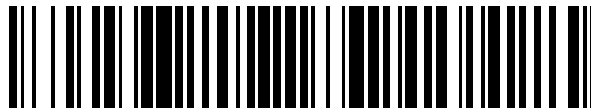


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 623 393**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 1/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C12N 9/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.02.2010 PCT/US2010/000469**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.08.2010 WO10096173**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.02.2010 E 10744058 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2400973**

54 Título: **Identificación de la forma extracelular de PTEN que puede usarse para tratar tumores**

30 Prioridad:

17.02.2009 US 207974 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.07.2017

73 Titular/es:

**THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN
THE CITY OF NEW YORK (100.0%)
West 116th Street and Broadway
New York, NY 10027, US**

72 Inventor/es:

PARSONS, RAMON

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 623 393 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

Identificación de la forma extracelular de PTEN que puede usarse para tratar tumores

5 A lo largo de esta solicitud, se hace referencia a diversas publicaciones entre paréntesis por el primer autor y año. Todas las citas de estas referencias pueden encontrarse al final de la memoria descriptiva inmediatamente antes de las reivindicaciones.

Antecedentes

10 El supresor tumoral PTEN (véase documento WO98/34624) es una fosfatasa citoplasmática que desfosforila el importante segundo mensajero de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (Maehama y Dixon 1998). Esta actividad regula negativamente las muchas señales oncogénicas iniciadas por la activación PIP3 de Akt incluyendo las rutas antiapoptóticas, progresión del ciclo celular y aumento del metabolismo celular (Sulis y Parsons, 2003). La función de PTEN en cáncer es evidente a partir de su frecuente pérdida, de manera bien genética o funcional, en muchos diferentes tipos de tumores (Bonneau y Longy 2000). Originalmente se descubrió como deleciónado en cánceres gliales, desde entonces se ha implicado en la tumorigénesis de la próstata, mama, endometrio, melanocitos, riñones y pulmones. Las mutaciones de línea germinal en PTEN también se relacionaron con síndromes de predisposición de cáncer heredados tales como Síndrome de Cowden (Eng 2003). Los modelos de ratón de pérdida de PTEN han recapitulado su función como un supresor tumoral tanto en el ratón heterocigoto como en los knockouts específicos de tejido en muchos tipos de tejido diferentes (Di Cristofano, Pesce *et al.* 1998; Kwabi-Addo, Giri *et al.* 2001; Petrocelli y Slingerland 2001; You, Castrillon *et al.* 2002; Fraser, Zhu *et al.* 2004).

25 La proteína PTEN contiene un dominio fosfatasa de especificidad dual N terminal, y un dominio de unión a fosfolípido C2 C terminal, seguido de una cola no estructurada de importancia reguladora debido a los sitios de fosforilación encontrados en su interior (Lee, Yang *et al.*, 1999; Vázquez, Ramaswamy *et al.*, 2000, Torres y Pulido 2001; Vázquez, Grossman *et al.*, 2001). La proteína PTEN es mayormente citoplasmática, sin embargo cada vez hay más pruebas de una presencia de PTEN en el núcleo, una localización que está regulada por la monoubiquitinación de la proteína por NEDD4-1 (Baker 2007, Wang, Trotman *et al.* 2007).

30 El escaneo de ribosoma de la UTR 5' precede el inicio de la traducción que se produce en el codón de inicio, AUG. Aunque el medio real mediante el cual el ribosoma decide el codón de inicio adecuado sigue sin entenderse completamente, hay determinadas propiedades tanto del propio ARNm como de la secuencia que dictaminan donde el complejo de preinicio ralentizará su escaneo y comenzará a traducir. La "secuencia Kozak" clásica CCACC**ATG**G, en la que la ATG subrayada es el codón de inicio, se ha mostrado que es el contexto de secuencia más favorable para el inicio (Kozak 1991). La estructura secundaria del ARNm también promueve el inicio probablemente mediante una ralentización real del escaneo del complejo del preinicio que requiere una helicasa para fusionar estructuras secundarias antes de la lectura (Kozak 1990).

40 En determinados transcritos, el inicio de la traducción puede producirse a partir de codones que no sean AUG. Normalmente esto comprende solo un porcentaje minoritario de la proteína total traducida a partir de un transcripto y el resultado es una especie mixta de proteínas que varían en su extremo N. Kozak delinea las eficiencias del inicio de la traducción de codones no AUG y se encuentra que GUG y CUG eran ambos capaces de iniciar la traducción *in vitro* sin embargo de un modo mucho menos eficaz (Kozak 1989). Investigaciones adicionales han mostrado que la disponibilidad de la metionina puede alterar la promiscuidad del inicio de la traducción a través de un mecanismo que no está aclarado, pero que probablemente implica la fosforilación de eIF2, un componente del complejo de preinicio 43S, mediante una quinasa sensible a nutrientes (Hershey 1991; Hann 1994).

50 Se ha mostrado que diversas proteínas se traducen a partir de codones de inicio alternativos. El factor de transcripción, c-myc, tiene un codón de inicio CUG cadena arriba alterno que cuando se traduce, añade 14 aminoácidos al extremo N de la proteína (Hann y Eisenman 1984). Se ha observado que esta isoforma alterna se altera selectivamente en linfoma de Burkitt (Hann, King *et al.*, 1988). En cultivo tisular, la forma más larga de myc se transcribe predominantemente a densidades celulares elevadas cuando la metionina está a una concentración baja (Hann, Sloan-Brown *et al.* 1992). Estudios adicionales han revelado que la forma más larga de c-myc es inhibidora del crecimiento y tiene un conjunto de dianas transcripcionales diferentes en comparación con la proteína c-myc clásica (Hann, Dixit *et al.* 1994). (Florkiewicz y Sommer 1989) (Prats, Kaghad *et al.* 1989).

60 Adicionalmente, se sabe que la localización subcelular real de una proteína puede dictaminarse por codones de inicio alternos. En el caso del proto-oncogén de ratón el inicio alterno int-2 de un codón CUG cadena arriba codifica una localización nuclear mientras que el codón AUG codifica un péptido señal para la localización en la ruta secretora (Acland, Dixon *et al.* 1990). Se describió un fenómeno similar en el FGF3 humano, en el que la proteína traducida de AUG está destinada para la ruta secretora mientras que la proteína traducida a partir de CUG cadena arriba se localizaba en el núcleo (Kiefer, Acland *et al.* 1994). Adicionalmente, en algunas proteínas eucariotas, tales como TEF-1 y PRPS-3, la proteína se inicia completamente a partir de un codón CUG (Taira, Iizasa *et al.* 1990, Xiao, Davidson *et al.*, 1991).

Las proteínas que están destinadas para la secreción se dirigen al retículo endoplasmático mediante un tramo de aminoácidos hidrófobos denominado péptido señal (Blobel, Walter *et al.* 1979). Normalmente hallado en el extremo N de las proteínas, el péptido señal se une a la partícula de reconocimiento de señal (PRS) después de la traducción y hace que el ribosoma se detenga y se transloque al retículo endoplasmático rugoso donde se une al receptor de PRS. Una vez acoplado al ribosoma, el complejo PRS-receptor de PRS se libera y la traducción se reanuda a través del lumen del RE a través del traslocón Sec61. El péptido señal se escinde después en caso de que las proteínas solubles liberen la proteína a partir del traslocón Sec. En el caso de proteínas transmembrana, la hélice transmembrana sirve como un péptido señal para la translocación al RE. Estas proteínas se modifican enormemente por glucosilación en el aparato de golgi y se lanzan a la membrana plasmática en vesículas secretoras (Alberts 2002).

Hay varias proteínas secretoras que se ha demostrado que son importantes en el cáncer. Se ha mostrado que la ruta de señalización Wnt por ejemplo está alterada en cáncer de pulmón. Wnt es un ligando secretado para la familia de receptores Frizzled. La activación de Wnt de frizzled causa desorden para disociar el complejo de degradación de β catenina, que incluye APC, permitiendo que los niveles de β catenina aumenten y se transloquen al núcleo donde pueden interactuar y transactivar el factor de transcripción TCF. Las mutaciones inactivantes en APC y las mutaciones activantes en β catenina se han detallado en cáncer de colon tanto hereditario como esporádico. Adicionalmente, diversos antagonistas de ligandos extracelulares tales como SFRP y Wnt-5a compiten por los mismos receptores Frizzled que Wnt. Se ha demostrado que ambos son supresores tumorales; el ratón SFRP knockout desarrolla tumores linfoides y silenciamiento epigenético de Wnt-5a se ha detectado en melanomas.

Todos los informes publicados de PTEN han indicado que la proteína se localiza en el citoplasma o en el núcleo. Se descubrieron diversas proteínas extracelulares (glicicanos y sindecanos) que se unían a PTEN, así como diversas proteínas implicadas en la ruta secretora (reticulocalbina y calumenina). Se supuso que PTEN entraba en la ruta secretora para permitir dichas interacciones. De hecho, como se desvela en el presente documento, existen nuevas proteínas diferencialmente traducidas, denominadas PTEN-largas, que contienen un péptido señal N terminal y que se secretan extracelularmente.

El documento US 2007/054333 desvela un supresor tumoral denominado TS10Q23.3.

Sumario de la invención

Una fosfatasa humana aislada y un polipéptido largo homólogo de tensina (PTEN-largo) que consiste en los restos de aminoácidos consecutivos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1, para su uso en el tratamiento de un tumor sólido.

Un polipéptido que comprende (i) restos 1 a 173 de SEQ ID NO: 1, o (ii) un análogo del mismo que comprende los restos 1 a 173 de SEQ ID NO: 5, o (iii) restos 22 a 516 de SEQ ID NO: 1.

(No reivindicado:)

Una composición farmacéutica que comprende fosfatasa y el polipéptido largo homólogo de tensina (PTEN-largo) que comprende los restos de aminoácidos consecutivos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma que comprende los restos 22 a 516 de SEQ ID NO: 1, o un análogo de la misma que comprende restos de aminoácidos consecutivos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5.

Un método para el tratamiento de un tumor sólido en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad de una fosfatasa humana y un polipéptido largo homólogo de tensina (PTEN-largo) que comprende los restos de aminoácidos consecutivos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1, o un fragmento (no reivindicado) del mismo que comprende los restos 22 a 516 de SEQ ID NO: 1, o un análogo del mismo que comprende los restos de aminoácidos consecutivos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5, eficaz para tratar el tumor sólido en el sujeto.

Un método para inhibir el crecimiento de un tumor sólido en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad de una fosfatasa humana y polipéptido largo homólogo de tensina (PTEN-largo) que comprende los restos de aminoácidos consecutivos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1, o un fragmento (no reivindicado) del mismo que comprende los restos 22 a 516 de SEQ ID NO: 1, o un análogo del mismo que comprende los restos de aminoácidos consecutivos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5, eficaz para inhibir el crecimiento del tumor sólido en el sujeto.

Un método para inhibir la angiogénesis en un tumor sólido en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad de una fosfatasa humana y un polipéptido largo homólogo de tensina (PTEN-largo) que comprende los restos de aminoácido consecutivos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1, o un fragmento (no reivindicado) del mismo que comprende los restos 22 a 516 de SEQ ID NO: 1, o un análogo del mismo que comprende los restos de aminoácido consecutivos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5, eficaz para inhibir la angiogénesis en el tumor sólido del sujeto.

Un método para inducir la apoptosis de una célula epitelial vascular de un vaso sanguíneo en un tumor sólido en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad de una fosfatasa humana y un polipéptido largo homólogo de tensina (PTEN-largo) que comprende restos de aminoácido consecutivos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1, o un fragmento (no reivindicado) del mismo que comprende los restos 22 a 516 de SEQ ID NO: 1, o un análogo del mismo que comprende los restos de aminoácidos consecutivos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5, eficaz para inducir la apoptosis de la célula epitelial vascular en el vaso sanguíneo en el tumor sólido en el sujeto.

(No reivindicado:)

Un método para el tratamiento de un tumor sólido en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad de un vector de expresión que codifica la fosfatasa humana y el polipéptido largo homólogo de tensina (PTEN largo) humano que comprende la SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma que comprende los restos 22 a 516 de SEQ ID NO: 1, o un análogo de la misma que comprende la SEQ ID NO: 5, para expresar PTEN-largo, fragmento de PTEN-largo, o el análogo del mismo, en células del tumor sólido en una cantidad eficaz para tratar el tumor sólido en el sujeto.

Una fosfatasa humana y un polipéptido largo homólogo de tensina (PTEN-largo) que comprenden SEQ ID NO: 1 o un fragmento de la misma que comprende los restos 22 a 516 de SEQ ID NO: 1, o un análogo (no reivindicado) de la misma que comprende SEQ ID NO: 5 para uso en el tratamiento de un tumor sólido en un sujeto, para inhibir el crecimiento de un tumor sólido en un sujeto, para inducir la apoptosis de una célula epitelial vascular en un tumor sólido en un sujeto, o para inhibir la angiogénesis en un tumor sólido en un sujeto.

Una composición que comprende fosfatasa humana y polipéptido largo de homólogo de tensina (PTEN-largo) que comprende SEQ ID NO: 1, o un fragmento (no reivindicado) de la misma que comprende los restos 22 a 516 de SEQ ID NO: 1, o un análogo del mismo que comprende SEQ ID NO: 5, unido a un agente no peptídico que aumenta la semivida en plasma del PTEN-largo, fragmento de PTEN-largo, o el análogo del mismo, respectivamente.

(No reivindicado:)

Un ácido nucleico aislado que codifica una fosfatasa humana y un polipéptido largo de homólogo de tensina (PTEN-largo) que comprende SEQ ID NO: 1, o que codifica un fragmento de la misma que comprende los restos 22 a 156 de SEQ ID NO: 1, o que codifica un análogo del mismo que comprende SEQ ID NO: 5.

(No reivindicado:)

Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica fosfatasa humana y un polipéptido largo de homólogo de tensina (PTEN-largo) que comprende SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma que comprende los restos 22 a 516 de SEQ ID NO: 1, o un análogo del mismo que comprende SEQ ID NO: 5.

(No reivindicado:)

Una célula transformada que puede expresar la fosfatasa humana y el polipéptido largo homólogo de tensina (PTEN-largo) que comprende la SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma que comprende los restos 22 a 516 de SEQ ID NO: 1, o un análogo de la misma que comprende SEQ ID NO: 5, en el que la célula tiene integrado en su genoma un ADN recombinante que codifica PTEN-largo o un análogo del mismo.

(No reivindicado:)

Una célula hospedadora que puede expresar la fosfatasa humana y el polipéptido largo homólogo de tensina (PTEN-largo) que comprende SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma que comprende los restos 22 a 516 de SEQ ID NO: 1, o un análogo de la misma que comprende SEQ ID NO: 5, en el que la célula hospedadora comprende un plásmido que codifica PTEN-largo o un análogo del mismo.

(No reivindicado:)

Un proceso que comprende mezclar (1) la fosfatasa humana y el polipéptido largo homólogo de tensina (PTEN-largo) que comprende SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma que comprende los restos 22 a 516 de SEQ ID NO: 1, o un análogo de la misma, que comprende SEQ ID NO: 5, y (2) un agente no peptídico que aumenta la semivida plasmática de PTEN-largo o el análogo del mismo, para constituir PTEN-largo que comprende SEQ ID NO: 1, o el fragmento del mismo que comprende los restos 22 a 516 de SEQ ID NO: 1, o el análogo de la misma que comprende SEQ ID NO: 5, unido al agente no peptídico que aumenta la semivida plasmática del PTEN-largo, fragmento de PTEN-largo o análogo del mismo respectivamente.

(No reivindicado:)

Una molécula de ácido nucleico aislada que consta de al menos un fragmento de 20 nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 6, o un complemento de las mismas que se hibridan específicamente en condiciones rigurosas con un complemento de la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 6, o SEQ ID NO: 2 SEQ ID NO: 6.

(No reivindicado:)

Un anticuerpo aislado, o fragmento del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo se une a (1) un polipéptido PTEN-largo que comprende los restos de aminoácidos 1-173 de SEQ ID NO: 1 o (2) un análogo de la misma que comprende SEQ ID NO: 5 o (3) los aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 3 o (4) un fragmento de PTEN-largo que comprende los restos 22 a 516 de SEQ ID NO: 1.

15 (No reivindicado:)

Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo se une a un epítipo conformacional de PTEN-largo, en el que el PTEN-largo comprende la secuencia expuesta en los restos 1-173 de SEQ ID NO: 1, pero en el que el anticuerpo no se une a PTEN.

20 (No reivindicado:)

Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo se une a un epítipo de un PTEN-largo, en el que el PTEN-largo comprende la secuencia expuesta en los restos 1-173 de SEQ ID NO: 1, pero en el que el anticuerpo no se une a PTEN.

(No reivindicado:)

Un fragmento peptídico de SEQ ID NO: 1, o SEQ ID NO: 5, cuyo fragmento tiene actividad antitumoral, antiangiogénica o antiapoptótica.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Diagrama de construcciones de PTEN-larga. Construcciones de expresión que muestran las combinaciones creadas para dirigir la expresión de PTEN bien desde el sitio de inicio endógeno o sitio de inicio alternativo. PTEN canónico se muestra en negrita mientras que la región traducida en la UTR se muestra en gris.

Figura 2. Diagrama del ARNm de PTEN de *Homo sapiens*. El ARNm de PTEN codifica 173 aminoácidos en fase con y cadena arriba del codón de inicio ATG canónico mostrado. La traducción comienza cadena arriba desde el ATG canónico en un CTG en el nucleótido -519. Se muestran ampliados los restos 1-173 de SEQ ID NO: 1.

Figura 3. Alineamiento del extremo N de Ortólogos de PTEN. Secuencias de proteína PTEN de especies indicadas se alinearon usando la matriz de puntuación BLOSUM62 en el Vector NTI (Invitrogen). La secuencia N terminal ampliada para *Homo sapiens* y *Mus musculus* (asterix) se tradujeron del ARNm publicado usando un codón de inicio alternativo CUG en -519 (*H. sapiens*) y -520 (*M. musculus*) desde el codón de inicio AUG canónico usando ORFinder (NCBI). Las secuencias de ARNm de *Homo sapiens* (NM_000314) y de *Mus musculus* (NM_008960). La secuencia de *Apis mellifera* se obtuvo en Baylor College of Medicine Honey Bee Genome Project. La secuencia de proteínas de PTEN de *Caenorhabditis elegans* (Daf-18) se descargó de Wormbase. *Bos taurus* (XM_613125) y *Pan troglodytes* (XP_521544) se descargaron del NCBI.

Figura 4. Pruebas de la existencia de PTEN-largo. A) Investigación de líneas celulares diferentes con dos anticuerpos PTEN diferentes. MCF10A y HEK293 son tipo silvestre para PTEN. BT549 y HCC1937 son nulo PTEN y ZR-75-1 tiene una mutación en PTEN (L136); B) Investigación adicional de diferentes líneas celulares con un anticuerpo monoclonal contra PTEN que reconoce tanto PTEN como PTEN-largo; C) células ES Wt que expresan una gran cantidad de PTEN-largo. PTEN-largo es sensible a la expresión de ARNhC (de horquilla corto) de PTEN estable en estas células y está completamente ausente en las células PTEN knockout. Los niveles de pAkt en su mayor parte siguen inversamente el nivel de PTEN; D) El ARNiC (ARN de interferencia corto) de PTEN causa genosupresión tanto de PTEN como de PTEN-largo en células HEK293. E) Expresión exógena de plásmidos en la línea celular PC3 nula de PTEN. La orf (fase de lectura abierta) de PTEN codifica exclusivamente la ORF del codón de inicio AUG (carril 2). La adición de la ATR (ATR = región alternativamente traducida) puede traducir débilmente PTEN-larga (carril 3). La mutación del sitio de inicio cadena arriba en ATG modificó el complemento de proteína a PTEN-largo completamente (carril 5 y 6). La mutación del codón de inicio ATG en ATA anuló la banda de 55 kDa (carril 4 y 6). E) Un anticuerpo suscitado contra aminoácidos que codifican la ATR 5' y usados tanto en un lisado celular de HEK293 como en la línea celular U87 PTEN nula que sobreexpresa bien la orf de PTEN o un plásmido que codifica la ATR 5' (ATG/ATG). PTEN-largo puede verse en células que solo sobreexpresan la ATR 5'. Una banda de fondo observada en células U87 está presente en la parte inferior de la transferencia.

Figura 5. Predicción del Péptido de Señal. La secuencia 5' UTR de PTEN se tradujo y se introdujo en SignallP3.0. El modelo de markov oculto para péptidos de señal eucariotas se usó para la predicción. La región N indica la secuencia N terminal con carga positiva del péptido señal. La región H es el núcleo hidrófobo del péptido señal. La región C es una región levemente polar marcada por una prolina que normalmente rompe la hélice del núcleo hidrófobo. La probabilidad de la escisión es predictiva de un sitio de escisión para liberar el péptido señal, lo que permite que la proteína se libere en el lumen del RE (retículo endoplasmático) (Dalbey y Heijne, 2002). Se predice que la escisión ocurra en la posición 21.

Figura 6. Ensayo de Inmunoprecipitación (*pull-down*) de Concanavalina A. Se produjo la lisis de células HEK293 y se usó sefarosa concanavalina para inmunoprecipitación de proteínas glucosiladas. Los eluatos se resolvieron por SDS-PAGE y se realizó la inmunotransferencia para PTEN (6H2.1). Puede observarse un enriquecimiento en PTEN-largo en la inmunoprecipitación frente a adición. Obsérvese enriquecimiento de la banda PTEN más larga. PTEN tiene sitios de O-glucosilación posibles múltiples, pero solo un sitio de N-glucosilación. Se usó la lectina concanavalina A, que se une a restos de azúcar, en un ensayo de inmunoprecipitación para determinar si una parte del complemento de PTEN en células HEK293 estaba glucosilada. Se pudo purificar una mezcla de PTEN que tenía un PTEN-largo de aproximadamente 50 %, un enorme enriquecimiento de PTEN-largo sobre PTEN normal. Esto muestra que PTEN-largo está glucosilado y que la forma de 55 kDa citoplasmática de PTEN está glucosilada o que el PTEN-largo se escinde extracelularmente.

Figura 7. PTEN y PTEN-β se unen a heparán. Un extracto de hígado de ratón se pasó a través de una columna de Heparán sefarosa HiTrap de 1 ml (Amersham). La columna se lavó con NaCl 500 mM y las proteínas se eluyeron con volúmenes de columna secuenciales de NaCl 1 M. Las fracciones se analizaron mediante SDS-PAGE para PTEN usando un anticuerpo monoclonal de PTEN. Previamente se había observado que PTEN tenía una afinidad por especies con una alta carga negativa, una propiedad de PTEN lo que conduce a su preferencia de las PtdIns (3,4,5)P3 altamente aniónicas (Das, Dixon *et al.* 2003). Dado que el heparán es una de las moléculas biológicas con carga más negativa, se postuló que heparán actuaba realmente como mediador en la unión de PTEN con la matriz extracelular. Usando extractos de proteína de hígados de ratón, se descubrió que PTEN se une a heparán con alta afinidad. Adicionalmente, la elución continua de PTEN de una columna de agarosa heparina usando NaCl 1 M, también eluyó PTEN-larga.

Figura 8. Ensayo de Protección con Proteasa. Las células HEK293 se resuspendieron en concentraciones en aumento de proteinasa K. Se añadió tritón a una concentración final de 0,2 % a la reacción que contenía la concentración más alta de proteinasa K. La reacción se detuvo con PMSF y los lisados celulares se constituyeron en tampón laemlli. Los lisados se resolvieron por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 8 % y se inmunotransfirieron para PTEN (6H2.1), AKT, E-cadherina. La banda más grande de la inmunotransferencia de PTEN se denominó PTEN-largo. Estos datos muestran que la E-cadherina y PTEN-largo están principalmente en la superficie celular.

Figura 9. Elución de alta salinidad de PTEN y PTEN-largo de purificación de afinidad con heparina de medios acondicionados. PTEN y PTEN-largo pueden eluirse de una columna HiTrap de Heparina (Amersham) después de purificación con afinidad de medios acondicionados. Tanto un anticuerpo monoclonal como la cola de PTEN (anterior) y un anticuerpo específico contra aminoácidos traducidos en la ATR 5' reconocen una banda de proteína de aproximadamente 55 kDa de masa.

Figura 10. Purificación de PTEN de suero humano. El suero humano de sangre de AB se preclarificó de anticuerpos con proteína A/G y se sometió a heparin sefarosa. Los eluatos se resolvieron por SDS-PAGE y se inmunotransfirieron para PTEN o con secundario solo para el control de contaminación de cadena pesada.

Figuras 11A - 11C. Actividad antiangiogénica de PTEN-largo. (A) PTEN-largo se expresa en un subconjunto de vasos y capilares en la retina en desarrollo. Este patrón de expresión contrasta mucho con el de la forma canónica de PTEN y es coherente con una función de PTEN-largo en la inducción de regresión vascular que se produce en estas regiones. Esta correlación es reforzada por la notable regulación positiva de PTEN-largo, cuando este proceso de regresión vascular se ha inducido por hipoxia así como la transferencia western de lisados de retina completa en la parte superior derecha (B) y por la pérdida de PTEN-largo en células endoteliales en condiciones hipóxicas (C). Estos hallazgos indican la utilidad de PTEN-largo como una terapia antiangiogénica, por ejemplo en retinopatía diabética, así como en trastornos vasculares hiperproliferativos. Las flechas indican tejido positivo a CD34 y a PTEN-largo (vasos sanguíneos).

Figura 12. Actividad proapoptótica de PTEN-Largo. La apoptosis se indujo en células epiteliales de mamífero MCF-10A que se trataron con PTEN-largo purificado durante 24 horas como se indica. La escisión con caspasa 3 fue indicativa de actividad apoptótica.

Figura 13. Tratamiento de Ratones con PTEN-Largo. Gráfico de tamaño tumoral calibrado con mediciones de calibrador durante diez días de tratamiento, con PTEN-largo o un control de vector vacío. Células 293 se transfectoron con PTEN-largo ATG/ATG en el vector pcDNA3.1 His V5. Se realizaron lisados citoplasmáticos 48 horas después de la transfección y se pasaron sobre perlas del anticuerpo V5 y se eluyeron con péptido V5. Se muestran abajo transferencias Western de los eluatos de purificación con perlas V5. Observación inicial de que

PTEN-largo puede usarse para tratar tumores. Se establecieron xenoinjertos usando células de glioblastoma U87 (1 millón) inyectadas en la almohadilla de grasa mamaria de un ratón scid. El tratamiento se inició aproximadamente dos semanas después del trasplante.

5 **Figura 14. Resultados del Tratamiento de Ratones con PTEN-largo.** El gráfico que muestra la fracción de supervivencia de ratones (en días) tratados con control e inyecciones de PTEN-largo durante 14 días.

10 **Figura 15.** Construcciones indicadas para PTEN (orf de PTEN que carece de la UTR 5'), PTEN-largo y PTEN-largo con una mutación G en R en el aminoácido 305, que es comparable a la mutación G129R en la orf PTEN, se transfecaron en células 293. Usando proteína purificada de estas células se observó que PTEN-largo es una fosfatasa activa y que el mutante G305R de PTEN-largo (que es G129R en PTEN) reduce la actividad fosfatasa.

15 **Figura 16.** La actividad fosfatasa es esencial para la actividad de PTEN-largo que se muestra en los experimentos con el mutante PTEN-largo (G305R). Basándose en la bibliografía de PTEN se sabe que los truncamientos realizados dentro del dominio C2 desestabilizan la proteína, y basándose en la estructura cristalina de PTEN se cree que las interacciones entre el dominio C2 y los dominios fosfatasa son críticas para la actividad de la fosfatasa. Por lo tanto, el dominio mínimo para la actividad de PTEN-largo en el extremo C requerirá el dominio C2 pero no la cola. En el extremo N el sitio de escisión previsto es en el aminoácido 21, y por lo tanto la región funcional de la proteína está dentro de esta región. En lo que respecta a esto es importante observar que cuando se tratan tumores U87 en paralelo con PTEN o con PTEN-largo, no se observa efecto significativo del tratamiento con PTEN, solamente tratamiento con PTEN-largo.

20 **Figura 17.** Purificación de PTEN-largo de células 293 transfecadas con PTEN-largo ATG/ATG en el vector de expresión pcDNA3.1 con etiquetas His y V5. Después de la elución en columna Ni⁺, el eluato se resolvió en una columna de filtración en gel. La DO280 se muestra con una línea azul. PTEN-largo es rico en fracciones 7-18. El rendimiento de este experimento fue de aproximadamente 1 mg. Las flechas indican los productos PTEN-largo y PTEN-largo migrante alterado.

25 **Figuras 18A - 18B.** (A) Respuesta a la dosis de células de cáncer de próstata LNCaP contra la proteína purificada PTEN-largo usando muerte celular como una lectura (la proteína se purificó mediante ARVYS). 1x es igual a 0,33 microgramos por ml. Las células se trataron en medios sin factores de crecimiento. Después de 24 h, las células se lavaron con medio sin suero y se lisaron en tampón de muestra Laemmli. Se realizaron transferencias Western para las proteínas indicadas. (B) Células de glioblastoma U87 tratadas con PTEN-largo, PTEN-largo (G305R) o un control simulado muestran inducción de apoptosis según se indica por escisión de PARP y regulación negativa de señal pAKT en la serina 473. Estos datos confirman además que PTEN-largo puede inducir la apoptosis y reducir la señalización de PI3K/AKT.

30 **Figuras 19A - 19C.** La proteína PTEN-largo purificada con AKTA era capaz de reducir el tamaño tumoral durante un período de cinco días, medido por calibradores y usando un indicador de luciferasa junto con un sistema de formación de imágenes en animales vivos de xenogen. Los ratones recibieron PTEN-largo ~ 0,05 mg al día durante cinco días. Los xenoinjertos se establecieron con 1 millón de células de glioblastoma U87 inyectadas en la almohadilla de grasa mamaria que expresan luciferasa debido a la infección con FUW-luciferasa-neo. Los ratones recibieron inyección de luciferina por vía intraperitoneal 10 minutos antes de la formación de imágenes con el sistema de formación de imágenes Xenogen. (A) Mediciones luciferasa en 4 ratones antes (panel izquierdo) y el quinto día de tratamiento (panel derecho). (B) Mediciones con calibrador en cm² antes y durante los 5 días de tratamiento. (C) Fotonos detectados por el sistema Xenogen como se muestra la formación de imágenes en el panel. Se muestra el error típico de cuatro ratones en la cohorte. El ensayo de la t de Student para fotonos detectados desde el día 0 al día 5.

35 **Figura 20.** En un experimento independiente, tumores U87 se dejaron crecer a 1,5 cm² antes del tratamiento con PTEN (orf-403 aminoácidos; n = 5), PTEN-largo (G305R; n = 5) o PTEN-largo de tipo silvestre (n = 4). Después de 5 días de tratamiento el cambio promedio de luminiscencia muestra una disminución significativa para los ratones tratados con PTEN largo, pero no una disminución para las cohortes tratadas con PTEN o PTEN-largo (G305R). La luminiscencia reducida se correlacionó con un tamaño de tumor reducido. Estos datos demuestran que PTEN-largo requiere la ATR 5' y actividad fosfatasa para funcionar.

40 **Figuras 21A - 21C.** Análisis de xenoinjertos de U87 tratados con PTEN largo demuestran activación de apoptosis e inhibición de la señalización de PI3K. Los tumores se trataron durante 5 días como se ha indicado anteriormente. (A) Tumores tratados con PTEN-largo de tipo silvestre y G305R se recogieron después de 5 días de tratamiento indicado y se lisaron para el análisis de western. La proteína de tipo silvestre para PTEN-largo fue capaz de reducir la fosforilación de FOXO y AKT y activar la escisión de caspasa-3. (B) Tumores representativos tratados durante 5 días como se indica se fijaron en formalina y se embebieron en parafina. Las secciones se tificaron para un anticuerpo que detecta la caspasa-3 escindida, un marcador de apoptosis. Células tratadas con PTEN-largo tenían un aumento significativo en porcentaje de células apoptóticas P = 0,0419, ensayo de la t de Student. (C) Imágenes representativas de tinción de caspasa-3 escindida.

Figuras 22A - 22B. En el mismo tumor tratado con PTEN-largo durante 5 días el número de vasos sanguíneos se redujo enormemente. Los tumores tratados con PTEN-largo de tipo silvestre y G305R se recogieron después de 5 días de tratamiento indicado y se fijaron en formalina y se embebieron en parafina. Las secciones se tiñeron para un anticuerpo que detecta CD31, un marcador de células endoteliales que revisten vasos sanguíneos. (A) Células tratadas con PTEN-largo tenían una reducción significativa en el número de vasos por campo de vista (objetivo de 40x) $P = 0,007579$, ensayo de t de Student. (B) Imágenes representativas de tinción CD31.

Figuras 23A - 23B. Se establecieron xenoinjertos U87 en seis grupos ($n = 3/\text{grupo}$) y se trataron durante cuatro días con PTEN largo mediante inyecciones intramusculares (IM), intraperitoneales (IP), intratumorales (IT), subcutáneas (SC), intravenosas (IV). (A) El cambio promedio en el tamaño tumoral (CM2) del día 0 al día 4 se midió con un calibrador. (B) Imágenes representativas de la formación de imágenes con xenogen se muestran en la parte derecha. A partir de estos datos se puede llegar a la conclusión de que todos los métodos de inyección efectúan crecimiento tumoral en comparación con los ratones no tratados y que solamente la cohorte tratada IM mostró una cantidad de regresión significativamente disminuida.

Figuras 24A - 24C. Se ejecutaron experimentos de xenoinjerto en 6 líneas celulares, de mama, cerebro y próstata. En la parte superior se muestran los gráficos de cambios en cuatro líneas de células de cáncer de mama. (A, B y D). Gráficos de área de superficie tumoral (cm^2) medidos con calibrador durante los días de tratamiento indicados. (C) El cambio en células HCT-1143 se observa después de solo 24 horas de tratamiento. En las cuatro líneas celulares hay una clara reducción en el tamaño del tumor después del tratamiento.

Figura 25. PTEN-largo se une a células. La proteína PTEN-largo se añadió a medios de células U87 en hielo durante 10 minutos, se fijaron y después se tiñeron para PTEN-largo con el anticuerpo que lo reconoce.

Figura 26. Ensayo Miles: se inhibe inducción de permeabilidad vascular por PTEN-largo. Esta inhibición puede revertirse incubando previamente la proteína purificada con anticuerpo PTEN (6H2.1). PTEN-largo puede inhibir la inducción de la permeabilidad vascular mediante VEGF. Esta inducción puede reestablecerse por preincubación de PTEN-largo con anticuerpo suscitado contra PTEN, pero no con IgG de control.

Descripción detallada de la invención

Una fosfatasa humana aislada y un polipéptido largo homólogo de tensina (PTEN-largo) que consiste en los restos de aminoácidos consecutivos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1 para su uso en el tratamiento de un tumor sólido.

(No reivindicado:)

Un polipéptido que comprende (i) restos 1 a 173 de SEQ ID NO: 1, o (ii) un análogo del mismo que comprende los restos 1 a 173 de SEQ ID NO: 5, o (iii) restos 22 a 516 de SEQ ID NO: 1.

Una composición farmacéutica que comprende fosfatasa y polipéptido largo homólogo a tensina (PTEN-largo) que comprende los restos de aminoácidos consecutivos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1, o un fragmento (no reivindicado) del mismo que comprende los restos 22 a 516 de SEQ ID NO: 1 o un análogo de la misma que comprende los restos de aminoácido consecutivos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5.

Un método para el tratamiento de un tumor sólido en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad de una fosfatasa humana y polipéptido largo homólogo a tensina (PTEN-largo) que comprende los restos de aminoácido consecutivos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1, o un fragmento (no reivindicado) de la misma que comprende los restos 22 a 516 de SEQ ID NO: 1, o un análogo de la misma que comprende los restos de aminoácidos consecutivos que tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5, eficaz para tratar el tumor sólido en el sujeto.

Un método para inhibir el crecimiento de un tumor sólido en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad de una fosfatasa humana y un polipéptido largo homólogo a tensina (PTEN-largo) que comprende los restos de aminoácidos consecutivos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1, o un fragmento (no reivindicado) de la misma que comprende los restos 22 a 516 de SEQ ID NO: 1, o un análogo de la misma que comprende los restos de aminoácidos consecutivos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5, eficaz para inhibir el crecimiento del tumor sólido en el sujeto.

Un método para inhibir la angiogénesis en un tumor sólido en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad de una fosfatasa humana y un polipéptido largo homólogo de tensina (PTEN-largo) que comprende los restos de aminoácidos consecutivos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1, o un fragmento (no reivindicado) de la misma que comprende los restos 22 a 516 de SEQ ID NO: 1, o un análogo de la misma que comprende los restos de aminoácidos consecutivos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5, eficaz para inhibir la angiogénesis en el tumor sólido en el sujeto.

Un método para inducir la apoptosis de una célula epitelial vascular de un vaso sanguíneo en un tumor sólido en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad de una fosfatasa humana y un polipéptido largo homólogo de tensina (PTEN-largo) que comprende los restos de aminoácidos consecutivos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1, o un fragmento (no reivindicado) de la misma que comprende los restos 22 a 516 de SEQ ID NO: 1, o un análogo de la misma que comprende los restos de aminoácidos consecutivos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5, eficaz para inducir la apoptosis de la célula epitelial vascular en el vaso sanguíneo en el tumor sólido en el sujeto.

En una realización de los métodos descritos en el presente documento el tumor es un tumor canceroso. En una realización de los métodos descritos en el presente documento el tumor canceroso es un tumor de las células gliales, próstata, ovarios, útero, endometrio, mama, melanocitos, riñón, pulmón, colon, cabeza, cuello o páncreas del sujeto.

En una realización de los métodos descritos en el presente documento el tumor canceroso está activado por PTEN o por una ruta de PI3K o es negativo a PTEN.

En una realización de los métodos descritos en el presente documento el PTEN-largo, o análogo del mismo, o el fragmento de PTEN-largo, se administra al sujeto por introducción directa en el tumor sólido. En una realización de los métodos descritos en el presente documento el PTEN-largo, o el análogo del mismo, o el fragmento de PTEN-largo se inyecta en el tumor sólido. En una realización de los métodos descritos en el presente documento el PTEN-largo, o el análogo del mismo, o el fragmento de PTEN-largo se introduce directamente en el tumor sólido mediante un catéter. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, el PTEN-largo, o el análogo del mismo, o el fragmento de PTEN-largo se administra al sujeto mediante introducción directa en un vaso sanguíneo proporcionándolo al tumor sólido. En una realización de los métodos descritos en el presente documento el PTEN-largo, o el análogo del mismo, o el fragmento de PTEN-largo se inyecta en el vaso sanguíneo proporcionándolo al tumor sólido. En una realización de los métodos descritos en el presente documento el PTEN largo, o el análogo del mismo, o el fragmento de PTEN-largo se introduce directamente mediante un catéter en el vaso sanguíneo que se proporciona al tumor sólido. En una realización de los métodos descritos en el presente documento el PTEN-largo, o el análogo del mismo, o el fragmento de PTEN-largo, se administra al sujeto por vía intravenosa. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, el PTEN-largo, o el análogo del mismo, o el fragmento de PTEN-largo se administra al sujeto por vía subcutánea.

(No reivindicado:)

Un método para el tratamiento de un tumor sólido en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad de un vector de expresión que codifica fosfatasa humana y un polipéptido largo homólogo de tensina (PTEN-largo) que comprende la SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma que comprende los restos 22 a 516 de SEQ ID NO: 1, o un análogo de la misma que comprende SEQ ID NO: 5, para expresar PTEN-largo, el fragmento de PTEN-largo o el análogo del mismo, en células del tumor sólido en una cantidad eficaz para tratar el tumor sólido en un sujeto.

Una fosfatasa humana y un polipéptido largo homólogo de tensina (PTEN-largo) que comprende la SEQ ID NO: 1 o un fragmento (no reivindicado) de la misma que comprende los restos 22 a 516 de SEQ ID NO: 1, o un análogo de la misma que comprende SEQ ID NO: 5 para su uso en el tratamiento de un tumor sólido en un sujeto, para la inhibición del crecimiento de un tumor sólido en un sujeto, para inducción de la apoptosis de una célula epitelial vascular en un tumor sólido en un sujeto o para inhibir la angiogénesis en un tumor sólido en un sujeto.

En una realización del compuesto para los usos descritos en el presente documento el tumor es un tumor canceroso. En una realización de los métodos descritos en el presente documento, el tumor canceroso es un tumor glial, de próstata, de mama, de endometrio, de melanocitos, de riñón o de pulmón.

En una realización del compuesto para los usos descritos en el presente documento el tumor canceroso se activa por PTEN mediante una ruta PI3K o es negativo a PTEN.

Una composición que comprende la fosfatasa humana y el polipéptido largo homólogo de tensina (PTEN-largo) que comprende SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma que comprende los restos 22 a 516 de SEQ ID NO: 1, o un análogo de la misma que comprende SEQ ID NO: 5, unido a un agente no peptídico que aumenta la semivida plasmática de PTEN-largo, fragmento de PTEN-largo o el análogo de los mismos respectivamente.

En una realización, las composiciones descritas en el presente documento comprenden adicionalmente un transportador farmacéutico. En una realización de las composiciones descritas en el presente documento el agente no peptídico que aumenta la semivida plasmática es polietilenglicol (PEG). En una realización de las composiciones descritas el PEG está unido a un extremo C o a un extremo N de PTEN-largo, fragmento de PTEN-largo o el análogo de los mismos. En una realización de las composiciones descritas el agente no peptídico que aumenta la semivida plasmática es 9-fluorenilmetil cloroformiato (Fmoc) o (7-sulfo)-9-fluorenilmetoxycarbonilo.

(No reivindicado:)

5 Un ácido nucleico aislado que codifica una fosfatasa humana y un polipéptido largo homólogo de tensina (PTEN-largo) comprende SEQ ID NO: 1, o que codifica un fragmento de la misma que comprende los restos 22 a 516 de SEQ ID NO: 1, o que codifica un análogo de la misma que comprende SEQ ID NO: 5.

(No reivindicado:)

10 En una realización el ácido nucleico comprende los nucleótidos consecutivos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 6. En una realización el ácido nucleico comprende los restos de nucleótidos consecutivos 503 a 2243 de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 6. En una realización el ácido nucleico comprende nucleótidos consecutivos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 7. En una realización el ácido nucleico comprende los restos de nucleótidos consecutivos 503 a 2243 de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 7. En una realización el ácido nucleico es ARN. En una realización el ácido nucleico es ADN. En una realización el ácido nucleico es ADNc.

(No reivindicado:)

20 Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica fosfatasa humana y polipéptido largo homólogo de tensina (PTEN-largo) que comprende SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma que comprende los restos 22 a 516 de SEQ ID NO: 1, o un análogo de la misma que comprende SEQ ID NO: 5.

(No reivindicado:)

25 Una célula transformada que puede expresar la fosfatasa humana y el polipéptido largo homólogo de tensina (PTEN-largo) que comprende SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma que comprende los restos 22 a 516 de SEQ ID NO: 1, o un análogo de la misma que comprende SEQ ID NO: 5, en el que la célula tiene integrado en su genoma un ADN recombinante que codifica PTEN-largo o un análogo del mismo.

30 (No reivindicado:)

35 Una célula hospedadora que puede expresar la fosfatasa humana y el polipéptido largo homólogo de tensina (PTEN-largo) que comprende SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma que comprende los restos 22 a 516 de SEQ ID NO: 1, o un análogo de la misma que comprende SEQ ID NO: 5, en el que la célula hospedadora comprende un plásmido que codifica PTEN-largo o un análogo del mismo.

(No reivindicado:)

40 En una realización la célula hospedadora es una célula bacteriana. En una realización la célula hospedadora es una célula de mamífero.

45 Un proceso que comprende mezclar (1) fosfatasa humana y polipéptido largo homólogo de tensina (PTEN-largo) que comprende SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma que comprende los restos 22 a 516 de SEQ ID NO: 1, o un análogo de la misma que comprende SEQ ID NO: 5, y (2) un agente no peptídico que aumenta la semivida plasmática de PTEN-largo o el análogo del mismo, para preparar PTEN-largo que comprende SEQ ID NO: 1, o el fragmento del mismo que comprende los restos 22 a 516 de SEQ ID NO: 1, o el análogo del mismo que comprende SEQ ID NO: 5, unido al agente no peptídico que aumenta la semivida plasmática del PTEN-largo, fragmento de PTEN-largo o análogo de los mismos respectivamente.

50 (No reivindicado:)

55 Una molécula de ácido nucleico aislada que consta de al menos un fragmento de 20 nucleótidos de la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 6 o un complemento de las mismas que se hibrida específicamente en condiciones rigurosas con un complemento de la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 6, o con SEQ ID NO: 2 SEQ ID NO: 6.

(No reivindicado:)

60 Un anticuerpo aislado, o fragmento del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo se une a (1) polipéptido PTEN-largo que comprende los restos de aminoácido 1-173 de SEQ ID NO: 1 o (2) un análogo de la misma que comprende SEQ ID NO: 5 o (3) los aminoácidos que tienen la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 3 o (4) un fragmento de PTEN-largo que comprende los restos 22 a 516 de SEQ ID NO: 1.

(No reivindicado:)

5 En una realización el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal. En una realización el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo. En una realización el fragmento de anticuerpo es Fab, Fab', F(ab')₂ o fragmento Fv. En una realización el fragmento de anticuerpo es un anticuerpo monocatenario. En una realización el anticuerpo es un anticuerpo humanizado.

(No reivindicado:)

10 Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo se une a un epítipo conformacional de PTEN-largo, en el que PTEN largo comprende la secuencia expuesta en los restos 1-173 de SEQ ID NO: 1, pero en el que el anticuerpo no se une a PTEN.

(No reivindicado:)

15 En una realización el anticuerpo se une a un epítipo que comprende cualquiera de los restos 153-173 de SEQ ID NO: 1.

(No reivindicado:)

20 Un anticuerpo aislado o fragmento del mismo, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo se une a un epítipo de un PTEN-largo, en el que el PTEN-largo comprende la secuencia expuesta en los restos 1-173 de SEQ ID NO: 1, pero en el que el anticuerpo no se une a PTEN.

25 (No reivindicado:)

En una realización el anticuerpo se une a los restos 153-173, o a una parte de los mismos, de SEQ ID NO: 1.

(No reivindicado:)

30 Un fragmento peptídico de SEQ ID NO: 1, o SEQ ID NO: 5, cuyo fragmento tiene una actividad antitumoral, antiangiogénica o antiapoptótica. En una realización el péptido comprende 5-10, 10-20, 20-30 o 30-40 aminoácidos. En una realización el péptido comprende los aminoácidos 1-173 de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 5. En una realización el péptido comprende los restos de aminoácidos consecutivos 22 a 516 de SEQ ID NO: 1. En una realización el péptido no comprende los restos de aminoácido consecutivos 174 a 576 de SEQ ID NO: 1 ni SEQ ID NO: 5.

35 Como se usa en el presente documento, una cantidad "profilácticamente eficaz" de una sustancia es una cantidad efectiva para prevenir o retrasar la aparición de una afección patológica determinada en un sujeto al cual se le administra la sustancia.

40 Como se usa en el presente documento, una cantidad "terapéuticamente eficaz" de una sustancia es una cantidad eficaz para tratar, mejorar o disminuir un síntoma o causa de una afección patológica determinada en un sujeto que padece la misma, sujeto al que se le administra la sustancia.

45 En una realización, la cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz es de aproximadamente 1 mg de agente/sujeto a aproximadamente 1 g de agente/sujeto por dosificación. En otra realización, la cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz es de aproximadamente 10 mg de agente/sujeto a 500 mg de agente/sujeto. En una realización adicional, la cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz es de aproximadamente 50 mg de agente/sujeto a 200 mg de agente/sujeto. En una realización adicional, la cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz es de aproximadamente 100 mg de agente/sujeto. En otra realización adicional más, la cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz se selecciona de 50 mg de agente/sujeto, 100 mg de agente/sujeto, 150 mg de agente/sujeto, 200 mg de agente/sujeto, 250 mg de agente/sujeto, 300 mg de agente/sujeto, 400 mg de agente/sujeto y 500 mg de agente/sujeto.

50 "Administración" de un agente puede efectuarse o realizarse usando cualquiera de los diversos métodos y sistemas de suministro conocidos por el experto en la técnica. La administración puede ser, por ejemplo, intravenosa, oral, nasal, intraperitoneal, mediante el líquido cefalorraquídeo, mediante implante, transmucosa, transdérmica, intramuscular, intravascular, intraarterial, intracoronaria, intramiocárdica o subcutánea.

55 La expresión "análogo de PTEN-largo" incluye polipéptidos que tienen uno o más aminoácidos modificados, pero que conservan al menos 90 % de similitud de secuencia con SEQ ID NO: 1, y que conservan o mejoran la actividad de la inhibición del crecimiento tumoral medida mediante el estudio *in vivo* descrito a continuación en el presente documento. El propio PTEN (es decir el polipéptido definido solo por los restos 174-576 de SEQ ID NO: 1) se excluye expresamente.

60

65

La expresión “variante PTEN-larga” incluye polipéptidos que tienen uno o más aminoácidos adicionales, que tienen típicamente menos de 5 aminoácidos adicionales en cualquiera del extremo N o extremo C de PTEN, o en ambos, y que conserva o mejora la actividad de la inhibición del crecimiento tumoral medida mediante el estudio *in vivo* descrito en el presente documento a continuación que se mantiene.

La expresión “variante análoga de PTEN-largo” incluye polipéptidos que tienen uno o más aminoácidos adicionales, típicamente que tienen menos de 5 aminoácidos adicionales en cualquiera del extremo N o extremo C del análogo de PTEN-largo (es decir, SEQ ID NO: 5), o en ambos, y que conserva o mejora la actividad de la inhibición del crecimiento tumoral medida mediante el estudio *in vivo* descrito a continuación en el presente documento que se mantiene.

Todas las realizaciones que hacen referencia en el presente documento a un análogo de PTEN-largo son aplicables cambiando lo que deba cambiarse a una variante de PTEN-largo.

PTEN-largo algunas veces se denomina PTEN-beta, PTEN-β, PTEN-S.

Los sistemas de suministro de fármacos inyectables para PTEN-largo, análogo de PTEN-largo, variante de PTEN-largo, variante análoga de PTEN-largo o conjugados de cada uno de los mismos incluyen soluciones, suspensiones, geles, microesferas e inyectables poliméricos y pueden comprender excipientes tales como agentes alteradores de la solubilidad (por ejemplo, etanol, propilenglicol y sacarosa) y polímeros (por ejemplo, policaprilactonas y PLGA). Los sistemas implantables incluyen varillas y discos y pueden contener excipientes tales como los ejemplos no limitantes PLGA y policaprilactona.

Los sistemas de suministro oral para las composiciones y compuestos de la invención incluyen comprimidos y cápsulas. Estos contienen excipientes tales como aglutinantes (por ejemplo hidroxipropilmetilcelulosa, polivinilpirrolidona, otros materiales celulósicos y almidón), diluyentes (por ejemplo, lactosa y otros azúcares, almidón, fosfato dicálcico y materiales celulósicos), agentes disgregantes (por ejemplo, polímeros de almidón y materiales celulósicos) y agentes lubricantes (por ejemplo, estearatos y talco).

Los sistemas de suministro transmucoso para las composiciones y compuestos de la invención incluyen parches, comprimidos, supositorios, pesarios, geles y cremas y pueden contener excipientes tales como solubilizantes y potenciadores (por ejemplo, propilenglicol, sales biliares y aminoácidos) y otros vehículos (por ejemplo polietilenglicol, ésteres de ácidos grasos y derivados y polímeros hidrófilos tales como hidroxipropilmetilcelulosa y ácido hialurónico).

Los sistemas de administración dérmica para las composiciones y compuestos de la invención incluyen, por ejemplo, geles acuosos y no acuosos, cremas, emulsiones múltiples, microemulsiones, liposomas, pomadas, soluciones acuosas y no acuosas, lociones, aerosoles, bases de hidrocarburos y polvos y pueden contener excipientes tales como solubilizantes, potenciadores de la permeación (por ejemplo, ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos, alcoholes grasos y aminoácidos) y polímeros hidrófilos (por ejemplo, policarbofil y polivinilpirrolidona). En una realización, el transportador farmacéuticamente aceptable es un liposoma o un potenciador transdérmico.

Las soluciones, suspensiones y polvos para sistemas de suministro reconstituibles para las composiciones y compuestos de la invención incluyen vehículos tales como agentes de suspensión (por ejemplo, gomas, xantanas, materiales celulósicos y azúcares), humectantes (por ejemplo sorbitol), solubilizantes (por ejemplo, etanol, agua, PEG y propilenglicol), tensioactivos (por ejemplo, laurilsulfato sódico, Spans, Tweens y piridin cetilo), conservantes y antioxidantes (por ejemplo, parabenos, vitaminas E y C y ácido ascórbico), agentes antiapelmazamiento, agentes de recubrimiento y agentes quelantes (por ejemplo, EDTA).

Como se usa en el presente documento, “ATR 5” es la región traducida alternativamente 5’ como se describe en la sección Experimental más adelante en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, un “transportador farmacéutico” es un disolvente, agente de suspensión o vehículo farmacéuticamente aceptable, para el suministro de los compuestos o composiciones de la presente invención a un animal o un ser humano. El transportador puede ser líquido, aerosol, gel o sólido y se selecciona con la manera planificada de administración en mente.

Un “agente no peptídico” significará cualquier entidad química, incluyendo, sin limitación, un glicómero, un polímero, una molécula pequeña (es decir, una molécula basada en hidrocarburo o una molécula orgánica que tiene un peso molecular menor de 1.000), un lípido, un liposoma. Los ejemplos de agentes no peptídicos incluyen, pero sin limitación, PEG, Fmoc y FMS.

“Tumor Sólido” como se usa en el presente documento incluye tumores sólidos cancerosos y no cancerosos. Los tumores sólidos cancerosos incluyen sin limitación cáncer del tracto biliar; cáncer de cerebro, incluyendo glioblastomas y meduloblastomas; cáncer de mama; cáncer de cuello uterino; coriocarcinoma; cáncer de colon; cáncer endometrial; cáncer esofágico; cáncer gástrico; neoplasmas intraepiteliales, incluyendo enfermedad de

Bowen y enfermedad de Paget; cáncer de hígado; cáncer de pulmón; linfomas, incluyendo enfermedad de Hodgkin y linfomas linfocíticos; neuroblastomas; cáncer oral, incluyendo carcinoma de células escamosas; cáncer de ovario, incluyendo los que surgen de células epiteliales, células estromales, células germinales y células mesenquimáticas; cáncer de páncreas; cáncer de próstata; cáncer colorrectal; sarcomas, incluyendo leiomioma, rhabdomyosarcoma, liposarcoma, fibrosarcoma y osteosarcoma; cáncer de piel, incluyendo melanoma, sarcoma de Kaposi, cáncer basocelular y cáncer de células escamosas; cáncer testicular, incluyendo tumores germinales (seminoma, no seminoma [teratomas, coriocarcinomas]), tumores estromales y tumores de células germinales; cáncer tiroideo, incluyendo adenocarcinoma tiroideo y carcinoma medular; y cáncer renal incluyendo adenocarcinoma y tumor de Wilms, pero excluye tumores de tejidos no sólidos tales como leucemias y otros neoplasmas hematológicos, incluyendo leucemia linfocítica aguda y mielógena; mieloma múltiple; leucemias asociadas con SIDA y linfoma de leucemia de linfocitos T adultos.

La SEQ ID NO: 1 del listado de secuencias es la secuencia de la proteína PTEN-largo de longitud completa. Los restos de aminoácidos 1 a 173 de SEQ ID NO: 1 representan los nuevos restos de PTEN-largo que están codificados por la secuencia de ARNm de la ATR 5' (véase la descripción de SEQ ID NO: 2 más adelante). La metionina iniciadora canónica de PTEN es el resto de aminoácido 174 de SEQ ID NO: 1.

La SEQ ID NO: 2 es la secuencia de ARNm de PTEN-largo de longitud completa. La secuencia ATR 5' de PTEN-largo comienza en el nucleótido 513 de SEQ ID NO: 2, el codón de inicio CUG no canónico y finaliza en el nucleótido 1031 de SEQ ID NO: 2. La ATR 5' está en fase con la fase de lectura abierta de *PTEN*, que comienza en el codón de inicio AUG canónico en el nucleótido 1032 de SEQ ID NO: 2 y acaba en el nucleótido 2243 de SEQ ID NO: 2. Por tanto, la fase de lectura abierta de PTEN-largo se extiende desde el nucleótido 513 de SEQ ID NO: 2 al nucleótido 2243 de SEQ ID NO: 2 y conduce a la adición de 173 aminoácidos en el extremo N de PTEN. La proteína se denomina PTEN-largo.

SEQ ID NO: 3 es el ADNc que corresponde a la secuencia de ARNm de PTEN-largo de longitud completa.

SEQ ID NO: 4 es el péptido de la secuencia de la proteína PTEN-largo que comprende los restos de aminoácido 153 a 173 de SEQ ID NO: 1. Este único péptido representa un único epítipo procedente de PTEN-largo que no se encuentra en PTEN.

SEQ ID NO: 5 es una secuencia de proteína análoga de PTEN-largo de longitud completa. El resto de aminoácido 1 de PTEN-largo se ha cambiado de Leu a Met en el análogo para aumentar las producciones de la proteína.

SEQ ID NO: 6 es la secuencia de ARNm análoga de PTEN-largo de longitud completa modificada. La secuencia ATR 5' del análogo de PTEN-largo comienza en el nucleótido 513 de SEQ ID NO: 6 en el codón de inicio AUG modificado por ingeniería genética, y finaliza en el nucleótido 1031 de SEQ ID NO: 6.

SEQ ID NO: 7 es el ADNc modificado correspondiente a la secuencia de ARNm análoga de PTEN-largo de longitud completa modificado.

Cuando se da un intervalo en la memoria descriptiva, se entiende que el intervalo incluye todos los números enteros y 0,1 unidades dentro de ese intervalo, y cualquier subintervalo de los mismos. Por ejemplo, un intervalo de 77 a 90 % incluye 77,0 %, 77,1 %, 77,2 %, 77,3 %, 77,4 %, 77,5 %, 77,6 %, 77,7 %, 77,8 %, 77,9 %, 80,0 %, 80,1 %, 80,2 %, 80,3 %, 80,4 %, 80,5 %, 80,6 %, 80,7 %, 80,8 %, 80,9 % y 90,0 %, así como el intervalo de 80 % a 81,5 %, etc.

La presente invención se entenderá mejor con referencia a los detalles experimentales a continuación.

Detalles experimentales

El supresor tumoral PTEN es uno de los genes más comúnmente alterados en cáncer. Funciona como una fosfatasa lipídica de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato que a su vez suprime la señalización oncogénica de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y Akt. La inspección del ARNm de *PTEN* reveló que la región no traducida (UTR) 5' está en fase con la fase de lectura abierta (ORF) de *PTEN* por 770 pb. Dentro de esta ORF UTR, hay un codón de inicio CUG alternativo dentro de una secuencia Kozak débil cadena arriba de 513 pares de bases del codón de inicio AUG canónico. Aunque la expresión de la ORF de *PTEN* canónica genera una proteína que migra a aproximadamente 55 kDa, la expresión del ADNc de *PTEN* que contiene la UTR 5' puede generar una segunda proteína de 70 kDa denominada PTEN-larga. La mutación de los sitios de inicio indica que la PTEN de 55 kDa está generada a partir de la traducción del codón de inicio canónico mientras que el PTEN-largo se inicia desde el sitio de inicio alternativo cadena arriba. La inmunotransferencia con diferentes anticuerpos PTEN demuestran la presencia endógena de PTEN largo en líneas celulares múltiples. Estudios knockdown y knockout en células SE de ratón confirmaron que esta proteína más larga era de hecho PTEN. La secuencia de la proteína N terminal añadida codificaba un péptido de señal y sitio de escisión, indicando que PTEN-largo entra en la ruta secretora. PTEN-largo se une preferentemente a la lectina concanavalina A, demostrando que está glucosilada. Además, PTEN-largo puede purificarse de medios acondicionados mediante purificación por afinidad usando tanto un anticuerpo contra PTEN

así como heparán sulfato. PTEN-largo es también sensible a degradación en un ensayo de protección de proteasa *in vivo* mientras que PTEN normal no lo es, indicando que PTEN-largo se localiza fuera de la membrana celular.

Reactivos, líneas celulares y anticuerpos - Proteinasa K y concanavalina A se adquirieron en Sigma (St. Louis, MO). Las columnas de Heparin sefarosa y Heparin HiTrap HP se adquirieron en Amersham (Piscataway, NJ). Los anticuerpos contra PTEN se adquirieron en Cell Signaling (Danvers MA) y Cascade (Winchester MA). El anticuerpo de Akt se obtuvo en Cell Signaling (Danvers MA) y el anticuerpo de E cadherina de Upstate Millipore (Billerica, Ma). Un anticuerpo purificado por afinidad policlonal suscitado contra el epítipo PRHQQLLPSLSSFFFSHRLPD (SEQ ID NO: 3), encontrado en la traducción novedosa de PTEN, se realizó por Zymed Laboratories (South San Francisco, CA). Los anticuerpos secundarios se adquirieron en Pierce (Rockford, IL). HEK293, ZR-75-1, SKBR-3, MDAMB-361, BT549 y PC3 se obtuvieron en la ATCC (Manassas, VA) y se cultivaron de acuerdo con la normativa proporcionada.

Plásmidos y construcciones - pCEP4-PTEN, que codifican la fase de lectura abierta completa de PTEN y la región 5' no traducida se generó como se ha indicado anteriormente clonando el ADNc de PTEN (depositado en el NCBI como U90351) en el sitio NotI de pCEP4 (Invitrogen) (Simpson *et al.* 1998). La UTR 5' se extendió adicionalmente en este plásmido ligando una secuencia codificante adaptadora cadena arriba del sitio de restricción NotI original usado para clonación. El adaptador codificó hasta 10 pares de bases cadena arriba del primer codón de inicio CTG alternativo posible localizado en -513 del sitio de inicio canónico. Un adaptador en el que el supuesto sitio de inicio alternativo se mutó a ATG también se usó para crear un segundo conjunto de construcciones de expresión en el que la forma larga podría expresarse de un modo eficaz. Adicionalmente también se realizó mutagénesis del codón de inicio canónico contra ATA, produciendo un total de 4 construcciones diferentes (Figura 5.1). Estas 4 variaciones, así como la fase de lectura abierta de PTEN original también se subclonaron en el vector de retrovirus MSCV (Clontech, Mountainview, CA) para la expresión estable por infección.

Ensayo de protección de proteasa - células HEK293 se recogieron en PBS enfriado con hielo sin tripsina y se incubaron 5×10^5 alícuotas celulares durante 30 minutos con concentraciones en aumento de proteinasa K, de 0,5 ug/ml a 10 ug/ml. Se incluyó un control con Tritón 0,1 % para verificar la capacidad de la proteinasa K para degradar las proteínas indicadas. La reacción se detuvo con PMSF 5 mM. Las células se lisaron en tampón de muestra Laemmli 2x (Tris 125 mM pH 6,8, glicerol al 20 %, azul de bromofenol al 0,05 %, SDS al 4 %, 2-mercaptoetanol al 10 %) y se inmunotransfirieron para PTEN, Akt y E-cadherina.

Purificación de PTEN de hígados de ratón - Hígados de ratones C57BL6 se ultracongelaron en nitrógeno líquido, se pulverizaron y se resuspendieron en tampón TNN (Tris 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, 0,5 % NP-40, EDTA 5 mM, glicerol al 3 %, DTT 1 mM, Inhibidores de Cóctel de Proteasa de Mamífero 1x [Sigma]). La suspensión se homogeneizó con un mortero y se centrifugó a 40.000 RPM a 4 grados durante 1 hora. El sobrenadante se filtró sucesivamente con filtros de 0,45 micrómetros y 0,22 micrómetros. Una columna de exclusión de tamaño de sephacryl 200 (Amersham) se preequilibró con TMN y la muestra se aplicó a una velocidad de 0,3 ml/h, seguido de tampón. Se recogieron fracciones de 2 ml y las muestras de bajo peso molecular se agruparon y aplicaron a una columna preequilibrada HiTrap de Hepain HP (Amersham). La columna se lavó con tres volúmenes de columna de TNN y la proteína se eluyó con 3 volúmenes de columna graduales de soluciones TNN NaCl 0,3 M, 0,5 M y 1 M. Las fracciones se recogieron en incrementos de 0,5 ml y se realizó la inmunotransferencia para PTEN.

Purificación de heparin PTEN de los medios - células HEK293 se cultivaron hasta la confluencia en medio DMEM con FBS al 10 % en placas de 15 cm. Las células se incubaron durante una noche con 15 ml de DMEM sin FBS. Los medios de 20 placas se recogieron y filtraron a través de un filtro de 0,45 micrómetros. Una columna de HP Heparin 1 ml se equilibró con DMEM usando AktaPrime (AmershamBioscience) usando un flujo de 4 ml/min a 4 °C. Después, los medios acondicionados se pasaron a través de una columna a 1 ml/min. La columna se lavó con 10 volúmenes de BC200 (NaCl 200 mM, Tris 50 mM pH 7,4, EDTA 1 mM, Tritón X-100 al 0,2 %). Las proteínas se eluyeron con 5 ml de NaCl 1 M a 1 ml/min en fracciones de 1 ml. La concentración de las proteínas de cada fracción se determinó mediante una DO a 280 nm. La mitad de cada fracción se precipitó con ácido tricloroacético al 20 %, se lavó con acetona fría secada al vacío. La proteína se reconstituyó en 20 µl de tampón de lisis Laemmli y se inmunotransfirió usando un anticuerpo contra PTEN y PTEN-largo.

Purificación de PTEN a partir de suero - Se obtuvo suero humano de plasma AB en Sigma. 1 ml de suero se filtró a través de un filtro de 0,45 micrómetros y se purificó previamente de anticuerpos usando proteína A/G agarosa durante una incubación de 1 hora. La heparin-agarosa se incubó con el suero previamente purificado durante una noche junto con un control de sefarosa y se lavó al día siguiente con BC150 (NaCl 150 mM, Tris 25 mM pH 7,4, NP-40 al 1 %, Desoxicolato Sódico al 0,25 %, EDTA 1 mM). Las proteínas se eluyeron con tampón de muestra laemmli y se inmunotransfirieron para PTEN o solo anticuerpo secundario para la contaminación de la cadena pesada.

Inmunoprecipitación de Concanavalina A - células HEK293 se lisaron a subconfluencia con BC500 (NaCl 500 mM, Tris 20 mM a pH 7,4, Tritón X-100 al 1 %, $MnCl_2$ 1 mM, $CaCl_2$ 1 mM, Cóctel Inhibidor de Proteasa 1x). El lisado celular se centrifugó y se filtró. Las inmunoprecipitaciones se realizaron con 20 microlitros de concanavalina A sefarosa (Sigma) durante 1 hora a 4 °C. La resina se lavó con BC500 y la proteína se eluyó con tampón de muestra Laemmli.

Resultados

El ARNm de PTEN tiene un sitio de partida de inicio alternativo cadena arriba.

5 El ARNm de PTEN depositado en NCBI (Li y Sun 1997, Steck, Pershouse *et al.* 1997) contiene una UTR 5' extensiva. Aproximadamente 770 pb de secuencia continua en la región UTR 5' está en fase con el codón de inicio. En esta región no están codificadas metioninas; sin embargo, hay diversos codones CUG de inicio alternativos que comienzan en -519 desde el codón de inicio canónico. La traducción de esta secuencia no reveló dominios identificables de acuerdo con el scansite (scansite.mit.edu) y prosite (www.ebi.ac.uk/ppsearch). La traducción de
10 toda esta región añadiría 173 aminoácidos a PTEN aumentando su masa molecular a aproximadamente 70 kilodalton (Figura 2 y SEQ ID NO: 1).

El alineamiento de otros ortólogos de PTEN reveló que la secuencia traducida de la UTR de *Homo sapiens* puede encontrarse en las fases de lectura abierta de PTEN de diversas especies. *Pan troglodytes*, *Bos taurus*, *Apis mellifera* y *Caenorhabditis elegans* todos contienen homólogo de secuencia de proteína del producto traducido de la UTR 5' de *Homo sapiens* (Figura 3). Adicionalmente, el alineamiento de la UTR 5' de *Homo sapiens* y de la UTR 5' de PTEN de *Mus musculus* mostró una amplia homología de nucleótidos (no mostrada). La UTR 5' de *Mus musculus* se tradujo en fase con el codón de inicio canónico para 522 pares de bases y reveló una secuencia de proteína altamente homóloga cuando se comparó con la traducción de la UTR 5' de *Homo sapiens* (Figura 5.3). La homología
15 de la UTR 5' y la presencia real de la secuencia de aminoácidos precedente de la UTR 5' de *Homo sapiens* en las proteínas traducidas de otras especies es indicativa de la importancia evolutiva de esta secuencia.

El ARNm de PTEN puede iniciar la traducción de un sitio cadena arriba alternativo. La sobreexpresión de la ORF de PTEN generó una única banda de proteína a 55 kDa. La inclusión de la UTR 5' dio como resultado una segunda
25 banda de proteína más grande de aproximadamente 70 kDa. Una banda de proteína más grande en inmunotransferencias de PTEN también estaba presente en diversas líneas celulares endógenamente y fue detectable por anticuerpos monoclonales diferentes (Figura 4). Esta banda de proteína más larga también estaba presente en células ES de tipo silvestre de ratón y no estaba en células ES de ratón knockout de PTEN y disminuyó en clones ES de ratón que expresaban establemente el ARNhc de PTEN (Figura 4). El knockdown de la proteína
30 PTEN humana en células HEK293 usando ARNic también causó un knockdown de la proteína de 70 kDa.

Expresión de un plásmido que codifica la ORF de *PTEN* en la línea celular PC3 PTEN nula dio como resultado la generación de una proteína de 55 kDa. Cuando los plásmidos que también codificaban la UTR 5' se sobreexpresaban, se producía una proteína de 70 kDa. La mutación del supuesto codón de inicio cadena arriba de CTG a ATG (Figura 1, "ATG/ATG") cambió predominantemente el patrón de inmunotransferencia a la forma de
35 70 kDa (Figura 4). La banda de 55 kDa también se confirmó como originaria desde el codón de inicio ATG por mutagénesis (Figura 4 "CTG/ATA").

Por tanto, la UTR 5' fue suficiente para iniciar la traducción de una forma más larga de PTEN. Por consiguiente, la UTR 5' se denominó ATR 5' por Región Alternativamente Traducida y la proteína más larga se denominó "PTEN-largo".
40

Se generó un anticuerpo policlonal purificado por afinidad contra aminoácidos traducidos desde la ATR 5' y se usó para confirmar la producción de PTEN-largo recombinante en estudios de sobreexpresión así como la forma endógena en células HEK293 (Figura 4). A partir de toda de la inmunotransferencia del lisado de células completas de células HEK293 y de estudios de sobreexpresión en células PC3, aparecieron formas múltiples de PTEN-largo indicando bien posibles modificaciones postraduccionales, formas de corte y empalme no documentadas o incluso codones de inicio alternativo en la ATR 5'.
45

50 *PTEN-largo codifica un péptido señal N terminal*

La secuencia N terminal de PTEN-largo contiene un tramo largo de alaninas que podría ser indicativo de bien una secuencia transmembrana o un péptido señal. El análisis de la secuencia traducida usando SignallP 3.0 predijo con un grado de probabilidad alto (>95 %) que la secuencia contenía un péptido señal (Figura 5). Un péptido señal comprende característicamente aminoácidos básicos seguido de un tramo hidrófobo. La supuesta hélice transmembrana hidrófoba se rompe por una prolina y está seguida por una secuencia algo polar. También se predijo que la secuencia se escindía indicando que la proteína debía liberarse en el lumen del RE.
55

60 *PTEN está glucosilada*

Una de las características de las proteínas secretadas y extracelulares es la adición de residuos de azúcar complejos en el aparato de golgi, un proceso conocido como glucosilación. Los azúcares pueden añadirse a las asparaginas en la secuencia consenso N-X-S/T (X no puede ser prolina) mediante N-glucosilación (Gupta y Brunak 2002); los grupos hidroxilo de las serinas, treoninas y tirosinas también pueden ser la diana de lo que se denomina O-glucosilación (Julenius, Molgaard *et al.* 2005). PTEN tiene sitios de O-glucosilación múltiples, pero solo un sitio de N-glucosilación. La lectina concanavalina A, que se une a residuos de azúcar, se usó en un ensayo de
65

inmunoprecipitación para determinar si una parte del complemento PTEN en células HEK293 estaba glucosilado. A partir de estas células se purificó una mezcla de PTEN que era aproximadamente 50 % de PTEN-largo (Figura 6). Esto muestra que PTEN-largo está glucosilado y que bien la forma citoplasmática de 55 kDa de PTEN está glucosilada o que PTEN-largo está extracelularmente escindido.

5

PTEN-largo se une a heparán y se encuentra en la superficie celular

PTEN unido a diversos proteoglicanos, tales como sindecanos y glipicanos, que se encuentran unidos a la hoja externa de la membrana. Estos proteoglicanos son dos de las moléculas extracelulares heparinizadas (Blero, Zhang *et al.* 2005). Previamente se demostró que PTEN tenía una alta afinidad por especies altamente cargadas con carga negativa, una propiedad de PTEN que conduce a su preferencia de PIP3 altamente aniónico (Das, Dixon *et al.* 2003). Como heparán es una de las moléculas biológicas más negativamente cargadas, fue posible que el heparán pudiese mediar la unión de PTEN con la matriz extracelular. Usando extractos de proteína de hígados de ratón, se descubrió que PTEN se unía a heparán con alta afinidad. Adicionalmente, la elución continua de PTEN de una columna de agarosa heparina usando NaCl 1 M, también eluyó PTEN-largo (Figura 7).

10

15

El PTEN-largo adherido a la superficie externa de una membrana celular, debe ser sensible a degradación por proteasas. En el ensayo de protección de proteasas, se incubaron células vivas con una proteasa y solo se degradaron las proteínas extracelulares ya que la membrana lipídica es impermeable a la proteasa y sirve para proteger todas las proteínas intracelulares. Las células HEK293 se retiraron del cultivo adherente con suave agitación con PBS y se suspendieron con concentraciones crecientes de proteinasa K. La reacción se detuvo con PMSF y las células se lisaron con tampón de laemlli. PTEN-largo presentó sensibilidad al tratamiento con Proteinasa K junto con E-cadherina, que es una proteína extracelular conocida (Figura 8). Por otro lado PTEN mostró una sensibilidad a proteasa moderada, que indica que alguna parte de la especie de 55 kDa es también extracelular (ya que está glucosilada) o se produjo alguna lisis celular durante el ensayo que expuso PTEN citoplasmático a Proteinasa K. Se incluyó un control con tritón permeabilizador de membrana para demostrar que PTEN podía degradarse si se exponía a Proteinasa K. Queda aún por ver si esta es la forma de PTEN apropiada o una escindida de PTEN-largo que migra a 55 kDa y conserva el epítipo C terminal del anticuerpo PTEN. Estos datos indican que PTEN-largo está en la superficie celular.

20

25

30

PTEN-largo soluble se secreta en los medios.

La posibilidad de que una parte de la proteína sea soluble y se libere en el entorno extracelular. Heparin sefarosa se usó para purificar por afinidad PTEN-largo de medio sin suero acondicionado en células HEK293. La elución de la columna reveló la presencia de PTEN en los medios que migraban a un peso molecular de 50 kDa (figura 9). Una inmunotransferencia con el anticuerpo específico de PTEN-largo reveló la misma especie de 50 kDa, indicando que esta proteína conserva la secuencia traducida del sitio de inicio alternativo y la secuencia del epítipo C terminal del anticuerpo monoclonal PTEN. Esto implica fuertemente que la parte de PTEN observada era de 55 kDa que en efecto es un producto de traducción escindido que se origina a partir del codón de inicio cadena arriba.

35

40

La secreción de PTEN en el medio se confirmó adicionalmente por sobreexpresión de PTEN-largo en células HEK293 transfectadas con la construcción ATG/ATG. Estas células se usaron para producir medios acondicionados sin suero durante una noche y el anticuerpo monoclonal PTEN 6H2.1 se usó para inmunoprecipitar PTEN de 1 ml de los medios. La banda de PTEN más larga se inmunoprecipitó con éxito de los medios junto con la banda de 55 kDa más pequeña. Dado que la proteína se sobreexpresó, el procesamiento adecuado de la proteína probablemente no se produjo lo que dio como resultado la secreción de PTEN de 70 kDa de tamaño completo.

45

PTEN se encuentra en suero humano.

Una de las mejores fuentes de material fisiológico secretado es el suero. Se usó heparin sefarosa para purificar por afinidad PTEN de suero humano. El suero humano se centrifugó y se filtró para retirar la materia particulada. Después se diluyó a 1:5 en BC150 y se preclaró ampliamente con proteína A/G para retirar la IgG. El suero se incubó en lotes con una pequeña cantidad de heparin sefarosa. La heparin sefarosa se eluyó con tampón de laemlli y el eluato se transfirió para PTEN y solo para anticuerpo secundario para descartar contaminación de la cadena pesada. Tanto PTEN como PTEN-largo se descubrieron en suero humano (figura 10).

50

55

Actividad antiangiogénica de PTEN-largo

La función antiangiogénica de PTEN-largo se muestra por lo siguiente: (1) PTEN-largo se expresa normalmente de forma débil en la retina en desarrollo del ratón pero se observa expresión a alto nivel en vasos sanguíneos que experimentan involución/muerte celular durante el desarrollo neonatal (Figura 11); (2) PTEN-largo se encuentra en vasos sanguíneos en apoptosis en tumores. Adicionalmente, las células epiteliales tratadas con PTEN-largo, purificadas parcialmente de células transfectadas, inhibieron la migración celular e indujeron la apoptosis (Figura 12). PTEN-largo purificado también puede inducir la muerte celular asociada a la activación de la apoptosis en células endoteliales HUVEC, U87 o en células 293 en cultivo, medido por escisión de caspasa-3.

60

65

Actividad in vivo antitumoral y antiangiogénica de PTEN-largo

La Figura 13 muestra el tratamiento de ratones con PTEN-largo (A) Se inyectó la línea de células de glioblastoma U87 en ratones (n = 5) para formar xenoinjertos en 2 sitios (izquierda y derecha) en las almohadillas de grasa mamaria. Después del injerto tumoral en un tumor se inyectó directamente PTEN-largo y el tumor contralateral no se inyectó (con PTEN-largo). También se inyectó en un conjunto de 5 ratones de control (Vector Vacío) una preparación de proteína purificada simulada procedente de células transfectadas con vector vacío. De nuevo el tumor contralateral no se inyectó (con Vector Vacío). Los ratones se trataron los días 1-11 y los días 13-14. El diámetro más grande (cm) se midió con calibradores los días indicados. Los ratones se sacrificaron cuando el volumen tumoral alcanzó ≥ 1 cm. (B) La proteína se preparó por transfección de un vector de expresión de PTEN-largo en células 293 y se purificó parcialmente usando una resina de afinidad V5 seguido por elución con péptido V5. La Figura 14 muestra la fracción de supervivencia de los ratones (en días) tratados con inyecciones de control de PTEN-largo durante 14 días.

Tinción de retina

La tinción para PTEN-largo y vasos sanguíneos en la retina murina p7 reveló que PTEN-largo teñía selectivamente los vasos hialoideos que están comenzando a retroceder en este punto en el desarrollo vascular retinal murino. El anticuerpo contra PTEN-largo se dirigió contra el epítipo: N-PRHQQLLPSLSSFFFSHRLPD-C (SEQ ID NO: 3). La tinción de los vasos fue con BSI-lectina.

Purificación

En un método para la purificación de PTEN-largo, células 293 se transfectaron con PTEN-largo ATG/ATG y el lisado celular se pasó sobre una columna de afinidad Ni⁺. PTEN-largo se purificó coherentemente usando una columna Ni⁺ en el purificador AKTA usando un tampón de elución de imidazol.

Regresión tumoral

Xenoinjertos de células U87 transfectados antes de inyección con PTEN (orf aminoácidos 403) o PTEN-largo. A los 7 días después de la inyección hubo una reducción en los vasos sanguíneos mamaros en la cohorte que sobreexpresaba PTEN-largo en comparación con la cohorte que sobreexpresaba PTEN (n = 4 de 4). Esto sugiere que PTEN-largo puede afectar al entorno tumoral.

Análisis

Una segunda banda de proteína más larga en inmunotransferencias de PTEN de lisados celulares y tejido se observó regularmente. Las pruebas que confirmaban que la banda más larga es PTEN incluían: las bandas de proteína más largas se detectaron mediante diferentes anticuerpos monoclonales de PTEN; la proteína más larga estaba ausente cuando las células se trataron con ARNⁱ contra PTEN o el locus PTEN estaba desactivado en ratones. Se observó que la UTR 5' de *PTEN* estaba en fase para más de 700 pares de bases con el codón de inicio clásico de *PTEN*. Adicionalmente, había un codón CUG de 522 pares de bases cadena arriba de *PTEN*, que, si se traducía, podría representar el tamaño de la banda de proteína más grande en inmunotransferencias PTEN. Aunque esto no está asociado a una secuencia Kozak fuerte, sí conserva la secuencia de citosina -1 y guanosina +1. Cuando se traduce y añade a la ORF de *PTEN*, debería crearse una proteína de aproximadamente 70 kDa, que es la masa molecular de la banda PTEN más larga que se ha observado.

La traducción de esta secuencia ya existía en diversos ortólogos de PTEN dentro de su secuencia codificante actual. La UTR 5' de ratón también se inspeccionó debido a que se había observado una banda similar en lisados de tejido de ratón. La secuencia de nucleótidos de la UTR 5' de ratón era altamente homóloga a la UTR 5' de *Homo sapiens* y de manera similar en fase con el codón de inicio. Existen dos posibles codones de inicio alternativos a -522 y -516 y una traducción de esta secuencia de los sitios revela la secuencia de aminoácidos 90 % + homóloga a la secuencia de *Homo sapiens*. La conservación de esta supuesta proteína es notable y demuestra una importancia evolutiva de esta secuencia. Para describir mejor esta secuencia, se renombró a la ATR 5' o región alternativamente traducida de *PTEN* para describir su potencial para la traducción.

Se construyó un plásmido en el que la fase de lectura abierta de *PTEN* se clonó junto con la ATR 5' y la expresión de esta PTEN recombinante se comparó solo con la fase de lectura abierta que producía 403 aminoácidos canónicos. La inclusión de la ATR 5' generó una segunda banda de proteína de PTEN más grande que migraba a aproximadamente 70 kDa en comparación con los plásmidos de expresión que solo contenían la ORF canónica de PTEN, que creó una sola banda que migraba a 55 kDa. La proteína más larga representaba solo una parte minoritaria de la proteína total traducida; sin embargo, la mutación del supuesto sitio de inicio de ATG cambió la proporción de la proteína predominantemente a la forma más larga.

La conservación de la secuencia de la proteína de la ATR 5' indicó que esta era más que un artefacto de evolución. El extremo N contenía un tramo de aminoácidos alifáticos que se predijo que era una secuencia transmembrana. El

uso de Prosite y Signal 3.OIP predijo que el extremo N de PTEN-largo era un péptido señal con un sitio de escisión proteasa directamente después de este.

Se usó un ensayo de protección de proteasa *in vivo* para ensayar si PTEN-largo estaba localizado en la superficie extracelular de las células. PTEN-largo mostró degradación progresiva con cantidades en aumento de proteasa extracelular, mientras que PTEN no, indicando que al menos algo de PTEN-largo es extracelular y al menos en parte está unida a la hoja externa de la membrana celular. Este es un resultado más intrigante dada la implicación de una fosfatasa lipídica activa en la hoja externa de la membrana celular. Dos familias de proteoglicanos unidos a membrana externa, glicanos y sindecanos, se identificaron previamente en un complejo de proteína PTEN.

La presencia de PTEN en la superficie celular no excluye la posibilidad de un PTEN secretado soluble. Los sindecanos y glicanos son dos de los proteoglicanos más fuertemente heparinizados. El heparán es un glucosaminoglucano altamente cargado negativamente y se ha demostrado que PTEN tiene una afinidad por los aniones, en parte explicando la elección del PIP3 altamente cargado negativamente como su sustrato. Los experimentos de optimización de purificación de PTEN de hígado de ratón revelaron que tanto PTEN como PTEN-largo puede purificarse usando una columna de heparin sefarosa. Adicionalmente, una proteína de aproximadamente 50 kDa se purificó de medio sin suero acondicionado en células HEK293, usando una columna de heparin sefarosa. La proteína purificada se reconoció por un anticuerpo monoclonal específico contra PTEN y un anticuerpo policlonal contra restos de aminoácidos únicos presentes en PTEN largo. Previamente, el anticuerpo PTEN-largo solo reconoció una banda de proteína de aproximadamente 70 kDa. La observación de que ambos anticuerpos podrían reconocer la banda indica que el procesamiento proteolítico se produce probablemente y que la proteína observada por inmunotransferencia es un fragmento de PTEN que conserva los epítomos de ambos anticuerpos. Tanto PTEN como PTEN-largo también pueden purificarse de suero humano usando purificación de afinidad con heparina.

Se ha acumulado una inmensa bibliografía durante los 10 últimos años suponiendo la secuencia de PTEN. En este caso se confirma la existencia de una nueva forma de PTEN que se traduce a partir de un sitio alternativo y se secreta tanto en la hoja externa así como en los espacios extracelulares.

Los resultados *in vivo* muestran que el PTEN-largo es un nuevo compuesto antitumoral que está normalmente presente en suero humano y que tiene propiedades antiangiogénicas y proapoptóticas.

Referencias

- Acland, P., M. Dixon, *et al.* (1990). "Subcellular fate of the int-2 oncoprotein is determined by choice of initiation codon." *Nature* 343(6259): 662-5.
- Alberts, B. (2002). *Molecular biology of the cell*. Nueva York, Garland Science.
- Baker, S. J. (2007). "PTEN enters the nuclear age." *Cell* 128(1): 25-8.
- Blero, D., J. Zhang, *et al.* (2005). "Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate modulation in SHIP2-deficient mouse embryonic fibroblasts." *Febs J* 272(10): 2512-22.
- Blobel, G., P. Walter, *et al.* (1979). "Translocation of proteins across membranes: the signal hypothesis and beyond." *Symp Soc Exp Biol* 33: 9-36.
- Bonneau, D. and M. Longy (2000). "Mutations of the human PTEN gene." *Hum Mutat* 16(2): 109-22.
- Di Cristofano, A., B. Pesce, *et al.* (1998). "Pten is Essential for embryonic development and tumour suppression." *Nat Genet* 19(4): 348-55.
- Eng, C. (2003). "PTEN: one gene, many syndromes." *Hum Mutat* 22(3): 183-98.
- Florkiewicz, R. Z. and A. Sommer (1989). "Human Basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: three initiate translation from non-AUG codons." *Proc Natl Acad Sci USA* 86(11): 3978-81.
- Fraser, M. M., X. Zhu, *et al.* (2004). "Pten loss causes hypertrophy and increased proliferation of astrocytes *in vivo*." *Cancer Res* 64(21): 7773-9.
- Gupta, R. and S. Brunak (2002). "Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function." *Pac Symp Biocomput*: 310-22.
- Hann, S. R. (1994). "Regulation and function of non-AUG-initiated protooncogenes." *Biochimie* 76(9): 880-6.
- Hann, S. R., M. Dixit, *et al.* (1994). "The alternatively initiated c-Myc proteins differentially regulate transcription through a noncanonical DNA-binding site." *Genes Dev* 8(20): 2441-52.
- Hann, S. R. and R. N. Eisenman (1984). "Proteins encoded by the human c-myc oncogene: differential expression in neoplastic cells." *Mol Cell Biol* 4(11): 2486-97.
- Hann, S. R., M. W. King, *et al.* (1988). "A non-AUG translational initiation in c-myc exon 1 generates an N-terminally distinct protein whose synthesis is disrupted in Burkitt's lymphomas." *Cell* 52(2): 185-95.
- Hann, S. R., K. Sloan-Brown, *et al.* (1992). "Translational activation of the non-AUG-initiated c-myc 1 protein at high cell densities due to methionine deprivation." *Genes Dev* 6(7): 1229-40.
- Hershey, J. W. (1991). "Translational control in mammalian cells." *Arm Rev Biochem* 60: 717-55.
- Julenius, K., A. Molgaard, *et al.* (2005). "Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites." *Glycobiology* 15(2): 153-64.
- Kiefer, P., P. Acland, *et al.* (1994). "Competition between nuclear localization and secretory signals determines the subcellular fate of a single CUG-initiated form of FGF3." *Embo J* 13(17): 4126-36.

Kozak, M. (1989). "Context effects and inefficient initiation at non-AUG codons in eucaryotic cell-free translation systems." *Mol Cell Biol* 9(11): 5073-80.

Kozak, M. (1990). "Downstream secondary structure facilitates recognition of initiator codons by eukaryotic ribosomes." *Proc Nati Acad Sci USA* 87(21): 8301-5.

5 Kozak, M. (1991). "An analysis of vertebrate mRNA sequences: intimations of translational control." *J Cell Biol* 115(4): 887-903.

Kwabi-Addo, B., D. Giri, *et al.* (2001). "Haploinsufficiency of the Pten tumor suppressor gene promotes prostate cancer progression." *Proc Nati Acad Sci USA* 98(20): 11563-8.

10 Lee, J. O., H. Yang, *et al.* (1999). "Crystal structure of the PTEN tumor suppressor: implications for its phosphoinositide phosphatase activity and membrane association." *Cell* 99(3): 323-34.

Li, J., L. Simpson, *et al.* (1998). "The PTEN/MMAC1 tumor suppressor induces cell death that is rescued by the AKT/protein kinase B oncogene." *Cancer Res* 58(24): 5667-72.

Maehama, T. and J. E. Dixon (1998). "The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate." *J Biol Chem* 273 (22): 13375-8.

15 Petrocelli, T. and J. M. Slingerland (2001). "PTEN deficiency: a role in mammary carcinogenesis." *Breast Cancer Res* 3(6): 356-60.

Prats, H., M. Kaghad, *et al.* (1989). "High molecular mass forms of basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codons." *Proc Nati Acad Sci U S A* 86(6): 1836-40.

Sulis, M. L. and R. Parsons (2003). "PTEN: from pathology to biology." *Trends Cell Biol* 13(9): 478-83.

20 Taira, M., T. Iizasa, *et al.* (1990). "A human testis-specific mRNA for phosphoribosylpyrophosphate synthetase that initiates from a non-AUG codon." *J Biol Chem* 265(27): 16491-7.

Torres, J. and R. Pulido (2001). "The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation." *J Biol Chem* 276(2): 993-8.

25 Vázquez, F., S. R. Grossman, *et al.* (2001). "Phosphorylation of the PTEN tail acts as an inhibitory switch by preventing its recruitment into a protein complex." *J Biol Chem* 276(52): 48627-30.

Vázquez, F., S. Ramaswamy, *et al.* (2000). "Phosphorylation of the PTEN tail regulates protein stability and function." *Mol Cell Biol* 20(14): 5010-8.

Wang, X., L. C. Trotinan, *et al.* (2007). "NEDD4-1 is a proto-oncogenic ubiquitin ligase for PTEN." *Cell* 128(1): 129-39.

30 Xiao, J. H., I. Davidson, *et al.* (1991). "Cloning, expression, and transcriptional properties of the human enhancer factor TEF-1." *Cell* 65(4): 551-68.

You, M. J., D. H. Castrillon, *et al.* (2002). "Genetic analysis of Pten and Ink4a/Arf interactions in the suppression of tumorigenesis in mice." *Proc Nati Acad Sci USA* 99(3): 1455-60 EP 10744058.8-1406 // EP2400973 26 de octubre, 2015 The Trustees of Columbia University in the City of New York

35

LISTADO DE SECUENCIAS

40 <110> COLUMBIA UNIVERISTY/ RAMON PARSONS

<120> IDENTIFICACIÓN DE LA FORMA EXTRACELULAR DE PTEN QUE PUEDE USARSE PARA TRATAR TUMORES

45 <130> 0575/79943-A-PCT/JPW/BJA

<160> 7

<170> Patentin versión 3.5

50 <210> 1
<211> 576
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

55 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(173)
<223> Secuencia de proteína específica de PTEN-largo codificada por ATR 5' partiendo del codón de inicio CUG

60 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (174)..(174)
<223> Iniciador Met de PTEN

65 <400> 1

ES 2 623 393 T3

Leu Glu Arg Gly Gly Glu Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Ala Pro Gly Arg Gly Ser Glu Ser Pro Val Thr Ile Ser Arg Ala Gly
 20 25 30
 Asn Ala Gly Glu Leu Val Ser Pro Leu Leu Leu Pro Pro Thr Arg Arg
 35 40 45
 Arg Arg Arg Arg His Ile Gln Gly Pro Gly Pro Val Leu Asn Leu Pro
 50 55 60
 Ser Ala Ala Ala Ala Pro Pro Val Ala Arg Ala Pro Glu Ala Ala Gly
 65 70 75 80
 Gly Gly Ser Arg Ser Glu Asp Tyr Ser Ser Ser Pro His Ser Ala Ala
 85 90 95
 Ala Ala Ala Arg Pro Leu Ala Ala Glu Glu Lys Gln Ala Gln Ser Leu
 100 105 110
 Gln Pro Ser Ser Ser Arg Arg Ser Ser His Tyr Pro Ala Ala Val Gln
 115 120 125
 Ser Gln Ala Ala Ala Glu Arg Gly Ala Ser Ala Thr Ala Lys Ser Arg
 130 135 140

ES 2 623 393 T3

Ala Ile Ser Ile Leu Gln Lys Lys Pro Arg His Gln Gln Leu Leu Pro
145 150 155 160

Ser Leu Ser Ser Phe Phe Phe Ser His Arg Leu Pro Asp Met Thr Ala
165 170 175

Ile Ile Lys Glu Ile Val Ser Arg Asn Lys Arg Arg Tyr Gln Glu Asp
180 185 190

Gly Phe Asp Leu Asp Leu Thr Tyr Ile Tyr Pro Asn Ile Ile Ala Met
195 200 205

Gly Phe Pro Ala Glu Arg Leu Glu Gly Val Tyr Arg Asn Asn Ile Asp
210 215 220

Asp Val Val Arg Phe Leu Asp Ser Lys His Lys Asn His Tyr Lys Ile
225 230 235 240

Tyr Asn Leu Cys Ala Glu Arg His Tyr Asp Thr Ala Lys Phe Asn Cys
245 250 255

Arg Val Ala Gln Tyr Pro Phe Glu Asp His Asn Pro Pro Gln Leu Glu
260 265 270

Leu Ile Lys Pro Phe Cys Glu Asp Leu Asp Gln Trp Leu Ser Glu Asp
275 280 285

Asp Asn His Val Ala Ala Ile His Cys Lys Ala Gly Lys Gly Arg Thr
290 295 300

Gly Val Met Ile Cys Ala Tyr Leu Leu His Arg Gly Lys Phe Leu Lys
305 310 315 320

Ala Gln Glu Ala Leu Asp Phe Tyr Gly Glu Val Arg Thr Arg Asp Lys
325 330 335

Lys Gly Val Thr Ile Pro Ser Gln Arg Arg Tyr Val Tyr Tyr Tyr Ser
340 345 350

Tyr Leu Leu Lys Asn His Leu Asp Tyr Arg Pro Val Ala Leu Leu Phe
355 360 365

His Lys Met Met Phe Glu Thr Ile Pro Met Phe Ser Gly Gly Thr Cys
370 375 380

Asn Pro Gln Phe Val Val Cys Gln Leu Lys Val Lys Ile Tyr Ser Ser
385 390 395 400

Asn Ser Gly Pro Thr Arg Arg Glu Asp Lys Phe Met Tyr Phe Glu Phe
405 410 415

Pro Gln Pro Leu Pro Val Cys Gly Asp Ile Lys Val Glu Phe Phe His
 420 425 430

Lys Gln Asn Lys Met Leu Lys Lys Asp Lys Met Phe His Phe Trp Val
 435 440 445

Asn Thr Phe Phe Ile Pro Gly Pro Glu Glu Thr Ser Glu Lys Val Glu
 450 455 460

Asn Gly Ser Leu Cys Asp Gln Glu Ile Asp Ser Ile Cys Ser Ile Glu
 465 470 475 480

Arg Ala Asp Asn Asp Lys Glu Tyr Leu Val Leu Thr Leu Thr Lys Asn
 485 490 495

Asp Leu Asp Lys Ala Asn Lys Asp Lys Ala Asn Arg Tyr Phe Ser Pro
 500 505 510

Asn Phe Lys Val Lys Leu Tyr Phe Thr Lys Thr Val Glu Glu Pro Ser
 515 520 525

Asn Pro Glu Ala Ser Ser Ser Thr Ser Val Thr Pro Asp Val Ser Asp
 530 535 540

Asn Glu Pro Asp His Tyr Arg Tyr Ser Asp Thr Thr Asp Ser Asp Pro
 545 550 555 560

Glu Asn Glu Pro Phe Asp Glu Asp Gln His Thr Gln Ile Thr Lys Val
 565 570 575

5 <210> 2
 <211> 5572
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (513)..(515)
 <223> codón de inicio CUG de PTEN-largo

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (513)..(1031)
 <223> ATR 5' de PTEN-largo

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1032)..(1034)
 <223> codón de inicio AUG canónico de PTEN

<400> 2
 ccuccccucg cccggcgcgg ucccguccgc cucucgcucg ccucccgccu cccucgguc 60
 uuccgaggcg cccgggcucc cggcgcgggc gcgaggggg cgggcaggcc ggcgggcggu 120

gauguggcgg	gacucuuuau	gcgcugcggc	aggauacgcg	cucggcgcug	ggacgcgacu	180
gcgcucaguu	cucuccucuc	ggaagcugca	gccaugaugg	aaguuuagaga	guugagccgc	240
ugugagggcga	ggccgggcuc	aggcgagggga	gaugagagac	ggcggcggcc	gcggcccgga	300
gccccucuca	gcgccuguga	gcagccgcgg	gggcagcgcc	cucggggagc	cggccggccu	360
gcggcggcgg	cagcggcggc	guuucucgcc	uccucuucgu	cuuuucuaac	cgugcagccu	420
cuuccucggc	uucuccugaa	agggaaaggug	gaagccgugg	gcucgggcgg	gagccggcug	480
aggcgcggcg	gcggcggcgg	caccucccgc	uccuggagcg	ggggggagaa	gcggcggcgg	540
cggcggccgc	ggcggcugca	gcuccagggga	gggggucuga	gucgccuguc	accuuuucca	600
gggcugggaa	cgccggagag	uuggucucuc	cccuucuaac	gccuccaaca	cggcggcggc	660
ggcggcggca	cauccagggga	cccgggccgg	uuuuuaaccu	cccguccgcc	gccgccgcac	720
cccccguggc	ccgggcuccg	gaggccgccg	gcggaggcag	ccguucggag	gauuuuucgu	780
cuucucccca	uuccgcugcc	gccgcugcca	ggccucuggc	ugcugaggag	aagcaggccc	840
agucgcugca	accauccagc	agccgccgca	gcagccauua	cccggcugcg	guccagagcc	900
aagcggcggc	agagcgaggg	gcaucagcua	ccgccaaguc	cagagccauu	uccauccugc	960
agaagaagcc	ccgccaccag	cagcuucugc	caucucucuc	cuccuuuuuc	uucagccaca	1020
ggcucccaga	caugacagcc	aucaucaaag	agaucguuag	cagaaacaaa	aggagauauc	1080
aagaggauug	auucgacuua	gacuugaccu	auuuuuaucc	aaacauuuuu	gcuaugggau	1140
uuccugcaga	aagacuugaa	ggcguauaca	ggaaacaauu	ugaugaugua	guaagguuuu	1200
uggauucaa	gcauaaaaac	cauuaacaaga	uauacaaucu	uugugcugaa	agacauuau	1260
acaccgccaa	auuuauuugc	agaguugcac	aaauuccuuu	ugaagaccuu	aaccaccac	1320
agcuagaacu	uaucaaacc	uuuugugaag	aucuugacca	auggcuaagu	gaagauagca	1380
aucauguugc	agcaauucac	uguaaaagcug	gaaagggacg	aacuggugua	augauaugug	1440
cauuuuuuu	acaucggggc	aaauuuuuua	aggcacaaga	ggcccuagau	uucuaugggg	1500
aaguaaggac	cagagacaaa	aagggaguua	cuauucccag	ucagaggcgc	uauuguuuuu	1560
auuauagcua	ccuguuuaag	aaucaucugg	auuauagacc	aguggcacug	uuguuucaca	1620
agaugauguu	ugaaacuauu	ccaauuuuca	guggcggaac	uugcaauccu	caguuugugg	1680
ucugccagcu	aaaggugaag	auauauuccu	ccaauucagg	accacacgca	cgggaagaca	1740
aguucaugua	cuuugaguuc	ccucagccgu	uaccugugug	uggugauauc	aaaguagagu	1800
ucuccacaa	acagaacaag	augcuaaaaa	aggacaaaau	guuucacuuu	uggguuuuuu	1860
cauucuucau	accaggacca	gaggaaaccu	cagaaaaagu	agaaauggga	agucuaugug	1920
aucaagaaau	cgauagcauu	ugcaguauag	agcgugcaga	uaaugacaag	gaauaucuag	1980
uacuuacuuu	aacaaaaauu	gaucuugaca	aagcaauuaa	agacaaagcc	aaccgauacu	2040
uuucuccaaa	uuuuaggug	aagcuguacu	ucacaaaaac	aguagaggag	ccgucaauuc	2100

cagaggcuag	caguucaacu	ucuguaacac	cagauguuag	ugacaaugaa	ccugaucuuu	2160
auagauuuu	ugacaccacu	gacucugauc	cagagaauga	accuuuugau	gaagaucagc	2220
auacacaaa	uacaaaaguc	ugaauuuuuu	uuuaucaaga	gggauaaaac	accaugaaaa	2280
uaaacuugaa	uaaacugaaa	auggaccuuu	uuuuuuuuua	uggcaauagg	acauuguguc	2340
agauuaccag	uuauaggaac	aauucucuuu	uccugacca	ucuuguuuua	cccuauacau	2400
ccacaggguu	uugacacuug	uuguccaguu	gaaaaaaggu	uguguagcug	ugucauguau	2460
auaccuuuuu	gugucaaaa	gacauuuuaa	auucaauuag	gauuaauaaa	gauggcacuu	2520
ucccguuuuu	uuccaguuuu	auaaaaagug	gagacagacu	gauguguaua	cguaggaauu	2580
uuuuccuuuu	guguucuguc	accaacugaa	guggcuaaa	agcuuuguga	uauacugguu	2640
cacauccuac	cccuuugcac	uuguggcaac	agauaaguuu	gcaguuggcu	aagagagguu	2700
uccgaagggg	uuugcuacau	ucuaaugcau	guauucgggu	uaggggaau	gagggaaugc	2760
ucagaaagga	aaauuuuuu	ugcuggacuc	uggaccauau	accaucucca	gcuauuuaca	2820
cacaccuuuc	uuuagcaugc	uacaguuuuu	aaucuggaca	uucgaggaau	uggccgcugu	2880
cacugcuugu	uguuugcgca	uuuuuuuuua	aagcauuuug	gugcuagaaa	aggcagcuua	2940
aggaagugaa	ucuguauugg	gguaacaggaa	ugaaccuuuc	gcaacaucuu	aagauccaca	3000
aaugaagggg	uaauaaaaaa	augucauagg	uaagaaacac	agcaacaau	acuuuaaccau	3060
auaaaugugg	aggcuaucaa	caaagaau	gcuugaaaca	uuauaaaaaa	ugacaaugau	3120
uuauaaaaaa	uguuuucuca	auuguaacga	cuucuccauc	uccuguguua	ucaaggccag	3180
ugcuaaaaau	cagaugcugu	uaguaccuac	aucagucaac	aacuuacacu	uuuuuuacua	3240
guuuucaauc	auaaauaccg	cuguggaugc	uucaugugcu	gccugcaagc	uuuuuuuuuc	3300
ucauuuaaaa	uaaaauuuuu	uguaaugcug	cacagaaauu	uucauuuuga	gauucucacag	3360
uaagcguuuu	uuuuuuuuga	agauuuuuga	ugcacuuuuu	caauagcugu	cagccguucc	3420
accuuuuuga	ccuuacacau	ucuuuuucaa	ugaauuuugc	aguuuugcac	uuuuuuuaaa	3480
ugucauuuac	uguuagggaa	uuuuacuuga	auacugaaua	cauuuuuugu	uuuuuuuuuu	3540
aaggacauuu	guguuaaaaa	ggaaauuuga	guugcaguua	acuuucaaug	cugcacacaa	3600
aaaaaagaca	uuugauuuuu	caguagaaau	uguccuacau	gugcuuuuuu	gauuugcuau	3660
ugaaagaaua	ggguuuuuuu	uuuuuuuuuu	uuuuuuuuuu	uuuuuuuuuu	uuuuuuuuuu	3720
cauuucuuca	uagugcuccc	ccgaguuggg	acuagggcuu	cauuuucacu	ucuuuuuuuu	3780
aaucaucaua	uuuuugauuu	gcccagacug	cauacgauuu	uaagcggagu	acaacuacua	3840
uuguaaagcu	aaugugaaga	uuuuuuuuuu	aaaguuuuuu	uuuccagaaa	uuuggugucu	3900
ucaaaauuaa	ccuucaccuu	gacauuugaa	uauccagcca	uuuuuuuuuu	uuuuuuuuuu	3960
aaauuccauu	uucauuuacu	uuuuuuuuuu	uuuuuuuuuu	uuuuuuuuuu	uuuuuuuuuu	4020
guuuuuuuac	aaauacagau	ugaauaggac	cuacuagagc	agcauuuuua	gaguuuugaug	4080
gcaauuagau	uaggcagaac	uucaucuaaa	uuuuuuuuuu	uuuuuuuuuu	uuuuuuuuuu	4140

uccauaccuu gucaguuuca uucaacaauu uuuuuuuuu uaacaaagcu cuuaggauuu 4200
 acacauuuau auuuuuuuuu ugauuuuuuu aguauugauu gauugcucuu aaguuuuuuu 4260
 gguuuuuuu gagacaacua uucuaacacc ucaccauuga aauuuuuuuu ccaccuuguc 4320
 uuucuuuuuu gcuguuuuuu guuaccuuuu auguuuuuuu acuuuuuuuu uugaaguuuu 4380
 uuuuuuuuuu uguuuuuuuu uacuuuuuuu ggcaccgcau auuuuuuuuu aacuuuuuuu 4440
 uucauuuuuu uaacauuuuu ggccagguca uuuuuuuuuu cauuuuuuuu ggcuuuuuuu 4500
 cuuuuuuuuu uuuuuuuuuu gaauguuuuu gucuuuuuuu gguuuuuuuu uuuuuuuuuu 4560
 ucauuuuuuu ugaguuuuuu ugcuuuuuuu uuuuuuuuuu guuuuuuuuu auguuuuuuu 4620
 gguuuuuuuu auuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu acuuuuuuuu cuuuuuuuuu 4680
 guuuuuuuuu ccuuuuuuuu ugauuuuuuu uuuuuuuuuu guuuuuuuuu gaauuuuuuu cgauuuuuu 4740
 uuuuuuuuuu auuuuuuuuu guuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuu 4800
 cuuuuuuuuu gguuuuuuuu cuuuuuuuuu uuuuuuuuuu aguuuuuuuu aguuuuuuuu uuuuuuuuu 4860
 uuuuuuuuuu gcuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuu 4920
 uuuuuuuuuu cuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuu 4980
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuu 5040
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuu 5100
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuu 5160
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuu 5220
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuu 5280
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuu 5340
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuu 5400
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuu 5460
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuu 5520
 uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuu 5572

5 <210> 3
 <211> 5572
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (513)..(515)
 <223> codón de inicio CTG de PTEN-largo

15 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (513)..(1031)
 <223> ATR 5' de PTEN-largo

20 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1032)..(1034)
 <223> codón de inicio ATG canónico de PTEN

<400> 3

ES 2 623 393 T3

cctcccctcg cccggcgcgg tcccgtccgc ctctcgctcg cctcccgcct cccctcggtc	60
ttccgaggcg cccgggctcc cggcgcgggc gcggaggggg cgggcaggcc ggcgggcggt	120
gatgtggcgg gactctttat gcgctgcggc aggatacgcg ctcggcgctg ggacgcgact	180
gcgctcagtt ctctctctc ggaagctgca gccatgatgg aagtttgaga gttgagccgc	240
tgtgaggcga ggccgggctc aggcgagggg gatgagagac ggcggcggcc gcggcccgga	300
gcccctctca gcgcctgtga gcagccgcgg gggcagcgcc ctcggggagc cggccggcct	360
gcggcgcgcg cagcggcggc gtttctcgcc tcctcttcgt cttttctaac cgtgcagcct	420
cttctcggc ttctctgaa agggaaggtg gaagccgtgg gctcgggcgg gagccggctg	480
aggcgcggcg gcggcgcgcg cacctcccgc tcctggagcg ggggggagaa gcggcgggcg	540
cggcgccgc ggcggtgca gctccagga ggggtctga gtcgcctgtc accatttcca	600
gggctgggaa cgccggagag ttggtctctc cccttctact gcctccaaca cggcgggcggc	660
ggcgcgggca catccagga cccgggcccg ttttaaact cccgtccgcc gccgccgcac	720
ccccgtggc ccgggctccg gaggcccgcg gcggaggcag ccgttcggag gattattcgt	780
cttctcccca ttccgctgcc gccgctgcca ggcctctggc tgctgaggag aagcaggccc	840
agtcgctgca accatccagc agccgccga gcagccatta cccggctgcg gtccagagcc	900
aagcggcgcg agagcgaggg gcatcagcta ccgccaagtc cagagccatt tccatcctgc	960
agaagaagcc ccgccaccag cagcttctgc catctctctc ctctttttc ttcagccaca	1020
ggctcccaga catgacagcc atcatcaaag agatcgttag cagaaacaaa aggagatatic	1080
aagaggatgg attcgactta gacttgacct atatttatcc aaacattatt gctatgggat	1140
ttcctgcaga aagacttgaa ggcgtataca ggaacaatat tgatgatgta gtaaggtttt	1200
tggattcaaa gcataaaaac cattacaaga tatacaatct ttgtgctgaa agacattatg	1260
acaccgcaa atttaattgc agagttgcac aatatccttt tgaagaccat aaccaccac	1320
agctagaact tatcaaacc ttttgtgaag atcttgacca atggctaagt gaagatgaca	1380
atcatgttgc agcaattcac tgtaaagctg gaaagggacg aactgggtgta atgatatgtg	1440
catatttatt acatcggggc aaatttttaa aggcacaaga ggccctagat ttctatgggg	1500
aagtaaggac cagagacaaa aagggagtaa ctattcccag tcagaggcgc tatgtgtatt	1560
attatagcta cctgttaaag aatcatctgg attatagacc agtggcactg ttgtttcaca	1620
agatgatggt tgaaactatt ccaatgttca gtggcggaac ttgcaatcct cagtttgtgg	1680
tctgccagct aaagggtgaag atatattcct ccaattcagg acccacacga cgggaagaca	1740
agttcatgta ctttgagttc cctcagccgt tacctgtgtg tggtgatatic aaagtagagt	1800
tcttccacaa acagaacaag atgctaaaaa aggacaaaat gtttcacttt tgggtaaata	1860

cattcttcat accaggacca gaggaaacct cāgāaaaāgt āgāaaatgga agtctatgtg 1920
atcaagaaat cgatagcatt tgcagtatag agcgtgcaga taatgacaag gaatatctag 1980
tacttacttt aacaaaaaat gatcttgaca aagcaaataa agacaaagcc aaccgatact 2040
tttctccaaa ttttaagggtg aagctgtact tcacaaaaac agtagaggag ccgtaaatc 2100
cagaggctag cagttcaact tctgtaacac cagatgttag tgacaatgaa cctgatcatt 2160
atagatattc tgacaccact gactctgatc cagagaatga accttttgat gaagatcagc 2220
atacacaat tacaaaagtc tgaatTTTTT tttatcaaga gggataaaac accatgaaaa 2280
taaacttgaa taaactgaaa atggaccttt ttttttttaa tggcaatagg acattgtgtc 2340
agattaccag ttataggaac aattctcttt tcctgacca tcttgtttta ccctatacat 2400
ccacaggggt ttgacacttg ttgtccagtt gaaaaaagggt tgtgtagctg tgtcatgtat 2460
ataccttttt gtgtcaaaag gacatttaaa attcaattag gattaataaa gatggcactt 2520
tcccgtttta ttccagtttt ataaaaagtg gagacagact gatgtgtata cgtaggaatt 2580
ttttcctttt gtgttctgtc accaactgaa gtggctaaag agctttgtga tatactgggt 2640
cacatctac cctttgcac ttgtggcaac agataagttt gcagttggct aagagaggtt 2700
tccgaaggggt tttgctacat tctaattgat gtattcgggt taggggaatg gagggaatgc 2760
tcagaaagga aataatttta tgctggactc tggaccatat accatctcca gctatttaca 2820
cacacctttc ttttagcatgc tacagttatt aatctggaca ttcgaggaat tggccgctgt 2880
cactgcttgt tgtttgcgca tttttttta aagcatattg gtgctagaaa aggcagctaa 2940
aggaagtgaa tctgtattgg ggtacaggaa tgaaccttct gcaacatctt aagatccaca 3000
aatgaagggga tataaaaaata atgtcatagg taagaaacac agcaacaatg acttaacat 3060
ataaatgtgg aggctatcaa caaagaatgg gcttgaaca ttataaaaaat tgacaatgat 3120
ttattaaata tgttttctca attgtaacga cttctccatc tcctgtgtaa tcaaggccag 3180
tgctaaaatt cagatgctgt tagtacctac atcagtcaac aacttacct tattttacta 3240
gttttcaatc ataatacctg ctgtggatgc ttcattgtgt gcctgcaagc ttcttttttc 3300
tcattaaata taaaatattt tgtaatgctg cacagaaatt ttcaatttga gattctacag 3360
taagcgtttt ttttctttga agatttatga tgcacttatt caatagctgt cagccgttcc 3420
acccttttga ccttacacat tctattaca tgaattttgc agttttgcac attttttaa 3480
tgtcattaac tgttagggaa ttttacttga atactgaata catataatgt ttatattaaa 3540
aaggacattt gtgttaaaaa ggaaattaga gttgcagtaa actttcaatg ctgcacacaa 3600
aaaaaagaca tttgattttt cagtagaaat tgcctacat gtgctttatt gatttgctat 3660
tgaaagaata gggttttttt tttttttttt tttttttttt ttaaattgtc agtgttgaat 3720
catttcttca tagtctccc ccgagttggg actagggctt caatttctact tcttaaaaaa 3780
aatcatcata tatttgatat gccagactg catacgattt taagcggagt acaactacta 3840
ttgtaaagct aatgtgaaga tattattaaa aaggtttttt tttccagaaa tttggtgtct 3900

```

tcaaattata ccttcacctt gacatttgaa tatccagcca ttttgtttct taatgggtata 3960
aaattccatt ttcaataact tattgggtgct gaaattgttc actagctgtg gtctgaccta 4020
gttaatttac aaatacagat tgaataggac ctactagagc agcatttata gagtttgatg 4080
gcaaatagat taggcagaac ttcatctaaa atattcttag taaataatgt tgacacgttt 4140
tccatacctt gtcagtttca ttcaacaatt tttaaatttt taacaaagct cttaggattt 4200
acacatttat atttaaacat tgatataatag agtattgatt gattgctcat aagttaaatt 4260
ggtaaagtta gagacaacta ttctaacacc tcaccattga aatttatatg ccacctgtgc 4320
tttcataaaa gctgaaaatt gttacctaaa atgaaaatca acttcatggt ttgaagatag 4380
ttataaatat tgttctttgt tacaatttcg ggcaccgcat attaaaacgt aactttattg 4440
ttccaatag taacatggag ggccagggtca taaataatga cattataatg ggcttttgca 4500
ctgttattat ttttcctttg gaatgtgaag gtctgaatga gggttttgat tttgaatggt 4560
tcaatgtttt tgagaagcct tgcttacatt ttatgggtga gtcattggaa atggaaaaat 4620
ggcattatat atattatata tataaatata tattatacat actctcctta ctttatttca 4680
gttaccatcc ccatagaatt tgacaagaat tgctatgact gaaaggtttt cgagtcctaa 4740
ttaaaacttt atttatggca gtattcataa ttagcctgaa atgcattctg taggtaatct 4800
ctgagtttct ggaatatttt cttagacttt ttggatgtgc agcagcttac atgtctgaag 4860
ttacttgaag gcatcacttt taagaaagct tacagttggg ccctgtacca tccaagtcc 4920
ttttagctc ctcttgaaca tgtttgcat acttttaaaa gggtagttga ataaatagca 4980
tcaccattct ttgctgtggc acaggttata aacttaagtg gagtttaccg gcagcatcaa 5040
atgtttcagc tttaaaaaat aaaagtaggg tacaagttta atgtttagtt ctagaaattt 5100
tgtgcaatat gttcataacg atggctgtgg ttgccacaaa gtgcctcgtt tacctttaa 5160
tactgttaat gtgtcatgca tgcagatgga aggggtggaa ctgtgcacta aagtgggggc 5220
tttaactgta gtatttggca gagttgcctt ctacctgcca gttcaaaagt tcaacctggt 5280
ttcatataga atatatatac taaaaaattt cagtctgtta aacagcctta ctctgattca 5340
gcctcttcag atactcttgt gctgtgcagc agtggctctg tgtgtaaatt ctatgactg 5400
aggatacaca aaaatacaca tatgatgtgt acaggataat gcctcatccc aatcagatgt 5460
ccatttgta ttgtgtttgt taacaacct ttatctctta gtgttataaa ctccacttaa 5520
aactgattaa agtctcattc ttgtcaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aa 5572

```

<210> 4
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

```

<400> 4
      Pro Arg His Gln Gln Leu Leu Pro Ser Leu Ser Ser Phe Phe Phe Ser
      1           5           10           15
      His Arg Leu Pro Asp
                20

```

10

<210> 5

<211> 576
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(173)
 <223> Secuencia de proteína análoga de PTEN-largo codificada por ATR 5' partiendo del codón de inicio AUG modificado por ingeniería genética

10

<400> 5

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

Gly Phe Asp Leu Asp Leu Thr Tyr Ile Tyr Pro Asn Ile Ile Ala Met
 195 200 205

Gly Phe Pro Ala Glu Arg Leu Glu Gly Val Tyr Arg Asn Asn Ile Asp
 210 215 220

Asp Val Val Arg Phe Leu Asp Ser Lys His Lys Asn His Tyr Lys Ile
 225 230 235 240

Tyr Asn Leu Cys Ala Glu Arg His Tyr Asp Thr Ala Lys Phe Asn Cys
 245 250 255

Arg Val Ala Gln Tyr Pro Phe Glu Asp His Asn Pro Pro Gln Leu Glu
 260 265 270

Leu Ile Lys Pro Phe Cys Glu Asp Leu Asp Gln Trp Leu Ser Glu Asp
 275 280 285

Asp Asn His Val Ala Ala Ile His Cys Lys Ala Gly Lys Gly Arg Thr
 290 295 300

Gly Val Met Ile Cys Ala Tyr Leu Leu His Arg Gly Lys Phe Leu Lys
 305 310 315

Ala Gln Glu Ala Leu Asp Phe Tyr Gly Glu Val Arg Thr Arg Asp Lys
 325 330 335

Lys Gly Val Thr Ile Pro Ser Gln Arg Arg Tyr Val Tyr Tyr Tyr Ser
 340 345 350

Tyr Leu Leu Lys Asn His Leu Asp Tyr Arg Pro Val Ala Leu Leu Phe
 355 360 365

His Lys Met Met Phe Glu Thr Ile Pro Met Phe Ser Gly Gly Thr Cys
 370 375 380

Asn Pro Gln Phe Val Val Cys Gln Leu Lys Val Lys Ile Tyr Ser Ser
 385 390 395 400

Asn Ser Gly Pro Thr Arg Arg Glu Asp Lys Phe Met Tyr Phe Glu Phe
 405 410 415

Pro Gln Pro Leu Pro Val Cys Gly Asp Ile Lys Val Glu Phe Phe His
 420 425 430

Lys Gln Asn Lys Met Leu Lys Lys Asp Lys Met Phe His Phe Trp Val
 435 440 445

Asn Thr Phe Phe Ile Pro Gly Pro Glu Glu Thr Ser Glu Lys Val Glu
 450 455 460

Asn Gly Ser Leu Cys Asp Gln Glu Ile Asp Ser Ile Cys Ser Ile Glu
 465 470 475 480

Arg Ala Asp Asn Asp Lys Glu Tyr Leu Val Leu Thr Leu Thr Lys Asn
 485 490 495

Asp Leu Asp Lys Ala Asn Lys Asp Lys Ala Asn Arg Tyr Phe Ser Pro
 500 505 510

Asn Phe Lys Val Lys Leu Tyr Phe Thr Lys Thr Val Glu Glu Pro Ser
 515 520 525

Asn Pro Glu Ala Ser Ser Ser Thr Ser Val Thr Pro Asp Val Ser Asp
 530 535 540

Asn Glu Pro Asp His Tyr Arg Tyr Ser Asp Thr Thr Asp Ser Asp Pro
 545 550 555 560

Glu Asn Glu Pro Phe Asp Glu Asp Gln His Thr Gln Ile Thr Lys Val
 565 570 575

<210> 6
 <211> 5572
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (513)..(515)
 <223> Codón de inicio AUG modificado por ingeniería genética de análogo de PTEN-largo

<400> 6
 ccucccccucg cccggcgcg g ucccguccgc cucucgcucg ccucccgccu ccccucgguc 60
 uuccgaggcg cccgggcucc cggcgcgggc gcgagggggg cgggcaggcc ggcggggcgg 120
 gauguggcgg gacucuuuau ggcugcgggc aggauacgcg cucggcgcg ggacgcgacu 180
 gcgcucaguu cucuccucuc ggaagcugca gccaugaugg aaguuuagaga guugagccgc 240
 ugugaggcga ggccgggcuc aggcgagggg gaugagagac ggcggcgcc gcggcccggg 300
 gccccucuca gcgccuguga gcagccgagg gggcagcgcc cucgggggagc cggccggccu 360
 gcggcgggcg cagcggcggc guuucucgcc uccucucgu cuuuucuaac cgugcagccu 420
 cuuccucggc uucuccugaa agggaaggug gaagccgugg gcucgggcgg gagccggcug 480
 aggcgcgggc gcggcgggcg caccuccgc ucauggagcg ggggggagaa gcggcgggcg 540
 cggcgggcgc ggcggcgca gcuccagggg gggggucuga gucgccuguc accauuucca 600
 gggcugggaa cgccggagag ugggucucuc ccuucuaqu gccuccaaca cggcgggcggc 660
 ggcggcgga cauccagggg cccgggcccg uuuuaaaccu cccguccgcc gccgcccgcac 720
 cccccguggc ccgggcuccg gaggccgccc gcggaggcag ccguucggag gauuauucgu 780

cuucucccca	uuccgcugcc	gccgcugcca	ggccucuggc	ugcugaggag	aagcaggccc	840
agucgcugca	accauccagc	agccgccgca	gcagccauua	cccggcugcg	guccagagcc	900
aagcggcggc	agagcgaggg	gcaucagcua	ccgccaaugc	cagagccauu	uccauccugc	960
agaagaagcc	ccgccaccag	cagcuucugc	caucucucuc	cuccuuuuuc	uucagccaca	1020
ggcucccaga	caugacagcc	aucaucaaag	agaucguuag	cagaaacaaa	aggagauauc	1080
aagaggaugg	auucgacuua	gacuugaccu	auuuuuaucc	aaacauuuuu	gcuaugggau	1140
uuccugcaga	aagacuugaa	ggcguauaca	ggaacaauau	ugaugaugua	guaagguuuu	1200
uggauucaa	gcavuuuuac	cauuacaaga	uauacaaucu	uugugcugaa	agacauuau	1260
acaccgcaa	uuuuuuuugc	agaguugcac	aaauuccuuu	ugaagaccuu	aaccaccac	1320
agcuagaacu	uaucaaaccc	uuuugugaag	aucuugacca	auggcuuagu	gaagaugaca	1380
aucauguugc	agcauuucac	uguuuuugc	gaaagggacg	aacugguua	augauaugug	1440
cauuuuuuu	acaucggggc	aauuuuuuu	aggcacaaga	ggcccuagau	uucuaugggg	1500
aaguaaggac	cagagacaaa	aaggagauaa	cuuuucccag	ucagaggcgc	uauuguuuu	1560
auuuuagcua	ccuguuuuag	aaucucugc	uuuuuagacc	aguggcacug	uuguuucaca	1620
agaugauguu	ugaaacuauu	ccaauuuca	guggcggaac	uugcauccu	caguuuugug	1680
ucugccagcu	aaaggugaag	auuuuuuccu	ccaauucagg	accacacga	cgggaagaca	1740
aguucaugua	cuuugaguuc	ccucagccgu	uaccugugug	uggugauauc	aaaguagagu	1800
ucuuaccaca	acagaacaag	augcuuuuuu	aggacuuuuu	guuuucuuuu	uggguuuuuu	1860
cauuuuuau	accaggacca	gaggaaaccu	caguuuuuuu	aguuuuuuuu	aguuuuuuuu	1920
aucaagaaau	cgauagcauu	ugcaguauag	agcugcagaa	uaauugacaag	gaauuucua	1980
uacuuacuuu	aaacuuuuuu	gaucuuugca	aagcauuuuu	agacuuuuuu	aaccgaauc	2040
uuucuccaaa	uuuuuaggug	aagcuguauc	ucacuuuuuu	aguagaggag	ccguuuuuuu	2100
cagaggcuag	caguuuuacu	ucuguuuac	caguuuuuuu	ugacuuuuuu	ccguuuuuuu	2160
auaguuuuu	ugacuuuacu	gacuuuuuuu	caguuuuuuu	accuuuuuuu	gaaguuuuuu	2220
auacuuuuu	uacuuuuuuu	ugaauuuuuu	uuuuuuuuuu	gguuuuuuuu	accuuuuuuu	2280
uaauuuuuu	uaauuuuuuu	auuuuuuuuu	uuuuuuuuuu	ugguuuuuuu	acuuuuuuuu	2340
aguuuuuuu	uuuuuuuuuu	aauuuuuuuu	uuuuuuuuuu	uccuuuuuuu	ucuuuuuuuu	2400
ccacuuuuu	uugacuuuuu	uuuuuuuuuu	gaauuuuuuu	uguuuuuuuu	uguuuuuuuu	2460
auuuuuuuu	guguuuuuuu	gacuuuuuuu	auuuuuuuuu	gauuuuuuuu	gauguuuuuu	2520
uccuuuuuu	uuccuuuuuu	uuuuuuuuuu	gaguuuuuuu	gauguuuuuu	cguuuuuuuu	2580
uuuuuuuuu	guguuuuuuu	accuuuuuuu	guguuuuuuu	aguuuuuuuu	uuuuuuuuuu	2640
cacuuuuuu	ccuuuuuuuu	uuuuuuuuuu	aguuuuuuuu	gcuuuuuuuu	aaguuuuuuu	2700
uccuuuuuu	uuuuuuuuuu	ucuuuuuuuu	guuuuuuuuu	uaguuuuuuu	gaguuuuuuu	2760
ucuuuuuuu	aauuuuuuuu	uguuuuuuuu	ugguuuuuuu	accuuuuuuu	gcuuuuuuuu	2820

cacaccuuuc	uuuagcaugc	uacaguuuuu	aaucuggaca	uucgaggaau	uggccgcugu	2880
cacugcuugu	uguuugcgca	uuuuuuuuua	aagcauuuug	gugcuagaaa	aggcagcuua	2940
aggaagugaa	ucuguauugg	gguacaggaa	ugaaccuuuc	gcaacaucuu	aagauccaca	3000
aaugaagggg	uaaaaaaua	augucauagg	uaagaaacac	agcaacaauug	acuuuaccau	3060
auaaaugugg	aggcuaucaa	caaagaauug	gcuugaaaca	uuauaaaaau	ugacaaugau	3120
uuauaaaaua	uguuuucuca	auuguaacga	cuucuccauc	uccuguguaa	ucaaggccag	3180
ugcuaaaauu	cagaugcugu	uaguaccuac	aucagucaac	aacuuacacu	uuuuuuacua	3240
guuuucaauc	auaaauaccug	cuguggaugc	uucaugugcu	gccugcaagc	uucuuuuuuc	3300
ucauuaaaaa	uaaaauuuu	uguaaugcug	cacagaaaau	uucauuuga	gauucucag	3360
uaagcguuuu	uuuucuuuga	agauuuuga	ugcacuuuuu	caauagcugu	cagccguucc	3420
acccuuuuga	ccuuacacau	ucuauuacaa	ugaauuuugc	aguuuugcac	auuuuuuaaa	3480
ugucauuuac	uguuagggaa	uuuuacuuga	auacugaaua	cauauaaugu	uuauuuuaaa	3540
aaggacauuu	guguuaaaaa	ggaaauuuga	guugcaguua	acuuucaaug	cugcacacaa	3600
aaaaaagaca	uuugauuuuu	caguagaaau	uguccuacau	gugcuuuuuu	gauuugcuau	3660
ugaaagaaua	ggguuuuuuu	uuuuuuuuuu	uuuuuuuuuu	uuaaaugugc	aguguugaau	3720
cauuucuuca	uagugcuccc	ccgaguuggg	acuagggcuu	cauuuucacu	ucuuaaaaaa	3780
aaucaucaua	uauuugauau	gcccagacug	cauacgauuu	uaagcggagu	acaacuacua	3840
uuguaaagcu	aaugugaaga	uauuauuaaa	aagguuuuuu	uuuccagaaa	uuuggugucu	3900
ucaaaauuaa	ccuucaccuu	gacauuugaa	uauccagcca	uuuuguuucu	uaaugguaua	3960
aaauuccauu	uucauuacu	uauuggugcu	gaaauuguuc	acuagcugug	gucugaccua	4020
guuauuuuac	aaauacagau	ugaauaggac	cuacuagagc	agcauuuaa	gaguuuugaug	4080
gcaaaauagau	uaggcagaac	uucaucuaaa	auauucuuag	uaaaauaugu	ugacacguuu	4140
uccauaccuu	gucaguuuca	uucaacaauu	uuuuuuuuuu	uaacaaagcu	cuuaggauuu	4200
acacauuuau	auuuuuacau	ugauuuuuag	aguauuugau	gauugcucau	aaguuuuuuu	4260
gguaaaguua	gagacaacua	uucuaacacc	ucaccauuga	aauuuuuauug	ccaccuuguc	4320
uuucauuuuu	gcugaaaauu	guuaccuaaa	augaaaauca	acuucauguu	uugaagauag	4380
uuauuuuuau	uguucuuugu	uacaauuucg	ggcaccgcau	auuuuuuacgu	aacuuuuuug	4440
uuccaauaug	uaacauuggag	ggccagguca	uaaaauauga	cauuuuuuuug	ggcuuuugca	4500
cuguuuuuuu	uuuuccuuug	gaauugugaag	gucugaauga	ggguuuuugau	uuugaauuuu	4560
ucaauuuuuu	ugagaagccu	ugcuuacauu	uuauuggugua	gucuuuggaa	auggaaaaau	4620
ggcauuuuuu	auuuuuuuua	uuuuuuuuua	uuuuuuuuuu	acucuccuaa	cuuuuuuuca	4680
guuaccuucc	ccauagaauu	ugacaagaau	ugcuauugacu	gaaagguuuu	cgaguccuaa	4740
uuuuuuuuuu	uuuuuuuuugca	guuuuuuuuu	uuagccugaa	augcauuucug	uagguaauuc	4800

cugaguuuu ggaauuuuu cuuagacuuu uuggauūgc āgcagcuuac augucugaag 4860
 uuacuugaag gcaucacuuu uaagaaagcu uacaguuggg cccuguacca uccaagucc 4920
 uuuguagcuc cucuugaaca uguuugccau acuuuuuuuu gguuaguuga auuuuagca 4980
 ucaccauuu uugcuguggc acagguuuua aacuuuagug gaguuuaccg gcagcaucaa 5040
 auguuucagc uuuuuuuuu aaaaguaggg uacaaguuuu auguuuaguu cuagaaauuu 5100
 ugugcaauu guucauaacg auggcugugg uugccacaaa gugccucguu uaccuuuuuu 5160
 uacuguuuuu gugucaugca ugcagaugga agggguggaa cugugcacua aagugggggc 5220
 uuuuacugua guuuuuggca gaguugccuu cuaccugcca guucaaagu ucaaccuguu 5280
 uucauuuaga auuuuuuuu uuuuuuuuu cagucuguua aacagccuuu cucugauuca 5340
 gccucuucag auacucuugu gcugugcagc aguggcucug uguguuuuug cuaugcacug 5400
 aggauacaca aaauuaccaa uaugaugugu acaggauuuu gccucauccc aaucagaugu 5460
 ccuuuuguuu uuguguuuuu uaacaacccu uuauucuua guguuuuuuu cuccacuuuu 5520
 aacugauuuu agucucuauu uuguuuuuuu uuuuuuuuu uuuuuuuuu aa 5572

<210> 7
 <211> 5572
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (513)..(515)
 <223> Codón de inicio AUG modificado por ingeniería genética de análogo de PTEN-largo

10

<400> 7
 cctcccctcg cccggcgcg tcccgtccgc ctctcgctcg cctcccgcct cccctcggtc 60
 ttccgaggcg cccgggctcc cggcgcgcg gcggaggggg cgggcaggcc ggcggcggt 120
 gatgtggcgg gactctttat gcgctgcggc aggatacgcg ctcggcgctg ggacgcgact 180
 gcgctcagtt ctctcctctc ggaagctgca gccatgatgg aagtttgaga gttgagccgc 240
 tgtgaggcga ggccgggctc aggcgaggga gatgagagac ggcggcgcc gcggcccgga 300
 gcccctctca gcgcctgtga gcagccgcgg gggcagcgcc ctgggggagc cggccggcct 360
 gcggcgcgcg cagcggcggc gtttctcgcc tcctcttcgt cttttctaac cgtgcagcct 420
 cttcctcggc ttctcctgaa agggaaggtg gaagccgtgg gctcgggcgg gagccggctg 480
 aggcgcggcg gcggcgcgcg cacctcccgc tcatggagcg ggggggagaa gcggcgcgcg 540
 cggcgccgc ggcggctgca gctccaggga gggggctctga gtcgcctgtc accatttcca 600
 gggctgggaa cgccggagag ttggtctctc cccttctact gcctccaaca cggcgcgcg 660
 ggcggcgca catccaggga cccgggcccg ttttaaact cccgtccgcc gccgccgac 720
 cccccgtggc ccgggctccg gaggccccc gcggaggcag ccgttcggag gattattcgt 780
 cttctcccca ttccgctgcc gccgctgcca ggctctggc tgctgaggag aagcaggccc 840

agtcgctgca	accatccagc	agccgccgca	gcagccatta	cccggctgcg	gtccagagcc	900
aagcggcggc	agagcgaggg	gcatcagcta	ccgccaagtc	cagagccatt	tccatcctgc	960
agaagaagcc	ccgccaccag	cagcttctgc	catctctctc	ctcctttttc	ttcagccaca	1020
ggctcccaga	catgacagcc	atcatcaaag	agatcgtag	cagaaacaaa	aggagatc	1080
aagaggatgg	attcgactta	gacttgacct	atatttatcc	aaacattatt	gctatgggat	1140
ttcctgcaga	aagacttgaa	ggcgtataca	ggaacaatat	tgatgatgta	gtaaggtttt	1200
tggattcaaa	gcataaaaac	cattacaaga	tatacaatct	ttgtgctgaa	agacattatg	1260
acaccgcaa	atttaattgc	agagttgcac	aatatccttt	tgaagaccat	aaccaccac	1320
agctagaact	tatcaaacc	ttttgtgaag	atcttgacca	atggctaagt	gaagatgaca	1380
atcatgttgc	agcaattcac	tgtaaagctg	gaaagggacg	aactggtgta	atgatatgtg	1440
catatttatt	acatcggggc	aaatttttaa	aggcacaaga	ggccctagat	ttctatgggg	1500
aagtaaggac	cagagacaaa	aagggagtaa	ctattcccag	tcagaggcgc	tatgtgtatt	1560
attatagcta	cctgttaaag	aatcatctgg	attatagacc	agtggcactg	ttgtttcaca	1620
agatgatgtt	tgaactatt	ccaatgttca	gtggcggaac	ttgcaatcct	cagtttgtgg	1680
tctgccagct	aaagtgaa	atatattcct	ccaattcagg	accacacga	cgggaagaca	1740
agttcatgta	ctttgagttc	cctcagccgt	tacctgtgtg	tggtgatatc	aaagtagagt	1800
tcttccacia	acagaacaag	atgctaaaaa	aggacaaaat	gtttcacttt	tgggtaaata	1860
cattttcat	accaggacca	gaggaaacct	cagaaaaagt	agaaaatgga	agtctatgtg	1920
atcaagaaat	cgatagcatt	tgcagtatag	agcgtgcaga	taatgacaag	gaatatctag	1980
tacttacttt	aacaaaaaat	gatcttgaca	aagcaaataa	agacaaagcc	aaccgatact	2040
tttctccaaa	ttttaaggtg	aagctgtact	tcacaaaaac	agtagaggag	ccgtcaaatc	2100
cagaggctag	cagttcaact	tctgtaacac	cagatgttag	tgacaatgaa	cctgatcatt	2160
atagatattc	tgacaccact	gactctgatc	cagagaatga	accttttgat	gaagatcagc	2220
atacaciaat	tacaaaagtc	tgaatttttt	tttatcaaga	gggataaaac	accatgaaaa	2280
taaacttgaa	taaactgaaa	atggaccttt	tttttttaa	tggcaatagg	acattgtgtc	2340
agattaccag	ttataggaac	aattctcttt	tctgacca	tcttgtttta	ccctatacat	2400
ccacagggtt	ttgacacttg	ttgtccagtt	gaaaaaaggt	tgtgtagctg	tgtcatgtat	2460
ataccttttt	gtgtcaaaa	gacatttaaa	attcaattag	gattaataaa	gatggcactt	2520
tcccgtttta	ttcagttttt	ataaaaagtg	gagacagact	gatgtgtata	cgtaggaatt	2580
ttttcctttt	gtgttctgtc	accaactgaa	gtggctaaag	agctttgtga	tatactgggt	2640
cacatcctac	ccctttgcac	ttgtggcaac	agataagttt	gcagttggct	aagagaggtt	2700
tccgaagggt	tttgctacat	tctaattgat	gtattcgggt	taggggaatg	gagggaaatgc	2760
tcagaaagga	aataatttta	tgctggactc	tggaccatat	accatctcca	gctatttaca	2820
cacacctttc	tttagcatgc	tacagttatt	aatctggaca	ttcgaggaat	tggccgctgt	2880

cactgcttgt	tgtttgcgca	ttttttt	aagcatattg	gtgctagaaa	aggcagctaa	2940
aggaagtgaa	tctgtattgg	ggtacaggaa	tgaaccttct	gcaacatctt	aagatccaca	3000
aatgaagggg	tataaaaata	atgtcatagg	taagaaacac	agcaacaatg	acttaacccat	3060
ataaatgtgg	aggctatcaa	caaagaatgg	gcttgaaaca	ttataaaaat	tgacaatgat	3120
ttattaaata	tgttttctca	attgtaacga	cttctccatc	tcctgtgtaa	tcaaggccag	3180
tgctaaaatt	cagatgctgt	tagtacctac	atcagtcaac	aacttacct	tattttacta	3240
gttttcaatc	ataataacctg	ctgtggatgc	ttcatgtgct	gcctgcaagc	ttcttttttc	3300
tcattaaata	taaaatattt	tgtaatgctg	cacagaaatt	ttcaatttga	gattctacag	3360
taagcgtttt	ttttctttga	agatttatga	tgcacttatt	caatagctgt	cagccgttcc	3420
acccttttga	ccttacacat	tctattacaa	tgaattttgc	agttttgcac	attttttaa	3480
tgctattaac	tgtaggggaa	ttttacttga	atactgaata	catataatgt	ttatattaaa	3540
aaggacattt	gtgttaaaaa	ggaaattaga	gttgcagtaa	actttcaatg	ctgcacacaa	3600
aaaaagaca	tttgattttt	cagtagaaat	tgtcctacat	gtgctttatt	gatttgctat	3660
tgaaagaata	gggtttttt	ttttttttt	ttttttttt	ttaaatgtgc	agtgttgaat	3720
catttcttca	tagtgctccc	ccgagttggg	actagggctt	caatttctact	tcttaaaaa	3780
aatcatcata	tatttgatat	gcccagactg	catacgattt	taagcggagt	acaactacta	3840
ttgtaaagct	aatgtgaaga	tattattaaa	aaggttttt	ttccagaaa	tttgggtgct	3900
tcaaattata	ccttcacctt	gacatttgaa	tatccagcca	ttttgtttct	taatggtata	3960
aaattccatt	ttcaataact	tattggtgct	gaaattgttc	actagctgtg	gtctgacct	4020
gttaatttac	aaatacagat	tgaataggac	ctactagagc	agcatttata	gagtttgatg	4080
gcaaatagat	taggcagaac	ttcatctaaa	atattccttag	taaataatgt	tgacacgttt	4140
tccatacctt	gtcagtttca	ttcaacaatt	tttaaatttt	taacaaagct	cttaggattt	4200
acacatttat	atttaaacat	tgatatatag	agtattgatt	gattgctcat	aagttaaatt	4260
ggtaaagtta	gagacaacta	ttctaacacc	tcaccattga	aatttatatg	ccaccttgtc	4320
ttcataaaa	gctgaaaatt	gttacctaaa	atgaaaatca	acttcatggt	ttgaagatag	4380
ttataaatat	tgttctttgt	tacaatttcg	ggcaccgcat	attaaaacgt	aactttattg	4440
ttccaatatg	taacatggag	ggccagggtca	taaataatga	cattataatg	ggcttttgca	4500
ctgttattat	ttttctttg	gaatgtgaag	gtctgaatga	gggttttgat	tttgaatggt	4560
tcaatgtttt	tgagaagcct	tgcttacatt	ttatggtgta	gtcattggaa	atggaaaaat	4620
ggcattatat	atattatata	tataaatata	tattatacat	actctcctta	ctttatttca	4680
gttaccatcc	ccatagaatt	tgacaagaat	tgctatgact	gaaaggtttt	cgagtcctaa	4740
ttaaaacttt	atztatggca	gtattcataa	ttagcctgaa	atgcattctg	taggtaatct	4800
ctgagtttct	ggaatatttt	cttagacttt	ttggatgtgc	agcagcttac	atgtctgaag	4860

ES 2 623 393 T3

ttacttgaag	gcatcacttt	taagaaagct	tacagttggg	ccctgtacca	tccaagtcc	4920
ttttagctc	ctcttgaaca	tgtttgccat	acttttaaaa	gggtagttga	ataaatagca	4980
tcaccattct	ttgctgtggc	acaggttata	aacttaagtg	gagtttaccg	gcagcatcaa	5040
atgtttcagc	tttaaaaaat	aaaagtaggg	tacaagttta	atgttttagtt	ctagaaattt	5100
tgtgcaatat	gttcataacg	atggctgtgg	ttgccacaaa	gtgcctcgtt	tacctttaa	5160
tactgttaat	gtgtcatgca	tgcagatgga	aggggtggaa	ctgtgacta	aagtgggggc	5220
tttaactgta	gtatttgga	gagttgcctt	ctacctgcca	gttcaaaagt	tcaacctggt	5280
ttcatataga	atatatatac	taaaaaattt	cagtctgtta	aacagcctta	ctctgattca	5340
gcctcttcag	atactcttgt	gctgtgcagc	agtggctctg	tgtgtaaagt	ctatgcactg	5400
aggatacaca	aaaataccaa	tatgatgtgt	acaggataat	gcctcatccc	aatcagatgt	5460
ccatttgta	ttgtgtttgt	taacaaccct	ttatctctta	gtgttataaa	ctccacttaa	5520
aactgattaa	agtctcattc	ttgtcaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aa	5572

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado, cuya secuencia consta de la secuencia de restos de aminoácidos 1 a 576 de SEQ ID NO: 1 para su uso en el tratamiento de un tumor sólido.
- 5 2. El polipéptido aislado para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el tumor sólido es cáncer del tracto biliar, de cerebro, de mama, de cervix, de colon, de endometrio, esofágico, gástrico, de hígado, de pulmón, oral, de ovario, de páncreas, de próstata, colorrectal, de piel, testicular, tiroideo o renal, o coriocarcinoma, neoplasma intraepitelial, linfoma, neuroblastoma o sarcoma.
- 10 3. Uso de un polipéptido aislado en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un tumor sólido en un sujeto, en el que la secuencia del polipéptido consiste en la secuencia de restos de aminoácidos 1-576 de SEQ ID NO: 1.
- 15 4. El uso de la reivindicación 3, en el que el tumor sólido es cáncer del tracto biliar, de cerebro, de mama, de cervix, de colon, de endometrio, esofágico, gástrico, de hígado, de pulmón, oral, de ovario, de páncreas, de próstata, colorrectal, de piel, testicular, tiroideo o renal, o coriocarcinoma, neoplasma intraepitelial, linfoma, neuroblastoma o sarcoma.

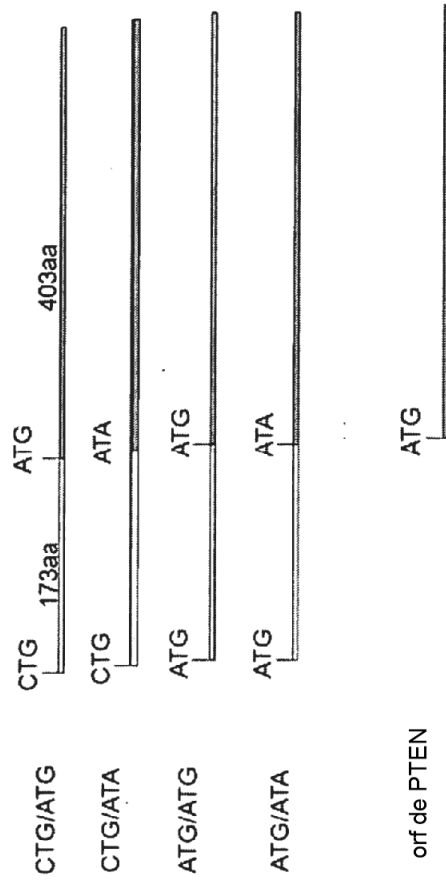


Fig. 1

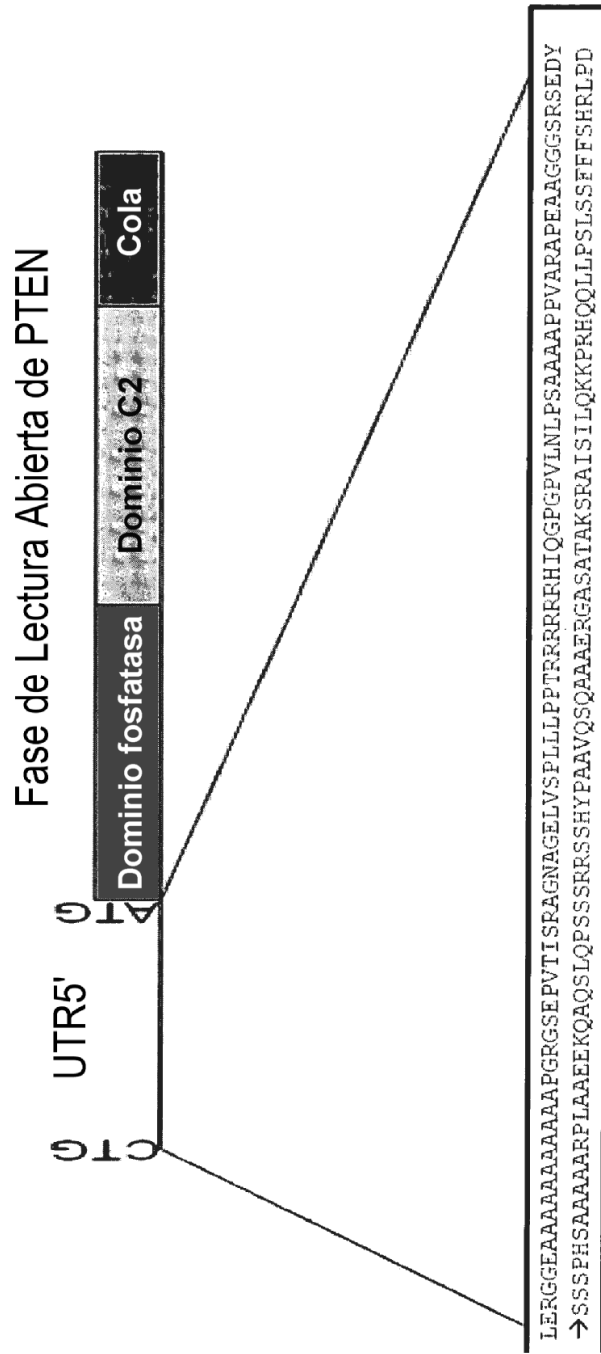


Fig. 2

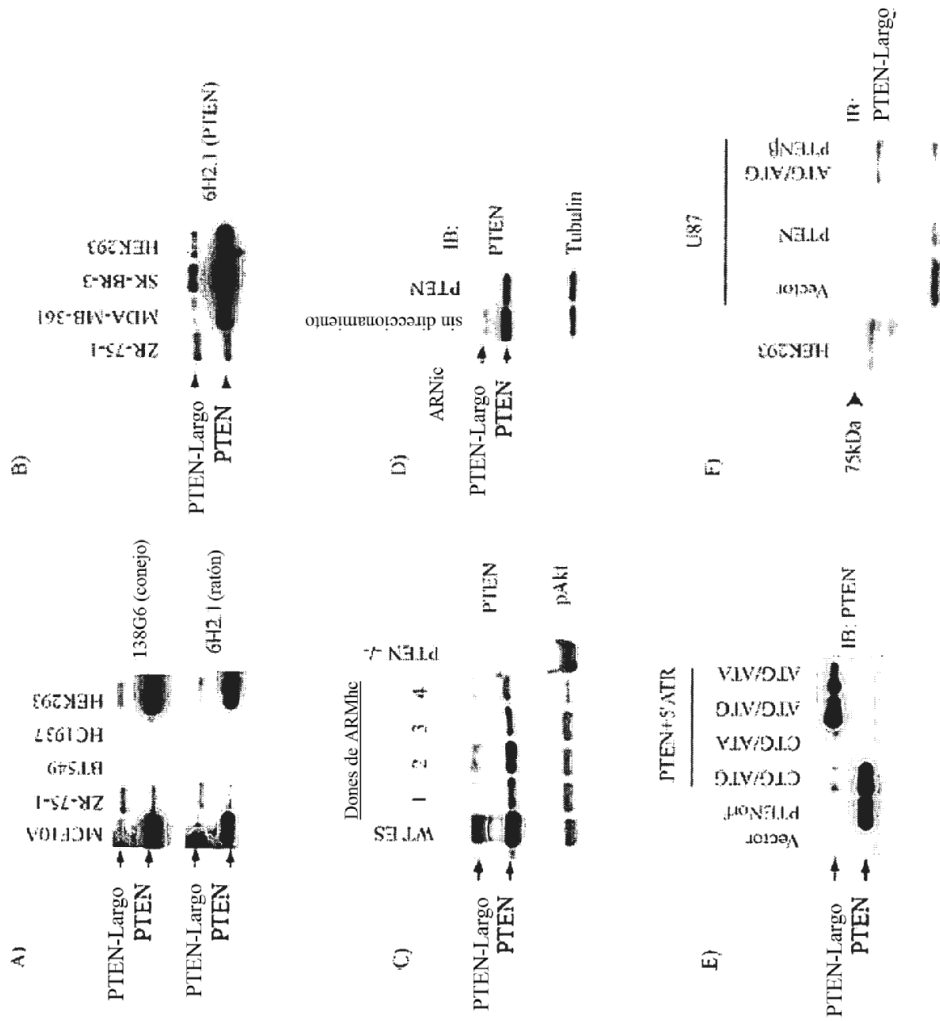


Fig. 4

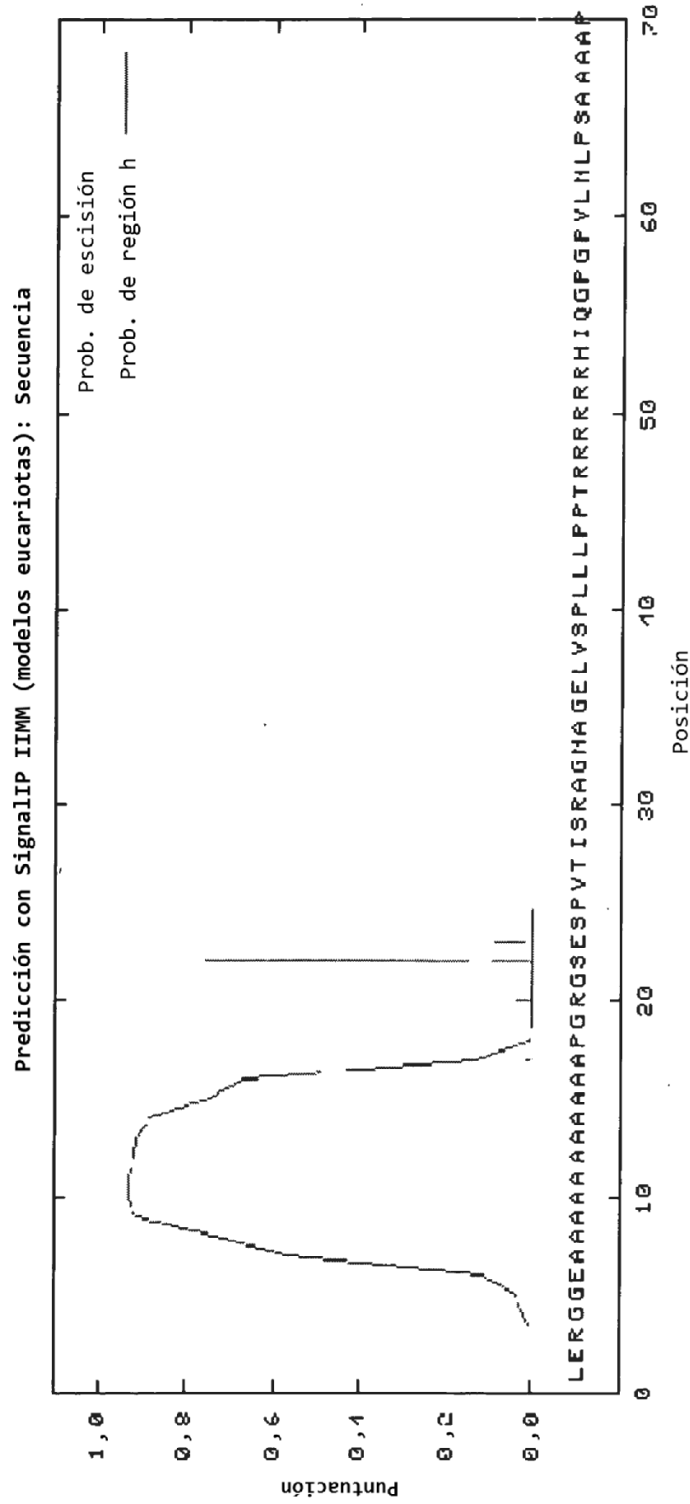


Fig. 5

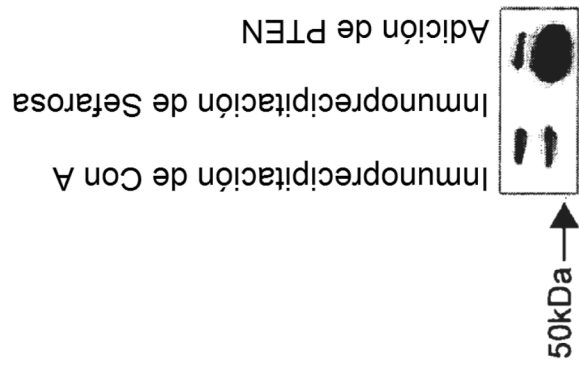


Fig. 6

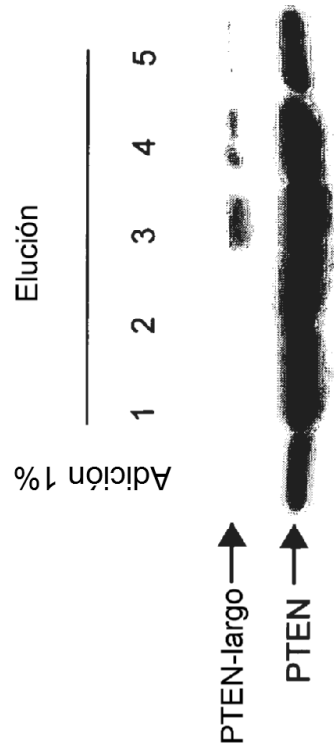


Fig. 7

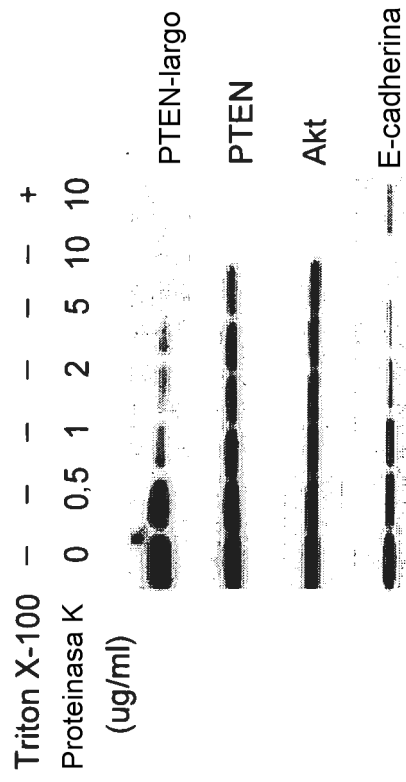


Fig. 8

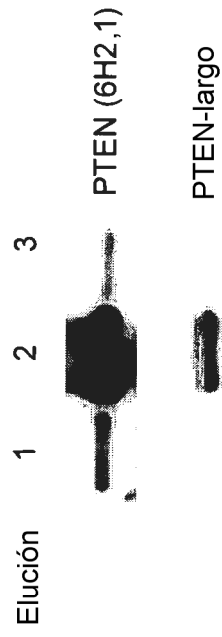


Fig. 9

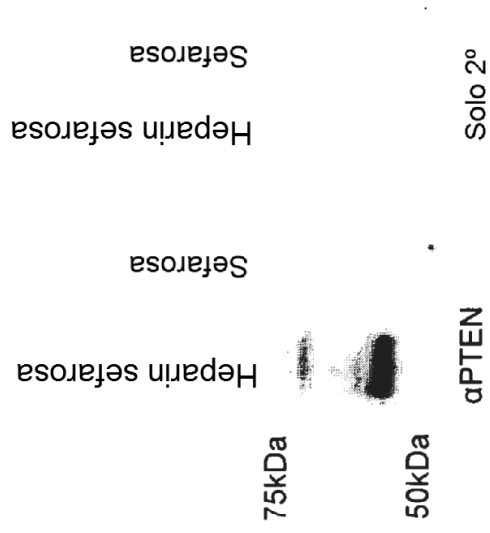


Fig. 10

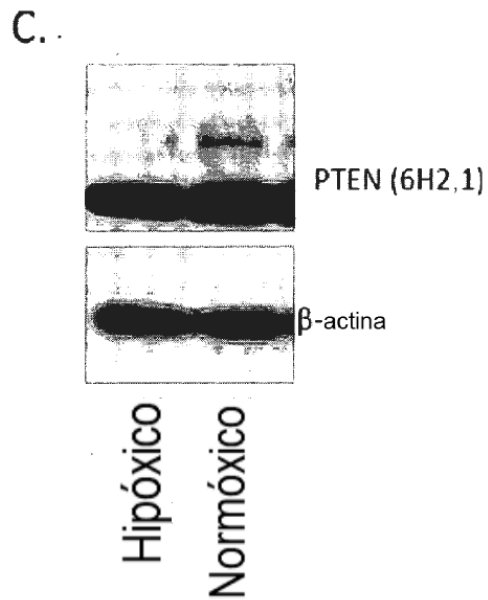
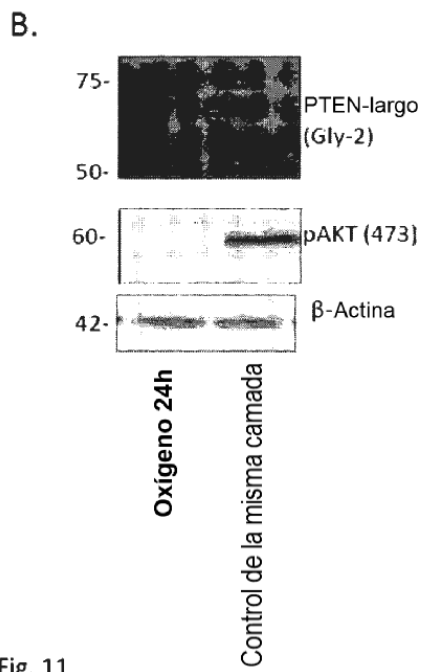
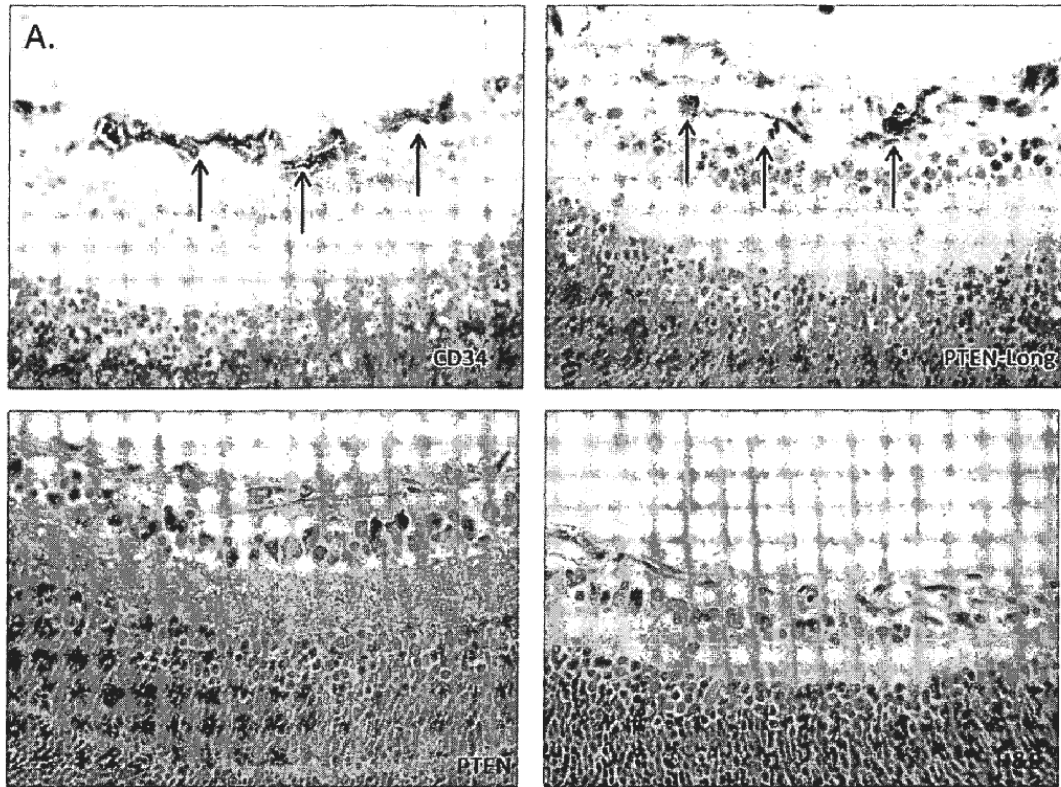


Fig. 11

Células MCF10a Tratadas con Proteínas Purificadas durante 24h como se indica

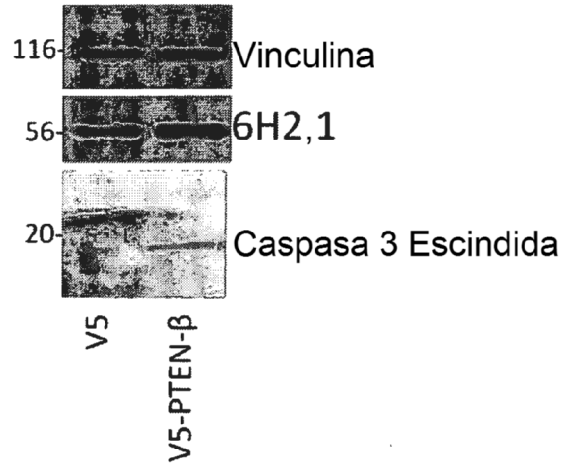


Fig. 12

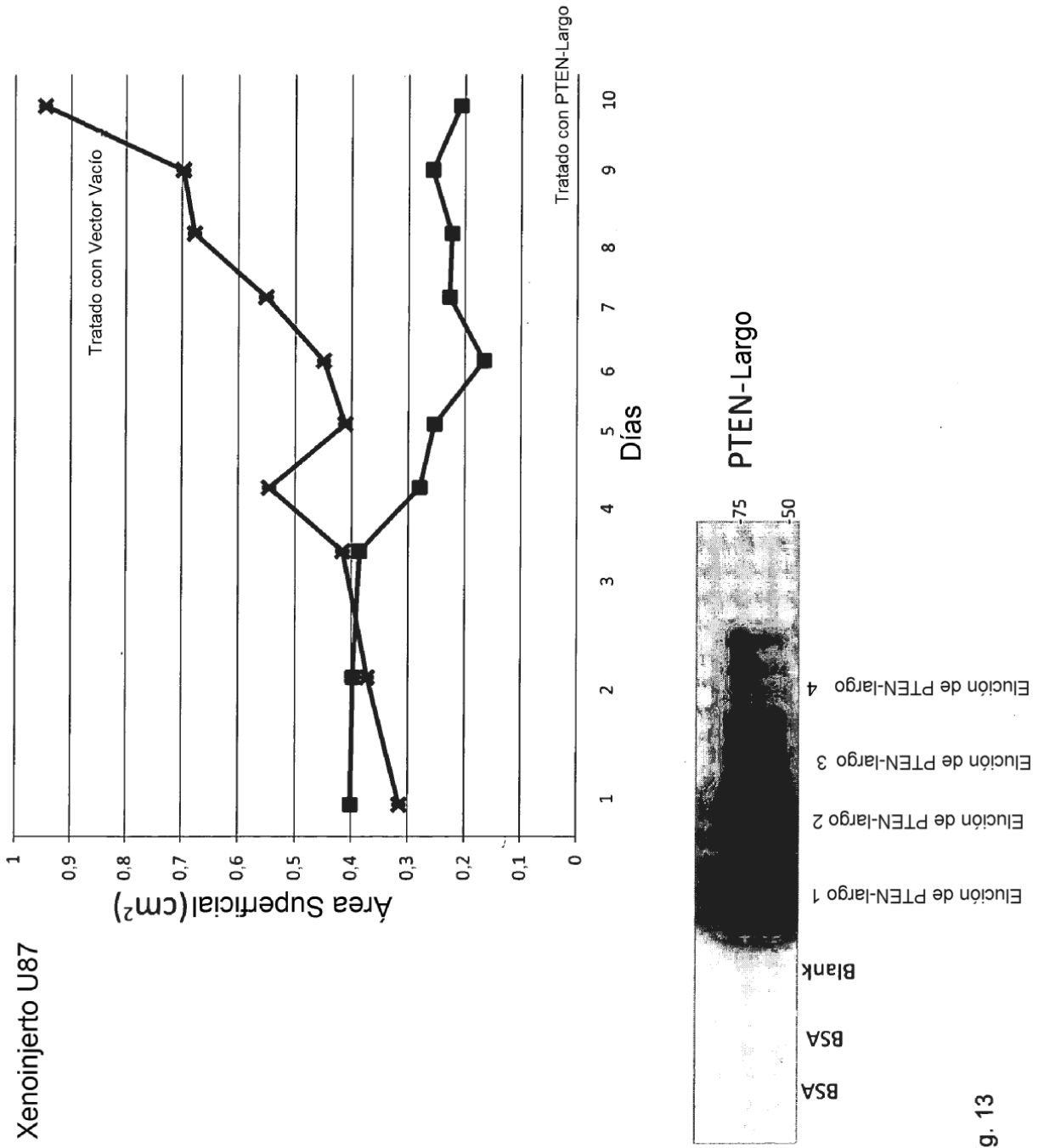


Fig. 13

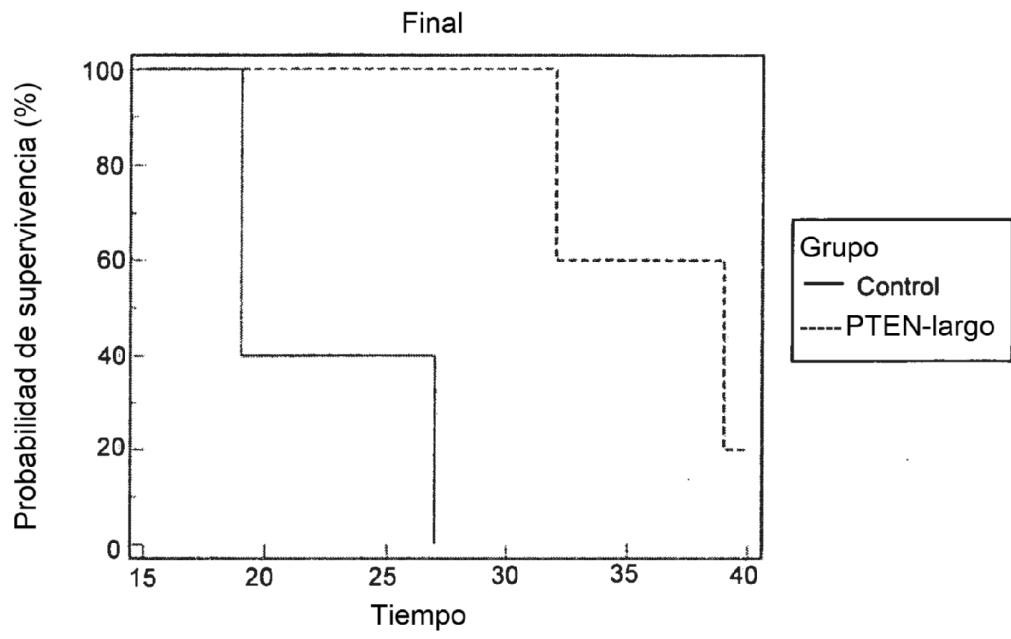


Fig. 14

Ensayo de fosfatasa

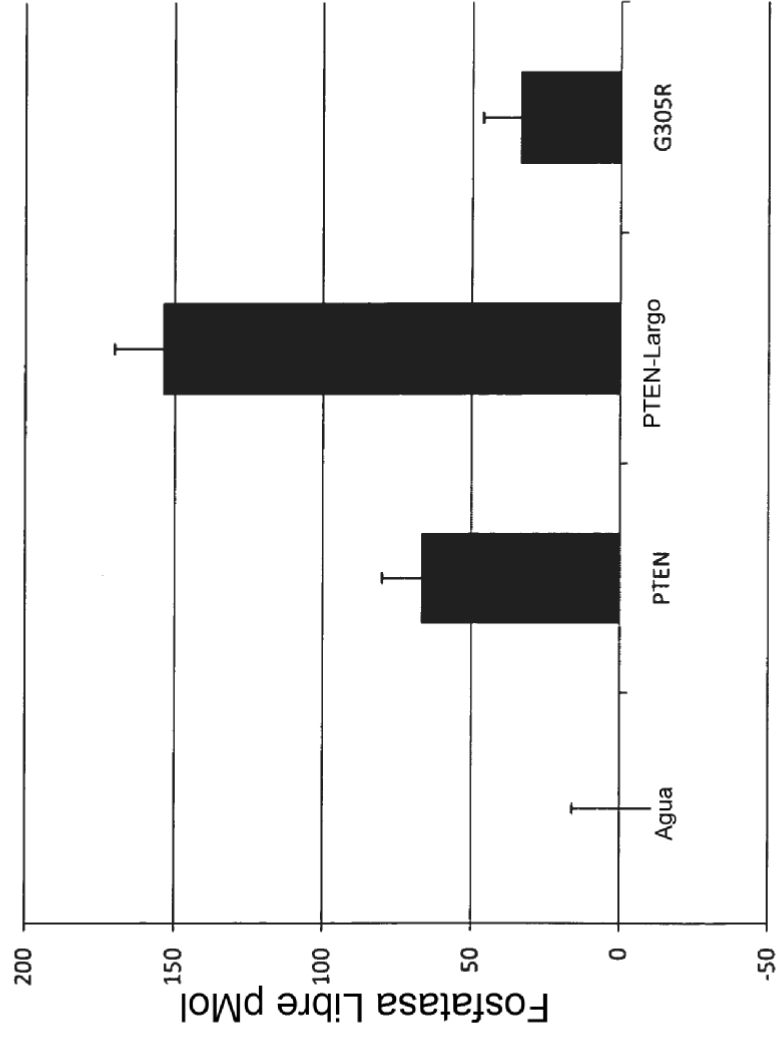


Fig. 15

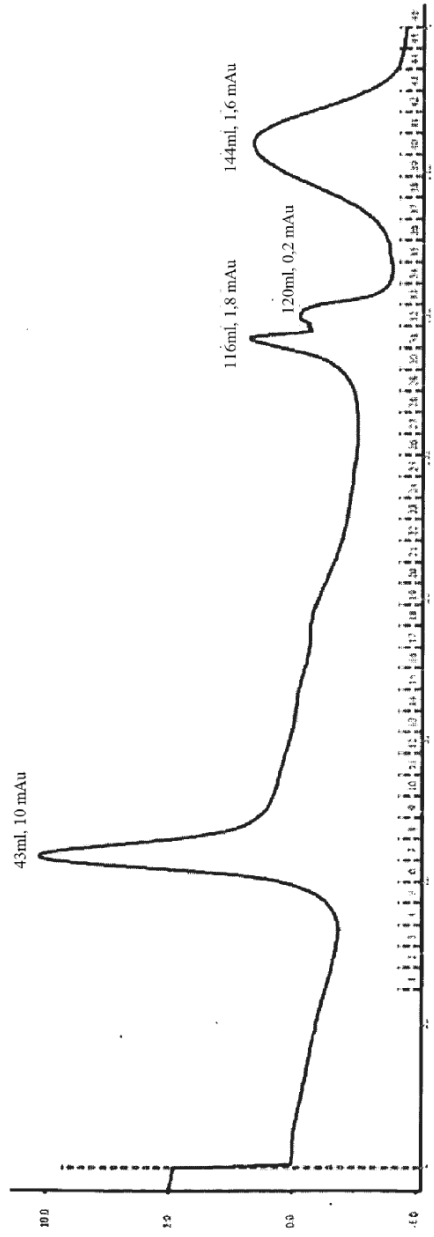
PTEN-Largo de Longitud Completa



Región Funcional Mínima Esperada (numerada en fase PTEN-largo)



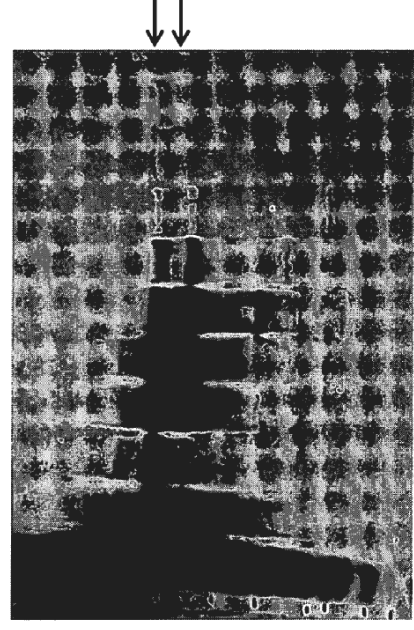
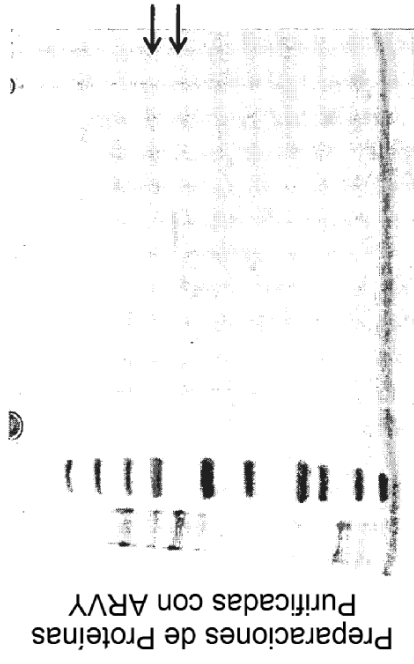
Fig. 16



Fraciones de Elución por Filtración con Gel PM Inicial

PM kDa 7 10 13 15 18 21 24 30

PM kDa 7 10 13 15 18 21 24 30



Lote 1a: Fracciones 3-9 (especies de PM alto), 0,328mg, 0,47mg/ml

Lote 1b: Fracciones 10-17 (especies de PM más bajo más productos de degradación), 0,37mg, 0,41mg/ml

Fig. 17

Purificadas con ARVY

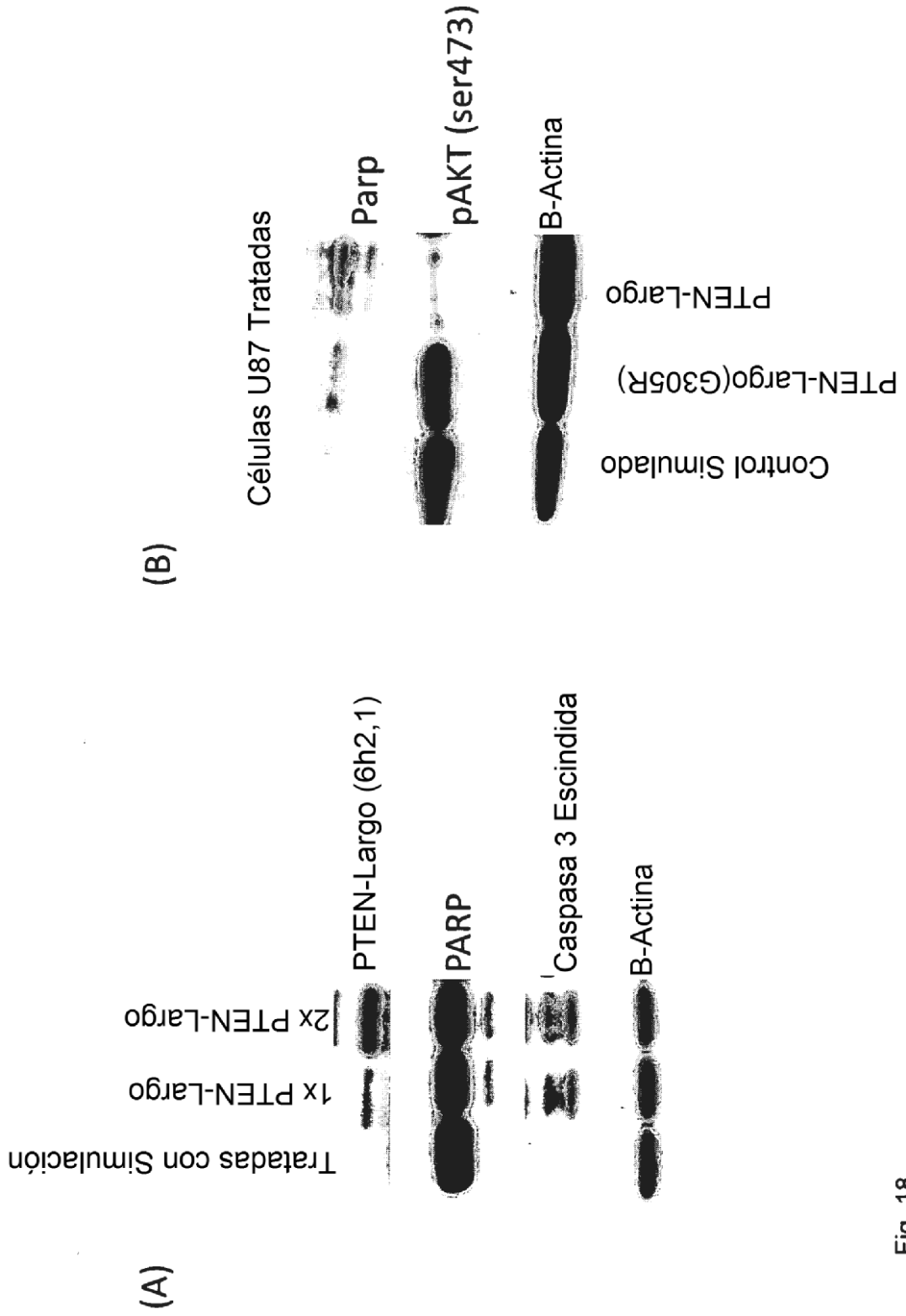


Fig. 18

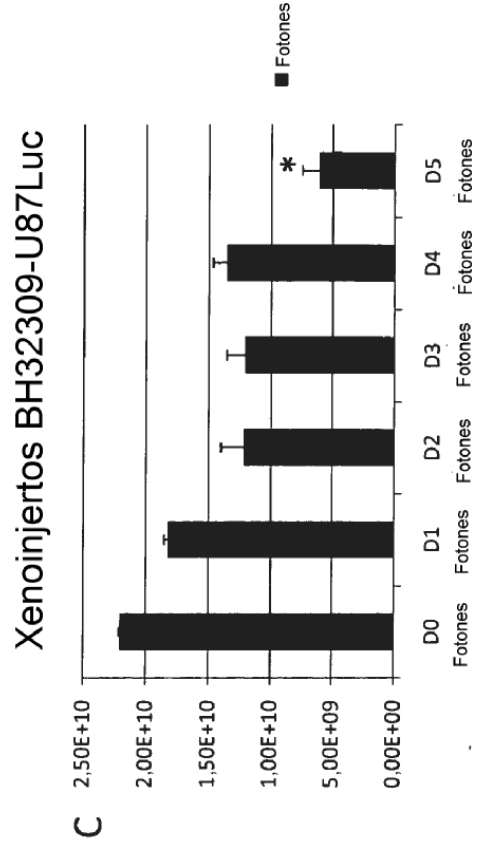
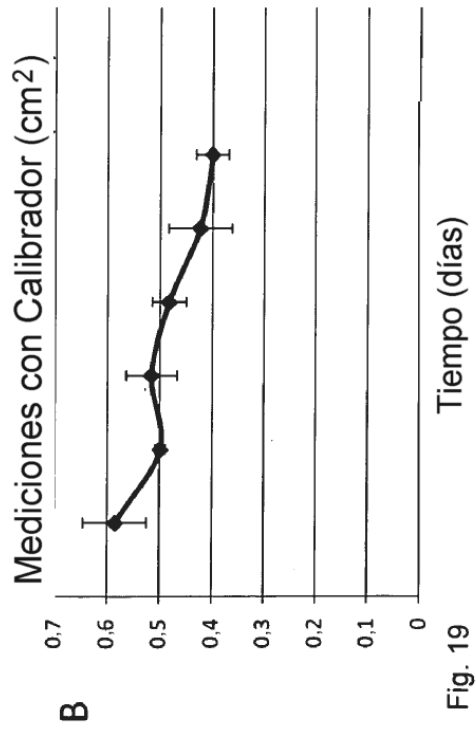
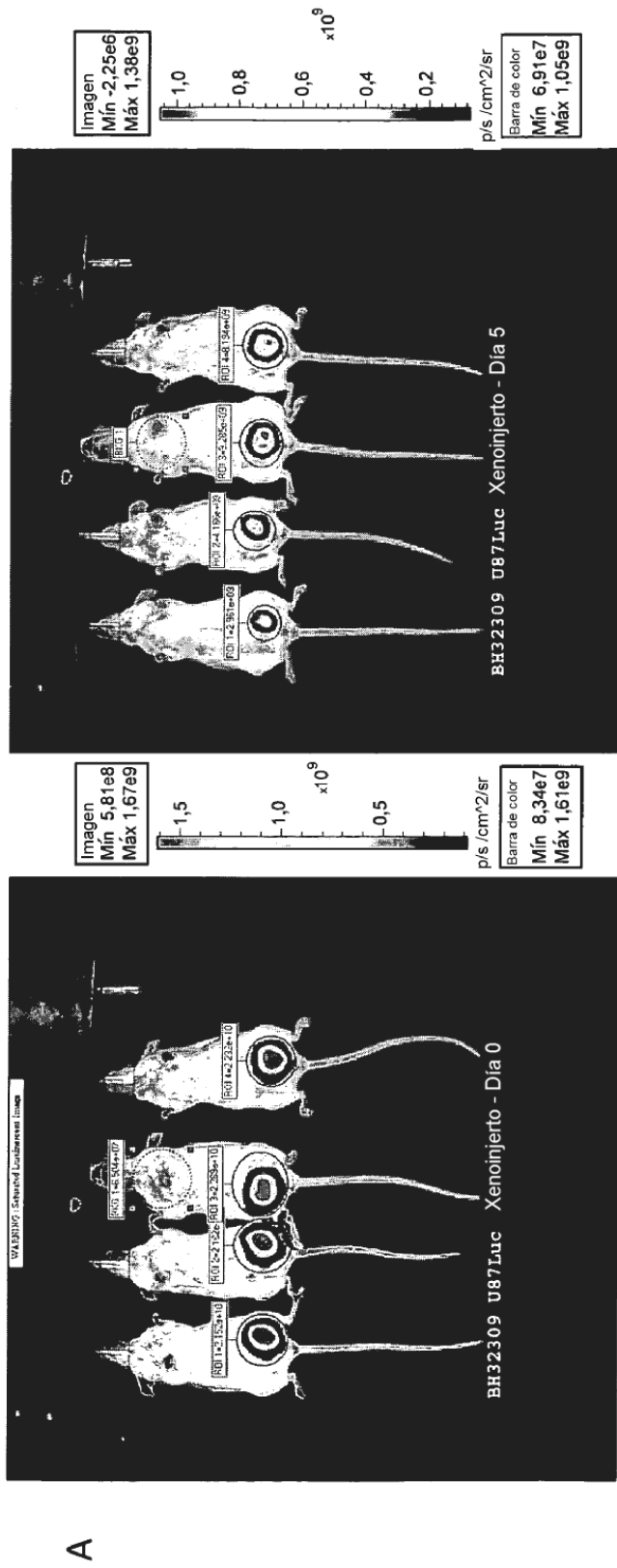


Fig. 19

Las células U87Mg cambian en expresión luciferasa después de 5 días de tratamiento como se indica

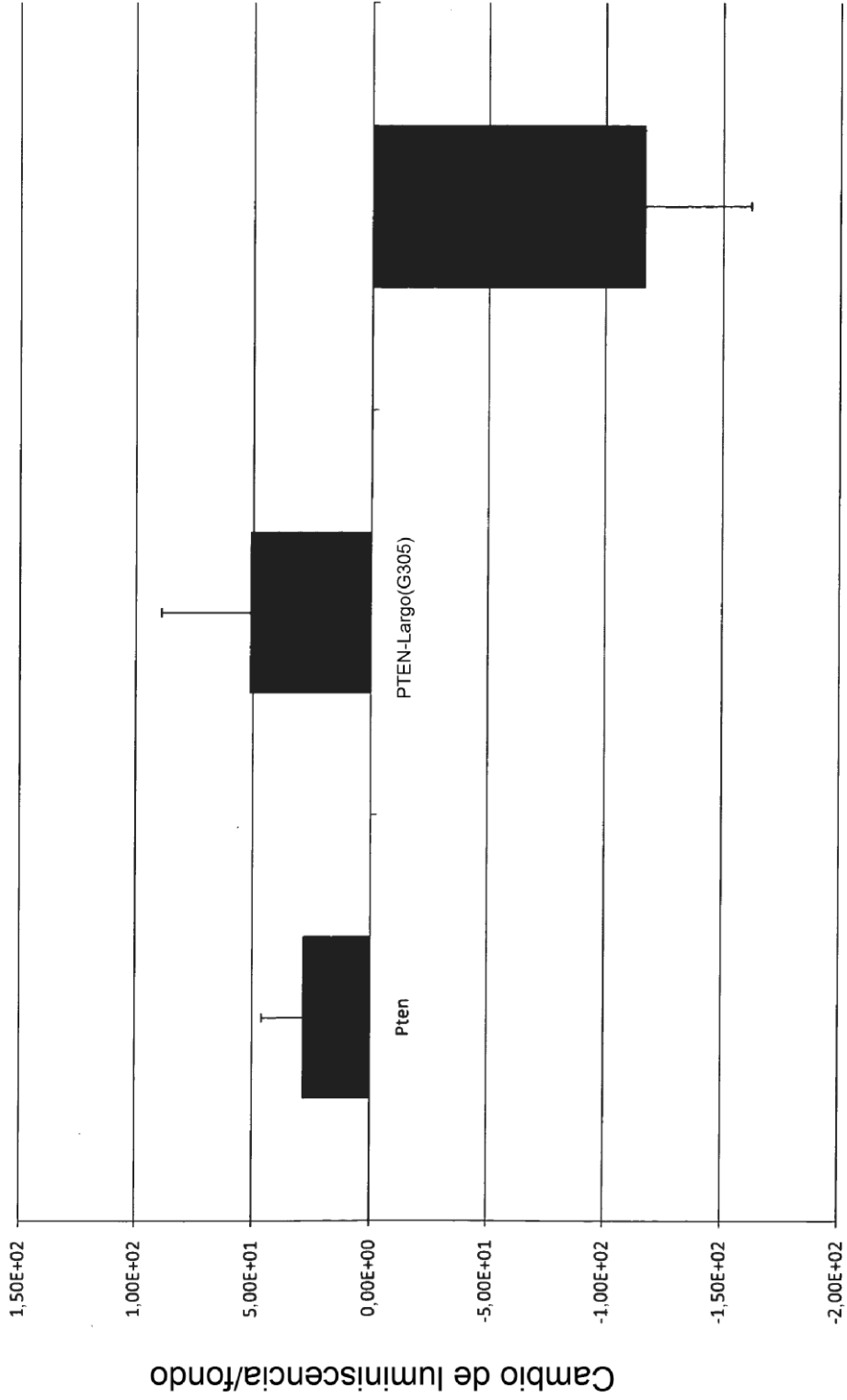


Fig. 20

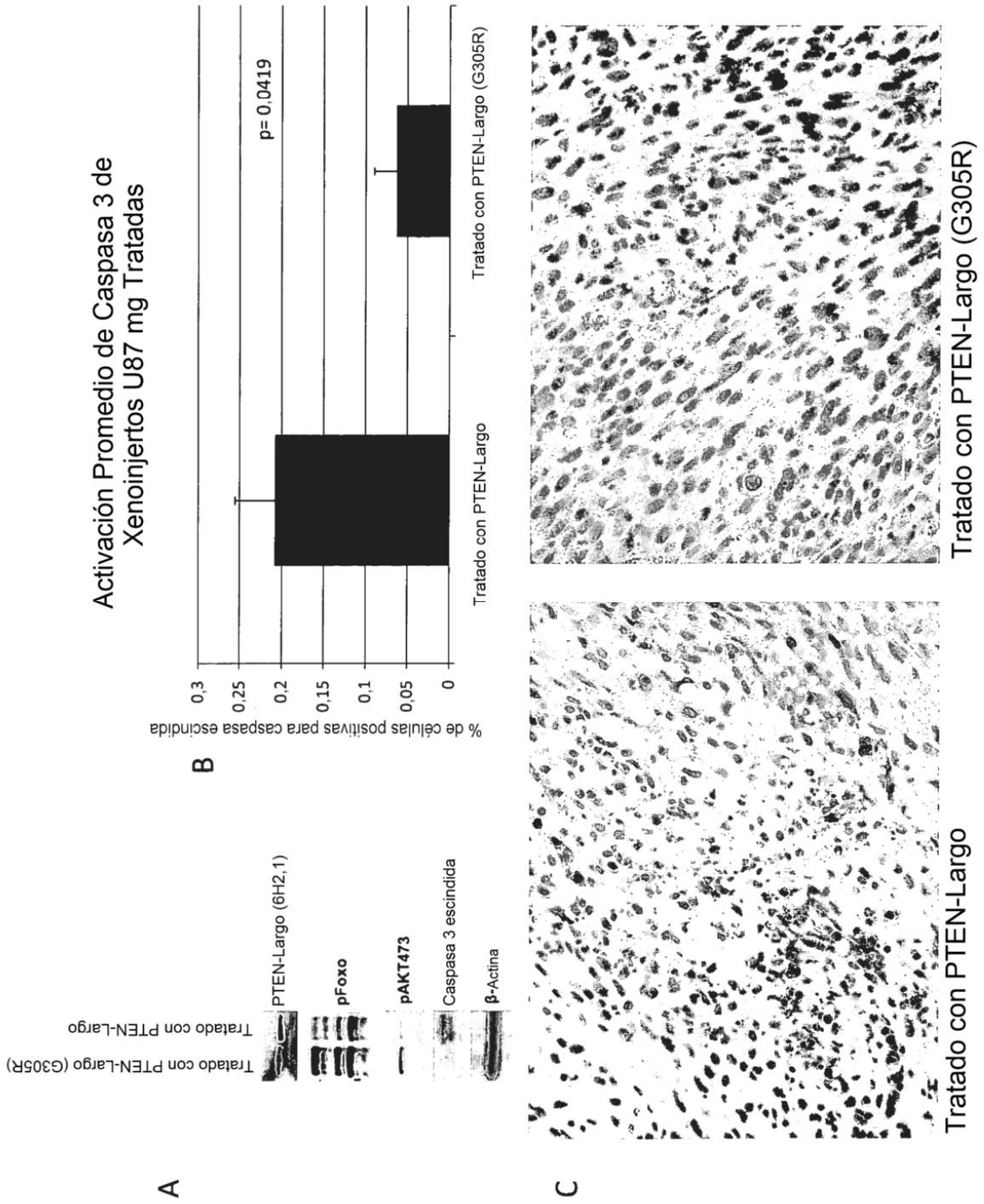


Fig. 21

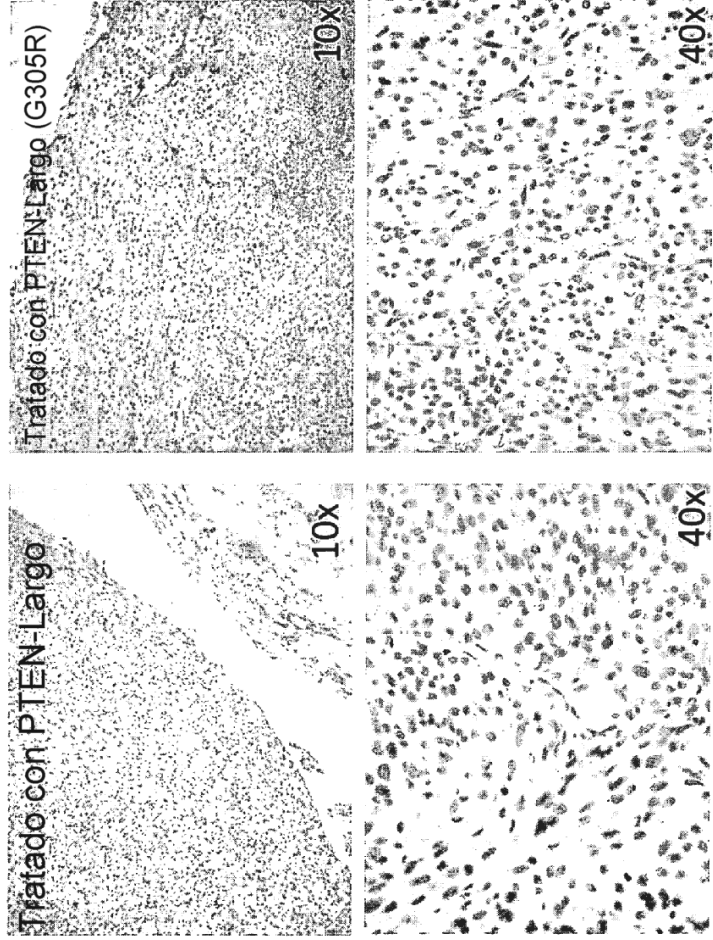
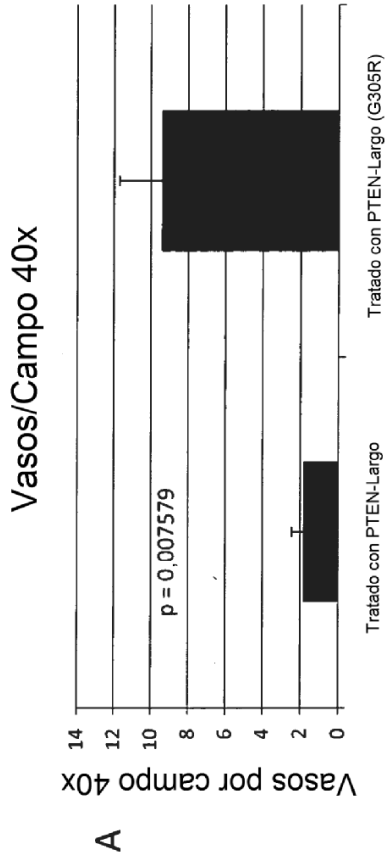
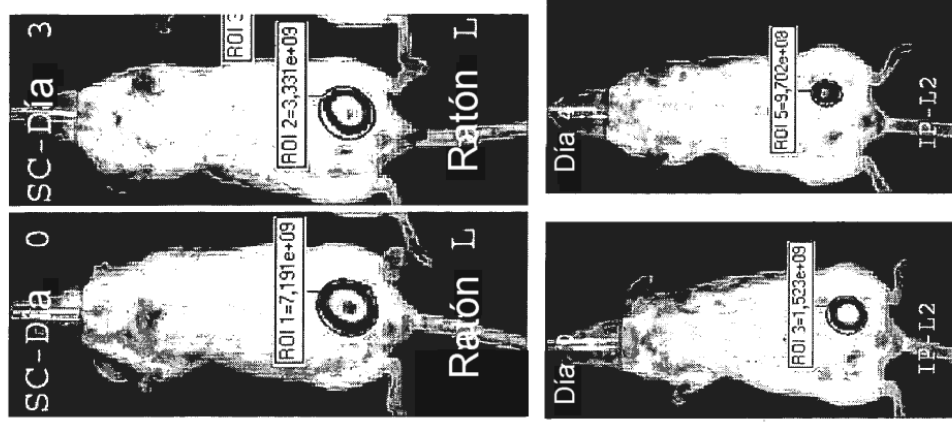


Fig. 22

Método de inyección de células U87



B
Cambio Promedio en Área Tumoral (cm²)
Después de 4 Días de Tratamiento

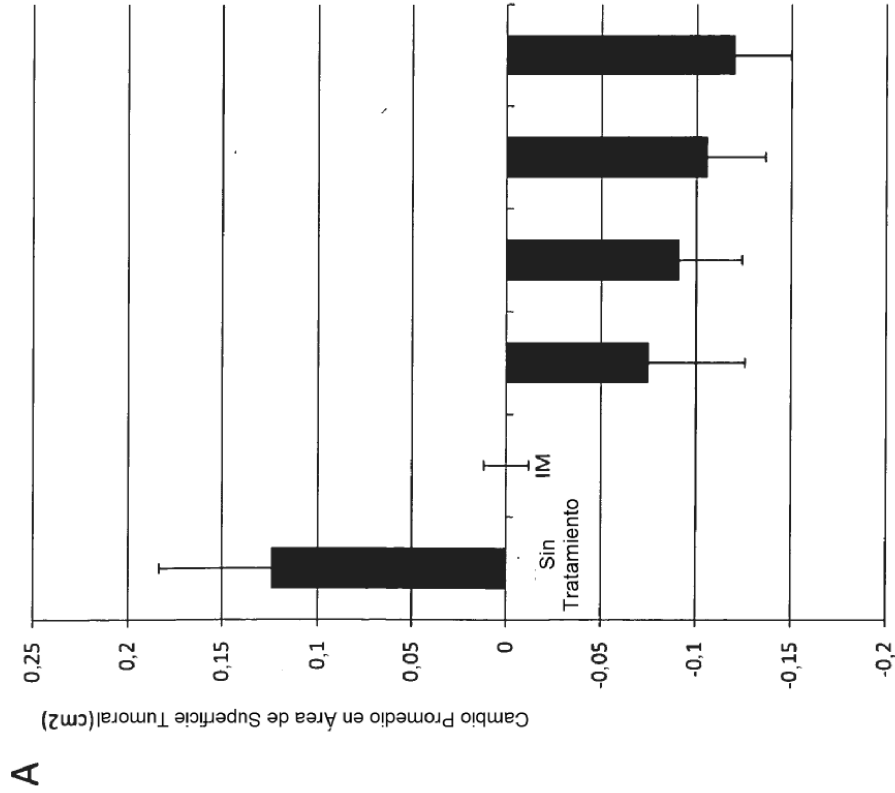


Fig. 23

Respuestas a Xenoinjertos

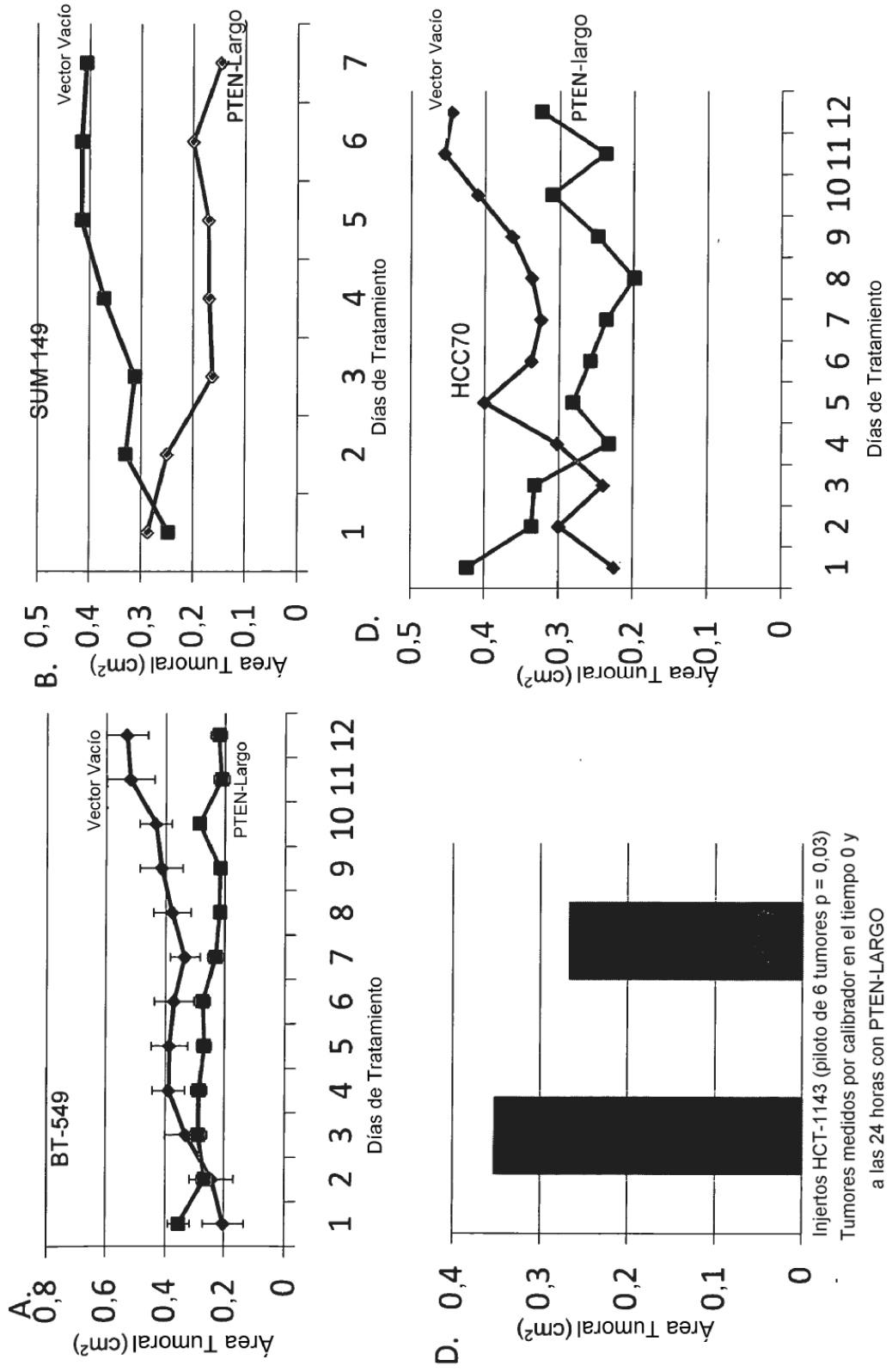


Fig. 24

Vector* es vector vacío es un control preparado de células que sobreexpresan PTEN no marcado

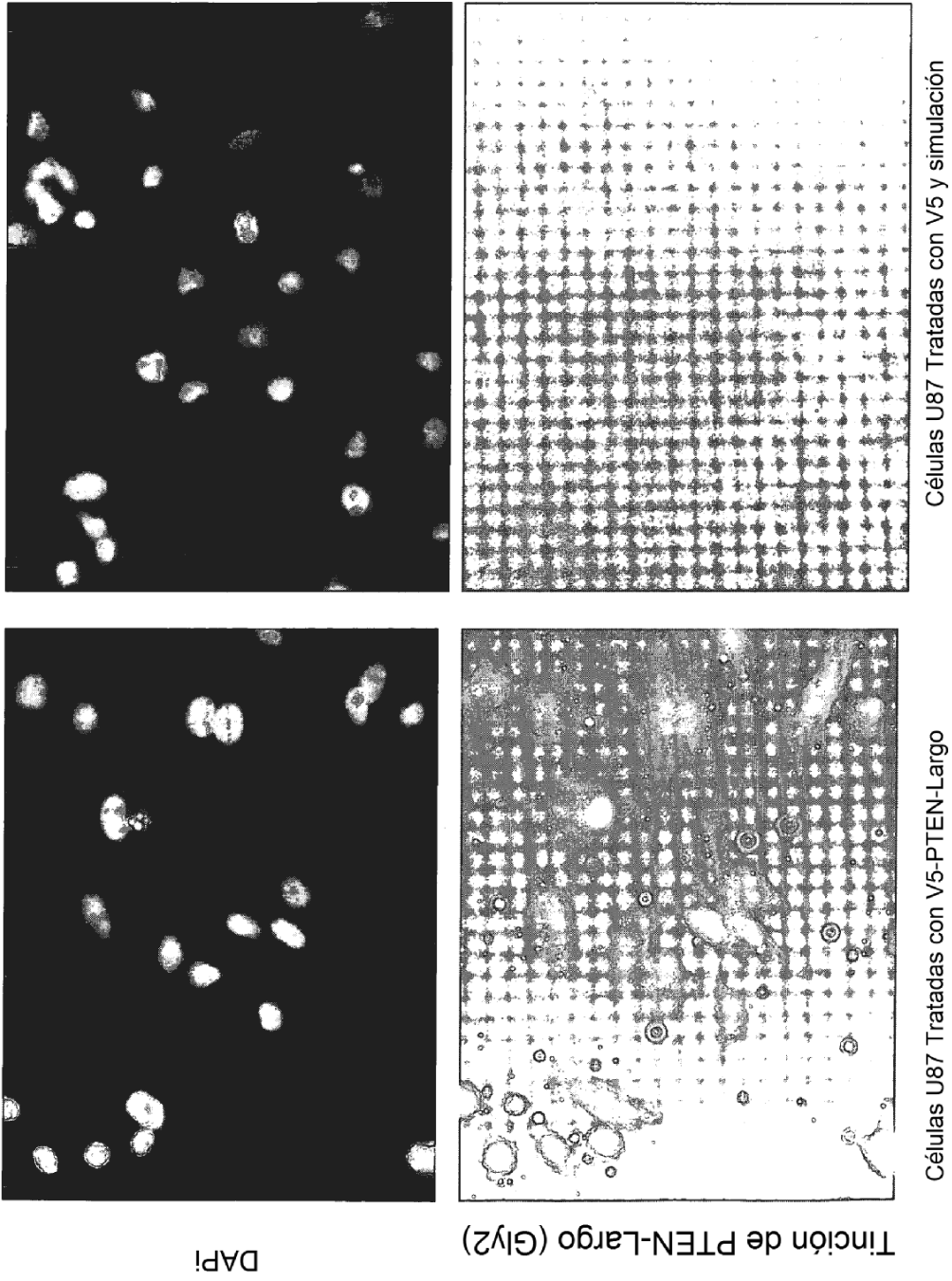


Fig. 25

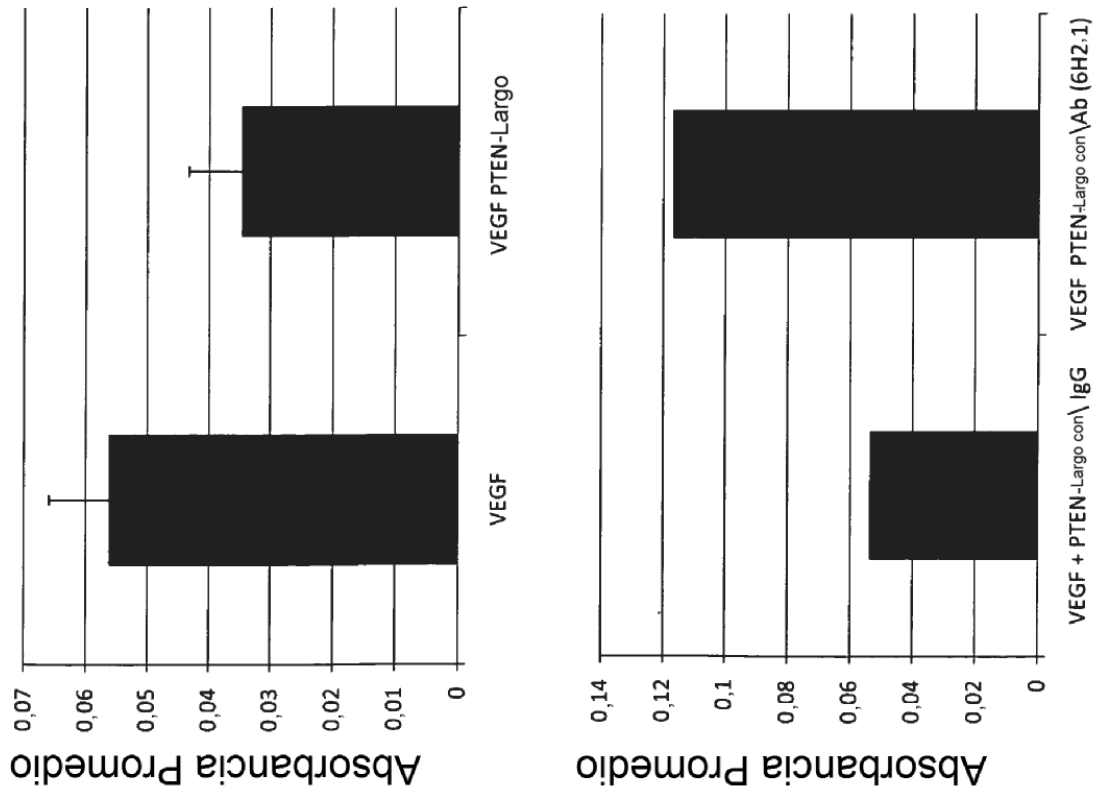


Fig. 26