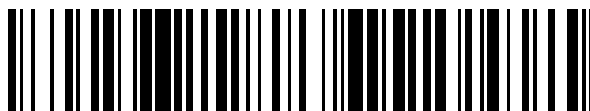


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 708 750**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.06.2014 PCT/EP2014/062251**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.12.2014 WO14198833**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2014 E 14736649 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.10.2018 EP 3008185**

54 Título: **Secuencias de miARN de TTV como marcador temprano para el desarrollo futuro de cáncer y como diana para el tratamiento y la prevención del cáncer**

30 Prioridad:

14.06.2013 EP 13003062

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

11.04.2019

73 Titular/es:

**DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM
(100.0%)
Im Neuenheimer Feld 280
69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**ZUR-HAUSEN, HARALD;
DE VILLIERS, ETHEL-MICHELE;
CID-ARREGUI, ANGEL y
SARACHAGA DE BENITO, VICTOR**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 708 750 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

Secuencias de miARN de TTV como marcador temprano para el desarrollo futuro de cáncer y como diana para el tratamiento y la prevención del cáncer

5 La presente invención se refiere a miARN de TTV, así como a sondas y cebadores que comprenden parte de dicho poli(ácido nucleico) de miARN de TTV. Finalmente, la presente invención se refiere al uso de dichos compuestos como un marcador temprano de un futuro desarrollo del cáncer.

10 El virus torque teno (TTV) es una especie de virus perteneciente a la familia Anelloviridae, género Alphatorquevirus. Los virus clasificados en esta especie presentan un genoma de ADN circular monocatenario (ADNs) de 3,7-3,8 Kb de longitud, y no tienen envuelta [2, 3]. Fueron descubiertos por primera vez en 1997 en un paciente que presentaba hepatitis no A a G después de una transfusión [1]. Se observa una alta divergencia en la secuencia de nucleótidos entre diferentes cepas de TTV, alcanzando en algunos casos más de un 70%. Aunque la organización genómica es también variable, todos ellos contienen una región no codificante, que abarca 1,2 Kb [22]. Se ha demostrado que la región no codificante alberga un promotor en su extremo 3' [4] y una región altamente conservada de 70 pb dentro de ese extremo 3' se cree que es el origen de replicación de los virus. Se estima que más del 90% de los seres humanos están infectados con una o varias cepas de TTV. La cantidad de diferentes cepas aisladas (más de 200), su ubicuidad y la falta de técnicas fiables y sencillas para diferenciarlas entre sí, han hecho que sea difícil obtener una evidencia epidemiológica suficiente que apoye una relación causal entre una infección con TTV y una enfermedad específica [23-28]. Los virus TTV son conocidos por infectar diversos tejidos humanos [21]. Están disponibles unos datos limitados sobre el ciclo de replicación, e incluso menos sobre la función de las proteínas codificadas por estos virus.

20 El documento EP 2 399 928 describe una molécula quimérica de una región altamente conservada de TTV de 71 bases (HCR), y secuencias de ADN celular en líneas celulares de cáncer humano e inmortalizadas que se pueden utilizar para el diagnóstico, la prevención y el tratamiento del cáncer y la autoinmunidad.

25 Los micro ARN (miARN) son moléculas pequeñas de ARN que oscilan entre 19 y 29 nt y por lo general 22 nt de longitud. Median en el silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) mediante la inducción de una escisión, desestabilización o inhibición de la traducción de un ARN mensajero diana (ARNm) [9, 10, 11, 12]. Lo hacen guiando el complejo RISC hacia un ARNm concreto, interaccionando con él mediante el emparejamiento de bases. Se cree que esta interacción está mediada principalmente por un emparejamiento perfecto entre la región 3' no traducida del ARNm diana (UTR) y el miARN "semilla" (nucleótidos de 2 a 7) [7, 8, 80]. En contraste, hallazgos recientes sugieren que los emparejamientos no perfectos (sin emparejamiento de Watson y Crick o semillas que contienen un desemparejamiento) en esta región son más abundantes que los emparejamientos perfectos [6]. El mismo estudio sugiere que los emparejamientos de miARN-ARNm en secuencias codificantes (CDS) son tan abundantes como los de las 3'UTR. Por otra parte, se demuestra que algunos miARN tienden a hibridarse con ARNm en una región totalmente diferente de la región semilla, y que todavía son capaces de ejercer PTGS. Para aumentar aún más la complejidad de la regulación de la expresión génica basada en miARN, en los últimos años han aparecido algunos ejemplos de silenciamiento génico transcripcional (TGS) y activación génica transcripcional (conocida como activación del ARN (ARNa)) mediados por miARN [29-33]. Si bien los mecanismos que median en estos dos eventos son aún poco conocidos, no se descarta que el TGS y el ARNa sean características generales de algunos miARN. El número de miARN humanos endógenos conocidos ha aumentado muy rápidamente en los últimos años. El número de miARN maduros registrados en la miRBase es 2042 [13-16]. Adicionalmente, también se ha mostrado que una gran cantidad de miARN codificados de forma vírica utiliza la maquinaria celular de silenciamiento del miARN. Desde el descubrimiento del primer miARN humano codificado de forma vírica [5] su número ha aumentado a 157 [13-16]. La mayoría de estos miARN están codificados por virus de ADN, especialmente los que pertenecen a las familias Herpesviridae y Polyomaviridae. Recientemente, se ha informado de que un virus de ARN oncogénico bovino (virus de la leucemia bovina) codifica 8 miARN maduros, lo que demuestra que este tipo de virus también los puede expresar. A pesar del gran número de miARN víricos descubiertos, la función de la mayor parte de ellos sigue siendo imprecisa, aunque en los últimos años algunas publicaciones han arrojado luz sobre este tema. Por ejemplo, los miARN codificados por los virus Polyoma y del herpes han demostrado que ayudan a estos virus a escapar de la respuesta inmune del hospedador, mediante una regulación de la expresión proteica vírica [17] o del hospedador [18, 19]. Otro hallazgo importante se ha realizado hace algunos meses cuando se demostró que los miARN codificados por el virus Epstein-Barr son adecuados para transformar células por sí mismos [20], lo que sugiere que los miARN víricos podrían ser capaces de mediar en un proceso oncogénico en condiciones adecuadas. Los miARN codificados por virus y sus funciones han sido revisados en Kincaid R.P., Sullivan C.S. (2012) PLOS Pathogens, vol. 8, nº 12, página e1003018. Muy recientemente, se ha mostrado que los TTV codifican miARN, y se demostró el papel de uno de estos miARN en la inhibición de la señalización del interferón [78].

60 El gen APC (*Adenomatous Polyposis coli*) es un supresor tumoral muy importante, especialmente en el contexto del cáncer colorrectal. Prácticamente todos los cánceres colorrectales son portadores de mutaciones que inactivan el APC o cambios epigenéticos que inactivan la transcripción de este gen. Su actividad supresora de tumores se cree que está mediada por su función en la inhibición de la señalización de wnt, aunque también se ha implicado en la migración y el ensamblaje correcto del huso mitótico.

El problema técnico subyacente de la presente invención es proporcionar medios (o marcadores) para el diagnóstico del cáncer o el diagnóstico de una predisposición a dicha enfermedad. Otro problema técnico es proporcionar medios para prevenir el desarrollo del cáncer y la recidiva del cáncer mediante la inhibición de una diana específica.

5 La solución de dicho problema técnico se consigue proporcionando las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

Se conocen pocos aspectos relacionados con la interacción entre los TTV y su hospedador. En los estudios que dan lugar a la presente invención, se aclaró que TTV codifica miARN, y su importancia para la infección y la patogenicidad de TTV, centrándose principalmente en su posible papel en el cáncer. Se proporciona una evidencia que apoya la expresión de cuatro pre-miARN a través de una cepa de TTV (TTV-HD14a) (Figura 1A-B). El miARN se transcribe a partir de la región no codificante del virus, en ambas orientaciones sentido y antisentido (del inglés, "sense and antisense"). También se ha podido demostrar que algunos miARN codificados en ambas orientaciones pueden, directa o indirectamente, regular a la baja al supresor tumoral Adenomatous Polyposis Coli (APC) a nivel de ARNm. Sorprendentemente, los inventores han identificado una relación entre TTV-HD14a y una regulación de la supresión de tumores y este hallazgo sugiere un papel de TTV-HD14a en el desarrollo del cáncer. Este trabajo representa el primer vínculo molecular entre TTV y el cáncer. Por otra parte, se informa por primera vez de la expresión de miARN a través de un virus de ADN circular que infectar a los seres humanos.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Organización genómica de TTV-HD14a y ubicación del pre-miARN

20 **(A)** TTV-HD14a. Los números sobre las líneas indican el número de nucleótido. NCR - región no codificante. **(B)** Detalles de la región no codificante. Los números indican el número de nucleótido. Las horquillas sobre la línea indican el pre-miARN codificado en la orientación sentido. Las horquillas debajo de la línea indican el pre-miARN codificado en la orientación antisentido. Los nombres por encima y por debajo de las horquillas son los nombres dados a los pre-miARN.

25 Figura 2: Representación esquemática de los plásmidos usados para la transfección y las transferencias Northern que muestra el pre-miARN y el miARN maduro

30 **(A)** Representación esquemática de los plásmidos que contienen el promotor de CMV y la región no codificante (NCR) en la orientación sentido (+) o antisentido (-). Las estructuras artificiales se denominan pCDNA3.1(+)-TTV-HD14a-NCR-Sense y pCDNA3.1(+)-TTV-HD14a-NCR-AntiSense, respectivamente. Los números por encima y por debajo de las líneas indican el número de nucleótido. Las horquillas y las líneas verticales indican el pre-miARN en la orientación sentido o antisentido. Los nombres de los pre-miARN se escriben debajo de las líneas.

35 **(B-E)** Transferencias Northern que muestran los resultados con las sondas y las transfecciones indicadas (Sentido - células HEK293TT transfectadas con pCDNA3.1(+)-TTV-HD14a-NCR-Sense. Anti-sentido - células HEK293TT transfectadas con pCDNA3.1(+)-TTV-HD14a-NCR-AntiSense. Simulado - células HEK293TT transfectadas con pCDNA3.1(+)). Las secuencias de las sondas se indican en la Tabla 4.

Figura 3: Complementariedad de TTV-HD14a-mir-2-5p con ARNm de APC y TTV-HD14a-ASmir-2-3p con los promotores de APC y ARNm de APC regulado a la baja en células transfectadas

40 **(A)** Complementariedad entre TTV-HD14a-mir-2-5p (1, 2 y 3) TTV-HD14a-mir-2-3p (4) con ARNm de APC. Posiciones relativas a la variante 2 del transcrito de APC (NCBI número de orden: NM_001127510.2).

(B, C y D) Complementariedad entre TTV-HD14a-ASmir-2-3p y los promotores de APC 1, 2 y 3, respectivamente, tal y como se almacena en EPDNew Human. Las posiciones que se muestran se refieren al sitio de inicio de la transcripción (TSS) haciendo referencia a EPD New Human (nombres de EPDNew Human: APC_1, APC_2 y APC_3).

45 **(E)** Niveles relativos de expresión de APC según lo medido por qPCR (media para Sense = 0,747 y para AntiSense = 0,650). ΔCt se calculó respecto a HPRT. $\Delta\Delta Ct$ se calculó respecto a células transfectadas de forma simulada. Los valores diferenciales se normalizaron a 1. Sentido - Valores relativos para células HEK293TT transfectadas con pCDNA3.1(+)-TTV-HD14a-NCR-Sense. Antisentido - Valores relativos para células HEK293TT transfectadas con pCDNA3.1(+)-TTV-HD14a-NCR-AntiSense. Simulado - Valores relativos para células HEK293TT transfectadas con pCDNA3.1(+). TTV-HD14a - Valores relativos para células transfectadas con el virus TTV-HD14a de longitud completa. +-SD; N = 6. La significación estadística se calcula utilizando la Prueba T de Student no pareada de dos colas.

50 **(E)** Niveles relativos de expresión de APC según lo medido por qPCR (media para Sense = 0,747 y para AntiSense = 0,650). ΔCt se calculó respecto a HPRT. $\Delta\Delta Ct$ se calculó respecto a células transfectadas de forma simulada. Los valores diferenciales se normalizaron a 1. Sentido - Valores relativos para células HEK293TT transfectadas con pCDNA3.1(+)-TTV-HD14a-NCR-Sense. Antisentido - Valo-

res relativos para células HEK293TT transfectadas con pCDNA3.1(+)-TTV-HD14a-NCR-AntiSense. Simulado - Valores relativos para células HEK293TT transfectadas con pCDNA3.1(+). TTV-HD14a - Valores relativos para células transfectadas con el virus TTV-HD14a de longitud completa. +-SD; N = 6. La significación estadística se calcula utilizando la Prueba T de Student no pareada de dos colas.

5 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un poli(ácido nucleico) de TTV que comprende: (a) una secuencia de nucleótidos de TTV-HD14a-mir2 representada en la Tabla 1 o 2; (b) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de nucleótidos de (a) y que contiene la secuencia de nucleótidos CATCCYY (con Y = C o T); o (c) una secuencia de nucleótidos que es complementaria a cualquiera de dichas secuencias de nucleótidos.

10 La expresión "poli(ácido nucleico)" se refiere a una secuencia de ácido nucleico de cadena sencilla o cadena doble. Un poli(ácido nucleico) puede consistir en desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos, análogos de nucleótidos o nucleótidos modificados, o se puede haber adaptado para fines de diagnóstico o terapéuticos. Un poli(ácido nucleico) puede comprender también un clon de ADN de cadena doble que se puede utilizar, por ejemplo, para fines de clonación. A continuación, las observaciones y comprobaciones realizadas a nivel de ADN se aplican a nivel de ARN en consecuencia y viceversa.

15 El poli(ácido nucleico) de TTV de la invención se puede preparar de acuerdo con métodos de rutina bien conocidos, por ejemplo, mediante (a) el aislamiento del ADN completo o, preferiblemente, el ARN a partir de una muestra, (b) la detección de la secuencia de TTV mediante hibridación o PCR y (c) la clonación de la secuencia de TTV en un vector (d) mediante la síntesis de los respectivos nucleótidos de la secuencia de miARN.

20 También se incluyen en la presente invención variantes de la secuencia del poli(ácido nucleico) de la invención que contienen o bien deleciones y/o inserciones de uno o varios nucleótidos, especialmente inserciones o deleciones de uno o varios codones, principalmente en los extremos de los oligonucleótidos (ya sea 3' o 5') y que muestran al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad con dicha secuencia de poli(ácido nucleico) de la invención y contienen la secuencia de consenso CATCCYY (con Y = C o T). Las secuencias de poli(ácido nucleico) de acuerdo con la presente invención que son similares a la secuencia de TTV-HD14a-mir2 como se muestra en la Tabla 1 o 2, se pueden caracterizar y aislar de acuerdo con cualquiera de los métodos conocidos en la técnica, tales como la amplificación por medio de cebadores específicos de secuencia, hibridación con sondas específicas de secuencia en condiciones más o menos rigurosas, determinación de la secuencia de la información genética de TTV, etc. Las variantes y los fragmentos de las secuencias de poli(ácido nucleico) de TTV de la presente invención todavía son capaces de interferir o de inhibir la expresión de su gen diana.

25 En una realización preferida particular, la secuencia de poli(ácido nucleico) de TTV (si es ADN) contiene la secuencia de consenso CATCCYY (con Y = C o T), es decir, CATCCCC, CATCCCT, CATCCTC o CATCCTT. En otra realización preferida particular, la secuencia de poli(ácido nucleico) de TTV (si es ARN) contiene la secuencia de consenso CAUCCYY (con Y = C o U), es decir, CAUCCCC, CAUCCCU, CAUCCUC o CAUCCUU.

35 En una realización preferida particular, los inventores muestran cómo el motivo de semilla más conservado (AUC-CUC) tiene tres sitios de interacción posibles adicionales dentro del ARNm de APC, además del descrito previamente para TTV-HD14a-mir-2-3p.

40 Además, la presente invención se refiere a un cebador oligonucleótido que comprende parte del poli(ácido nucleico) de TTV de la presente invención, siendo capaz dicho cebador de actuar como cebador para secuenciar específicamente o amplificar específicamente cierto miARN de TTV.

45 El término "cebador" se refiere a una secuencia de oligonucleótidos de ADN de cadena sencilla capaz de actuar como un punto de iniciación para la síntesis de un producto de extensión del cebador que es complementario a la cadena de ácido nucleico que se va a copiar. La longitud y la secuencia del cebador deben ser tales que permitan cebar específicamente la síntesis de los productos de extensión. Preferiblemente, el cebador tiene al menos aproximadamente 10, preferiblemente al menos 15 nucleótidos. La longitud y la secuencia específicas dependerán de la complejidad de las dianas de ADN o ARN requeridas, así como de las condiciones de uso del cebador, tales como temperatura, fuerza iónica, etc. Los cebadores para la amplificación no tienen que coincidir exactamente con la secuencia del molde correspondiente para garantizar una amplificación adecuada. El método de amplificación empleado puede ser o bien la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la amplificación basada en la secuencia de ácido nucleico (NASBA), el sistema de amplificación basado en la transcripción (TAS), la amplificación por desplazamiento de cadena (SDA) o la amplificación por medio de la replicasa Q β o cualquier otro método adecuado para amplificar moléculas de ácido nucleico usando la extensión del cebador. Durante la amplificación o la síntesis, los productos amplificados se pueden marcar convenientemente, ya sea usando cebadores marcados o incorporando nucleótidos marcados. Los marcadores pueden ser isotópicos (³²P, ³⁵S, etc.) o no isotópicos (biotina, digoxigenina, etc.).

55 La presente invención también se refiere a una sonda de oligonucleótido que comprende parte del poli(ácido nucleico) de TTV de la presente invención, siendo capaz dicha sonda de actuar como una sonda de hibridación para la detección específica de un determinado miARN de TTV *in vitro* e *in vivo*.

El término "sonda" se refiere a oligonucleótidos específicos de secuencia de cadena sencilla que tienen una secuencia que es complementaria a la secuencia diana del poli(ácido nucleico) de TTV que se va a detectar. Preferiblemente, esas sondas tienen aproximadamente de 5 a 50 nucleótidos de longitud, más preferiblemente de aproximadamente 10 a 25 nucleótidos. La sonda se puede fijar a un soporte sólido, es decir, cualquier sustrato sobre el cual se puede acoplar una sonda de oligonucleótido, siempre que conserve sus características de hibridación y siempre que el nivel de fondo de la hibridación se mantenga bajo. Por lo general, el sustrato sólido será una placa de microtitulación, una membrana (por ejemplo, de nailon o nitrocelulosa) o una microesfera (perla). Antes de la aplicación sobre la membrana o la fijación puede ser conveniente modificar la sonda de ácido nucleico con el fin de facilitar la fijación o mejorar la eficacia de la hibridación. Tales modificaciones pueden incluir la formación de colas de homopolímeros, el acoplamiento con diferentes grupos reactivos tales como grupos alifáticos, grupos NH₂, grupos SH, grupos carboxicos, o el acoplamiento con biotina o haptenos.

La presente invención también se refiere a un vector que contiene un poli(ácido nucleico) de TTV, un cebador de oligonucleótido o una sonda de oligonucleótido de la invención que permite, por ejemplo, la expresión, mutagénesis o modificación de una secuencia mediante una recombinación de las secuencias de ADN. Preferiblemente, los vectores son plásmidos, cósmidos, virus, bacteriófagos y otros vectores usados habitualmente en el campo de la ingeniería genética. Los vectores adecuados para el uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a los mismos, el vector de expresión basado en T7 para la expresión en células de mamífero y vectores obtenidos a partir de baculovirus para la expresión en células de insecto. Preferiblemente, el poli(ácido nucleico) de la invención o parte del mismo está ligado funcionalmente a los elementos reguladores en el vector recombinante de la invención que garantizan la transcripción y la síntesis de un ARNm en células procariotas y/o eucariotas que se puede traducir. La secuencia de nucleótidos que se va a transcribir puede estar ligada funcionalmente a un promotor, tal como un promotor de T7, metalotioneína I o polihedrina.

La presente invención también se refiere a células hospedadoras recombinantes de forma transitoria o estable que contienen el poli(ácido nucleico) de TTV (o fragmentos del mismo) o vectores de la invención. Una célula hospedadora se entiende que es un organismo que es capaz de aceptar ADN recombinante *in vitro* y, si es el caso, sintetizar los polipéptidos codificados por los polinucleótidos de la invención. Preferiblemente, esas células son células procariotas o eucariotas, por ejemplo, células de mamífero, células bacterianas, células de insecto o células de levadura.

La presente invención también se refiere a un kit de diagnóstico que contiene un poli(ácido nucleico) de TTV, un cebador de oligonucleótido o una sonda de oligonucleótido de la presente invención.

Para los ensayos basados en la hibridación, de acuerdo con la solución de hibridación (SSC, SSPE, etc.), las sondas se deben hibridar de forma rigurosa con la diana (con o sin amplificación previa) a su temperatura apropiada para alcanzar una especificidad suficiente. Sin embargo, modificando ligeramente el polinucleótido, las sondas (ADN y/o ARN), ya sea mediante una adición o deleción de uno o unos pocos nucleótidos en sus extremos (ya sea 3' o 5'), o mediante la sustitución de algunos nucleótidos no esenciales (es decir, nucleótidos que no son esenciales para discriminar entre los tipos) por otros (incluyendo nucleótidos modificados o inosina), se puede provocar que esas sondas o variantes de las mismas se hibriden específicamente en las mismas condiciones de hibridación (es decir, la misma temperatura y la misma solución de hibridación). También el cambio de la cantidad (concentración) de la sonda utilizada, puede ser beneficioso para obtener unos resultados de la hibridación más específicos.

Los métodos de ensayo adecuados para los fines de la presente invención para detectar híbridos formados entre las sondas de oligonucleótidos y un poli(ácido nucleico) de TTV en una muestra, pueden comprender cualquiera de los formatos de ensayo conocidos en la técnica, tales como el formato convencional de transferencia de manchas, la hibridación de tipo sándwich o la hibridación inversa. Por ejemplo, la detección se puede realizar utilizando un formato de transferencia de manchas, en donde la muestra amplificada sin marcar se une a una membrana, en donde la membrana se incorpora con al menos una sonda marcada en condiciones de hibridación y condiciones de lavado adecuadas, y se puede supervisar la presencia de una sonda unida. Un método alternativo y preferido es un formato de transferencia de manchas "inverso", en el que la secuencia amplificada contiene un marcador. En ese formato, las sondas de oligonucleótidos sin marcar se unen a un soporte sólido y se exponen a la muestra marcada en condiciones rigurosas de hibridación y condiciones de lavado posteriores adecuadas. Se ha de entender que también se puede emplear cualquier otro método de ensayo que se base en la formación de un híbrido entre los ácidos nucleicos de la muestra y las sondas de oligonucleótidos de acuerdo con la presente invención.

La presente invención también se refiere al uso de un poli(ácido nucleico) de TTV, un cebador de oligonucleótido o una sonda de oligonucleótido de la presente invención como un marcador temprano para un futuro desarrollo del cáncer, preferiblemente de cáncer colorrectal.

Finalmente, la presente invención también se refiere al uso de un poli(ácido nucleico) de TTV de la presente invención como un componente principal para el desarrollo de un medicamento para la prevención o el tratamiento del cáncer, preferiblemente el cáncer colorrectal. Estos medicamentos pueden ser inhibidores de cualquier interacción entre los miARN y genes supresores tumorales para evitar un desarrollo del cáncer o una recidiva y el tratamiento del cáncer. Por lo tanto, el miARN del virus TT específico o de sus derivados o de miARN relacionados, es útil para aplicaciones de diagnóstico, prevención o terapéuticas en el campo del cáncer.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no se interpretarán como cualquier limitación de la invención.

Ejemplo 1

Materiales y métodos

(A) Cultivo celular y transfecciones

- 5 Las células HEK293TT [76] se cultivaron en medio Eagle modificado con Dulbecco (DMEM Sigma) complementado con 10% de FBS, 1% de Glutamax y 1% de NGAA. Las células se transfectaron cuando tenían 50% de confluencia, 24 h después de la siembra (7 millones por matraz T-75 y 800.000 por pocillo para una placa de 6 pocillos). Las transfecciones se realizaron utilizando Lipofectamina y reactivo Plus (Life Technologies, n° de catálogo 11514 y 18324) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

10 (B) Construcción de plásmidos

- La NCR de TTV-HD14a se amplificó mediante PCR usando los cebadores TT-ON9 y TT-ON10 (Tabla 4) usando pCDNA3.1(+)-TTV-HD14a como molde (un plásmido que contiene TTV-HD14a linealizado de longitud completa y clonado en el sitio XbaI). El producto de la PCR se hizo correr sobre un gel de agarosa al 1% y el ADN se tiñó usando bromuro de etidio. Las bandas correspondientes al tamaño esperado (-1200 pb) se cortaron y posteriormente se extrajeron desde la agarosa usando el kit de extracción en gel QIAEXII (QIAGEN). Se cortaron 4 µg de pCDNA3.1(+)
- 15 (Life Technologies) usando KpnI y se desfosforilaron utilizando FastAP (Thermo Scientific). El producto de la PCR se cortó utilizando el mismo procedimiento, pero no se desfosforiló. El plásmido cortado y los productos de la PCR se purificaron utilizando el kit de extracción en gel QIAEXII.

- La ligación del plásmido y el fragmento amplificado correspondiente a la NCR de TTV-HD14a se realizó utilizando ADN ligasa de T4 (Thermo Scientific). El producto de la ligación se transformó en células competentes NovaBlue Singles (Merck Millipore) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se sembró en placas de agar con LB complementadas con ampicilina como marcador de la selección. Las placas se incubaron 20 horas a 37°C. Las colonias individuales se seleccionaron y se sembraron en medio LB complementado con ampicilina. Estos cultivos se incubaron 20 horas. El plásmido fue extraído por medio del kit PureLink Quick Plasmid Miniprep (Life Technologies). 1 µg de cada plásmido se cortó de forma doble con SacI y NheI (Thermo Scientific). Los productos cortados de
- 20 dejaron correr en geles de agarosa al 1%. La estrategia de restricción permitió distinguir entre clones insertados en la orientación sentido y antisentido. Dos plásmidos positivos, uno que contenía el inserto con la orientación sentido y el otro con la antisentido, se eligieron y se enviaron para realizar una secuenciación. Después de confirmar la secuencia, los plásmidos se prepararon para la transfección mediante el uso del kit Plasmid Maxi (Qiagen).

30 (C) Extracción del ARN y tratamiento con ADNasa

- Las células se recogieron 48-72 horas después de la transfección. Las células se homogeneizaron usando QiaShredder (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los lisados se sometieron a continuación a una extracción del ARN usando el mini kit miRNAeasy o el mini kit RNAeasy (Qiagen), dependiendo de la finalidad del ARN (para transferencia Northern o para RT-qPCR, miARN), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- 35 Después de la elución, las muestras de ARN se trataron con ADNasa RQ1 (Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con la adición de RNasin (Promega). Se realizó la extracción con fenol-cloroformo seguida de precipitación con etanol, y el sedimento resultante se resuspendió en agua DEPC. La calidad del ARN y la concentración se sometieron a ensayo usando NanoDrop 2000c (Thermo Scientific).

(D) Marcado de las sondas

- 40 Los oligos de ADN apropiados se encargaron a Sigma (Tabla 4). Las sondas se marcaron en 3' con biotina. Se incubaron 10 pmoles de cada sonda con 4 U de desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) y 2, 5 nanomoles de biotina-11-dUTP (Thermo Scientific) en tampón 1X TdT, durante la noche. Las sondas se sometieron a una extracción con alcohol isoamílico-cloroformo y se utilizó el volumen total para una hibridación posterior.

(E) Transferencia Northern

- 45 Se separaron 30-50 µg del ARN total por muestra mediante electroforesis usando geles de 15% de poliacrilamida (29:1) vertidos en urea 7 M y tamponados con 1xTBE usando una celda de MiniProtean (Bio-Rad). El tampón de la electroforesis era 0,5x TBE. Los geles se tiñeron con EtBr.

- Para la transferencia, los geles se colocaron sobre una membrana de hibridación de hoja de nailon (Hybond-NX®, Amersham/Pharmacia) humedecida previamente en 0,5x TBE. Después, la misma se intercaló entre hojas de papel de filtro 3MM de Whatman (una capa debajo de la membrana y tres sobre el gel), también humedecidas previamente en 0,5x TBE y se colocan en una celda de transferencia semiseca Trans-Blot SD (Bio-Rad). El exceso de líquido y las burbujas de aire se eliminaron presionando el sándwich, haciendo rodar una pipeta sobre la superficie. La transferencia electroforética del ARN desde el gel a la membrana se realizó a 400 W durante 60-90" min. Después de la transferencia, el ARN se reticuló con la membrana mediante una exposición a radiación ultravioleta usando Strata-
- 50

linker (Stratagene).

5 Las membranas se cortaron según fue necesario y se hibridaron con la sonda adecuada marcada con biotina (Tabla 4) una noche en tampón Ultrahyb Oligo (Life Technologies) a 42°C. Después de la hibridación, se realizaron 4 lavados; el primero con 2X SSC 30 minutos a 42°C, el segundo con 2x SSC 0,5% de SDS 30 min a 42°C y los dos últimos con 2X SSC 0,5% de SDS 30 min a 55°C. Las señales de la hibridación se detectaron utilizando el kit BrightStar BioDetect (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Película utilizada: (Fiji).

(F) RT-qPCR

10 Se empleó 1 µg de ARN para preparar el ADNc con superscript III y RNaseOUT (Life Technologies) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADNc se diluyó 1:10. La qPCR se realizó utilizando una mezcla maestra rápida de Taqman y ensayos de expresión de Taqman, en un aparato StepOne plus para qPCR (Applied Biosystems).

(G) Predicción de pre-miARN y predicción de miARN maduro

V-mir se estableció como configuración por defecto, cambiando el tipo de secuencia a circular. El CID-miARN se ejecutó en la herramienta basada en la web, utilizando la configuración de ejecución por defecto para Homo sapiens. Mature Bayes se ejecutó en la herramienta basada en la web.

15 (H) Predicciones de la diana de miARN

DIANA microT 3.0 se ejecutó en la herramienta basada en la web (no se dan opciones para ese programa). El ARN híbrido se ejecutó utilizando una configuración de nucleótido limitada, desde el nucleótido 2 a 8 del miARN. Se permitieron las parejas G:U.

Tabla 1

20 Pre-miARN previsto procedente de TTV-HD14a empleando CID-miARN y V-mir que se ajusta a tres criterios: estar previsto por ambos programas, tener una puntuación superior a 150 para V-mir y estar localizado en la región no codificante del virus.

Grupo	Orientación	Longitud	Nucleótido de partida	Nombre
S2	Sentido	69	3135	TTV-HD14a-mir-1
Secuencia y estructura secundaria g - - - - a - - - - a cu 5' gccuc gaccccccc ucg cc gaaucg c 3' cgggg cuggggggg ggc gg cuuagc g g cucc gucca - gc				
S3	Sentido	78	3420	TTV-HD14a-mir-2
Secuencia y estructura secundaria ac - a c gugua 5' gcugugacguca gucacgugg gg gga ggc a c 3' cggcacugcagu cagugcacu cc ccu cug c c- a - a aaggc				
AS3	Antisentido	63	3576	TTV-HD14a-ASmir-1
Secuencia y estructura secundaria - ac c a-- u u 5' ccgccg cu gu ac cucc cuuuuu u u 3' ggccggu ga ca ug gaagg gaaaaa a a a- c aag c c				
AS1	Antisentido	80	3497	TTV-HD14a-ASmir-2
Secuencia y estructura secundaria c - gau u uuc gg 5' ggc gugacgucag gucacgu gggga gac cg u u 3' ccg cacugcaguu cagugca ccccu cug gc a a g - - - c cc- ac				

ES 2 708 750 T3

Tabla 2 pre-miARN inicial previsto procedente de diferentes cepas de TTV agrupadas de acuerdo con la homología de secuencia.

Grupo	Nombre del Pre-miARN	Alineación
Sense1	TTV-HD16a-mir-3	GGCCGCCATTTTAAGTAA-- GGCGGAAGCAACTCCACTTTTCTCACAAAATGGCGGCGGAGCACTTCCGGCTT- GCCCAAAATGGCCGCC
	TTV-sle2057-mir1	-CCGCCATTTTAAGTAA-- GGCGGAAGCAGCTCCACTTTTCTCACAAAATGGCGGCGGAGCACTTCCGGCTT- GCCCAAAATGGCGG-
	TTV-HD23a-mir-1	-CCGCCATTTTAAGTAA-- GGCGGAAGCAGCTCCACCCTCTCACATAATGGCGGCGGAGCACTCCC GGCTT- GCCCAAAATGGCGG-
	TTV-Sanban-mir-1	-GCCGCCATTTTAAGTAA--GGCGGAAGCAGCTCGGCATA--TACAAAATGTGGCGGAGCACTTCCGGCTTACCAAAATGAAGGC- ***** *
Sense2	TTV-HD14a-mir-1	GCCTCGGACCCCCCTCGACCAGAATCGCTCGCGGATTCCGGACCTG-- CGGCCTCGGGGGGGTCCGGGGC
	TTV-CT30F-mir-1	-CCTCGGACCCCCCGACCCGAATCGCTCGCGGATTCCGGACCTG-- CGGCCTCGGGGGGGTCCGGGG-
	TTV-HD16a-mir-2-	-CCTCGGACCCCCGCTCGTGCTGACGCGCTTGC CGCGTCAGACCCTTCCGGCTCGCGGG-- ***** *
Sense3	TTV-HD14a-mir-2	GCTGTGACGTCAACG-TCACGTGGG-GAGGACGGCGTGTAAACCCGGAAGTCATCCCCA- TCACGTGACCTGACGTACGGC-
	TTV-Sanban-mir-2	---ACGTCACAAGTCACGTGGGGAGGGTTGGCGTATAGCCCGGAAGTCAATCCT- CCCACGTGGCCTGTCACGT---
	TTV-HD23a-mir-2	GCAGCTACGTACAAGTCACCTGACTGGGGAGGAGTTACATCCCG- GAAGTTCTCCTCGGTACGTGACTGTACACGTGACTGC
	TTV-sle2057-mir-2	-----ACGTCACAAGTCACCTGACTGGGGAGGAGTCACAACCCGGAAGTCTCTTCGGTACGTGACTAGTCACGT----- ***** *
AS1	TTV-HD14a-ASmir-2	----GGCCGTGACGT-CAG-GTCACGTGAT-GGGGATGACTTCCGGGTACACGCCGTCTCC- CCACGTGACGT-TGACGTACAGCC
	TTV-CT30F-ASmir-3	-----CGTGACGT-CAGAGTCACGTGACCAGGGATG-CTCCGGGTTTAGGCACGCCCCCA- TCACGTGTCTC-AAACGTACAG
	TTV-HD23a-ASmir-1	GCAGTCACGTGTA---CA-- GTCACGTGACCGAGGAGAAGTTCGGGATGTAACCTCCTCCCAGTCAGGTGACTT- GTGACGTAGCTGC-
	TTV-sle2057-ASmir-1	-----ACGTGAC---TA-- GTCACGTGACCGAAGAGGACTTCCGGGTTGTGACTCCTCCCAGTCAGGTGACTT- GTGACGT-----
	TTV-HD16a-ASmir-1	-----ACGTGAC---CA--GTTACGTGTTGAGGAT-ACTTCAGTGTAAAGTACCTCCCAGTCACGTGACTTATGACGT----- ***** *
AS2	TTV-	---GCCATTTTGGGCAAG--CCG--

Tabla 3

Genes previstos para ser regulados a la baja por TTV-HD14a y al menos otros dos miARN de cepas de TTV. Obsérvese que algunas cepas tienen más de un miARN putativo que está previsto que regule a la baja algunos de los genes.

Gen	Número de orden de NCBI	Número de cepas aisladas de TTV previstas para regularlo a la baja	Número de miARN de TTV previstos para regularlo a la baja
APC2	NM_005883.2	4 (de 9)	8
SOX4	NM_003107.2	3 (de 9)	3
TNRC6B	NM_001162501.1	4 (de 9)	7
BNC2	NM_017637.5	3 (de 9)	4
ONECUT2	NM_004852.2	5 (de 9)	7
BCL11A	NM_022893.3	3 (de 9)	3
Slit1	NM_003061.2	3 (de 9)	3
MLL	NM_153827.4	5 (de 9)	8
MACF1	NM_012090.5	8 (de 9)	12
DST	NM_001144769.2	9 (de 9)	13
CREB5	NM_182898.2	3 (de 9)	3
CHD5	NM_015557.2	3 (de 9)	4
SSRP1	NM_003146.2	3 (de 9)	3
MINK1	NM_001197104.1	5 (de 9)	5

5

Tabla 4 - Sondas y cebadores

Nombre de la sonda	Secuencia
HD14a-mir-1-5p	5' agcgattctggtcgaagggggggtccgagggc -Sonda
HD14a-mir-1-3p	5' gccccgaccccccgaggccgcaggtccgaatcgcg -Sonda
HD14a-mir-2-5p	5' acacgcccgtcctcccacgtgacgttgacgtcacagc -Sonda
HD14a-mir-2-3p	5' gccgtgacgtcaggtcacgtgatgggatgacttccg -Sonda
HD14a-ASmir-1-5p	5' aagaggaagtgtagcgtacggcggg -Sonda
HD14a-ASmir-1-3p	5' cgccatctgtgacttcctccgcttt -Sonda
HD14a-ASmir-2-5p	5' cggaaagtcaccccatcacgtgacctgacgtcacggc -Sonda
HD14a-ASmir-2-3p	5' gctgtgacgtcaacgtcacgtggggaggacggcgtgt -Sonda
hsa-mir-93-5p	5' cactacctgcacgaacagcactttggagccccag -Sonda
hsa-mir-93-3p	5' ccgggggctcgggaagtgctagctcagcagtaggt -Sonda

Ejemplo 2

Predicción del miARN

- 10 Para abordar la cuestión de una posible función de la región no codificante (NCR) de los TTV más allá de su actividad como promotor, los inventores tuvieron la idea de que también genera ARN no codificantes, tales como miARN. Por lo tanto, se utilizaron algoritmos de predicción de miARN disponibles, con los que se identificaron varios pre-miARN candidatos en la NCR de algunos TTV. Los inventores optaron por utilizar dos de tales algoritmos: CID-miRNA [34] y Vmir [35-36]. El primero fue elegido debido a su alta especificidad y el segundo debido a su mayor
- 15 sensibilidad. Para considerar una estructura de pre-miARN como candidata, se empleó el criterio de que debería estar prevista por ambos programas, con un valor de corte superior a 125 para el programa V-mir y que tenía que estar situada en la NCR del virus. Después de filtrar, solo se consideraron 4 candidatos de pre-miARN (Tabla 1 y Figura 1B), dos con la orientación sentido y dos con la orientación antisentido, como pre-miARN putativos y se evaluaron adicionalmente.
- 20 Con el fin de comprobar la conservación de las secuencias de los pre-miARN entre las diferentes cepas aisladas de TTV, los inventores realizaron la misma predicción en siete cepas diferentes: TTV-HD16a, TTV-C3T0F, TTV-HD23a, TTV-YonKc197, TTV-SANBAN, TTV-Sle2057 y TTV-tth8 (números de orden de GenBank: FR751476.1, AB064597.1, FR751500.1, AB038624.1, AB025946.2, AM712030.1, AJ620231.1). A continuación, se agruparon los pre-miARN resultantes en diferentes clases (Tabla 2), de acuerdo con la similitud de su secuencia. Como se puede
- 25 observar, la conservación de las secuencias es bastante pobre, siendo extraña la identidad total entre dos pre-miARN de diferentes cepas.

Ejemplo 3**TTV-HD14a puede transcribir cuatro miARN precursores codificados en su NCR**

Para abordar la cuestión de si los pre-miARN previstos se podían procesar, la NCR de TTV-HD14a se clonó aguas abajo del promotor CMV, con la orientación sentido o antisentido, utilizando el plásmido pCDNA3.1(+)-zeo como armazón (Figura 2A). Los inventores transfectaron a continuación células HEK293TT con esos plásmidos y realizaron una hibridación de la transferencia Northern con sondas específicas contra el brazo 3' o 5' de cada pre-miARN putativo (Tabla 4) (Figura 2B-E). Los inventores pudieron detectar claramente bandas que coincidían con el tamaño esperado para un pre-miARN con las sondas dirigidas contra el brazo 3' y 5' de TTV-HD14a-mir-2 y TTV-HD14a-ASmir-2. Además, los inventores fueron capaces de detectar un transcrito que se correspondía con el tamaño esperado de un miARN maduro dentro del brazo 5' de TTV-HD14a-mir-2. Por otra parte, los inventores fueron capaces de detectar transcritos que se correspondían con los tamaños esperados de las sondas dirigidas contra el brazo 3' solo de TTV-HD14a-mir-1 y TTV-HD14a-ASmir-1.

Estos resultados demuestran que TTV-HD14a codifica varios miARN precursores con ambas orientaciones; y al menos uno de ellos se puede procesar en un miARN maduro.

Ejemplo 4**Predicción de las dianas**

Es bien sabido que la característica principal del miARN es la regulación a la baja de la expresión génica de una manera postranscripcional. También se sabe que este efecto es debido a la forma madura de los miARN, y no a sus precursores. Aunque los inventores no fueron capaces de observar ningún miARN maduro para tres de los pre-miARN, piensan que los bajos niveles de expresión de estos miARN en lugar de su ausencia, podría ser la razón de ello. En cualquier caso, es necesario identificar la secuencia de los miARN maduros para realizar predicciones precisas, y esto es difícil de determinar mediante métodos experimentales diferentes de miRNA-seq. Para superar este problema, los inventores decidieron utilizar un factor predictor de miARN maduro in-silico, Mature Bayes [37]. Este programa predice el miARN maduro a partir de una secuencia de pre-miARN. Después de hacer esto con todos los precursores de miARN previstos (Tabla 2), utilizaron DIANA-microT-3.0 [38-39] para predecir las posibles dianas. Se razonó que, a pesar de la variabilidad de sus secuencias, los miARN maduros putativos de TTV deben tener algunas dianas en común. Por tanto, después de realizar las predicciones, los inventores compararon los resultados entre las diferentes cepas de TTV y consideraron como candidatas adecuadas las dianas que se habían previsto para algunos miARN pertenecientes a TTV-HD14a y, al menos, dos cepas más de TTV. Las dianas candidatas se indican en la Tabla 3.

Además de este enfoque, los inventores realizaron una comparación directa del miARN maduro previsto procedente de TTV-HD14a, con las regiones CDS, 3'UTR y promotoras de varios genes supresores tumorales utilizando RNA Hybrid [40]. Este programa permite detectar directamente la secuencia complementaria de un miARN dado dentro de un gen, independientemente de la conservación o localización de la secuencia complementaria. Esto es útil, ya que la mayoría de los otros programas de predicción no tienen en cuenta la región CDS o promotora de los genes, aunque se ha demostrado que un emparejamiento de la semilla con la primera región puede mediar en el PTGS y con la segunda puede causar TGS o ARNa [11, 12, 29-33]. Los inventores encontraron una complementariedad de la semilla entre el gen de APC y TTV-HD14a-mir-2-5p en tres puntos diferentes dentro de la secuencia del ARNm de APC, dos en CDS y una en 3'UTR (Figura 3A - 1, 2 y 3). Además, un posible sitio de interacción entre TTV-HD14a-mir-2-3p y el ARNm de APC estaba presente en CDS (Figura 3A - 4). Los inventores también encontraron complementariedad entre TTV-HD14a-ASmir-2-3p y tres de los cuatro promotores indicados para APC en la base de datos de promotores eucariotas New Human (EPD New Human) [59] (nombres de registro APC_1, APC_2, APC_3 y APC_4) (Figura 3B-D).

Ejemplo 5**APC se regula a la baja después de la transfección con pCDNA3.1(+)-TTVHD14a-NCR-Sense**

Para comprobar la posible regulación a la baja de APC mediada por el miARN de TTV-HD14a, los inventores transfectaron de forma transitoria células HEK293TT con las estructuras artificiales que codifican el miARN, con el virus de longitud completa TTV-HD14a o las transfectaron de forma simulada, seguido por RT-qPCR (Figura 3E). La regulación a la baja de APC por el propio miARN, así como por el genoma de longitud completa (que codificaba el miARN) es significativa en comparación con la transfección simulada.

Ejemplo 6**Regulación al alza de GAPDH a través de miARN de TTV**

Después de la transfección con pCDNA3.1(+)-TTV-HD14a-NCZ-Sense, que está destinada a producir 4 miARN maduros (TTV-HD14a-mir-1-5p, TTV-HD14a-mir-1-3p, TTV-HD14a-mir-2-5p y TTV-HD14a-mir-2-3p), los inventores pueden observar un aumento estadísticamente significativo del transcrito de GAPDH:

GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa) es un gen que generalmente se usa como control interno (gen de mantenimiento), a nivel de ARNm y proteico, debido a que sus niveles de expresión son muy constantes bajo condiciones muy diferentes.

5 *GAPDH* se regula al alza en la mayoría de los cánceres y en condiciones de hipoxia [72, 73, 74]. Los inventores sugieren que la regulación al alza de *GAPDH* dependiente del miARN de TTV está mediada indirectamente por la regulación a la baja de APC.

Ejemplo 7

Un análisis con micromatrices revela el cuadro de alteraciones inducidas con los miARN de TTV-HD14a

10 Después de 72 h de la transfección de las células con las dos estructuras artificiales diferentes, se aisló el genoma de TTV HD14a de longitud completa o se aisló un ARN plasmídico vacío y se realizó un análisis con micromatrices. La Tabla 5 incluye todos los genes que se desregularon consecuentemente entre la transfección con las estructuras artificiales y el virus de longitud completa.

Tabla 5

15 Genes expresados de forma diferencial entre células transfectadas con un plásmido que codifica TTV-HD14a NCR con orientación sentido en comparación con células transfectadas de modo simulado

ILLUMINA_ID	GENE_SYMBOL	Descripción
5550379	CAV1	caveolina 1, proteína caveolae, 22 kDa
1230465	HNRNPK	ribonucleoproteína heterogénea nuclear K
4230673	GRM2	receptor de glutamato, metabotrópico 2
7160327	ARPC2	complejo de proteínas relacionadas con actina 2/3, subunidad 2,34 kDa
4640161	C17orf97	marco de lectura abierto 97 del cromosoma 17
2640142	C17orf97	marco de lectura abierto 97 del cromosoma 17
70403	C14orf45	marco de lectura abierto 45 del cromosoma 14
7510097	CMTM1	que contiene el dominio transmembranal MARVEL similar a CKLF 1
4850736	CMTM1	que contiene el dominio transmembranal MARVEL similar a CKLF 1
6290358	TPX2	TPX2, asociado a microtúbulos, homólogo (<i>Xenopus laevis</i>)
7150270	LRRC26	repetición rica en leucina que contiene 26
6420441	LOC728416	LOC728416 hipotético
2140541	LRRC26	repetición rica en leucina que contiene 26
6220053	FAM57B	familia con similitud de secuencia 57, miembro B
3520128	TUBG2	tubulina, gamma 2
1410470	FAM71E1	familia con similitud de secuencia 71, miembro E1
2490433	RNF32	proteína de anillo de dedo 32
650717	C22orf23	marco de lectura abierto 23 del cromosoma 22
4070424	C16orf93	marco de lectura abierto 93 del cromosoma 16
4860068	STX1A	sintaxina 1A (cerebro)
2940739	RASSF1	miembro 1 de la familia de dominio de asociación a Ras (RalGDS/AF-6)
2370538	KRCC1	hélice superenrollada 1 rica en lisina
6130047	CCDC151	que contiene el dominio de hélice superenrollada 151

ES 2 708 750 T3

ILLUMINA_ID	GENE_SYMBOL	Descripción
1240731	RFPL3S	ARN antisentido de RFPL3 (no codifica proteínas)
650689	CLIP3	dominio CAP-GLY que contiene la proteína enlazadora 3
7320402	APBB3	se une a proteína precursora beta amiloide (A4), familia B, miembro 3
450204	ALG9	glicosilación 9 ligada a asparagina, homólogo de alfa-1,2-manosiltransferasa (<i>S. cerevisiae</i>)
1240523	RPL41	proteína ribosómica L41
1940561	CGRRF1	regulador del crecimiento celular con dominio de anillo de dedo 1
6290609	RPS15	proteína ribosómica S15
1090564	TMEM175	proteína transmembranal 175
5820494	ZNF177	proteína con dedos de zinc 177
7560731	SNORA64	ARN nucleolar pequeño, caja H/ACA 64
7550021	TTC25	dominio de repetición de tetratricopéptido 25
2350477	LRRC6	que contiene la repetición rica en leucina 6
2480364	DPP7	dipeptidil-peptidasa 7
3180678	HNRNPH2	ribonucleoproteína nuclear heterogénea H2 (H)
3400164	C21orf2	marco de lectura abierto 2 del cromosoma 21
730292	RNFT2	proteína de anillo de dedo, transmembranal 2
7330474	MOBP	proteína básica de oligodendrocito asociada con mielina
6520241	FAM116B	familia con similitud de secuencia 116, miembro B
270026	RASSF1	miembro 1 de la familia del dominio de asociación a Ras (RaIGDS/AF-6)
5560253	N6AMT1	ADN metiltransferasa específica de N-6-adenina 1 (putativa)
3520092	BAX	proteína X asociada con BCL2
6940181	FAM24B	familia con similitud de secuencia 24, miembro B
7320750	ILVBL	ilvB similar a (acetolactato sintasa bacteriana)
3840356	TRIM11	motivo de tripartito que contiene 11
6350121	RASSF1	miembro 1 de la familia del dominio asociación Ras (RaIGDS/AF-6)
7400619	SPATA5L1	similar a asociado con espermatogénesis 5 1
5270343	IQCC	que contiene el motivo IQ C
7320192	LOC100129148	LOC100129148 hipotético
3140689	KIAA1407	KIAA1407
1990593	IRX6	homeocaja iroquois 6
5340725	DYNLRB2	dineína, cadena ligera, de tipo barrera 2
4120279	APBB3	que se une a proteína precursora de beta amiloide (A4), familia B, miembro 3
5910397	LIAS	sintetasa de ácido lipoico
3130035	FAM149B1	familia con similitud de secuencia 149, miembro B1

ES 2 708 750 T3

ILLUMINA_ID	GENE_SYMBOL	Descripción
2570707	N6AMT1	ADN metiltransferasa específica de N-6-adenina 1 (putativa)
2900725	CYP27B1	citocromo P450, familia 27, subfamilia B, polipéptido 1
7400246	BCDIN3D	que contiene el dominio BCDIN3
5080010	LOC401431	LOC401431 hipotético
830681	C14orf45	marco de lectura abierto 45 del cromosoma 14
5910041	RPL23AP7	seudogén 7 de proteína ribosómica L23a
1820739	CDK20	cinasa dependiente de ciclina 20
6350672	PHF21B	proteína de dedo PHD 21B
1170022	C17orf81	marco de lectura abierto 81 del cromosoma 17
4640095	RPL9	proteína ribosómica L9
5390497	C7orf53	marco de lectura abierto 53 del cromosoma 7
4490348	C9orf6	marco de lectura abierto 6 del cromosoma 9
6040156	C6orf52	marco de lectura abierto 52 del cromosoma 6
2480735	KIAA1731	KIAA1731
4180408	SNORD55	ARN pequeño nucleolar, caja C/D 55
6660451	NDUFB4	NADH deshidrogenasa (ubiquinona) subcomplejo 1 beta, 4,15 kDa
4150561	AASDH	aminoadipato-semialdehído deshidrogenasa
6840291	FOXN4	caja forkhead N4
3850754	KIAA1683	KIAA1683
3800400	LDHAL6B	similar a lactato deshidrogenasa A 6B
540403	LRP5L	similar a proteína relacionada con el receptor de lipoproteína de baja densidad 5
5360139	LOC100128221	similar a hCG2041787
2810674	TRIM4	que contiene el motivo tripartito 4
3780450	BANP	proteína nuclear asociada a BTG3
5690280	FXR2	retraso mental X frágil, homólogo autosómico 2
1580750	LOC100130828	LOC100130828 hipotético
4610433	ANGPTL4	similar a angiopoyetina 4
3120452	MTMR10	proteína relacionada con miotubularina 10
2750465	C19orf61	marco de lectura abierto 61 del cromosoma 19
2470270	DUS4L	similar a dihidrouridina sintasa 4 (<i>S. cerevisiae</i>)
3370288	CBX6	homólogo de cromocaja 6
7210092	TRIT1	ARNt isopenteniltransferasa 1
1580021	TCTEX1D2	que contiene el dominio Tctex1 2
540041	CASC1	candidato de susceptibilidad a cáncer 1

ES 2 708 750 T3

ILLUMINA_ID	GENE_SYMBOL	Descripción
2030152	MOBP	proteína básica de oligodendrocito asociada a mielina
2650678	RSPH3	homólogo de radio radial 3 (Chlamydomonas)
620414	HSD17B10	hidroxiesteroide (17-beta) deshidrogenasa 10
5360326	SIP1	proteína que interacciona con supervivencia de proteína neuronal motora 1
5860709	C9orf9	marco de lectura abierto 9 del cromosoma 9
5960709	APITD1	inductor de apoptosis, similar a TAF9 dominio 1
6100014	MRPL47	proteína ribosómica mitocondrial L47
4150059	HNRNPH2	ribonucleoproteína nuclear heterogénea H2 (H)
5820500	C1orf35	marco de lectura abierto 35 del cromosoma 1
3610148	EVISL	similar a sitio de integración vírica ecotrópico 5
3170494	PPP2R3B	proteína fosfatasa 2, subunidad reguladora B, beta
2810112	RRAGC	que se une a GTP relacionado con Ras C
5260692	ZRSR2	dedo de zinc (tipo CCCH), motivo que se une a ARN y rico en serina/arginina 2
10543	PNCK	dinasa CaM regulada al alza en el embarazo expresada de forma no ubicua
940021	PEX11B	factor de la biogénesis peroxisomal 11 beta
5340703	KRCC1	hélice superenrollada 1 rica en lisina
70019	SUGP2	que contiene el dominio SURP y parche G 2
7150433	TCTEX1D2	que contiene el dominio Tctex1 2
3140634	MECR	trans-2-enoil-CoA reductasa mitocondrial
4050040	TUBB3	tubulina, beta 3
940576	ZSCAN21	que contiene dedos de zinc y dominio SCAN 21
4390687	POMT1	proteína-O-manosiltransferasa 1
6520687	SLC7A9	familia portadora de soluto 7 (transportadora de aminoácidos catiónicos, sistema y+), miembro 9
2750280	CDK5R1	cinasa dependiente de ciclina 5, subunidad reguladora 1 (p35)
4210113	CMTM2	que contiene el dominio transmembranal MARVEL similar a CKLF 2
940435	TRIM8	que contiene el motivo tripartito 8
4850593	TRIM46	que contiene el motivo tripartito 46
7550110	BAX	proteína X asociada a BCL2
1070541	MYH3	miosina, cadena pesada 3, músculo esquelético, embrionaria
1740576	LMF2	factor de maduración de lipasa 2
6650593	CEL	carboxil éster lipasa (lipasa estimulada por sales biliares)
7050326	CDKN2D	inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 2D (p19, inhibe CDK4)
1430673	SDCBP2	proteína que se une a sindecano (sintenina) 2
2600392	CENPA	proteína del centrómero A

ES 2 708 750 T3

ILLUMINA_ID	GENE_SYMBOL	Descripción
7380634	C20orf20	marco de lectura abierto 20 del cromosoma 20
1740392	COMMD10	que contiene el dominio COMM 10
3710746	OXSM	3-oxoacil-ACP sintasa, mitocondrial
7550626	BIRC5	repetición IAP baculoviral que contiene 5
6020719	RAB23	RAB23, miembro de la familia del oncogén RAS
6400524	LOC390705	proteína fosfatasa 2, subunidad reguladora B, seudogén beta
5290148	GPT2	glutámico piruvato transaminasa (alanina aminotransferasa) 2
3290296	MRPS14	proteína ribosómica mitocondrial S14
770044	FBXO15	proteína F-caja 15
380079	SPATA7	asociado a espermatogénesis 7
4590154	ZDHHC8	que contiene dedos de zinc, similar a DHHC 8
6770673	SOCS2	supresor de la señalización de citocina 2
3940309	CDAN1	anemia diseritropoyética congénita, tipo I
1470348	RAGE	antígeno tumoral renal
3990259	TMEM91	proteína transmembranal 91
730475	PIN4	que interacciona con proteína (peptidilprolil cis/trans isomerasa) NIMA, 4 (parvulina)
5670075	PAFAH1B1	acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas 1b, subunidad reguladora 1 (45 kDa)
4670082	RGS5	regulador de la señalización de la proteína G 5
7210438	ATRIP	proteína que interacciona con ATR
7000333	ASB6	que contiene la repetición de anquirina y caja SOCS 6
3420180	ZNF202	proteína con dedos de zinc 202
2760181	COQ3	homólogo de la coenzima Q3, metiltransferasa (<i>S. cerevisiae</i>)
3120093	EFCAB6	dominio que se une a calcio de mano EF 6
3140202	MYPOP	factor de transcripción relacionados con Myb, ligando de profilina
7380670	MYB	homólogo del oncogén vírico de v-myb mieloblastosis (aviar)
6100609	UAP1L1	similar a UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilasa 1 1
6520059	SNF8	SNF8, subunidad del complejo ESCRT-II, homólogo (<i>S. cerevisiae</i>)
6350070	SCNM1	modificador de canal de sodio 1
430402	ABCA3	casete que se une a ATP, subfamilia A (ABC1), miembro 3
6580402	UBE2H	enzima que se conjuga con ubiquitina E2H (homólogo de UBC8, levadura)
6280482	NIP7	homólogo de importación nuclear 7 (<i>S. cerevisiae</i>)
4260609	C2orf74	marco de lectura abierto 74 del cromosoma 2
6100056	HSD17B10	hidroxiesteroide (17-beta) deshidrogenasa 10
3890561	IFT20	homólogo de transporte intraflagelar 20 (<i>Chlamydomonas</i>)

ES 2 708 750 T3

ILLUMINA_ID	GENE_SYMBOL	Descripción
5900491	ZNF34	proteína de dedos de zinc 34
4730204	FCRLB	similar a receptor de Fc B
450309	DDX49	polipéptido de caja DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) 49
2060274	PREB	que se une a elemento regulador de prolactina
4890692	LOC285943	proteína hipotética LOC285943
3130326	MSH5	homólogo de mutS 5 (<i>E. coli</i>)
3440403	DHDDS	deshidrodoliquil difosfato sintasa
1170121	MRPL4	proteína ribosómica mitocondrial L4
2600470	WDR60	dominio de repetición de WD 60
1690711	SNAPC2	complejo activador de ARN pequeño nuclear, polipéptido 2,45 kDa
5080367	CKLF	factor similar a quimiocina
730414	APOE	apolipoproteína E
3290446	RPL36	proteína ribosómica L36
5900286	ZFP90	homólogo de proteína con dedos de zinc 90 (ratón)
7610079	HSF2BP	proteína que se une al factor de transcripción de choque térmico 2
4480477	SBSN	suprabasina
540519	NAGLU	N-acetilglucosaminidasa, alfa
6020209	CYTSA	citospina A
6100072	DENND2A	que contiene el dominio DENN/MADD 2A
4890382	ILVBL	similar a ilvB (acetolactato sintasa bacteriana)
2810082	C2orf111	marco de lectura abierto 111 del cromosoma 20
5220309	RILPL1	similar a proteína lisosómica que interacciona con Rab 1
7040609	SIP1	proteína que interacciona con supervivencia de proteína neuronal motora 1
520446	COMT	catecol-O-metiltransferasa
4670021	NPEPL1	similar a aminopeptidasa 1
2850180	NUDT16L1	similar a motivo de tipo nudix (resto ligado a nucleósido difosfato X) 16 1
650048	MOBP	proteína básica de oligodendrocito asociada a mielina
3170725	C2orf79	marco de lectura abierto 79 del cromosoma 2
7210767	GAK	cinasa asociada a ciclina G
240035	RUNDC3B	que contiene el dominio RUN 3B
1770519	PDRG1	regulado por p53 y daño al ADN 1
2190743	RBM23	proteína de motivo que se une a ARN 23
6620601	ZBTB40	que contiene el dominio de dedos de zinc y BTB 40
3140280	C9orf6	marco de lectura abierto 6 del cromosoma 9
1820711	LOC100288144	LOC100288144 hipotético

ES 2 708 750 T3

ILLUMINA_ID	GENE_SYMBOL	Descripción
6420632	MCCC1	metilcrotonoil-CoA carboxilasa 1 (alfa)
2760519	CKLF	factor similar a quimiocina
2490333	ZNF467	proteína de dedos de zinc 467
3890274	DPF2	familia de dedos D4, de zinc y dobles PHD 2
4010452	SLC38A6	familia portadora de soluto 38, miembro 6
5720154	ZBTB48	que contiene el dominio de dedos de zinc y BTB 48
6960692	ZSCAN10	que contiene el dominio de dedos de zinc y SCAN 10
6580075	TAF1D	factor asociado con proteína que se une a caja TATA (TBP) - ARN polimerasa I, D, 41 kDa
1580402	SLC35B2	familia portadora de soluto 35, miembro B2
6200561	CCDC28B	que contiene el dominio de hélice superenrollada 28B
1780095	RPL26L1	similar a proteína ribosómica L26 1
2100189	KCTD13	que contiene el dominio de tetramerización de canal de potasio 13
7610538	H1FX	familia de histonas H1, miembro X
6200253	THBS4	trombospondina 4
3930170	CDK20	cinasa dependiente de ciclina 20
6560750	UBE3C	ligasa de proteína ubiquitina E3C
870376	C9orf152	marco de lectura abierto 152 del cromosoma 9
4490544	LY6G6D	complejo de antígeno de linfocito 6, locus G6D
1990674	NUP50	nucleoporina 50 kDa
240750	TELO2	TEL2, mantenimiento de los telómeros 2, homólogo (<i>S. cerevisiae</i>)
2630102	CCDC28B	que contiene el dominio de hélice superenrollada 28B
7040131	DALRD3	que contiene el dominio que se une a anticodón DALR 3
6480209	RRAGD	que se une a GTP relacionada con Ras D
6580521	UBAC2	que contiene el dominio UBA 2
7570315	MRPL45	proteína ribosómica mitocondrial L45
6510397	WDR19	dominio de repetición de WD 19
610735	LRRC43	que contiene la repetición rica en leucina 43
2190241	AP1M1	complejo proteico relacionado con adaptador 1, subunidad mu 1
510370	SYCE2	proteína del elemento central del complejo sinaptonémico 2
2360138	ATP6V0C	ATPasa, transportadora de H ⁺ , lisosómica 16 kDa, subunidad V0 c
4610201	SNORA10	ARN nucleolar pequeño, caja H/ACA 10
3180445	C14orf79	marco de lectura abierto 79 del cromosoma 14
4890647	C1orf25	marco de lectura abierto 25 del cromosoma 1
2810400	KLHL3	similar a kelch 3 (<i>Drosophila</i>)

ES 2 708 750 T3

ILLUMINA_ID	GENE_SYMBOL	Descripción
540221	NOP2	homólogo de la proteína nucleolar NOP2 (levadura)
6020458	NR2F2	subfamilia del receptor nuclear 2, grupo F, miembro 2
10626	TRNAU1AP	proteína 1 asociada con ARNt de selenocisteína 1
3060092	LAT2	enlazador para la activación de la familia de linfocitos T, miembro 2
1850612	PARP2	poli (ADP-ribosa) polimerasa 2
3450521	ECM1	proteína de la matriz extracelular 1
4920537	POLA2	polimerasa (dirigida a ADN), alfa 2 (subunidad de 70 kD)
4760433	C16orf7	marco de lectura abierto 7 del cromosoma 16
3390373	TIMM22	homólogo de la translocasa de la membrana mitocondrial interna 22 (levadura)
3710685	CARD9	familia del dominio de reclutamiento de caspasas, miembro 9
7100079	PHF8	proteína de dedos PHD 8
150315	C21orf7	marco de lectura abierto 7 del cromosoma 21
6040703	TRIM39	que contiene el motivo tripartito 39
6650451	MYCBP2	proteína que se une a MYC 2
2750324	PRKCZ	proteína cinasa C, zeta
7400707	C1S	componente del complemento 1, subcomponente s
1070474	POC5	homólogo de la proteína centriolar POC5 (<i>Chlamydomonas</i>)
2350221	TSNAXIP1	proteína que interacciona con el factor X asociado a translina 1
2630561	RPL6	proteína ribosómica L6
6330440	MSH5	homólogo de mutS 5 (<i>E. coli</i>)
4280048	WFDC3	dominio 3 del núcleo de cuatro disulfuros WAP
4860367	ATRIP	proteína que interacciona con ATR
1990196	DACT3	apuesto, antagonista de beta-catenina, homólogo 3 (<i>Xenopus laevis</i>)
4120427	PDX1	homeocaja pancreática y duodenal 1
240333	ETS1	homólogo 1 del oncogén E26 del virus de la eritroblastosis v-ets (aviar)
4850300	ARHGAP39	proteína que activa la Rho GTPasa 39
1710639	RBM4B	proteína del motivo que se une a ARN 4B
6620278	ADI1	acirreductona dioxigenasa 1
3930577	HMG2	dominio 2 que se une al grupo de alta movilidad nucleosomal
2490377	C17orf71	marco de lectura abierto 71 del cromosoma 17
4850632	ALG8	glicosilación ligada a asparagina 8, homólogo de alfa-1,3-glucosiltransferasa (<i>S. cerevisiae</i>)
1780450	ASB6	que contiene la repetición de anquirina y caja SOCS 6
2710546	COG4	componente del complejo de golgi oligomérico 4
6620634	UBE2S	enzima que se conjuga con ubiquitina E2S

ES 2 708 750 T3

ILLUMINA_ID	GENE_SYMBOL	Descripción
5310358	TIA1	proteína que se une a ARN asociado a gránulos citotóxica TIA1
3610735	F12	factor de coagulación XII (factor de Hageman)
1500678	TFPT	pareja de fusión de TCF3 (E2A) (en leucemia infantil)
5220152	TMEM55B	proteína transmembranal 55B
4260441	CLEC3B	familia 3 del dominio de lectina de tipo C, miembro B
610358	PGS1	fosfatidilglicerofosfato sintasa 1
6350181	LOC730183	proteína LOC730183 hipotética
2100209	FAM24B	familia con similitud de secuencia 24, miembro B
1070053	SUGP2	que contiene el dominio SURP y parche G 2
4590424	PDCD2L	similar a muerte celular programada 2
2470296	ZSCAN16	que contiene el dominio de dedos de zinc y SCAN 16
1340411	CAMSAP1	proteína asociada a espectrina regulada por calmodulina 1
4210500	PSG4	beta-1-glicoproteína específica de embarazo 4
6100196	ZNF653	proteína con dedos de zinc 653
270053	GABPA	factor de transcripción de la proteína que se une a GA, subunidad alfa 60 kDa
6770097	UBTD1	que contiene el dominio de ubiquitina 1
4220184	LOC100289410	LOC100289410 hipotético
7330674	KIFC1	miembro de la familia de kinesinas C1
3400202	GPATCH1	que contiene el dominio de parche G 1
4900044	CDC7	homólogo del ciclo de división celular 7 (<i>S. cerevisiae</i>)
1470379	CCDC116	que contiene el dominio de hélice superenrollada 116
650626	C16orf68	marco de lectura abierto 68 del cromosoma 16
1300521	INSM2	asociado a insulinoma 2
2340180	TAGLN2	transgelina 2
2370064	ASGR1	receptor de asialoglicoproteína 1
1070360	APITD1	que induce apoptosis, dominio 1 similar a TAF9
10075	ZNF768	proteína con dedos de zinc 768
5260639	ZNF330	proteína con dedos de zinc 330
5360682	IL17F	interleucina 17F
7570500	COQ5	homólogo de coenzima Q5, metiltransferasa (<i>S. cerevisiae</i>)
3190246	CHN2	quimerina (quimaerina) 2
6350626	CCDC120	que contiene el dominio de hélice superenrollada 120
6330358	C9orf98	marco de lectura abierto 98 del cromosoma 9
3800068	GTF2E1	factor de transcripción general IIE, polipéptido 1, alfa 56 kDa

ES 2 708 750 T3

ILLUMINA_ID	GENE_SYMBOL	Descripción
6180598	NDUFAF1	NADH deshidrogenasa (ubiquinona) subcomplejo 1 alfa, factor de ensamblaje 1
4850674	PSAT1	fosfoserina aminotransferasa 1
6590520	ZNF839	proteína con dedos de zinc 839
1090687	POLR1D	polipéptido D de polimerasa (ARN) I, 16 kDa
2680020	DAGLB	diacilglicerol lipasa, beta
3440315	PPP2R3B	proteína fosfatasa 2, subunidad reguladora B, beta
4260731	STMN1	estatmina 1
1450707	RING1	proteína de anillo de dedos 1
380373	BANP	proteína nuclear asociada a BTG3
5900112	ZNF830	proteína de dedos de zinc 830
7160414	C7orf63	marco de lectura abierto 63 del cromosoma 7
4570500	CPNE1	copina I
2060427	SBDSP1	seudogén del síndrome de Shwachman-Bodian-Diamond 1
4570292	PHF12	proteína de dedos de PHD 12
3710068	WARS	sintetasa de triptofanil-ARNt
4260044	SQSTM1	secuestrosoma 1
730687	TCHP	tricopleína, que se une a filamentos de queratina
4900431	STUB1	homología con STIP1 y proteína 1 que contiene U-caja
6290239	ATP6V1B1	ATPasa, que transporta H ⁺ , lisosómica 56/58 kDa, subunidad V1 B1
6620669	C3orf23	marco de lectura abierto 23 del cromosoma 3
5080431	NBPF3	familia de punto de interrupción de neuroblastoma, miembro 3
510112	PTAFR	receptor del factor activador de plaquetas
3520746	MTPP	proteína de transferencia de triglicéridos microsómica
7560328	RAVER1	ribonucleoproteína, que se une a PTB 1
3930754	PRR3	rico en prolina 3
2000100	ABI2	interaccionador con abl 2
5270239	TUBD1	tubulina, delta 1
460768	LOC285943	proteína LOC285943 hipotética
5700722	TSSC1	candidato subtransferible supresor de tumores 1
1190129	SLMO2	homólogo de slowmo 2 (<i>Drosophila</i>)
1400601	TOX2	miembro de la familia de la caja del grupo TOX de alta movilidad 2
520114	PET112L	similar a PET112 (levadura)
5900020	C10orf110	marco de lectura abierto 110 del cromosoma 10
5860452	BNIP1	proteína que interacciona con BCL2/adenovirus E1B 19 kDa 1

ILLUMINA_ID	GENE_SYMBOL	Descripción
6350075	CENPBD1	que contiene el dominio CENPB que se une a ADN 1
4850296	HCFC1	factor de células hospedadoras C1 (proteína accesoria de VP16)
5050735	TMEM62	proteína transmembranal 62
3310681	LOC391578	seudogén homólogo de MAF1 (<i>S. cerevisiae</i>)
7050612	TIAM2	invasión y metástasis de linfoma de linfocitos T 2
10187	CNPY3	homólogo de canopi 3 (pez cebra)
3890398	WBP2	proteína que se une al dominio WW 2
4860184	PCBD1	cofactor de pterin-4 alfa-carbinolamina deshidratasa/dimerización de hepatocito nu alfa
130037	PHF5A	proteína con dedos de PHD 5A
6350292	C1orf50	marco de lectura abierto 50 del cromosoma 1
6420296	MRPL2	proteína ribosómica mitocondrial L2
7510687	SRCAP	proteína activadora de CREBBP relacionada con Snf2
5820333	RPUSD2	que contiene el dominio de ARN seudouridilato sintasa
2190010	RACGAP1	proteína activadora de Rac GTPasa 1
2570288	SH3YL1	que contiene el dominio SH3, similar a Ysc84 1 (<i>S. cerevisiae</i>)
2070201	CCKBR	receptor de colecistoquinina B
1570129	TRAFD1	que contiene el dominio con dedos de zinc de tipo TRAF 1
610670	ISL2	homeocaja ISL LIM 2
6370593	BCL7B	CLL/linfoma de linfocitos B 7B
4860291	HMGXB3	que contiene el dominio de caja HMG 3
2360601	NAA25	N(alfa)-acetiltransferasa 25, subunidad auxiliar NatB

Con estos genes también se realizaron análisis de ontología de los genes. El miARN de TTV podría estar desregulando varias vías importantes para la progresión del cáncer.

Ejemplo 8

5 Cribado de TCGA en busca de miARN de TTV asociado con el cáncer

El TCGA (The Cancer Genome Atlas) es una iniciativa del NIH. Los datos almacenados dentro de este depósito consisten en la secuenciación de conjuntos de datos procedentes de tejido cancerígeno y normal extraído a partir de pacientes. En este sentido, los datos extraídos mediante este análisis se pueden considerar "*in vivo*", ya que provienen directamente de tumores de pacientes. En un esfuerzo por establecer una relación entre el miARN de TTV y el cáncer, los datos de la secuenciación de ARN pequeño para el adenocarcinoma de colon, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de mama y carcinoma hepatocelular de la iniciativa TCGA, se cartografiaron frente a todos los genomas TTV de longitud completa, incluidos en la base de datos del NCBI, más varios TTV identificados recientemente en el laboratorio de los inventores. Para excluir artefactos, los miARN tomados en consideración cumplían lo siguiente: cartografiado con 2 desajustes o menos frente a genomas de TTV y cartografiado en una región en la que se había previsto que el ARN iba a adquirir la estructura de horquilla característica de un pre-miARN (Tabla 7).

Tabla 7

Conjuntos de datos de la secuenciación de ARN pequeño procedente de pacientes con diferentes tumores malignos, se escrutaron en busca de la presencia de miARN de TTV. Los pacientes se consideraron positivos para TTV cuando tenían al menos una lectura en la que se cartografiaba un miARN de TTV. Los

pacientes positivos para TTV que codificaban un miARN maduro que presentaban la "secuencia de consenso" se consideraron cuando tenían al menos una lectura en la que se cartografiaba una cepa de TTV que codificaba un miARN maduro que contenía la "secuencia de consenso". La "secuencia de consenso" para los nucleótidos 1 a 7 (que comprende la semilla (nt 2-7)) es CATCCYY y las cepas de TTV que se encontraron en el TCGA que contenían la secuencia de consenso, son TTV-HD14a y TTV-HD18a.

Tipo de cáncer	Número total de pacientes escrutados	Pacientes positivos para TTV	% de pacientes positivos para TTV	Pacientes positivos para TTV que codifican un miARN maduro que presenta la "secuencia de consenso"	%
Carcinoma de colon	421	76	18,05225653	53	12,5890736
Carcinoma hepatocelular	147	19	12,92517007	9	6,12244898
adenocarcinoma de pulmón (en curso)	213	25	11,7370892	9	4,22535211
Carcinoma de mama (en curso)	141	11	7,80141844	1	0,70921986

miARN análogos de TTV-HD14a-2-3p (es decir, con un 80% de homología o más en los nucleótidos 1 a 7 del miARN, que comprenden la semilla) se encontraron en una frecuencia más alta en pacientes con cáncer de colon que en los otros tres tipos de cáncer que se habían escrutado hasta el momento.

- 5 Las ligeras diferencias en la semilla respecto a TTV-HD14a-mir-2-3p no alteran los sitios de unión previstos en el ARNm de APC, lo que sugiere que son capaces de regular a la baja APC.

Semilla de un miARN: los nucleótidos 2 a 7 de la forma madura del miARN [80]

- 10 A pesar de los polimorfismos de nucleótido único (SNP) encontrados en la semilla de diversos miARN de TTV respecto a la semilla de TTV-HD14a-mir-2-3p, el sitio de interacción previsto con el ARNm de APC mostrado en la figura 3 (A.4) estaría conservado. El motivo de semilla más conservado (AUCCUC) tiene tres sitios adicionales para posibles interacciones dentro del ARNm de APC, además del descrito previamente para TTV-HD14a-mir-2-3p.

Esto apoyaría un papel causal para este tipo de miARN de TTV en esa enfermedad o, al menos, una asociación con el mismo.

- 15 Se ha demostrado un aumento significativo en la carga de TTV en pacientes con cáncer en comparación con los controles normales [44]. En el caso de cáncer de colon, este aumento en la carga viral estaría representado presumiblemente, principalmente por las cepas de TTV que codifican un miARN análogo al de TTV-HD14a.

Ejemplo 9

Activación de Wnt a través de un miARN de TTV

- 20 APC ejerce su actividad supresora de tumores mediante una regulación a la baja de la vía Wnt canónica, aunque se han sugerido otros papeles putativos para esa proteína. Este efecto está mediado por su participación en el "complejo de destrucción". El complejo de destrucción está formado por APC, AXIN y GSK3-beta, entre otros. Este complejo fosforila la beta-catenina, lo que permite su ubiquitinación y la degradación por el proteasoma. En ausencia de cualquiera de las proteínas del complejo de destrucción, su función se ve afectada. El resultado final es la acumulación citoplasmática de beta-catenina, que entonces se puede traslocar al núcleo, en donde activa la transcripción de sus genes diana, junto con el factor de transcripción TCF4 o LEF1. Está bien documentado que esta vía está regulada al alza en varias enfermedades malignas, así como en otras enfermedades. Por consiguiente, pensamos que la regulación a la baja de APC podría conducir a una activación de la vía de Wnt. Para comprobar esto, se utilizó un enfoque de gen informador. Se transfectaron células HEK293TT con los plásmidos que codifican el miARN de TTV-HD14a ((pCDNA-3.1(-)-TTV-HD14a-NCR(2820-3516)Sense o pCDNA-3.1(-)-TTV-HD14a-NCR(3516-2820)-AntiSense, con el genoma completo de TTV-HD14a, o transfectadas de manera simulada, junto con un plásmido que codificaba luciferasa de luciérnaga bajo el control de un promotor mínimo y siete sitios de unión para el complejo TCF4/beta catenina (plásmido TOPFLASH). Además, la luciferasa de renilla bajo el control del promotor CMV se utilizó para fines de normalización. Una regulación al alza de la vía Wnt apareció en células en las que el plásmido codificaba el miARN sentido o con el virus TTV-HD14a, en comparación con células transfectadas de forma simulada.
- 35 da.

Conclusiones

Los resultados anteriores ponen de relieve la importancia de los hallazgos experimentales como un método de diagnóstico para la infección con TTV e identifican el miARN de TTV como una diana prometedor para la prevención, el tratamiento o la recidiva del cáncer.

5 Se sabe que TTV se replica en varios tejidos [21], pero solo se replica en células mononucleares de sangre periférica cuando esas células están activadas [42]. Se ha demostrado recientemente que TTV se replica de manera más eficaz cuando son células coinfectadas con el virus de Epstein Barr [41].

10 Se conocen muy pocas cosas sobre los mecanismos moleculares que median en la infección, la replicación y la interacción virus-hospedador de los TTV. En este contexto, los inventores proporcionan una evidencia que apoya el que diversos TTV codifiquen miARN y que algunos de ellos tienen un papel biológicamente relevante, especialmente en relación con el desarrollo del cáncer.

15 Se ha mostrado en la presente invención que el miARN codificado de TTV-HD14a puede regular a la baja APC, un importante supresor tumoral. Por lo tanto, una infección con cualquiera de los TTV que codifican los miARN que se incluyen en la presente invención, podría representar un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer de colon, así como muchos otros tipos de cáncer.

20 Para respaldar estos hallazgos, los inventores detectaron miARN de TTV que regulaban a la baja APC con una frecuencia más alta en pacientes con adenocarcinoma de colon, en comparación con otros tres tipos de cáncer (adenocarcinoma de pulmón, carcinoma hepatocelular y carcinoma invasivo de mama). En consecuencia, los miARN de TTV presentados en este documento representan una diana para la prevención del cáncer de colon, así como un biomarcador putativo para la detección temprano de un subconjunto de estos cánceres.

Referencias

1. Nishizawa, T., Okamoto, H., Konishi, K., Yoshizawa, H., Miyakawa, Y. & Mayumi, M. (1997). A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem Biophys Res Commun* 241, 92-97.

25 2. Okamoto, H., Nishizawa, T., Kato, N., Ukita, M., Ikeda, H., Iizuka, H., Miyakawa, Y. & Mayumi, M. (1998). Molecular cloning and characterization of a novel DNA virus (TTV) associated with posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Hepatology* 10, 1-16.

3. Miyata, H., Tsunoda, H., Kazi, A., Yamada, A., Khan, M. A., Murakami, J., Kamahora, T., Shiraki, K. & Hino, S. (1999). Identification of a novel GC-rich 113-nucleotide region to complete the circular, singlestranded DNA genome of TT virus, the first human circovirus. *J Virol* 73, 3582-3586.

30 4. Suzuki T, Suzuki R, Li J, Hijikata M, Matsuda M, Li TC, Matsuura Y, Mishiro S, Miyamura T (2004) Identification of basal promoter and enhancer elements in an untranslated region of the TT virus genome. *J Virol* 78: 10820-10824.

5. Sébastien Pfeffer, Mihaela Zavolan, Friedrich A. Grässer, Minchen Chien, James J. Russo, Jingyue Ju, Bino John, Anton J. Enright, Debora Marks, Chris Sander, and Thomas Tuschl (2004) Identification of Virus-Encoded MicroRNAs *Science* 304 (5671), 734. [DOI: 10.1126/science.1 096781].

35 6. Aleksandra Helwak, Grzegorz Kudla, Tatiana Dudnakova, David Tollervey (2013) Mapping the Human miRNA Interactome by CLASH Reveals Frequent Noncanonical Binding. *Cell* 153, Issue 3, 654-665, ISSN 0092-8674.

7. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB (2003) Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 115: 787-798.

40 8. J. Brennecke, A. Stark, R.B. Russell, S.M. Cohen(2005) Principles of microRNA-target recognition *PLoS Biol.*, 3 , p. e85.

9. Meister, G. et al (2004) Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miARNs and siRNAs. *Mol. Cell* 15, 185-197.

10. Pillai, R. S., Artus, C. G. & Filipowicz, W (2004) Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *RNA* 10, 1518-1525.

45 11. Eulalio, A., Huntzinger, E. & Izaurralde, E (2008) Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 132, 9-14.

12. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N. & Sonenberg, N (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature Rev. Genet.* 9, 102-114.

50 13. Kozomara A, Griffiths-Jones S (2011) miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data.

- Kozomara A, Griffiths-Jones S. N 2011 39 (Database Issue):D152- D157.
14. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. (2008) miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* 36 (Database Issue):D154-D158.
- 5 15. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 34 (Database Issue):D140-D144.
16. The microRNA Registry.Griffiths-Jones S.(2004) *Nucleic Acids Res* 32 (Database Issue):D109- D111.
17. Sullivan CS, Grundhoff AT, Tevethia S, Pipas JM, Ganem D (2005) SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature* 435:682-86.
- 10 18. Cullen, B. R. (2013). MicroRNAs as mediators of viral evasion of the immune system. *Nature Immunology*, 14(3), 205-210.
19. Bauman, Y., Nachmani, D., Vitenshtein, A., Tsukerman, P., Drayman, N., Stern- Ginossar, N. & Mandelboim, O. (2011). An identical miRNA of the human JC and BK polyoma viruses targets the stress-induced ligand ULBP3 to escape immune elimination. *Cell host & microbe*, 9(2), 93-102.
- 15 20. Vereide, D. T., Seto, E., Chiu, Y. F., Hayes, M., Tagawa, T., Grundhoff, A. & Sugden, B. (2013). Epstein-Barr virus maintains lymphomas via its miARNs. *Oncogene*.
21. Okamoto, H., T. Nishizawa, M. Takahashi, S. Asabe, F. Tsuda, and A. Yoshikawa (2001) Heterogeneous distribution of TT virus of distinct genotypes in multiple tissues from infected humans. *Virology* 288:358-368.
- 20 22. I.K. Mushahwar, J.C. Erker, A.S. Muerhoff, T.P. Leary, J.N. Simons, L.G. Birkenmeyer, M.L. Chalmers, T.J. Pilot-Matias, S.M. Desai (1999) Molecular and biophysical characterization of TT virus: Evidence for a new virus family infecting humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 3177-3182.
23. Irving, W. L., J. K. Ball, S. Berridge, R. Curran, A. M. Grabowska, C. L. Jameson, K. R. Neal, S. D. Ryder, and B. J. Thomson (1999) TT virus infection in patients with hepatitis C: frequency, persistence and sequence heterogeneity. *J. Infect. Dis.* 180:27-34.
- 25 24. de Villiers EM, Borkosky SS, Kimmel R, Gunst K, Fei JW (2011) The diversity of torque teno viruses: in vitro replication leads to the formation of additional replication-competent subviral molecules. *J. Virol.* 85:7284-7295.
25. Jelcic I, Hotz-Wagenblatt A, Hunziker A, Zur Hausen H, de Villiers EM (2004) Isolation of multiple TT virus genotypes from spleen biopsy tissue from a Hodgkin's disease patient: genome reorganization and diversity in the hyper-variable region. *J. Virol.* 78:7498-7507.
- 30 26. Leppik L., Gunst K., Lehtinen M., Dillner J., Streker K., de Villiers E. M. (2007) In vivo and in vitro intragenomic rearrangement of TT viruses. *J Viro* 181, 9346-9356.
27. Ninomiya, M., et al (2007) Identification and genomic characterization of a novel human torque teno virus of 3.2 kb. *J. Gen. Virol.* 88:1939-1944.
- 35 28. Ninomiya, M., M. Takahashi, T. Nishizawa, T. Shimosegawa, and H. Okamoto (2008) Development of PCR assays with nested primers specific for differential detection of three human anelloviruses and early acquisition of dual or triple infection during infancy. *J. Clin. Microbiol.* 46:507-514.
29. Kim, D. H., Sætrom, P., Snøve, O., & Rossi, J. J (2008). MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(42), 16230-16235.
30. Sepramaniam, S., Ying, L. K., Armugam, A., Wintour, E. M., & Jeyaseelan, K (2012). MicroRNA-130a Represses Transcriptional Activity of Aquaporin 4 M1 Promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 287(15), 12006-12015.
- 40 31. Younger ST, Corey DR (2011)Transcriptional gene silencing in mammalian cells by miRNA mimics that target gene promoters. *Nucleic Acids Res* ; 39:5682-91.
32. Huang V, Place RF, Portnoy V, Wang J, Qi Z, Jia Z, et al. Upregulation of Cyclin B1 by miRNA and its implications in cancer. *Nucleic Acids Res* 2011
- 45 33. Place RF, Li LC, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad.*
34. Tyagi, S., Vaz, C., Gupta, V., Bhatia, R., Maheshwari, S., Srinivasan, A., & Bhattacharya, A. (2008). CID-miRNA: a web server for prediction of novel miRNA precursors in human genome. *Biochemical and biophysical research communications*, 372(4), 831-834.

35. Grundhoff, A. (2011). Computational prediction of viral miARNs. In *Antiviral RNAi* (pp. 143-152). Humana Press.
36. Grundhoff, A., Sullivan, C. S., & Ganem, D. (2006). A combined computational and microarray-based approach identifies novel microRNAs encoded by human gammaherpesviruses. *Rna*, 12(5), 733-750.
- 5 37. Gkirtzou, K., Tsamardinos, I., Tsakalides, P., & Poirazi, P. (2010). MatureBayes: a probabilistic algorithm for identifying the mature miRNA within novel precursors. *PLoS one*, 5(8), e11843.
38. M. Maragkakis; P. Alexiou; G. L. Papadopoulos; M. Reczko; T. Dalamagas; G. Giannopoulos; G. Goumas; E. Koukis; K. Kourtis; V. A. Simossis; P. Sethupathy; T. Vergoulis; N. Koziris; T. Sellis; P. Tsanakas; A. G. Hatzigeorgiou. Accurate microRNA target prediction correlates with protein repression levels. *BMC Bioinformatics* 2009, 10:295.
- 10 39.2/ M. Maragkakis; M. Reczko; V. A. Simossis; P. Alexiou; G. L. Papadopoulos; T. Dalamagas; G. Giannopoulos; G. Goumas; E. Koukis; K. Kourtis; T. Vergoulis; N. Koziris; T. Sellis; P. Tsanakas; A. G. Hatzigeorgiou. DIANA-microT web server: elucidating microRNA functions through target prediction. *Nucleic Acids Research* 2009 Jul 1; 37 (Web Server issue):W273-6.
- 15 40. Rehmsmeier, M., Steffen, P., Hochsmann, M., & Giegerich, R. (2004). Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *Rna*, 10(10), 1507-1517.
41. Borkosky, S. S., Whitley, C., Kopp-Schneider, A., & Zur Hausen, H. (2012). Epstein-Barr Virus Stimulates Torque Teno Virus Replication: A Possible Relationship to Multiple Sclerosis. *PLoS one*, 7(2), e32160.
- 20 42. Mariscal, L. F., Lopez-Alcorocho, J. M., Rodriguez-Iñigo, E., Ortiz-Movilla, N., de Lucas, S., Bartolomé, J., & Carreño, V. (2002). TT virus replicates in stimulated but not in nonstimulated peripheral blood mononuclear cells. *Virology*, 301(1), 121-129.
43. Zur Hausen, H., & de Villiers, E. M. (2009). TT viruses: oncogenic or tumor-suppressive properties?. In *TT Viruses* (pp. 109-116). Springer Berlin Heidelberg.
- 25 44. hong, S., Yeo, W., Tang, M. W., LIN, X. R., Mo, F., Ho, W. M., & Johnson, P. J. (2001). Gross elevation of TT virus genome load in the peripheral blood mononuclear cells of cancer patients. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 945(1), 84-92.
- 45 45. Madsen, C. D., Eugen-Olsen, J., Kirk, O., Parner, J., Christensen, J. K., Brasholt, M. S., & Krogsgaard, K. (2002). TTV viral load as a marker for immune reconstitution after initiation of HAART in HIV-infected patients. *HIV Clinical Trials*, 3(4), 287-295.
- 30 46. Thom, K., & Petrik, J. (2007). Progression towards AIDS leads to increased Torque teno virus and Torque teno minivirus titers in tissues of HIV infected individuals. *Journal of medical virology*, 79(1), 1-7.
47. Van Es, J. H., Kirkpatrick, C., Van de Wetering, M., Molenaar, M., Miles, A., Kuipers, J., & Clevers, H. (1999). Identification of APC2, a homologue of the adenomatous polyposis coli tumour suppressor. *Current biology*, 9(2), 105-S2.
- 35 48. Nakagawa, H., Murata, Y., Koyama, K., Fujiyama, A., Miyoshi, Y., Monden, M., & Nakamura, Y. (1998). Identification of a brain-specific APC homologue, APCL, and its interaction with β -catenin. *Cancer research*, 58(22), 5176-5181.
49. Mokarram, P., Kumar, K., Brim, H., Naghibalhossaini, F., Saberi-Firoozi, M., Nouraie, M., & Ashktorab, H. (2009). Distinct high-profile methylated genes in colorectal cancer. *PLoS One*, 4(9), e7012.
- 40 50. Chen, H. J., Lin, C. M., Lin, C. S., Perez-Olle, R., Leung, C. L., & Liem, R. K. (2006). The role of microtubule actin cross-linking factor 1 (MACF1) in the Wnt signaling pathway. *Genes & development*, 20(14), 1933-1945.
51. Suozzi, K. C., Wu, X., & Fuchs, E. (2012). Spectraplakins: Master orchestrators of cytoskeletal dynamics. *The Journal of cell biology*, 197(4), 465-475.
- 45 52. Zaoui, K., Benseddik, K., Daou, P., Salaün, D., & Badache, A. (2010). ErbB2 receptor controls microtubule capture by recruiting ACF7 to the plasma membrane of migrating cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(43), 18517-18522.
53. Aaltonen, L. A., Peltomaki, P., Leach, F. S., Sistonen, P., Pylkkanen, L., Mecklin, J. P., & Jen, J. (1993). Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*, 260(5109), 812-816.
54. Dreos, R., Ambrosini, G., Périer, R. C., & Bucher, P. (2013). EPD and EPDnew, high- quality promoter resources in the next-generation sequencing era. *Nucleic acids research*, 41(D1), D157-D164.
- 50 55. Munemitsu, S., Albert, I., Souza, B., Rubinfeld, B., & Polakis, P. (1995). Regulation of intracellular beta-catenin

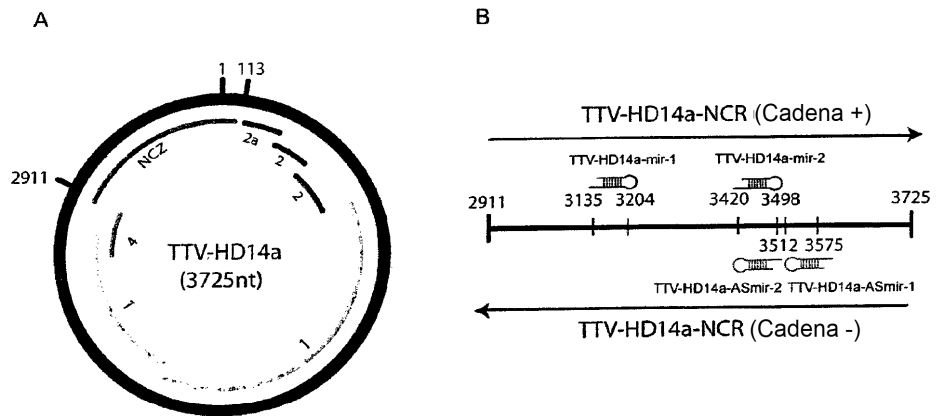
- levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(7), 3046-3050.
56. Grace, A., Butler, D., Gallagher, M., Al-Agha, R., Xin, Y., Leader, M., & Kay, E. (2002). APC gene expression in gastric carcinoma: an immunohistochemical study. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, 10(3), 221-224.
57. Perez-Sayans, M., Suárez-Peñaranda, J. M., Herranz-Carnero, M., Gayoso-Diz, P., Barros-Angueira, F., Gándara-Rey, J. M., & García-García, A. (2012). The role of the adenomatous polyposis coli (APC) in oral squamous cell carcinoma. *Oral oncology*, 48(1), 56-60.
58. Lee, H. C., Kim, M., & Wands, J. R. (2006). Wnt/Frizzled signaling in hepatocellular carcinoma. *Front Biosci*, 11(5), 1901-1915.
59. Reya, T., & Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, 434(7035), 843-850.
60. Fodde, R., Smits, R., & Clevers, H. (2001). APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer*, 1(1), 55-67.
61. Klaus, A., & Birchmeier, W. (2008). Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nature Reviews Cancer*, 8(5), 387-398.
62. Chen, J., Röcken, C., Lofton-Day, C., Schulz, H. U., Müller, O., Kutzner, N., & Ebert, M. P. (2005). Molecular analysis of APC promoter methylation and protein expression in colorectal cancer metastasis. *Carcinogenesis*, 26(1), 37-43.
63. Esteller, M., Sparks, A., Toyota, M., Sanchez-Cespedes, M., Capella, G., Peinado, M. A., & Herman, J. G. (2000). Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer research*, 60(16), 4366-4371.
64. Arnold, C. N., Goel, A., Niedzwiecki, D., Dowell, J. M., Wasserman, L., Compton, C., & Boland, C. R. (2004). APC promoter hypermethylation contributes to the loss of APC expression in colorectal cancers with allelic loss on 5q1. *Cancer biology & therapy*, 3(10), 960-964.
65. Samowitz, W. S., Slattery, M. L., Sweeney, C., Herrick, J., Wolff, R. K., & Albertsen, H. (2007). APC mutations and other genetic and epigenetic changes in colon cancer. *Molecular cancer research*, 5(2), 165-170.
66. Nagel, R., le Sage, C., Diosdado, B., van der Waal, M., Vrieling, J. A. O., Bolijn, A., & Agami, R. (2008). Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer. *Cancer Research*, 68(14), 5795-5802.
67. Karreth, F. A., Tay, Y., Perna, D., Ala, U., Tan, S. M., Rust, A. G., & Pandolfi, P. P. (2011). In vivo identification of tumor-suppressive PTEN ceRNAs in an oncogenic BRAF- induced mouse model of melanoma. *Cell*, 147(2), 382-395.
68. Liu, P., Ramachandran, S., Seyed, M. A., Schärer, C. D., Laycock, N., Dalton, W. B., & Moreno, C. S. (2006). Sex-determining region Y box 4 is a transforming oncogene in human prostate cancer cells. *Cancer research*, 66(8), 4011-4019.
69. Bagchi, A., Papazoglu, C., Wu, Y., Capurso, D., Brodt, M., Francis, D. & Mills, A. A. (2007). CHD5 is a Tumor Suppressor at Human 1p36. *Cell*, 128(3), 459-475.
70. Deshmukh, H., Yu, J., Shaik, J., MacDonald, T., Perry, A., Payton, J., & Nagarajan, R. (2011). Identification of transcriptional regulatory networks specific to pilocytic astrocytoma. *BMC medical genomics*, 4(1), 57.
71. Botchkina, I. L., Rowehl, R. A., rivadeneira, D. E., karpel, M. S., Crawford, H., dufour, A., & botchkina, G. I. (2009). Phenotypic subpopulations of metastatic colon cancer stem cells: genomic analysis. *Cancer Genomics-Proteomics*, 6(1), 19-29.
72. Revillion, F., Pawlowski, V., Hornez, L., & Peyrat, J. P. (2000). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene expression in human breast cancer. *European Journal of Cancer*, 36(8), 1038-1042.
73. Tokunaga, K., Nakamura, Y., Sakata, K., Fujimori, K., Ohkubo, M., Sawada, K., & Sakiyama, S. (1987). Enhanced expression of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene in human lung cancers. *Cancer research*, 47(21), 5616-5619.
74. Majmundar, A. J., Wong, W. J., & Simon, M. C. (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Molecular cell*, 40(2), 294-309.
75. Semenza, G. L. (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 3(10), 721-732.

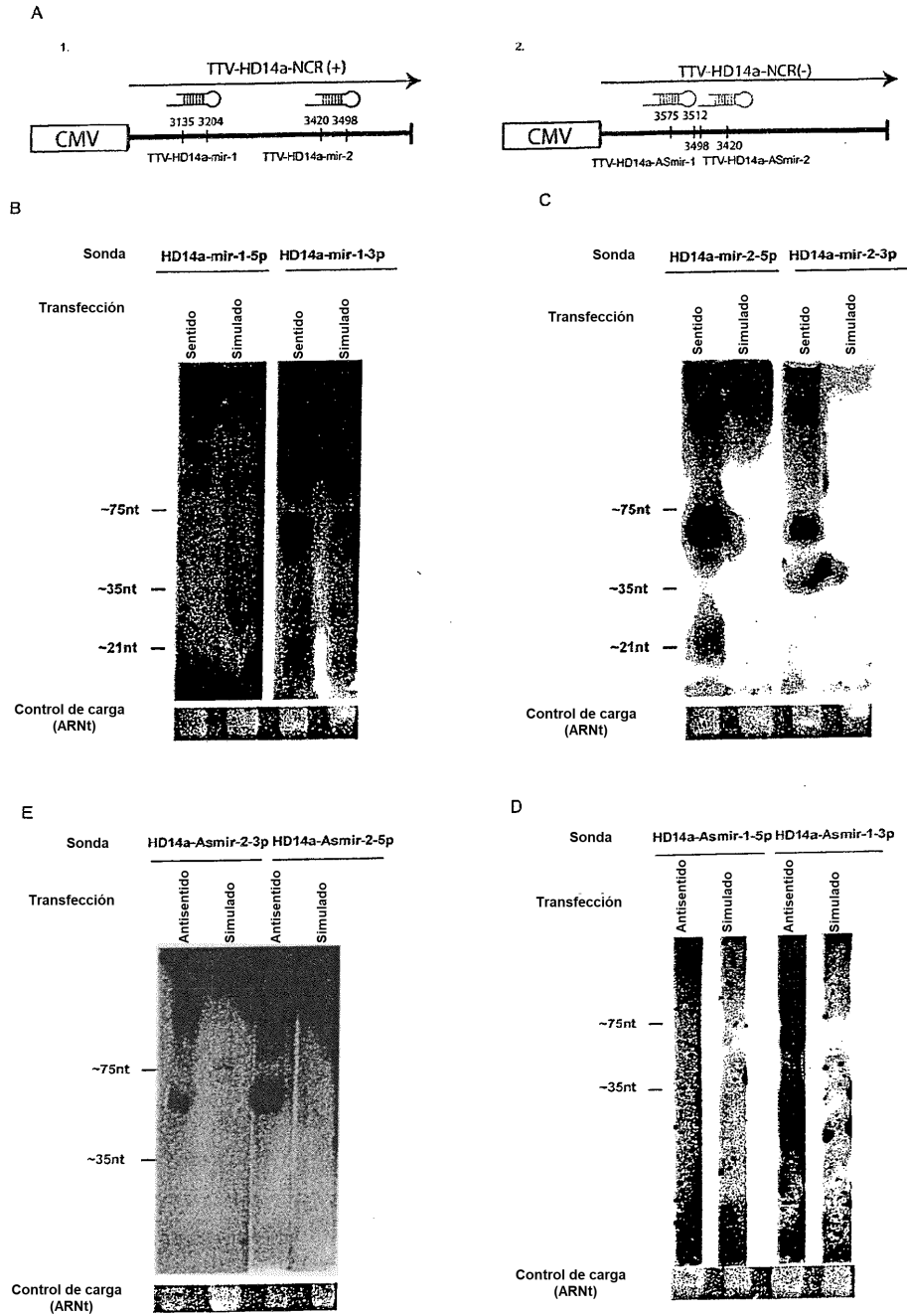
76. Buck, C.B., Thompson, C.D., Pang, Y.Y., Lowy, D.r., Schiller J.T. (2005) Maturation of papillomavirus capsids. *J Virology* 79(5), 2839-2846.
77. Okamoto H., (2009). TT viruses in animals. *Curr Top Microbiol Immunol* 331:35-52.
- 5 78. Kincaid, R.P., Burke, J.M., Cox, J.M., De Villiers, E.M., Sullivan C.S. (2013) A human Torque Teno virus encodes a miRNA that inhibits interferon signalling. *PLoS Pathog* 9(12): e1003818. doi:10.1371/journal.ppat.1003818.
79. Valeri N., et Al. (2014) MicroRNA-135b Promotes Cancer Progression by Acting as a Downstream Effector of Oncogenic Pathways in Colon Cancer. *Cancer Cell*, Volume 25 , Issue 4, 469 - 483.
80. Farh K. K-H., et Al. (2005) The Widespread Impact of Mammalian MicroRNAs on mRNA Repression and Evolution. *Science*, Vol. 310 no. 5755, 1817-1821.

REIVINDICACIONES

1. Un poli(ácido nucleico) de TTV que consiste en:
 - (a) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de nucleótidos de TTV-HD14a-mir2 representada en la Tabla 1 y que contiene la secuencia de nucleótidos CAUCCYY (con Y: C o U);
 - (b) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de nucleótidos de TTV-HD14a-mir2 representada en la Tabla 2 y que contiene la secuencia de nucleótidos CATCCYY (con Y: C o T); o
 - (c) una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos de (a) o (b).
2. El poli(ácido nucleico) de TTV según la reivindicación 1(a), que contiene una secuencia de nucleótidos seleccionada a partir del grupo que consiste en CAUCCCC, CAUCCCU, CAUCCUC y CAUCCUU.
3. El poli(ácido nucleico) de TTV según la reivindicación 1(b), que contiene una secuencia de nucleótidos seleccionada a partir del grupo que consiste en CATCCCC, CATCCCT, CATCCTC y CATCCTT.
4. El poli(ácido nucleico) de TTV según la reivindicación 1, en donde el poli(ácido nucleico) comprende un micro ARN maduro (miARN) que comprende la secuencia de nucleótidos CAUCCYY (con Y: C o U).
5. El poli(ácido nucleico) de TTV según la reivindicación 4, en el que la secuencia de nucleótidos CAUCCYY (con Y: C o U) comprende la semilla AUCCUC de un miARN maduro.
6. Un cebador de oligonucleótido o una sonda de oligonucleótido que tiene la secuencia de nucleótidos de HD14a-mir-2-5p o HD14a-mir-2-3p como se representa en la Tabla 4.
7. Un vector que contiene un poli(ácido nucleico) de TTV según la reivindicación 1, un cebador de oligonucleótido según la reivindicación 6 o una sonda de oligonucleótido según la reivindicación 6.
8. Una célula hospedadora transfectada con el vector según la reivindicación 7.
9. Un kit de diagnóstico que contiene un poli(ácido nucleico) de TTV según la reivindicación 1, un cebador de oligonucleótido según la reivindicación 6 o una sonda de oligonucleótido según la reivindicación 6.
10. El poli(ácido nucleico) de TTV según la reivindicación 1, un cebador de oligonucleótido que comprende parte del poli(ácido nucleico) de TTV según la reivindicación 1(b) y que contiene la secuencia de nucleótidos CATCCYY (con Y: C o T), en donde dicho cebador es capaz de actuar como cebador para secuenciar específicamente o amplificar específicamente el ácido nucleico de una determinada cepa aislada de TTV que contiene una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 1(b), o una sonda de oligonucleótido que comprende un poli(ácido nucleico) de TTV según la reivindicación 1, en donde dicha sonda es capaz de actuar como una sonda de hibridación para una detección específica del poli(ácido nucleico) según la reivindicación 1, para uso como un marcador temprano de un desarrollo futuro del cáncer.
11. El poli(ácido nucleico) de TTV según la reivindicación 1, para uso como un componente principal para el desarrollo de un medicamento para la prevención o el tratamiento del cáncer.
12. El poli(ácido nucleico) de TTV según la reivindicación 11, en donde el cáncer es cáncer de colon.

Figura 1





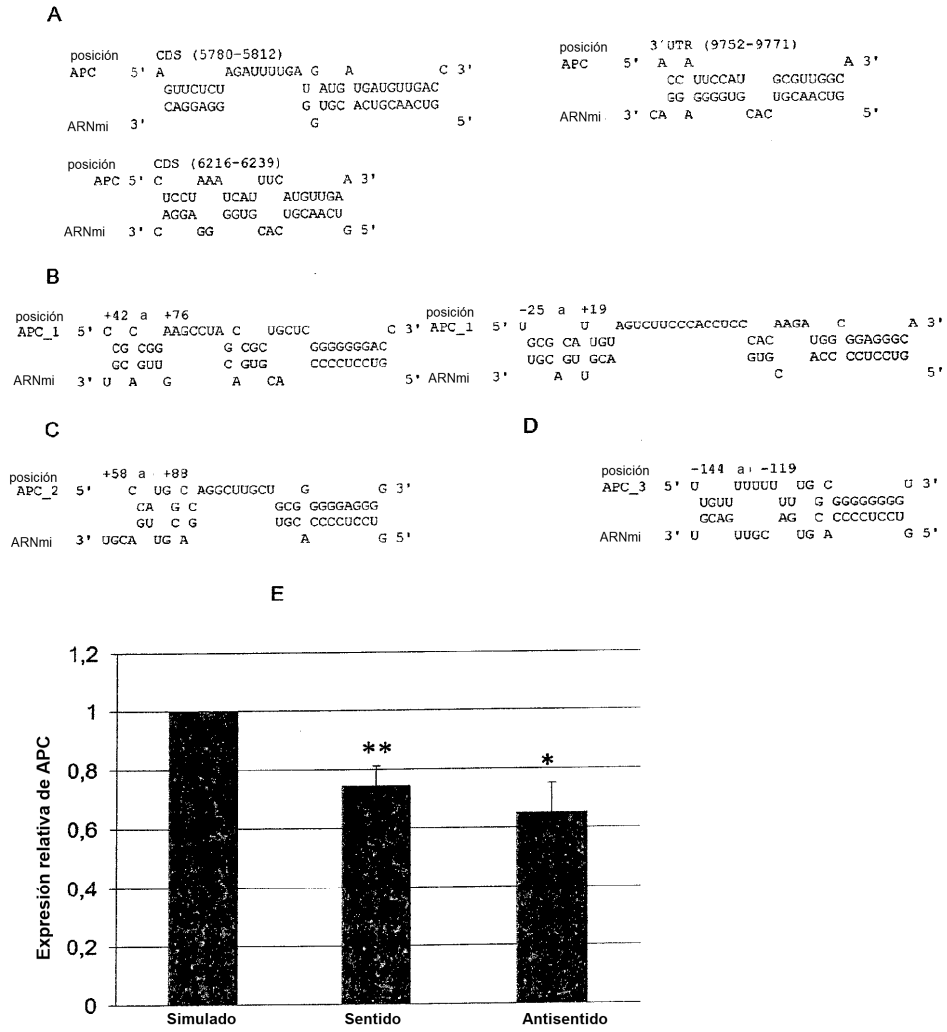


Figura 3

Fig. 4

