTSAYARLIDYARMREV
 CDEVKAHLLADMAHISGLVAAKVIPSPFKHADIVTTTTHTKTLRGARSGLIFYRKGVKAVD
 PKTGREIPYTFEDRINFVAVFVPSLQGGPHNHAAVAVALKQACTPMFREYSLQVLKNARA
 MADALLERGYSLVSGGTDNHLVLDLRPKGLDGARAERVLELVSITANKNTCPGDRSAIT
 PGGLRLGAPALTSRQFREDDFRRVDF IDEGVNIGLEVKSKTAKLQDFKSFLLDKSETSQ
 RLANLRQVEQFARAFMPGFDEH

SHMT2 (isoforma 2)

MLYFSLFWAARPLQRCGQLVRMAIRAQHSNAAQTQTGEANRGWTGQESLSDSDPEMWELL
 QREKDRQCRGLELIAENFCSRAALEALGSCLNKYSEGYPGKRYGGAEVVDIEILLCQ
 RRALEAFDLDPAQWGVNVQPYSGSPANLAVYTALLQPHDRIMGLDLPDGGHLTHGYMSDV
 KRISATSIFFESMPYKLNALALTARLFRPRLI IAGTSAYARLIDYARMREVCDEVKAHLLA
 DMAHISGLVAAKVIPSPFKHADIVTTTTHTKTLRGARSGLIFYRKGVKAVDPKTGREIPYT
 FEDRINFVAVFVPSLQGGPHNHAAVAVALKQACTPMFREYSLQVLKNARAMADALLERGY
 SLVSGGTDNHLVLDLRPKGLDGARAERVLELVSITANKNTCPGDRSAITPGGLRLGAPA
 LTSRQFREDDFRRVDF IDEGVNIGLEVKSKTAKLQDFKSFLLDKSETSQRLANLRQVE
 QFARAFMPGFDEH

5

SHMT2 (isoforma 3)

MAIRAQHSNAAQTQTGEANRGWTGQESLSDSDPEMWELLQREKDRQCRGLELIAENFCS
 RAALEALGSCLNKYSEGYPGKRYGGAEVVDIEILLCQRRALEAFDLDPAQWGVNVQPY
 SGSPANLAVYTALLQPHDRIMGLDLPDGGHLTHGYMSDVKRISATSIFFESMPYKLNPKT
 GLIDYNQLALTARLFRPRLI IAGTSAYARLIDYARMREVCDEVKAHLLADMAHISGLVAA
 KVIPSPFKHADIVTTTTHTKTLRGARSGLIFYRKGVKAVDPKTGREIPYTFEDRINFVAVF
 SLQGGPHNHAAVAVALKQACTPMFREYSLQVLKNARAMADALLERGYSLVSGGTDNHL
 VLVDLRPKGLDGARAERVLELVSITANKNTCPGDRSAITPGGLRLGAPALTSRQFREDDF
 RRVVDF IDEGVNIGLEVKSKTAKLQDFKSFLLDKSETSQRLANLRQVEQFARAFMPGF
 DEH

10

VIPR1

MRPPSPLPARWLCVLAGALAWALGPAGGQAARLQEECDYVQMI EVQHQCLEEAQLENET
 IGC SKMWDNLTCPATPRGQVVVLA CLIFKLFSSIQGRNVSRSCTDEGWTHLEPGYPPI
 ACGLDDKAASLDEQQTMFYGSVKTYTIGYGLSLATLLVATAILSLFRKLHCTRNYIHMH
 LFISFILRAAAVF IKDLALFDSGESDQCSEGSVGC KAAMVFFQYCVMANFFWLLVEGLYL
 YTL LAVSFFSERKYFWGYILIGWVPSFTMVVTIARIHFEDYGCWDTINSSLWIIKGP
 ILTSILVNFILFICIRILLQKLRPPDIRKSDSSPYSRLARSTLLLIPLFGVHYIMFAFF
 PDNFKPEVKMVFELVVG SFQGFVVAILYCF LNGEVQAELRRKWRWHLQGV LGWNPKYRH
 PSGGNSGATCSTQVSMLTRVSPGARRSSSFQAEVSLV

15 Un agente inhibidor (es decir, inhibidor) o un agente de activación (es decir, activador) puede ser un ácido nucleico, un polipéptido, un anticuerpo o un compuesto de molécula pequeña. Preferiblemente, es un agente aislado, pero no una molécula endógena (un microARN) en una célula del sujeto. En un ejemplo, excluye un microARN que es endógeno en células humanas, por ejemplo, miR-126, miR206 o/y miR-335. En otro ejemplo, el agente inhibidor o de activación funciona a nivel de la transcripción, Estabilidad de ARNm, traducción, estabilidad/degradación de
 20 proteínas, modificación de proteínas y unión a proteínas.

Un ácido nucleico se refiere a una molécula de ADN (por ejemplo, pero sin limitarse a, un ADNc o ADN genómico), una molécula de ARN (por ejemplo, pero sin limitarse a, un ARNm), o un análogo de ADN o ARN. Un análogo de
 25 ADN o ARN puede sintetizarse a partir de análogos de nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria. Un "ácido nucleico aislado" es un ácido nucleico cuya estructura no es idéntica a la de ningún ácido nucleico que se produce de manera natural o a la de ningún fragmento de un ácido nucleico genómico que se produce de manera natural. El término cubre por tanto, por ejemplo, (a) un ADN que tiene la secuencia de parte de una molécula de ADN genómica que se produce de manera natural pero no está flanqueada por ambas
 30 secuencias codificantes que flanquean esa parte de la molécula en el genoma del organismo en el que se produce de manera natural; (b) un ácido nucleico incorporado en un vector o en el ADN genómico de una procarionota o eucariota de tal manera que la molécula resultante no es idéntica a ningún vector o ADN genómico que se produce de manera natural; (c) una molécula independiente tal como un ADNc, un fragmento genómico, un fragmento producido por una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o un fragmento de restricción; y (d) una secuencia de nucleótidos recombinante que forma parte de un gen híbrido, es decir, un gen que codifica para una proteína de
 35 fusión.

Los términos “ARN”, “molécula de ARN” y “molécula de ácido ribonucleico” se usan de manera intercambiable en el presente documento, y se refieren a un polímero de ribonucleótidos. El término “ADN” o “molécula de ADN” o molécula de ácido desoxirribonucleico” se refiere a un polímero de desoxirribonucleótidos. El ADN y el ARN pueden sintetizarse de manera natural (por ejemplo, mediante replicación de ADN o transcripción de ADN, respectivamente).

5 El ARN puede modificarse de manera postraduccional. El ADN y el ARN también pueden sintetizarse químicamente. El ADN y el ARN pueden ser monocatenarios (es decir, ARNmc y ADNmc, respectivamente) o multicatenarios (por ejemplo, bicatenarios, es decir, ARNbc y ADNbc, respectivamente).

10 La secuencia de ácido nucleico puede codificar para un ARN de interferencia pequeño (por ejemplo, un agente de iARN) que selecciona como diana uno o más de los genes mencionados anteriormente e inhibe su expresión o actividad. El término “agente de iARN” se refiere a un ARN, o análogo del mismo, que tiene suficiente complementariedad de secuencia con un ARN diana para dirigir la interferencia de ARN. Los ejemplos también incluyen un ADN que puede usarse para producir el ARN. La interferencia de ARN (iARN) se refiere a un proceso selectivo o específico de secuencia mediante el cual una molécula diana (por ejemplo, un gen, proteína o ARN diana) está regulada por disminución. Generalmente, un ARN interferente (“ARNi”) es un ARN interferente corto bicatenario (ARNic), ARN en horquilla corto (ARNhc) o micro-ARN monocatenario (miARN) que da como resultado la degradación catalítica de ARNm específicos, y también puede usarse para reducir o inhibir la expresión génica.

20 El término “ARN interferente corto” o “ARNic” (también conocido como “ARN interferentes pequeños”) se refiere a un agente de ARN, preferiblemente un agente bicatenario, de aproximadamente 10-50 nucleótidos de longitud, preferiblemente entre aproximadamente 15-25 nucleótidos de longitud, más preferiblemente de aproximadamente 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 nucleótidos de longitud, teniendo opcionalmente las hebras extremos de proyección que comprenden, por ejemplo 1, 2 ó 3 nucleótidos (o análogos de nucleótidos) de proyección, que puede dirigir o mediar en la interferencia de ARN. Se generan ARNic que se producen de manera natural a partir de moléculas de ARNbc más largas (por ejemplo, >25 nucleótidos de longitud) por la maquinaria de iARN de una célula (por ejemplo, Dicer o un homólogo de la misma).

30 El término “miARN” o “microARN” se refiere a un agente de ARN, preferiblemente un agente monocatenario, de aproximadamente 10-50 nucleótidos de longitud, preferiblemente entre aproximadamente 15-25 nucleótidos de longitud, más preferiblemente de aproximadamente 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ó 25 nucleótidos de longitud, que puede dirigir o mediar en la interferencia de ARN. Se generan miARN que se producen de manera natural a partir de ARN precursores de tallo-bucle (es decir, pre-miARN) por Dicer. El término “Dicer” tal como se usa en el presente documento, incluye Dicer así como cualquier ortólogo u homólogo de Dicer que puede procesar estructuras de ARNbc para dar ARNic, miARN, moléculas similares a ARNic o moléculas similares a miARN. El término microARN (o “miARN”) se usa de manera intercambiable con el término “ARN temporal pequeño” (o “ARNtp”) basado en el hecho de que se ha encontrado que se expresan microARN que se producen de manera natural (o “miARN”) de manera temporal (por ejemplo, durante el desarrollo).

40 El término “ARNhc”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un agente de ARN que tiene una estructura de tallo-bucle, que comprende una primera y una segunda regiones de secuencia complementaria, siendo suficiente el grado de complementariedad y orientación de las regiones de tal manera que se produce el apareamiento de bases entre las regiones, uniéndose las regiones primera y segunda mediante una región de bucle, resultando el bucle de una ausencia de apareamiento de bases entre nucleótidos (o análogos de nucleótidos) dentro de la región de bucle.

45 Por tanto, también dentro del alcance de esta invención está la utilización de iARN que presenta degradación de moléculas de ARN (por ejemplo, dentro de una célula). La degradación está catalizada por un complejo enzimático de silenciamiento inducido por ARN (RISC). Un agente de ARN que tiene una secuencia suficientemente complementaria a una secuencia de ARN diana (por ejemplo, uno o más de los genes mencionados anteriormente) para dirigir la iARN significa que el agente de ARN tiene una homología de al menos el 50%, (por ejemplo, una homología del 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95%, el 98%, el 99% o el 100%) con la secuencia de ARN diana de modo que las dos son suficientemente complementarias entre sí como para hibridar y desencadenar la destrucción del ARN diana por la maquinaria o el proceso de iARN (por ejemplo, el complejo RISC). Un agente de ARN que tiene una “secuencia suficientemente complementaria a una secuencia de ARN diana para dirigir la iARN” también significa que el agente de ARN tiene una secuencia suficiente como para desencadenar la inhibición traduccional del ARN diana por la maquinaria o el proceso de iARN. Un agente de ARN también puede tener una secuencia suficientemente complementaria a un ARN diana codificada por la secuencia de ADN diana de tal manera que la secuencia de ADN diana se silencia de manera cromática. Dicho de otro modo, el agente de ARN tiene una secuencia suficiente como para inducir silenciamiento génico transcripcional, por ejemplo, para modular por disminución la expresión génica en o cerca de la secuencia de ADN diana, por ejemplo, induciendo cambios estructurales de la cromatina en o cerca de la secuencia de ADN diana.

65 Los polinucleótidos mencionados anteriormente pueden administrarse usando dispositivos de administración de micropartículas o microcápsulas poliméricas, biodegradables conocidos en la técnica. Otro modo de conseguir la captación de los polinucleótidos es usando liposomas, preparados mediante métodos convencionales. El polinucleótido puede incorporarse solo en estos vehículos de administración o incorporarse conjuntamente con

anticuerpos específicos de tejido. Alternativamente, puede prepararse un conjugado molecular que se compone de un plásmido u otro vector unido a poli-L-lisina mediante fuerzas electrostáticas o covalentes. La poli-L-lisina se une a un ligando que puede unirse a un receptor en células diana (Cristiano, *et al.*, 1995, J. Mol. Med. 73:479). Alternativamente, pueden obtenerse dianas específicas de tejido mediante el uso de elementos reguladores de la transcripción específicos de tejido que se conocen en la técnica. La administración de ADN desnudo (es decir, sin un vehículo de administración) a un sitio intramuscular, intradérmico o subcutáneo es otro medio de lograr la expresión *in vivo*.

Pueden diseñarse moléculas de ARN_i, miARN y ARNas (ARN antisentido) mediante métodos bien conocidos en la técnica. Pueden diseñarse moléculas de ARN_i, miARN y ARNas con homología suficiente para proporcionar la especificidad de secuencia requerida para degradar de manera única cualquier ARN usando programas conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, los mantenidos en los sitios web de AMBION, Inc. y DHARMA CON, Inc. Los expertos en la técnica pueden realizar de manera rutinaria pruebas sistemáticas de varias especies diseñadas para la optimización de la secuencia de ARN_i, miARN y ARNas. Las consideraciones cuando se diseñan moléculas de ácido nucleico interferente corto incluyen, pero no se limitan a, consideraciones biofísicas, termodinámicas y estructurales, preferencias de bases en posiciones específicas en la hebra sentido y homología. Estas consideraciones se conocen bien en la técnica y proporcionar directrices para el diseño de las moléculas de ARN mencionadas anteriormente.

En un ejemplo, el polipéptido es un anticuerpo. El término “anticuerpo” se refiere a una molécula de inmunoglobulina o parte inmunológicamente activa de la misma, es decir, una parte de unión a antígeno. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, una proteína que tiene al menos una o dos, regiones variables de cadena pesada (H) (V_H), y al menos una o dos regiones variables de cadena ligera (L) (V_L). Las regiones V_H y V_L pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas “regiones determinantes de complementariedad” (“CDR”), intercaladas con regiones que son más conservadas, denominadas “regiones de entramado” (FR). Tal como se usa en el presente documento, el término “inmunoglobulina” se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina humanos reconocidos incluyen los genes de región constante kappa, lambda, alfa (IgA1 e IgA2), gamma (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), delta, epsilon y mu, así como los múltiples genes de región variable de inmunoglobulina.

El término “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo (o “parte de anticuerpo”) se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, IGF1, IGF1R, MERTK, PTPN22, ABCB9, PSAT1, PYGB, SHMT2 o VIPR). Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión englobados dentro del término “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los V_H dominios y C_{H1} ; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio V_H ; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , están codificados por genes independientes, pueden unirse, usando métodos recombinantes, mediante un ligador sintético que les permite constituirse como una sola cadena de proteína en la que las regiones V_L y V_H se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase por ejemplo, Bird *et al.* (1988) Science 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). También se pretende que tales anticuerpos de cadena sencilla estén englobados dentro del término “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y se examinan los fragmentos para determinar su utilidad de la misma manera que se hace con anticuerpos intactos.

Pueden producirse anticuerpos que se unen específicamente a una de las proteínas diana mencionadas anteriormente usando métodos conocidos en la técnica. Este anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o uno monoclonal. Los ejemplos de tales anticuerpos incluyen los descritos en los ejemplos de trabajo a continuación. En una realización, el anticuerpo puede producirse de manera recombinante, por ejemplo, producirse mediante presentación en fago o mediante métodos combinatorios. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo completamente humano (por ejemplo, un anticuerpo producido en un ratón que se ha modificado por ingeniería genética para producir un anticuerpo a partir de una secuencia de inmunoglobulina humana), un anticuerpo humanizado o un anticuerpo no humano, por ejemplo, pero sin limitarse a, un anticuerpo de roedor (ratón o rata), cabra, primate (por ejemplo, pero sin limitarse a, mono), conejo o camello. Los ejemplos de métodos para generar una versión humanizada de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, injerto de CDR (Queen *et al.*, patente estadounidense n.º 5,585,089; Riechmann *et al.*, Nature 332:323 (1988)), intercambio de cadenas (patente estadounidense n.º 5,565,332); y revestimiento o remodelado de la superficie (documentos EP 592.106; EP 519.596); Padlan, Molecular Immunology 28(415):489-498 (1991); Studnicka *et al.*, Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska. *et al.*, PNAS 91:969-973 (1994)). Los ejemplos de métodos para generar anticuerpos completamente humanos incluyen, pero no se limitan a, la generación de anticuerpos a partir de ratones que pueden expresar genes de inmunoglobulina humanos y el uso de la tecnología de presentación en fago para generar y examinar bibliotecas de genes de inmunoglobulina humanos.

- Un “anticuerpo aislado” pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a IGF1R, IGF1, IGF1R, MERTK, PTPN22, ABCB9, PSAT1, PYGB, SHMT2 o VIPR está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de tal antígeno). Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente al antígeno puede tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de IGF1R, IGF1, IGF1R, MERTK, PTPN22, ABCB9, PSAT1, PYGB, SHMT2 o VIPR de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.
- Los términos “anticuerpo monoclonal” o “composición de anticuerpo monoclonal” tal como se usa en el presente documento se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular sencilla. Una composición de anticuerpo monoclonal presenta una única afinidad y especificidad de unión para un epítipo particular.
- El término “anticuerpo humano”, tal como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones de entramado como las CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácido no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis al azar o específica de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término “anticuerpo humano”, tal como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que se han injertado secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, sobre secuencias de entramado humanas.
- El término “anticuerpo monoclonal humano” se refiere a anticuerpos que presentan una única afinidad de unión que tienen regiones variables en las que tanto las regiones de entramado como las CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos los produce un hibridoma que incluye una célula B obtenida a partir de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionados a una célula inmortalizada.
- El término “anticuerpo humano recombinante”, tal como se usa en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan mediante medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humanos o un hibridoma preparado a partir de los mismos (descrito adicionalmente a continuación), (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca combinatoria de anticuerpos humanos recombinantes y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humanos a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones de entramado y CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En determinadas realizaciones, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y por tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se derivan de y están relacionadas con secuencias de V_H y V_L de línea germinal humana, pueden no existir de manera natural dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.
- Tal como se usa en el presente documento, “isotipo” se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificada por los genes de región constante de cadena pesada.
- Las expresiones “un anticuerpo que reconoce un antígeno” y “un anticuerpo específico para un antígeno” se usan de manera intercambiable en el presente documento con el término “un anticuerpo que se une a específicamente a un antígeno”.
- Tal como se usa en el presente documento, el término “alta afinidad” por un anticuerpo contra IgG se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10⁻⁷ M o menos, preferiblemente 10⁻⁸ M o menos, más preferiblemente 10⁻⁹ M o menos e incluso más preferiblemente 10⁻¹⁰ M o menos para un antígeno diana. Sin embargo, la unión de “alta afinidad” puede variar para otros isotipos de anticuerpo. Por ejemplo, la unión de “alta afinidad” para un isotipo IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10⁻⁷ M o menos, más preferiblemente 10⁻⁸ M o menos.
- En un ejemplo, se describe una composición que comprende un anticuerpo monoclonal que neutraliza la función de IGF1R inhibiendo la unión de IGF1R a IGF1. En una realización, este anticuerpo puede ser un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo no humano, por ejemplo, pero sin limitarse a, un anticuerpo de roedor (ratón o rata), cabra, primate (por ejemplo, pero sin limitarse a, mono), conejo o camello. En una realización, pueden sustituirse uno o más aminoácidos de este anticuerpo monoclonal con el fin de alterar sus propiedades físicas. Estas propiedades incluyen, pero no se limitan a, especificidad de unión, afinidad de unión,

inmunogenicidad e isotipo de anticuerpo. Pueden usarse composiciones farmacéuticas que contienen versiones completamente humanas o humanizadas de los anticuerpos descritos anteriormente para tratar trastornos de angiogénesis patológica.

5 En un ejemplo, una composición que comprende un anticuerpo neutralizante de IGFBP2 que inhibe que se una IGF1 a IGFBP2 inhibe la evolución tumoral de cáncer de mama y la carga tumoral *in vivo*. En este ejemplo, la administración del anticuerpo descrito anteriormente redujo la carga tumoral de cáncer de mama humano *in vivo* en un modelo de ratón de cáncer humano.

10 Pueden usarse composiciones farmacéuticas que contienen versiones completamente humanas o humanizadas de los anticuerpos descritos anteriormente para inhibir metástasis de cáncer de mama en pacientes humanos inhibiendo el reclutamiento endotelial por células metastásicas. En otra realización, pueden usarse composiciones farmacéuticas que contienen versiones completamente humanas o humanizadas de estos anticuerpos para tratar otros tipos de tumores vasculares. Los tumores vascularizados típicos que pueden tratarse con esta composición
15 incluyen tumores sólidos, particularmente carcinomas, que requieren una componente vascular para la provisión de oxígeno y nutrientes. Los tumores sólidos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, carcinomas de pulmón, mama, óseo, de ovario, estómago, páncreas, laringe, esófago, testículos, hígado, parotídeo, de vías biliares, colon, recto, cuello uterino, útero, endometrio, riñón, vejiga, próstata, tiroides, carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas, carcinomas de células pequeñas, melanomas, gliomas, glioblastomas, neuroblastomas, sarcoma de Kaposi y sarcomas.
20

En otra realización, el polipéptido es una forma mutante de la proteína mencionada anteriormente, que interfiere en la ruta mencionada anteriormente y, por tanto, inhibe la angiogénesis y el reclutamiento endotelial. El término "mutante" engloba mutantes que se producen de manera natural y mutantes creados químicamente y/o usando
25 técnicas de ADN recombinantes. Un mutante de uno de los péptidos de tipo natural mencionados anteriormente puede deberse a la alteración, por ejemplo, truncamiento, elongación, sustitución, delección o inserción, de uno o más aminoácidos. La alteración también puede tener un aminoácido modificado, tal como uno que comprende una modificación postraducciona. La actividad proangiogénica de un mutante, si la hay, es sustancialmente menor que la actividad del polipéptido de tipo natural en al menos aproximadamente el 20% (por ejemplo, el 30%, el 40%, el
30 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o el 100%) tal como se mide usando un ensayo descrito en el presente documento o conocido en la técnica. Un ejemplo es un polipéptido que tiene el dominio extracelular de IGF1-R, pero que carece el dominio intracelular. Competiendo por IGF-1, este mutante puede inhibir la ruta mencionada anteriormente y la actividad proangiogénica de manera dominante negativa.

35 Las composiciones de aminoácidos de los anticuerpos o polipéptidos mencionados anteriormente pueden variar con o sin perturbar la capacidad (por ejemplo, afinidad) para unirse a las dianas o los antígenos respectivos, y desencadenar o inhibir la respuesta celular respectiva. Por ejemplo, pueden contener una o más sustituciones de aminoácido conservativas. Una "sustitución de aminoácido conservativa" es una en la que el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido
40 familias de residuos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales apolares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales con ramificación β (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por tanto, un residuo de aminoácido no esencial predicho en, por ejemplo, SEQ ID NO: 9 o 10 puede reemplazarse por otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales. Alternativamente, pueden introducirse mutaciones al azar a lo largo de la totalidad o parte de las secuencias, tal como mediante mutagénesis de saturación, y los
45 mutantes resultantes pueden examinarse para determinar la capacidad para unirse al antígeno respectivo y desencadenar la respuesta celular respectiva para identificar mutantes que conservan la actividad.
50

Composiciones

55 Dentro del alcance de esta invención es una composición que contiene un portador adecuado y uno o más de los agentes descritos anteriormente. La composición puede ser una composición farmacéutica que contiene un portador farmacéuticamente aceptable, una composición dietética que contiene un portador dietéticamente aceptable adecuado, o una composición cosmética que contiene un portador cosméticamente aceptable.

60 El término "composición farmacéutica" se refiere a la combinación de un agente activo con un portador, inerte o activo, haciendo que la composición sea especialmente adecuada para uso diagnóstico o terapéutico *in vivo* o *ex vivo*. Un "portador farmacéuticamente aceptable", después de administrarse a o sobre un sujeto, no provoca efectos fisiológicos adversos. El portador en la composición farmacéutica debe ser "aceptable" también en el sentido de que sea compatible con el principio activo y pueda estabilizarlo. Pueden usarse uno o más agentes solubilizantes como portadores farmacéuticos para la administración de un compuesto activo. Los ejemplos de un portador farmacéuticamente aceptable incluyen, pero no se limitan a, vehículos, adyuvantes, aditivos y diluyentes
65 biocompatibles para obtener una composición que puede usarse como forma de dosificación. Los ejemplos de otros

portadores incluyen óxido de silicio coloidal, estearato de magnesio, celulosa, laurilsulfato de sodio y amarillo D&C n.º 10.

5 La composición descrita anteriormente, en cualquiera de las formas descritas anteriormente, puede usarse para tratar trastornos caracterizados por angiogénesis patológica. Una cantidad eficaz se refiere a la cantidad de un compuesto/agente activo que se requiere para conferir un efecto terapéutico en un sujeto tratado. Las dosis eficaces variarán, tal como reconocen los expertos en la técnica, dependiendo de los tipos de enfermedades tratadas, vía de administración, uso de excipientes y la posibilidad de uso conjunto de otro tratamiento terapéutico.

10 Una composición farmacéutica de esta invención puede administrarse por vía parenteral, por vía oral, por vía nasal, por vía rectal, de manera tópica o por vía bucal. El término "parenteral" tal como se usa en el presente documento se refiere a inyección subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinovial, intraesternal, intratecal, intralesional o intracraneal, así como cualquier técnica de infusión adecuada.

15 Una composición inyectable estéril puede ser una disolución o suspensión en un diluyente o disolvente no tóxico aceptable por vía parenteral. Tales disoluciones incluyen, pero no se limitan a, disolución en 1,3-butanodiol, manitol, agua, solución de Ringer y disolución isotónica de cloruro de sodio. Además, de manera convencional se emplean aceites fijos como disolvente o medio de suspensión (por ejemplo, mono o diglicéridos sintéticos). Los ácidos grasos, tales como, pero sin limitarse a, ácido oleico y sus derivados de glicérido, son útiles en la preparación de
20 productos inyectables, como lo son los aceites naturales farmacéuticamente aceptables, tales como, pero sin limitarse a, aceite de oliva o aceite de ricino, versiones polioxieladas de los mismos. Estas disoluciones o suspensiones en aceite también pueden contener un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga tal como, pero sin limitarse a, carboximetilcelulosa, o agentes de dispersión similares. También pueden usarse con el fin de
25 formulación otros tensioactivos usados habitualmente, tales como, pero sin limitarse a, Tween o Span u otros agentes emulsionantes o potenciadores de la biodisponibilidad similares, que se usan habitualmente en la fabricación de formas de dosificación farmacéuticamente aceptables sólidas, líquidas u otras.

Una composición para administración oral puede ser cualquier forma de dosificación aceptable por vía oral incluyendo cápsulas, comprimidos, emulsiones y suspensiones, dispersiones y disoluciones acuosas. En el caso de
30 los comprimidos, los portadores usados habitualmente incluyen, pero no se limitan a, lactosa y almidón de maíz. Normalmente se añaden agentes lubricantes, tales como, pero sin limitarse a, estearato de magnesio. Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen, pero no se limitan a, lactosa y almidón de maíz desecado. Cuando se administran suspensiones o emulsiones acuosas por vía oral, el principio activo puede suspenderse o disolverse en una fase de aceite combinada con agentes emulsionantes o de suspensión. Si se
35 desea, pueden añadirse determinados agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes.

Pueden formularse composiciones farmacéuticas para administración tópica según la invención descrita como disoluciones, pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, pastas, geles, pulverizaciones, aerosoles o aceites. Alternativamente, las formulaciones tópicas pueden estar en forma de parches o apósitos impregnados con
40 principio(s) activo(s), que pueden comprender opcionalmente uno o más excipientes o diluyentes. En algunas realizaciones preferidas, las formulaciones tópicas incluyen un material que aumentarán la absorción o penetración del/de los principio(s) activo(s) a través de la piel u otras zonas afectadas. La composición tópica es útil para tratar trastornos en la piel, tal como melanoma y determinados trastornos inflamatorios.

45 Una composición tópica contiene una cantidad segura y eficaz de un portador dermatológicamente aceptable adecuado para la aplicación a la piel. Una composición o un componente "cosméticamente aceptable" o "dermatológicamente aceptable" se refiere a una composición o un componente que es adecuado para su uso en contacto con la piel humana sin excesiva toxicidad, incompatibilidad, inestabilidad, respuesta alérgica, y similares. El portador permite que se administren un agente activo y componente opcional a la piel a una(s)
50 concentración/concentraciones apropiada(s). Por tanto, el portador puede actuar como diluyente, dispersante, disolvente, o similar para garantizar que los materiales activos se aplican a y se distribuyen uniformemente por la diana seleccionada a una concentración apropiada. El portador puede ser sólido, semisólido o líquido. El portador puede estar en forma de una loción, una crema o un gel, en particular uno que tiene un límite de elasticidad o consistencia suficiente para impedir que sedimenten los materiales activos. El portador puede ser inerte o presentar
55 beneficios dermatológicos. También debe ser física y químicamente compatible con los componentes activos descritos en el presente documento, y no deben afectar indebidamente la estabilidad, eficacia u otros beneficios de uso asociados con la composición.

Métodos de tratamiento

60 La invención descrita proporciona métodos para tratar en un sujeto un trastorno angiogénico o un trastorno de la angiogénesis.

65 Los términos "trastorno angiogénico", "trastorno de la angiogénesis" y "trastorno de la angiogénesis" se usan de manera intercambiable en el presente documento, y se refieren a un trastorno caracterizado por angiogénesis patológica. Un trastorno caracterizado por angiogénesis patológica se refiere a un trastorno en el que angiogénesis

anómala o aberrante, sola o en combinación con otros, contribuye a la causalidad, el origen o síntoma del trastorno. Los ejemplos de este trastorno incluyen diversos cánceres (por ejemplo, tumores vascularizados), trastornos oculares, trastornos inflamatorios, y otros.

5 Los tumores vascularizados típicos que pueden tratarse con el método incluyen tumores sólidos, particularmente carcinomas, que requieren una componente vascular para la provisión de oxígeno y nutrientes. Los tumores sólidos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, carcinomas de pulmón, mama, óseo, de ovario, estómago, páncreas, laringe, esófago, testículos, hígado, parotídeo, de vías biliares, colon, recto, cuello uterino, útero, endometrio, riñón, vejiga, próstata, tiroides, carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas, carcinomas de
10 células pequeñas, melanomas, gliomas, glioblastomas, neuroblastomas, sarcoma de Kaposi y sarcomas.

También pueden tratarse varios trastornos o estados, distintos de cáncer, con el método descrito anteriormente. Los ejemplos incluyen artritis, artritis reumatoide, psoriasis, aterosclerosis, retinopatía diabética, degeneración macular asociada con la edad, enfermedad de Graves, reestenosis vascular (incluyendo reestenosis tras angioplastia),
15 malformaciones arteriovenosas (MAV), meningioma, hemangioma, glaucoma neovascular, enfermedad renal crónica, nefropatía diabética, enfermedad renal poliquística, enfermedad pulmonar intersticial, hipertensión pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfisema, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad hepática inflamatoria crónica, cirrosis hepática, linfoma cutáneo de células T, rosácea y carcinoma de células basales.

Otras dianas de tratamiento incluyen las descritas en, por ejemplo, las solicitudes estadounidenses 2009004297, 20090175791 y 20070161553, tales como angiofibroma, placas ateroscleróticas, neovascularización de injerto corneal, articulaciones hemofílicas, cicatrices hipertróficas, síndrome de Osler-Weber, granuloma piógeno, fibroplasia retrolenticular, esclerodermia, tracoma, adhesiones vasculares, sinovitis, dermatitis, otras diversas
20 enfermedades y trastornos inflamatorios y endometriosis.

Un “sujeto” se refiere a un ser humano y un animal no humano. Los ejemplos de un animal no humano incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos, tales como mamíferos no humanos, primates no humanos (particularmente primates superiores), perros, roedores (por ejemplo, ratones o ratas), cobayas, gatos y conejos, y animales no mamíferos, tales como aves, anfibios, reptiles, etc. En una realización, el sujeto es un ser humano. En otra realización, el sujeto es un animal de experimentación o animal adecuado como modelo de enfermedad. Puede identificarse un sujeto que ha de tratarse para un trastorno mediante técnicas de diagnóstico convencionales para el
30 trastorno.

Opcionalmente, el sujeto puede examinarse para detectar una mutación, un nivel de expresión o nivel de actividad de uno o más de las proteínas o los genes mencionados anteriormente mediante métodos conocidos en la técnica o descritos anteriormente antes del tratamiento. Si el sujeto tiene una mutación particular en el gen, o si el nivel de actividad o expresión génica es, por ejemplo, mayor en una muestra del sujeto que el de una muestra de una persona normal, el sujeto es un candidato para el tratamiento.
35

Para confirmar la inhibición o el tratamiento, puede evaluarse y/o verificar la inhibición de la angiogénesis o el reclutamiento endotelial resultante usando una tecnología conocida en la técnica antes y/o después de la etapa de administración. Las tecnologías a modo de ejemplo incluyen angiografía o arteriografía, una técnica de obtención de imágenes médicas usadas para visualizar el interior de, o la luz, de vasos sanguíneos y órganos del cuerpo, puede realizarse generalmente inyectando un agente de contraste radiopaco en el vaso sanguíneo y obteniendo imágenes usando técnicas basadas en rayos X tales como fluoroscopia.
40 45

“Tratar” o “tratamiento” se refiere a la administración de un compuesto o agente a un sujeto que tiene un trastorno con el fin de curar, aliviar, paliar, remediar, retrasar la aparición de, prevenir o mejorar el trastorno, el síntoma del trastorno, el estado patológico secundario al trastorno o la predisposición al trastorno.
50

Una “cantidad eficaz” o “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a una cantidad del compuesto o agente que puede producir un resultado deseable a nivel médico en un sujeto tratado. El método de tratamiento puede realizarse *in vivo* o *ex vivo*, solo o junto con otros fármacos o terapias. Puede administrarse una cantidad terapéuticamente eficaz en una o más administraciones, aplicaciones o dosificaciones y no pretende limitarse a una formulación o vía de administración particular.
55

El agente puede administrarse *in vivo* o *ex vivo*, solo o coadministrarse junto con otros fármacos o terapias, es decir, un terapia de cóctel. Tal como se usa en el presente documento, el término “coadministración” o “coadministrarse” se refiere a la administración de al menos dos agente(s) o terapias a un sujeto. Por ejemplo, en el tratamiento de tumores, particularmente tumores vascularizados, malignos, los agentes pueden usarse solos o en combinación con, por ejemplo, agentes quimioterápicos, radioterápicos, apoptóticos, antiangiogénicos y/o inmunotoxinas o coaguligandos.
60

En algunas realizaciones, la coadministración de dos o más agentes/terapias es concurrente. En otras realizaciones, un primer agente/terapia se administra antes del segundo agente/terapia. Los expertos en la técnica entienden que
65

las formulaciones y/o vías de administración de los diversos agentes/terapias usados pueden variar.

En un enfoque *in vivo*, se administra un compuesto o agente a un sujeto. Generalmente, el compuesto se suspende en un portador farmacéuticamente aceptable (tal como, por ejemplo, pero sin limitarse a, solución salina fisiológica) y se administra por vía oral o mediante infusión intravenosa, o inyectarse o implantarse por vía subcutánea, por vía intramuscular, por vía intratecal, por vía intraperitoneal, por vía intrarrectal, por vía intravaginal, por vía intranasal, por vía intragástrica, por vía intratraqueal o por vía intrapulmonar.

La dosificación requerida depende de la elección de la vía de administración; la naturaleza de la formulación; la naturaleza de la enfermedad del paciente; la talla, el peso, el área superficial, la edad y el sexo del sujeto; otros fármacos que se administren; y el criterio del médico encargado. Las dosificaciones adecuadas se encuentran en el intervalo de 0,01-100 mg/kg. Se esperan variaciones en la dosificación necesaria en vista de la variedad de compuestos disponibles y las diferentes eficacias de diversas vías de administración. Por ejemplo, se esperaría que la administración oral requiera mayores dosificaciones que la administración mediante inyección i.v. Pueden ajustarse variaciones en estos niveles de dosificación usando rutinas empíricas convencionales para la optimización tal como se entiende bien en la técnica. La encapsulación del compuesto en un vehículo de administración adecuado (por ejemplo, micropartículas poliméricas o dispositivos implantables) puede aumentar la eficacia de administración, particularmente para la administración oral.

Diagnóstico

La invención descrita también proporciona kits y métodos de diagnóstico. Puede diagnosticarse a un sujeto que tiene células cancerosas o células propensas a la tumorigénesis basándose en la expresión o actividad de uno o más de los genes o polipéptidos descritos anteriormente en una muestra de prueba del sujeto. El polipéptido y los ácidos nucleicos pueden usarse como marcadores para indicar la presencia o ausencia de una célula cancerosa o célula propensa a la tumorigénesis. Los ensayos de diagnóstico y pronóstico de la invención descrita incluyen métodos para evaluar el nivel de expresión del polipéptido o ácido nucleico.

Puede evaluarse la presencia, el nivel o la ausencia del polipéptido o ácido nucleico en una muestra de prueba obteniendo una muestra de prueba de un sujeto de prueba y poniendo en contacto la muestra de prueba con un compuesto o un agente que puede detectar el polipéptido o ácido nucleico (por ejemplo, sonda de ARNm, sonda de ADNc genómico o sonda de ADNc). La "muestra de prueba" puede incluir tejidos, células y líquidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y líquidos presentes dentro de un sujeto. El nivel de expresión del gen puede medirse de varias maneras, incluyendo, pero sin limitarse a, medir el ARNm codificado por el gen; medir la cantidad de polipéptido codificado por el gen; o medir la actividad de polipéptido codificado por el gen.

El nivel de ARNm correspondiente al gen en una célula puede determinarse tanto mediante formatos *in situ* como mediante formatos *in vitro*. Puede usarse ARN mensajero aislado de una muestra de prueba en ensayos de hibridación o amplificación que incluyen, pero no se limitan a, análisis de transferencia de tipo Southern o Northern, análisis de PCR y alineamientos de sondas. Por ejemplo, un método de diagnóstico para la detección de niveles de ARNm implica poner en contacto el ARNm aislado con una sonda de ácido nucleico que puede hibridar con el ARNm codificado por el gen. La sonda puede ser un ácido nucleico de longitud completa, o una parte del mismo, tal como un oligonucleótido de al menos 10 nucleótidos de longitud y suficiente para hibridar específicamente en condiciones rigurosas con ARNm o ADN genómico.

En un formato, se inmoviliza ARNm (o ADNc preparado a partir del mismo) sobre una superficie y se pone en contacto con las sondas, por ejemplo, haciendo correr el ARNm aislado sobre un gel de agarosa y transfiriendo el ARNm del gel a una membrana, tal como nitrocelulosa. En otro formato, se inmovilizan las sondas sobre una superficie y se pone en contacto el ARNm (o ADNc) con las sondas, por ejemplo, en un alineamiento de chips de ADN. Un experto en la técnica puede adaptar métodos de detección de ARNm conocidos para detectar el nivel de ARNm.

Puede evaluarse el nivel de ARNm (o ADNc preparado a partir del mismo) en una muestra codificado por uno o más de los genes mencionados anteriormente con ácido nucleico amplificación, por ejemplo, mediante PCR convencional (patente estadounidense n.º 4.683.202), RT-PCR (Bustin S. J. *Mol Endocrinol.* 25:169-93, 2000), PCR cuantitativa (Ong Y. *et al.*, *Hematology.* 7:59-67, 2002), real time PCR (Ginzinger D. *Exp Hematol.* 30:503-12, 2002), y PCR *in situ* (Thaker V. *Methods Mol Biol.* 115:379-402, 1999), o cualquier otro método de amplificación de ácidos nucleicos, seguido por la detección de las moléculas amplificadas usando técnicas conocidas en la técnica. Tal como se usa en el presente documento, los "cebadores de amplificación" se definen que son un par de moléculas de ácido nucleico que pueden aparearse a regiones en 5' o 3' de un gen (hebras positiva y negativa, respectivamente, o viceversa) y contienen una región corta entremedias. En condiciones apropiadas y con reactivos apropiados, tales cebadores permiten la amplificación de una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos flanqueada por los cebadores.

Para métodos *in situ*, puede prepararse una muestra de células o tejido e inmovilizarse sobre un soporte, tal como, pero sin limitarse a, un portaobjetos de vidrio, y luego ponerse en contacto con una sonda que puede hibridar con

ADN genómico en cromosomas o ARNm que codifica para el polipéptido correspondiente.

En otra realización, los métodos de la invención descrita incluyen además poner en contacto una muestra de control con un compuesto o agente que puede detectar ARNm, o ADN genómico, y comparar la presencia de ARNm o ADN genómico en la muestra de control con la presencia de ARNm o ADN genómico en la muestra de prueba.

Los métodos de diagnóstico basados en ácidos nucleicos descritos anteriormente pueden proporcionar información cualitativa y cuantitativa para determinar si un sujeto tiene o está predispuesto a una enfermedad asociada con la expresión génica aberrante y angiogénesis aberrante, por ejemplo, cánceres.

Puede usarse una variedad de métodos para determinar el nivel de uno o más de los polipéptidos mencionados anteriormente. En general, estos métodos incluyen poner en contacto un agente que se une selectivamente al polipéptido, tal como un anticuerpo, para evaluar el nivel de polipéptido en una muestra. Los anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. También puede usarse un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo (por ejemplo, Fab o F(ab')₂). En otra realización, el anticuerpo porta un marcador detectable. El término "marcado", con respecto a la sonda o el anticuerpo, pretende englobar el marcaje directo de la sonda o el anticuerpo uniendo físicamente una sustancia detectable a la sonda o al anticuerpo, así como el marcaje indirecto de la sonda o el anticuerpo mediante reactividad con una sustancia detectable. Por ejemplo, un anticuerpo con una región Fc de conejo puede marcarse indirectamente usando un segundo anticuerpo dirigido contra la región Fc de conejo, en la que el segundo anticuerpo se acopla a una sustancia detectable. Se proporcionan ejemplos de sustancias detectables en el presente documento. Las sustancias o los marcadores detectables apropiados incluyen, pero no se limitan a, radioisótopos (por ejemplo, pero sin limitarse a, ¹²⁵I, ¹³¹I, ³⁵S, ³H o ³²P), enzimas (por ejemplo, pero sin limitarse a, fosfatasa alcalina, peroxidasa del rábano, luciferasa o β-galactosidasa), restos o proteínas fluorescentes (por ejemplo, pero sin limitarse a, fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, GFP o BFP), o restos luminiscentes (por ejemplo, pero sin limitarse a, nanopartículas Qdot™ de Quantum Dot Corporation, Palo Alto, CA).

Los métodos de detección pueden usarse para detectar uno o más de los polipéptidos mencionados anteriormente en una muestra biológica *in vitro* así como *in vivo*. Las técnicas *in vitro* para la detección del polipéptido incluyen análisis mediante ELISA, inmunoprecipitaciones, inmunofluorescencia, EIA, RIA y de inmunotransferencia de tipo Western. Las técnicas *in vivo* para la detección del polipéptido incluyen introducir en un sujeto un anticuerpo marcado. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse con una sustancia detectable tal como se describió anteriormente. La presencia y ubicación de la sustancia detectable en un sujeto puede detectarse mediante técnicas de obtención de imágenes convencionales.

Los métodos de diagnóstico descritos en el presente documento pueden identificar sujetos que tienen, o corren el riesgo de desarrollar, una enfermedad o un trastorno asociado con la expresión o actividad aberrante de uno o más de los polipéptidos mencionados anteriormente. Tal como se describe en el presente documento, los ejemplos de una enfermedad o un trastorno de este tipo incluyen los descritos anteriormente.

Los ensayos de pronóstico descritos en el presente documento pueden usarse para determinar si es adecuado administrar a un sujeto un agente (por ejemplo, un agonista, antagonista, peptidomimético, una proteína, un péptido, ácido nucleico, una molécula pequeña u otro candidato a fármaco) para tratar un trastorno, tal como cáncer. Por ejemplo, tales ensayos pueden usarse para determinar si puede administrarse a un sujeto un fármaco citotóxico para tratar el trastorno.

La información obtenida de la práctica de los ensayos anteriores es útil en el pronóstico, la identificación de la evolución de y la gestión clínica de enfermedades y otros estados perjudiciales que afectan al estado de salud de un individuo. En algunas realizaciones, los ensayos de diagnóstico anteriores proporcionan información útil en el pronóstico, la identificación de la evolución de y la gestión clínica de tumores malignos (cánceres) que se caracterizan por una angiogénesis patológica anómala. La información ayuda más específicamente al médico clínico en el diseño de regímenes quimioterápicos u otros regímenes de tratamiento para erradicar tales tumores malignos del cuerpo de un mamífero aquejado, por ejemplo, un ser humano.

Ejemplo 1: Métodos y materiales

Este ejemplo describe métodos y materiales generales usados en los ejemplos 2-8.

Cultivo celular

Todas las líneas celulares se propagaron tal como se describe en Tavazoie, S. F. *et al.*, Nature 451 (7175), 147 (2008). Se cultivaron células 293T con medios DMEM complementados con FBS al 10%; se cultivaron células H29 con medios DMEM complementados con FBS al 10%, doxiciclina 20 µg/ml, puromicina 2 µg/ml y G418 0,3 mg/ml; y se cultivaron células HUVEC con medios EGM-2 (CC-3162, Lonza, Basilea, Suiza). Las líneas celulares de cáncer de mama MDA-MB-231 y CN34 y sus derivados metastásicos LM2, BoM2 y Lmla se describen en Minn, A. J. *et al.*, Nature 436 (7050), 518 (2005).

Estudios con animales

5 Todo el trabajo con animales se realizó según un protocolo aprobado por el Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) en la Universidad Rockefeller. Se usaron ratones NOD/SCID hembra ratones de edades coincidentes (6-8 semanas de edad) tanto para ensayos de inicio de tumor en el pániculo adiposo mamario ortotópico (Minn, A. J. *et al.*, Nature 436 (7050), 518 (2005) como para ensayos de metástasis de pulmón (Tavazoie, S. F. *et al.*, Nature 451 (7175), 147 (2008)). Se usaron ratones atímicos hembra de edades coincidentes de ocho semanas de edad para ensayos de metástasis sistémica (Kang, Y. *et al.*, Cancer Cell 3 (6), 537 (2003) y Yin, J. J. *et al.*, J Clin Invest 103 (2), 197 (1999)).

10 Se obtuvo expresión de miR-126 inducible clonando pre-miR-126 en el vector pTripz que contenía tet-ON (Thermo Scientific, Huntsville, AL). En el día 3, se añadió doxiciclina 2 mg/ml (Sigma Aldrich) al agua potable que contenía sacarosa al 5%. Se dio a los ratones de control agua potable con sacarosa al 5%.

15 *Generación de Lentivirus, Retrovirus, silenciamiento y células de sobreexpresión*

Para la generación de lentivirus, se sembraron 1×10^6 células 293T sobre una placa de 10 cm y se incubaron durante 24 h. Entonces se cotransfectaron doce microgramos de vector K (Gag/Pol), 6 μ g de vector A (Env) y 12 μ g del plásmido de ARNhc apropiado en las células 293T usando 40 μ l de reactivo de transfección TRANSIT®-293 (MIR 2700, MIRUS BIO LLC, Madison, WI). Tras 16 h, se reemplazaron los medios por DMEM libre de antibióticos recién preparado complementado con FBS al 10%. Tras otras 24 h, se recogió el virus centrifugando durante 5 min a 1.500 g antes de filtrarse a través de un filtro de 0,45 μ m. Para la generación de retrovirus, se sembraron células H29 sobre una placa de 10 cm y se dejaron crecer hasta una confluencia del 90%. Entonces se transfectaron diez microgramos del plásmido apropiado en las células H29 usando 60 μ l de reactivo de transfección LIPOFECTAMINE™ 2000 (11668-019, INVITROGEN por LIFE TECHNOLOGIES, Carlsbad, CA). Tras 16 h, se reemplazaron los medios por DMEM libre de antibióticos recién preparado complementado con FBS al 10%. Tras otras 48 h, se recogió el virus centrifugando durante 5 min a 1.500 g y se filtró a través de un filtro de 0,45 μ m. Se usaron dos mililitros del virus apropiado para transducir 50 K células cancerosas en presencia de 10 μ g/ml de polibreno (TR-1003-G, MILLIPORE, Billerica, A). Tras 24 h, se cambiaron los medios a DMEM complementado con FBS al 10% y puomicina 2 μ g/ml (lentivirus) o blastidina 10 μ g/ml para la selección. Tras otras 72 h, se lavaron las células y se dejaron crecer en D10F y se sometieron a prueba para determinar el silenciamiento del gen de interés mediante qPCR.

35 *Reclutamiento endotelial*

Se sembraron células cancerosas (25.000) en placas de 24 pocillos aproximadamente 24 h antes del comienzo del ensayo de reclutamiento. Se privaron de suero células HUVEC en medios EGM-2 complementados con FBS al 0,2% durante 24 horas. Entonces se marcaron las células HUVEC con colorante CELLTRACKER Red CMTPX (C34552, INVITROGEN) durante 45 min y se rescataron en medios EGM-2 complementados con FBS al 2% durante 30 min. Mientras, se lavaron las células cancerosas con PBS y 1 ml de FBS al 0,2% y se añadieron medios EGM-2 a cada pocillo. Se equipó cada pocillo con un inserto HTS FLUROBLOCK de 3,0 μ m (351151, BD FALCON, San Jose, CA). Para los experimentos con anticuerpos, se añadió entonces la concentración apropiada de cada anticuerpo a cada pocillo: anticuerpo anti-IGFBP2 50 ng/ml (AF674, R&D SYSTEMS, Minneapolis, MN), anticuerpo anti-IGF-1 20 μ g/ml (AF-291-NA, R&D SYSTEMS), anticuerpo anti-IGF-2 40 μ g/ml (MAB292, R&D SYSTEMS), anticuerpo anti-IGF1R 20 μ g/ml (MAB391, R&D SYSTEMS), anticuerpo anti-IGF2R 5 μ g/ml (AF2447, R&D SYSTEMS) y anticuerpo anti-IgG (AB-108-C, R&D SYSTEMS). Para los ensayos de reclutamiento endotelial que requieren pre-incubación con anticuerpos, se incubaron entonces o bien células HUVEC o bien células cancerosas con anticuerpo anti-IGF1R 20 μ g/ml o anticuerpo contra IgG de control durante 1 h y se lavaron una vez PBS. Entonces se privaron de suero las células HUVEC durante 1 h antes de resuspenderse en EGM-2 con FBS al 0,2% en 100 K HUVEC por ml. Entonces se añadió la resuspensión (0,5 ml) a cada inserto FLUROBLOCK y se dejó que el ensayo de reclutamiento continuara durante 16 h. Tras la finalización del ensayo, se fijaron las piezas de inserción FLUROBLOCK con paraformaldehído al 4% durante 15 min y se montaron en portaobjetos con medios de montaje VECTASHIELD (H-1000, VECTOR LABORATORIES, Burlingame, CA). Se tomaron tres imágenes de cada inserto y se analizaron las imágenes usando IMAGEJ (NIH).

55 *Ensayo de quimiotaxia*

Se dejó que Matrigel (250 μ l, BD BIOSCIENCES, n.º 356231) que contenía cantidades dadas de albúmina sérica bovina (A2153, Sigma Aldrich), rhIGFBP2 (674-B2, R&D SYSTEMS), rhGas6 (885-GS, R&D SYSTEMS), anticuerpo anti-IGF1R (MAB391, R&D SYSTEMS) y MerFc (891-MR-100, R&D SYSTEMS) solidificara en el fondo de una placa de 24 pocillos durante 30 min antes de que se añadieran 250 μ l de medios HUVEC que contenían FBS al 0,2%. Entonces se colocó un inserto HTS Fluroblock de 3,0 μ m (351151, BD Falcon) en cada pocillo. Se marcaron las células HUVEC con colorante CellTracker Red CMTPX (C34552, Invitrogen) antes de resuspender 300 K HUVEC por ml de EGM-2 con FBS al 0,2%. Entonces se añadieron 0,5 ml de la resuspensión a cada inserto Fluoroblock y se dejó que el ensayo continuara durante 20 h. Entonces se fijaron las piezas de inserción durante 15 min en

paraformaldehído al 4% y se montaron en portaobjetos con medios de montaje VectaShield (H-1000, Vector Laboratories). Entonces se tomaron imágenes de 5 campos del lado basal de cada inserto y se analizaron las imágenes usando ImageJ (NIH).

5 *Ensayo de migración*

Se hicieron crecer células HUVEC hasta una confluencia del 90% y de estimularon en las concentraciones dadas de albúmina sérica bovina (Sigma Aldrich, n.º A2153), rhIGFBP2 (674-B2, R&D SYSTEMS) y anticuerpo anti-IGF1R (MAB391, R&D SYSTEMS) en medios HUVEC que contenían FBS al 0,2% durante 40 min a 37°C. Entonces se sometieron las células a tripsinización y se añadieron y 50 K células a piezas de inserción HTS Fluroblock (351151, BD Falcon). Tras 24 horas a 37°C con el 5% de CO₂, se retiraron las piezas de inserción, se escindió la membrana y se fijó en paraformaldehído al 4%. Se visualizaron las células HUVEC que habían migrado al lado basal de la membrana con DAPI y se contaron en 5 campos por membrana usando Image J (NIH).

15 *Adhesión endotelial*

Se sembraron células HUVEC en una placa de 6 cm y se dejaron crecer hasta la confluencia. Se privaron de suero células cancerosas en medios DMEM complementados con FBS al 0,2% durante 30 min, se marcaron con colorante CELLTRACKER Green CMFDA (C7025, Invitrogen) durante 45 min y se incubaron en medios DMEM complementados con FBS al 10% durante 30 min. Entonces se sometieron las células cancerosas a tripsinización y se resuspendieron en FBS al 10%/DMEM hasta 10 K células/ml. Entonces se añadieron cinco mililitros de la resuspensión a cada placa de HUVEC y se incubó la placa a 37°C durante 10 min. Entonces se lavaron las placas suavemente con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 min. Entonces se trató cada placa con 1 ml de PBS y se tomaron 6 imágenes de cada placa. Entonces se cuantificó el número de células cancerosas adherentes a las células HUVEC usando IMAGEJ.

Proliferación endotelial

Se sembraron células cancerosas (1x10⁶) en una placa de 10 cm y se dejaron crecer durante 24 h. Entonces se lavaron suavemente las células cancerosas con PBS y se añadieron medios EGM-2 complementados con FBS al 2% a cada placa. Se recogieron los medios EGM-2 acondicionados tras 24 h. Se sembraron células HUVEC (25 K) por triplicado en una placa de 6 pocillos y se dejaron crecer durante 16 h. Entonces se lavaron suavemente las células HUVEC con PBS y se añadieron 3 ml de medios EGM-2 acondicionados a cada pocillo. Tras 48 h, se reemplazaron los medios acondicionados por otros 3 ml de medios acondicionados. Tras otras 48 h, se sometieron las células a tripsinización y se contaron usando un hemocitómetro.

Ensayo de formación de tubos

Se realizó un ensayo de formación de tubos según el protocolo del fabricante (354149, BD BIOCOAT™ ANGIOGENESIS SYSTEM - Endothelial Cell Tube Formation). Brevemente, se privaron de suero células HUVEC en Medios EGM-2 complementados con FBS al 0,2% durante 24 horas. Entonces se marcaron las células HUVEC con colorante CELLTRACKER Red CMTPX (C34552, INVITROGEN) durante 45 min y se trataron posteriormente en medios EGM-2 complementados con FBS al 2% durante 30 min. Mientras, se incubó la placa de ensayo de formación de tubos, que estaba en un formato de 96 pocillos, a 37°C durante 30 min. Se sometieron las células cancerosas y las células HUVEC a tripsinización y se resuspendieron a 400 K/ml y 800 K/ml, respectivamente en medios EGM-2 complementados con FBS al 2%. Entonces se mezclaron las suspensiones de células cancerosas y células HUVEC a una razón 1:1 y se sembraron 50 µl de cada mezcla en cada pocillo de la placa de ensayo de formación de tubos. Se incubó la placa de ensayo a 37°C durante 16 h. Se tomaron imágenes de cada pocillo y se procesaron las imágenes usando el software de análisis METAMORPH (MOLECULAR DEVICES, Inc.) para obtener el número de puntos de ramificación por imagen.

Análisis de expresión de miARN y expresión de ARNm

Se extrajo el ARN total de diversas líneas celulares usando el kit MIRVANA (AM1560, APPLIED BIOSYSTEMS, Austin, TX). Se usó el ensayo de microARN TAQMAN (4427975-0002228, APPLIED BIOSYSTEMS) para cuantificar los niveles de expresión de miARN maduro tal como se describe en Tavazoie, S. F. *et al.*, Nature 451 (7175), 147 (2008). Para la cuantificación del ARNm, se sometieron a transcripción inversa 400 ng del ARN total usando el kit de de síntesis de primera cadena de ADNc (18080-051, INVITROGEN). Entonces se mezclaron aproximadamente 4 ng del ADNc resultante con el reactivo SYBR green PCR MASTER MIX (4309155, APPLIED BIOSYSTEMS) y cebadores apropiados (tabla 1). Se obtuvieron datos de expresión de ARNm cuantitativos usando un sistema de PCR en tiempo real ABI PRISM 7900HT (APPLIED BIOSYSTEMS). Se usó Smad4 como control endógeno para normalización. Se realizó análisis de expresión de cánceres de mama humanos en diversos estadios de enfermedad usando los paneles 2 y 3 de cáncer de mama en serie mediante qPCR ISSUESCAN (BCRT102 & BCRT103, ORIGENE, Rockville, MD).

65

Tabla 1. Cebadores de qPCR con SYBR green

Gen	Directo	Inverso
ABCB9	GACCTTCACCTACCGCACTC	CACAGGAGCTCTTCCCCTG
BEX2	GCCCCGAAAGTAGGAAGC	CTCCATTACTCCTGGGCCTAT
BGLAP	GGCGCTACCTGTATCAATGG	TCAGCCAACTCGTCACAGTC
CA12	CCAAGGCTACAATCTGTCTGC	GGGCAGGTTTCAGCTTCACT
GDF15	CCGGATACTCACGCCAGA	AGAGATACGCAGGTGCAGGT
GEM	GACAGCATGGACAGCGACT	AACCATCAGGGTTCGTTTCAT
IGFBP2	CCAAGAAGCTGCGACCAC	GGGATGTGCAGGGAGTAGAG
ITGB4	TCAGCCTCTCTGGGACCTT	TATCCACACGGACACACTCC
KIAA0746	GTTGTCTGTGCAGATGTACGC	TAGCAGGGCCAGGTTAAAAA
KLF4	GCCGCTCCATTACCAAGA	TCTTCCCCTCTTTGGCTTG
MARS	AACAACCTGGGCAACTTCAT	ACCATCTCAGGCACATAGCC
MERTK	GGAGACAGGACCAAAGC	GGGCAATATCCACCATGAAC
PADI4	AAGTGCAAGCTGACCATCTG	GCCGATCTCCATTTTCATCC
PHGDH	TGGTGGAAAAGCAGAACCTT	AACAATAAGGCCTTCACAGTCC
PITPNC1	GCGCTACTACAAAGAATCTGAGG	GAGCACATGATAGGCTGATGAC
PSAT1	TCTTGTGCGGGAATTGCTA	AAGGGGACAGCACTGAACTG
PYGB	TCCAGGGTCCTGTATCCAAA	CCACGAAGTACTCCTGCTTCA
RGC32	TGCTGATCTTGACAAAACCTTAGC	GCAGGTCCTCGGAACCTTCT
SHMT2	GAGGGAGAAGGACAGGCAGT	CTCGGCTGCAGAAGTTCTCT
SMAD4	TGGCCCAGGATCAGTAGGT	CATCAACACCAATTCCAGCA
THBD	AATTGGGAGCTTGGAATG	TGAGGACCTGATTAAGGCTAGG
TNFSF4	GTATCCTCGAATTCAAAGTATCAAAGT	CTGAGTTGTTCTGCACCTTCA
VIPR1	CTGTCCCCTCATCTTCAAGC	CAGCTGCGGCTTACATTG

Predicción de diana de miR-126

5 Se identificaron posibles dianas de miR-126 usando 3 conjuntos de perfiles de microalineamiento: células LM2 control en relación con células LM2 que sobreexpresan miR-126 (GSE n.º 23905) y 2 alineamientos por duplicado de células MDA y LM2 (GSE n.º 23904 y Minn, A. J. *et al.*, Nature 436 (7050), 518 (2005). Con estos alineamientos, se usaron los siguientes criterios para identificar posibles genes diana de miR-126: (1) Genes regulados por disminución más de 1,6 veces con la sobreexpresión de miR-126 en células LM2 y (2) genes regulados por incremento más de 1,4 veces en uno de los dos alineamientos de LM2 frente a MDA. Posteriormente se verificaron todas las posibles dianas mediante qPCR.

Ensayo de indicador de luciferasa

15 Se realizó en ensayo de indicador de luciferasa tal como se describe en Tavazoie, S. F. *et al.*, Nature 451 (7175), 147 (2008). Brevemente, se clonaron 3'UTR y CDS de longitud completa de ABCB9, IGFBP2, MERTK, PITPNC1, PSAT1, PYGB, SHMT2 y VIPR1 en el vector de indicador de luciferasa dual psiCheck2 (C8021, PROMEGA, Madison, WI). A continuación se enumeran las secuencias de las CDS y las 3'UTR.

CDS de ABCB9

20

ATGCGGCTGTGGAAGGCGGTGGTGGTGACTTTGGCCATCATGAGTGTGGACATCTGCGTGACCAGG
 GCCATCTATGTCTTCAGCCACCTGGACCGCAGCCTCCTGGAGGACATCCGCCACTTCAACATCTTT
 GACTCGGTGCTGGATCTCTGGGCAGCCTGCCTGTACCGCAGCTGCCTGCTGCTGGGAGCCACCATT
 GGTGTGGCCAAGAACAGTGCCTGGGGCCCCGGCGGCTGCGGGCCTCGTGGCTGGTATCACCCCTC
 GTGTGCCTCTTCGTGGGCATCTATGCCATGGTGAAGCTGCTGCTTCTCAGAGGTGCGCAGGCC
 ATCCGGGACCCCTGGTTTTGGGCCCTGTTCGTGTGGACGTACATTTCACTCGGCGCATCCTTCTG
 CTCTGGTGGCTGCTGTCCACCGTGGCGCCAGGCACCCAGGCCCTGGAGCCAGGGGCGGCCACCGAG
 GCTGAGGGCTTCCCTGGGAGCGGCCGGCCACCGCCGAGCAGGCGTCTGGGGCCACGCTGCAGAAG
 CTGCTCTCCTACACCAAGCCCGACGTGGCCTTCTTCGTGGCCGCTCCTTCTTCTCATCGTGGCA
 GCTCTGGGAGAGACCTTCCCTGCCTACTACACGGGCGCGCCATTGATGGCATCGTCATCCAGAAA
 AGCATGGATCAGTTCAGCACGGCTGTGTCATCGTGTGCCTGCTGGCCATTGGCAGCTCATTGGCC
 GCAGGTATTCGGGGCGGCATTTTACCCCTCATATTTGCCAGACTGAACATTGCGCTTCGAAACTGT
 CTCTTCGCTCACTGGTGTCCAGGAGACAAGCTTCTTTGATGAGAACCAGCAGGGGACCTCATC
 TCCCGCTGACCTCGACACCACCATGGTCAGCGACCTGGTCTCCAGAACATCAATGTCTTCTG
 CGAACACAGTCAAGGTACGGGCGTGGTGGTCTTTCATGTTACGCCCTCATATGGCAGCTCTCCTTG
 GTCACCTTCATGGGCTTCCCCATCATATGATGGTGTCCAACATCTACGGCAAGTACTACAAGAGG
 CTCTCCAAAGAGGTCCAGAATGCCCTGGCCAGAGCGACAACACGGCGGAGGAGACCATCAGTGCC
 ATGAAGACTGTCCGGAGCTTCGCCAATGAGGAGGAGGAGGCAGAGGTGTACCTGCGGAAGCTGCAG
 CAGGTGTACAAGCTGAACAGGAAGGAGGAGCTGCCTACATGTACTACGTCTGGGGCAGCGGGCTC
 ACATGCTGGTGGTCCAGGTACAGCATCCTTACTACGGGGCCACCTTGTCACTCAGGCCAGATG
 ACCAGCGGCAACCTCATCGCCTTTCATCATCTACGAGTTTGTCCCTGGGAGATTGTATGGAGTCCGTG
 GGCTCCGTCTACAGTGGCCTGATGCAGGGAGTGGGGGCTGCTGAGAAGGTGTTGAGTTCATCGAC
 CGGCAGCGGACCATGGTGCAGATGGCAGCTTGGCCCCGACCCTGGAGGGCCGGGTGGACTTT
 GAGAATGTGACCTTACCTACCGCACTCGGCCCCACACCCAGGTCTGCAGAATGTCTCCTTCAGC
 CTGTCCCCCGGCAAGGTGACGGCCCTGGTGGGGCCCTCGGGCAGTGGGAAGAGCTCCTGTGTCAAC
 ATCCTGGAGAACTTTCACCCCTGGAGGGGGCCGGGTGCTGCTGGACGGCAAGCCATCAGCGCC
 TACGACCACAAGTACTTGCACCGTGTGATCTCCCTGGTGAGCCAGGAGCCCGTGTGTTCCGCCG
 TCCATCAGGATAACATCTCCTACGGCTGCCACTGTGCTTTTCGAGATGGTGGTGGAGGCCGCA
 CAGAAGGCCAATGCCACGGCTTTCATCATGGAACCTCAGGACGGCTACAGCACAGAGACAGGGGAG
 AAGGGCGCCAGCTGTGAGGTGGCCAGAAGCAGCGGGTGGCCATGGCCCGGGCTCTGGTGCAGAAC
 CCCCCAGTCTCATCTGGATGAAGCCACCAGCGCTTTGGATGCCGAGAGCGAGTATCTGATCCAG
 CAGGCCATCCATGCGCAACCTGCGAAGCACACGGTACTCATCATCGCGCACCCGGCTGAGCACCGTG
 GAGCACGCGCACCTCATTGTGGTGTGGACAAGGGCCGCGTAGTGCAGCAGGGCACCCACCAGCAG
 CTGCTGGCCAGGGCGGCCTTACGCCAAGCTGGTGCAGCGGCAGATGCTGGGGCTTACGCCCGCC
 GCAGACTTCACAGCTGGCCACAACGAGCTGTAGCCAACGGCAGTACAAGGCCTGA

3'UTR de ABCB9

5

TGGGGGGCCCTGCTTCTCCCGGTGGGGCAGAGGACCCGGTGCCTGGCAGATGTGCCACGG
 AGGCCCCAGCTGCCCTCCGAGCCAGGCCGTCAGCACTGAAAGACGACCTGCCATGTCCCATGGA
 TCACCCTTCTGTCATCTTGGCCCTGGTCCCTGCCCATTTCCAGGGCACTCCTTACCCCTGCTGC
 CCTGAGCCAACGCCTTACGGACCTCCTAGCCTCCTAAGCAAAGGTAGAGCTGCCTTTTTAAACC
 TAGGCTTACCAGGGTTTTACTGTTTGGTTTGGAGCACCCAGTCAACTCCTAGATTTCAAAAAC
 CTTTTTCTAATTGGGAGTAATGGCGGGCACTTTCACCAAGATGTTCTAGAAACTTCTGAGCCAGGA
 GTGAATGGCCCTTCTTAGTAGCTTGGGGATGTCCAGAGACTAGGCCTTCTCCCTTTACCCCTCC
 AGAGAAGGGGCTTCCCTGTCCCGGAGGGAGACACGGGAACGGGATTTCCGTCTCTCCCTTTCG
 CAGCTCTGTGAGTCTGGCCAGGGCGGGTAGGGAGCGTGGAGGGCATCTGTCTGCCATCGCCCGCTG
 CCAATCTAAGCCAGTCTCAGTGTGAACCACAGAACTCAACTGGGGGAGTGGGGGCTGGCCAG
 GTCTGGAGGGCCCTCAGGGGTCCCGCCAGCCCGGCACCCAGCGCTTTCGCCCTCGTCCACCCACC
 CCTGGCTGGCAGCTCCTTCCACACCCCGCCCTGTGCTCTGCTGTCTGGAGGCCAGTGGATGT
 TCATGAGATGCATTTCTTCTGCTTTTGGTGGATGGATGGTGGCAAAGCCAGGATCTGGCTTTG
 CCAGAGGTGCAACATGTTGAGAGAACCCGGTCAATAAAGTGTACTACCTTACCCCTAA

CDS de IGFBP2

ATGCTGCCGAGAGTGGGCTGCCCGCGCTGCCGCTGCCGCGCCGCGCTGCTGCCGCTGCTGCTG
 CTGCTACTGGGCGCGAGTGGCGGCGGGCGGGGCGCGCGGAGGTGCTGTTCCGCTGCCCGCCC
 TGCACACCCGAGCGCCTGGCCGCTGCGGGCCCCGCGGTTGCGCCGCCCGCGGTTGGCCGCA
 GTGGCCGAGGCGCCGATGCCATGCGCGGAGCTGCTCCGGGAGCCGGGCTGCGGCTGCTGCTCG
 GTGTGCGCCCGGCTGGAGGGCGAGGCGTGCAGCGCTTACACCCCGCTGCGGCCAGGGGCTGCGC
 TGCTATCCCCACCCGGGCTCCGAGCTGCCCTGCAGGCGCTGGTATGGGCGAGGGCACTTGTGAG
 AAGCGCCGGGACGCGAGTATGGCGCCAGCCGAGGAGGTGCGAGACAATGGCGATGACCACTCA
 GAAGGAGGCTGGTGGAGAACCAGTGGACAGCACCATGAACATGTTGGGCGGGGAGGCACTGCT
 GGCCGGAAGCCCTCAAGTCGGGTATGAAGGAGCTGGCCGTGTTCCGGGAGAAGGTCACTGAGCAG
 CACCGGCAGATGGGCAAGGGTGGCAAGCATCACCTTGGCCTGGAGGAGCCCAAGAAGTGCAGCCA
 CCCCCGCCAGGACTCCTGCCAACAGGAAGTGGACCAGGTCTGGAGCGGATCTCCACCATGCGC
 CTTCGGATGAGCGGGGCCCTTGGAGCAGCTTACTCCTGCACATCCCCAAGTGTGACAAAGCAT
 GGCCTGTACAACCTCAAACAGTGAAGATGCTCTGAACGGGACGCGTGGGGAGTGTGGTGTGTG
 AACCCCAACACCGGAAGTGTATCCAGGGAGCCCCACCATCCGGGGGACCCCGAGTGTGATCTC
 TTCTACAATGAGCAGCAGGAGGCTCGCGGGGTGCACACCCAGCGGATGCAGTAG

10

3'UTR de IGFBP2

ACCGCAGCCAGCCGGTGCCTGGCGCCCCCTGCCCCCCGCCCTCTCCAAACACCCGGCAGAAAAACGGA
 GAGTGTCTGGGTGGTGGGTGCTGGAGGATTTCCAGTCTGACACACGTATTTATATTTGGAAAGA
 GACCAGCACCGAGCTCGGCACCTCCCCGGCCTCTCTCTCCAGCTGCAGATGCCACACCTGCTCC
 TTCTTGTCTTCCCCGGGGGAGGAAGGGGTTGTGGTCCGGGAGCTGGGGTACAGGTTTGGGGAGGG
 GGAAGAGAAATTTTATTTTTGAACCCCTGTGTCCCTTTTGCATAAGATTAAGGAAGGAAAAGTA
 A

5

CDS de MERTK

ATGGGGCCGGCCCCGCTGCCGCTGCTGCTGGGCTCTTCCCTCCCCGCGCTCTGGCGTAGAGCTATC
 ACTGAGCAAGGGAAGAAGCCAAAGCCTTACCCGCTATCCCCGGGACCTTTTCCAGGGAGCCTGCAA
 ACTGACCACACACCCGCTGTTATCCCTTCCCTCACGCCAGTGGGTACCAGCCTGCCTTGATGTTTTCA
 CCAACCAGCCTGGAAGACCACATACAGGAAACGTAGCCATTTCCAGGTGACCTCTGTCTGAATCA
 AAGCCCTACCGCCTTGGCCTTCAAACACACAGTTGGACACATAATACTTTCTGAACATAAAGGT
 GTCAAATTTAATTGCTCAATCAGTGTACCTAATATATAACCAGGACACCACAATTTCTTGGTGGAAA
 GATGGGAAGGAATTGCTTGGGACACATCATGCAATTACACAGTTTTATCCAGATGATGAAGTTACA
 GCAATAATCGCTTCCCTCAGCATAACCAGTGTGCAGCGTTTACAGCAATGGGTTCGTATATCTGTAAG
 ATGAAAATAAACAATGAAGAGATCGTGTCTGATCCCATCTACATCGAAGTACAAGGACTTCCTCAC
 TTTACTAAGCAGCCTGAGAGCATGAATGTCACCAGAAACACAGCCTTCAACCTCACCTGTCAAGCT
 GTGGGCCCGCCTGAGCCCGTCAACATTTTCTGGGTTCAAACAGTAGCCGTGTTAACGAACAGCCT
 GAAAAATCCCCCTCCGTGCTAACTGTTCCAGGCCTGACGGAGATGGCGGTCTTCAGTTGTGAGGCC
 CACAATGACAAAGGGCTGACCGTGTCCAAGGGAGTGCAGATCAACATCAAAGCAATTTCCCTCCCCA
 CCAACTGAAGTCAGCATCCGTAACAGCACTGCACACAGCATTCTGATCTCCTGGGTTCCCTGGTTTT
 GATGGATACTCCCGTTTCCAGGAATTGCAGCATTTCAGGTCAAGGAAGCTGATCCGCTGAGTAATGGC
 TCAGTCATGATTTTTAACACCTCTGCCTTACCACATCTGTACCAAAATCAAGCAGCTGCAAGCCCTG
 GCTAATTACAGCATTTGGTGTTCCTGTCATGAATGAAATAGGCTGGTCTGCAGTGCAGCCCTGGATT
 CTAGCCAGCAGACTGAAGGAGCCCCATCAGTAGCACCTTTAAATGTCACCTGTGTTTTCTGAATGAA
 TCTAGTGATAATGTGGACATCAGATGGATGAAGCCTCCGACTAAGCAGCAGGATGGAGAAGTGGTG
 GGCTACCGGATATCCACGTGTGGCAGAGTGCAGGGATTTCCAAGAGCTCTTGGAGGAAGTTGGC
 CAGAATGGCAGCCGAGCTCGGATCTCTGTTCAAGTCCACAATGCTACGTGCACAGTGAGGATTGCA
 GCCGTACCAGAGGGGGAGTTGGGCCCTTCAGTGTCCAGTGAATAATTTATCCCTGCACACGGT
 TGGGTAGATTATGCCCCCTCTCAACTCCGGCGCCTGGCAACGCAGATCCTGTGCTCATCATCTTT
 GGCTGCTTTTGTGGATTTATTTTGTATTGGGTTGATTTTATACATCTCCTTGGCCATCAGAAAAAGA
 GTCCAGGAGACAAAAGTTTGGGAATGCATTCACAGAGGAGGATTTGAATTAGTGGTGAATTATATA
 GCAAAGAAATCCTTCTGTCCGGCAGCCATTGAACTTACCTTACATAGCTTGGGAGTCAGTGAGGAA
 CTACAAAAATAACTAGAAGATGTGTGATTGACAGGAATCTTCTAATTCTTGGAAAAATTTCTGGGT
 GAAGGAGAGTTTGGGTCTGTAATGGAAGGAAATCTTAAGCAGGAAGATGGGACCTCTCTGAAAGTG
 GCAGTGAAGACCATGAAGTTGGACAACCTTTCACAGCGGGAGATCGAGGAGTTTCTCAGTGAGGCA
 CGGTGCATGAAAGACTTCAGCCACCCAAATGTCATTTCGACTTCTAGGTGTGTGTATAGAAATGAGC
 TCTCAAGGCATCCCAAAGCCCATGGTAATTTTACCCTTCATGAAATACGGGGACCTGCATACTTAC
 TTACTTTATTCCCGATTGGAGACAGGACCAAAGCATAATTCCTCTGCAGACACTATTGAAGTTTCATG
 GTGGATATTGCCCTGGGAATGGAGTATCTGAGCAACAGGAATTTTCTTCATCGAGATTTAGCTGCT
 CGAAACTGCATGTTGCGAGATGACATGACTGTCTGTGTTGCGGACTTCGGCCTCTCTAAGAAGATT
 TACAGTGGCGATTATACCGCCAAGGCCGATTGCTAAGATGCCGTGTTAAATGGATCGCCATAGAA
 AGCTTTCAGACAGCCGATCTACACAAGTAAAGTGATGTGTGGGCATTTGGCGTGACCATGTGGGAA
 ATAGCTACGCGGGGAATGACTCCCTATCCTGGGGTCCAGAACCATGAGATGTATGACTATCTTCTC
 CATGGCCACAGGTTGAAGCAGCCGAAGACTGCCTGGATGAACTGTATGAAATAATGTACTCTTGC
 TGGAGAACCAGATCCCTTAGACCGCCCCACCTTTTTCAGTATTGAGGCTGCAGCTAGAAAAACTCTTA
 GAAAGTTTGCTGACGTTCCGGAACCAAGCAGACGTTATTTACGTCAATACACAGTTGCTGGAGAGC
 TCTGAGGGCCTGGCCAGGGCTCCACCCTTGTCCACTGGACTGAAACATCGACCCTGACTCTATA
 ATTGCCCTCTGCACCTCCCCGGCCTGCCATCAGTGTGGTTCACAGCAGAAAGTTTCATGACAGCAAACCT
 CATGAAGGACGGTACATCTGAAATGGGGCAGTGAGGAATGGGAAGATCTGACTTCTGCCCCCTCT
 GCTGCAGTCACAGCTGAAAAGAACAGTGTTTTACCAGGGGAGAGACTTGTTAGGAATGGGGTCTCC
 TGGTCCCATTTCAGCATGCTGCCCTTGGGAAGCTCATTGCCCGATGAACTTTTGTGTTGCTGACGAC
 TCCTCAGAAGGCTCAGAAGTCTGATGTGA

10

3'UTR de MERTK

GGAGAGGTGCGGGGAGACATTCCAAAAATCAAGCCAATTTCTTCTGCTGTAGGAGAATCCAATTGTA
 CCTGATGTTTTTGGTATTTGCTTCCCTTACCAAGTGAACCTCCATGGCCCCAAAGCACCAGATGAAT
 GTTGTAAAGTAAGCTGTTCATTAATAAATAACATAATATAATTTATTTAAAGAGAAAAAATATGTGTA
 TATCATGGAAAAAGACAAGGATATTTTAAATAAAACATTACTTATTTCAATTTCACTTATCTTGATA
 TCTTAAATAAAGCTTTCAGCTGCTCCTTGATATTAACATTTGTACAGAGTTGAAGTTGTTTTTCA
 AGTTCCTTTCTTTTTCATGACTATTAATGTAATAAATAATTTGTAATAAATGAAATGCCATATTTGACT
 TGGCTTCTGGTCTTGATGATTTGATAAGAATGATTCATTCAATGTTTAAAGTTGTATAACTGATT
 AATTTTCTGATATGGCTTCCATAAATAAATGAATAAGGAAG

CDS de isoforma A de PITPNC1

ATGCTGCTGA AAGAGTACCG GATCTGCATG CCGCTCACCG TAGACGAGTA CAAAATTGGA
 CAGCTGTACA TGATCAGCAA ACACAGCCAT GAACAGAGTG ACCGGGGAGA AGGGGTGGAG
 GTCGTCCAGA ATGAGCCCTT TGAGGACCTT CACCATGGCA ATGGGCAGTT CACCGAGAAG
 CGGGTGTATC TCAACAGCAA ACTGCCTAGT TGGGCTAGAG CTGTTGTCCC CAAAATATTT
 TATGTGACAG AGAAGGCTTG GAACTATTAT CCCTACACAA TTACAGAATA CACATGTTCC
 TTTCTGCCGA AATTCTCCAT TCATATAGAA ACCAAGTATG AGGACAACAA AGGAAGCAAT
 GACACCATT TCGACAATGA AGCCAAAAGAC GTGGAGAGAG AAGTTTGCTT TATTGATATT
 GCCTGCGATG AATTTCAGG GCGCTACTAC AAAGAATCTG AGGATCCTAA GCACTTCAAG
 TCAGAGAAGA CAGGACGGGG ACAGTTGAGG GAAGGCTGGA GAGATAGTCA TCAGCCTATC
 ATGTGCTCCT ACAAGCTGGT GACTGTGAAG TTTGAGGCTT GGGGGCTTCA GACCAGAGTG
 GAACAATTTG TACACAAGGT GGTCCGAGAC ATTCTGCTGA TTGGACATAG ACAGGCTTTT
 GCATGGGTTG ATGAGTGGTA TGACATGACA ATGGATGAAG TCCGAGAATT TGAACGAGCC
 ACTCAGGAAG CCACCAACAA GAAAATCGGC ATTTTCCCAC CTGCAATTTT TATCTCCAGC
 ATCCCCCTGC TGCCTTCTTC CGTCCGCGAGT GCGCCTTCTA GTGCTCCATC CACCCCTCTC
 TCCACAGACG CACCCGAATT TCTGTCCGTT CCCAAAGATC GGCCCCGGAA AAAGTCTGCC
 CCAGAAACTC TCACACTTCC AGACCCTGAG AAAAAAGCCA CCTGAATTT ACCCGGCATG
 CACTCTTCAG ATAAGCCATG TCGGCCAAA TCTGAGTAA

5

CDS de isoforma B de PITPNC1

ATGCTGCTGAAAGAGTACCGGATCTGCATGCCGCTCACCGTAGACGAGTACAAAATTGGACAGCTG
 TACATGATCAGCAAAACACAGCCATGAACAGAGTGACCGGGGAGAAAGGGTGGAGGTCGTCCAGAA
 GAGCCCTTTGAGGACCTCACCATGGCAATGGGCAGTTACCGAGAAGCGGGTGTATCTCAACAGC
 AAAGTGCCTAGTTGGGCTAGAGCTGTTGTCCCAAAATATTTTATGTGACAGAGAAGGCTTGGAAC
 TATTATCCCTACACAATTACAGAATACACATGTTCTTTCTGCCGAAATTTCTCCATTCATATAGAA
 ACCAAGTATGAGGACAACAAAGGAAGCAATGACACCAATTTTCGACAATGAAGCCAAAGACGTTGGAG
 AGAGAAGTTTGCTTTATTGATATGCTGCGATGAAATTTCCAGAGCGCTACTACAAAGAATCTGAG
 GATCTAAGCACTTCAAGTACAGAGAAGACAGGACGGGACAGTTGAGGGAAGGCTGGAGAGATAGT
 CATCAGCCTATCATGTGCTCCTACAAGCTGGTGACTGTGAAGTTTGGAGTCTGGGGGCTTCAGACC
 AGAGTGAACAATTTGTACACAAGGTGGTCCGAGACATTTCTGTGATTGGACATAGACAGGCTTTT
 GCATGGGTTGATGAGTGGTATGATATGACAATGGATGATGTTCCGGGAATACGAGAAAAACATGCAT
 GAACAACAACATAAAAAGTTTGAATCAGCATTTCTCCCTGTGGATGACATAGAGAGTCATGCC
 CAAACAAGTACATGA

10 3'UTR de PITPNC1

CAATGGATGAAGTCCGAGAATTTGAACGAGCCACTCAGGAAGCCACCAACAAGAAAATCGGCATTT
 TCCCACCTGCAATTTCTATCTCCAGCATCCCCCTGCTGCCTTCTCCGATCCGACAGTCCGCTTCTA
 GTGCTCCATCCACCCTCTCTCCACAGACGCCACCCGAATTTCTGTCCGTTCCCAAAGATCGGCCCC
 GGAAAAAGTCTGCCCCAGAACTCTCACACTTCCAGACCCTGAGAAAAAAGCCACCCTGAATTTAC
 CCGGCATGCACCTTCAGATAAGCCATGTCGGCCCAATCTGAGTAACTTTATATAAATATCTCAT
 GGGGTTTTATATTTTCATTTGTTGTTGTTGTTTTTTTTAAGAATCTTCTGATAGAGAAAAAGACT
 GCTTTGTCACTCAAACATGTTCTTCGACCTTTCAGTGTGCATGTGACTCAGTAACTTCACATAGA
 ATATGATTCCTAAGTATGCTACACAGCATCATATTAGATGTAAGATGTAAGACTTGCAAAGGACA
 GAAGGAATCTTCTGTAACCACATAGCTGTATGCCAGAGAGGAAGCCTTGTTATTGGGCATTTGATG
 AGGTTTGGCATGGACTTCAAGGATAAATGAATGAAAACCTTTCACCACCTTTTGTACAAGGTACGG
 TAGAAAAATAGTGAAGTCAGTTTCTCTCATCAAAATCTAAAATCTCCAAAATACTCTCAGGCATAA
 CATACTAGCTGTTAAATTTTGAAGTCTAATTAATACTTGAATACCAATAGTTACTGAGATT
 CCTATTTGTGGTTAGTCTGACTCAGGATTTGGAGCCTAATTAATACTTAACTTAACTTTTGAATAATTA
 ATCATCAAGCTATAGAGGCTCCAAGTGCAATTAATAATAACTCATTATACCTTCCACAGAATTTA
 AATAAGATTCTACTTGTCTTCTGCTTTTTAA

15 CDS de PSAT1

ATGGACGCCCCAGGCAGGTGGTCAACTTTGGGCCTGGTCCCGCCAAGCTGCCGCACTCAGTGTTG
 TTAGAGATACAAAAGGAATTTAGACTACAAAGGAGTTGGCATTAGTGTTCTTGAAATGAGTCAC
 AGGTCATCAGATTTTGCCAAGATTATTAACAATACAGAGAATCTTGTGCGGGAATTGCTAGCTGTT
 CCAGACAACATAAAGGTGATTTTTCTGCAAGGAGGTGGGTGCGGCCAGTTTCACTGCTGTCCCTTA
 AACCTCATTTGGCTTGAAAGCAGGAAGGTGTGCTGACTATGTGGTGACAGGAGCTTGGTCAAGTAA
 GCCGCAGAAGAAGCAAGAAGTTTGGGACTATAAATATCGTTTACCCTAACTTGGGAGTTATACA
 AAAATCCAGATCCAAGCACCTGGAACCTCAACCCAGATGCCTCCTACGTGTATTATTGCGCAAA
 GAGACGGTGCATGGTGTGGAGTTTACTTTATACCCGATGTCAAGGGAGCAGTACTGTTTGTGAC

ATGTCCTCAAACCTCTGTCCAAGCCAGTGGATGTTTCCAAGTTTGGTGTGATTTTTGCTGGTGCC
 CAGAAGAATGTTGGCTCTGCTGGGGTCACCGTGGTGATGTCCGTGATGACCTGCTGGGGTTTGCC
 CTCCGAGAGTGCCTCTCGGTCCTGGAATACAAGGTGCAGGCTGGAAACAGCTCCTTGTACAAACAG
 CCTCCATGTTTCAGCATCTACGTCATGGGCTTGGTCTCGGAGTGGATTAACAAACAAATGGAGGTGCC
 GCGGCCATGGAGAAGCTTAGCTCCATCAAATCTCAAACAATTTATGAGATTATGATAATTTCTCAA
 GGATTCACGTTTTGTCCAGTGGAGCCCCAAAATAGAAGCAAGATGAATATTCATTCCCGATTGGC
 AATGCCAAAGGAGATGATGCTTTAGAAAAAAGATTTCTTGATAAAGCTCTTGAACCTCAATATGTTG
 TCCTTGAAGGGCATAGGTCGTGGGAGGCATCCGGGCTCTCTGTATAATGTGTCACAATTGAA
 GACGTTACAGAAGCTGGCCGCTTCATGAAAAAATTTTGGAGATGCATCAGCTATGA

3'UTR de PSAT1

ACACATCCTAACCCAGGATATACTCTGTTCTTGAACAACATACAAAGTTTAAAGTAACTTGGGGATG
 GCTACAAAAAGTTAACACAGTATTTTTCTCAAATGAACATGTTTATTCAGATTCTTCTTTTTTGA
 AAGAACAACAGCAAAACATCCACAACCTGTAAAGCTGGTGGGACCTAATGTCACCTTAATTTCTGA
 CTTGAACCTGGAAGCATTTTAAGAAATCTTGTGCTTTTCTAACAAATCCCGGATTTTTGCTTTT
 GCTGCTACTTTTTCTAGTTAGATTTCAAACCTTGCCTGTGGACTTAATAATGCAAGTTGCGATTAAT
 TATTTCTGGAGTCATGGGAACACACAGCACAGAGGGTAGGGGGCCCTCTAGGTGCTGAATCTACA
 CAICTGTGGGGTCTCCTGGGTTGAGCGGCTGTTGATTCAAGGTCAACATTGACCATTTGGAGGAGTG
 GTTTTAAGAGTGCCAGGCGAAGGGCAAACGTAGATCGATCTTTATGCTGTTATTACAGGAGAAGTG
 ACATACTTTATATATGTTTATATAGCAAGGCTGTTTTTAATACCATATACTTTATATTTCTATA
 CATTATATTTCTAATAAATACAGTTATCACTGATATATGTAGACACTTTTAGAATTTATTAATCC
 TTGACCTTGTGCATTATAGCATTCCATTAGCAAGAGTTGTACCCCTCCCCAGTCTTCGCCTTCT
 CTTTTAAGCTGTTTTATGAAAAAGACCTAGAAGTCTTGATTCAATTTTTACCATTCTTTCCATAG
 GTAGAAGAGAAAAGTTGATTGGTTGGTTGTTTTCAATATGCCATTAACCTAAACATTCTGTTAA
 ATTACCCATCCTTTGTTCTCTACTGTTTTCTTTGTAATGTATGACTACGAGAGTGATACTTTGCT
 GAAAAGTCTTTCCCTATTTGTTATCTATTTGTCAGTATTTTATGTTGAATAITGTAAGAACATTA
 AGTCCATAAACATCTAA

5

CDS de PYGB

ATGGCGAAGCCGCTGACGGACAGCGAGAAGCGGAAGCAGATCAGCGTGCAGCGCCTGGCGGGGCTA
 GGCGACGTGGCCGAGGTGCGGAAGAGCTTCAACCCGGCACTTGCACTTCACGCTGGTCAAGGACCGC
 AATGTGGCCACGCCCGCGACTACTTCTTCGCGCTGGCGCACACGGTGCAGGACACCTCGTGGGC
 CGCTGGATCCGCACGCAGCAGCACTACTACGAGCGGACCCCAAGCGCATTATATCTTTCCCTG
 GAATTCACATGGTGCACGCTGCAGAACACGATGGTGAACCTGGGCCTTCAGAATGCCGCGAT
 GAAGCCATCTATCAGTTGGGGTTAGACTTGGAGGAACTCGAGGAGATAGAAGAAGATGCTGGCCTT
 GGAATGGAGGCCCTGGGAGGCTGGCAGCGTGTTCCTTGACTCAATGGCTACCTTGGGCCTGGCA
 GCATACGGCTATGGAATCCGCTATGAATTTGGGATTTTTAACCAGAAAGATTGCAATGGCTGGCAG
 GTAGAGGAGGCCGATGACTGGCTGCGCTACGGCAACCCCTGGGAGAAAGCGCGGCCTGAGTATATG
 CTTCCTGTCACCTTCTACGGACGCGTGGAGCACACCCCGGACGGCGTGAAGTGGCTGGACACACAG
 GTGGTGTGGCCATGCCCTACGACACCCCAAGTGCCTGGCTACAAGAACAACACCGTCAACACCATG
 CGGCTGTGGTCCGCAAGGCTCCCAACGACTTCAAGCTGCAGGACTTCAACGTGGGAGACTACATC
 GAGGCGGTCTGGACCGGAACCTGGCTGAGAACATCTCCAGGGTCTGTATCCAAATGATAACTTC
 TTTGAGGGGAAGGAGCTGCGGCTGAAGCAGGAGTACTTCGTGGTGGCCGCCACGCTCCAGGACATC
 ATCCGCGCTTCAAGTCGTCCAAGTTCCGGCTGCCGGACCCTGTGAGAACCTGTTTCGAGACGTTT
 CCAGACAAGGTGGCCATCCAGCTGAACGACACCCACCCCGCCCTCTCCATCCCTGAGCTCATGCGG
 ATCCTGGTGGACGTGGAGAAGGTGGACTGGGACAAGGCTGGGAAATCACGAAGAAGACCTGTGCA
 TACCAACACACTGTGCTGCTGAGGCTTGGAGCGCTGGCCGCTGTCATGTTTGGAGAAGCTG
 CTGCCGCGCACCTGGAGATAATCTATGCCATCAACCAGCGGCACCTGGACCAGTGGCCGCGCTG
 TTTCCCGCGCATGTGGACCGCTGCGCAGGATGTCTGTGATCGAGGAGGGGGACTGCAAGCGGATC
 AACATGGCCACCTGTGTGTGATTTGGTCCCATGCTGTCAATGGTGTGGCGAGGATCCACTCGGAG
 ATCGTGAAAACAGTCGGTCTTTAAGGATTTTTATGAACTGGAGCCAGAGAAGTTCAGAATAAGACC
 AATGGCATCACCCCGCCGGTGGCTGCTGCTGTGCAACCCGGGGCTGGCCGATACCATCGTGGAG
 AAAATTGGGGAGGAGTTCTGACTGACCTGAGCCAGCTGAAGAAGCTGCTGCCGCTGGTCAGTGAC
 GAGGTGTTTCATCAGGGACGTGGCCAAGGTCAAACAGGAGAACAAGCTCAAGTTCTCGGCCTTCTG
 GAGAAGGAGTACAAGGTGAAGATCAACCCCTCCTCCATGTTTCGATGTGCATGTGAAGAGGATCCAC
 GAGTACAAGCGGACGCTGCTCAACTGCCTGCACGTCGTCACCCTGTACAATCGAATCAAGAGAGAC
 CCGGCCAAGGCTTTTGTGCCAGGACTGTTATGATTTGGGGCAAGGCGAGCGCCGGTTACCACATG
 GCCAAGCTGATCATCAAGTTGGTCACTCCATCGGCGACGTCGTCAATCATGACCCAGTTGTGGT

GACAGGTTGAAAGTGATCTTCTCGGAGAACTACCGTGTGTCCTTGGCTGAGAAAGTGATCCCGGCC
 GCTGATCTGTGCGCAGCAGATCTCCACTGCAGGCACCGAGGCCTCAGGCACAGGCAACATGAAGTTC
 ATGCTCAACGGGGCCCTCACCATCGGCACCATGGACGGCGCCAACGTGGAGATGGCCGAGGAGGCC
 GGGGCCGAGAACCCTTTCATCTTCGGCCTGCGGGTGGAGGATGTCGAGGCCTTGGACCGGAAAGGG
 TACAATGCCAGGGAGTACTACGACCACCTGCCCGAGCTGAAGCAGGCCGTGGACCAGATCAGCAGT
 GGCTTTTTTCTCCAAGGAGCCAGACTGCTTCAAGGACATCGTGAACATGCTGATGCACCATGAC
 AGGTTCAAGGTGTTTGCAGACTATGAAGCCTACATGCAGTGCAGGCACAGGTGGACCAGCTGTAC
 CGGAACCCCAAGGAGTGGACCAAGAAGTTCATCAGGAACATCGCCTGCTCGGGCAAGTTCCTCAGT
 GACCGGACCATCACGGAGTATGCACGGGAGATCTGGGGTGTGGAGCCCTCCGACTGCAGATCCCG
 CCCCCAACATCCCCGGGACTAG

3'UTR de PYGB

GCACACCCTGCCTTGGCGGGACCAGCGGGCATTGTTTTCTTGCTGACTTTGCACCTCCTTTTTTC
 CCCAAACACTTTGGCAGCCACTGGTGGTCCCTGCTTTTTCTGAGTACCATGTTTCCAGGAGGGGCCA
 TGGGGGTCAGGGTGGTTTTGAGAGAGCAGGGTAAGGAAGGAATGTGCTAGAAGTGTCTCCTAGTTTC
 TTGTAAGGAAGCCAGAGTTGACAGTACAAAGGGTCTGGCCAGCCCTGCAGCTTCAGCACCTGCC
 CCACCCAGAGTGGGAGTCAAGTGGAGCCACCTGCTGGGCTCCCCAGAACTTTGCACACATCTTGC
 TATGATATAGCCGATGTCTTTAGTGTGAGCCTCTGGATTCTGGGGTCTGGGCCAGTGGCCATAGT
 GAAGCCTGGGAATGAGTGTACTGCAGCATCTGGGCTGCCAGCCACAGGGAAGGGCCAAGCCCCAT
 GTAGCCCCAGTCACTCTGCCAGCCCTGCCCTCTGGCCATGCCGGGAGGGGICGGATCCTCTAGGC
 ATCGCCTTCACAGCCCCCTGCCCTCTGTCTGGCTCTGCACCTGGTATATGGGTCATGG
 ACCCAGATGGGGCTTTCCCTTTGTAGCCATCCAATGGGCATTGTGTGGGTGCTTGAACCCGGGAT
 GACTGAGGGGGACACTGGAGTGGGTGCTTGTGTCTGTCTCAGAGGCCTTGGTCAGGATGAAGT
 TGGCTGACACAGCTTAGCTTGGTTTTGCTTATCAAAGAGAAAAATAACTACACATGGAATGAAA
 CTAGCTGAAGCCTTTCTTGTTTTAGCAACTGAAAATGTACTTGGTCACTTTTGTGCTTGGAGG
 GCCCATTTCTGCCTGGCAGGGGGCAGGTCTGTGCCCTCCCGTGACTCCGTGCTGTGTCTGAGGT
 GCATTTCTGTTGTACACACAAGGGGCCAGGCTCCATTCTCCCTCCCTTTCCACCAGTGCCACAGCC
 TCGTCTGAAAAAGGACCAGGGGTCCCGGAGGAACCCATTTGTGCTCTGCTTGGACAGCAGGCCTG
 GCACCTGGGAGGTGGGGGTGAGCCCCACAGCCTTGGCCCTCCCAAGGCTGGCAACCTGCCTCCC
 ATTGCCAAAGAGAGAGGGCAGGGAACAGGCTACTGTCTTCCCTGTGGAATTGCCGAGAAATCTAG
 CACCTTGCATGCTGGATCTGGGCTGCGGGGAGGCTCTTTTTCTCCCTGGCCTCCAGTGCCACCAG
 GAGGATCTCGCACGGTGCACAGCCACCAGAGCACTACAGCCTTTTATTGAGTGGGGCAAGTGTCT
 GGGCTGTGGTCTGCCCTGACAGCATCTCCCCAGGCAGCGGCTCTGTGGAGGAGGCCATACTCCC
 CTAGTTGGCCACTGGGGCCACCACCCTGACCACCCTGTGCCCTCATTGTTACTGCCTTGTGAGA
 TAAAAACTGATTAACCTTTGTGGCTGTGGTTGGCTGA

5

CDS de SHMT2

ATGCTGTACTTCTCTTTGTTTTGGGCGGCTCGGCCTCTGCAGAGATGTGGGCAGCTGGTCAGGATG
 GCCATTCGGGCTCAGCACAGCAACGCAGCCAGACTCAGACTGGGGAAGCAAACAGGGGCTGGACA
 GGCCAGGAGAGCCTGTGCGACAGTATCCTGAGATGTGGGAGTTGCTGCAGAGGGAGAAGGACAGG
 CAGTGTGCTGGCCTGGAGCTCATTGCCCTCAGAGAACTTCTGCAGCCGAGCTGCGCTGGAGGCCCTG
 GGGTCTGTCTGAACAACAAGTACTCGGAGGGTTATCCTGGCAAGAGATACTATGGGGGAGCAGAG
 GTGGTGGATGAAATGAGCTGCTGTGCCAGCGCCGGGCTTGGAAAGCCTTTGACCTGGATCTTGCA
 CAGTGGGGAGTCAATGTCCAGCCCTACTCCGGGTCCCAAGCAACCTGGCCGTCTACACAGCCCTT
 CTGCAACCTCACGACCGGATCATGGGGCTGGACCTGCCCCGATGGGGGCCATCTCACCCACGGCTAC
 ATGTCTGACGTCAAGCGGATATCAGCCACGTCCATCTTCTTCGAGTCTATGCCCTATAAGCTCAAC
 CCAAAAAGTGGCCTCATTGACTACAACCAGCTGGCACTGACTGCTCGACTTTTCCGGCCACGGCTC
 ATCATAGCTGGCACCAGCGCTATGCTCGCCTCATTGACTACGCCCGCATGAGAGAGGTGTGTGAT
 GAAGTCAAAGCACACCTGCTGGCAGACATGGCCACATCAGTGGCCTGGTGGCTGCCAAGGTGATT
 CCCTCGCCTTTCAAGCACGGGACATCGTCAACCACCTACTCACAAAGACTCTTCGAGGGGCCAGG
 TCAGGGCTCATCTTCTACCGGAAAGGGGTGAAGGCTGTGGACCCCAAGACTGGCCGGGAGATCCCT
 TACACATTTGAGGACCGAATCAACTTTGCGGTGTTCCCATCCCTGCAGGGGGGCCCCCAATCAT
 GCCATTGCTGCAGTAGCTGTGGCCCTAAAGCAGGCCTGCACCCCATGTTCCGGGAGTACTCCCTG
 CAGGTTCTGAAGAAATGCTCGGGCCATGGCAGATGCCCTGCTAGAGCGAGGCTACTCAC TGGTATCA
 GGTGGTACTGACAACCACCTGGTGTGGTGGACCTGCGGCCAAGGGCCTGGATGGAGCTCGGGCT
 GAGCGGGTGTAGAGCTTGTATCCATCACTGCCAACAAGAACACCTGTCTGGAGACCGAAGTGCC
 ATCACACCGGGCGGCTGCGGCTTGGGGCCCGAGCCTTAACCTTCGACAGTTCGGTGGAGGATGAC
 TTCCGGAGAGTTGTGGACTTTATAGATGAAGGGGTCAACATTGGCTTAGAGGTGAAGAGCAAGACT
 GCCAAGCTCCAGGATTTCAAATCCTTCTGCTTAAGGACTCAGAAACAAGTACAGCTGTGGCCAAC
 CTCAGGCAACGGGTGGAGCAGTTTGGCAGGGCCTTCCCCATGCCTGGTTTTGATGAGCATTGA

10

3'UTR de SHMT2

AGGCACCTGGGAAATGAGGCCACAGACTCAAAGTTACTCTCCTTCCCCCTACCTGGGCCAGTGAA
 ATAGAAAGCCTTTTCTATTTTTTGGTGCAGGAGGGAAGACCTCTCAGTTAGGGCAAGAGCCAGGTAT
 AGTCTCCCTTCCCAGAATTTGTAAGTGAAGATCTTTCTTTTTTCTTTTTTGGTAACAAGACT
 TAGAAGGAGGGCCAGGCACCTTCTGTTTGAACCCCTGTGATGATCACAGTGTGAGAGACGCGTCC
 TCTTTCTTGGGGAAGTTGAGGAGTGCCCTTCAGAGCCAGTAGCAGGCAGGGTGGGTAGGCACCCT
 CCTTCTGTTTTTATCTAATAAAATGCTAACCTGCCCTGAGTTTCCATTACTGTGGGTGGGGTTC
 CCTGGGCCAAACAGTGATTTGTCTCCCTCAATGTGTACACCGCTCCGCTCCCACCACCGTACCAC
 AAGGACCCCGGGGCTGCAGCCTCCTCTTCTGTCTCTGATCAGAGCCGACACCAGACGTGATTAG
 CAGGCGCAGCAAATTCATTTGTAAATGAAATGTAATTTT

CDS de VIPR1

ATGGCCCGCCAAGTCCGCTGCCCGCCCGCTGGCTATGCGTGTGGCAGGCGCCCTCGCCTGGGCC
 CTTGGGCCGGGGCGGCCAGGCGGCCAGGCTGCAGGAGGAGTGTGACTATGTGCAGATGATCGAG
 GTGCAGCACAAGCAGTGCCTGGAGGAGGCCAGCTGGAGAATGAGACAATAGGCTGCAGCAAGATG
 TGGGACAACCTCACCTGCTGGCCAGCCACCCTCGGGGCCAGGTAGTTGTCTTGGCCTGTCCCTC
 ATCTTCAAGCTCTTCTCCTCCATTCAAGGCCGAATGTAAGCCGAGCTGCACCGACGAAGGCTGG
 ACGCACCTGGAGCCTGGCCCGTACCCCATGCTGTGGTTTGGATGACAAGGCAGCGAGTTGGAT
 GAGCAGCAGACCATGTTCTACGGTCTGTGAAGACCCGGCTACACCATTTGGCTACGGCCTGTCCCTC
 GCCACCTTCTGGTCGCCACAGCTATCCTGAGCCTGTTTCAAGGAGCTCCACTGCACGCGGAACCTAC
 ATCCACATGCACCTCTTCATATCCTTTCATCTGAGGGCTGCCGCTGTCTTCATCAAAGACTTGGCC
 CTCTTCGACAGCGGGAGTCCGACAGTGTCTCCGAGGGCTCGGTGGGCTGTAAGGCAGCCATGGTC
 TTTTTCAATATTTGTGTCATGGCTAACTTCTTCTGGTGTGTTGGAGGGCCTTACCTGTACACC
 CTGCTTGGCGTCTCCTTCTTCTGAGCGGAAGTACTTCTGGGGGTACATACTCATCGGCTGGGGG
 GTACCCAGCACATTACCATGGTGTGGACCATCGCCAGGATCCATTTTGGAGTATGGGTGCTGG
 GACACCATCAACTCCTCACGTGGTGGATCATAAAGGGCCCATCCTCACCTCCATCTTGGTAAAC
 TTCATCTGTTTATTTGCATCATCCGAATCCTGCTTCAGAAACTGCGGCCCCAGATATCAGGAAG
 AGTGACAGCAGTCCATACTCAAGGCTAGCCAGGTCCACACTCCTGCTGATCCCCTGTTTGGAGTA
 CACTACATCATGTTCGCCTTCTTCCGGACAATTTTAAAGCCTGAAGTGAAGATGGTCTTTGAGCTC
 GTCGTGGGGTCTTCCAGGGTTTTGTGGTGGCTATCCTCTACTGCTTCTCAATGGTGGGTGACG
 GCGGAGCTGAGCGGAAGTGGCGGCGCTGGCACCTGCAGGGCCTCGGGCTGGAACCCCAAATAC
 CGGCACCCGTGGGGAGCAACGGCCACGTCAGCACGAGTTTCCATGCTGACCCGCGTC
 5 AGCCAGGTGCCCGCCGCTCCTCCAGCTTCCAAGCCGAAGTCTCCCTGGTCTGA

3'UTR de VIPR1

CCACCAGGATCCCAGGGGCCAAGGCGGCCCTCCCGCCCTTCCCACTACCCCGGCAGACGCCG
 GGGACAGAGGCTGCCCGGGCGGCCAGCCCGGCCCTGGGCTCGGAGGCTGCCCGGGCCCT
 GGTCTCTGGTCCGACACTCCTAGAGAACGCAGCCCTAGAGCCTGCCTGGAGCGTTTCTAGCAAGT
 GAGAGAGATGGGAGCTCCTCTCCTGGAGGATGCAAGTGGAACTCAGTCAATTAGACTCCTCCTCCA
 AAGCCCCCTACGCCAATCAAGGGCAAAAAGTCTACATACTTTCATCCTGACTCTGCCCTGCTG
 GCTCTTCTGCCCAATTTGGAGGAAAGCAACCGGTGGATCCTCAAACAACACTGGTGTGACCTGAGGG
 CAGAAAGGTTCTGCCCGGGAAGGTCACCAGCACCAACACCACGGTAGTGCCTGAAATTTACCATT
 GCTGTCAAGTTCCTTTGGGTTAAGCATTACCCTCAGGCATTTGACTGAAGATGCAGCTCACTACC
 CTATTTCTCTTTTACGCTTAGTTATCAGCTTTTTAAAGTGGGTTATTTCTGGAGTTTTTGTGGAG
 AGCACACCTATCTTAGTGGTTCCCAACCGAAGTGGACTGGCCCTGGGTGAGTCTGGTGGGAGGAC
 GGTGCAACCCAAAGGACTGAGGACTCTGAAGCCTCTGGGAAATGAGAAGGCAGCCACCAGCGAATG
 CTAGGTCTCGGACTAAGCCTACCTGCTCTCAAGTCTCAGTGGCTTCATCTGTCAAGTGGGATCTG
 TCACACCAGCCATACTTATCTCTCTGTGCTGTGGAAGCAACAGGAATCAAGAGCTGCCCTCCTTGT
 CCACCACCTATGTCCAACGTGTGTAAC TAGGCTCAGAGATGTGCACCCATGGGCTCTGACAGAA
 AGCAGATACTCACCCTGCTACACATACAGGATTTGAACTCAGATCTGTCTGATAGGAATGTGAAA
 GCACGGACTCTTACTGCTAACTTTTGTGTATCGTAACCAGCCAGATCCTCTTGGTTATTTGTTTAC
 CACTTGTATTATTAATGCCATTATCCCTGAATCCCCCTTGCACCCACCCTCCCTGGAGTGTGGC
 TGAGGAGGCTCCATCTCATGTATCATCTGGATAGGAGCCTGTGGTACAGCCTCCTCTGTCTGC
 CCTTACCCAGTGGCCACTCAGCTTCTACCCACACCTCTGCCAGAAGATCCCCTCAGGACTGCA
 10 ACAGGCTTGTGCAACAATAAATGTTGGCTTGA

Se transfectoron células MDA-MB-231 que expresan o bien una horquilla de control o bien un miR-126 de selección como diana en horquilla con el constructo indicador específico respectivo. Treinta horas tras la transfección, se lisaron las células y se determinó la razón de expresión de luciferasa de *Renilla* con respecto a la de luciérnaga usando un ensayo de luciferasa dual (E1910, PROMEGA). Las secuencias del cebador de clonación se muestran en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2. Cebadores de clonación

Gene	Forward	Reverse
3'UTR de ABCB9	CCGGCCCTCGAGTGGGGGGCCCTGCTTCTC C	CCGGCCGCGCCGCTTAGGGGTAAGAGG TAGTAC

CDS de ABCB9	CCGGCCCTCGAGATGCGGCTGTGGAAGGCGG T	CCGGCCGCGGCCGCTCAGGCCTTGTGAC TGCCGT
3'UTR de IGFBP2	CCGGCCCTCGAGACCGCAGCCAGCCGGTGCC T	CCGGCCGCGGCCGCTTACTTTTCCCTCC TTAAT
CDS de BP2	CCGGCCCTCGAG ATGCTGCCGAGAGTGGGCTG	CCGGCCGCGGCCGCTACTGCATCCGCT GGGTGT
3'UTR de MERTK	CCGGCCCTCGAGGGAGAGGTGCGGGGAGACA T	CCGGCCGCGGCCGCTTCTTATTCATA TTTTAT
CDS de MERTK	CCGGCCCTCGAGATGGGGCCGGCCCGCTGC C	CCGGCCGCGGCCGCTCACATCAGGACTT CTGAGC
3'UTR de PITPNC1	CCGGCCCTCGAG CAATGGATGAAGTCCGAGAA	CCGGCCGCGGCCGCTTAAAAGACAGAAA CAAGTA
CDS de PITPNC1	CCGGCCCTCGAG ATGCTGCTGAAAGAGTACCG	CCGGCCGCGGCCGCTCATGTACTTGT GGGCAT
3'UTR de PSAT1	CCGGCCCTCGAGACACATCCTAACCAGGATA T	CCGGCCGCGGCCGCTTAGATGTTTTAGG ACTTTA
CDS de PSAT1	CCGGCCGCGGCCGCTCATAGCTGATGCATCT CCA	CCGGCCCTCGAGATGGACGCCCCAGGC AGGT
3'UTR de PYGB	CCGGCCCTCGAGGCACACCCTGCTTGGCGG G	CCGGCCGCGGCCGCTCAGCCAACCACAG CCACAA
CDS de PYGB	CCGGCCGTTTTAAACATGGCGAAGCCGCTGAC GGA	CCGGCCGCGGCCGCTTAGTCCCGGGGA TGTTGG
3'UTR de SHMT2	CCGGCCCTCGAGAGGCACCTGGGAAATGAGG C	CCGGCCGCGGCCGCCAAAATACAATTC ATTTAA
CDS de SHMT2	CCGGCCCTCGAGATGCTGTACTTCTTTGT T	CCGGCCGCGGCCGCTCAATGCTCATCAA AACCAG
CDS de VIPR	CCGGCCGTTTTAAACTCAGACCAGGGAGACTT CGG	CCGGCCCTCGAGATGCGCCCGCCAAGTC CGCT
3'UTR de VIPR1	CCGGCCCTCGAGCCACCAGGATCCAGGGGC C	CCGGCCGCGGCCGCTCCAAGCCAACATT TATTGT

Se identificaron los posibles sitios de miR-126 en los genes mediante la alineación con la secuencia de miR-126 complementaria 5-TTACTCACGGTACGA-3, y se realizó mutagénesis usando el kit de mutagénesis dirigida a múltiples sitios QUICKCHANGE (200514, AGILENT TECHNOLOGIES, Santa Clara, CA). Basándose en el buscador de genomas UCSC, se mutó la 3'UTR de MERTK en la posición 5 (de GTT a CAC), se mutó la 3'UTR de IGFBP2 en la posición 246 (de GGT a CAC), se mutó la CDS de PITPNC1 en la posición 709 (de TAC a GTA) del codón inicial y se mutó la CDS de SHMT2 en la posición 1126 (de GGT a CAC). Los cebadores de mutagénesis se muestran en la tabla 3 a continuación

10 Tabla 3. Cebadores de mutagénesis

Gen	Directo
3'UTR de IGFBP2	AAGGGGGTTGTGGTTCGGGGAGCTGGCACACAGGTTTGGGGAGGGGGAAGAGAA
3'UTR de MERTK	ATTCTAGGCGATCGCTCGAGGGAGACACGCGGGGAGACATTCCAAAAATCAAG
CDS de PITPNC1	TATGACAATGGATGATGTTTCGGGAAGTAGAGAAAAACATGCATGAACAAACCA
CDS de SHMT2	GCGAGGCTACTCACTGGTATCAGGTACACTGACAACCACCTGGTGTGGTGG
	Inverso
3'UTR de IGFBP2	TTCTCTTCCCCTCCCCAACCTGTGTGCCAGCTCCCCGACCACAACCCCTT
3'UTR de MERTK	CTTGATTTTTGGAATGTCTCCCCGCGTGTCTCCCTCGAGCGATCGCCTAGAAT
CDS de PITPNC1	TGGTTTGTTCATGCATGTTTTTCTCTACTTCCCGAACATCATCCATTGTCATA
CDS de SHMT2	CCACCAGCACCAGGTGGTTGTCAGTGTGACCTGATACCAGTGAGTAGCCTCGC

Se sembraron células LM2 ($2,5 \times 10^4$) que expresan una horquilla de control o IGF2BP2, PTPN11 o MERTK de selección como diana en horquillas cortas por triplicado en placas de 6 pocillos y se contaron las células viables a los 5 días tras la siembra.

5

Histología

Se prepararon pulmones mediante fijación por perfusión con paraformaldehído al 4% infundido a través del sistema vascular y a través de la tráquea. Tras la escisión, se colocaron los pulmones en paraformaldehído al 4% durante la noche y se incluyeron en parafina. Cinco minutos antes de la fijación, se inyectaron 100 mg de lectina biotinilada (B-1175, VECTOR LABORATORIES) en la circulación a través de la vena de la cola. Se tiñeron cortes en parafina de cinco micrómetros de grosor con anticuerpos primarios contra MECA-32 (Developmental Studies Hybridoma Bank, Universidad de Iowa, IA), vimentina (VP-V684, VECTOR LABORATORIES) y con avidina marcada con FITC (B-1175, VECTOR LABORATORIES) para la detección de la lectina biotinilada inyectada. Los anticuerpos primarios se detectaron usando diversos anticuerpos secundarios conjugados con el colorante Alexa Flour. Se obtuvo la fluorescencia usando un microscopio confocal de barrido láser ZEISS (LSM 510). Para determinar la vascularización de los nódulos metastásicos, se cuantificaron las señales de MECA-32 y lectina usando IMAGEJ mientras que las extensiones de los nódulos metastásicos se determinaron a través de tinción con vimentina humana. Se determinó el área colectiva cubierta por vasos restando el fondo (radio de bola rodante de 1 píxel) y usando un umbral predeterminado como punto de corte. La densidad de vasos se da como el porcentaje del área cubierta por los vasos sanguíneos en comparación con el área total del nódulo metastásico. Un nódulo metastásico se definió por un área positiva para tinción con vimentina con un área total por encima de $2000 \mu\text{m}^2$.

Se escindieron tumores de pániculo adiposo mamario y se sumergieron en paraformaldehído al 4% durante 24 horas. Se incluyó el tejido fijado en parafina y se cortó en cortes de $5 \mu\text{m}$ de grosor. Se realizó inmunodetección usando anticuerpos dirigidos hacia MECA-32 (Developmental Studies Hybridoma Bank), Mac-2 (CL8942AP, Cederlane, Burlington) y CD45 (550539, BD Biosciences). La detección de anticuerpos primarios se realizó usando diversos anticuerpos secundarios biotinilados (Vector Laboratories). Posteriormente se amplificó la señal usando el kit ABC (Vector Laboratories) y se detectó usando DAB (3,3'-diaminobencidina). Antes del montaje, los portaobjetos se contratiñeron con hematoxilina.

Se determinó la permeabilidad del dextrano tal como se describe en Arnold *et al.*, 2010 Dis Model Mech 3 (1-2), 57 (2010) con ligeras modificaciones. Brevemente, se infundió un bolo intravenoso de rodamina B 10 mg/ml marcada con dextrano de bajo peso molecular (1×10^4 kDa: D1824, INVITROGEN) en PBS estéril. Quince minutos después, se anestesió a los ratones y se perfundieron los pulmones con OCT, se extrajeron y se congelaron en hielo seco. Se realizó un corte de diez micrómetros y se midió la permeabilidad del dextrano dentro de los nódulos metastásicos (tal como se determina mediante tinción con vimentina) mediante microscopía de fluorescencia. Usando IMAGEJ, se usó un umbral preseleccionado para determinar los niveles de permeabilidad del dextrano. Los resultados se presentan como el porcentaje medio del área de umbral dentro del nódulo metastásico.

40

ELISA

Se determinaron los niveles de IGF2BP2 en medios acondicionados usando un ELISA de IGF2BP2 (AAHBLG-1-2, RAYBIOTECH, Norgross, GA).

45

Inmunotransferencia de tipo Western

Se prepararon lisados celulares de células MDA-MB-231 lisando células en 1 ml de tampón RIPA helado que contenía inhibidores de proteasa (ROCHE, Mannheim, Alemania). Se prepararon medios acondicionados incubando células MDA-MB-231 en medios libres de suero durante 24 horas. Entonces se concentraron los medios veinte veces mediante filtración por centrifugación. Posteriormente se separaron $40 \mu\text{g}$ de proteína en un SDS-PAGE al 4-12% y se transfirieron a una membrana de PVDF. Se usó un anticuerpo monoclonal contra MERTK humana (CVO-311, CAVEO THERAPEUTICS, Aurora, CO) para detectar MERTK.

Análisis de supervivencia libre de metástasis

Tras identificar los ocho genes regulador por miR-126 a través de un análisis integrador, se determinó si la expresión de estos genes en agregado se correlaciona con metástasis clínica humana. Se usaron datos de microalineamientos publicados de series de UCSF46, NKI47 y MSKCC13 para obtener valores de expresión a nivel de sonda. Para los genes que estaban representados por múltiples sondas, se usaron sondas que presentaban una intensidad de señal suficiente, así como el mayor coeficiente de variación (en su mayor parte informativo) en un conjunto de datos independiente. Cada cáncer de mama se clasificó como positivo para rasgo distintivo de miR-126 si la suma de puntuaciones Z para los valores de expresión de los 8 genes era mayor que la media de la población. Se generaron curvas de supervivencia libre de metástasis de Kaplan-Meier usando el software GRAPHPAD PRISM 5 (GRAPHPAD Software, Inc., LA Jolla, CA). Se determinó la significación estadística para las diferencias entre curvas de supervivencia de pacientes usando la prueba de rangos logarítmicos de Mantel-Cox usando el software

65

GRAPHPAD Prism 5.

Análisis de la densidad de vasos

- 5 Se usó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para determinar la significación de la diferencia en la densidad de vasos sanguíneos para tinción tanto de MECA-32 y de lectina usando el software disponible públicamente en physics.csbsju.edu/stats/KS-test.html.

Ejemplo 2: Colonización metastásica sistémica suprimida de miR-126 endógeno

10 En este ejemplo, se llevaron a cabo ensayos para analizar la evolución metastásica en la práctica de pérdida de función de miR-126. Esto permitió comparar acontecimientos metastásicos *in vivo* entre células de control y con silenciamiento de miR-126 (KD) y revelar la influencia de miR-126 endógeno sobre la colonización metastásica.

15 Se generó una línea celular de cáncer de mama MDA-231 en la que miR-126 estaba silenciado de manera notable (silenciamiento del 94%; figura 7) usando el sistema de inhibición de microARN anti sentido de miR-Zip. Se inyectaron miR-126 KD y células KD de control en ratones inmunodeficientes y se evaluaron para determinar la capacidad de colonización metastásica en ensayos de colonización en la vena de la cola. El silenciamiento de miR-126 en células escasamente metastásicas aumentó la colonización metastásica pulmonar en 4,2 veces ($P = 0,0073$) tal como se evaluó mediante obtención de imágenes de bioluminiscencia cuantitativa (figura 1a) y aumentó espectacularmente la colonización metastásica en histología macroscópica (figura 1a). La inyección intracardiaca de MDA miR-126 KD y células KD de control reveló adicionalmente que miR-126 endógeno suprime la metástasis sistémica tal como se pone de manifiesto por la colonización potenciada de múltiples órganos tales como el cerebro y el hueso en la práctica de silenciamiento de miR-126 (figura 1b-c; $P = 0,0232$ (b), $P = 0,0119$ (c)).

25 A continuación, se llevaron a cabo ensayos para examinar hasta qué punto en aumento espectacular en la colonización metastásica observada con la inhibición de miR-126 se debía al efecto de miR-126 sobre el crecimiento tumoral. Para este fin, se inyectaron miR-126 KD y células KD de control en los panículos adiposos mamarios de ratones inmunodeficientes y se monitorizó el volumen tumoral. La inhibición de miR-126 condujo a un aumento modesto (39,4%) en el volumen tumoral (figura 1d) que fue de un orden de magnitud más pequeño que el efecto de la inhibición de miR-126 sobre la potenciación de la metástasis, lo que indica que el efecto de miR-126 sobre la metástasis no es simplemente el resultado de su efecto sobre la supresión del crecimiento tumoral.

35 Para entender mejor el papel de este miARN sobre la colonización metastásica, se cuantificaron los números y los tamaños de todas las metástasis a través del análisis de imágenes de pulmones de ratones de control y con miR-126 KD (figura 1e). Esto reveló un aumento sustancial en el número total de nódulos metastásicos en pulmones con miR-126 KD en relación con los pulmones de control ($13,6 \pm 3,2$ frente a $4,9 \pm 1,8$; $P = 0,03$). Este aumento se observó para nódulos tanto pequeños como grandes (figura 1e) y reflejó el aumento en el número de metástasis en otros órganos (figura 1c). De manera importante, el aumento en el número de nódulos fue más pronunciado para los tamaños de nódulo más pequeños en relación con los más grandes, lo que concuerda principalmente con un aumento en el inicio de metástasis más que con un aumento en el crecimiento de la metástasis establecida. Sin restringirse a la teoría, si el silenciamiento de miR-126 proporciona una ventaja de inicio de metástasis para las células cuando inicial la metástasis en el nicho metastásico, su inducción en la fase inicial de formación de metástasis reducirá el número de nódulos metastásicos. Para someter esto a prueba, se indujo la expresión de miR-126 en células de cáncer de mama metastásicas (LM2) que mostraban silenciamiento de este miARN usando un sistema tet-on condicionado. De acuerdo con esto, el restablecimiento de la expresión de miR-126 a células LM2 una vez que se han extravasado en el pulmón (día 3) redujo significativamente la colonización metastásica (figura 1f). Por tanto, el restablecimiento de la expresión de miR-126 en esta fase temprana de inicio de metástasis en el nicho redujo significativamente el número de nódulos metastásicos visualizados en el día 49.

50 Los hallazgos anteriores demostraron que el silenciamiento de miR-126 potencia la eficacia de formación de metástasis que conduce a un mayor número de metástasis. Los hallazgos revelaron por tanto que miR-126 endógeno es un supresor del inicio metastásico y la colonización metastásica.

55 Ejemplo 3: miR-126 suprime el reclutamiento endotelial metastásico por células de cáncer de mama

Los hallazgos anteriores sugieren que el silenciamiento de miR-126 puede dar a las células metastásicas y a la metástasis incipiente una ventaja durante la colonización metastásica. Aunque se considerara la base de esta ventaja, se observó que las metástasis con silenciamiento de miR-126 mostraban densidades de vasos superiores en visualización microscópica de cortes tisulares de pulmón con H&E. Para cuantificar esto, se realizó co-inmuntinción para vimentina humana, que marca células de cáncer de mama MDA-231, y el marcador endotelial MECA-32, que permitía cuantificar la densidad endotelial dentro de nódulos metastásicos en pulmones de ratones a los que se inyectaron o bien células de cáncer de mama de control o con miR-126 KD. El análisis de imágenes y la cuantificación revelaron que las metástasis derivadas de células miR-126 KD tenían una densidad endotelial significativamente superior (figura 2a; aumento del 35%; $P = 0,02$).

Para determinar si la densidad endotelial potenciada en metástasis de miR-126 KD representa vasos funcionales, se inyectó lectina de unión a azúcar en la circulación de ratones antes de las extracciones de pulmón, y posteriormente se tiñeron para determinar la lectina inyectada. La citoquímica de lectina reveló que la metástasis de silenciamiento de miR-126 aumentó la densidad de vasos sanguíneos funcionales (figura 2b; aumento del 33%; $P = 0,001$).

Finalmente, se buscó determinar si miR-126 regula la perfusión hemodinámica a metástasis a través de perfusión intravenosa y posterior visualización de dextrano de bajo peso molecular (1×10^4 kDa). De hecho, la metástasis de miR-126 KD presentó una perfusión significativamente aumentada en relación con la metástasis de control (figura 8; $P = 0,02$).

Por tanto, estos métodos independientes y complementarios revelan que miR-126 suprime la perfusión y la angiogénesis metastásica funcional *in vivo*. Estos hallazgos están de acuerdo con el silenciamiento de miR-126 da a las metástasis una ventaja selectiva en la progresión angiogénica.

15 **Ejemplo 4: mir-126 suprime el reclutamiento endotelial en cáncer *in vitro***

En este ejemplo, se buscó determinar la base celular para el fenotipo de angiogénesis dependiente de miR-126 observado.

Se analizó la capacidad de miR-126 para regular diversas interacciones endoteliales del cáncer tales como adhesión endotelial, proliferación endotelial y formación de tubos en células LM2 metastásicas (derivadas originalmente de la población MDA-231 escasamente metastásica, Minn, A. J. *et al.*, Nature 436 (7050), 518 (2005)) en cocultivo con células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC). El restablecimiento de la expresión de miR-126 a células LM2, que muestran silenciamiento de miR-126, no suprimió la adhesión de las células metastásicas a células endoteliales (figura 2c), la proliferación de células endoteliales (figura 2d) o la formación de tubos tal como se evalúa mediante cuantificación automatizada de puntos de ramificación (figura 2e). De acuerdo con esto, la inhibición de miR-126 en células MDA-231 tampoco no potenció estos fenotipos angiogénicos (figuras 9a-c).

Se investigó el papel de miR-126 en la regulación del reclutamiento de células endoteliales a células metastásicas. Células LM2 metastásicas colocadas en el fondo de una cámara de Boyden reclutaron fuertemente HUVEC a través de un inserto Transwell poroso y presentaron una capacidad significativamente potenciada para reclutar endotelios en comparación con su línea parental escasamente metastásica (figura 2f). El reclutamiento endotelial por células metastásicas se inhibió fuertemente (reducción del 47%) por la sobreexpresión de miR-126 (figura 2g). A la inversa, el silenciamiento de miR-126 en la población MDA-231 parental escasamente metastásica aumentó significativamente el reclutamiento endotelial (aumento del 146%; figura 2g). La línea CN34LM1a, un derivado de pulmón altamente metastásico que se obtuvo previamente a través de selección *in vivo* de la población maligna primaria CN34 (Tavazoie *et al.*, Nature 451 (7175), 147 (2008)) (una población maligna primaria independiente obtenida del líquido pleural de una paciente con cáncer de mama metastásico Gupta *et al.*, Nature 446 (7137), 765 (2007)), también presentó capacidad de reclutamiento endotelial significativamente potenciada en comparación con su línea parental escasamente metastásica (figura 2h). Ambos experimentos de ganancia de función y pérdida de función revelaron que miR-126 también suprime significativamente el reclutamiento endotelial por la población de CN34 (figura 2i). Los hallazgos revelaron que la capacidad de reclutamiento endotelial potenciada era una característica clave de las poblaciones con cáncer de mama metastásico e identificaron miR-126 endógeno como un regulador principal de este proceso.

A continuación, se buscó determinar si miR-126 endógeno puede regular selectivamente el reclutamiento endotelial a células de cáncer de mama independientemente de su ubicación. Por tanto, se implantaron células de cáncer de mama metastásicas que expresaban una horquilla de control o que sobreexpresaban miR-126 en el panículo adiposo mamaros de ratones. Las células metastásicas, que presentan expresión de miR-126 silenciada, presentaron densidad de vasos superior en la glándula mamaria en relación con las células escasamente metastásicas. El reclutamiento endotelial a células metastásicas en el panículo adiposo mamaros se inhibió por la expresión de miR-126 (figura 2j), mientras que el silenciamiento de miR-126 en células escasamente metastásicas aumentó significativamente el reclutamiento endotelial a y el contenido en vasos funcionales de tumores de mama en crecimiento en panículos adiposos mamaros tal como se determina por tinción con meca-32 (figura 2j) y tinción con lectina (figura 10a), respectivamente. Este efecto del reclutamiento fue selectivo para células endoteliales ya que el silenciamiento de miR-126 no aumentó la densidad de leucocitos (figura 10b) o la densidad de macrófagos (figura 16c) en tumores mamaros.

Los hallazgos anteriores revelaron que miR-126 regula selectivamente el reclutamiento endotelial a células de cáncer de mama independientemente de su ubicación anatómica.

65 **Ejemplo 5: El regulón de mir-126 promueve el reclutamiento endotelial**

En este ejemplo, se realizó una investigación sistemática para identificar las dianas moleculares de miR-126 que median el reclutamiento endotelial y la colonización metastásica. Específicamente, se realizó análisis de transcriptomas de células LM2 que sobreexpresan miR-126 y se compararon alteraciones de transcrito global en

células MDA-231 escasamente metastásicas y células LM2 altamente metastásicas.

Sin restringirse a la teoría, se lanzó la hipótesis de que, dado el papel de miR-126 en inhibir la metástasis, los mediadores biológicos de miR-126 presentan una expresión aumentada en células metastásicas y de que se suprimirían por este miARN. Se identificó un conjunto de 23 genes ya que se suprimieron tras la sobreexpresión de miR-126 (>1,6 veces; figura 11; tabla 4), y se regularon por incremento (>1,4 veces) en células metastásicas en relación con la línea parental de MDA-231 (figura 11).

De estos genes, se validó que 14 habían cambiado significativamente mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) de células MDA-231 control y miR-126KD así como células LM2 control y células que sobreexpresaban miR-126. Para aumentar adicionalmente la confianza de esta lista, se sometió a prueba la expresión de estos genes en los derivados metastásicos de la línea CN34 independiente, y se identificó que 8 genes presentaban una expresión significativamente aumentada en múltiples derivados de CN34 metastásicos en relación con su línea parental (figura 3a).

La contribución de estos 8 genes a la metástasis humana se comprobó determinando si su sobreexpresión en cánceres de mama humanos primarios se correlaciona con la supervivencia libre de metástasis distal. Era significativamente más probable que las pacientes cuyos cánceres de mama primarios presentaban sobreexpresión desarrollaran metástasis distal y experimentarían una supervivencia libre de metástasis más corta que aquellas cuyos cánceres no sobreexpresaban estos genes (figura 3b-d). Esta asociación presentó significación en las cohortes UCSF (n=117; $P < 0,0165$), NKI (n=295; $P < 0,0005$) y las cohortes combinadas MSK/NKI/UCSF (n=494; $P < 0,0004$). Por tanto, miR-126 suprimió la expresión de un conjunto de ocho genes que estaban correlacionados positiva y fuertemente con recidiva metastásica humana.

A continuación, se llevaron a cabo ensayos para identificar las dianas directas de miR-126. Para este fin, se clonaron las regiones no traducidas en 3' (3'-UTR) y las secuencias codificantes (CDS) de los ocho genes regulados de miR-126 y se usaron para generar constructos de fusión de luciferasa. Ensayos de indicador de luciferasa con este conjunto completo revelaron que miR-126 regula la expresión de IGFBP2 y MERTK a través de interacciones con sus 3'-UTR y PIPNC1 y SHMT2 a través de interacciones con sus regiones codificantes ya que el silenciamiento de miR-126 endógeno en células MDA-231 potenciaba la expresión de estos genes de fusión de luciferasa (figura 3e y figura 12). La mutación de secuencias complementarias de miR-126 en las 3'-UTR de IGFBP2 y MERTK anulaban la regulación mediada por miR-126 de la expresión de luciferasa (figura 3f), mientras que la mutación de las CDS de PIPNC1 y SHMT2 anulaban la selección como diana mediada por miARN (figura 3f).

Tabla 4. Reducción en veces por miR-126 en células LM2

Nombre del gen	Veces						
GDF15	-4,15	CTAGE5	-1,93	PRKAR1A	-1,80	KIAA0746	-1,71
RARA	-3,53	CDA	-1,93	CHAC1	-1,80	PADI4	-1,71
P8	-2,98	FLJ46385	-1,92	SCD	-1,80	BEX2	-1,71
RPS6KA2	-2,54	RALGPS2	-1,92	PCK2	-1,80	TAF13	-1,70
C20orf100	-2,47	BDNFOS	-1,91	CDC42BPB	-1,79	KLF4	-1,70
C12orf39	-2,38	MBNL1	-1,91	DSCR1	-1,79	DLG1	-1,70
HERPUD1	-2,37	MKX	-1,91	TCF7L2	-1,79	DDEFL1	-1,70
CTH	-2,36	LPIN1	-1,90	TNRC6C	-1,79	MID1IP1	-1,70
LOC23117	-2,35	DNAJB9	-1,90	TncRNA	-1,78	LOC124220	-1,70
LOC23117	-2,35	TncRNA	-1,90	CLDN23	-1,78	C10orf58	-1,70
ASNS	-2,35	BCL2L1	-1,90	GPR153	-1,78	CDKN1C	-1,70
RGC32	-2,33	DNAJB9	-1,90	KRTHA4	-1,78	DTX3	-1,70
CTH	-2,33	ENTH	-1,89	SCD	-1,78	SETD5	-1,70
NRP1	-2,28	S100A5	-1,89	VIPR1	-1,78	SLC7A11	-1,69
RIT1	-2,26	CST4	-1,89	SLC1A4	-1,77	WSB1	-1,69
HMGA1	-2,24	TRIB3	-1,89	PNPLA3	-1,77	KIAA1618	-1,69
DDIT3	-2,20	PHLDA1	-1,89	PPP1R11	-1,77	PYGB	-1,69
MBNL1	-2,20	RGNEF	-1,89	CFLAR	-1,77	CSNK1A1	-1,69

ES 2 645 366 T3

SUPT6H	-2,16	GFPT1	-1,88	NSF	-1,77	THBD	-1,68
LPIN1	-2,15	TMTC2	-1,88	ABHD4	-1,77	CG012	-1,68
ZNF451	-2,12	TPARL	-1,87	SOCS2	-1,77	DDX17	-1,68
THBD	-2,10	INHBB	-1,87	TACSTD2	-1,76	BGLAP	-1,68
ITGB4	-2,10	FASN	-1,87	SESN2	-1,76	MAGI1	-1,68
BHLHB8	-2,09	CALB2	-1,86	CTNNB1	-1,76	WARS	-1,68
SLCO4C1	-2,09	IGFBP2	-1,86	MAP1LC3B	-1,76	LOC283050	-1,68
AFF4	-2,07	SLC6A9	-1,86	LOC165186	-1,76	AQP3	-1,68
ATP6V0D2	-2,05	PLAT	-1,86	FLJ20054	-1,75	LOC400581	-1,68
KRT19	-2,05	SIN3B	-1,86	ZNF69	-1,74	CILN2	-1,68
SMAD3	-2,04	S100A6	-1,85	TNFSF4	-1,74	CD97	-1,68
ARHGAP5	-2,04	WSB1	-1,85	LOC441453	-1,74	CNTNAP3	-1,67
DNAJB9	-2,04	C20orf18	-1,85	MARS	-1,74	PDE2A	-1,67
ATF3	-2,03	HMGCS1	-1,85	LOC647135	-1,74	AOF1	-1,67
LOC440092	-2,03	MBNL1	-1,85	ACSL3	-1,74	IDS	-1,67
RIT1	-2,03	MBNL1	-1,85	SCD	-1,74	SCD	-1,67
ZNF499	-2,02	WHSC1L1	-1,85	SERINC2	-1,73	SHMT2	-1,67
ATXN1	-2,02	NCF2	-1,85	ZCCHC7	-1,73	RNF10	-1,67
CST6	-2,01	MERTK	-1,84	ETNK1	-1,73	CRLF3	-1,67
WBP2	-2,00	PFAAP5	-1,84	CHRM3	-1,73	PSAT1	-1,67
ZFAND3	-2,00	RTN4	-1,83	DCAMKL1	-1,73	FNBP1	-1,67
FLJ38717	-1,99	LARP6	-1,83	C20orf119	-1,73	LOC554203	-1,66
LOC158160	-1,99	TRIB3	-1,83	CDKN1C	-1,73	MYADM	-1,66
PITPNC1	-1,99	RAB37	-1,83	CXorf33	-1,72	ATXN1	-1,66
JMJD1C	-1,99	LOC399959	-1,83	LPIN1	-1,72	CA12	-1,66
PRO2852	-1,98	SYTL1	-1,82	GEM	-1,72	SF3B4	-1,66
AGR2	-1,97	SDF2L1	-1,82	KIAA0746	-1,72	KHDRBS1	-1,66
SLC7A5	-1,94	RPH3AL	-1,82	LOC115648	-1,72	EGFR	-1,66
NSF	-1,94	OGDH	-1,82	TIA1	-1,72	FRMD5	-1,65
BCL2L1	-1,94	CDIL	-1,81	FLJ10120	-1,71	ZNF252	-1,65
KIAA1267	-1,93	RHOQ	-1,81	DUSP5	-1,71	FNBP1	-1,65
NT5C2	-1,93	ITGB4	-1,81	RNF12	-1,71	TNKS2	-1,65
C9orf3	-1,65	C14orf118	-1,61				
AOF1	-1,65	PIAS1	-1,61				
PDP2	-1,65	PXN	-1,61				
MLLT10	-1,65	C14orf118	-1,61				
WIRE	-1,65	PIAS1	-1,61				
ATXN1	-1,65	FLJ43663	-1,65				
WARS	-1,65	SOS2	-1,61				
RAB5B	-1,64	FLJ43663	-1,60				
SQLE	-1,64	HCRP1	-1,60				

ES 2 645 366 T3

SCNN1A	-1,64	LOC646916	-1,60				
C14orf78	-1,64	NUP43	-1,60				
SHMT2	-1,63	PEBP1	-1,60				
PSCD3	-1,63	FLJ23556	-1,60				
LOC643998	-1,63	NRP1	-1,60				
PHGDH	-1,63	JUP	-1,60				
HEXA	-1,63						
CDRT4	-1,63						
ACTN4	-1,63						
C6orf155	-1,63						
EXT1	-1,63						
JDP2	-1,63						
LSS	-1,63						
PITPNC1	-1,63						
C20orf18	-1,63						
CLDN7	-1,63						
NPC1	-1,62						
IDH1	-1,62						
THBD	-1,62						
GSTM4	-1,62						
ATP5C1	-1,62						
PMM1	-1,62						
C9orf5	-1,62						
COL8A2	-1,62						
CST1	-1,62						
MAGI1	-1,62						
G6PD	-1,62						
FOSL1	-1,61						
RASD1	-1,61						
PITX1	-1,61						
P2RY2	-1,61						
HYOU1	-1,61						
CSF2RA	-1,61						
SLC16A4	-1,61						
SQLE	-1,61						
EFHD2	-1,61						
ABCB9	-1,61						
SYDE1	-1,61						
MAGI1	-1,61						
SLC7A11	-1,61						
HSPA5	-1,61						

Por tanto, la proteína de unión, proteína de unión a IGF 2, la cinasa receptora MERTK, la proteína de transferencia de fosfatidilinositol PITPNC1 y la enzima hidroximetiltransferasa SHMT2 comprenden un conjunto de dianas directas de miR-126 en cáncer de mama humano.

5

Ejemplo 6: IGFBP2, PITPNC1 y MERTK promueven el reclutamiento endotelial y la metástasis

En este ejemplo, se llevaron a cabo ensayos para examinar si cualquiera de los genes diana de miR-126 regula el reclutamiento de células endoteliales por células cancerosas. De estos cuatro genes, el silenciamiento de IGFBP2, MERTK o PITPNC1 usando horquillas cortas independientes suprime significativamente la capacidad de las células LM2 metastásicas para reclutar células endoteliales (figura 4a y figura 13). De manera importante, el silenciamiento de estos genes no dio como resultado una disminución significativa en la proliferación celular (figura 14).

10

Dados los efectos robustos de los genes diana de miR-126 sobre el reclutamiento endotelial, se examinó si los niveles de expresión de estos genes se correlacionan individualmente con la propensión metastásica de cánceres humanos. Se analizaron por tanto los niveles de expresión de cada uno de estos genes a través de qPCR en un conjunto completamente independiente de 96 cánceres de mama humanos para los que estaban disponibles ADNc.

15

Las pacientes con cánceres de mama en estadio III y estadio IV presentan diseminación metastásica local y metástasis distales, respectivamente, y comprenden colectivamente las que desarrollan recidiva distal a tasas mucho mayores que las pacientes en los estadios I y II. Resulta interesante que los niveles de expresión de IGFBP2 ($P < 0,0003$), MERTK ($P < 0,002$) y PITPNC1 ($P < 0,004$) estaban significativamente aumentados de manera individual en los cánceres primarios de pacientes en los estadios III y IV en relación con pacientes en los estadios I y II (figura 4b). Dado el requisito para reclutamiento endotelial por células metastásicas, así como su selección como diana directa por miR-126, se buscó determinar si se requiere cualquiera de los genes diana de miR-126 para la colonización metastásica.

20

25

Se encontró que, de manera importante, el silenciamiento de IGFBP2 usando horquillas cortas independientes suprimió significativamente la colonización al pulmón (sh_1 : 10 veces; sh_2 : 6,25 veces; figura 4c). Además, el silenciamiento de PITPNC1 y MERTK también inhibió fuertemente la colonización metastásica (PITPNC1 sh_1 : 7,69 veces; PITPNC1 sh_2 : 4,55 veces, figura 4d; MERTK sh_1 : 3,91 veces; MERTK sh_2 : 3,08 veces, figura 4e). Las secuencias de ARNhc usadas se enumeran en la tabla 5 a continuación.

30

Estos hallazgos revelaron que se requieren individualmente cada uno los genes diana directos de miR-126 IGFBP2, PITPNC1 y MERTK para el reclutamiento endotelial y la colonización metastásica y que se correlacionan individualmente en la expresión con la evolución metastásica humana.

35

Tabla 5. Secuencias de ARNhc

Gen	Secuencia
IGFBP2_sh1	CCGGCCAGTTCTGACACACGTATTTCTCGAGAAATACGTGTGTCAGAACTGGTTTTT (SEQ ID NO: 1)
IGFBP2_sh2	CCGGCAGGTTGCAGACAATGGCGATCTCGAGATCGCCATTGTCTGCAACCTGTTTTT (SEQ ID NO: 2)
MERTK_sh1	CCGGGCTTCTGGTCTTGATGTATTTCTCGAGAAATACATCAAGACCAGAAGCTTTTT (SEQ ID NO: 3)
MERTK_sh2	CCGGCCTGCATACTTACTTTACTCGAGTAAAGTAAGTAAGTATGCAGTTTTT (SEQ ID NO: 4)
PITPNC1_sh1	CCGGCGGGTGTATCTCAACAGCAAACCTCGAGTTTGCTGTTGAGATACACCCGTTTTTG (SEQ ID NO: 5)
PITPNC1_sh2	CCGGCAATGGATGAAGTCCGAGAATCTCGAGATTCTCGGACTTCATCCATTGTTTTG (SEQ ID NO: 6)
SHMT2hc	CCGGCCGGAGAGTTGTGGACTTTATCTCGAGATAAAGTCCACAACCTCTCCGGTTTTTG (SEQ ID NO: 7)
controlhc	CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTC-GAGTTGGTGCTTTCATCTTGTGTTTTT (SEQ ID NO: 8)

40 **Ejemplo 7: IGFBP2 media el reclutamiento a través de la activación de IGF1/IGF1R de células endoteliales**

De las dianas de miR-126, IGFBP2 es un factor secretado y, como tal, dispuesto para mediar la comunicación intercelular entre células de cáncer metastásicas y células endoteliales. Por tanto, se examinó si las células

metastásicas secretan niveles aumentados de IGFBP2. Se encontró que, de hecho, los análisis de ELISA revelaron que las células LM2 metastásicas secretan niveles 2,1 veces superiores de este factor que la línea parental MDA-231 escasamente metastásica (figura 5a).

5 Los miembros de la familia de IGFBP ejercen sus efectos interaccionando con diversos factores de crecimiento de tipo insulina (IGF) y modulan su unión a receptores de IGF (Baxter, R. C., *Horm Res* 42 (4-5), 140 (1994) y Jones, J. I. *et al.* *Endocr Rev* 16 (1), 3 (1995). Para determinar si el reclutamiento endotelial metastásico está mediado a través de IGFBP2 secretada, se inhibió la unión de IGFBP2 a IGF por medio de la incubación con anticuerpo neutralizante contra IGFBP2.

10 Se encontró que la inhibición mediada por anticuerpos de IGFBP2 en un ensayo de reclutamiento Transwell inhibió significativamente el reclutamiento endotelial celular metastásicos hasta niveles comparables a los obtenidos con la sobreexpresión de miR-126 (figura 5b) y también evitó el reclutamiento dependiente de miR-126 (figura 5b). Por tanto, este efecto fue específico para la ruta de miR-126/IGFBP2, ya que la inhibición del reclutamiento endotelial por el anticuerpo contra IGFBP2 se ocluyó con la sobreexpresión de miR-126 (figura 5b). La inhibición mediada por anticuerpos de IGFBP2 también suprimió el reclutamiento endotelial por el derivado de CNLM1A de la línea maligna CN34 independiente y dio como resultado una reducción estadísticamente significativa en el reclutamiento endotelial dependiente de miR-126 (figura 5c). Estos hallazgos revelaron que IGFBP2 secretada es un mediador de la señalización intercelular para el reclutamiento endotelial dependiente de miR-126 por células metastásicas.

20 Se sabía que IGFBP2 se une tanto a IGF1 como IGF2 en el espacio extracelular y modulan su actividad de señalización (Jones, J. I. *et al.* *Endocr Rev* 16 (1), 3 (1995); Arai, T., *et al.* *Endocrinology* 137 (11), 4571 (1996); Rajaram, S., *et al.* *Endocr Rev* 18 (6), 801 (1997); y Hoflich, A. *et al.*, *FEBS Lett* 434 (3), 329 (1998)). Para determinar que IGF media el reclutamiento endotelial dependiente de miR-126, se trataron las células con anticuerpos bloqueantes contra IGF1, IGF2, o con control con inmunoglobulina. La inhibición mediada por anticuerpos de IGF1, pero no de IGF2, redujo significativamente el reclutamiento endotelial que resulta del silenciamiento de miR-126 (figura 5d).

30 A continuación, se buscó determinar el receptor a través del cual se está mediando el reclutamiento endotelial dependiente de miR-126. La inhibición del receptor de IGF de tipo 1 (IGF1R) mediante incubación con anticuerpos bloqueantes contra IGF1R redujo significativamente el reclutamiento que resulta del silenciamiento de miR-126, mientras que la neutralización de IGF2R no tuvo efecto (figura 5e). Estos hallazgos demostraron que la ruta de miR-126/IGFBP2/IGF1 activa IGF1R en células endoteliales.

35 Para asegurarse de que el reclutamiento dependiente de miR-126 estaba mediado a través de IGF1R en células endoteliales (en lugar de en células cancerosas) se preincubaron células endoteliales HUVEC o cancerosas con el anticuerpo contra IGF1R antes del ensayo de reclutamiento endotelial. Esto reveló que sólo la preincubación con el anticuerpo contra IGF1R de células endoteliales inhibió el reclutamiento endotelial mediado por miR-126 ya que no hubo efecto sobre el reclutamiento con la preincubación con las células cancerosas (figura 5f).

40 Los hallazgos anteriores están de acuerdo con el reclutamiento endotelial metastásico que resulta de la secreción de IGFBP2 de gen diana de miR-126, que se une a IGF1 en el espacio extracelular y potencia la activación dependiente de IGF1 del receptor de IGF1 en células endoteliales. La activación de IGF1R potenciada en células endoteliales estimula a su vez la migración endotelial hacia las células de cáncer de mama metastásicas. De acuerdo con este modelo, fue suficiente la proteína IGFBP2 recombinante, de un modo dependiente de la dosis, para promover la quimiotaxia endotelial (figura 5g) y la migración (figura 15) de una manera dependiente de IGF1R.

Ejemplo 8: MERTK media el reclutamiento a través de GAS6

50 En este ejemplo, se llevaron a cabo ensayos para investigar los mecanismos por los que los otros genes diana de miR-126 PTPNC1 y MERTK median el reclutamiento endotelial.

Dada la identificación de IGFBP2 como un factor dependiente de miR-126 secretado que media este fenotipo, se investigó el papel de PTPNC1 o MERTK en la regulación de la secreción de este factor de las células cancerosas. Se encontró que el silenciamiento de PTPNC1 usando horquillas independientes reducía la secreción de IGFBP2 de células de cáncer de mama (figura 6a), de acuerdo con la regulación por PTPNC1 del reclutamiento endotelial que está mediado en parte a través de regulación positiva de la secreción de IGFBP2. Sin embargo, el silenciamiento de MERTK no condujo a secreción de IGFBP2 disminuida, lo que sugiere una ruta independiente de IGFBP2 por la que este gen diana de miR-126 media el reclutamiento.

60 Para determinar el mecanismo por el que el receptor de MERTK media el reclutamiento, se llevaron a cabo ensayos para someter a prueba el impacto de su ligando soluble GAS6 sobre el reclutamiento endotelial mediado por cáncer. La adición de GAS6 recombinante al sistema de cocultivo, a la concentración fisiológica encontrada en el suero humano (Balogh, I. *et al.*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25 (6), 1280 (2005)) redujo potencialmente el reclutamiento dependiente de miR-126 (figura 6b), lo que sugiere que GAS6 actúa como inhibidor del reclutamiento endotelial. El receptor de MERTK existe tanto en formas unidas a membrana como solubles, donde se ha escindido el dominio

extracelular y por tanto se cree generalmente que actúa como un receptor señuelo para regular negativamente la activación del receptor de MERTK en células que lo expresan (Sather, S. *et al.*, Blood (3), 1026 (2007). Se detectó MERTK soluble en medios acondicionados de células MDA-MB-231 (figura 16). Sin restringirse a la teoría, MERTK soluble liberada de células cancerosas puede promover el reclutamiento endotelial a través de la unión e inhibición de GAS6. De acuerdo con esto, la adición de la forma soluble recombinante del dominio extracelular de MERTK (MerFc) suprimió la inhibición mediada por GAS6 exógeno así como sérico del reclutamiento endotelial por células cancerosas (figura 6b). De manera importante, ese efecto fue dependiente de miR-126 (figura 6b). Estos hallazgos sugieren que MERTK secretada de células metastásicas actúa como un receptor señuelo para GAS6, reduciendo de ese modo los efectos supresores de GAS6 en el reclutamiento de células endoteliales. A continuación se enumeran secuencias de aminoácidos de tres isoformas de GAS6.

Isoforma 1

MAPSLSPGPAALRRAPQLLLLLLLAAECALAALLPAREATQFLRPRQRRAFQVFEEAKQGH
LERECVEELCSREEAREVFENDPETDYFYPRYLDCINKYGSPTYTKNSGFATCVQNLDPQC
TPNPCDRKGTQACQDLMGNFCLCKAGWGGRLCDKDVNECSQENGGCLQICHNKPGSFHC
SCHSGFELSSDGRITQDIDECADSEACGEARCKNLPGSYSCLCDEGFAYSSQEKACRDVD
ECLQGRCEQVCVNSPGSYTCHCDGRGGLKLSQDMDTCEDILPCVPFVSAKSVKSLYLGRM
FSGTPVIRLRFKRLQPTRLVAEFDRTFDPEGILLFAGGHQDSTWIVLALRAGRLELQLR
YNGVGRVTS SGPVINHG MWQTI SVEELARNLVIKVN RDAVMKIAVAGDLFQPERGLYHLN
LTVGGIPFHEKDLVQPINPRLDGCMRSWNWLNGETTTIQTETVKVNTRMQCF SVTERGSFY
PGSGFAFYSLDYMRTPLDVGTSTWEVEVVAHIRPAADTGVLFALWAPDLRAVPLSVALV
DYHSTKLLKKQLVVLAVEHTALALMEIKVCDGQEHVTVSLRDGEATLEVDGTRGQSEVS
AAQLQERLAVLERHLRSPVLTFAAGLPDVPVTSAPVTAFYRGCMTELVNRRLLDLDEAAY
KHSDITAHSCPPVEPAAA

15

Isoforma 2

MDTCEDILPCVPFVSAKSVKSLYLGRMFSGTPVIRLRFKRLQPTRLVAEFDRTFDPEGI
LLFAGGHQDSTWIVLALRAGRLELQLR YNGVGRVTS SGPVINHG MWQTI SVEELARNLVI
KVN RDAVMKIAVAGDLFQPERGLYHLNLT VGGIPFHEKDLVQPINPRLDGCMRSWNWLN
GETTTIQTETVKVNTRMQCF SVTERGSFY PGSGFAFYSLDYMRTPLDVGTSTWEVEVVAHI
RPAADTGVLFALWAPDLRAVPLSVALVDYHSTKLLKKQLVVLAVEHTALALMEIKVCDGQ
EHVTVSLRDGEATLEVDGTRGQSEVSAQLQERLAVLERHLRSPVLTFAAGLPDVPVTS
APVTAFYRGCMTELVNRRLLDLDEAAYKHSDITAHSCPPVEPAAA

Isoforma 3

MFSGTPVIRLRFKRLQPTRLVAEFDRTFDPEGILLFAGGHQDSTWIVLALRAGRLELQLR
RYNGVGRVTS SGPVINHG MWQTI SVEELARNLVIKVN RDAVMKIAVAGDLFQPERGLYHL
NLTVGGIPFHEKDLVQPINPRLDGCMRSWNWLNGETTTIQTETVKVNTRMQCF SVTERGSF
YPGSGFAFYSLDYMRTPLDVGTSTWEVEVVAHIRPAADTGVLFALWAPDLRAVPLSVAL
VDYHSTKLLKKQLVVLAVEHTALALMEIKVCDGQEHVTVSLRDGEATLEVDGTRGQSEV
SAAQLQERLAVLERHLRSPVLTFAAGLPDVPVTSAPVTAFYRGCMTELVNRRLLDLDEAA
YKHSDITAHSCPPVEPAAA

Para determinar si las formas recombinantes de IGFBP2 y MERTK, que se expresan por células metastásicas, y GAS6, que está presente en el suero humano, son suficientes para regular la quimiotaxia endotelial, se realizaron ensayos quimiotácticos Transwell para cuantificar la migración quimiotáctica migración de células endoteliales hacia estos factores. GAS6 recombinante a dosis fisiológicas bajas inhibió la quimiotaxia endotelial hacia IGFBP2 recombinante (figura 6c). De manera importante, el ectodominio de MERTK soluble recombinante anuló el efecto supresor de GAS6 sobre la quimiotaxia endotelial (figura 6c). La preincubación de células endoteliales con GAS6 no afectó a la migración endotelial, lo que sugiere que GAS6 inhibe la migración quimiotáctica. Estos hallazgos revelan que IGFBP2 media una señal migratoria y quimiotáctica positiva para células endoteliales a través del receptor de IGF tipo 1 receptor, mientras que el receptor de MERTK soluble antagoniza con una señal quimiotáctica inhibidora mediada por GAS6.

Dados los papeles de IGFBP2, PTPN1 y MERTK en el reclutamiento endotelial *in vitro* y la colonización metastásica *in vivo*, se llevaron a cabo ensayos para examinar si estos genes regulan el reclutamiento endotelial *in vivo*. Para este fin, se realizó tinción con MECA-32 en pulmones de ratones a los que se inyectaron células de cáncer de mama de control y silenciamiento para cuantificar el reclutamiento endotelial *in vivo* tal como se mide mediante densidad de vasos metastásicos. La inhibición de IGFBP2, PTPN1 y MERTK individualmente usando horquillas cortas independientes redujo significativamente la densidad endotelial metastásico (figura 6d; $P < 0,0001$ y $P = 0,002$ para shIGFBP2, $P = 0,01$ y $P = 0,02$ para shPTPN1, y $P < 0,0001$ y $P = 0,005$ para shMERTK). Adicionalmente, la perfusión de lectina y la citoquímica revelaron también una reducción significativa en el contenido de vasos metastásicos funcionales (figura 17). Por tanto, se requieren individualmente los genes diana de miR-126 IGFBP2, PTPN1 y MERTK para el reclutamiento endotelial metastásico *in vivo*.

Los hallazgos anteriores, que comprenden ensayos *in vitro* así como análisis *in vivo* tanto de reclutamiento endotelial mediado por células de cáncer como de reclutamiento mediado por proteínas recombinantes, demostraron que

IGFBP2 y MERTK expresados en cáncer son necesarios y bastan para mediar el reclutamiento endotelial y transmiten rutas paralelas que emanan de células de cáncer metastásicas (figura 6e).

Ejemplo 9. Regulón de miARN que media angiogénesis metastásica

Los hallazgos descritos anteriormente revelaron que un miARN expresado en células cancerosas puede regular de manera autónoma no celular el complejo proceso de perfusión vascular y reclutamiento endotelial metastásicos a través de la regulación coordinada de IGFBP2, MERTK y PTPN11 (un conjunto novedoso de genes de angiogénesis y metástasis).

Se encontró que la expresión aumentada de estos genes de angiogénesis metastásica dota a células de cáncer de mama altamente metastásicas de capacidad de reclutamiento endotelial potenciada en relación con células escasamente metastásicas. Las células metastásicas que sobreexpresan estos genes pueden establecer más fácilmente los vasos sanguíneos necesarios para la colonización eficaz. Aunque se demostró la necesidad de estos tres genes en el reclutamiento endotelial metastásico, uno de ellos, es decir, IGFBP2 secretada, es un mediador transcelular de este fenotipo.

Adicionalmente, se descubrió la ruta de señalización de IGF1 (modulada por IGFBP2 secretada de células cancerosas y que culmina en la activación de IGF1R en células endoteliales) como mediador del reclutamiento endotelial de células metastásicas y se ha identificado miR-126 en células cancerosas como regulador de esta ruta. Aunque se han notificado los papeles de IGF1 y IGF2 en el crecimiento celular y de organismos (Laviola, L., *et al. Curr Pharm Des* 13 (7), 663 (2007) y Varela-Nieto, I., *et al. Curr Pharm Des* 13 (7), 687 (2007).), la expresión ubicua de estos factores de crecimiento y sus receptores en diversos tejidos y sus requisitos para fisiología normal limitan su aplicación terapéutica (Varela-Nieto, I., *et al. Curr Pharm Des* 13 (7), 687 (2007)).

IGFBP2 es uno de los 16 miembros de la familia de IGFBP; véase Schmid, C., *Cell Biol Int* 19 (5), 445 (1995); Hwa, V., *et al. Endocr Rev* 20 (6), 761 (1999); y Firth, S. M. *et al. Endocr Rev* 23 (6), 824 (2002). La identificación de IGFBP2 como promotor de metástasis, su sobreexpresión en cáncer de mama humano metastásico y el efecto robusto de su inhibición mediada por anticuerpos en el reclutamiento endotelial por células metastásicas proporciona un apoyo específico para la selección como diana terapéutica de la ruta de IGF en la evolución del cáncer de mama la angiogénesis del cáncer.

Aunque se identificó IGFBP2 como regulador positivo del reclutamiento endotelial a través de su activación de un regulador positivo de este proceso (IGF1), también se descubrió MERTK como promotor de reclutamiento a través de su inhibición de un regulador negativo de quimiotaxia endotelial (GAS6). Por tanto, un solo miARN puede controlar un fenotipo complejo modulando tanto los reguladores positivos como los negativos de un fenómeno.

Posteriormente a su identificación como miARN supresor de metástasis, miR-126, que se expresa en desarrollo en células endoteliales, se seleccionó como diana genéticamente en ratones. Se encontró que la delección de miR-126 conducía a letalidad embrionaria parcial, pérdida de integridad vascular y hemorragia (Wang, S. *et al., Dev Cell* 15 (2), 261 (2008).). Por tanto, se encontró que miR-126 expresado de manera era un promotor de la angiogénesis en desarrollo normal en sistemas de ratón y pez cebra (Nicolini, S. *et al., Nature* 464 (7292), 1196 (2010) y Fish, J. E. *et al., Dev Cell* 15 (2), 272 (2008).)

En vista de su papel como promotor de angiogénesis, resultó inesperado que miR-126 también suprimía la angiogénesis en, por ejemplo, cáncer de mama, tal como se da a conocer en el presente documento. Resultó inesperado que miR-126 pudiera actuar al menos de dos modos diferentes. Por una parte, actúa de forma específica del tipo celular para suprimir la angiogénesis patológicas tal como se da a conocer en esta solicitud. Tal como se da a conocer en esta solicitud, miR-126 suprimía la migración endotelial patológica hacia metástasis. Por otra parte, mientras está en desarrollo, la expresión de miR-126 mantiene la integridad de los vasos. De hecho, se demostró que miR-126 endotelial regula la angiogénesis en desarrollo a través de la selección como diana de Spred-1 y PIK3R2, genes no se regularon significativamente por miR-126 en células de cáncer de mama (Wang, S. *et al., Dev Cell* 15 (2), 261 (2008) y Fish, J. E. *et al., Dev Cell* 15 (2), 272 (2008).). Véase la tabla 6. A la inversa, se encontró que la inhibición de miR-126 en células endoteliales no potencia el reclutamiento endotelial por células endoteliales (figura 18) como lo hace en células de cáncer de mama. De acuerdo con esto, la inhibición de miR-126 en células endoteliales no alteró la expresión de PTPN11, MERTK o IGFBP2, mientras que aumentó la expresión de las dianas de miR-126 endoteliales establecidas, SPRED1 y PIK3R2 (figura 19).

Tabla 6

Nombre del gen	LM2	miR-126 OE de LM2	Veces
SPRED1	979	851	-1,1030
PIK3R2	2188	1513	-1,2634

Ejemplo 10. Identificación de genes o ARN no codificantes que regulan la colonización de cáncer

metastásico de cualquier tejido corporal

Este ejemplo describe dos enfoques para identificar un gen o un ARN no codificante que regula la colonización de cáncer metastásico de un tejido corporal

5

1. Enfoque de Lenti-miR

Transducción de biblioteca Lenti-miR en células e inyección en animales

10 En este enfoque se usó la biblioteca Lenti-miR (SYSTEM BIOSCIENCES, n.º de catálogo PMIRHPLVAHT-1). Esta biblioteca consiste en un conjunto de lentivirus que contiene microARN precursores representativos de todo el genoma humano. Se transdujeron poblaciones parenterales de las líneas celulares SW620 y LS174T (2 x 10⁵ células) con la biblioteca a una multiplicidad de infección (MOI) de 1 para obtener un conjunto heterogéneo de células parenterales con células individuales que sobreexpresan diferentes microARN. Cada precursor de microARN
15 estaba representado aproximadamente en 50X tras la transducción. Cuatro días tras la transducción, se apartó la mitad de las células y se extrajo el ADN genómico usando el kit DNeasy de Qiagen. Este fue el conjunto de referencia del ADN genómico antes de la presión selectiva de colonización hepática. La mitad de la población restante se inyectó en los hígados de ratones NOD/SCID. 3-5 semanas tras la inyección, se extrajo el ADN genómico de los tumores que se formaron en los hígados. Se realizaron transducciones e inyecciones en
20 repeticiones para ambas líneas celulares.

Identificación de microARN que modulan la colonización hepática

25 Se recuperaron precursores de microARN derivados de Lenti-miR de ADN genómico mediante amplificación por PCR en el intervalo linear usando cebadores que contienen el promotor de T7 específicos de biblioteca (cebador directo: 5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGGGCCTGGAGACGCCATCCACGCTG-3'; cebador inverso: 5': GATGTGCGCTCTGCCCACTGAC-3') en el ADN genómico de referencia y el ADN genómico tumoral. Se realizaron cuatro reacciones de PCR usando 400 ng de ADN genómico como molde y se reunieron por muestra para garantizar la representación adecuada de microARN precursores transducidos.

30

Los amplicones de PCR resultantes fueron un material compuesto de diferentes microARN precursores con secuencias de promotor de T7 y se usaron como moldes para la transcripción *in vitro* para obtener una biblioteca de precursores biotinilada. La biblioteca biotinilada obtenida de los tumores y el conjunto de referencia se marcaron con Cy3 y Cy5, respectivamente y se hibridaron con un microalineamiento diseñado para detectar las secuencias de
35 microARN (Genosensor). Se realizó un experimento de intercambio de colorante para controlar la diferencia de colorantes.

40

Se calculó la razón de la abundancia de cada precursor de microARN entre el conjunto de referencia y tras la presión selectiva durante la colonización hepática tras la normalización de la señal de microalineamiento. Los microARN quedaron representados en exceso en la población tumoral en comparación con el conjunto de referencia se consideraron promotores y los microARN que quedaron representados insuficientemente, supresores de la colonización hepática.

45

2. Enfoque de Lentiplex

Transducción de biblioteca Lentiplex en células e inyección en animales

50 En este enfoque se usó la biblioteca de ARNhc de genoma completo Lentiplex (SIGMA-ALDRICH, n. de catálogo SHPH01). Esta biblioteca es una biblioteca reunida lentivirus que contiene aproximadamente 150.000 ARNhc que seleccionan como diana el genoma humano completo, seleccionándose como objetivo cada gen por 3-5 ARNhc independientes.

55

Se transdujeron poblaciones parenterales de las líneas celulares SW620, LS174T y WiDR (2 x 10⁶ células) con la biblioteca a una MOI de 1, dando como resultado un conjunto población heterogénea, expresando las células individuales un único ARNhc. Se tradujo cada ARNhc a una representación de aproximadamente 100X. 48 h tras la transducción; se seleccionaron las células transducidas con puomicina durante 48 h para retirar las células no transducidas. Tras la selección con antibióticos, se dejó que las células restantes se recuperaran durante una semana antes de los experimentos posteriores. Se apartó la mitad de las células seleccionadas y se extrajo el ADN genómico. Este fue el conjunto de referencia de ADN genómico antes de la presión selectiva de la colonización hepática. La mitad de la población restante se inyectó en los hígados de ratones NOD/SCID. 3-5 semanas tras la inyección, se extrajo el ADN genómico de los tumores que se formaron en los hígados. Se realizaron transducciones e inyecciones en repeticiones para las tres líneas celulares.

60

Identificación de genes novedosos que modulan la colonización hepática a través del examen de ARNhc reunido de genoma completo

65

Para recuperar un conjunto complejo de secuencias de biblioteca de ARNhc a partir de ADN genómico, se usó un enfoque de PCR seguido por secuenciación masiva Solexa de amplicones de PCR. Se realizó amplificación de PCR inicial en 500 ng de ADN genómico usando cebadores (cebador directo: 5'-TGGACTATCATATGCTTACCGTAACT-3'; cebador inverso: 5'-AAAGAGGATCTCTGTCCCTGT-3') específicos para el vector viral, seguido por cebadores con secuencias requeridas para secuenciación masiva Solexa (cebador directo: 5'-AATGATACGGCGACCACCGAG ATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTCCGATCTGTATTCTTGGCTTTATAT ATCTTGTGGAAAGGAC-3'; cebador inverso: 5'-CAAGCAGAAGACGGCATACG AGCTCTCCGATCTGGATGAATACTGCCATTTGTCTCGAGTCCGA-3') para obtener amplicones que contenían las secuencias de ARNhc. Se realizaron diez reacciones de PCR equivalentes a 5 ug de ADN genómico por cada conjunto de ADN genómico y se reunieron los productos para secuenciación para garantizar la representación adecuada de ARNhc.

Los amplicones reunidos representan un material compuesto de secuencias de ARNhc de genoma completo y se realizó secuenciación masiva para determinar la representación de cada especie de ARNhc en el conjunto de referencia en comparación con el conjunto amplificado de tumores. Se normalizó el recuento para cada especie de ARNhc contra el número total de secuencias obtenidas y se identificaron sus dianas génicas haciéndolas coincidir con una base de datos de Sigma. Las dianas génicas cuyos ARNhc que quedaron representadas en exceso en el conjunto tumoral se consideran supresores de la colonización hepática y viceversa. Para explicar efectos no específicos de silenciamiento de ARNhc, sólo los resultados positivos de dianas génicas identificados por tres o más "resultados positivos" de ARNhc independientes se consideraron posibles supresores o promotores.

Ejemplo 11. El anticuerpo monoclonal que neutraliza la función de IGFBP2 inhibió el reclutamiento endotelial por las células de cáncer de mama humanas metastásicas.

Este ejemplo demuestra un anticuerpo monoclonal que inhibe el reclutamiento endotelial por células de cáncer de mama metastásicas uniéndose a IGFBP2 e inhibiendo la interacción (unión) de IGF1 a IGFBP2. Mediante el bloque de la unión de IGF1 a IGFBP2, este anticuerpo monoclonal puede inhibir el reclutamiento endotelial por las células de cáncer de mama humanas metastásicas. Los métodos usados para generar anticuerpos neutralizantes frente a IGFBP2 son los conocidos comúnmente en la técnica.

En resumen, se inmunizaron ratones con péptido total IGFBP2 recombinante para generar una respuesta de anticuerpo policlonal. A continuación, se generaron bibliotecas de hibridomas mediante la fusión de células B aisladas de los ratones inmunizados a líneas celulares de mieloma. Entonces se aisló el sobrenadante de estos hibridomas con el fin de examinar e identificar aquellas células de hibridoma que generan anticuerpos que se unen a IGFBP2 con alta afinidad, usando ensayos de ELISA competitivos de captura de anticuerpos (figura 20). Una vez identificados, se examinaron los hibridomas que generan anticuerpos con alta afinidad para IGFBP2 con el fin de identificar aquellos que generan anticuerpos que pueden inhibir que IGFBP2 se una a IGF1, usando ensayos de ELISA competitivos de captura de anticuerpos (figura 21). La biblioteca de hibridomas wo6663-1 contenía anticuerpos que se unen a IGFBP2 para neutralizar la unión de IGF1, sin unión a los otros miembros de la familia de IGFBP, IGFBP3 e IGFBP4 (figuras 20 y 21). Para aislar células de hibridoma de clones individuales (monoclonales), se realizó separación y examen en la biblioteca de hibridomas wo6663-1. Se examinaron 2000 clones de hibridomas individuales (monoclonales) de esta biblioteca para identificar los que generaban anticuerpos monoclonales que se unen a IGFBP2 con alta afinidad para neutralizar la unión de IGF1. La tabla en la figura 22 enumera datos del ensayo competidor de ELISA de captura de anticuerpos de varios anticuerpos monoclonales aislados del examen anterior, muchos de los cuales tenían afinidad por IGFBP2 y podían inhibir la unión de IGF1 a IGFBP2 (figura 22), incluyendo el anticuerpo monoclonal IGFBP2_14 (M14) (recuadro en líneas discontinuas en la figura 22). Se examinaron entonces estos anticuerpos monoclonales neutralizantes contra IGFBP2 para identificar los que podían inhibir el reclutamiento endotelial por células metastásicas usando ensayos de migración endotelial Transwell. El anticuerpo monoclonal IGFBP2_M14 (M14) inhibió el reclutamiento endotelial por células de cáncer de mama metastásicas humanas.

Para identificar anticuerpos monoclonales que podrían inhibir el reclutamiento endotelial, se sometieron a prueba los anticuerpos monoclonales neutralizantes contra IGFBP2 generados en el examen anterior en un ensayo de reclutamiento endotelial *in vitro* usando Transwell. Se colocaron células de cáncer de mama humanas LM2 altamente metastásicas en el fondo de una cámara de Boyden, donde pudo someterse a ensayo su capacidad para reclutar HUVEC a través de un inserto Transwell poroso. Se añadió una pequeña concentración fisiológica de anticuerpos neutralizantes contra IGFBP2 (incluyendo M1, M4, M6, M9, M13, M14, M15 y M16 (de la figura 22)) a los Transwell de manera individual en concentraciones fisiológicas. De todos los anticuerpos sometidos a prueba, M14 (recuadro en línea discontinua en la figura 22) pudo inhibir significativamente el reclutamiento (células migradas/campo) de células HUVEC (reducción del 50% en células migradas) frente a los anticuerpos control negativos IgG y M5 (figura 23). Esto demuestra la capacidad del anticuerpo monoclonal M14 para inhibir el reclutamiento de células endoteliales humanas por células de cáncer metastásicas humanas (figura 23).

Para caracterizar adicionalmente M14, se secuenciaron las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera del anticuerpo. La secuencia de aminoácidos de las regiones variables tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera de M14 se presentan en la tabla 7.

Tabla 7

<p>Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de M14</p>	<p>QVQLEQSGGGLVQPGGSLKLSGASGFTFSDYYMYWIRQTPEKRLEWVAYISNG GGITYYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSRLKSEDTAVYYCVRRSDGSGWFVYW GQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 9)</p>
<p>Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de M14</p>	<p>DIVITQSPSSLAVSVGEKVTLSCKSSQSLLYSSNQKNCLAWYQQKPGQSPKLLIYW ASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQYYSYLTFGAGTKLEL KRADAAPTVS (SEQ ID NO:10)</p>

Ejemplo 12. El anticuerpo monoclonal M14 inhibió la evolución tumoral del cáncer de mama humano *in vivo*.

5 Este ejemplo demuestra que el anticuerpo neutralizante M14 contra IGFBP2 puede inhibir la evolución tumoral y la metástasis tumoral *in vivo* en un modelo de ratón de cáncer de mama humano.

10 Para someter a prueba si el anticuerpo monoclonal M14 podía reducir la carga tumoral e inhibir la evolución tumoral *in vivo*, se mezclaron 2000 células de cáncer de mama humanas MDA-MB-231 que expresan luciferasa en una razón 1:1 con factor de crecimiento reducido Matrigel y se inyectaron bilateralmente en los panículos adiposos mamarios de ratones NOD-SCID. Inmediatamente tras la inyección, se inyectó luciferina y se cuantificó la señal de bioluminiscencia de las células de cáncer para establecer una señal de nivel inicial en el día 0 de la carga tumoral. Entonces se separaron aleatoriamente los ratones en dos grupos: un grupo de control que se trató con PBS solo, y un grupo de M14 tratado con el anticuerpo monoclonal M14. Se administraron inmediatamente inyecciones intraperitoneales de PBS y anticuerpo M14 (250 microgramos) en el día 0 a los ratones en cada grupo respectivamente, y después posteriormente, se administraron inyecciones bisemanalmente. Se realizó un seguimiento de la carga tumoral tanto en los ratones tratados con M14 como en los de control tratados con PBS dos veces a la semana mediante bioluminiscencia del indicador de luciferasa. En el día 14, la evolución tumoral estaba significativamente inhibida por el tratamiento con M14 (reducción de 7 a 11 veces en la evolución tumoral) en comparación con los ratones tratados con PBS (figura 24).

25 Los ejemplos y la descripción anteriores de las realizaciones preferidas deben considerarse como ilustrativas, más que limitativas la presente invención tal como se define por las reivindicaciones. Tal como se apreciará fácilmente, pueden utilizarse numerosas variaciones y combinaciones de las características expuestas anteriormente sin apartarse de la presente invención tal como se expone en las reivindicaciones. No se considera que tales variaciones se aparten del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Agente que se une a IGFBP2 e inhibe que IGFBP2 se una a IGF1, para su uso en el tratamiento de cáncer.
- 5 2. Agente para su uso según la reivindicación 1, en el que el tratamiento da como resultado una inhibición de metástasis de cáncer.
3. Agente para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el cáncer es un cáncer metastásico.
- 10 4. Agente para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el cáncer es un cáncer de mama.
5. Agente para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el agente es un anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo.
- 15 6. Agente para su uso según la reivindicación 5, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
7. Agente para su uso según la reivindicación 6, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, o parte de unión a antígeno del mismo.
- 20 8. Agente para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 6-7, en el que el anticuerpo monoclonal se une a IGFBP2 con una K_D de 10^{-7} M o menos.
- 25 9. Agente para su uso según la reivindicación 7, en el que el anticuerpo monoclonal no presenta sustancialmente unión a IGFBP3 o IGFBP4.
10. Agente para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 6-9, en el que el anticuerpo monoclonal inhibe el reclutamiento de células endoteliales por células de cáncer de mama humanas metastásicas.
- 30 11. Agente para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 6-10, en el que el anticuerpo monoclonal es humanizado.
- 35 12. Agente para su uso según la reivindicación 6, en el que el anticuerpo monoclonal es una versión humanizada de un primer anticuerpo, comprendiendo dicho primer anticuerpo una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, en el que dicho anticuerpo monoclonal se genera mediante injerto de CDR.
- 40 13. Anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo, que se une a IGFBP2, comprendiendo dicho anticuerpo una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10.
- 45 14. Anticuerpo, o parte de unión a antígeno del mismo según la reivindicación 13, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
15. Anticuerpo monoclonal, o parte de unión a antígeno del mismo, que se une a IGFBP2, anticuerpo monoclonal que es una versión humanizada de un primer anticuerpo, comprendiendo dicho primer anticuerpo una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:9 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, en el que dicho anticuerpo monoclonal se genera mediante injerto de CDR.
- 50

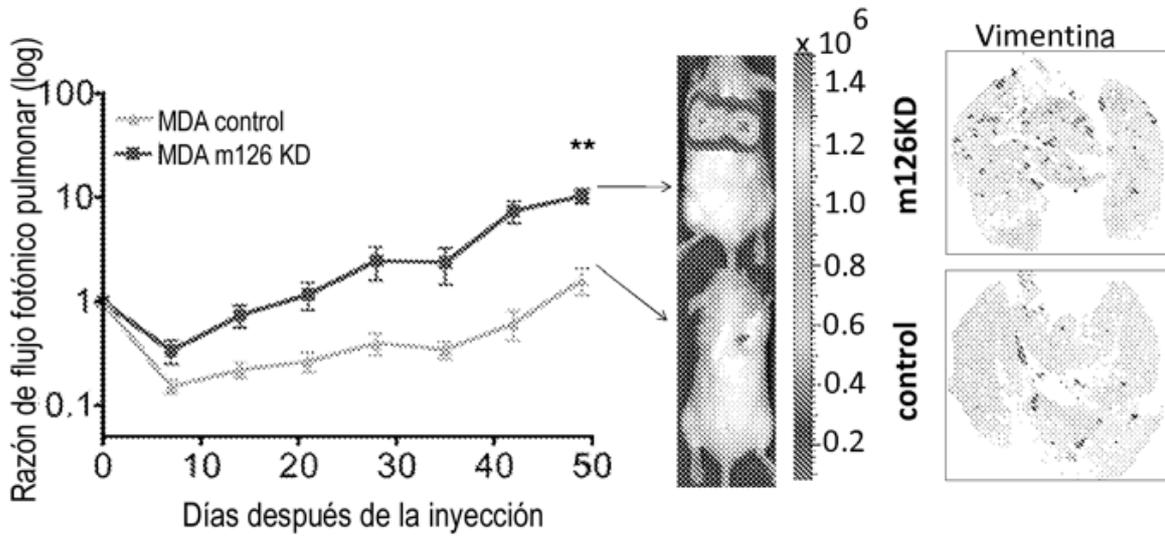


FIG. 1A

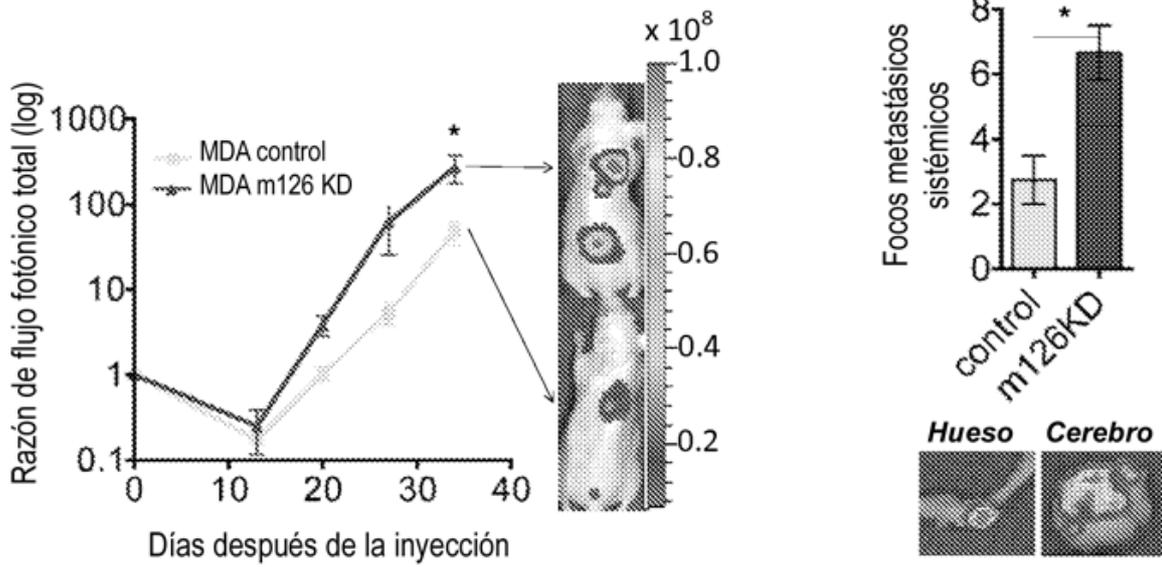


FIG. 1B

FIG. 1C

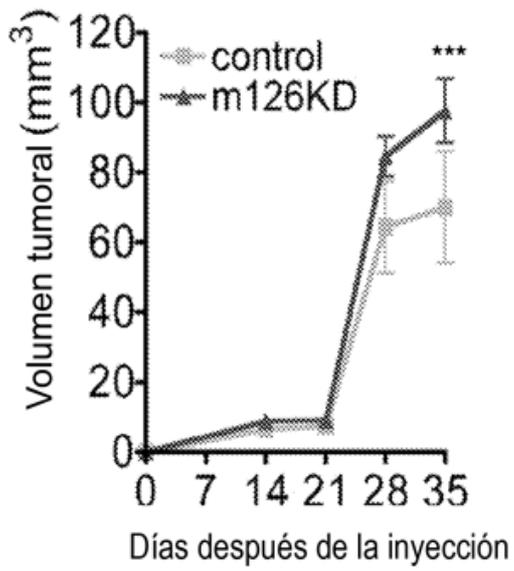


FIG. 1D

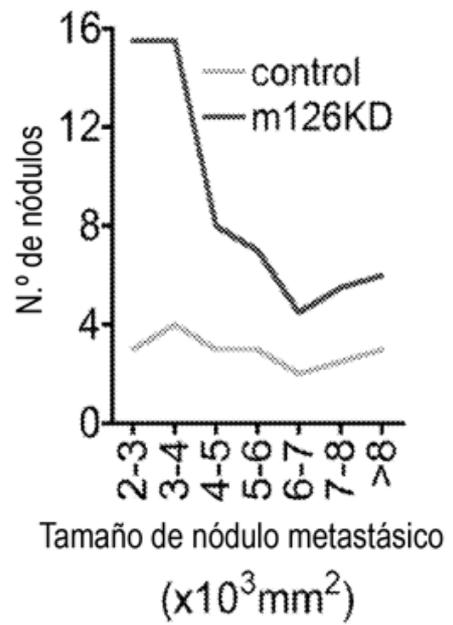


FIG. 1E

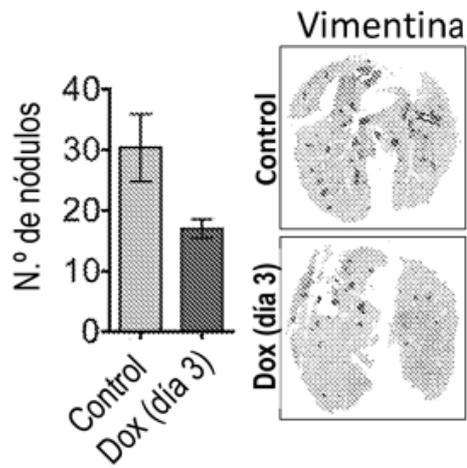


FIG. 1F

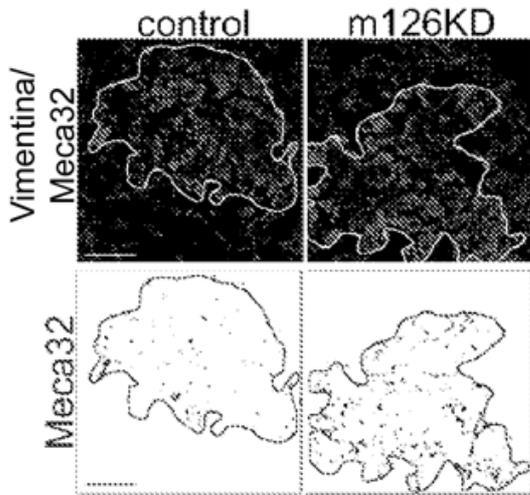


FIG. 2A

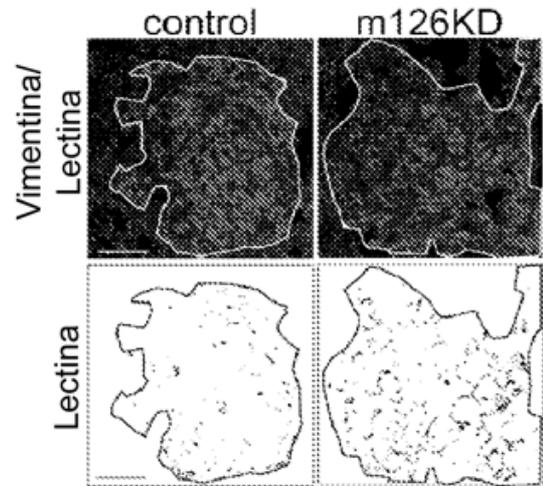


FIG. 2B

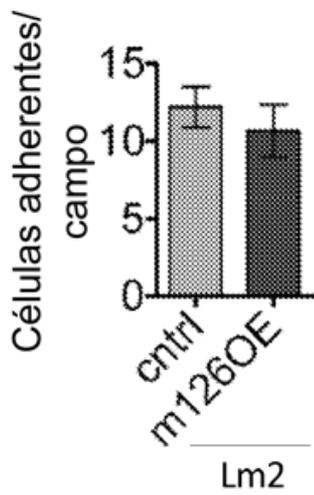


FIG. 2C

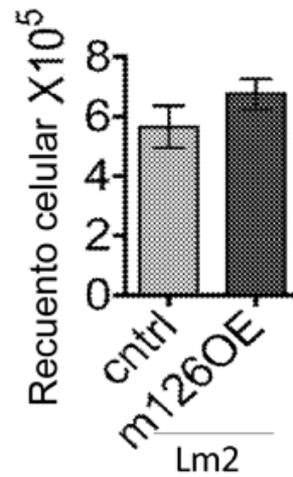


FIG. 2D

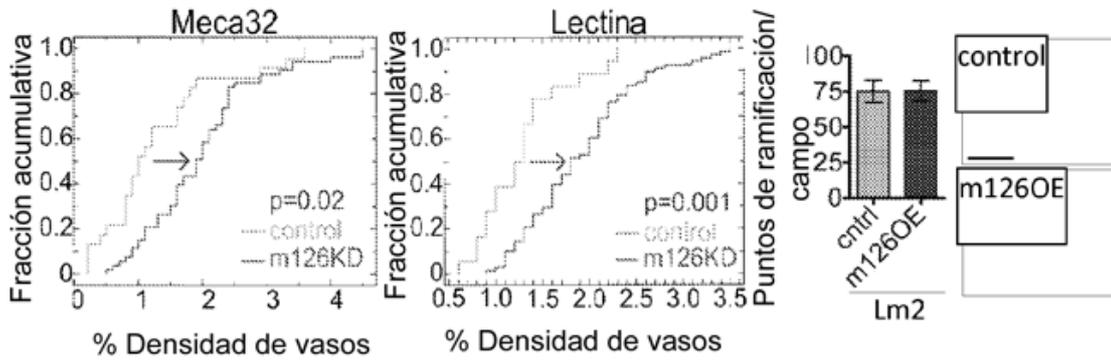


FIG. 2E

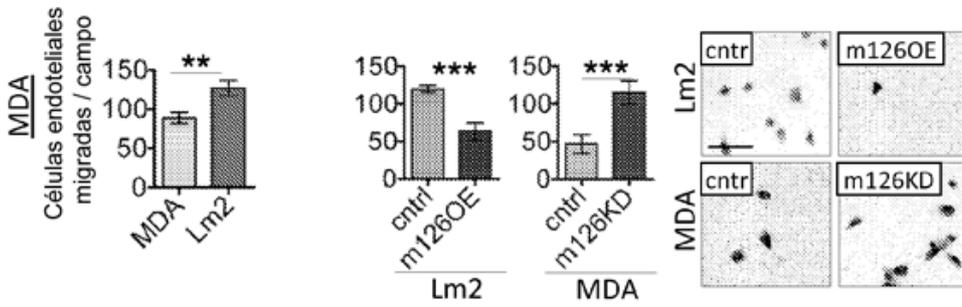


FIG. 2F

Fig. 2G

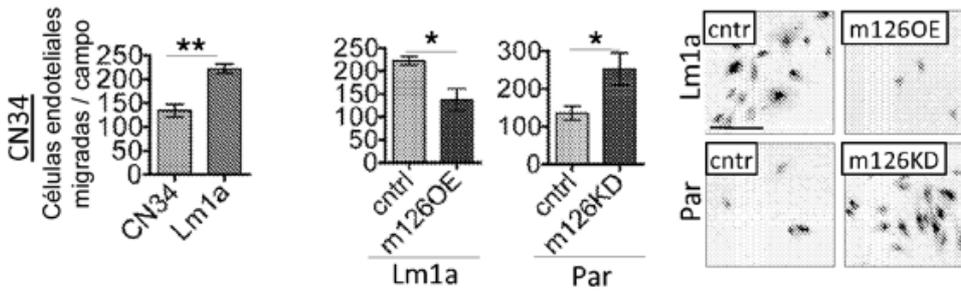


FIG. 2H

Fig. 2I

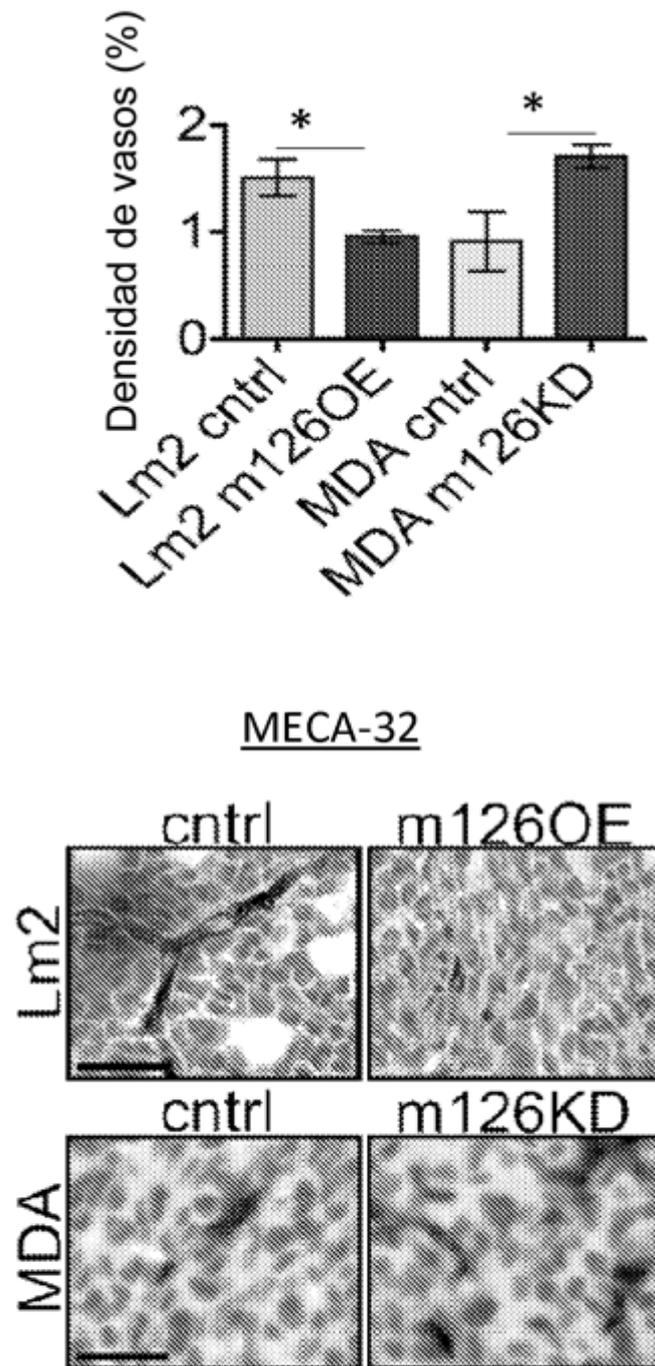


FIG. 2J

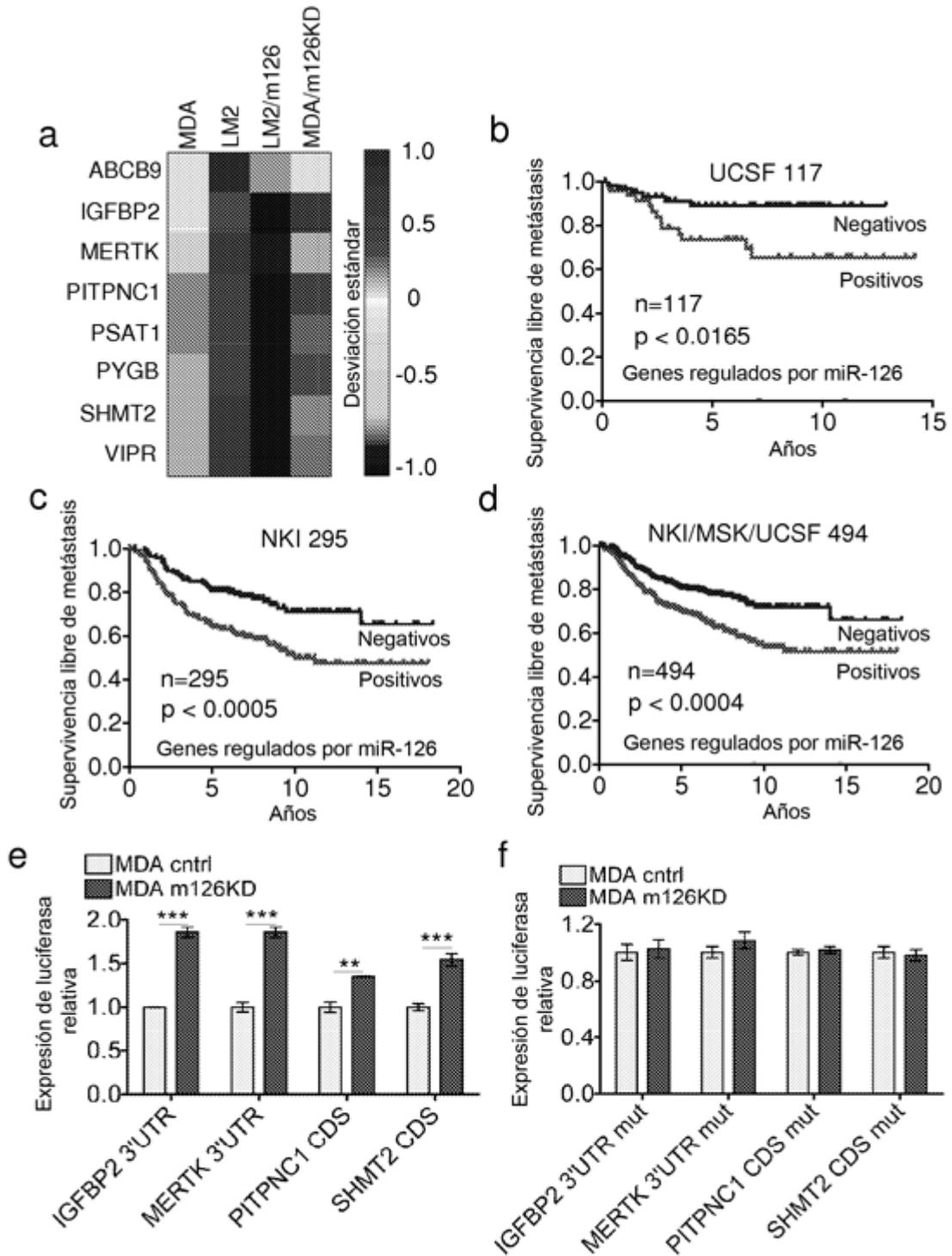


FIG. 3

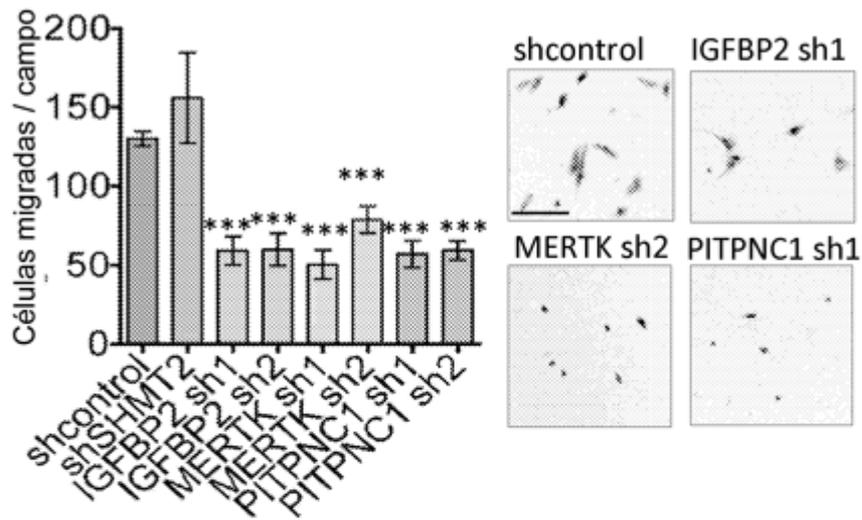


FIG. 4A

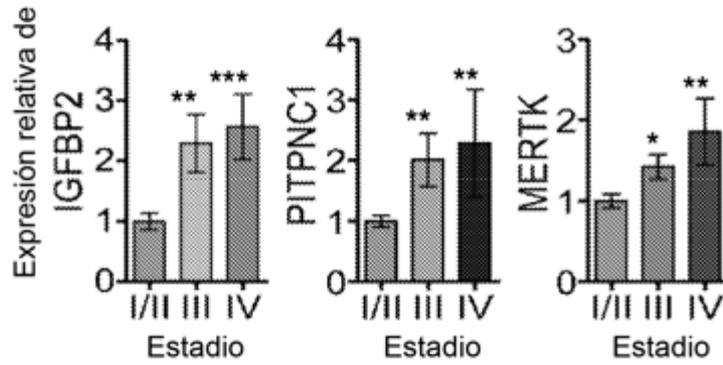


FIG. 4B

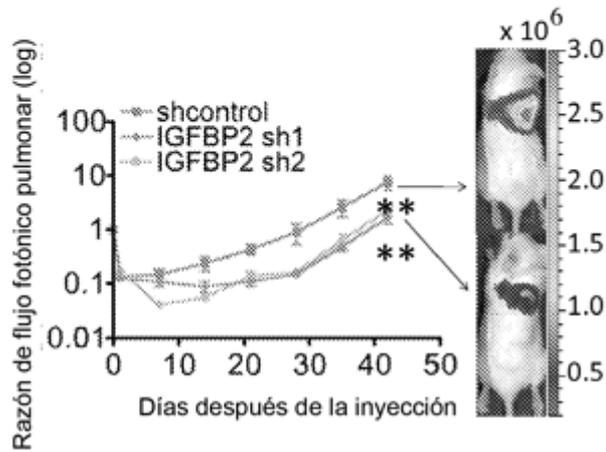


FIG. 4C

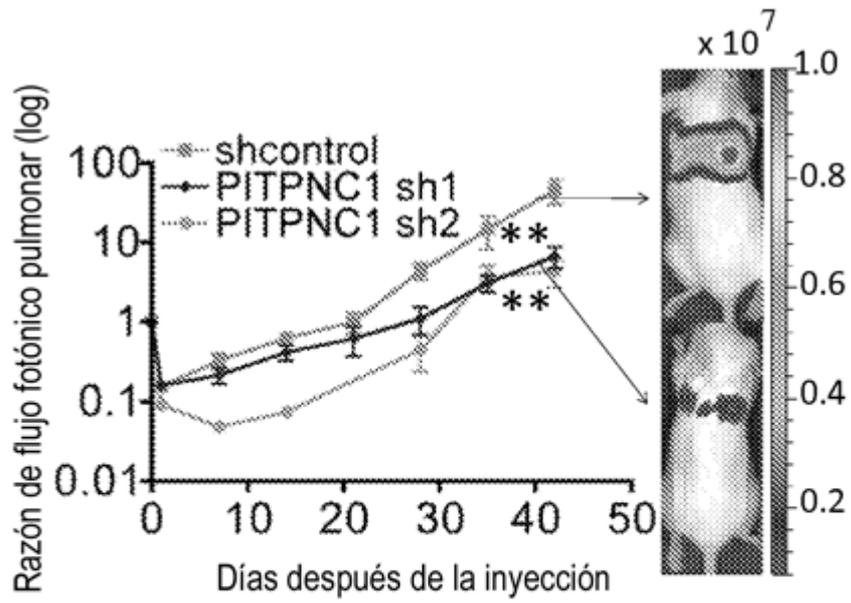


FIG. 4D

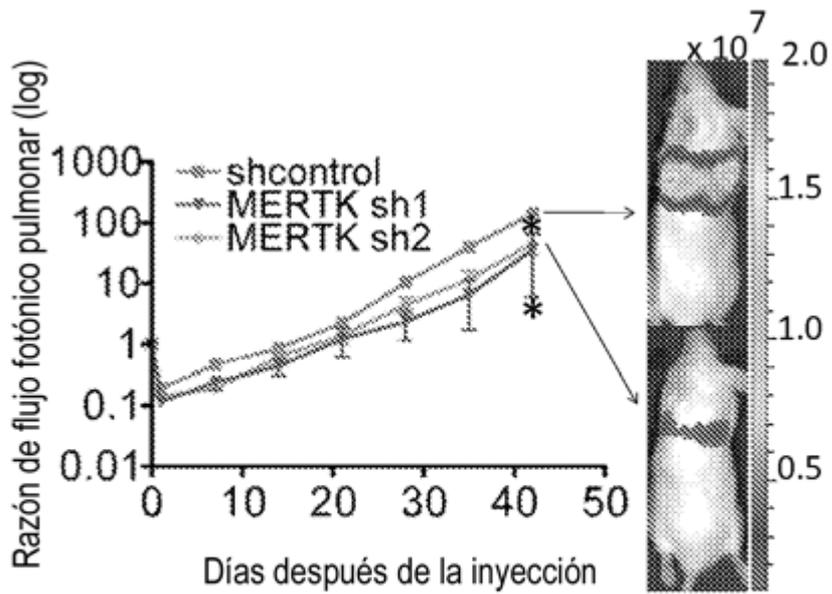


FIG. 4E

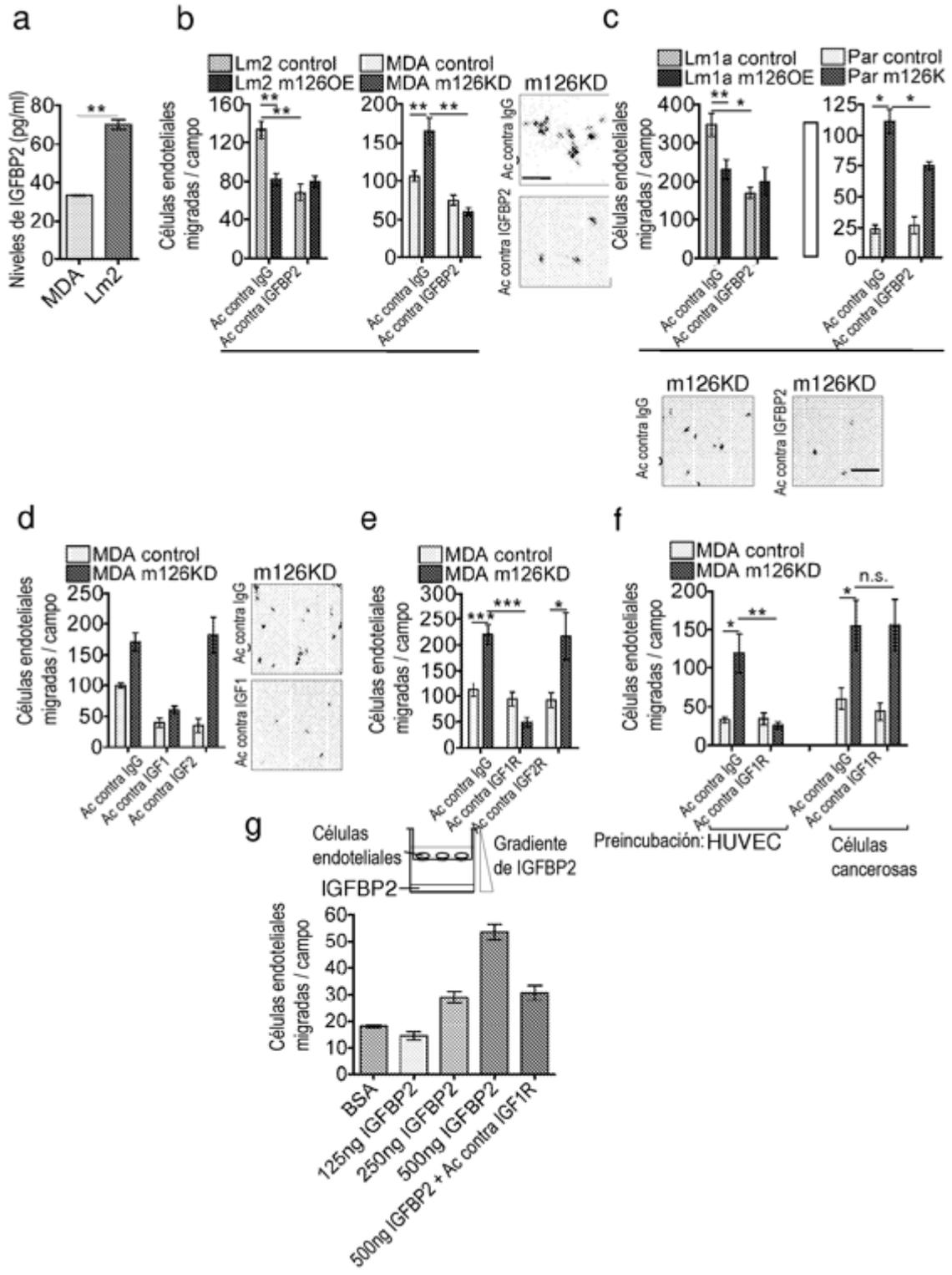


FIG. 5

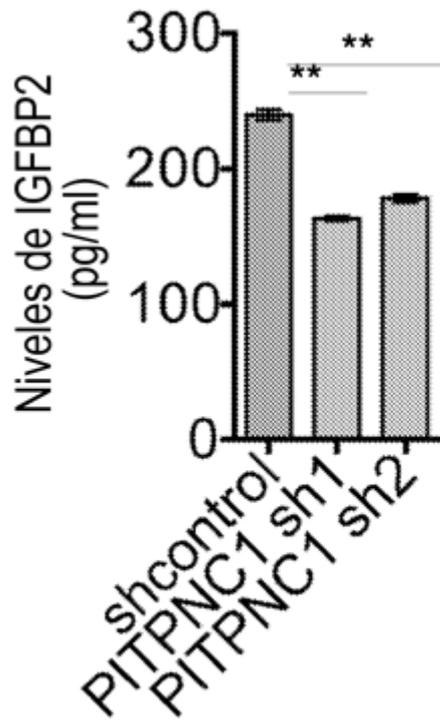


FIG. 6A

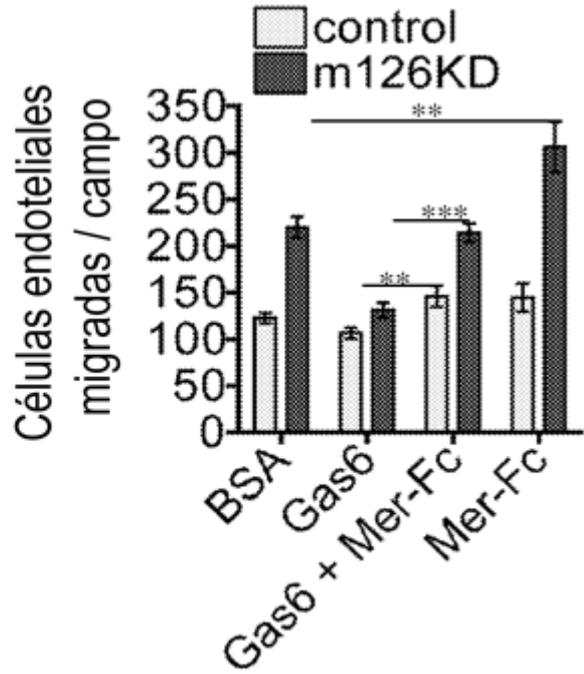


FIG. 6B

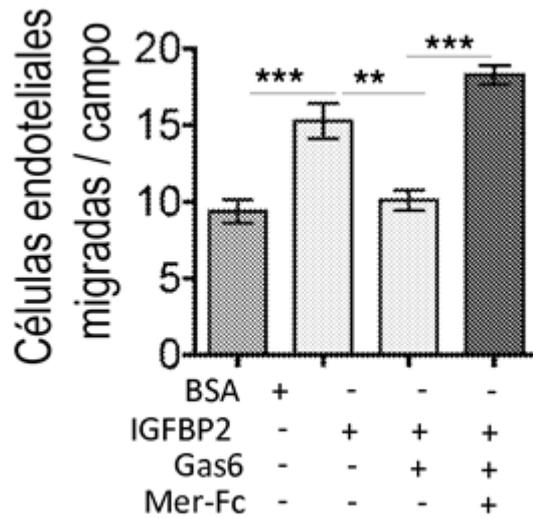


FIG. 6C

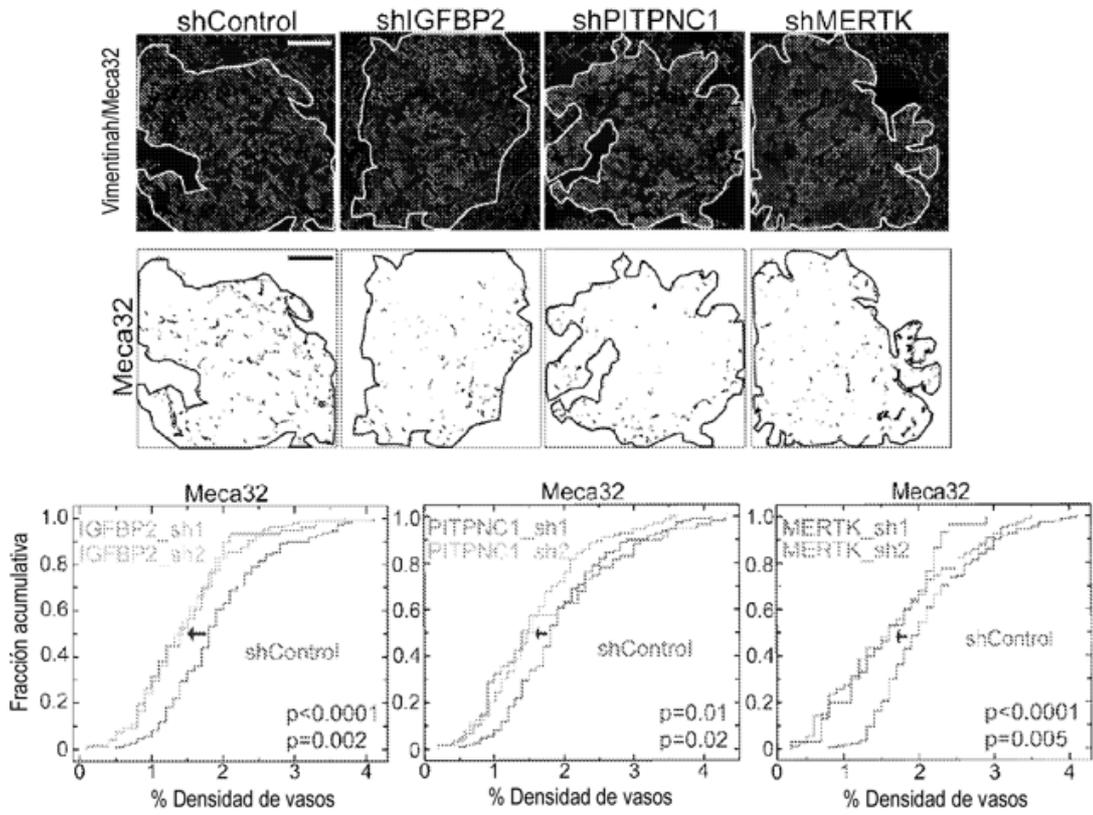


FIG. 6D

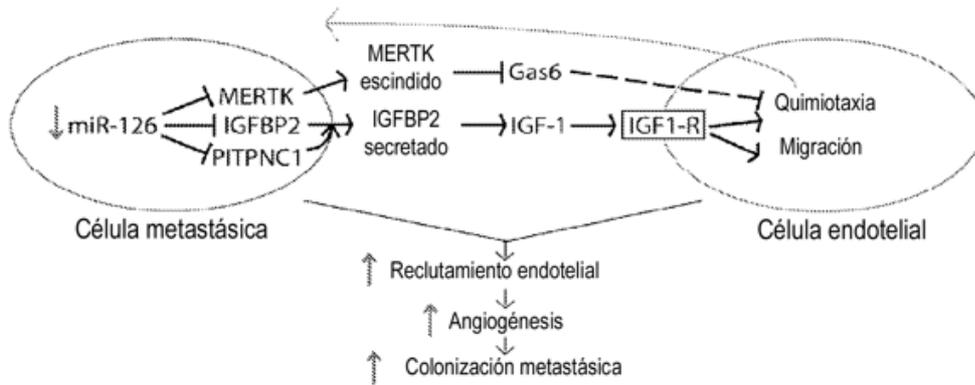


FIG. 6E

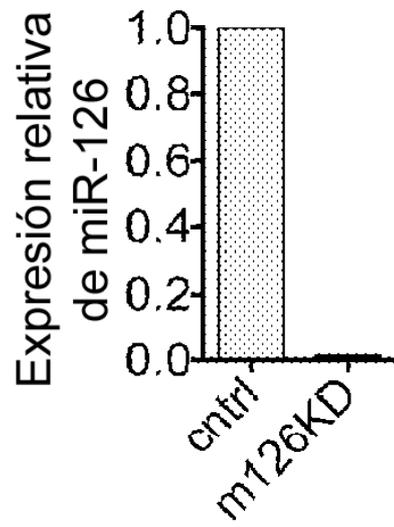


FIG. 7

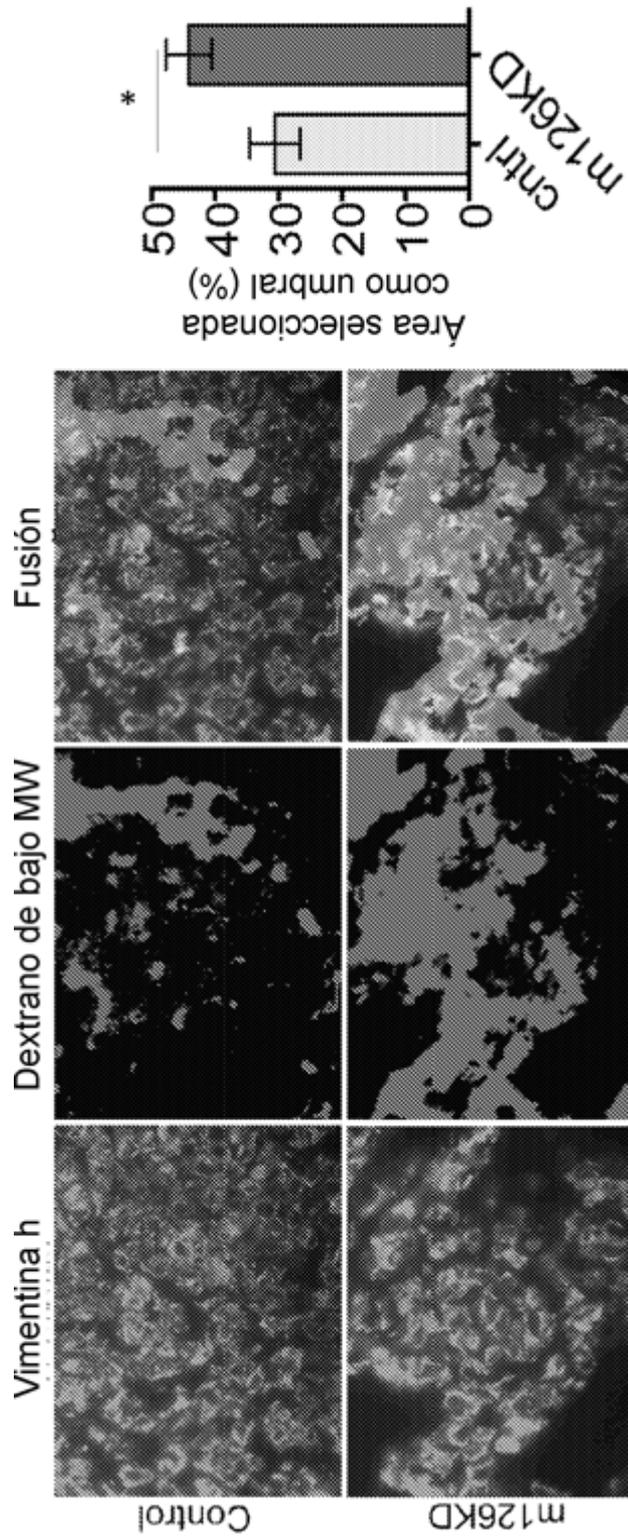


FIG. 8

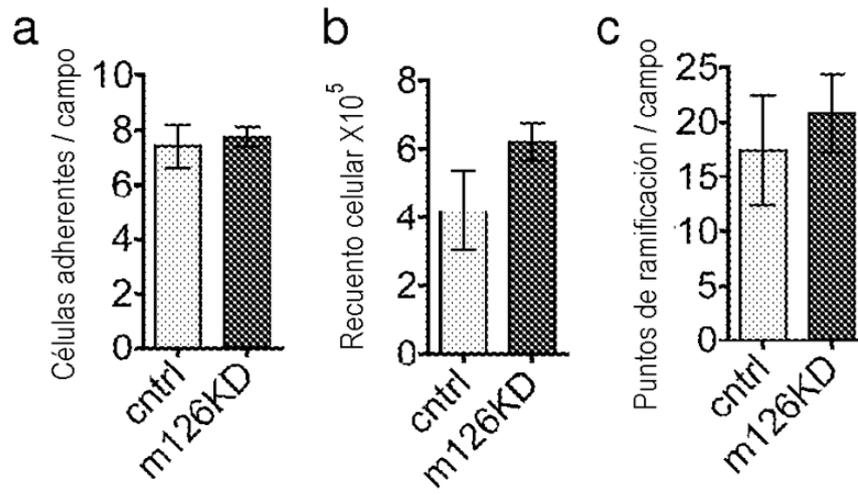


FIG. 9

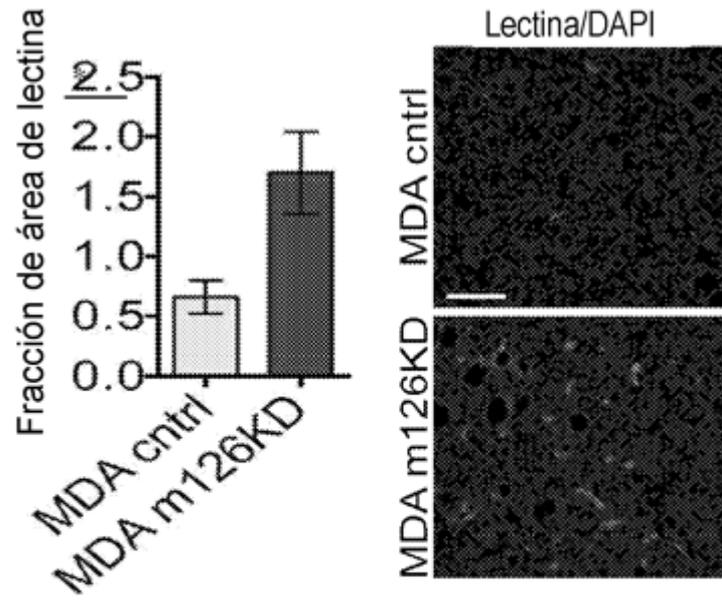


FIG. 10A

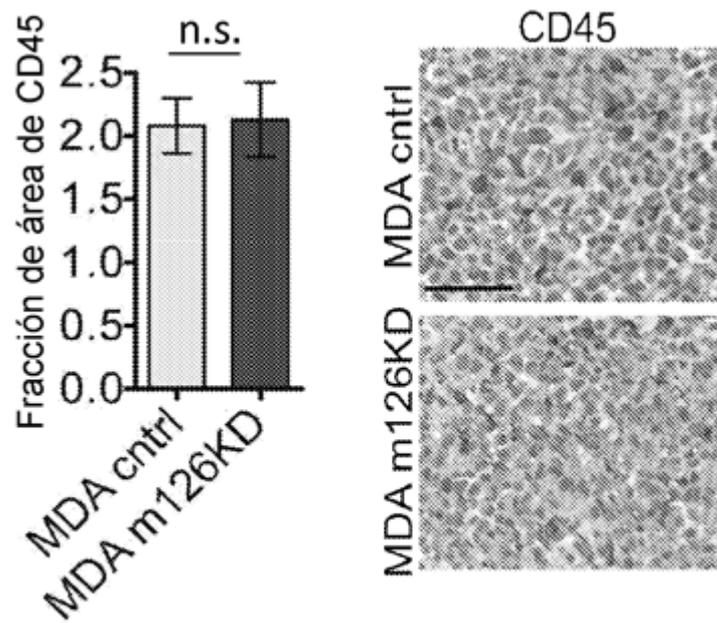


FIG. 10B

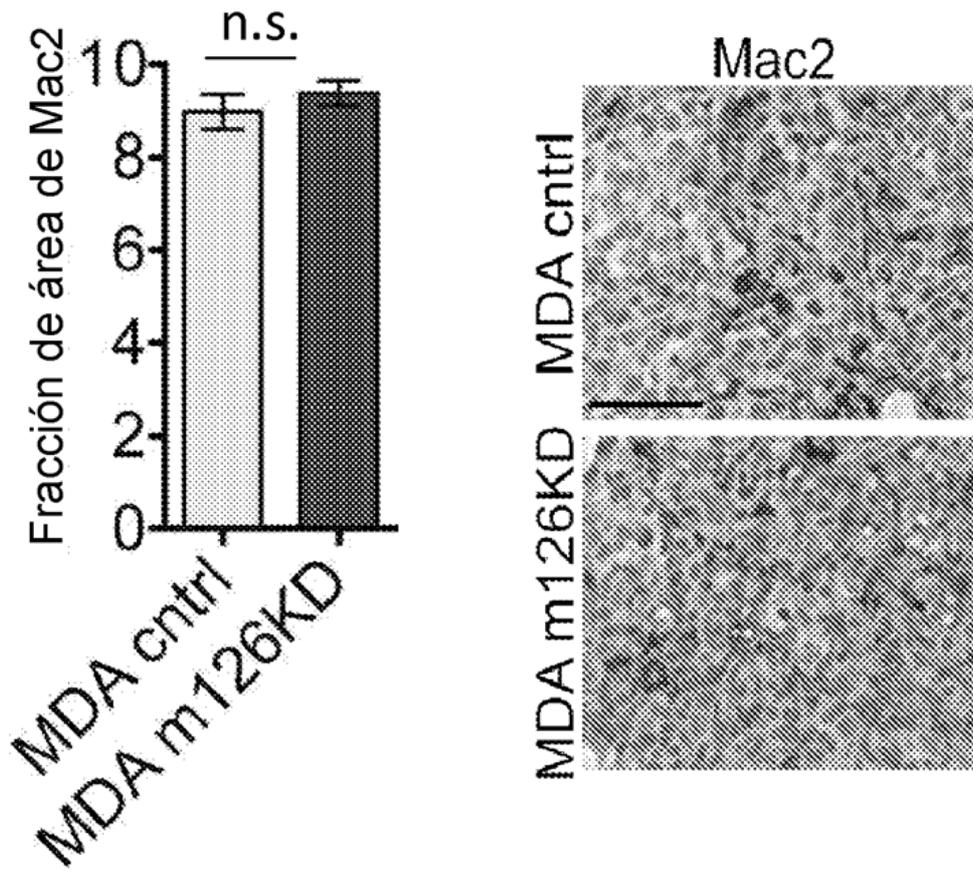


FIG. 10C

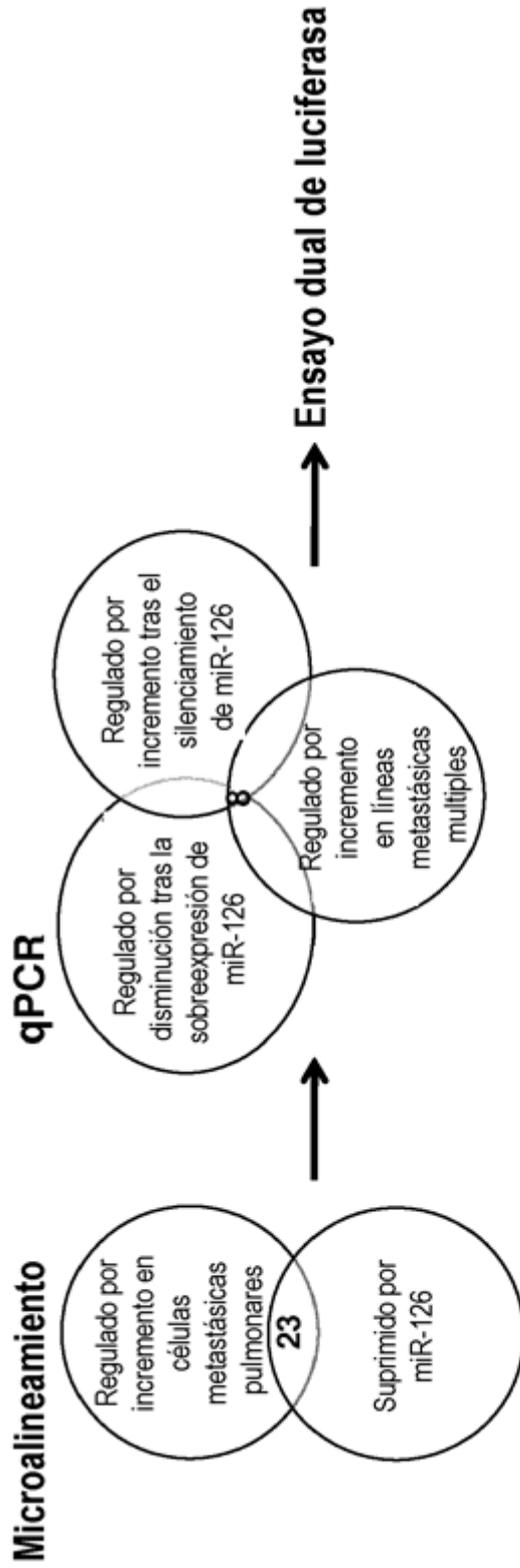


FIG. 11

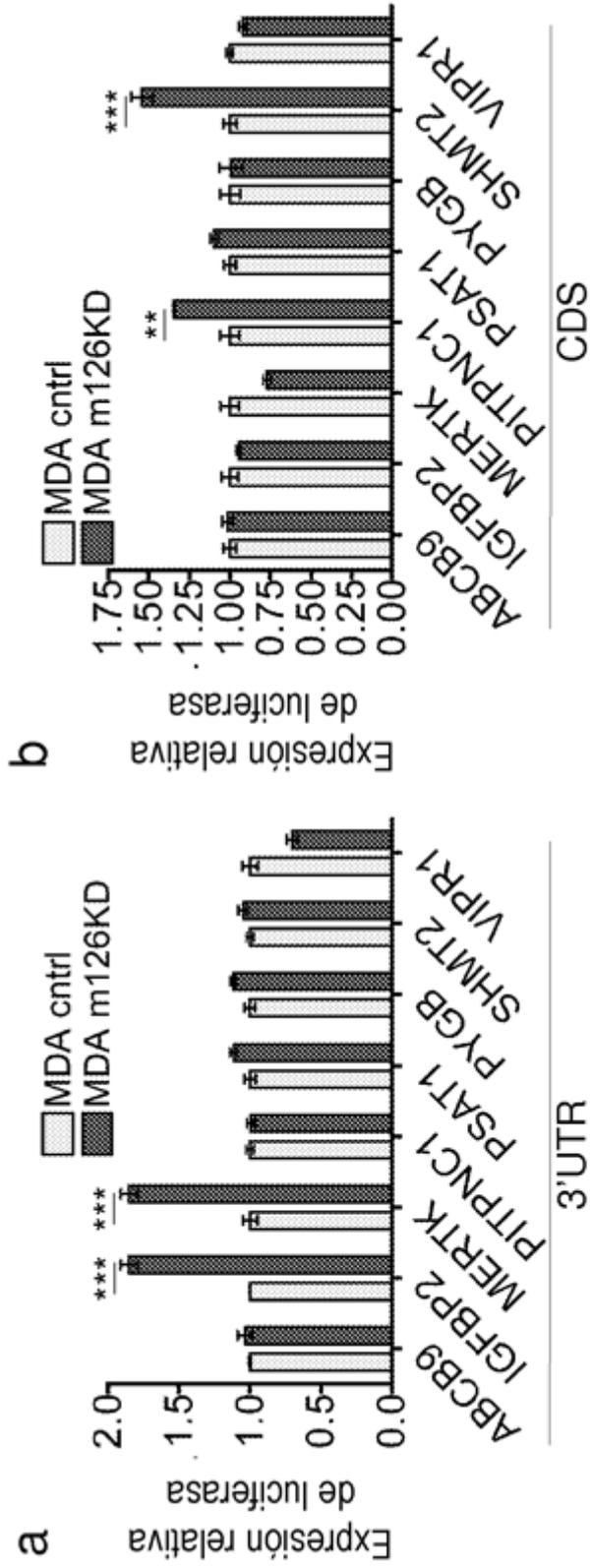


FIG. 12

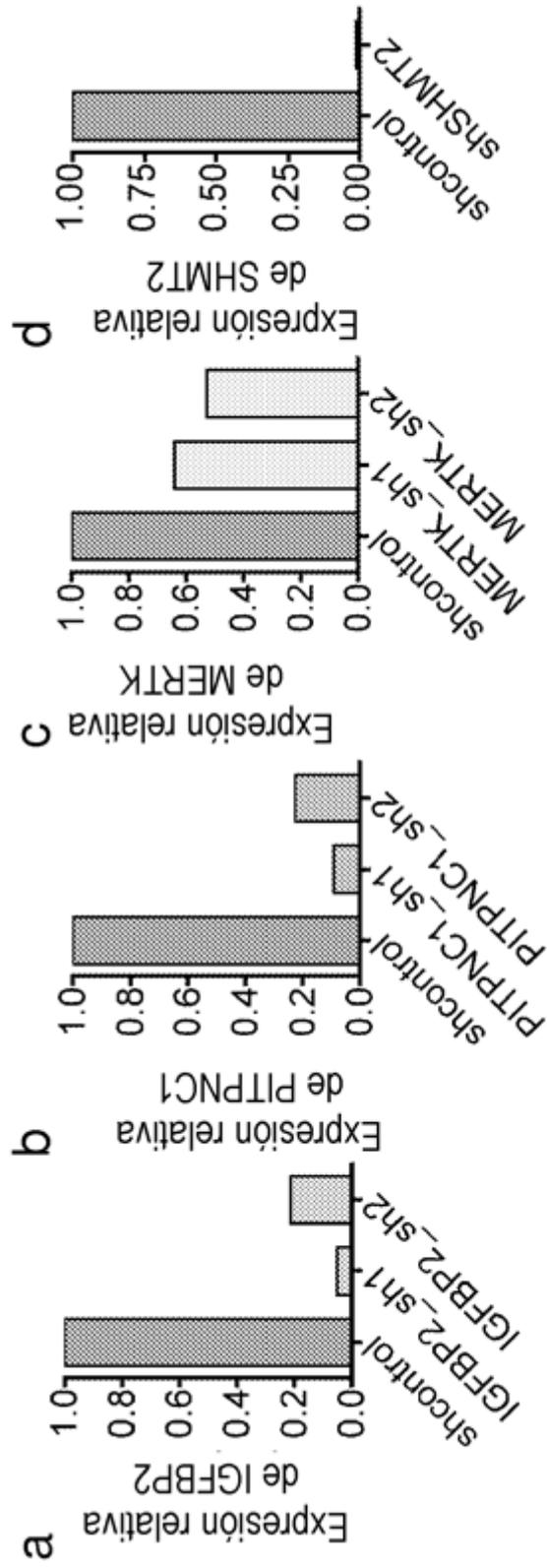


FIG. 13

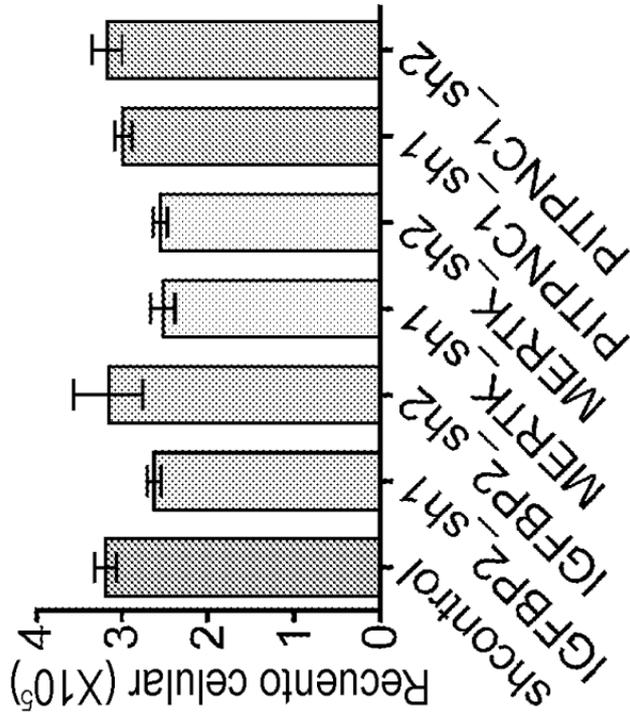


FIG 14

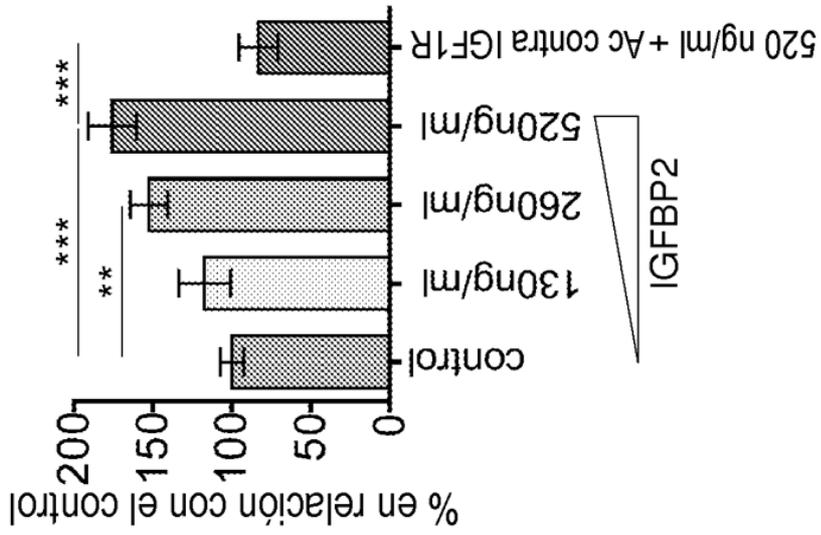


FIG. 15

Células CM



FIG. 16

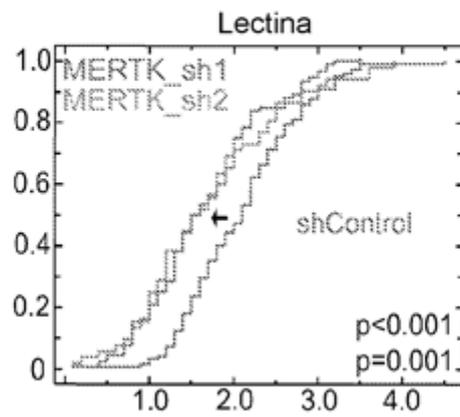
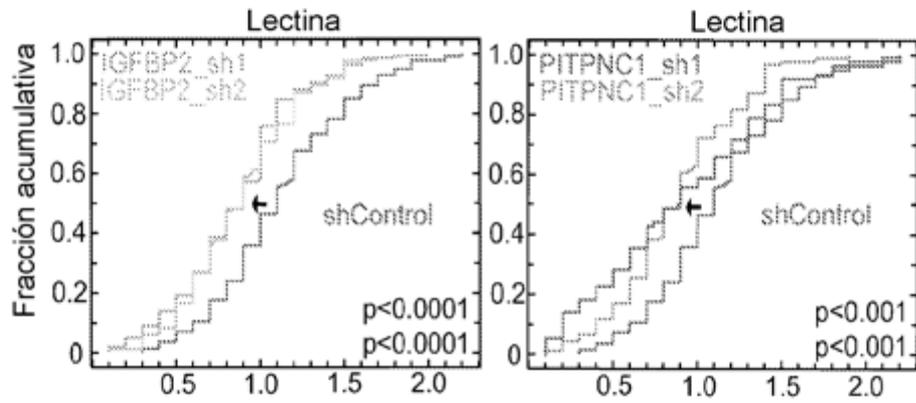
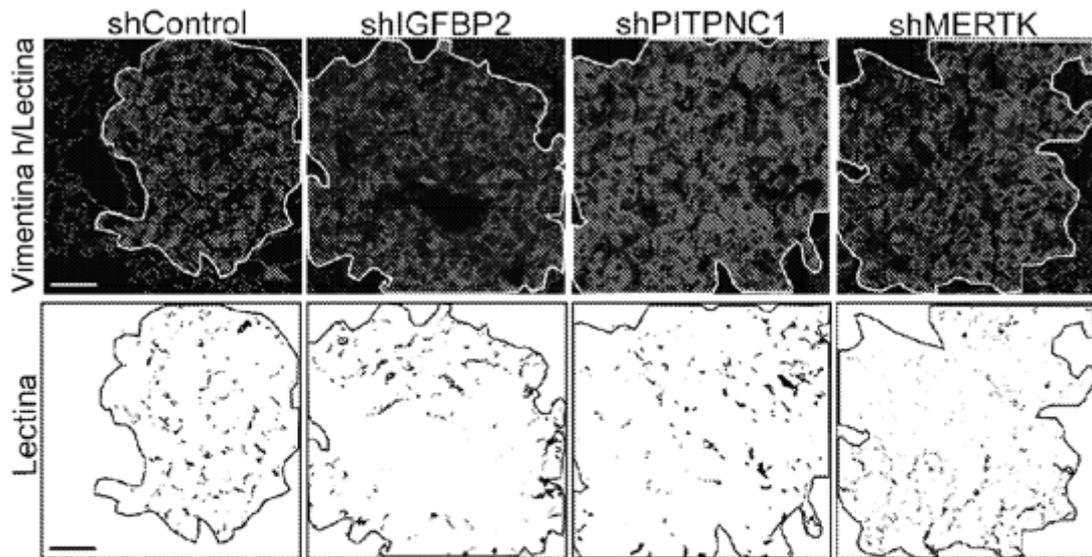


FIG. 17

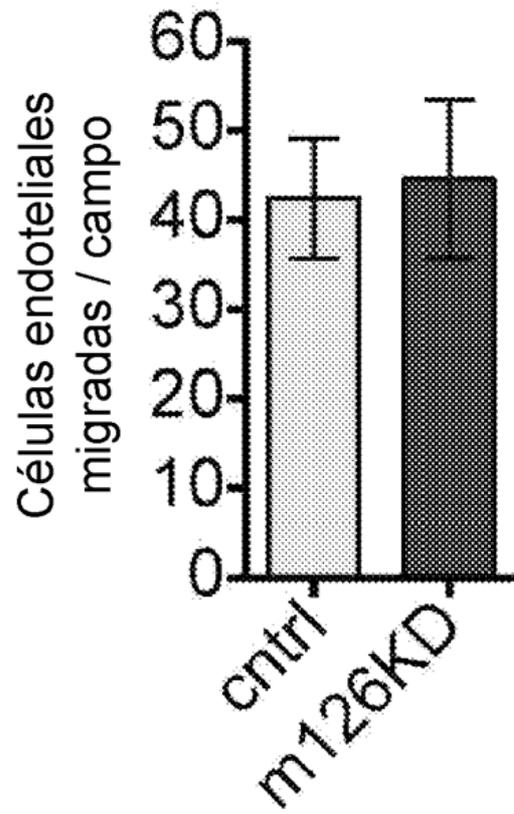


FIG. 18

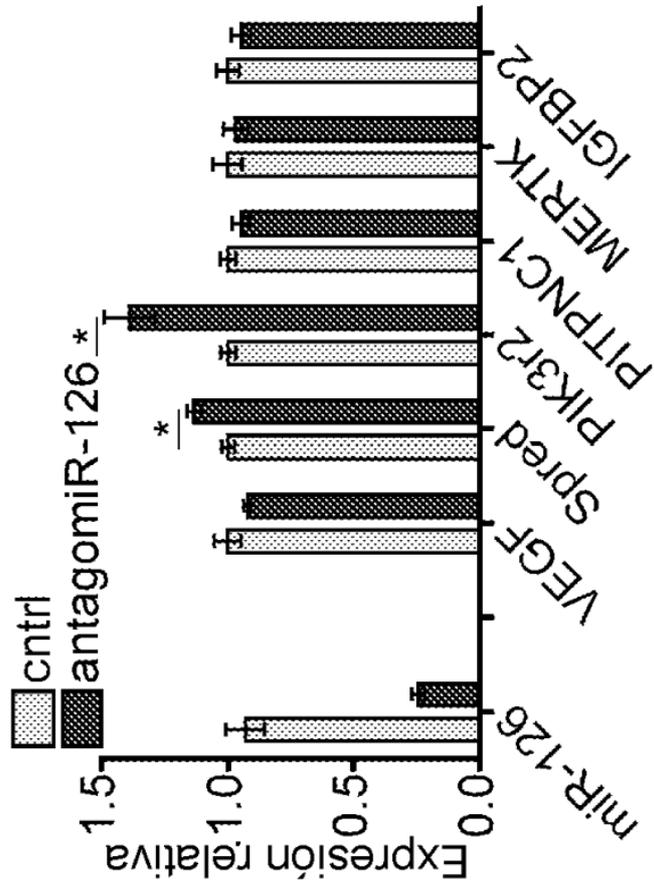
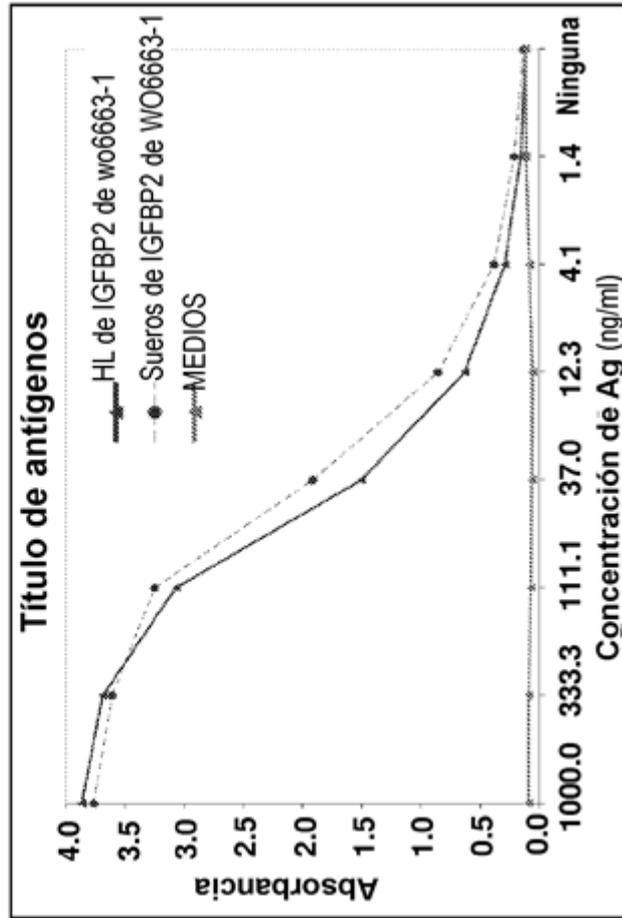


FIG. 19

Concentración de Ag	HL de IGFBP2 de wo6663-1	Sueros de IGFBP2 de WO6663-1	MEDIOS PROMEDIO	MEDIOS HT	MEDIOS HT
1000.0	3.8654	3.762	0.0888	0.075	0.1026
333.3	3.6839	3.6066	0.0893	0.0623	0.1162
111.1	3.0672	3.2468	0.0697	0.0564	0.0829
37.0	1.5044	1.9111	0.0631	0.0627	0.0635
12.3	0.6277	0.8578	0.0567	0.0576	0.0557
4.1	0.2915	0.3796	0.0863	0.0758	0.0968
1.4	0.1556	0.2108	0.1110	0.1101	0.1119
Ninguna	0.1196	0.1322	0.1186	0.1228	0.1143

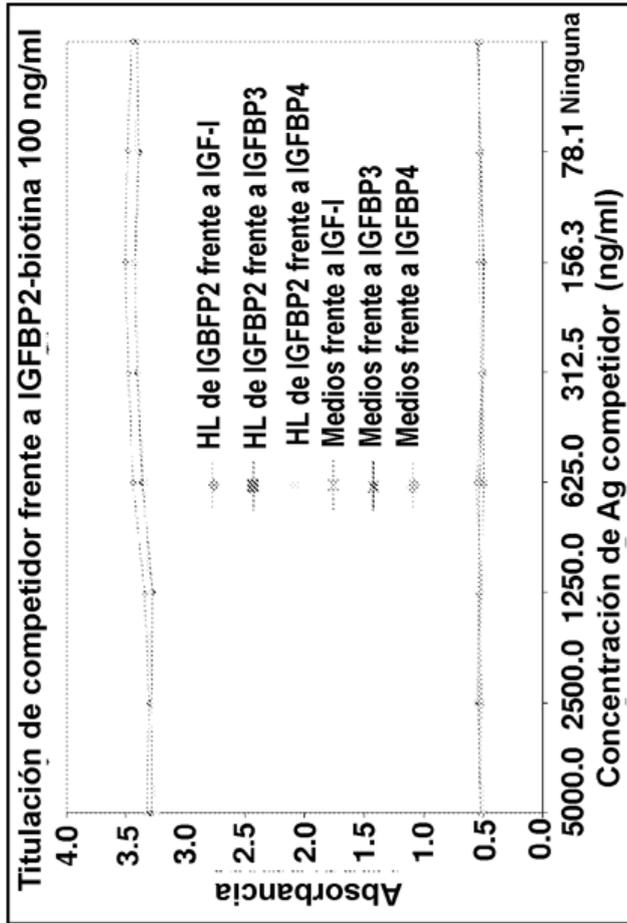


ID de Ac de recubr.: Antic. anti-IgG de ratón Gt
 ID de Ac: IGFBP2 HL Supnt
 ID de Ac: Sueros de ratón de IGFBP2 m1-m3 día 70
 ID de Ag: IGFBP2-biotina
 ID de reactivo de detección: SA-HRP

Resumen del ensayo: Recubrir placa de poliestireno para EIA/RIA con recubrimiento de Ac->Bloqueo->Ac primario->Ag biotinilado->SA-HRP->Detener y leer

FIG. 20

Concentración de Ag competidor	HL de IGBFP2 frente a IGF-1	HL de IGBFP2 frente a IGBFP3	HL de IGBFP2 frente a IGBFP4	Medios frente a IGF-1	Medios frente a IGBFP3	Medios frente a IGBFP4
5000.0	3.3238	3.2873	3.2493	0.5187	0.5171	0.5
2500.0	3.3069	3.2855	3.2905	0.5272	0.5414	0.5108
1250.0	3.3431	3.2769	3.3108	0.5143	0.5398	0.53
625.0	3.4375	3.3597	3.347	0.4893	0.5307	0.5504
312.5	3.4756	3.4014	3.3937	0.5004	0.5013	0.5144
156.3	3.5041	3.4262	3.4286	0.4916	0.496	0.5322
78.1	3.4833	3.39	3.4193	0.5234	0.5183	0.5384
Ninguna	3.4463	3.4077	3.3936	0.5344	0.5485	0.5277



ID de Ab de recubrimiento: Antic. anti-IgG de ratón Gt
 ID de Ac: IGBFP2 HL Supnt
 ID de Ag: IGBFP2-biotina
 ID de reactivo de detección: SA-HRP
 ID de competidor: IGF-1 (PeptoTech #100-11)
 ID de competidor: IGBFP3 (PeptoTech #100-08)
 ID de competidor: IGBFP4 (PeptoTech #350-05B)

Resumen del ensayo: Recubrir placa de poliestireno para EIA/RIA con recubrimiento de Ac-->Bloqueo--->Ac primario--->Ag biotinilado--->SA-HRP--->Detener y leer

FIG. 21

Designación T.C.	Pocillo T.C.	D.O. por ELISA frente a IGFBP2- Biotina	D.O. por ELISA frente a IGFBP2- Biotina + IGF-1	Razón	Designación TC	Pocillo T.C.	D.O. por ELISA frente a IGFBP2- Biotina	D.O. por ELISA frente a IGFBP2- Biotina + IGF-1	Razón
	1B1	0.86	0.59	1.44		5B5	0.83	0.71	1.17
IGFBP2_M1	1C2	2.53	1.82	1.39	IGFBP2_M13	5F5	2.37	2.09	1.13
	1D9	0.82	0.53	1.54		5F5	0.72	0.60	1.21
IGFBP2_M2	1A11	0.90	0.64	1.41		5D7	0.84	0.74	1.14
	1E11	0.76	0.52	1.46		5A8	0.81	0.66	1.24
IGFBP2_M3	2F6	0.80	0.61	1.30		6D2	0.84	0.70	1.19
IGFBP2_M4	2H7	2.42	2.09	1.16	IGFBP2_M14	6G4	2.39	2.12	1.13
IGFBP2_M5	3D2	0.10	0.36	0.28	IGFBP2_M15	6H9	2.43	2.16	1.12
IGFBP2_M6	3B3	2.27	1.96	1.14	IGFBP2_M16	6C12	2.36	2.11	1.12
IGFBP2_M7	3A4	1.65	0.73	2.26		7E4	0.76	0.66	1.15
IGFBP2_M8	3E7	0.58	0.09	5.98		7G4	0.73	0.61	1.20
IGFBP2_M9	4H2	2.43	2.14	1.14		7A7	0.82	0.70	1.16
	4E4	0.71	0.60	1.19	IGFBP2_M17	7E7	0.78	0.61	1.27
IGFBP2_M10	4C8	0.85	0.72	1.17		7E9	0.72	0.62	1.16
	4D8	0.72	0.61	1.19		8H3	0.87	0.83	1.05
	4A9	0.75	0.59	1.27		8A10	0.74	0.74	1.00
IGFBP2_M11	4F10	0.86	0.70	1.22	IGFBP2_M18	8C10	0.56	0.80	0.70
	5B1	0.83	0.70	1.18	IGFBP2_M19	10H1	0.89	0.76	1.17
IGFBP2_M12	5D1	0.89	0.82	1.08		10E3	0.76	0.66	1.14
	5F2	0.72	0.64	1.13	IGFBP2_M20	10A5	2.42	2.22	1.09
	5H2	0.76	0.68	1.13		10F8	0.86	0.79	1.08
	5H4	0.75	0.64	1.17		10C9	0.82	0.74	1.12

Resumen del ensayo: Recubrir placa de poliestireno para EIA/RIA con recubrimiento de Ac->Bloqueo->Ac primario->Ag biotinilado->SA-HRP->SA-HRP->Detener y leer

Controles	D.O. promedio por ELISA frente a IGFBP2-Biotina	D.O. promedio por ELISA frente a IGFBP2-Biotina + IGF-1
Control positivo	2.43	2.17
Control positivo	2.76	2.45
Control negativo	0.11	0.10

ID de Ac de recubr.: Antic. anti-IgG de ratón Gt (espec. para Fc)
 ID de Ac: Sobrenadante de biblioteca de hibridomas de IGFBP2
 ID de Ac: Sueros de ratón de IGFBP2 m1-m3
 ID de Ag: IGFBP2-Biotina
 ID de Ag comp.: IGF-I (Pepto Tech #100-110)
 ID de reactivo de detección: SA-HRP

FIG. 22

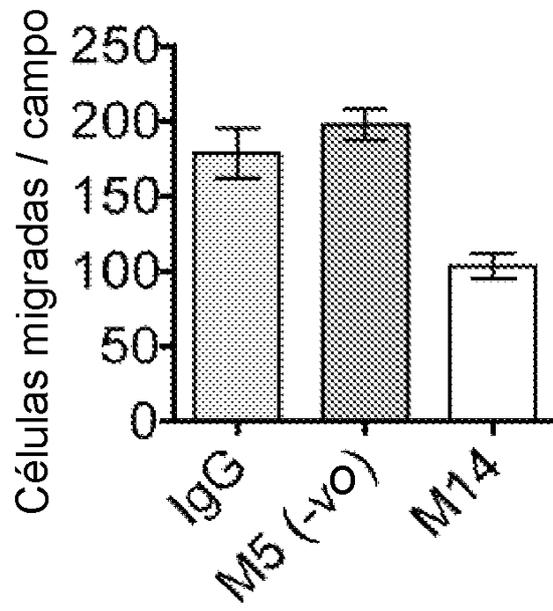


FIG. 23

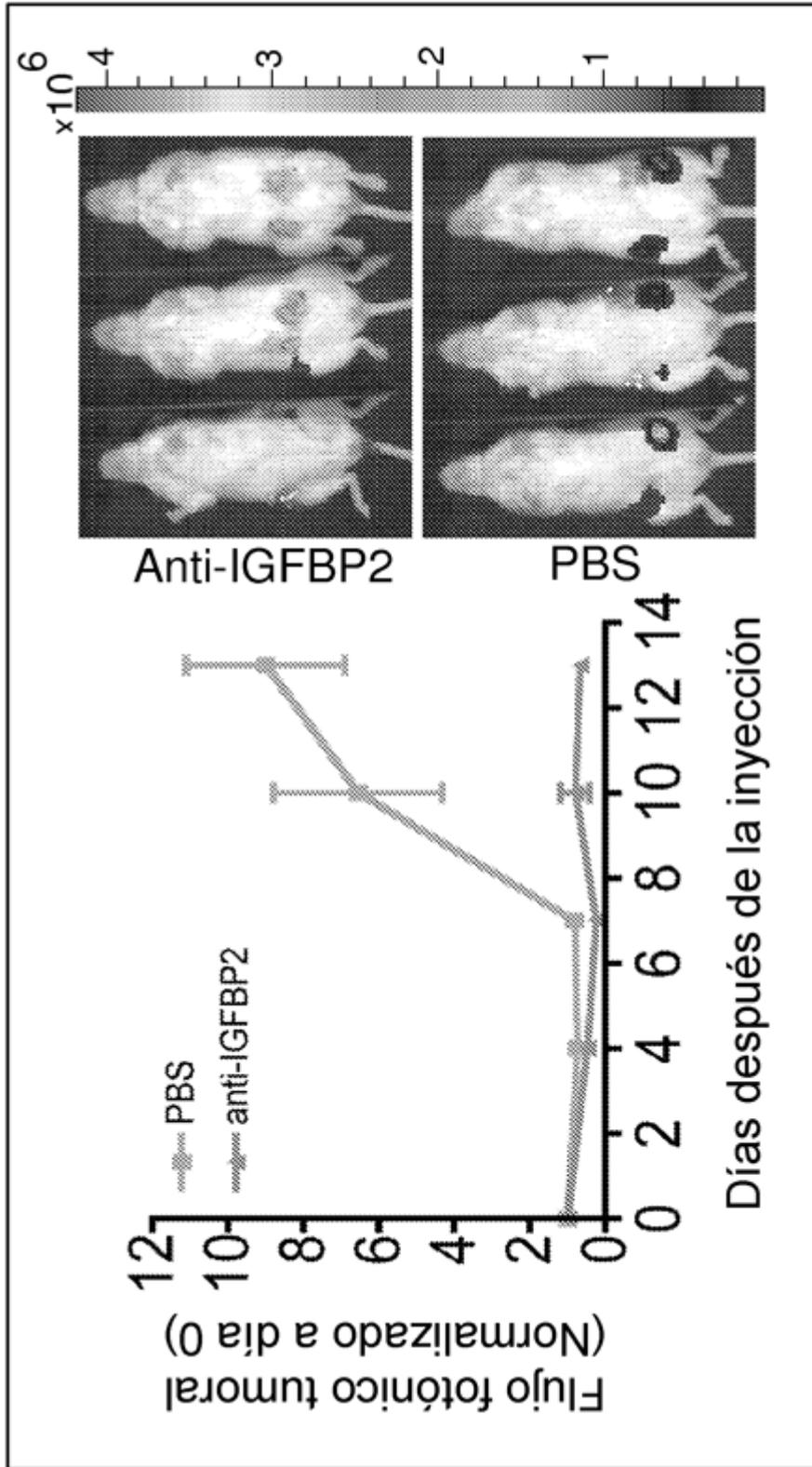


FIG. 24