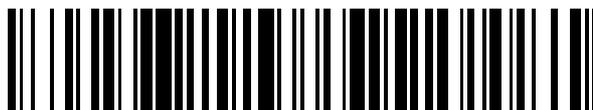


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 498 340**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/68** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.11.2009 E 09760341 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.06.2014 EP 2359134**

54 Título: **Métodos para identificar compuestos de modulación de la linfangiogénesis, medios para ello, compuestos y usos de estos**

30 Prioridad:

**17.11.2008 EP 08169305**

**03.06.2009 EP 09161876**

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

**24.09.2014**

73 Titular/es:

**KONINKLIJKE NEDERLANDSE AKADEMIE VAN  
WETENSCHAPPEN (100.0%)  
Kloveniersburgwal 29  
1011 JV Amsterdam, ML**

72 Inventor/es:

**SCHULTE-MERKER, STEFAN y  
HOGAN, BENJAMIN M.**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 498 340 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

Métodos para identificar compuestos de modulación de la linfangiogénesis, medios para ello, compuestos y usos de estos

## 5 Campo de la invención

La invención se refiere al campo de la medicina. En particular, la invención se refiere a los campos de linfomagénesis y el cáncer.

## 10 Antecedentes de la invención

La vasculatura linfática juega roles críticamente importantes en la inflamación, inmunidad, el drenaje de ácidos grasos dietéticos y en la metástasis del cáncer. La evidencia clínica sugiere que la diseminación de los tumores malignos a los nódulos linfáticos regionales a través de los vasos linfáticos es importante en la metástasis de tumor y que la inflamación crónica causa linfangiogénesis y linfedema. Además de VEGF-C, un potente factor de crecimiento linfangiogénico, tienen actividad linfangiogénica VEGF-A, bFGF, HGF, angiopoyetina-1, IGF-1/2, y PDGF-BB, previamente conocidos como factores proangiogénicos. Adicionalmente, se reportaron moléculas lipídicas bioactivas, incluyendo S1P, que inducen linfangiogénesis in vitro e in vivo mediante la estimulación de la migración y diferenciación de células endoteliales linfáticas a través de una ruta de señalización S1P1/Gi/PLC/Ca<sup>2+</sup> (Chang Min Yoon y otros Brood. 15 de agosto de 2008; 112(4): 1129-1138).

Aunque los mecanismos moleculares que regulan la linfangiogénesis no están muy esclarecidos se ha determinado que durante el desarrollo, crecimiento regenerativo o patogénesis, los vasos linfáticos surgen a partir de los vasos pre-existentes por linfangiogénesis, un proceso dinámico que implica la germinación, migración y proliferación de los linfangioblastos, los precursores de la vasculatura linfática.

La manipulación de la linfangiogénesis ofrece la oportunidad de estrategias terapéuticas diseñadas para inhibir o estimular el crecimiento de los vasos linfáticos en afecciones tales como linfedema, cáncer y enfermedades infecciosas.

En la técnica, estas estrategias se han desarrollado sobre la base de factores linfangiogénicos estimulantes tal como usando miembros de la familia VEGF-C (US7150970, US6818220, WO0151075). Como tal, existe una necesidad de métodos y composiciones para la manipulación de la linfangiogénesis.

## 35 Descripción de la invención

La invención se relaciona en un primer aspecto con un método para probar si un compuesto es capaz de inhibir el desarrollo de los canales linfáticos o linfangiogénesis y/o la migración de los linfangioblastos en un animal no-humano, un embrión no-humano o un cultivo de células, que comprende las etapas de:

- 40
- poner en contacto un compuesto capaz de interactuar con un gen Ccbe1, un transcripto de este o una proteína de ccbe1 con un animal no-humano, un embrión no-humano o un cultivo de células; y
  - determinar si dicho compuesto inhibe el desarrollo de los canales linfáticos, linfangiogénesis y/o migración de los linfangioblastos en dicho animal no-humano, un embrión no-humano o un cultivo de células.

45 Por el término "compuesto" se entiende cualquier compuesto químico. El compuesto es preferentemente una molécula pequeña, un anticuerpo o fragmento funcional de esta o un agente antisentido.

50 Por el término "poner en contacto" un compuesto se entiende proporcionar dicho compuesto en una dosis suficientemente alta tal que dicho compuesto puede interactuar con su objetivo molecular, que es el gen Ccbe1, un transcripto de este o una proteína de Ccbe1. Ccbe1 es una proteína secretada, es decir una proteína que se transporta hacia el exterior de la célula. La proteína traducida contiene un péptido señal que se escinde previo a transportarse hacia el exterior de la célula. La proteína secretada probablemente se asocia con el exterior de una célula o matriz extracelular. Por lo tanto, los métodos de poner en contacto pueden diferir entre los objetivos moleculares, pero pueden diferir además en dependencia del tipo de compuesto. Los métodos de proporcionar compuestos a animales y embriones se conocen bien en la técnica. Los compuestos pueden administrarse de cualquier manera efectiva, conveniente que incluye, por ejemplo, la administración por ruta tópica, oral, anal, vaginal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intranasal o intradérmica entre otras. Un experto en la técnica será capaz de seleccionar un método adecuado. Preferentemente, la administración de un compuesto a un animal o un embrión se realiza por inyección, debido a que resulta en la mejor captación por las células objetivo.

Un experto en la técnica puede probar cualquier compuesto capaz de interactuar con un gen Ccbe1, un transcripto de este o una proteína de ccbe1. Por el término "interactuar" se entiende cualquier interacción física en donde ocurre la unión covalente o no-covalente entre dicho compuesto y el gen Ccbe1, un transcripto de este o una proteína de ccbe1. El término "Ccbe1" se entiende que se refiere a una proteína que es el dominio 1 de EGF de unión al colágeno y calcio. Ccbe1 se refiere además al ácido nucleico (ADN o ARN) que codifica la proteína Ccbe1. Las secuencias representativas de ccbe1 pueden encontrarse, por ejemplo, sin limitarse a, en el Banco de Genes con números de acceso NC\_005117.2 (*Rattus Norvegicus*), NC\_000018.8 (*Homo Sapiens*), NC\_000084.5 (*Mus Musculus*), NC\_006127.2 (*Gallus Gallus*). El gen Ccbe1 se describe además en WO2006/122363 y WO2005/11269. La Figura 4 representa una secuencia de proteína y de nucleótidos de la Ccbe1 humana. Basado en la secuencia de ácido nucleico o secuencia de aminoácidos basada en ella, un experto en la técnica es capaz de diseñar moléculas capaces de interactuar con el gen Ccbe1, un transcripto de este o una proteína de Ccbe1. Por supuesto que puede seleccionarse compuestos que se conocen que interfieren con la proteína de Ccbe1 o la regulación de la expresión de Ccbe1. Al probar estos compuestos con el método de la invención, se obtiene la información valiosa de si estos compuestos son capaces de inhibir la linfangiogénesis. Los anticuerpos dirigidos contra la proteína de Ccbe1 están comercialmente disponibles (Novus Biologicals, anti humano en ratón). Los métodos para seleccionar anticuerpos con afinidad por una molécula son también conocidos. Por lo tanto, un experto en la técnica puede producir anticuerpos contra la proteína Ccbe1 y probar tales anticuerpos usando este método.

Agentes antisentido pueden usarse además y están comercialmente disponibles (Santa Cruz Biotechnology Inc.). Métodos para producir los agentes antisentido contra una secuencia objetivo conocida se conocen en la técnica. Un experto en la técnica es capaz de probar si un agente antisentido es capaz de bloquear la expresión de la proteína Ccbe1 al proporcionar dicho agente antisentido a una célula y determinar el nivel de expresión de Ccbe1.

Por el término "animal" se entiende cualquier animal no-humano vivo, que incluyen las larvas de vida libre y/o formas larvales en reproducción, pero que excluyen las formas fetales o embrionarias. Dicho animal puede ser cualquier animal no-humano que tiene un sistema linfático. Preferentemente dicho animal es un vertebrado, debido a que el sistema linfático de los vertebrados evolutivamente está más asociado a los seres humanos que a los sistemas linfáticos de otros animales. Preferentemente, dicho animal es un mamífero, más preferiblemente un roedor o primate. Preferentemente un primate no humano. Por el término "embrión" se entiende un organismo en las etapas primarias de crecimiento y diferenciación. Por el término "cultivo celular" se entiende cualquier cultivo de células in vitro fuera del cuerpo. Cultivos celulares adecuados son el cultivo celular en el que se mimetiza la linfangiogénesis e incluyen los cultivos celulares humanos. Se puede usar cualquier ensayo *in vitro* que mimetiza la linfangiogénesis. Tales ensayos se conocen en la técnica. Por ejemplo, un ensayo de tubo in-vitro usando células endoteliales linfáticas (LEC) y un ensayo de invasión usando LEC se describen (Nakamura Cancer Sci (95); núm.1;p.25-31(2004)). Dicho animal también puede incluir seres humanos, mientras que el término "animal no humano" se refiere a cualquier animal no humano incluyendo mamíferos y preferentemente un roedor o primate.

En una modalidad preferida, dicho ensayo in-vitro comprende una prueba de migración in vitro. Preferentemente tal prueba de migración in vitro comprende colocar las células (preferentemente LECs) en una cámara (cámara Boyden) que permite a las células moverse a través de una membrana (el fondo de la cámara) en respuesta a un estímulo.

Preferentemente, tal prueba de migración in vitro se basa en una cámara de dos compartimientos llenos de medio separados por una membrana microporosa. Típicamente, las células se colocan en el compartimiento superior y se les permite migrar a través de los poros de la membrana en la parte baja compartimiento, en el que un agente está presente. Preferentemente, después de un tiempo de incubación apropiado, la membrana entre los dos compartimientos se fija y se tiñe, y se determina el número de células que han migrado al lado inferior de la membrana. Tal prueba de migración in vitro puede comprender también un ensayo de migración a través de membrana de filtro o un ensayo de migración a través de trans-pocillo. Una serie de diferentes dispositivos de cámara de Boyden están comercialmente disponibles.

Preferentemente, tal prueba de migración in vitro comprende colocar LECs dentro de una cámara de Boyden, inducir la migración con VEGFC, y determinar si la caída de ccbe1 afecta a la migración. En otra modalidad preferida, tal prueba de migración in vitro comprende colocar LECs en un lado de la membrana, y proporcionar la proteína Ccbe1 en el otro lado de la membrana, preferentemente en la forma de células inducidas para expresar Ccbe1). Preferentemente, la migración u otro comportamiento de LEC se compara en presencia o ausencia de la proteína Ccbe1.

Por supuesto, es posible añadir a tal ensayo otros tipos de células, tales como células tumorales. Tal ensayo con células tumorales adicionales se puede usar para tamizar compuestos capaces de inhibir la linfangiogénesis en los tumores. En una modalidad preferida dicho cultivo comprende un co-cultivo de dos tipos diferentes de células. Preferentemente, al menos uno de dichos tipos de células comprende las células endoteliales, preferentemente células LEC. En una modalidad preferida, dicho otro tipo de células son las células que expresan ccbe1. En una modalidad preferida, dichas células endoteliales y dicho ccbe1 son compatibles, generalmente se derivan de la misma especie animal. Dichos dos tipos

diferentes de células son preferentemente, pero no necesariamente de la misma especie animal. En una modalidad, dicho otro tipo de células son células CHO. Preferentemente dichas células CHO comprenden un casete de expresión para la expresión de un ccbe1 de primate. En una modalidad preferida dichas células endoteliales son células endoteliales de primates. Preferentemente dichas células de primates son células humanas. Preferentemente dicho ccbe1 de primate es un ccbe1 humano.

Por el término "canal linfático" se entiende un conducto vascular que porta linfa que eventualmente se añade a la circulación sanguínea venosa. Por el término "linfangiogénesis" se entiende el proceso de formación de los canales linfáticos. Por el término "linfangioblasto" se entiende una célula precursora capaz de diferenciarse en de una célula presente en un canal linfático. Los linfangioblastos pueden detectarse mediante la presencia del marcador de unión a membrana, tales como VEGF-C; VEGFR-3 o Prox1, o por la expresión de estabilina1, tie2, lyve1 y/o fli1. Por el término "migración" de un linfangioblasto se entiende el inicio del proceso con la germinación de un linfangioblasto a partir de una vena y migración de dicho linfangioblasto dentro del tejido mesodérmico y termina cuando dicho linfangioblasto comienza a contribuir para la linfangiogénesis. Los métodos para detectar la migración de células endoteliales linfangiáticas se conocen en la técnica.

Los métodos para detectar los canales linfáticos y células en un animal se conocen por un experto en la técnica. Los canales linfáticos y células linfáticas se pueden visualizar por imagimática. La detección se puede hacer usando marcadores o etiquetas específicas para los canales linfáticos, células linfáticas o células endoteliales linfáticas. Por ejemplo, se pueden usar los anticuerpos dirigidos contra antígenos específicos. Un método preferido para determinar si se inhibe el desarrollo de los canales linfáticos o linfangiogénesis es determinando la presencia de un conducto torácico o parte de este en un animal no-humano o un embrión no-humano. En un mamífero no humano se prefiere para determinar si el desarrollo de los canales linfáticos o linfangiogénesis está inhibido en el oído. La inhibición se puede medir midiendo el hinchamiento de la oreja debido al drenaje inadecuado a través de la linfa.

La ausencia o reducción en el número de canales linfáticos, células o células endoteliales linfáticas en dicho animal, embrión o cultivo de células es indicativa de la inhibición del desarrollo de los canales linfáticos o linfangiogénesis. Por el término "inhibición del desarrollo de los canales linfáticos y/o linfangiogénesis" se entiende que el volumen o el número de canales linfáticos o el número de células implicadas en el proceso de linfangiogénesis se reduce significativamente en dicho animal, embrión o cultivo celular, en comparación con un control que no se ha provisto con dicho compuesto. La inhibición de la migración de un linfangioblasto se define como una interferencia en la migración de un linfangioblasto, con un resultado donde dicho linfangioblasto no contribuye a la linfangiogénesis. Preferentemente, se alcanza una inhibición entre 70-100%. Con mayor preferencia, se alcanza una inhibición entre 80 y 100%. Aún con mayor preferencia entre 90 y 100%. Aún con mayor preferencia entre 95 y 100%. Con la máxima preferencia dicha inhibición está entre 97 y 100%.

En una modalidad preferida, dicho animal o dicho embrión es transparente, al menos durante la duración del experimento. Una ventaja de este es que facilita la imagimática del desarrollo de los canales linfáticos o linfangiogénesis y/o la migración de los linfangioblastos.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para probar si un compuesto es capaz de inhibir el desarrollo de los canales linfáticos o linfangiogénesis y/o la migración de los linfangioblastos en un animal no-humano, un embrión no-humano o un cultivo de células, que comprende las etapas de administrar un compuesto a un animal no-humano, un embrión no-humano o un cultivo de células, en donde dicho animal no-humano, dicho embrión no-humano, o cultivo celular no expresa la proteína Ccbe1 a un nivel funcional; inducir la expresión de la proteína Ccbe1 en las células de dicho animal no-humano, dicho embrión no-humano, o dicho cultivo celular; y determinar si dicho compuesto inhibe el desarrollo de los canales linfáticos, linfangiogénesis y/o migración de los linfangioblastos en dicho animal no-humano, un embrión no-humano o un cultivo de células.

Una ventaja de este método es que se puede probar cualquier compuesto, sin conocimiento previo de cualquier interacción con el gen Ccbe1, transcripto o proteína. Por "expresión a un nivel funcional" se entiende que la expresión de la proteína Ccbe1 resulta en el desarrollo de los canales linfáticos, linfangiogénesis y/o migración de los linfangioblastos en dicho animal no-humano, un embrión no-humano o un cultivo de células.

En algunas modalidades, las células que no expresan la proteína Ccbe1 a un nivel funcional en un animal o embrión no-humano son las células que en un organismo silvestre expresan la proteína a un nivel funcional.

La inhibición de la función y/o expresión de la proteína Ccbe1 en un sistema de desarrollo de los canales linfáticos, linfangiogénesis y/o migración de los linfangioblastos, inhibe este desarrollo, génesis y/o migración. Preferentemente, la expresión se reduce entre 70-100%. Con mayor preferencia, entre 80 y 100%, aún con mayor preferencia entre 90 y 100%, aún con mayor preferencia entre 95 y 100%. Con la máxima preferencia dicha expresión se reduce entre 97 y 100% comparado con los niveles normales. Existen varios métodos conocidos para bloquear la expresión funcional de un gen. Es

5 posible bloquear la expresión del gen *Ccbe1* proporcionando un animal con agentes antisentido capaz de unir a los nucleótidos del gen o producto génico *Ccbe1*. Basándose en la secuencia del gen *Ccbe1*, un experto en la técnica será capaz de diseñar un agente antisentido que es capaz de unirse a dicho gen. Los ejemplos preferidos se describen en la sección de ejemplos. La expresión del gen *Ccbe1* se puede bloquear sustancialmente además al suprimir o mutar el gen *ccbe1* tal que se vuelve disfuncional. Un experto en la técnica sabrá cómo hacer animales knockout. Los ejemplos de procedimientos de supresión génica usando los sistemas de recombinación *cre/lox* se pueden encontrar en Lakso y otros (1992) Proc. Natal. Acad. Sci. 89: 6232-36 y Pichel y otros (1993) Oncogene 8: 3333-42. Un método preferido para generar ratones heterocigotos para una versión flanqueada en el sitio *Plox* de los exones objetivos 4 y 5 del gen *ccbe1*. Estos ratones se pueden cruzar después con ratones que expresan la *cre*-recombinasa bajo el control de un promotor inducible o un promotor tejido-específico, y los ratones mutantes homocigotos resultantes carecerán de la actividad génica en todas las células que expresan *Cre*-recombinasa.

15 Un experto en la técnica está familiarizado con varios métodos para inducir la expresión de una proteína. Si se suprime la expresión de *Ccbe1*, por ejemplo, bajo la influencia de un represor inducible, la expresión puede simplemente revertirse mediante la eliminación del sustrato que se une al represor. Otro método para inducir la expresión de *Ccbe1* es mediante la inyección de ARNm que codifica el *Ccbe1* silvestre en dicho animal. Un ejemplo de este método se proporciona en el Ejemplo 1. Un método preferido para proporcionar células con la capacidad de expresar la proteína *Ccbe1* es por medio de un vehículo de suministro de genes que comprende un casete de expresión para la expresión de una región codificante de *ccbe1*. En una modalidad preferida, dicho vehículo de suministro de genes comprende un vector adenoviral, un vector viral adeno-asociado o un vector viral lentiviral. Preferentemente dicho vehículo de suministro de genes comprende un gen que codifica una proteína de *ccbe1*.

25 En una modalidad preferida, dicho animal no humano o dicho embrión no humano está genéticamente modificado, en donde la modificación comprende la expresión transgénica de *estabilina1*, *tie2*, *lyve1* y/o *fli1* fusionada con una GFP o un derivado de este. Por el término "derivado" de GFP se entiende cualquier forma mutada de GFP que resulta en una funcionalidad mejorada de GFP, por ejemplo los derivados de la proteína fluorescente azul (EBFP, EBFP2, azurita, mKalama1) proteína fluorescente cian (ECFP, Cerulean, CyPet), proteína fluorescente amarilla (YFP, Citrino, Venus, YPet) y derivados de BFP.

30 La ventaja de estos es que esos marcadores facilitan la imagimática de las venas, y son útiles en el seguimiento de la migración de los linfangioblastos. Los métodos para producir animales con constructos de GFP se conocen en la técnica. Ejemplos de animales que expresan *tie2*, *lyve1* o *fli1* de GFP se conocen también en la técnica.

35 En otro aspecto, la descripción se refiere al uso de un animal no humano genéticamente modificado, preferentemente un pez en donde se suprime un gen *ccbe1*. Como se usa en la presente, una "supresión génica" se refiere a un gen que ha sido modificado, por ejemplo, por mutagénesis química o recombinación homóloga, para reducir la función y/o cantidad de la proteína codificada. Una supresión génica se puede generar, por ejemplo, mediante la eliminación de uno o más exones o mediante la introducción de un codón de terminación prematuro y puede resultar en un alelo nulo, hipomórfico, o neomórfico.

40 En algunas modalidades, el animal no humano es un ratón o *Drosophila*. La generación de mutaciones por supresión génica en estas especies está bien dentro del alcance de un experto en la técnica. Preferentemente, el animal modificado genéticamente es un pez. Los métodos para suprimir *ccbe1* se proporcionan en los ejemplos. La ventaja de dicho pez modificado genéticamente es que puede usarse ventajosamente en los métodos descritos anteriormente. Más preferido es un pez, en donde las células de dicho pez expresan además *estabilina1*, *tie2*, *lyve1* y/o *fli1* fusionadas a un GFP o un derivado de este. En otro aspecto, la invención se refiere a un animal no-humano genéticamente modificado, preferentemente un pez en donde se expresa la *estabilina1*, *tie2*, *lyve1* y/o *fli1* fusionada a un GFP o un derivado de este. Con mayor preferencia, dicho pez es un pez cebra, *Danio Rerio*. La ventaja de un pez cebra es que se son fáciles de crecer y cultivar.

50 En otro aspecto, la descripción se refiere al uso de una célula que expresa *estabilina1*, *tie2*, *lyve1* y/o *fli1* fusionada a un GFP o un derivado de este. Dicha célula se puede usar en los métodos mediante el trasplante de dichas células en un animal no-humano y determinar si dichas células contribuyen a la linfangiogénesis. Por supuesto, dichas células pueden usarse además en cultivo celular. La ventaja de este es que dichas células se pueden visualizar fácilmente. Dicha célula puede usarse en ensayos *in vitro* o *in vivo* para probar compuestos capaces de influenciar en la linfangiogénesis. Se puede usar cualquier ensayo *in vitro* que mimetiza la linfangiogénesis. Tales ensayos se conocen en la técnica. Por ejemplo, un ensayo de tubo *in vitro* usando LEC y un ensayo de invasión usando LEC se describen (Nakamura y otros, Cancer Sci (95);núm.1;p.25-31(2004)). Los métodos para suprimir *ccbe1* se proporcionan en el ejemplo. Por lo tanto, un experto en la técnica será capaz de producir LECs a partir de los linfangiomas (descrito en Mancardi y otros Exp Cell Res 1999; 246:368-75) derivado de ratones *Ccbe1* nulos. Un experto en la técnica es capaz de fabricar ratones *Ccbe1* nulos. Un experto en la técnica será capaz de usar LEC que no expresan *Ccbe1*. En los co-cultivos se prefiere usar células endoteliales que no

expresan Ccbe1. Estos se pueden obtener a partir de animales Ccbe1 nulos, o a partir de animales que tienen la capacidad de expresar Ccbe1. Las células endoteliales, preferentemente LEC, no expresan por sí mismas Ccbe1, pero las células adyacentes a las LEC expresan Ccbe1. Preferentemente los co-cultivos se usan en donde las células endoteliales son co-cultivadas con células que expresan Ccbe1.

5

Un ejemplo de un ensayo de crecimiento in vitro se da en Nakamura y otros Cancer Sci (95);núm.1 (2004), p 26. Ensayos in vitro anteriormente mencionados pueden, por supuesto, usarse además para determinar si un compuesto es capaz de inhibir la estimulación de la linfangiogenesis.

10 En otro aspecto, la descripción se refiere al uso de una célula en un método para determinar si un compuesto es capaz de influenciar en la linfangiogenesis.

En otro aspecto, la descripción se refiere a un agente antisentido que comprende la secuencia base de un gen que codifica Ccbe1. Preferentemente dicho género es un gen Ccbe1 humano. Una secuencia ccbe1 humana preferida se representa en la figura 3. Una ventaja de dicho agente antisentido es que puede usarse para bloquear funcionalmente la expresión de Ccbe1. Un "agente antisentido" se refiere a un oligonucleótido que interactúa con cadenas complementarias de ácidos nucleicos, modificando la expresión de genes. Un oligonucleótido es un segmento corto de nucleótidos, típicamente con entre 15-40 pocas bases. Preferentemente dicho oligonucleótido comprende entre 15-30 bases. Con mayor preferencia dicho oligonucleótido comprende entre 20-30 bases. Para compuestos morfolino se prefiere que dicho oligonucleótido comprenda entre 18-25 bases consecutivas complementarias al ARN objetivo. Muchas formas de moléculas antisentido se conocen en la técnica y se pueden categorizar en antisentido dependiente de enzima o antisentido bloqueador estérico. Puede usarse cualquier molécula antisentido capaz de bloquear sustancialmente la expresión de la proteína Ccbe1. Los ejemplos de agentes antisentido adecuados comprende, pero sin limitarse a: un iARN/ARNip (Caplen y otros Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Ago. 14;98(17):9742-7), un oligómero morfolino (Summerton Biochim Biophys Acta. 1999 Dic 10;1489(1):141-58), un ácido nucleico péptido (Hanvey y otros Science. 1992 Nov 27;258(5087):1481-5), un oligonucleótido modificado con 2'-O-alilil o 2'-O-alquilo, un oligonucleótido N3'.fwdarw.P5'fosforamidato (Gryaznov Biochim Biophys Acta. 1999 Dic 10;1489(1):131-40), un oligonucleótido modificado con C-5-propino pirimidina o un oligonucleótido "ribonucleasa-inactivo". Un morfolino se ensambla a partir de cuatro subunidades de morfolino diferentes, cada uno de los cuales contiene una de las cuatro bases genéticas enlazada a un anillo de morfolina de 6 miembros. Dieciocho a 25 subunidades de estos cuatro tipos de subunidades se unen en un orden específico por enlaces no-iónicos intersubunidad de fosforodiamidato para dar un morfolino. Un oligonucleótido "N3'.fwdarw.P5' fosforamidato" es uno en el cual el oxígeno-3 del desoxirribosa-2' se sustituye por un amino-3'. Un "oligonucleótido modificado 2'-O-alilo (o alquilo)" es un oligorribonucleótido en el cual el 2' hidroxilo se convierte en un éter alilo o alquilo. El éter alquilo es típicamente un éter metílico. El "oligonucleótido C-5-propino pirimidina-modificado" es un oligonucleótido en el cual el grupo metilo C-5 de bases timidina y/o el hidrógeno C-5 de bases citidina se sustituyó por un grupo propino. En un "ácido nucleico péptido", las unidades de fosfato desoxirribosa de una cadena principal de oligonucleótido se sustituyen con enlaces de poliamida. Un oligonucleótido o análogo oligonucleótido "ribonucleasa-inactiva" es uno que actúa a través de un mecanismo independiente de ribonucleasa, diferente a los oligonucleótidos ribonucleasa-activa, tal como fosforotioatos. Se creen que funcionan mediante el bloqueo estérico de la formación de ARN objetivo, transporte o traducción nucleocitoplasmática, y así, se les refieren además como "bloqueadores estéricos". Esta clase incluye, por ejemplo, metilfosfonatos, oligonucleótidos de morfolino, como se describe en la presente descripción, ácidos nucleicos péptidos (PNA's), oligonucleótidos modificados 2'-O-alilo o 2'-O-alquilo, y N3'.fwdarw.P5' fosforamidatos.

45 En una modalidad preferida dicho agente antisentido comprende una secuencia 5'-CGGGTAGATCATTTTCAGACACTCTG-3', 5'-ACAGCACAGCACTTTACCTGTCTAC-3' o 5'-ATTAGCATAGGGAACCTTACTTTTCG-3'. Estos tres oligonucleótidos se dirigen contra el ARN ccbe1 del pez cebra. Se prefiere que un oligonucleótido de la invención se dirija hacia la región correspondiente a un ARN ccbe1 humano. En una modalidad particularmente preferida, dicho agente anti-sentido se usa para inhibir el desarrollo de los canales linfáticos o linfangiogenesis y/o la migración de los linfangioblastos.

50 En otro aspecto, la descripción se refiere a un agente antisentido que tiene entre 15-40 nucleobases de longitud que comprende al menos entre 15-40 bases consecutivas complementarias a y capaces de hibridar con la secuencia nucleotídica de la figura 3.

55 En otro aspecto, la descripción describe un compuesto obtenible por el método de acuerdo con la invención. Una ventaja de dicho compuesto es que inhibe la linfangiogenesis, el desarrollo de los canales linfáticos o la migración de los linfangioblastos.

60 En otro aspecto, la descripción se refiere a un anticuerpo o un fragmento funcional de este capaz de unirse a una proteína ccbe1 y capaz de inhibir la linfangiogenesis. Por el término "anticuerpo" se entiende cualquier inmunoglobulina. Puede usarse cualquier inmunoglobulina producida por cualquier medio o derivada de cualquier animal capaz de esto. Por el

- 5 término "fragmento funcional" de un anticuerpo se entiende un fragmento funcional de dicho anticuerpo que comprende un sitio de unión al antígeno. Por ejemplo, pueden usarse los fragmentos Fab. Es esencial que dicho anticuerpo sea capaz de unirse a la proteína Ccbe1. No todos los anticuerpos capaces de unirse a la proteína Ccbe1 pueden ser capaces de inhibir en un animal el desarrollo de los canales linfáticos, linfangiogénesis y/o la migración de células endoteliales linfáticas. Sin estar limitados por la teoría, se cree que la proteína Ccbe1 es un regulador secretado de la linfangiogénesis.
- 10 En otro aspecto, la descripción se refiere a una composición farmacéutica, que comprende un agente antisentido de acuerdo con la invención, un sistema de expresión de acuerdo con la invención, un compuesto de acuerdo con la invención, y/o un anticuerpo de acuerdo con la invención y un portador o un adyuvante farmacéutico adecuado. Los portadores o adyuvantes farmacéuticos adecuados para anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Un vehículo farmacéutico puede ser cualquier sustancia compatible, no tóxica adecuada para el suministro del compuesto al paciente, agua estéril, alcohol, grasas, ceras, y sólidos inertes pueden estar incluidos en el vehículo. Adyuvantes farmacéuticamente aceptables (agentes amotiguadores, agente dispersante) puede incorporarse además en la composición farmacéutica. La invención también proporciona el uso de dicha composición en la terapia.
- 15 En otro aspecto, la descripción se refiere al uso de un agente antisentido de acuerdo con la invención, un compuesto de acuerdo con la invención, y/o un anticuerpo de acuerdo con la invención para la producción de un medicamento
- 20 En otro aspecto, la descripción describe el uso de un agente antisentido de acuerdo con la invención, un compuesto de acuerdo con la invención, y/o un anticuerpo de acuerdo con la invención para inhibir el desarrollo de los canales linfáticos o linfangiogénesis y/o la migración de los linfangioblastos.
- 25 En otro aspecto, la descripción se refiere al uso de acuerdo con la invención para el tratamiento del cáncer. Particularmente, la invención se refiere al uso de un agente antisentido de acuerdo con la invención, un compuesto de acuerdo con la invención, y/o un anticuerpo de acuerdo con la invención. La ventaja de dicho uso es que es capaz de prevenir el crecimiento tumoral en un animal. Sin estar limitados por la teoría, se cree que el crecimiento tumoral se previene debido a que los tumores requieren de vasculatura linfática.
- 30 En otro aspecto, la descripción proporciona un método para tratar un individuo aquejado de cáncer, que comprende proporcionar a dicho individuo que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de Ccbe1. En otro aspecto, la invención proporciona un método para tratar a un individuo aquejado con linfedema, que comprende proporcionar a dicho individuo que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de Ccbe1. En algunas modalidades, el inhibidor de Ccbe1 se selecciona a partir de un agente antisentido de acuerdo con la invención, un compuesto de acuerdo con la invención, y/o un anticuerpo de acuerdo con la invención. En algunas modalidades, el inhibidor de Ccbe1 se formula en una composición farmacéutica adecuada para la administración en el ser humano.
- 35 En otro aspecto, la descripción se refiere al uso de un sistema de expresión de acuerdo con la invención para la producción de un medicamento para el tratamiento del linfedema. El linfedema es una afección de retención de líquido localizada causada por un sistema linfático comprometido. Al proporcionar un sistema de expresión capaz de estimular la linfangiogénesis, los efectos del linfedema pueden tratarse eficazmente.
- 40 En otro aspecto, la descripción describe un método para influenciar en el desarrollo de los canales linfáticos, linfangiogénesis y/o la migración de los linfangioblastos de un animal que comprende la administración a un animal de una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con la invención, un anticuerpo de acuerdo con la invención, un agente antisentido de acuerdo con la invención o un sistema de expresión de acuerdo con la invención. Cualquier animal, incluidos los seres humanos pueden ser tratados.
- 45 Más preferido es un método en donde dicha influencia comprende inhibir en un animal el desarrollo de los canales linfáticos, linfangiogénesis y/o la migración de los linfangioblastos.
- 50 Se proporciona además un método en el que dicha influencia comprende estimular en un animal el desarrollo de los canales linfáticos, linfangiogénesis y/o la migración de los linfangioblastos.
- 55 En un aspecto adicional, la descripción describe un método para determinar si un individuo es un portador, o padece de, o en riesgo de padecer de, un trastorno de vaso linfático, que comprende proporcionar una muestra de dicho individuo; determinar la presencia de una alteración en la secuencia del gen Ccbe1, y determinar que el individuo es un portador, o padece de, o en riesgo de padecer del trastorno de vaso linfático si dicha alteración está presente.
- 60 Dicha alteración en la secuencia del gen Ccbe1 resulta en un silenciamiento funcional del gen Ccbe1. Por el término silenciamiento funcional se entiende que se reduce la actividad de la proteína Ccbe1, en comparación con el producto de

5 proteína de un gen Ccbe1 sin dicha alteración. Una reducción de la actividad puede resultar de una reducción de la expresión del gen. Por ejemplo, una alteración en el potenciador o promotor del gen Ccbe1, o una alteración de la secuencia líder de ARNm o secuencia remolque que resulta en una estabilidad reducida del ARNm, conducirá a una reducción de la expresión del gen. Así, en un método de la invención, se determinaron las secuencias no-codificantes del gen Ccbe1, por ejemplo mediante análisis de secuencia, para identificar una o más alteraciones que reducen la expresión del gen Ccbe1.

10 En una modalidad preferida, una alteración en la secuencia del gen Ccbe1 comprende una alteración de la secuencia codificante de la proteína Ccbe1. Dicha alteración de la secuencia codificante resulta, por ejemplo, en la estabilidad reducida de la proteína, actividad de unión al calcio reducida, actividad de unión al colágeno reducida, o unión reducida de la proteína a su receptor. Alteraciones preferidas para el método de la invención son las alteraciones de aminoácidos que comprenden los aminoácidos C75, C102, C174, L229 y/o G327. Más preferidas son las alteraciones del aminoácido C75 a S75 (C75S), C102S, C174R, L229fsX8 y/o G327R.

15 Métodos para determinar alteraciones en la región codificante del gen Ccbe1 están disponibles en la técnica. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la proteína se puede determinar por espectrometría de masas, por ejemplo ionización/desorción mediante láser asistida por matriz/tiempo de vuelo (MALDI-TOF) o reacción de degradación de Edman. Alternativamente, los anticuerpos que específicamente identifican un epítipo de la proteína Ccbe1 puede usarse para determinar la presencia de una alteración de la secuencia codificante de la proteína Ccbe1. Métodos preferidos adicionales comprenden el análisis de la secuencia de ácido nucleico del ARNm de Ccbe1, o un ADN copia del ARNm, y análisis de la secuencia nucleotídica de una o más de los exones codificantes del gen Ccbe1. Los métodos para analizar la secuencia de ácido nucleico de un ácido nucleico se conocen en la técnica y comprenden, por ejemplo, la secuenciación de terminación con colorante, pirosecuenciación, secuenciación por ligación, y secuenciación de Sanger. Una etapa de amplificación, tal como por ejemplo una reacción en cadena de la polimerasa, puede preceder el análisis de la secuencia de nucleótidos de uno o más de los exones codificantes del gen Ccbe1.

25 El uso de anticuerpos se puede emplear además para determinar si está presente una alteración en el gen Ccbe1. Por ejemplo, las mutaciones en el gen Ccbe1 que conducen a una expresión reducida o alteración en la longitud de la proteína codificada se pueden determinar por la reducción en la señal o tamaño de la banda alterado en una inmunoelectrotransferencia. Descritos además están los anticuerpos que reconocen específicamente a un epítipo seleccionado de C75S, C102S, C174R, L229fsX8 y/o G327R de Ccbe1, que pueden usarse, por ejemplo, para detectar las mutaciones específicas en un inmunoensayo. En una modalidad, la invención proporciona un método para determinar si un individuo es un portador, o padece de, o en riesgo de padecer de, un trastorno de vaso linfático, que comprende proporcionar una muestra de dicho sujeto; realizar un inmunoensayo para determinar la presencia de una alteración en la secuencia del gen Ccbe1, y determinar que el individuo es un portador, o padece de, o en riesgo de padecer del trastorno de vaso linfático si dicha alteración está presente.

40 Por el término una muestra se entiende cualquier muestra que comprende las células que pueden obtenerse de un individuo, preferentemente un ser humano. Preferentemente, dicha muestra comprende sangre, heces, u otros fluidos corporales que comprenden células del individuo. Una muestra preferida comprende células sanguíneas del individuo. Proteína, o ácido nucleico tales como ADN y/o ARN, se pueden fraccionar sustancialmente y aislar de la muestra como es conocida por un experto en la técnica. La presencia de una alteración en la secuencia del gen Ccbe1 se determina en la fracción de proteína, o en la fracción de ácido nucleico, como será evidente para un experto en la técnica.

45 Un método descrito en la presente permite determinar si un individuo es un portador de un trastorno de vaso linfático, o si el individuo padece de, en riesgo de padecer de, un trastorno de vaso linfático. Si una alteración en la secuencia del gen Ccbe1 está presente en una copia del gen Ccbe1, el individuo es heterocigoto para la alteración, y probablemente no padece del trastorno de vaso linfático. Dicho individuo heterocigoto es un portador del trastorno de vaso linfático, lo que significa que el individuo puede transmitir el trastorno a las crías del individuo. El método permite así determinar si un individuo es portador de un trastorno de vaso linfático que está en riesgo de transmitir la enfermedad a la descendencia del individuo. Si una alteración en la secuencia del gen Ccbe1 está presente en ambas copias del gen Ccbe1, dicho individuo padece o está en riesgo de padecer de dicho trastorno de vaso linfático.

55 Preferentemente dicho trastorno de vaso linfático es un trastorno de vaso linfático congénito que resulta en el linfedema. El linfedema congénito resulta de tener vasos linfáticos insuficientes que no pueden manejar toda la linfa. El linfedema casi siempre afecta a las piernas. Las mujeres son mucho más propensas que los hombres a tener linfedema congénito. Raramente, la hinchazón es evidente en el nacimiento. Más frecuentemente, la hinchazón aparece después en la vida, ya que el volumen de la linfa aumenta y dobla el pequeño número de vasos linfáticos. Frecuentemente, la inflamación comienza gradualmente en una o ambas piernas. Un trastorno de vaso linfático congénito preferido para el uso de un método de la invención se selecciona del síndrome de Meige, Nonne-Milroy y Hennekam. Un trastorno de vaso linfático más preferido es el síndrome de Hennekam.

- 5 En aún un aspecto adicional, se da a conocer una composición que comprende Ccbe1, o que comprende un ácido nucleico que codifica Ccbe1, como un medicamento. Un medicamento que comprende Ccbe1 o que comprende un ácido nucleico que codifica Ccbe1 se puede usar en el tratamiento de un trastorno de vaso linfático congénito o adquirido. Un medicamento preferido comprende Ccbe1 humana, o comprende un ácido nucleico que codifica Ccbe1 humano.
- 10 En algunas modalidades, la proteína humana Ccbe1 proporcionada en la composición, medicamento, o métodos descritos en la presente es al menos 70, 80, 90, 95, 98, o 100% idéntica a la proteína Ccbe1 humana como se representa en la Figura 3.
- 15 La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad y similitud entre dos secuencias es bien conocida en la técnica y se puede lograr utilizando un algoritmo matemático. (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., edición, Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., edición, Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., ediciones, Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., ediciones, M Stockton Press, Nueva York, 1991). Cuando una posición en una primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se usa en la presente la "identidad" de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a la "homología" de aminoácido o ácido nucleico). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que necesitan introducirse para un alineamiento óptimo de las dos secuencias.
- 25 En una modalidad, dicho medicamento comprende una proteína Ccbe1 humana de longitud completa o una parte activa o derivada de esta. Por el término parte activa se entiende una parte de la proteína que es capaz y suficiente para inducir la formación del vaso linfático. Por el término derivado se entiende una modificación de la proteína de longitud completa o una parte activa que, por ejemplo, estabiliza la proteína o parte de esta.
- 30 En algunas modalidades la proteína Ccbe1 humana es un fragmento funcional o derivado funcional de la proteína de longitud completa. Fragmentos y derivados funcionales son capaces de inducir la formación del vaso linfático. Derivados funcionales abarcan proteínas de longitud completa y fragmentos de proteínas de Ccbe1 que comprenden modificaciones, tales como, por ejemplo, modificaciones estabilizadoras. Proteínas Ccbe1 pueden incluir además varias etiquetas, tales como His, Myc, etc, así como secuencias heterólogas adicionales.
- 35 En una modalidad adicional, el medicamento comprende un ácido nucleico que codifica la Ccbe1 de longitud completa o una parte funcional de esta. En una modalidad, dicho ácido nucleico es una molécula de ácido nucleico desnudo que comprende además instrumentos para la expresión de la proteína Ccbe1, tales como, por ejemplo, un potenciador, un promotor, y una señal de terminación. En una modalidad preferida, dicho medicamento comprende además instrumentos para transducir el ácido nucleico en una célula. Preferentemente dichos instrumentos comprenden una partícula de virus que abarca el ácido nucleico. Una partícula de virus preferida se selecciona de una partícula de adenovirus, una partícula de retrovirus o una partícula de virus adeno-asociado.
- 40 Dicho medicamento para el tratamiento de un trastorno de vaso linfático se selecciona de un trastorno de vaso linfático congénito o un trastorno de vaso linfático adquirido. Un trastorno de vaso linfático adquirido típicamente aparece después de un tratamiento quirúrgico importante, especialmente después del tratamiento del cáncer en el que los ganglios linfáticos y vasos linfáticos se eliminan o tratan con radiación. Por ejemplo, el brazo tiende a hincharse después de la eliminación de una mama cancerosa y ganglios linfáticos de la axila. La cicatrización de los vasos linfáticos de la infección repetida puede causar también linfedema, que puede tratarse con un medicamento de acuerdo con la invención.
- 45 Un medicamento preferido comprende una cantidad terapéuticamente activa de Ccbe1, o de un ácido nucleico que codifica Ccbe1 de longitud completa, y uno o más vehículos o excipientes farmacológicos aceptados. El medicamento se administra en una formulación farmacéutica tal como en un vehículo líquido en inyección, o en forma de cápsula para la ingestión. La administración de un medicamento a los seres humanos puede ser por cualquier técnica capaz de introducir los ingredientes incluyendo la administración oral, intravenosa, intramuscular, intradérmica y subcutánea. Otros agentes terapéuticos pueden estar presentes también en la formulación.
- 50 En algunas modalidades, se describen la proteína Ccbe1 y/o ácido nucleico de Ccbe1 para uso en el tratamiento de un trastorno de vaso linfático como se describe en la presente.
- 60 En un aspecto, se describen métodos para tratar a un sujeto aquejado de un trastorno de vaso linfático que comprende

administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un medicamento descrito en la presente, particularmente una composición que comprende la proteína Ccbe1 o un ácido nucleico que codifica Ccbe1. En modalidades preferidas, el sujeto aquejado con el trastorno de vaso linfático tiene una o más mutaciones en el gen Ccbe1. Un trastorno de vaso linfático preferido para uso de un método de la invención se selecciona del síndrome de Meige, Nonne-Milroy y Hennekam. Un trastorno de vaso linfático más preferido es el síndrome de Hennekam.

La invención se explica además en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos no limitan el alcance de la invención, sino que simplemente sirven para evidenciar la invención.

10 Breve descripción de las figuras

**Figura 1:** Mutantes *llenos de fluido* carecen de vasos linfáticos del tronco.

- 15 **a y b.** Patrón general de los vasos sanguíneos (*fli1:GFP*, 5dpf) en hermanos de tipo silvestre (**a**) y mutantes *fof* (**b**).  
**c-f.** Las angiografías de embriones *fli1: GFP* a los 5dpf revelan que el conducto torácico (flechas en **c** y **e**), vasos linfáticos intersegmentarios (ISLVs) (puntas de flecha y recuadro en **e**) y el vaso linfático longitudinal dorsal (DLLV) (punta de flecha en **c**) carecen de flujo sanguíneo. Los mutantes *fof* carecen de todos los vasos linfáticos del tronco (**d** y **f**).  
**g y h.** Los mutantes *fof* (**J**) que sobreviven a los 36dpf (n=3/28, ver Fig. 1 complementaria) muestran edema severo  
**.i. Superior-** Mapa meiótico del locus *fof* locus. Eventos recombinantes para cada marcador polimórfico se representan en rojo (proximal) y azul (distal). Recombinantes de SNP1 y CA1 excluyen genes vecinos *lman1* y *hcn1*.  
**Izquierda inferior-** Secuencia de alineación múltiple de las proteínas Ccbe1 que demuestran la conservación del pez cebra D162.  
**Derecha inferior-** *ccbe1* fenocopias de morfolino ATG *fof* en embriones morfológicamente normales (recuadro) (n=134/136 (empalme MO n=20/59)). Asterisco=ausencia de conducto torácico.

**Figura 2:** *ccbe1* y *vegfc* se requieren para la germinación del linfangioblasto y brotación angiogénica a partir del endotelio venoso.

- 30 **a.** La expresión de *ccbe1* del tronco se limita al mesénquima ventral (vm) y pronefros (pn) a las 24 hpf. A las 36hpf, la expresión se extiende a lo largo de los límites somíticos (recuadro) y la miosepto horizontal (hm) (bilateral en la sección). La expresión de *ccbe1* del tronco se limita al miosepto horizontal a las 48hpf cuando los linfangioblastos pueblan esta región.  
35 **b.** *Estabilina 1: YFP* la expresión marca el PCV (barras azules=PCV, barras rojas=DA) y linfangioblastos derivados (flechas indican células bilaterales) a las 48hpf, y la vasculatura linfática (puntas de flecha) y PCV a los 7dpf, con la expresión arterial progresivamente debilitada. Las células que expresan *estabilina1* dejan de germinar en los morfantes *ccbe1* (n=21/22) y *vegfc* (n=29/31) (48hpf).  
**c.** Las células endoteliales de la región del miosepto horizontal expresan *fli1* (flecha) pero no mantienen el flujo sanguíneo (asterisco, angiograma en rojo) (52hpf).  
40 **d.** Linfangioblastos positivos a *fli1* en la región del miosepto horizontal son migratorios y contribuyen a la vasculatura linfática como se visualiza en *kdr-l:RFP*, *fli1:GFP* animales transgénicos dobles (flecha indica linfangioblastos (52hpf y 3.5dpf) y vasos linfáticos (5dpf), asterisco indica la ausencia de células endoteliales paracordales) (ver además película complementaria 5).  
45 **e.** Linfangioblastos (*fli1:GFP*) no brotan y migran en los mutantes *fof* (n=12/12), morfantes *vegfc* (n=16/16), morfantes dobles *fof/plcg* (n=28/28) y morfantes dobles *vegfc/plcg* (n=74/83) pero no en morfantes sencillos *plcg* (n=21/21) a las 48hpf. La flechas indican linfangioblastos, el asterisco su ausencia.  
**f.** *tie2* se expresa en los brotes de PCV en los embriones de tipo silvestre que están ausentes en los mutantes *fof* (n=35/35), morfantes *vegfc* (n=57/64) o morfantes *plcg* (n=55/55) a las 48hpf.  
50 **g.** En embriones de tipo silvestre, los brotes venosos son *flt1: YFP* negativos a las 48 hpf en embriones transgénicos dobles *kdr-l:RFP*, *flt1:YFP*. En morfantes *ccbe1*(n=20/20) y *vegfc* (n=22/25), los brotes venosos están ausentes y en su ausencia se establece una circulación funcional debido a las conexiones ISV aumentadas en la aorta dorsal. El corchete indica los brotes derivados venosos, las flechas indican las conexiones arteriales.

**Figura 3:** Secuencia de una proteína y secuencia codificante de *ccbe1* humano.

**Figura 4:** Supervivencia y morfología de los mutantes *llenos de fluido*.

- 60 **a.** Curva de supervivencia diaria de la población de tipo silvestre (n=28) de *fof* hermanos seleccionados por la presencia del conducto torácico a los 6dpf (diamantes azules) comparado con la población mutante (n=28) seleccionada por la carencia del conducto torácico a los 6dpf (cuadrados rosados).

- b. Acumulación de líquido en el intestino (flecha en el panel izquierdo) y alrededor de los ojos (flechas en **panel derecho**) en los mutantes (inferior) comparados con los hermanos de tipo silvestre (superior) a los 6dpf.
- c y d. La morfología del pez 36dpf hermano (c) y mutante (d) (imágenes de la Fig. 1) correspondiente con el punto final de las dos poblaciones graficadas.

5

**Figura 5:** Secuencia, fenocopia y rescate de *fof*<sup>hu3613</sup>.

- a y b. La secuenciación de *ccbe1* identificó una transversión (T a A) correspondiente a la posición 162 de la proteína predicha, sustituyendo el ácido aspártico (D) por ácido glutámico (E) (codón afectado subrayado).
- c y d. Inyección de un *ccbe1* de fenocopias de morfolinolinos ATG *fof* (d) (n=134/136 (empalme MO n=20/59)); control de tipo silvestre en (c). Flecha=conducto torácico, asterisco=ausencia del conducto torácico.
- e. ARNm *deccbe1* (400pg/embrión) recató el fenotipo *fof*. Los embriones se seleccionaron por la presencia del conducto torácico, y posteriormente se genotiparon (n=90 no-inyectados, 176 inyectados)

10

15

**Figura 6:** Expresión embrionaria de *ccbe1*.

- a-c. *ccbe1* se expresa en el mesodermo pronefrico (pm), pronefros (pn), mesénquima ventral (vm), piel (sk), epífisis (ep), y vesícula ótica (ov) durante el desarrollo.
- d. La expresión no se alteró en los embriones mutantes *cloche* seleccionados por la ausencia de células endoteliales del tronco (dorsal a la extensión del saco vitelino) (n=9).

20

**Figura 7:** Ensayos de trasplante.

- a. Células inyectadas con morfolino (rodamina marcada, izquierda) trasplantadas en embriones de tipo silvestre interrumpen la formación del conducto torácico (GFP, derecha, área encerrada) al contribuir con el mesodermo somático. En un total de 92 trasplantes, n=7/7 los conductos torácicos interrumpidos fueron inmediatamente ventrales a las células musculares marcadas (5dpf).
- b. Células donadoras de tipo silvestre (rodamina marcada, izquierda) rescataron la formación del conducto torácico en las células morfantes (GFP/rodamina en la sección confocal sencilla, derecha, área encerrada) al contribuir con el mesodermo somático. n=134 embriones trasplantados, n=7/7 con fragmentos linfáticos inmediatamente ventrales al músculo injertado, MO eficiencia 98.5% (n=136; 5dpf).  
Flechas = presencia, asterisco = ausencia de fragmentos del conducto torácico.
- c. Imagen intercalada del embrión de (a) indicando que los injertos grandes de las células musculares morfantes se necesitaron para la interrupción del conducto torácico.
- d. El segundo ejemplo de células morfantes injertadas en embriones de tipo silvestre interrumpe la formación del conducto torácico. Las células musculares morfantes en la región del miosepto horizontal (flechas amarillas) se asociaron con la ausencia del conducto torácico en esta región (asterisco blanco).
- e. La parte posterior del tipo silvestre en el embrión morfante injertado de (b) indica la ausencia del conducto torácico en la ausencia de células musculares injertadas.
- f. El segundo ejemplo de células de tipo silvestre injertadas en embriones morfantes rescata formación conducto torácico en las células morfantes. Las células musculares de tipo silvestre de la región del miosepto horizontal (flechas amarillas) se asociaron con la presencia de un pequeño fragmento del conducto torácico (flecha blanca). Las flechas amarillas indican la presencia del músculo derivado del mesodermo somático injertado, las flechas blancas indican la presencia de células del conducto torácico, el asterisco blanco indica la ausencia de las células del conducto torácico en c-f.
- g. Las células endoteliales trasplantadas fueron fácilmente detectables en presencia del marcador de rodamina (rojo). (g'=GFP, g''=rodamina, g'''=Flechas intercaladas indican célula trasplantada con doble marcaje, sección confocal individual).

25

30

35

40

45

50

**Figura 8:** Análisis de la expresión de *lyve-1*, *estabilina-1*, *vegfc* y *vegfd*.

- a. Expresión de *lyve-1* a los 4dpf se observa fácilmente en la región faríngea (flecha, superior) y la región de la vena caudal, así como en el aspecto dorsal de la vena cardinal posterior (flecha, inferior a la izquierda), conducto torácico (con 2 días de tinción) (flecha, inserción, inferior a la izquierda) y en la cabeza (inferior derecha).
- b. Expresión de *estabilina-1* a los 4dpf se observa en la región faríngea (flecha superior), región de la vena caudal, el aspecto dorsal de la vena cardinal posterior (flecha inferior) y el conducto torácico (con 2 días de tinción) (flecha, inserción, inferior a la izquierda), pero no se observa en la cabeza por la expresión cerebral difusa.
- c. Expresión de *vegfc* a las 24hpf, 36hpf y 48hpf se observa en el hipocorda (hy), aorta dorsal (da) y mesénquima ventral (vm), pero los niveles de expresión se reducen a 48hpf.
- d. Expresión de *vegfd* a las 24hpf, 36hpf y 48hpf se observa en el retoño (tb).

55

60

**Figura 9:** La ausencia de expresión de *kdr-l (flk1)* en los vasos linfáticos distingue la vasculatura arterial de la vasculatura linfática en animales doble transgénicos *kdr-l:RFP, flil1:GFP*.

- 5           a. Expresión de *kdr-l:RFP, flil1:GFP* e intercalado a los 3.5dpf revela que los fragmentos del conducto torácico de brotación precoz son *kdr-l* negativos y *flil1* positivos.
- b. Vasos linfáticos intersegmentarios y dorsales longitudinales son *kdr-l* negativos y *flil1* positivos (la flecha indica el conducto torácico) (B'= sección encerrada de B, flechas indican el DLLV y ISLV) (3.5dpf).
- 10           c. Los vasos linfáticos en la parte posterior son *kdr-l* negativos y *flil1* positivos (flecha) mientras que las células en la región paracordal retienen la alta expresión de *flil1* y débil expresión de *kdr-l* residual (puntas de flecha).
- d. La expresión de RFP está ausente del conducto torácico (asterisco, d') mientras que la expresión de GFP está presente en el conducto torácico (flecha, d'' y d''') a los 6dpf.

15 **Figura 10:** Mutaciones equivalentes en *Ccbe1* del pez cebra anula la función normal del gen. Representada en la parte superior está la proteína *ccbe1* humana, la localización de las mutaciones identificadas, y las secuencias homólogas de *ccbe1* en otros organismos.

- 20           **A y B.** Inyección de morfolino (MO) ATG dirigido a *ccbe1* (5ng/embrión) conduce a una fenocopia robusta del fenotipo *lleno de fluido* con ausencia del conducto torácico en los embriones inyectados (**B**) comparado con los embriones controles no-inyectados (**A**) a los 5 dpf.
- C y D.** El fenotipo ATG MO de *ccbe1* se rescata mediante la inyección del ARNm tipo silvestre de *ccbe1* (**C**) pero no del ARNm que contiene las mutaciones equivalentes a las mutaciones de *CCBE1* humano descrito en el documento (el ejemplo mostró el fracaso del rescate con el ARNm C166R de *ccbe1* del pez cebra (350pg/embrión) (**D**)).
- 25           **E.** Resumen de experimentos de rescate realizados. Los embriones se anotaron para la presencia o ausencia del conducto torácico (TD), los datos se muestran para el control no inyectado (100% TD+, n=21 embriones anotados), MO inyectado (0% TD+, n=45), MO + *ccbe1* (90% TD+, n=97), MO + ARNm R150C de *ccbe1* (81% TD+, n=36), MO + ARNm C166R de *ccbe1* (0% TD+, n=69) y MO + ARNm G313R de *ccbe1* (0% TD+, n=73). Estas mutaciones son equivalentes a R158C, C174R y G327R humanos respectivamente. La anotación de aminoácidos de una letra se usa en esta figura debido al espacio limitado.
- 30

35 **Figura 11:** Mutaciones en *CCBE1* anulan la función normal del gen. (a) Posiciones de las mutaciones en los aminoácidos conservados en *CCBE1*. La información sobre la localización del dominio se obtuvo de UniProt (disponible en la web mundial de uniprot.org).

(b-j) Análisis funcional de las mutaciones en el modelo *ccbe1* de pez cebra usando la línea transgénica TG(*flil1a:gfp*) y1, TG(*kdr-l:ras-cherry*)s916. *Fli1a* (verde) es un marcador tanto para las células endoteliales sanguíneas como linfáticas, mientras que *Kdr-l* (rojo) se expresa sólo en los vasos sanguíneos<sup>12</sup>. (b,c) Inyección de morfolino (MO) dirigido ATG *ccbe1* (5 ng por embrión) condujo a una fenocopia robusta del fenotipo mutante de *ccbe1* con ausencia (\*) del conducto torácico en los embriones inyectados (c), pero no en los embriones controles no inyectados (b) 5 d después de la fecundación, (d-i) el fenotipo MO ATG *ccbe1* está robustamente rescatado mediante la inyección del ARNm de *ccbe1* tipo silvestre (d), pero no del ARNm que codifica las sustituciones C67S (e), C94S (f), C166R (h) o G313R (i). El ARNm que codifica la sustitución R150C fue capaz de rescatarse (g). Asterisco, carencia de rescate; flechas, conducto torácico. Todos los ARNm se inyectaron a 350 pg por embrión.

45 (j) Resumen de los experimentos de rescate. Los embriones se anotaron para la presencia o ausencia del conducto torácico (TD), y los datos se muestran para control no inyectado (100% TD+, n = 21 embriones anotados), MO inyectado (6% TD+, n = 75), MO + *ccbe1* ARNm (97% TD+, n = 117), MO + *ccbe1* C67S ARNm (25% TD+, n = 108), MO + *ccbe1* C94S ARNm. (4% TD+, n = 96), MO + *ccbe1* R150C ARNm (78% TD+, n = 57), MO + *ccbe1* C166R ARN (0% TD+, n = 87) y MO + *ccbe1* G313R ARN (0% TD+, n = 73). Las mutaciones en e-i son equivalentes a los C75S, C102S, R158C, C174R y G327R humanos, respectivamente.

50

**Figura 12:** Iniciadores usados para la amplificación de los exones codificantes de *CCBE1*. Los iniciadores se etiquetaron con las secuencias de M13 que facilitan la secuenciación con los iniciadores M13 universales. Las secuencias escritas en mayúsculas son las secuencias génicas específicas.

55 Ejemplos

Ejemplo 1:

Los vasos linfáticos juegan papeles importantes en la homeostasis de fluidos, absorción de grasa, inflamación y metástasis del cáncer y se desarrollan en un proceso dinámico (denominado linfangiogénesis) que implica germinación, migración y proliferación de los linfangioblastos. Usando un tamiz genético en el pez cebra identificamos *el dominio-1 de EGF de unión al calcio y colágeno (ccbe1)* como indispensable para linfangiogénesis embrionaria. Ccbe1 actúa en la misma etapa de desarrollo que Vegfc y se necesita para la germinación linfangioblástica y brotación angiogénica del endotelio venoso.

Para identificar nuevos reguladores de linfangiogénesis, utilizamos la vasculatura linfática del pez cebra recientemente caracterizada<sup>1, 2</sup> como un modelo. En un tamiz genético directo y especializado, aislamos un mutante, *lleno de fluido (fof<sup>hu3613</sup>)*, que careció del conducto torácico y los vasos linfáticos intersegmentarios (ISLVs) y dorsales longitudinales (DLLVs) previamente no identificados, mientras que retienen una vasculatura arterial patrón y funcional (Fig. 1a-f). Los mutantes mostraron edema, iniciando en el intestino inferior y alrededor de los ojos desde los 6 días después de la fertilización (dpf) y los pocos mutantes que sobrevivieron a los 36dpf mostraron edema severo (Fig. 1g y h, Fig. 4).

El mapeo genético de *fof* localizó la mutación en el cromosoma 21 en un intervalo que contiene un solo gen, *dominio 1 de EGF de unión al calcio y colágeno (ccbe1)* (Fig. 1i (superior)). *ccbe1* codifica una proteína secretada predecible que contiene un péptido señal, un dominio de colágeno, y un dominio de EGF de unión al calcio. La secuenciación reveló una única mutación codificante en el cuarto exón de *ccbe1* que cambia un ácido aspártico (D) por el ácido glutámico (E) en el dominio EGF de unión al calcio (Fig. 5). El residuo mutado (D162) está completamente conservado en las proteínas Ccbe1 (Fig. 1i (izquierda inferior)). Significativamente, una mutación equivalente (D1479E)<sub>h</sub> en un dominio EGF de unión al calcio de Fibrilina1 se asocia con fenotipos de pérdida de función de los seres humanos<sup>3</sup>. La inyección de morfolinolinos dirigidos a *ccbe1* eficazmente fenocopiados *fof* a los 5 dpf (Fig. 1i (derecha inferior), Fig. 5) y la inyección ARNm de *ccbe1* rescataron la deficiencia linfática en los mutantes *fof* (Fig. 5), demostrando juntos que *fof<sup>hu3613</sup>* es un alelo de pérdida de función.

Observamos la expresión restringida de *ccbe1* durante el desarrollo (Fig. 6) con la expresión en los pronefros y el mesénquima ventral a las 24 horas después de la fertilización (hpf) (Fig. 2a). A las 36 hpf, se detectó expresión en zonas discretas a lo largo de cada límite somítico, entre el PCV y el miosepto horizontal, así como a lo largo del propio miosepto horizontal (Fig. 2a). Esta expresión se retuvo en los embriones mutantes *cloche<sup>hu2345</sup>* (Fig. 6) y, por tanto, fue no-endotelial. A las 48 hpf, la expresión de *ccbe1* se limitó a lo largo del miosepto horizontal (Fig. 2a). Curiosamente, este patrón de expresión dinámica o no-endotelial se correlaciona espacial y temporalmente con las rutas migratorias de células endoteliales que germinan a partir del PCV, migran en estrecha asociación con los límites somíticos y cultivan la región del miosepto horizontal desde donde migran después los precursores linfáticos<sup>1, 4</sup>. Usando ensayos de trasplante de embriones, encontramos claramente que se necesitó la función de *ccbe1* en el mesodermo somítico para la formación del conducto torácico adyacente y de cualquier otra forma fue suficiente para la formación del conducto torácico en embriones deficientes de *ccbe1* cuando se limitaron al mesodermo somítico (Fig. 7). En conjunto, la estructura del dominio de Ccbe1 (péptido señal, dominio de colágeno, dominio EGF de unión al calcio), expresión no-endotelial y el papel en el mesodermo somítico indican que *ccbe1* actúa de forma no-autónoma para promover la linfangiogénesis embrionaria.

#### Ejemplo 2:

Para observar directamente linfangiogénesis embrionaria, produjimos una línea transgénica utilizando el promotor de *estabilina1*, un gen expresado de la misma manera como *lyve1*<sup>7</sup> en el pez cebra (Fig. 8) y un marcador de linfáticos en los mamíferos<sup>5, 6</sup>. La expresión de *estabilina1: YFP* se enriqueció en el PCV y células endoteliales derivadas venosas, incluyendo las células endoteliales en el miosepto horizontal por 48hpf. En etapas posteriores, la expresión se limitó en gran medida al endotelio linfático y venoso (Fig. 2b). Usando imaginería en vivo, se observaron germinar las células positivas a la *estabilina1* desde PCV hasta el miosepto horizontal a partir de aproximadamente las 36 hpf (película complementaria 1). Entre las 48 y 72 hpf, estas células permanecieron en esta región antes de migrar dorsalmente, para contribuir al DLLV o ventral, para contribuir al conducto torácico (película complementaria 2). En los morfantes de *ccbe1*, las células que expresan *estabilina1* fracasan en la germinación a partir del PCV (Fig. 2b, película complementaria 3).

La señalización Vegfc/Vegfr3 se necesita para la iniciación de la germinación del linfangioblasto en mamíferos<sup>8, 9</sup>. La expresión en el pez cebra de *vegfc* pero no de *vegfd* se encuentra inmediatamente dorsal al PCV previo a y simultáneo con la germinación de las células que expresan *estabilina1* (Fig. 8)<sup>10</sup>. Inyectamos los morfolinolinos<sup>2</sup> dirigidos a *vegfc* y encontramos que se necesitó *vegfc* para la germinación de las células positivas a la *estabilina1* precisamente en la etapa que necesita de *ccbe1* (fig. 2b, película complementaria 4).

Como se observó para las células que expresan *estabilina1*, estudios previos describieron la germinación de las células desde el PCV hasta el miosepto horizontal para formar una estructura llamada vaso paracordal<sup>4</sup> a partir del que se derivan después los precursores linfáticos<sup>1</sup>. Encontramos que las células que expresan *fli1* en la región paracordal no forman un tubo vascular o soporte de flujo sanguíneo (Fig. 2c). Más bien, aprovechando la ausencia de la expresión de *kdr-tipo (flk1)*<sup>11</sup> en los vasos linfáticos (Fig. 6 complementaria), encontramos que la mayoría de estas células migran lejos del miosepto

horizontal para contribuir a la vasculatura linfática y están presentes durante el desarrollo en el miosepto horizontal sólo transitoriamente (Fig. 2d, película complementaria 5). Por lo tanto, estas células no constituyen un vaso sanguíneo y principalmente funcionan como precursores vasculares linfáticos (linfangioblastos).

5 A continuación examinamos los linfangioblastos que expresan *fli1* en la ausencia de arterias y derivados, en un escenario inducido experimentalmente suprimiendo la función de la fosfolipasa *Cgamma 1 (plcg)*<sup>12</sup>. En los morfantes *plcg*, los linfangioblastos que expresan *fli1* germinaron a partir del PCV en la ausencia de vasos intersegmentarios, pero la germinación estuvo ausente en los embriones mutantes *fof* y morfantes *vegfc* (Fig. 2e). La expresión de *tie2* identifica brotes venosos derivados de embriones de tipo silvestre (48hpf). Encontramos que estos brotes estuvieron ausentes en los  
10 mutantes *fof* y morfantes *vegfc*, sin embargo, estos brotes estuvieron ausentes además en los morfantes *plcg* que indican que son una población celular distinta de los linfangioblastos (Fig. 2f). Por lo tanto, desarrollamos una línea transgénica doble (*flt1:YFP, kdr-l:RFP*), que desenmascara los orígenes arteriales o venosos de las células individuales de la vasculatura del tronco. Los brotes de vasos intersegmentarios derivados venosos estuvieron ausentes en los morfantes *ccbe1* y *vegfc* (Fig. 2g). Por lo tanto, tanto la brotación angiogénica como la germinación linfangiogénica a partir del PCV  
15 necesita *ccbe1* y *vegfc*, pero sólo la brotación angiogénica necesita *plcg*, separando genéticamente los dos procesos.

En conjunto, estos datos demuestran que, durante la embriogénesis, *ccbe1* y *vegfc* actúan tanto a nivel de la brotación angiogénica como de la germinación linfangiogénica del endotelio venoso. Comparado con los ratones knockout *uegfc*<sup>9</sup> y *prox1*<sup>13, 14</sup>, el mutante *lleno de fluido* representa precisamente el tercer mutante vertebrado con pérdida de la función que  
20 conduce a la pérdida específica de la vasculatura linfática embrionaria.

### Ejemplo 3

Alteraciones de la linfangiogénesis generalmente causan interrupción del drenaje de los fluidos intersticiales en el sistema  
25 cardiovascular, resultando en linfedema, quilotórax o derrame pleural, ascitis quilosa, y angiectasias de vasos linfáticos en intestinos y otros órganos. Los signos de displasias vaso-linfáticas son comúnmente limitados a las extremidades. En 1989, una familia congénita se describió en la que cuatro miembros con retraso mental tenían un síndrome generalizado de malformación linfática congénita con linfedema del miembro, y linfangiectasias del intestino y en una edad más avanzada también de los pulmones (Hennekam, R.C. y otros Am. J. Med. Genet. 34, 593-600 (1989). Adicionalmente, los individuos  
30 afectados tuvieron características faciales peculiares (cara plana, puente nasal plano y ancho, hipertelorismo) considerándose que refleja el grado de linfedema facial precoz intrauterino. Posteriormente, se describieron sujetos con linfangiectasias en la pleura, pericardio, glándula tiroidea y riñón y con hidropesía fetal (Van Balkom, I.D. y otros Am. J. Med. Genet. 112, 412-421 (2002) y Bellini, C. y otros Am. J. Med. Genet. 120A, 92-96 (2003)). La entidad se designó linfedema-linfangiectasia-retraso mental o síndrome Hennekam (MIM 235510). El incidente de los hermanos afectados, igualdad entre  
35 los sexos y consanguinidad frecuente indicaron herencia recesiva autosómica.

Recogimos muestras de sangre a partir de una serie de 27 sujetos con síndrome de Hennekam nacidos de 22 familias. Ninguno de los sujetos portó mutaciones en FLT4, FOXC2 o SOX18. El análisis de la mutación del gen *Ccbe1* humano se  
40 realizó mediante la amplificación por PCR de los 11 exones codificantes de *Ccbe1* y la posterior secuenciación usando el kit BIGdye y secuenciador ABI3700 (Applied Biosystems). Los iniciadores para la amplificación de los exones codificantes se muestran en la Figura 12. Esto reveló mutaciones homocigóticas en 5 pacientes con Síndrome de Hennekam (HS) de los cuales tres pacientes (JP, AK y KB) provenían de un pequeño pueblo aislado en Holanda conocido por una alta prevalencia de consanguinidad. El análisis de linaje mostró que los padres de uno de ellos era consanguíneo y los tres pacientes  
45 estaban relacionados. Otros dos pacientes (MM y TS) de padres altamente consanguíneos se incluyeron además en el análisis.

Tanto la mutación en JP, AK y KB (p.Cys75Ser) como MM (p.Cys102Ser) son N-terminal del dominio putativo EGF de unión al calcio. Sin embargo, esta región muestra además que algunas secuencias tipo-EGF y la interrupción de cisteínas  
50 conservadas pueden afectar a las estructuras secundarias y/o terciarias. La mutación p.Gly258Arg en TS se prevé que interrumpe la cadena principal de la glicina en la hélice putativa del colágeno de CCBE1.

Otros dos pacientes (GV, LH) nacidos de padres no-consanguíneos se identificaron posteriormente con mutaciones en el gen *Ccbe1*. LH portó una inserción de herencia materna del nucleótido 1, c.683\_684insT, que resulta en una mutación del marco de lectura. Adicionalmente, GV portó una mutación de aminoácido p.Arg158Cys de herencia paterna. LH fue  
55 heterocigoto para c.683\_684insT y para p.Cys174Arg. Tanto las mutaciones de aminoácidos p.Arg158Cys como p.Cys174Arg están en el dominio de EGF de unión al calcio, la primera introduce otro cisteína que puede interferir con el plegamiento apropiado de la proteína en el dominio, y el segundo interrumpe un residuo de cisteína previsto para formar enlaces disulfuro y necesario para la estructura secundaria de este dominio (figura 3). Todas las mutaciones detectadas en los pacientes estuvieron ausentes en una población control de individuos sanos de Europa occidental (n=100) o

descendientes Árabicos (UAE) (n=97). Ninguno de los otros pacientes de 17 familias del total del grupo HS albergó una mutación en CCBE1.

La función de Ccbe1 se estudió en el modelo de pez cebra *lleno de fluido (fof)*. Este modelo es homocigoto para una mutación de *ccbe1* y carece del conducto torácico, así como de los vasos linfáticos intersegmentarios y dorsal longitudinales. Los mutantes desarrollan linfedema, pero retienen en gran medida un sistema cardiovascular normal. Este modelo es adecuado para probar la patogenicidad de las mutaciones de aminoácidos identificadas en los pacientes HS humanos.

Todas las cepas de pez cebra se mantuvieron en el Instituto Hubrecht usando las condiciones de cría estándar. Los experimentos con animales se aprobaron por el Comité de Experimentación Animal de la Real Academia Holandesa de Artes y Ciencias (DEC). La línea transgénica usada fue la línea transgénica doble *TG(fli1a:gfp)<sup>y1</sup>·TG(kdr-l:ras-cherry)<sup>s916</sup>* (Hogan y otros (2009). Nat. Genet. 41, 396-398). Mutaciones homólogas se introdujeron en el pez cebra *ccbe1-Myc pCS2+* (p.Cys166Arg y p.Gly313Arg) o *ccbe1-pCS2+(p.Arg150Cys)*. Cada uno de los ARNm probados se sintetizó simultáneamente con los ARNm control de tipo silvestre (la síntesis como se describió anteriormente en (Hogan y otros (2009). Nat. Genet. 41, 396-398) e inyectó (350pg/embrión) por separado en los embriones ya inyectados con un morfolino ATG dirigido *accbe1* en la primera etapa celular a una concentración de 5ng/embrión. La inyección del ARNm de *ccbe1* de tipo silvestre rescató fielmente el fenotipo *fof*, como se evidenció con la presencia de fragmentos del conducto torácico justo ventral a la aorta dorsal, o en un rescate completo de la formación del conducto torácico.

Dos de los tres ARNm mutantes probados (p.Cys166Arg y p.Gly313Arg, que son equivalentes a p.Cys174Arg y p.Gly327Arg humanos, respectivamente) no fueron capaces de conferir ningún rescate (Figura 10B-D y Figura 11). Sorprendentemente, el mutante p.Arg150Cys (equivalente al p.Arg158Cys humano) rescató el fenotipo *fof*. Esto indica que al menos alguna función de la proteína se conserva, pero sin excluir la patogenicidad. La mutación p.Arg150Cys puede resultar en la reducción drástica la actividad de la proteína, pero cuando se administran en exceso alta dosis de ARNm por inyección en el pez cebra todavía puede suministrarse suficiente la función de rescate del fenotipo *fof*.

Las mutaciones en CCBE1, mutaciones de aminoácidos en su mayoría, actúan como mutaciones recesivas y los portadores heterocigotos se manifiestan sin ningún signo o síntoma perceptible. Aparentemente las mutaciones resultan en proteínas que son no funcionales o hipomórficas y no tienen un efecto negativo dominante. En el pez cebra, la mutación *ccbe1* es predominantemente letal; sólo un pequeño número de pez cebra mutado sobrevive (Hogan y otros (2009). Nat. Genet. 41, 396-398). En los seres humanos no existe una tasa aumentada de aborto o riesgo en el parto y muerte neonatal en las familias con HS, y casi todos los pacientes afectados sobreviven hasta la edad adulta (Van Balkom y otros (2002). Am. J. Med. Genet. 112, 412-421). Uno puede argumentar que esta diferencia en la tasa de supervivencia puede deberse a la diferencia entre las mutaciones: las mutaciones en los seres humanos pueden dejar un poco de funcionalidad mientras que la mutación en el pez cebra suprime completamente la función de la proteína. Claramente, si p.Arg158Cys es patológica debido a la actividad reducida, esto puede favorecer esta teoría. Sin embargo, p.Cys174Arg mostró una incapacidad total para rescatar el fenotipo *fof*. Adicionalmente, la mutación *fof* en sí, p.Asp162Glu, se ubica además dentro del dominio de unión de EGF y no difiere claramente de algunos de las mutaciones humanas notificadas en el documento. Por lo tanto, las explicaciones alternativas de la diferencia en la letalidad pueden ser diferencias en la anatomía de los vasos linfáticos entre el pez cebra y los seres humanos, diferencias o redundancia en la función de CCBE1 u otros genes implicados en la linfangiogénesis de seres humanos.

#### Materiales y Métodos

Cepas del pez cebra que incluyen líneas transgénicas anteriormente descritas<sup>21, 26</sup> se mantuvieron usando condiciones de cría estándar. La mutagénesis se realizó como se describió anteriormente<sup>27</sup>, la progenie F2 se entrecruzó y F3 se tamizó para la presencia del conducto torácico. El mapeo genético se realizó como se describió anteriormente<sup>28</sup>, las secuencias iniciadoras y aproximaciones de genotipificación se pueden encontrar en los métodos completos en la red. *ccbe1* se dirigió con morfolinolinos de codón de iniciación y sitio de empalme (Genetools, LLC) a 2.5 o 5ng/embrión, el morfolino *plcg* morfolino (Open biosystems) se inyectó a 5 ng/embrión. Los detalles de secuencias y constructo de morfolino pueden encontrarse en los métodos complementarios. Ensayos de imagimática y trasplante se realizaron como se describió anteriormente<sup>28</sup> y se describen en los métodos complementarios. Un cassette de citrina-neomicina se recombinó dentro de clones BAC (cromosoma artificial bacteriano) usando Tecnología de recombinación Red/ET (Gene Bridges) y un sitio integrado de meganucleasa IScel como se describió anteriormente<sup>29</sup>. La hibridación *in situ* se realizó como se describió anteriormente<sup>28</sup> con sondas sintetizadas como se describe en los métodos complementarios.

Cepas del pez cebra y tamiz

Todas las cepas de pez cebra se mantuvieron en el Instituto Hubrecht usando las condiciones de cría estándar. El pez cebra es originario y distribuido geográficamente en el sudeste de Asia. Las cepas fueron las cepas de laboratorio cultivadas. Los experimentos con animales se aprobaron por el Comité de Experimentación Animal de la Real Academia Holandesa de Artes y Ciencias (DEC). Las líneas transgénicas públicas usadas fueron *TG(fli1a:gfp)<sup>y1</sup>* (Lawson, N. D. & Weinstein, B. M. In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev Biol* 248, 307-18 (2002)) y *TG(kdr-l:ras-cherry)<sup>s896</sup>* (Chi, N. C. y otros Foxn4 directly regulates tbx2b expression and atrioventricular canal formation. *Genes Dev* 22, 734-9 (2008)), (*kdr-l:RFP*) (además conocidas como *flk1:ras-cherry<sup>s896</sup>*) (Bussmann, J., Bakkers, J. & Schulte-Merker, S. Early endocardial morphogenesis requires Scl/Tal1. *PLoS Genet* 3, e140 (2007)). El alelo *cloche<sup>hu2345</sup>* se describió previamente (Herpers, R., van de Kamp, E., Duckers, H. J. & Schulte-Merker, S. Redundant roles for sox7 and sox18 arteriovenous specification in zebrafish. *Circ Res* 102, 12-5 (2008)).

La mutagénesis ENU se realizó como se describió anteriormente para la creación de la genoteca del Instituto Hubrecht de objetivo seleccionado por mutagénesis (Wienholds, E., Schulte-Merker, S., Walderich, B. & Plasterk, R. H. Target-selected inactivation of the zebrafish rag1 gene. *Science* 297, 99-102 (2002)). La progenie F1 de machos mutagénicos se cruzó con la cepa *fli1:GFP* para crear aproximadamente 300 familias de F2, que se entrecruzaron después. La progenie F3 se tamizó para la presencia del conducto torácico. Mapeo genético y genotipificación.

La construcción bioinformática de la región genómica se realizó con la base de datos Ensembl (disponible en la web mundial ensembl.org), liberada 44, en abril de 2007. Mapeo meiótico de la mutación *llena de fluidose* realizó usando los polimorfismos de longitud estándar de secuencia sencilla. Los iniciadores usados para los marcadores SSLP y SNP representados en la Fig. 2 fueron como sigue: z62970; 5'-ACACTGTAAACCAGACGGCC-3' y 5'-TCAGTCAAGCGCACGTAATC-3', SNP1; 5'-GCCTCCACACCTGGATAAC-3' y 5'-CCTGGGATATTAGCTTGCAG-3', CA1; 5'-ACTGACCCAAACTTTTGAC-3' y 5'-CATGTCTACAGCCTGAATGC-3', CA2; 5'-ATTTGCGTCAATGCTAACAC-3' y 5'-CAGTCTGCTCAGTTGGAG-3'.

El ARN total (1µg) de embriones de tipo silvestre y mutantes se transcribió inverso usando 12.5 µM de hexámeros aleatorios, 8 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de cada desoxinucleósido trifosfato, 1 U/µl del inhibidor de Ribonucleasa, y 10 U/µl MMuLV de la transcriptasa inversa (Promega). La PCR seguido por la secuenciación de ADNc silvestre y mutante se realizó con los iniciadores: 5'-GCGCTGAACTTCAAGACTG-3' y 5'-ATCATCTCCAGGTAGAAGC-3', 5'-AGAAACCATATTGCCTGGAC-3' y 5'-TTTGATATGCGACAGGTCAG-3', 5'-GGCTCTCTGGACAGATG-3' y 5'-ATTCAGCCTTCTTTCCTCAG-3'. La genotificación posterior de los mutantes *ccbe1* se realizó en los embriones individuales utilizando un marcador intrónico informativo CA repetitivo de *ccbe1* con los iniciadores: 5'-CAACTTTCTGTCCCTCACAC-3' y 5'-GCGTGTCTCATTTACTTTG-3'.

Síntesis de oligos y ARNm de morfolino

El codón de iniciación *ccbe1* dirigido a MO (ATG MO 5'-CGGGTAGATCATTTTCAGACACTCTG-3') (Genetools, LLC) se inyectó a una concentración de 2.5 o 5 ng/embrión. El sitio de empalme de *ccbe1* dirigido a MO (5'-ACAGCACAGCACTTTACCTGTCTAC-3') (Genetools, LLC) se inyectó a una concentración de 5ng/embrión. El *plcg* MO (5'-ATTAGCATAGGGAACCTTACTTTTCG-3') (Open biosystems) se inyectó a una concentración de 5ng/embrión. La secuencia codificante de longitud completa de *ccbe1* se amplificó por PCR a partir del clon EST molde EE696184 usando el siguiente par iniciador: 5'-gcgcgaaattcaccATGATCTACCCGGGCAGAG-3' y 5'-gcgctcgagTCAAACCGGCCAATCGGGAT-3' y clonó dentro de pCS2+ (Turner, D. L. & Weintraub, H. Expression of achaete-scute homolog 3 in *Xenopus* embryos converts ectodermal cells to a neural fate. *Genes Dev* 8, 1434-47 (1994)) usando los sitios de restricción *EcoRI* y *XhoI*.

Generación de líneas transgénicas

Un cassette de citrina-neomicina se recombinó usando Tecnología de recombinación Red/ET (Gene Bridges) dentro de clones BAC (cromosoma artificial bacteriano) DKEY-182E1 (*estabilina1*) o DKEY-256I8 (*flt1*) usando los iniciadores de PCR etiquetados con el brazo de homología: iniciador directo de la *estabilina1*;

5'-tgttgtgttacatgtttatctgactaattctctgcttgaggagtaACCATGGTGAGCAAGGGC GAGGAG-3',  
iniciador inverso de la *estabilina1*;

5'-gaatctgtgcagtcacagctactgtaagtccaaaacgagaagataagaTCAGAAGAAGGCG-3',

iniciador directo de *flt1*; 5'-tccataggtattctctatctccaacaacaccctcaagcaagaccaagACCATGGTGAGCAAGG GCGAGGAG-3',  
iniciador inverso de *flt1*;

5'-gtcagaacacgtctgacagtcctcaaatatcatcacaataatatcgaaTCAGAAGAAGGCG-3'.

Adicionalmente, un sitio de la meganucleasa IScel se integró en la cadena principal del clon para la facilidad de la transgénesis como se describió anteriormente (Kimura, Y., Okamura, Y. & Higashijima, S. alx, a zebrafish homolog of

Chx10, marks ipsilateral descending excitatory interneurons that participate in the regulation of spiral locomotor circuits. *J Neurosci* 26, 5684-97 (2006)).

#### Hibridación *in situ*

5 La hibridación *in situ* se realizó como se describió anteriormente (Busmann, J., Bakkers, J. & Schulte-Merker, S. Early endocardial morphogenesis requires *Scf/Tal1*. *PLoS Genet* 3, e140 (2007)). La sonda *tie2* se describió previamente (Lyons, M. S., Bell, B., Stainier, D. & Peters, K. G. Isolation of the zebrafish homologues for the *tie-1* and *tie-2* endothelium-specific receptor tyrosine kinases. *Dev Dyn* 212, 133-40 (1998)). La sonda de *cbe1* se sintetizó mediante la transcripción *in vitro* a partir del ADNc de longitud completa digerido con *EcoRI* en pCS2+ usando la ARN polimerasa T7 (Promega). Las ribosomas *vegfc* y *vegfd* se fabricaron clonando primero sus secuencias codificantes en el vector pCS2+ usando PCR a partir del molde del clon BC114253 (*vegfc*) (Open Biosystems) o ADNc con los iniciadores: *vegfc*; 5'-gcgcggaattcaccATGCACTTATTTGGATTTTC-3' y 5'-gcgcgctcgagTTAGTCCAGTCTCCCCAGT-3', *vegfd*; 5'-gcgcggaattcaccATGAAGAAACAGAAATGTGC-3', 5'-gcgcgctcgagTCACGTATAGTGTAGTCTGT-3', seguido por la clonación en los sitios de restricción *EcoRI* y *XhoI* y la transcripción *in vitro* a partir del molde digerido con *EcoRI* usando el ARN polimerasa T7 (Promega). El clon sonda de *lyve-1* (correspondiente a ENSDARG0000062483) fue una donación de Exelixis y el ARN se sintetizó mediante la digestión con *EcoRV* y la transcripción con la polimerasa SP6. La sonda de *estabilina-1* se sintetizó primero por PCR amplificando un fragmento exónico con los iniciadores de PCR: 5'-CACTGATGTAGTGCTGGTTG-3' y 5'-GGATCCATTAACCCTCACTAAAGGGAACACAGAAGGGCTGTCAAAC-3' y después sintetizando el ARN usando la RNA polimerasa T3 (Promega).

#### Imagimática

25 Los embriones se montaron en agarosa 0.5-1% de bajo punto de fusión en una placa de cultivo con un cubreobjetos que sustituye el fondo. La imagimática se realizó con un microscopio confocal Leica SP2 o SP5 (Leica Microsystems, disponible en la web mundial en [leica-microsystems.com/](http://leica-microsystems.com/)) usando un objetivo de 20x o 40x con aumento digital. El análisis a intervalos de tiempo prefijados se compiló usando el software ImageJ (disponible en la web mundial en [rsb.info.nih.gov/ij/](http://rsb.info.nih.gov/ij/)). Los intervalos de tiempo se registraron cada 20 minutos durante el periodo de tiempo establecido. Una etapa de calentamiento mantiene los embriones en aproximadamente 28.5 °C.

#### Transplante

35 El transplante se realizó prácticamente como se describió anteriormente (Ho, R. K. & Kane, D. A. Cell-autonomous action of zebrafish *spt-1* mutation in specific mesodermal precursors. *Nature* 348, 728-30 (1990)). En resumen, los embriones donadores de tipo silvestre del genotipo *TG(fli1:GFP)* se inyectaron con tetrametil rodamina (TAMRA) (Molecular Probes) de 70KDa con o sin ATG MO *ccbe1* (5ng/embriones) en la primera etapa celular y se utilizaron como donadores en las etapas pre-domo. Más de 10 células se transfirieron de los embriones donadores a los receptores entre las etapas de esfera y 30% de epibolia. Los embriones se anotaron primero para la presencia o ausencia de fragmentos linfáticos en la región del conducto torácico y se analizaron después para la posición relativa de la célula injertada. Sólo se examinaron embriones morfológicamente normales.

#### Literatura citada en los Ejemplos

- 45 1. Yaniv, K. y otros Live imaging of lymphatic development in the zebrafish. *Nat Med* 12, 711-6 (2006).
2. Kuchler, A. M. y otros Development of the zebrafish lymphatic system requires VEGFC signaling. *Curr Biol* 16, 1244-8 (2006).
3. Base de datos de mutaciones-FBN1. (disponible en la red mundial en [umd.be:2030/W\\_FBN1](http://umd.be:2030/W_FBN1)).
4. Isogai, S., Lawson, N. D., Torrealday, S., Horiguchi, M. & Weinstein, B. M. Angiogenic network formation in the developing vertebrate trunk. *Development* 130, 5281-90 (2003).
- 50 5. Prevo, R., Banerji, S., Ni, J. & Jackson, D. G. Rapid plasma membrane-endosomal trafficking of the lymph node sinus and high endothelial venule scavenger receptor/homing receptor stabilin-1 (FEEL-1/CLEVER-1). *J Biol Chem* 279, 52580-92 (2004).
6. Salmi, M., Koskinen, K., Henttinen, T., Elima, K. & Jalkanen, S. CLEVER-1 mediates lymphocyte transmigration through vascular and lymphatic endothelium. *Blood* 104, 3849-57 (2004).
- 55 7. Banerji, S. y otros LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol* 144, 789-801 (1999).
8. Makinen, T. y otros Inhibition of lymphangiogenesis with resulting lymphedema in transgenic mice expressing soluble VEGF receptor-3. *Nat Med* 7, 199-205 (2001).
- 60 9. Karkkainen, M. J. y otros Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol* 5, 74-80 (2004).

10. Covassin, L. D., Villefranc, J. A., Kacergis, M. C., Weinstein, B. M. & Lawson, N. D. Distinct genetic interactions between multiple Vegf receptors are required for development of different blood vessel types in zebrafish. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 6554-9 (2006).
- 5 11. Bussmann, J., Lawson, N., Zon, L. & Schulte-Merker, S. Zebrafish VEGF receptors: a guideline to nomenclature. *PLoS Genet* 4, e1000064 (2008).
12. Lawson, N. D., Mugford, J. W., Diamond, B. A. & Weinstein, B. M. phospholipase C gamma-1 is required downstream of vascular endothelial growth factor during arterial development. *Genes Dev* 17, 1346-51 (2003).
13. Wigle, J. T. y otros An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype. *Embo J* 21, 1505-13 (2002).
- 10 14. Wigle, J. T. & Oliver, G. Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. *Cell* 98, 769-78 (1999).

Reivindicaciones

- 5
1. Un método para probar si un compuesto es capaz de inhibir el desarrollo de los canales linfáticos o linfangiogénesis y/o la migración de los linfangioblastos en un animal no-humano, un embrión no-humano o un cultivo de células, que comprende las etapas de:
- 10
- a. administrar un compuesto capaz de interactuar con un gen Ccbe1, un transcripto de este, o una proteína de ccbe1 a un animal no-humano, un embrión no-humano o un cultivo de células;
- b. determinar si dicho compuesto inhibe el desarrollo de los canales linfáticos, linfangiogénesis y/o migración de los linfangioblastos en dicho animal no-humano, un embrión no-humano o un cultivo de células.
- 15
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho compuesto se selecciona del grupo que consiste de un anticuerpo dirigido contra la proteína Ccbe1 o fragmento funcional de este, y un agente antisentido contra Ccbe1.
- 20
3. un método para probar si un compuesto es capaz de inhibir el desarrollo de los canales linfáticos o linfangiogénesis y/o la migración de los linfangioblastos en un animal no-humano, un embrión no-humano, o un cultivo de células, que comprende las etapas de:
- a. administrar un compuesto a un animal no-humano, un embrión no-humano, o un cultivo de células, en donde dicho animal no-humano, dicho embrión no-humano, o cultivo celular no expresa la proteína Ccbe1 en un nivel funcional;
- b. inducir la expresión de la proteína Ccbe1 en las células de dicho animal no-humano o dicho embrión no-humano; y
- c. determinar si dicho compuesto inhibe el desarrollo de los canales linfáticos, linfangiogénesis y/o migración de los linfangioblastos en dicho animal no-humano, dicho embrión no-humano o dicho cultivo celular.
- 25
4. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicho animal o dicho embrión es transparente.
- 30
5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicho animal o dicho embrión se modifica genéticamente, en donde la modificación comprende la expresión transgénica de la estabilina1, tie2, lyve1 y/o fli1 fusionada con un GFP o un derivado de este.
- 35
6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-5, en donde dicho animal o dicho embrión se modifica genéticamente tal que se suprime el gen Ccbe1.
- 40
7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde dicho animal o dicho embrión es un pez.
8. Un agente antisentido de Ccbe1 que comprende la secuencia base de:
- 5'-CGGGTAGATCATTTCAGACACTCTG-3',  
5'-ACAGCACAGCACTTTACCTGTCTAC-3' o  
5'-ATTAGCATAGGGAAGCTTCTTCG-3' para su uso en un método para tratar el cáncer.
- 45
9. Un agente antisentido que tiene entre 15-40 nucleobases de longitud que comprende al menos 8 nucleobases complementarias consecutivas y es capaz de hibridar con una secuencia de nucleótidos que codifica ccbe1, preferentemente de la secuencia base que se representa en la sec. con núm. de ident.:35 para su uso en un método para tratar el cáncer.
- 50
10. Un método para determinar si un individuo es un portador de, o padece de, o en riesgo de padecer de, un trastorno de vaso linfático congénito, que comprende proporcionar una muestra de dicho individuo; determinar la presencia de una alteración en la secuencia del gen Ccbe1, y determinar que el individuo es un portador, o padece de, o en riesgo de padecer del trastorno de vaso linfático congénito si dicha alteración está presente.
- 55
11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicho trastorno de vaso linfático se selecciona del síndrome Meige, Nonne-Milroy y Hennekam.
12. El método de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en donde la alteración del gen Ccbe1 resulta en cambios de aminoácidos C75S, C102S, C174R, L229fsX8 y/o G327R.

5 **13.** Una composición que comprende la proteína Ccbe1 o un fragmento funcional de esta capaz de inducir la formación del vaso linfático, o que comprende un ácido nucleico que codifica Ccbe1 o un fragmento funcional de este capaz de inducir la formación del vaso linfático, para uso como un medicamento para el tratamiento de un trastorno de vaso linfático.

**14.** La composición para usar de acuerdo con la reivindicación 13, en donde dicho trastorno de vaso linfático es un trastorno de vaso linfático congénito o un trastorno de vaso linfático adquirido seleccionado a partir de linfedema, cáncer, y un trastorno que resulta de la eliminación o irradiación de los vasos linfáticos.

10

15

20

25

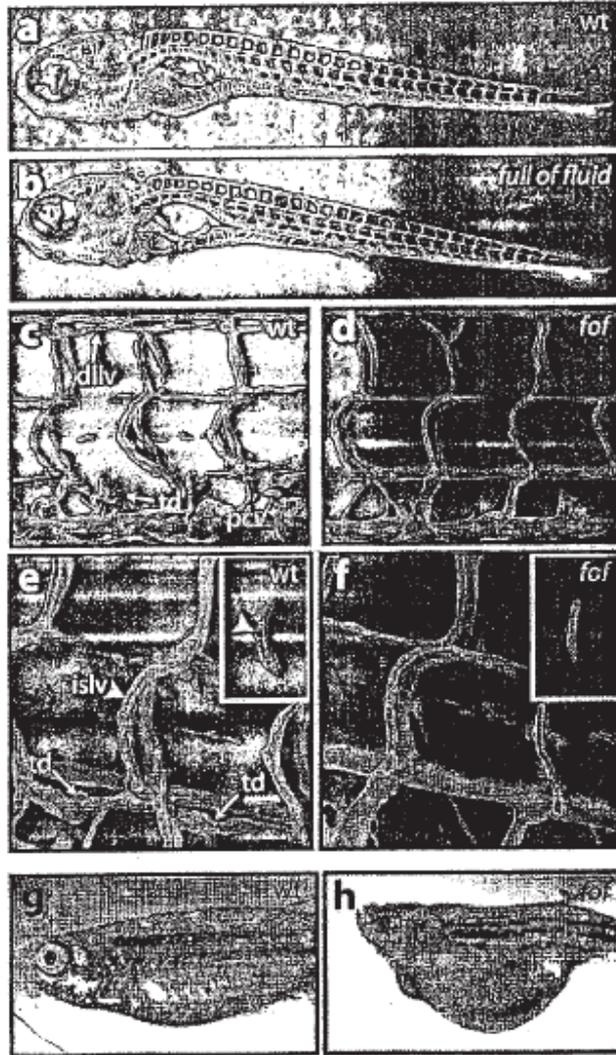


Fig. 1a/h

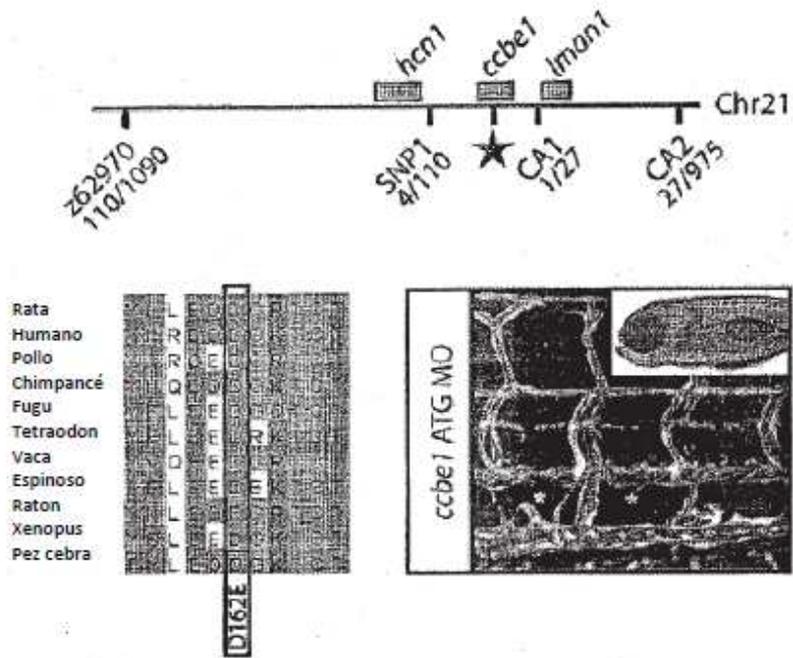


Fig. 1i

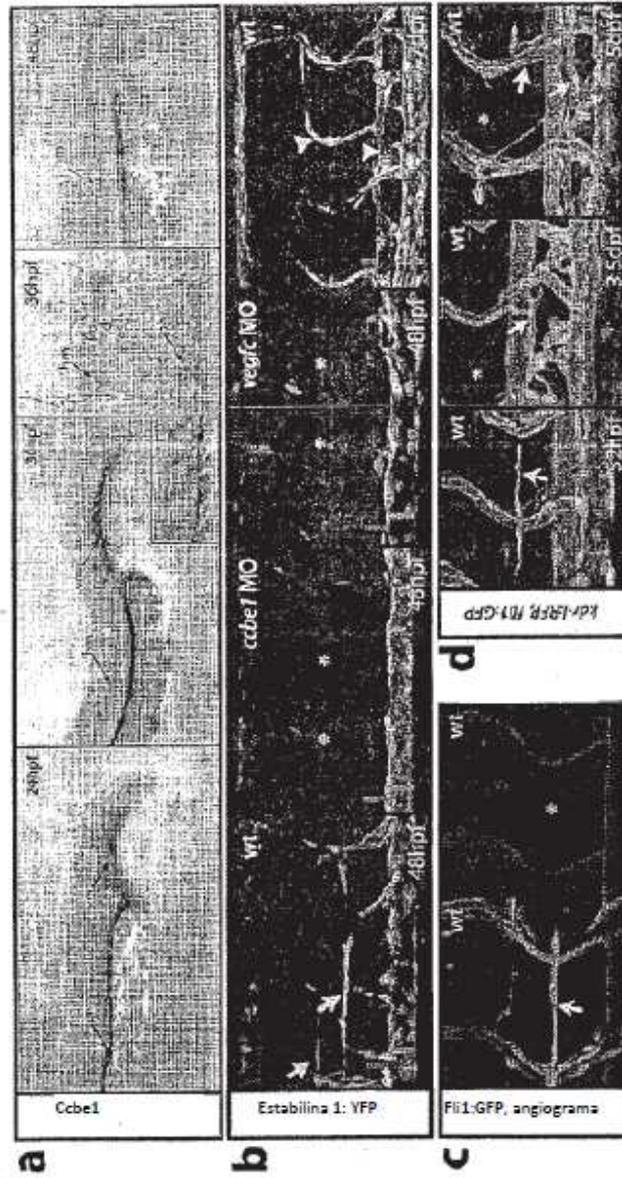


Fig. 2a/d

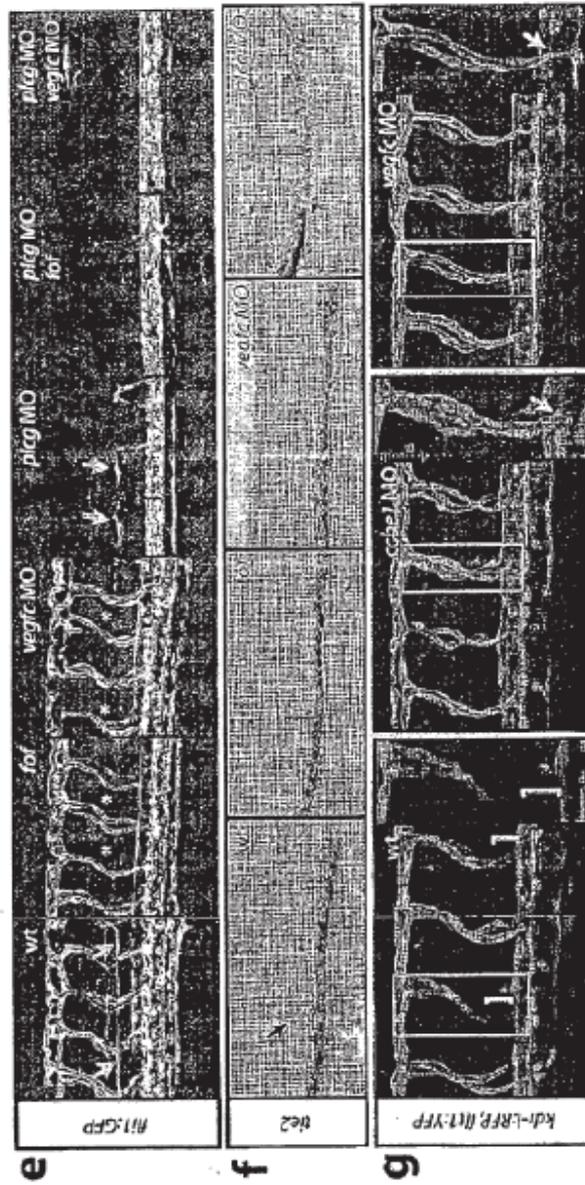


Fig. 2e-f-g

**Secuencia de nucleótidos (1221 nt):**

```
ATGGTGCCTCCGCTCCGAGCCGGGGAGGAGCTGDCAGGGGOCAGCTGGGCLAGSAGCCTGGGTCCGCTGC
TGCTGCTCCTGGCGTGGGACACACGTCGACCTACAGAGAGGGAGCCGGAGACGGCGACAGAGAAATCTG
CTCAGAGGCAAAATCGCGACGACTAAATACCCCTGTCTGAJCTCTTCAGCCGAGCTCACCCATCCTAC
AGGAAAAGTGCTGCAAAGGATAAATTTGTTCTTTGGACAATGCATCCCAGAGATTACGACGTTTGTG
CCGAGGCTCCCTGTGAACAGCAGTGCACGGACAACCTTTGGCCGAGTGCITGTACTTGTATCCGGGATA
CCGATATGACCGGGGAGACACCCGGACCCGGGAGAGCCATACTGTCTGGATATTGATGAGTGTGCCAGC
AGCAATGGGAGCGTGTGTGCCACATCTGCATCAATACCTTGGGACGCTACCGCTGCGAGTGCCTGGGAG
GCTACATCCGGGAAGATGATGGGAGACATGTACCAGGGGAGACAAATATCCCAATGACACTGGCCATGA
GAAGTCTGACAACATGGTGAAGCCCGACTTGTGTGCCACATGCAAGGAGTCTACCAGATGAAGCG
ACCGTGTGCRGCTGAAGCAAAAGATTGCTCTGCTCCCAACAAITGCAGCTGACCTGGGCAAGTATATCA
CTGGTGACAAGGTGCTGGCTCAAAACACCTACCTTCCAGGACCTCCTGGCCGCTGGGGGCAAGGGCC
TCCGGCTCAAGGACCAAAAGCGAAGCCAGGCTTCCCGCTATGCCAGGCTCCTGGGCAAGCCGCC
CCACGGGCTCAATGGGAACCATGGGACCATCTCTGATCTGTCCACATTAGCAAGGCCGGAGGGCC
CTGTGGTCCACAGGGGACCCAGGAGAGATGGTTCTAAGGGGGAGAGAGGAGCGCTGGGCCAGAGG
GTCTCCAGGACCCCTGGTCTTTGGACTTCTGCTACTTATGCTGGCTGACATCCGCAAAGACATCACT
GAGCTGCAGGAAAAGTGTTCGGCCACCGGACTCACTCTTCACCAGAGGAGTCCCTTTACCTCAGGAAT
TTCCAGCTACCCAGAAAGCCATGGACCTGGGCTCTGGAGATGACCATCCAAAGAAAGACTGGACCAAGCA
CTTGAGAGCCCCAGAGACTTCTACCCATAG
```

**Traducción (406 aa):**

```
MVPEFFSPGCAARGQLGRSLGFLLLLLALGHTWYRELFEDGDRICSESKIATTKYPCLESSELTTCY
RRRCRKYKFLGQCIPEYDVCREAPCEQQCTDHFGRLCTCVPGYRDREHRRKREKPYCLDIDECAS
SNGTICAHICINLGSYRCECREGYIREDDGKCTTRGDKYPNETGHEKSENMYKAG?CCAICKEFYOMKO
TVLQLRQRIALLPNNAADLGKYYITGDRVLSNTYLPGFPLGPGGPPGSPGPKSPGFFGNFPGPPGPG
PRGSMGPMGPPSDDLSHIKQGERGEVGGPPGAPGRDGSKGERGAPGPRGSPGPPGSPDFLLMLADIRNDIT
ELQEKVFGHRTHSAREFPLEQEFPSYPEANDLCSGDDHPRRTETRDLRAPRDFYP
```

Fig. 3

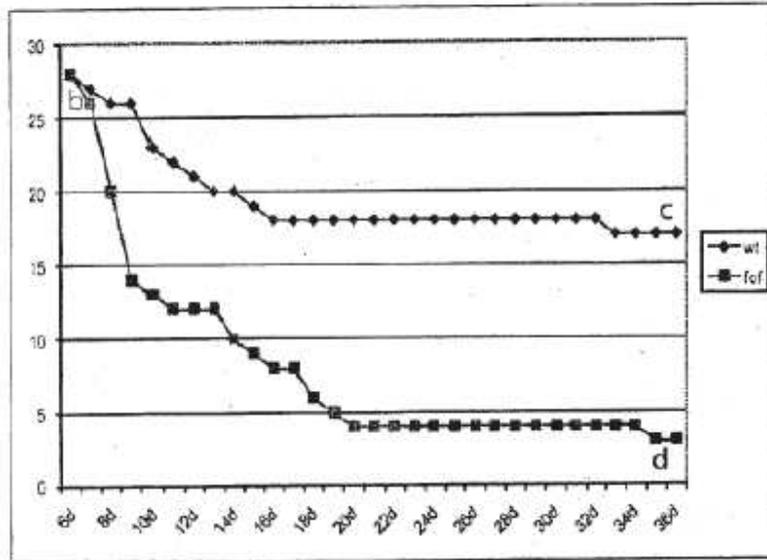


Fig. 4a

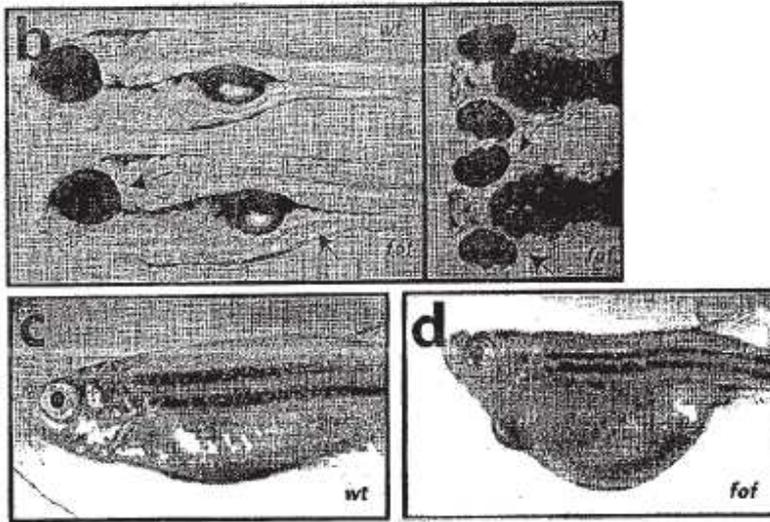


Fig. 4 b-c-d

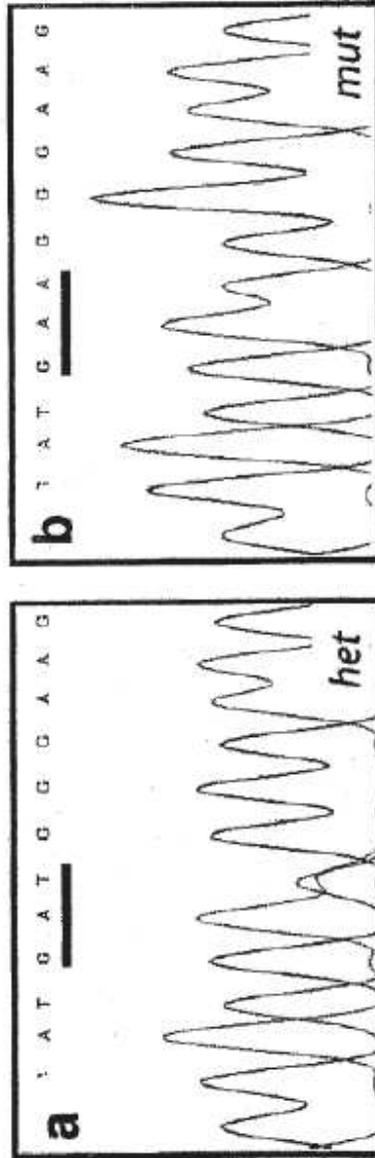


Fig. 5a-b

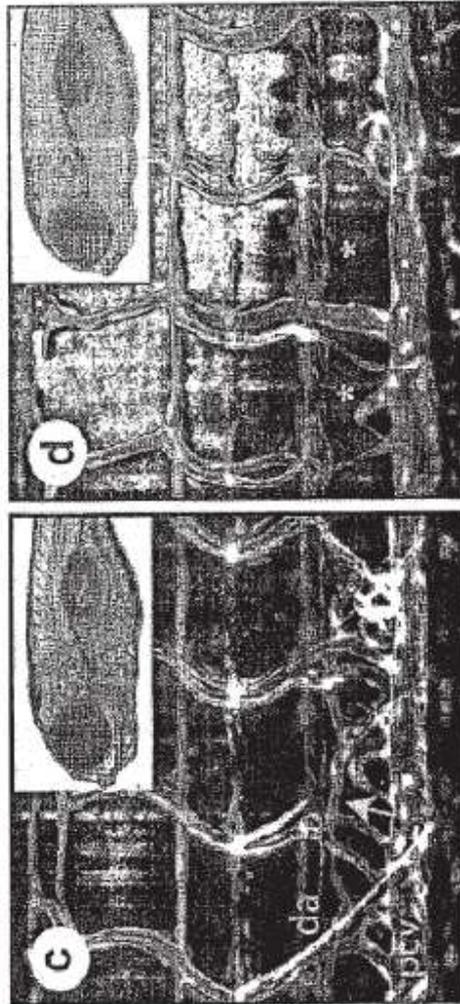


Fig. 5c-d

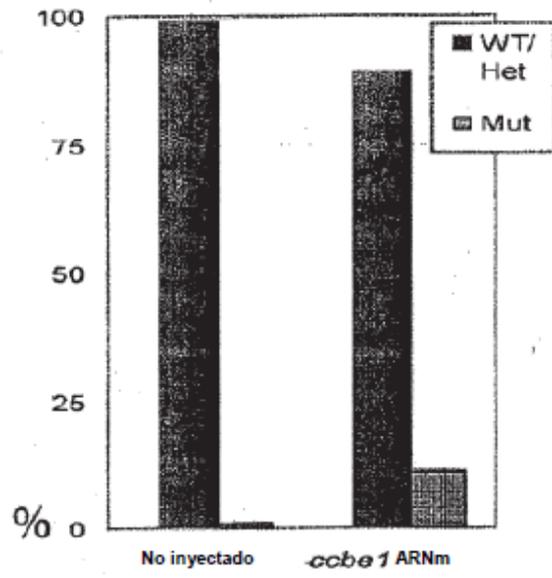


Fig. 5e

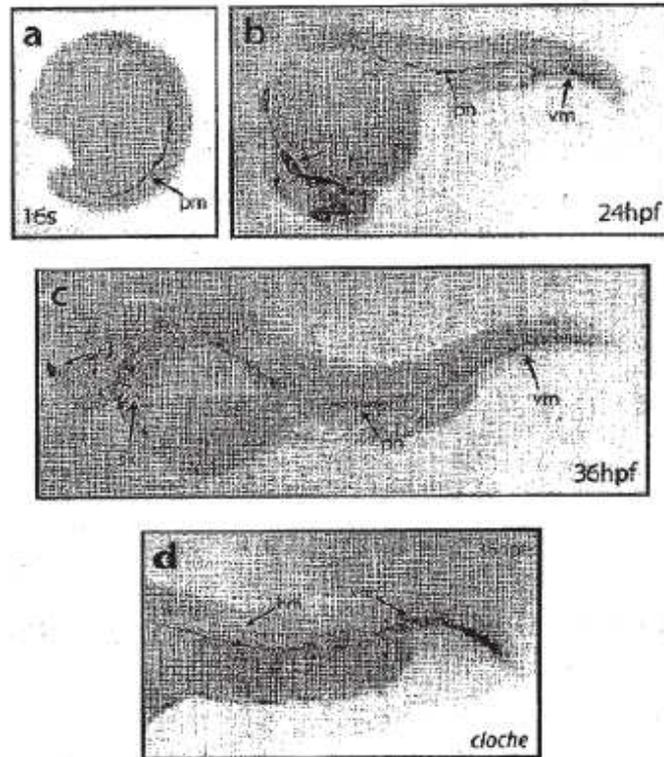


Fig. 6

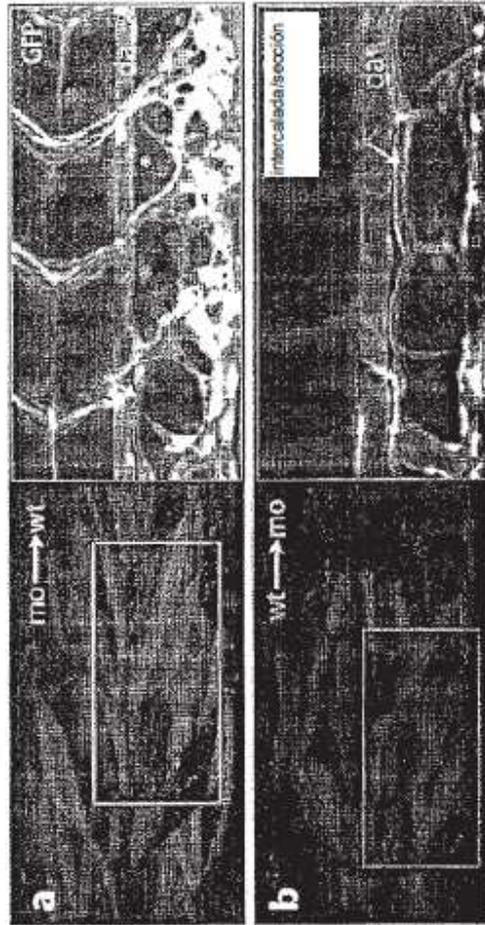


Fig.7 a-b

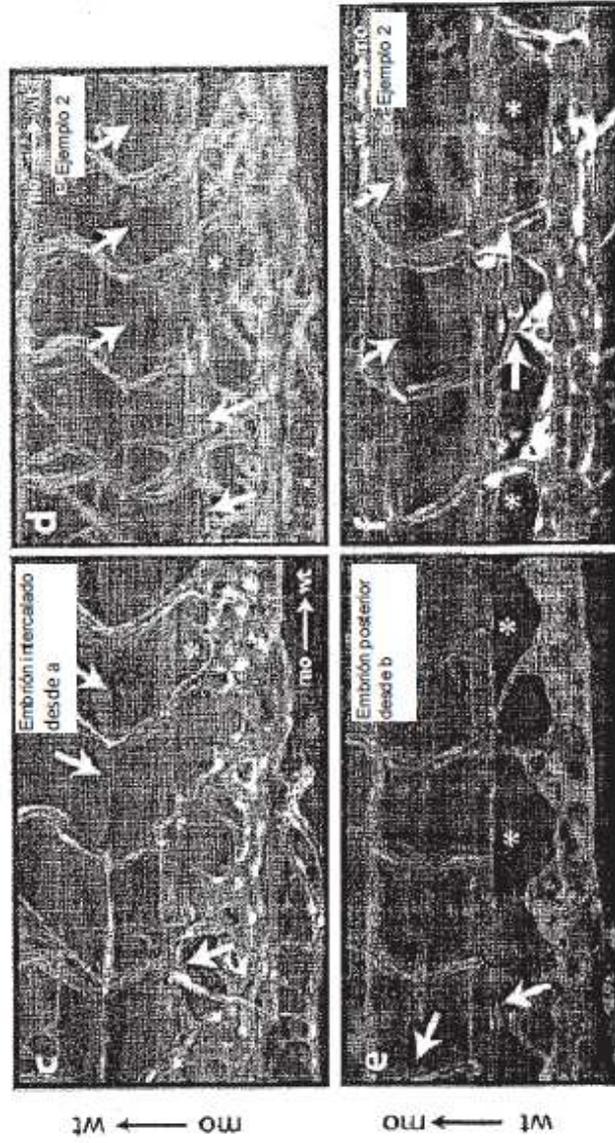


Fig. 7 c/f



Fig.7 g

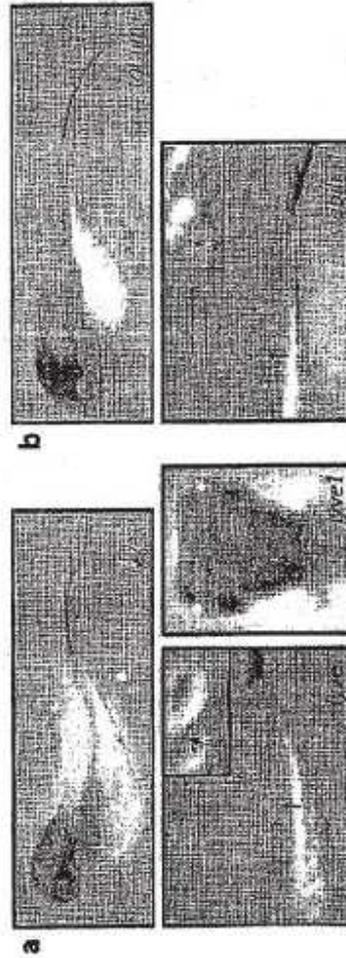


Fig. 8 a-b

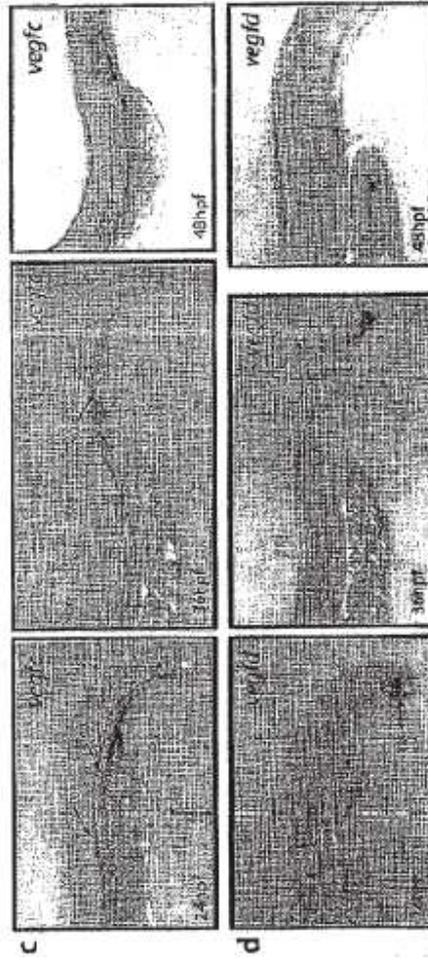


Fig. 8c-d

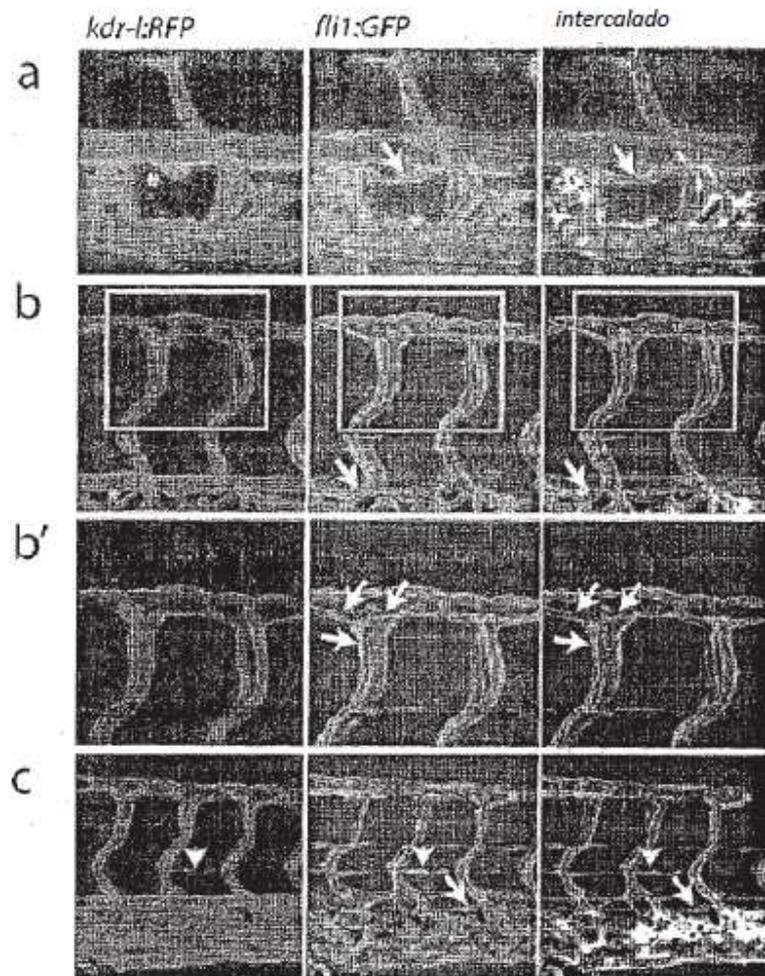


Fig. 9a/c

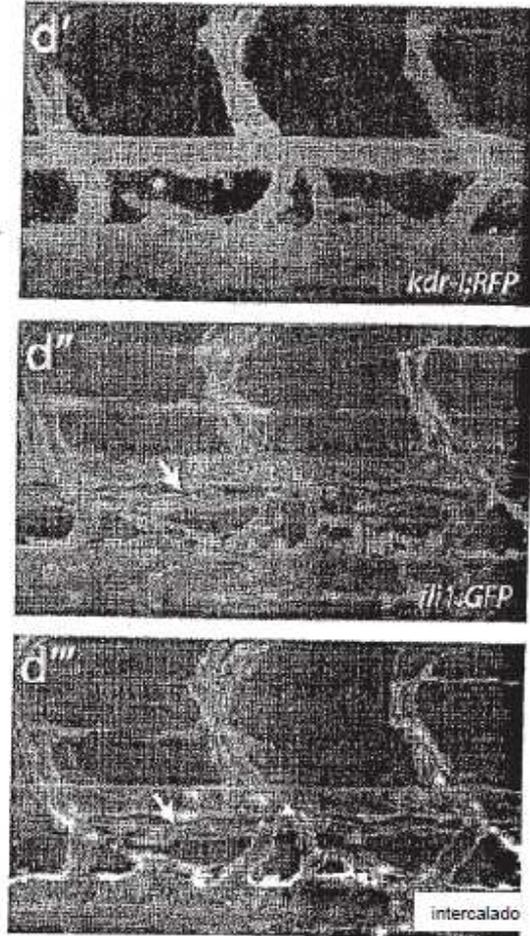


Fig. 9d



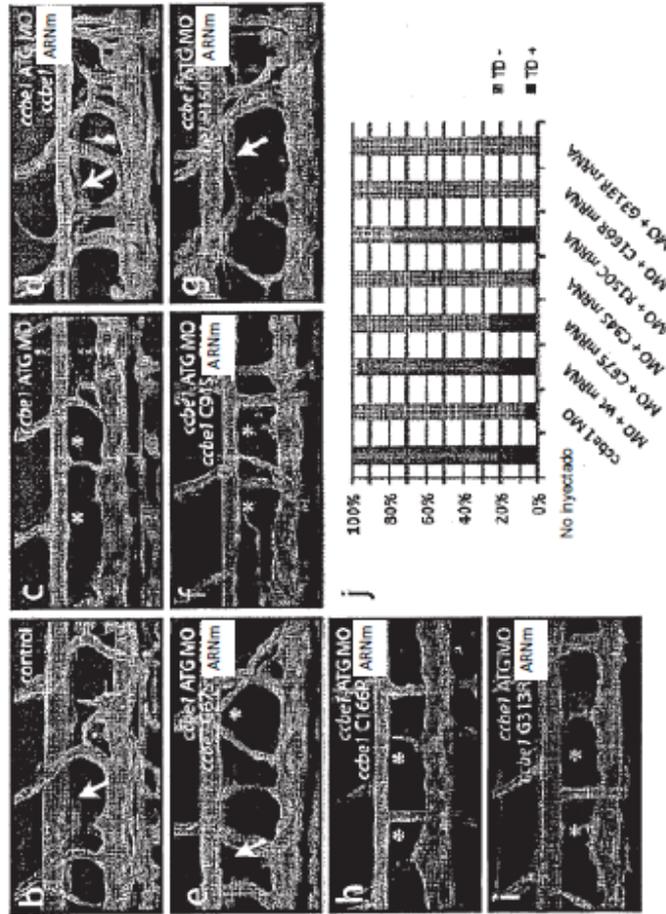


Figura 11 b-j

exón	iniciador	inverso
1	tgtaaaacgagcggccagtagcagcagcagcccttccct	caggaaacagctatgacccgacccgacccctcttggagctgg
2	tgtaaaacgagcggccagtagcagcagcagcccttccct	caggaaacagctatgacccgacccgacccctcttggagctgg
3	tgtaaaacgagcggccagtagcagcagcagcccttccct	caggaaacagctatgacccgacccgacccctcttggagctgg
4	tgtaaaacgagcggccagtagcagcagcagcccttccct	caggaaacagctatgacccgacccgacccctcttggagctgg
5	tgtaaaacgagcggccagtagcagcagcagcccttccct	caggaaacagctatgacccgacccgacccctcttggagctgg
6	tgtaaaacgagcggccagtagcagcagcagcccttccct	caggaaacagctatgacccgacccgacccctcttggagctgg
7	tgtaaaacgagcggccagtagcagcagcagcccttccct	caggaaacagctatgacccgacccgacccctcttggagctgg
8 y 9	tgtaaaacgagcggccagtagcagcagcagcccttccct	caggaaacagctatgacccgacccgacccctcttggagctgg
10	tgtaaaacgagcggccagtagcagcagcagcccttccct	caggaaacagctatgacccgacccgacccctcttggagctgg
11	tgtaaaacgagcggccagtagcagcagcagcccttccct	caggaaacagctatgacccgacccgacccctcttggagctgg

Fig. 12