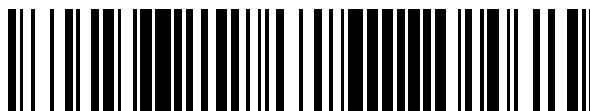


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 087**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

C07H 21/00 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.02.2012 E 17184170 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2019 EP 3301176**

54 Título: **Método para la identificación de ácidos nucleicos que regulan la metastatización**

30 Prioridad:

11.02.2011 US 201161441738 P

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

27.05.2020

73 Titular/es:

**THE ROCKEFELLER UNIVERSITY (100.0%)
New York, NY 10065, US**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 763 087 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

Método para la identificación de ácidos nucleicos que regulan la metastatización

5 Referencia cruzada a solicitud relacionada

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

10 Campo de la invención

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

Antecedentes de la invención

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

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

30 La prevención o el tratamiento eficaces de metástasis exige la comprensión de eventos moleculares y celulares, incluyendo la angiogénesis, subyacentes a este proceso complejo (Talmadge, J. E. *et al.*, Cancer Res 70 (14), 5649 (2010); Sleeman, J. *et al.*, Eur J Cancer 46 (7), 1177 (2010); y Hurst, D. R., *et al.*, Cancer Res 69 (19), 7495 (2009)). Se ha descubierto VEGF como promotor de la tumorigénesis en tumores primarios (Kim, K. J. *et al.*, Nature 362 (6423), 841 (1993)). Algunos ensayos clínicos han mostrado que la inhibición de VEGF puede prolongar, en combinación con quimioterapia, la supervivencia en 2-3 meses en pacientes con cáncer de pulmón o colorrectal de estadio IV (Hurwitz, H. *et al.*, N Engl J Med 350 (23), 2335 (2004); Giantonio, B. J. *et al.*, J Clin Oncol 25 (12), 1539 (2007); y Sandler, A. *et al.*, N Engl J Med 355 (24), 2542 (2006)). Sin embargo, no se ha probado que la inhibición de VEGF sea beneficiosa para la prevención de metástasis en la práctica de terapia adyuvante (Barugel, M. E., *et al.* Expert Rev Anticancer Ther 9 (12), 1829 (2009) y en recientes modelos de metástasis preclínicos (Paez-Ribes, M. *et al.*, Cancer Cell 15 (3), 220 (2009) y Ebos, J. M. *et al.*, Cancer Cell 15 (3), 232 (2009)). Aunque se ha propuesto que la compensación por otros factores desconocidos que fomentan la angiogénesis metastásica subyace a estos desenlaces, varios investigadores han tratado de abordar la metástasis mediante rutas distintas a la angiogénesis. Por ejemplo, el documento WO 2009082744 describió genes sobre expresados en metástasis en hueso y pulmón de 45 cáncer de mama, en los que los genes no estaban relacionados con la angiogénesis. Otros se esforzaron por identificar factores que medien en la angiogénesis metastásica. Sin embargo, han tenido un éxito limitado.

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

Sumario de la invención

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

60 Por consiguiente, en el presente documento se describe un método para inhibir el reclutamiento endotelial, así como la angiogénesis, en un sujeto que lo necesita. El método incluye una etapa de administrar al sujeto un primer agente que inhibe la expresión o actividad de una primera proteína seleccionada del grupo que consiste en IGFBP2, MERTK y PITPNC1. En un ejemplo, el sujeto tiene un trastorno de la angiogénesis, es decir, un trastorno caracterizado por angiogénesis patológica, tales como cáncer, un trastorno ocular o un trastorno inflamatorio. Los ejemplos del cáncer incluyen cáncer metastásico. El método mencionado anteriormente puede incluir además una etapa de administrar al sujeto un segundo agente que inhibe la expresión o actividad de una segunda proteína seleccionada del grupo que consiste en IGFBP2, IGF1, IGF1R, MERTK, PITPNC1, ABCB9, PSAT1, PYGB, SHMT2 y VIPR. El primer agente o el segundo agente mencionados anteriormente pueden ser un anticuerpo (o una parte de unión a antígeno del mismo), un ácido nucleico, un polipéptido o un compuesto de molécula pequeña. En un 65 ejemplo, el anticuerpo anterior es uno monoclonal que contiene una región variable de cadena pesada que

comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 mostradas a continuación.

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

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

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

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

La patente también proporciona un método para inhibir el reclutamiento endotelial en un sujeto que lo necesita. El método incluye una etapa de administrar al sujeto un primer agente que aumenta la expresión o actividad de GAS6 (es decir, un agente de activación de GAS6).

La descripción presenta además una composición que tiene un agente que aumenta la expresión o actividad de GAS6. En un ejemplo, el agente mencionado anteriormente tiene GAS6 actividad. En otros casos, el agente es un anticuerpo (o una parte de unión a antígeno del mismo), un ácido nucleico, un polipéptido o un compuesto de molécula pequeña. En un ejemplo, el agente es un polipéptido que tiene la secuencia de GAS6.

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

La invención presenta un método para la identificación de genes y ARN no codificantes que regulan la colonización por cáncer metastásico de cualquier tejido corporal. El método incluye una primera etapa de generar una población de células cancerosas de mamífero con un potencial aumentado de colonización tisular metastásica realizando tandas en serie de a) trasplante de una población de células cancerosas marcadas o no marcadas en cualquier tejido vivo del cuerpo y luego b) realización del aislamiento de dichas células cancerosas marcadas del tejido después de haberse producido la colonización metastásica y luego c) realización de un trasplante repetido de células cancerosas marcadas aisladas en tejido vivo del cuerpo. Al realizar tandas en serie de trasplante, aislamiento y trasplante repetido de células cancerosas marcadas tal como se describió anteriormente, se genera

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

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

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

Descripción de dibujos

Las figuras 1a-f son diagramas y fotografías que muestran que miR-126 endógeno suprime la colonización metastásica. **a**, obtención de imágenes de bioluminiscencia de metástasis en pulmón por células de cáncer de mama escasamente metastásicas tras la inhibición de miR-126. Se les inyectaron 4×10^4 células MDA-MB-231 que expresan un miR-126 de selección como diana en horquilla corto (miR-Zip) o la horquilla de control por vía intravenosa a ratones NOD-SCID inmunodeficientes. Los ratones representativos mostrados corresponden al conjunto MDA-MB-231/miR-126KD (parte superior) y al conjunto MDA-MB-231/reordenadas (parte inferior) en el día 49. Se cuantificó la colonización pulmonar a través de la obtención de imágenes de bioluminiscencia. $n=5$; las barras de error representan el e.e.m.; valor de p basado en una prueba de la t de Student unilateral en el día 49. Se extirparon los pulmones en el día 49 y se tiñeron de manera inmunohistoquímica para vimentina humana (parte derecha). **b**, obtención de imágenes de bioluminiscencia de metástasis sistémica por células de cáncer de mama escasamente metastásicas con expresión de miR-126 inhibida. Se les inyectaron 4×10^4 células MDA-MB-231 que expresan un miR-126 de selección como diana en horquilla corto o la horquilla de control a través de la vía intracardiaca a ratones desnudos atímicos. Los ratones representativos mostrados corresponden al conjunto MDA-MB-231/miR-126KD (parte superior) y al conjunto MDA-MB-231/reordenado (parte inferior) en el día 34. Se midió la colonización en cuerpo entero mediante bioluminiscencia y se cuantificó. $n=4$; las barras de error representan el e.e.m.; valor de p basado en una prueba de la t de Student unilateral en el día 34. **c**, se contó el número total de focos metastásicos en ratones a los que se les inyectó por vía intracardiaca células MDA-MB-231/miR-126KD y MDA-MB-231/reordenadas (parte superior). Se muestran imágenes representativas de nódulos metastásicos en hueso y cerebro (parte inferior). **d**, se les inyectaron 5×10^5 células MDA-MB-231 que expresan un miR-126 de selección como diana en horquilla corto o la horquilla de control a los panículos adiposos mamarios de ratones inmunodeficientes. Se midieron los volúmenes tumorales a lo largo del tiempo. $n=15$; las barras de error indican el

e.e.m.; valores de p basados en una prueba de la t de Student unilateral en el día 35. **e**, se tiñeron los pulmones extirpados de (a) para vimentina humana y se midió el tamaño de cada nódulo metastásico a través de análisis de imágenes usando ImageJ. **f**, se les inyectaron 4×10^4 células Lm2 que expresan un casete de pre-miR-126 inducible por doxiciclina a través de la vena de la cola a ratones NOD-SCID en el día 0. En el día 3, se añadieron doxiciclina (2 mg/ml) y sacarosa (5 %) al agua para beber en un grupo de ratones y sólo sacarosa al 5 % en el otro. En el día 48, se extirparon los ratones y se tiñeron de manera inmunohistoquímica para vimentina humana (parte derecha). Se muestra el número total de nódulos en cada pulmón en la parte izquierda.

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

Las figuras 3a-3f son diagramas y fotografías que muestran la identificación sistemática de una red reguladora de miR-126 que media en el reclutamiento endotelial metastásico. **a**, El rasgo distintivo de metástasis de miR-126 se compone de genes sobreexpresados en células metastásicas, regulados por disminución por miR-126 OE, e inducidos por miR-126 KD. El mapa de calor representa niveles de expresión normalizados según la varianza basados en análisis de microalineamientos y de qPCR. El mapa de colores corresponde al cambio de desviaciones estándar con respecto a la media. **b-d**, curvas de Kaplan-Meier para la (b) cohorte de cáncer de mama UCSF (117 tumores), (c) cohorte NCI (295 tumores), y (d) la cohorte combinada NCI/MSK/UCSF (494 tumores) que representa la supervivencia libre de metástasis de aquellos pacientes cuyos cánceres primarios sobreexpresaron el rango distintivo de ocho genes de miR-126 (positivos) y los que no lo hicieron (negativos). Valores de p basados en la prueba de rangos logarítmicos de Mantel-Cox. **e**, Ensayos de indicador de luciferasa de genes de metástasis de miR-126 en células MDA-MB-231 que expresan un miR-126 de selección como diana en horquilla corto o la horquilla KD de control. Se transfectaron constructos de indicador que contenían el gen de luciferasa en el sentido de 5' de las secuencias de 3'UTR o codificantes (CDS) de cada gen regulado por miR-126 en las diversas líneas celulares y

se sometió a ensayo la actividad luciferasa a las 30 horas tras la transfección. $n=4$; las barras de error representan el e.e.m.; se obtuvieron valores de p usando la prueba de la t de Student. **f**, se mutaron las regiones complementarias de miR-126 de los constructos 3'UTR/CDS y se repitió el ensayo de indicador de luciferasa con estos constructos en células MDA-MB-231 que expresan un miR-126 de selección como diana en horquilla corto o la horquilla de control (parte derecha). $n=4$; las barras de error representan el e.e.m.; se obtuvieron valores de p usando la prueba de la t de Student.

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

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

Las figuras 6a-6e son diagramas y fotografías que muestran que MERTK medió en el reclutamiento a través de GAS6. **a**, se cuantificaron los niveles de IGFBP2 en medios condicionados a partir de Lm2 células que expresan la horquilla de control o 2 horquillas independientes contra PITPNC1 tal como se determina mediante ELISA. **b**, se sembraron $2,5 \times 10^4$ células MDA-MB-231 que expresan una horquilla de control o una horquilla que selecciona como diana miR-126 por cuadruplicado. Luego se evaluó la migración en Trans-well de 5×10^4 células HUVEC hacia las células cancerosas en presencia de GAS6 1 ng/ml y/o MerFc 10 μ g/ml contando el número de células que habían migrado al lado basal de insertos porosos en imágenes obtenidas usando ImageJ. $n=4$; las barras de error representan el e.e.m., se obtuvieron valores de p usando la prueba de la t de Student. **c**, simuló un gradiente de IGFBP2 en presencia de Gas6 y MERTK secretado mezclando proteína rhIGFBP2 (520 ng), Gas6 (5 ng) y MerFc (10 μ g) con Matrigel (1:1) en el fondo de un pocillo. Luego se evaluó la quimiotaxia de $1,5 \times 10^5$ células HUVEC a lo largo del gradiente contando el número de células que habían migrado al lado basal de insertos Trans-well después de 20 h usando el software ImageJ. $n=4$; las barras de error representan el e.e.m., valores de p obtenidos usando la

prueba de la t de Student. **d**, Se tiñeron doblemente secciones de pulmón para vimentina y MECA-32. Se trazó el borde de cada nódulo basándose en la tinción de vimentina humana y la tinción de MECA-32 en el interior del nódulo metastásico destacado en negro (paneles inferiores). Luego se determinó el área positiva para la tinción de MECA-32 dentro de cada nódulo usando ImageJ y se presentó como el área cubierta por la tinción de MECA-32 por área del nódulo dado (% de densidad de vasos). La distribución de % de densidad de vasos entre las células LM2 inyectadas que expresan horquillas que seleccionan como diana IGFBP2, PTPNC1, MERTK o una horquilla de control se muestra en una representación gráfica de fracción acumulada. $n=4$, valor de p basado en la prueba de Kolmogorov-Smirnov. **e**, esquema de la regulación por miR-126 de reclutamiento endotelial y colonización metastásica a través de interacción con IGFBP2, PTPNC1 y MERTK.

La figura 7 es un diagrama que muestra que el sistema de miARN-ARNhc antisentido miR-Zip inhibió de manera estable la expresión de miR-126 en células MDA-MB-231. Se transdujeron células MDA-MB-231 con lentivirus que expresan o bien un constructo de miR-Zip que selecciona como diana miR-126 o una versión reordenada del constructo que no selecciona como diana ningún microARN conocido (SYSTEM BIOSCIENCES, Mountain View, CA). Luego se sometieron a prueba los niveles de expresión de miR-126 maduro usando qPCR.

La figura 8 es un conjunto de fotografías y un diagrama que muestran que miR-126 expresado en células de cáncer de mama regula la perfusión en nódulos metastásicos. Se les inyectaron 4×10^4 células MDA-MB-231 que expresan un miR-126 de selección como diana en horquilla corto o la horquilla de control por vía intravenosa a ratones NOD-SCID inmunodeficientes. En el día 59, se le inyectó por vía intravenosa una disolución de dextrano de bajo peso molecular (MW de 10.000) marcado con FITC. Se permitió que circularan las moléculas de dextrano durante 15 min antes de sacrificarse los ratones y extirparse los pulmones. Se prepararon secciones congeladas y se tiñeron para vimentina humana con el fin de localizar nódulos metastásicos, y se cuantificó la señal de FITC en el interior de los nódulos con un umbral constante usando ImageJ. $n=5$; las barras de error representan el e.e.m., valores de p obtenidos usando la prueba de la t de Student.

Las figuras 9a-9b son un conjunto de diagramas que muestran que miR-126 endógeno no suprimió la adhesión, proliferación o formación de tubos endoteliales. **a**, se sembraron 5×10^4 MDA células que expresan miR-126 KD o un vector KD de control sobre una monocapa de HUVEC y se evaluó la adhesión. Se obtuvieron imágenes de células que se habían adherido a la monocapa de HUVEC y se analizaron usando el software ImageJ. $n=4$; las barras de error representan el e.e.m. **b**, se obtuvieron medios condicionados a partir de 5×10^5 células MDA miR-126 KD o MDA control KD incubando las células con medios EGM-2 durante 24 h. Se sembraron $2,5 \times 10^4$ células HUVEC por triplicado, se hicieron crecer en los medios condicionados y se contaron las células viables a los 5 días después de la siembra. $n=3$; las barras de error representan el e.e.m. **c**, se mezclaron 2×10^4 células HUVEC con 1×10^4 MDA miR-126 KD o MDA control KD células, y se sometió a ensayo la formación de tubos por células HUVEC. Se obtuvieron imágenes de cada pocillo y se analizó el número de puntos de ramificación en cada imagen usando el software MetaMorph. $n=3$; las barras de error representan el e.e.m.

Las figuras 10a-10c son un conjunto de diagramas y diagramas que muestran que miR-126 endógeno reguló la angiogénesis, pero no el reclutamiento de linfocitos positivos para CD45 y de macrófagos positivos para Mac-2. **a-c**, se mezclaron 5×10^5 células MDA que expresan la horquilla de control o una horquilla que selecciona como diana miR-126 en una razón 1:1 con Matrigel y se inyectaron en el pániculo adiposo mamario. 5 min antes del sacrificio, se inyectó lectina biotinilada en la vena de la cola. Se extirparon tumores de tamaño coincidente y se detectaron vasos sanguíneos funcionales mediante tinción de la lectina inyectada (**a**), se detectaron linfocitos CD45+ mediante el anticuerpo anti-CD45 (**b**) y se detectaron macrófagos Mac-2+ mediante el anticuerpo anti-Mac-2 (**c**).

La figura 11 es un diagrama de Venn que muestra la ruta experimental integradora que dio como resultado la identificación de supuestos genes diana de miR-126. Se solaparon perfiles de transcriptomas de genes regulados por disminución en más de 1,6 veces tras la sobreexpresión de miR-126 con genes regulados por incremento en más de 1,4 veces en células LM2 metastásicas en comparación con las células MDA parentales. Esto condujo a la identificación de 23 posibles genes diana de miR-126. Mediante qPCR, 8 de estos 23 genes se vieron modulados por miR-126 tanto en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 como en la línea celular primaria CN34. Se sometieron estos 8 genes a pruebas funcionales para determinar la regulación directa por miR-126 a través de ensayos de indicador de luciferasa.

Las figuras 12a-12b son diagramas que muestran que miR-126 reguló IGFBP2 y MERTK a través de interacciones de 3'UTR y PTPNC1 y SHMT2 a través de interacciones de CDS. **a**, **b**, ensayos de indicador de luciferasa del conjunto de genes de metástasis de miR-126 en células MDA-MB-231 que expresan un miR-126 de selección como diana en horquilla corto así como la horquilla KD de control. Se transfectaron constructos de indicador que contenían el gen de luciferasa en el sentido de 5' de 3'UTR (**a**) o CDS (**b**) de ABCB9, IGFBP2, MERTK, PTPNC1, PSAT1, PYBG, SHMT2 y VIPR1 en las diversas líneas celulares y se sometió a ensayo la actividad luciferasa a las 30 horas tras la transfección. $n=4$; las barras de error representan el e.e.m.; se obtuvieron valores de p usando la prueba de la t de Student.

Las figuras 13a-13d son un conjunto de diagramas que muestran que horquillas independientes regularon por disminución los niveles de expresión de IGFBP2, PTPNC1 y MERTK en células LM2. Se transdujeron células LM2

con lentivirus que expresan una horquilla de control o un constructo de horquilla corta que selecciona como diana IGFBP2, PTPN11 o MERTK. Se analizaron los niveles de expresión de los genes diana a través de qPCR.

5 La figura 14 es un diagrama que muestra el análisis de proliferación de genes diana de miR-126. Se sembraron $2,5 \times 10^4$ células LM2 que expresan una horquilla de control u horquillas cortas que seleccionan como diana IGFBP2, PTPN11 o MERTK por triplicado y se contaron las células viables a los 5 días después de la siembra. $n=3$; las barras de error representan el e.e.m.

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

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

20 La figura 17 es un conjunto de fotografías y diagramas que muestran que IGFBP2, PTPN11 y MERTK fomentaron la angiogénesis metastásica. Se tiñeron doblemente de manera histológica secciones de pulmón para vimentina humana y se inyectó lectina por vía intravenosa. Se delimitaron los bordes de nódulo basándose en la tinción de vimentina y la tinción de lectina en el interior de los nódulos metastásicos. Se usó ImageJ para determinar el área positiva para la tinción de lectina dentro de cada nódulo. % de densidad de vasos representa el área cubierta por la tinción de lectina por área de un nódulo dado. La distribución de % de densidad de vasos entre las células LM2 inyectadas que expresan la horquilla de control u horquillas cortas que seleccionan como diana IGFBP2, PTPN11 o MERTK se muestra en una representación gráfica de fracción acumulada. $n=5$. Valor de p basado en la prueba de Kolmogorov-Smirnov.

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

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

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

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

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

60 La figura 23 es un diagrama que muestra que una composición que contiene concentraciones fisiológicas del anticuerpo monoclonal M14 puede inhibir el reclutamiento endotelial por células de cáncer de mama metastásicas. Como en los experimentos descritos anteriormente, se usó un ensayo de migración en Trans-well para cuantificar el reclutamiento endotelial por células metastásicas. Se pusieron células de cáncer de mama humanas LM2 altamente metastásicas en la parte inferior de una cámara de Boyden, en la que pudo someterse a ensayo su capacidad para reclutar HUVECs a través de un inserto Trans-well poroso. La adición de una pequeña concentración fisiológica de M14 al Transwell pudo inhibir significativamente el reclutamiento y la migración (células migradas por campo) de células HUVEC (reducción del 50 % de las células migradas) frente a los controles negativos (anticuerpos contra IgG y M5). Las barras de error representan el e.e.m.

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

Descripción detallada de la invención

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

Tal como se da a conocer en el presente documento, un análisis sistemático y la atención centrada en la metástasis y angiogénesis metastásica condujo a la identificación de varias moléculas, incluyendo IGFBP2 secretado, la transferasa PTPN1, la cinasa MERTK y miR-126, como dianas para la inhibición terapéutica con el potencial para tratar cáncer metastásico. Una ruta recién descubierta coordina los genes proangiogénicos de IGFBP2, PTPN1 y MERTK que se correlacionan en la expresión con metástasis humana. Estos genes representan reguladores de la angiogénesis y el reclutamiento endotelial metastásicos. Por ejemplo, IGFBP2, una proteína secretada por células metastásicas, recluta endotelios modulando la actividad mediada por IGF1 del receptor de tipo I de IGF en células endoteliales.

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

Para el inhibir reclutamiento endotelial y la angiogénesis resultante en un sujeto que lo necesita, puede administrarse al sujeto un agente que inhibe la expresión o actividad de una proteína seleccionada de IGFBP2, IGF1, IGF1R, MERTK, PTPN1, ABCB9, PSAT1, PYGB, SHMT2 y VIPR. Se enumeran a continuación las secuencias de aminoácidos de estas proteínas. El agente puede ser un ácido nucleico, un polipéptido, un anticuerpo o un compuesto de molécula pequeña.

IGFBP2

MLPRVGC PALFLPPPLLP LLLLLLGASGGGGGARA EVLFRCPPCTPERLAACGPPP
VAPPA AVAAVAGGARMPCAELVREPGCGCCSV CARLEGEACGVYTPRCGQGLRCYPHPS
ELPLQALVMGEGTCEKRRDAEY GASPEQVADNGDDHSEGGLVENHVDSTMNMLGGGGSAG
RKPLKSGMKELAVFREKVTEQHRQMGKGKHHGLLEPKKLRPPPARTPCQQLDQVLER
ISTMRLPDERGPLEHLYSLHIPNCDKHGLYNLQCKMSLNGQRGECWCVNPNNTGKLIQGA
PTIRGDPECHLFYNEQQEARGVHTQRMQ

IGF1 (isoforma 1)

MGKISSSLPTQLFKCCFCDFLKVKMHTMSSSHLFYLALCLLTFTSSATAGPETLCGAELVD
ALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSARS
VRAQRHTDMPKTQKYQPPSTNKNTKSQRRKGSTFEERK

IGF1 (isoforma 2)

MITPTVKMHTMSSSHLFYLALCLLTFTSSATAGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKP
TYGSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSARSVRAQRHTDMPKTQKEV
HLKNASRGSAGNKNYRM

IGF1 (isoforma 3)

MGKISSSLPTQLFKCCFCDFLKVKMHTMSSSHLFYLALCLLTFTSSATAGPETLCGAELVD
ALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSARS
VRAQRHTDMPKTQKYQPPSTNKNTKSQRRKGWPKTHPGGEQKEGTEASLQIRGKKKEQRR
EIGSRNAECRGKKGK

IGF1 (isoforma 4)

MGKISSSLPTQLFKCCFCDFLKVKMHTMSSSHLFYLALCLLTFTSSATAGPETLCGAELVD
ALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSARS
VRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSAGNKNYRM

5 IGF1R

MKSGSGGGSPTSLSWGLLFLSAALSLWPTSGEICGPGIDIRNDYQQLKRENC TVIEGYLH
ILLISKAEDYRSYRFPKLT VITEYLLLFRVAGLES LGDLFPNLT VIRGWKLFYNYALVIF
EMTNLKDIGLYNLRNITRGAIRIEKNADLCYLSTVDWSLILDVSNNYIVGNKPPKECGD
LCPGTMEEKPMCEKTTINNEYNYRCWTTNRCQKMC PSTCGKRAC TENNECCHPECLGSCS
APDNDTACVACRHYYYAGVCPACPPNTYRFE GWRCVDRDFCANILSAESSDSEGFVIHD
GECMQECPSGFIRNGSQSMYCIPCEGPCPKVCEEEKTKTIDS VTSAQMLQGCTIFKGNL
LINIRRGNNIASELENFMGLIEVVTGYVKIRHSHALVSL SFLKNLRLILGEEQLEGNYSF
YVLDNQNLQQLWDWDHRNLTIKAGKMYFAFNPKLCVSEIYRMEEVTG TKGRQSKGDINTR
NNGERASCESDVLHFTSTTTSKNR IIITWHRYPDPYRDLISFTVYYKEAPFKNVTEYDG
QDACGSNSWNMVDVLDLPNKDVEPGILLHGLKPWTQYAVYVKAVTLTMVENDHIRGAKSE
ILYIRTNASVPSIPLDVL SASNSSSQLIVKWNPPSLPNGNLSYYIVRWQRQPQDGYLYRH
NYCSKDKIPIRKYADGTIDIEEVTENPKTEVCGGEKGCCACPKTEAEKQAEKEEA EYRK
VFENFLHNSIFVPRPERKRRDVMQVANTTMSSRSRNTTAADTYNITDPEELETEY PFFES
RVDNKERTVISNLRPFTLYRIDIHSCNHEAEKLGCSASNFVFARTMPAEGADDIPGPVTW
EPRPENSIFLKWPEPENPNGLILMYEIKYGSQVEDQRECVSRQ EYRKYGAKLNLNLPGN
YTARIQATSLSGNGSWTDPVFFYVQAKTGYENFIHLIIALP VAVLLIVGGLVIMLYVFHR
KRNSRLGNGVLYASVNPEYFSAADVVPDEWEVAREKITMSREL GQGSFGMVYEGVAKG
VVKDEPETRVAIKTVNEAASMRERIEFLNEASVMKEFNCHHVRL LGVVSQGGPTLVIME
LMTRGDLKSYLRSLRPEMENNPVLAPP SL SKMIQ MAGEIADGMAYLNANKFVHRDLAARN
CMVAEDFTVKIGDFGMTRDIYETDYRKGGKGLLPVRWMSPE SLKDGVTFTYS DVWSFGV
VLWEIATLAEQPYQGLSNEQVLR FVMEGGLLDKPDNCPDMLFELMRMCWQYNPKMRPSFL
EIISSIKEEMEPGFREVVSFY YSEENKLP EPEELDLEPENMESVPLDPSASSSSLPLPDRH
SGHKAENGPGPGVLVLRASFDERQPYAHMNGGRKNERALPLPQSSTC

MERTK

10

MGPAPLPLLLGLFLPALWRRAITEAREEAKPYPLFPGPFP GSLQTDHTPLLSLPHASGYQ
PALMFSP TQGRPHTGNVAIPQVTSVESKPLPPLAFKHTVGHIILSEHKGVKFNC SIVP
NIYQDTTISWWKDGKELLGAHHAITQFYPDDEVTAI IASFSITSVQ RSDNGSYICKMKIN
NEEIVSDPIYIEVQGLPHFTKQPESMNVTNRNTAFNLTCQAVGPPEPVNIFWVQNSSRVNE
QPEKSPSVLTVPG LTEMVAFSCEAHNDKGLTVSKGVQINIKAI PPSPTVEVSIRNSTAHSI

LISWVPGFDGYSPFRNCSIQVKEADPLSNGSVMIFNTSALPHLYQIKQLQALANYSIGVS
CMNEIGWSAVSPWILASTTEGAPSVAPLNVTVFLNESSDNVDIRWMKPPTKQQDGELVGY
RISHVWQSAGISKEELLEEVGQNGSRARISVQVHNATCTVRIA AVTRGGVGFSDPVKIFI
PAHGWDYAPSSTPAPGNADPVLIIFGCF CGFILIGLILYISLAIRKRVQETKFGNAFTE
EDSELVNNYIAKKSFCRRRAIELTLHSLGVSEELQNKLEDVVIDRNL LILGKILGEGEFGS
VMEGNLKQEDGTSLKVAVKTMKLDNSSQREIEEFLSEAACMKDFSHPNVIRLLGVCIEMS
SQGIPKPMVILPFMKYGD LHTYLLYSRLETGPKHIPLQTL LKFMVDIALGMEYLSNRNFL
HRDLAARNCMRLRDDMTVCVADFGLSKKIYSGDYRQGR IAKMPVKWIAIESLADRVYTSK
SDVWAFGVMTWEIATRGMTPYPGVQNH EMYDYLLHGHRLKQPEDCLDELYEIMYSCWR TD
PLDRPTFSVLRLQLEKLLES LDPVRNQADVIYVNTQLLESSEGLAQGSTLAPLDL NIDPD
SIIASCTPRAAISVVTAEVHDSKPHEGRYILNGGSEEWEDLTSAPSAAVTA EKNSVLPGE
RLVRNGVSWSHSSMLPLGSSLPDELLFADD SSEGSEVLM

PTTPNC1 (isoforma a)

15

MLLKEYRICMPLTVDEYKIGQLYMISKHSHEQSDRGEGVEVVQNEPFEDPHHGNGQFTEK
RVYLNSKLPSWARAVVPKIFYVTEKA WNYYPYTITEYTC SFLPKFSIH IETKYEDNKGSN
DTIFDNEAKDVEREVC FIDIACDEIPERYYKESED PKHFKSEKTGRGQLREGWRD SHQPI
MCSYKLVTVKFVWGLQTRVEQFVHKVVRDILLIGHRQAF AWVDEYDMTMD E VREFERA
TQEATNKKIGIFPPAISISSIPLLPSSVRSAPSSAPSTPLSTDAPEFLSVPKDRPRKKSA
PETLTLPDPEKKATLNLPGMHSSDKPCRPKSE

PITPNC1 (isoforma b)

MLLKEYRICMPLTVDEYKIGQLYMI SKHSHEQSDRGEGVEVVQNEPFEDPHHGNGQFTEK
RVYLNSKLP SWARAVVPKIFYVTEKAWNYYPYTITEYTCSFLPKFSIH IETKYEDNKGSN
DTIFDNEAKDVEREVC FIDIACDEIPERYKESDPKHFKSEKTGRGQLREGWRD SHQPI
MCSYKLVTVKFVWGLQTRVEQFVHKVVRDILLIGHRQAFWVDEWYDMTMDDVREYEKN
MHEQTNIKVCNQHSSPVDDIESHAQTST

5 ABCB9

MRLWKAVVVTLAFMSVDICVTTAIYVFSHLDRSLLEDIRHFNIFDSVLDLWAAACLYRSCL
LLGATIGVAKNSALGPRRLRASWL VITLVCLFVGIYAMVKLLLFSEVRRPIRDPWF WALF
VWTYISLGASFLLWLLSTVRPGTQALEPGAATEAEGFPGSGRPPPEQASGATLQKLLSY
TKPDVAFLVAASFFLIVAALGETFLPYTGRAIDGIVI QKSMDQFSTAVVIVCLLAIGSS
FAAGIRGGIFTLIFARLNI RLNRCLFRSLVSQETSFFDENRTGD LISR L TSDTTMVSDLV
SQNINVFLRNTVKVTGVVVFMSLSWQLSLVTFMGFP IIMMVSN IYGKYYKRLSKEVQNA
LARASNTAEETISAMKT VRSFANEEEEAEVYLRKLQQVYKLN RKEAAAYMYVWGSGLTL
LVVQVSILYYGGHLVISGQMTSGNLI AFIIYEFVLGDCMESVGSVYSGLMQGVGA AEKVF
EFIDRQPTMVHDGSLAPDHLEGRVDFENVTF TYRTRPHTQV LQNVSFSLSPGKV TALVGP
SGSGKSSCVNILENFYPLEGGRVLLDGKPI SAYDHKYLHRV I SLVSQEPVLFARSITDNI
SYGLPTVPFEMVVEAAQKANAHGFIMELQDGYSTETGEKGAQLSGGQKQRVAMARALVRN
PPVLILDEATSALDAESEYLIQQA IHGNLQKH TVLIIA HRLSTVEHAHLIVVLDKGRVVQ
QGTHQQLLAQGGLYAKLVQRQMLGLQPAADFTAGHNEPVANGSHKA

PSAT1 (isoforma 1)

10

MDAPRQVVNFPGPAKLPHSVLLEIQKELLDYKGVGISVLEMSHRSSDFAKIINN TENLV
RELLAVPDNYKVI FLQGGGCGQFS AVPLNLIGLKAGRCADYVVTGAWSAKAAEEAKKFGT
INIVHPKLGSYTKIPDPSTWNLPDASYVYYCANETVHGVEFDFIPDVKGAVLVCDMSSN
FLSKPVDVSKFGVIFAGA QKNVGSAGVTVVIVRDDL LGFALRECPSVLEYKVQAGNSSLY
NTPPCFSIYVMGLVLEWIKNNGGAAAMEKLSSIKSQT IYEIIDNSQGFYVCPVEPQNRSK
MNIPFRIGNAKGDDALEKRFLDKALELNMLS LKGHR SVGGIRASLYNAV TIEDVQKLA AF
MKKFLEMHQL

PSAT1 (isoforma 2)

15

MDAPRQVVNFPGPAKLPHSVLLEIQKELLDYKGVGISVLEMSHRSSDFAKIINN TENLV
RELLAVPDNYKVI FLQGGGCGQFS AVPLNLIGLKAGRCADYVVTGAWSAKAAEEAKKFGT
INIVHPKLGSYTKIPDPSTWNLPDASYVYYCANETVHGVEFDFIPDVKGAVLVCDMSSN
FLSKPVDVSKFGVIFAGA QKNVGSAGVTVVIVRDDL LGFALRECPSVLEYKVQAGNSSLY
NTPPCFSIYVMGLVLEWIKNNGGAAAMEKLSSIKSQT IYEIIDNSQGFYVSVGGIRASLY
NAV TIEDVQKLA AFMKKFLEMHQL

PYGB

MAKPLTDSEKRKQISVRGLAGLDVAEVRKSFNRHLHFTLVKDRNVATPRDYFFALAH TV
RDHLVGRWIRTQQHYERDPKRIYYLSLEFYMGRTLQNTMVNLGLQ NACDEAIYQLGLDL
EELEEIEEDAGLGNGGLGRLAACFLDSMATLG LAAYGYGIRYEF G I FNQKIVNGWQVEEA
DDWLRYGNPWEKARPEYMLPVH FYGRVEHTPDGVKWLD TQVVLAMPYDTPVPGYKNNTVN
TMRLWSAKAPNDFKLQDFNVGDYIEAVLDRNLAENI SRVLYPNDNFFEGKELRLKQ EYFV
VAATLQDI IRRFKSSKFGCRDPVRTCFETFPDKVAIQ LNDTHPALSIPELMRILVDVEKV
DWDKAW EITKKTCA YTNHTVLP EALERWPVSMFEKLLPRHLEI IYAINQRHLDHVAALFP
GDVDRLRMSVIEEGDKRINMAHLCVIGSHAVNGVARIHSEIVKQSVFKDFYELEPEKF
QNKTNGITPRRWLLLCNFG LADTIVEKIGEEFLTDLSQLKKLLPLVSDEVFIRDVAKVQ
ENKLFSAFLEKEYVKINPSSMFDVHV KRIHEYKRQLLNCLHVVTLYNRIKRDPAKAFV
PRTVMIGGKAAPGYHMAKLI I KLVTSIGDVVNHD PVVGDRLKVI FLENYRVSLAEKVIPA
ADLSQQI STAGTEASGTGNMKFMLNGALTIGTMDGANVEMAE EAGAENLFI FGLRVEDVE
ALDRKGYNAREYYDHLPELQAVDQISSGFFSPKEPDCFKDIVNMLMHDRFKVFADYEA
YMQCQAQVDQLYRNPKEWTKKVIRNIACSGKFS SDR TITEYAREIWGVEPSDLQIPPN I
PRD

20

SHMT2 (isoforma 1)

MLYFSLFWAARPLQRCGQLVRMAIRAQHSNAAQTQTGEANRGWTGQESLSDSDPEMWELL
QREKDRQCRGLELIASENFCRAALEALGSCNNKYSEGYPGKRYYGGAEVVDEIELLCQ
RRALEAFDLDPAQWGVNVQPYSGSPANLAVYTALLQPHDRIMGLDLPDGGHLTHGYMSDV
KRISATSIFFESMPYKLNPKTGLIDYNQLALTARLFRPRLLIAGTSAYARLIDYARMREV
CDEVKAHLLADMAHISGLVAAKVIPSFFKHADIVTTTTTHKTLRGARSGLIIFYRKGVKAVD
PKTGREIPYTFEDRINFAVFPSLQGGPHNHAI AAVAVALKQACTPMFREYSLQVLKNARA
MADALLERGYSLVSGGTDNHLVLVDLRPKGLDGARAERVLELVSITANKNTCPGDRSAIT
PGGLRLGAPALTSRQFREDDFRRVDFIDEGVNIGLEVKSKTAKLQDFKSFLKDKSETSQ
RLANLRQRVEQFARAFPMMPGFDEH

SHMT2 (isoforma 2)

5

MLYFSLFWAARPLQRCGQLVRMAIRAQHSNAAQTQTGEANRGWTGQESLSDSDPEMWELL
QREKDRQCRGLELIASENFCRAALEALGSCNNKYSEGYPGKRYYGGAEVVDEIELLCQ
RRALEAFDLDPAQWGVNVQPYSGSPANLAVYTALLQPHDRIMGLDLPDGGHLTHGYMSDV
KRISATSIFFESMPYKLNALALTARLFRPRLLIAGTSAYARLIDYARMREVCDEVKAHLLA
DMAHISGLVAAKVIPSFFKHADIVTTTTTHKTLRGARSGLIIFYRKGVKAVDPKTGREIPYT
FEDRINFAVFPSLQGGPHNHAI AAVAVALKQACTPMFREYSLQVLKNARAMADALLERGY
SLVSGGTDNHLVLVDLRPKGLDGARAERVLELVSITANKNTCPGDRSAITPGGLRLGAPA
LTSRQFREDDFRRVDFIDEGVNIGLEVKSKTAKLQDFKSFLKDKSETSQRLANLRQRVE
QFARAFPMMPGFDEH

SHMT2 (isoforma 3)

MAIRAQHSNAAQTQTGEANRGWTGQESLSDSDPEMWELLQREKDRQCRGLELIASENFC
RAALEALGSCNNKYSEGYPGKRYYGGAEVVDEIELLCQRRALEAFDLDPAQWGVNVQPY
SGSPANLAVYTALLQPHDRIMGLDLPDGGHLTHGYMSDVKRISATSIFFESMPYKLNPKT
GLIDYNQLALTARLFRPRLLIAGTSAYARLIDYARMREVCDEVKAHLLADMAHISGLVAA
KVIPSFFKHADIVTTTTTHKTLRGARSGLIIFYRKGVKAVDPKTGREIPYTFEDRINFAVF
PSLQGGPHNHAI AAVAVALKQACTPMFREYSLQVLKNARAMADALLERGYSLVSGGTDNHL
VLVDLRPKGLDGARAERVLELVSITANKNTCPGDRSAITPGGLRLGAPALTSRQFREDDF
RRVDFIDEGVNIGLEVKSKTAKLQDFKSFLKDKSETSQRLANLRQRVEQFARAFPMMPGF
DEH

10

VIPR1

MRPFSPLPARWLCVLAGALAWALGPAGGQAARLQEECDYVQMIEVQHKQCLEEAQLENET
IGCSKMWDNLTCWPATPRGQVVVLACPLIFKLFSSIQGRNVSRCTDEGWTHLEPGPYPI
ACGLDDKAASLDEQQTMFYGSVKTGYTIGYGLSLATLLVATAILSLFRKLHCTRNYIHM
LFISFILRAAVFIKDLALFDSGESDQCSGSGVCKAAMVFFQYCVMANFFWLLVEGLYL
YTLLAVSFFSERKYFWGYILIGWGPSTFTMVWTIARIHFEDYGCWDTINSSLWIIKGP
ILTSILVNFILFICIRILLQKLRPDIRKSDSSPYSLARSTLLLIPLFGVHYIMFAFF
PDNFKPEVKMVFELVVGSGFQGFVVAIYLCFLNGEVQAE LRKWRWHLQGVLGWNPKYRH
PSGSGNGATCSTQVSMLTRVSPGARRSSSFQAEVSLV

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

- Un ácido nucleico se refiere a una molécula de ADN (por ejemplo, pero sin limitarse a, un ADNc o ADN genómico), una molécula de ARN (por ejemplo, pero sin limitarse a, un ARNm), o un análogo de ADN o ARN. Un análogo de ADN o ARN puede sintetizarse a partir de análogos de nucleótidos. La molécula de ácido nucleico puede ser monocatenaria o bicatenaria. Un "ácido nucleico aislado" es un ácido nucleico cuya estructura no es idéntica a la de ningún ácido nucleico que se produce de manera natural o a la de ningún fragmento de un ácido nucleico genómico que se produce de manera natural. El término cubre por tanto, por ejemplo, (a) un ADN que tiene la secuencia de parte de una molécula de ADN genómica que se produce de manera natural pero no está flanqueada por ambas secuencias codificantes que flanquean esa parte de la molécula en el genoma del organismo en el que se produce
- 25 de manera natural; (b) un ácido nucleico incorporado en un vector o en el ADN genómico de una procariota o eucariota de tal manera que la molécula resultante no es idéntica a ningún vector o ADN genómico que se produce
- 30

de manera natural; (c) una molécula independiente tal como un ADNc, un fragmento genómico, un fragmento producido por una reacción en cadena de la polimerasa (PCR), o un fragmento de restricción; y (d) una secuencia de nucleótidos recombinante que forma parte de un gen híbrido, es decir, un gen que codifica para una proteína de fusión.

5 Los términos “ARN”, “molécula de ARN” y “molécula de ácido ribonucleico” se usan de manera intercambiable en el presente documento, y se refieren a un polímero de ribonucleótidos. El término “ADN” o “molécula de ADN” o molécula de ácido desoxirribonucleico” se refiere a un polímero de desoxirribonucleótidos. El ADN y el ARN pueden sintetizarse de manera natural (por ejemplo, mediante replicación de ADN o transcripción de ADN, respectivamente).
10 El ARN puede modificarse de manera postraducciona. El ADN y el ARN también pueden sintetizarse químicamente. El ADN y el ARN pueden ser monocatenarios (es decir, ARNmc y ADNmc, respectivamente) o multicatenarios (por ejemplo, bicatenarios, es decir, ARNbc y ADNbc, respectivamente).

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

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

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

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

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

Los polinucleótidos mencionados anteriormente pueden administrarse usando dispositivos de administración de micropartículas o microcápsulas poliméricas, biodegradables conocidos en la técnica. Otro modo de conseguir la captación de los polinucleótidos es usando liposomas, preparados mediante métodos convencionales. El polinucleótido puede incorporarse solo en estos vehículos de administración o incorporarse conjuntamente con anticuerpos específicos de tejido. Alternativamente, puede prepararse un conjugado molecular que se compone de un plásmido u otro vector unido a poli-L-lisina mediante fuerzas electrostáticas o covalentes. La poli-L-lisina se une a un ligando que puede unirse a un receptor en células diana (Cristiano, *et al.*, 1995, J. Mol. Med. 73:479). Alternativamente, pueden obtenerse dianas específicas de tejido mediante el uso de elementos reguladores de la transcripción específicos de tejido que se conocen en la técnica. La administración de ADN desnudo (es decir, sin un vehículo de administración) a un sitio intramuscular, intradérmico o subcutáneo es otro medio de lograr la expresión *in vivo*.

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

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

El término "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo (o "parte de anticuerpo") se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, IGF2, IGF1, IGF1R, MERTK, PTPN1, ABCB9, PSAT1, PYGB, SHMT2 o VIPR). Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión englobados dentro del término "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios V_L, V_H, C_L y C_{H1}; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los V_H dominios y C_{H1}; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio V_H; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, están codificados por genes independientes, pueden unirse, usando métodos recombinantes, mediante un ligador sintético que les permite constituirse como una sola cadena de proteína en la que las regiones V_L y V_H se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase, por ejemplo, Bird *et al.* (1988) Science 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). También se pretende que tales anticuerpos de cadena sencilla estén englobados dentro del término "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y se examinan los fragmentos para determinar su utilidad de la misma manera que se hace con anticuerpos intactos.

Pueden producirse anticuerpos que se unen específicamente a una de las proteínas diana mencionadas anteriormente usando métodos conocidos en la técnica. Este anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o uno monoclonal. Los ejemplos de tales anticuerpos incluyen los descritos en los ejemplos de trabajo a continuación. En un ejemplo, el anticuerpo puede producirse de manera recombinante, por ejemplo, producirse mediante presentación en fago o mediante métodos combinatorios. En otro ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo completamente humano (por ejemplo, un anticuerpo producido en un ratón que se ha modificado por ingeniería genética para producir un anticuerpo a partir de una secuencia de inmunoglobulina humana), un anticuerpo humanizado o un anticuerpo no humano, por ejemplo, pero sin limitarse a, un anticuerpo de roedor (ratón o rata), cabra, primate (por ejemplo, pero sin limitarse a, mono), conejo o camello. Los ejemplos de métodos para generar una versión humanizada de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, injerto de CDR (Queen *et al.*, patente estadounidense n.º 5,585,089; Riechmann *et al.*, Nature 332:323 (1988)), intercambio de cadenas (patente estadounidense n.º 5,565,332); y revestimiento o remodelado de la superficie (documentos EP 592.106; EP

519.596); Padlan, *Molecular Immunology* 28(415):489-498 (1991); Studnicka *et al.*, *Protein Engineering* 7(6):805-814 (1994); Roguska. *et al.*, *PNAS* 91:969-973 (1994)). Los ejemplos de métodos para generar anticuerpos completamente humanos incluyen, pero no se limitan a, la generación de anticuerpos a partir de ratones que pueden expresar genes de inmunoglobulina humanos y el uso de la tecnología de presentación en fago para generar y examinar bibliotecas de genes de inmunoglobulina humanos.

Un “anticuerpo aislado” pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a IGFBP2, IGF1, IGF1R, MERTK, PTPN11, ABCB9, PSAT1, PYGB, SHMT2 o VIPR está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de tal antígeno). Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente al antígeno puede tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de IGFBP2, IGF1, IGF1R, MERTK, PTPN11, ABCB9, PSAT1, PYGB, SHMT2 o VIPR de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

Los términos “anticuerpo monoclonal” o “composición de anticuerpo monoclonal” tal como se usa en el presente documento se refieren a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular sencilla. Una composición de anticuerpo monoclonal presenta una única afinidad y especificidad de unión para un epítipo particular.

El término “anticuerpo humano”, tal como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables en las que tanto las regiones de entramado como las CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también se deriva de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácido no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis al azar o específica de sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). Sin embargo, el término “anticuerpo humano”, tal como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que se han injertado secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, sobre secuencias de entramado humanas.

El término “anticuerpo monoclonal humano” se refiere a anticuerpos que presentan una única afinidad de unión que tienen regiones variables en las que tanto las regiones de entramado como las CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En un ejemplo, los anticuerpos monoclonales humanos los produce un hibridoma que incluye una célula B obtenida a partir de un animal no humano transgénico, por ejemplo, un ratón transgénico, que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada humana y un transgén de cadena ligera fusionados a una célula inmortalizada.

El término “anticuerpo humano recombinante”, tal como se usa en el presente documento, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan mediante medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcrómico para genes de inmunoglobulina humanos o un hibridoma preparado a partir de los mismos (descrito adicionalmente a continuación), (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo humano, por ejemplo, a partir de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca combinatoria de anticuerpos humanos recombinantes y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humanos a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones de entramado y CDR se derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En determinados ejemplos, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes pueden someterse a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y por tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque se derivan de y están relacionadas con secuencias de V_H y V_L de línea germinal humana, pueden no existir de manera natural dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

Tal como se usa en el presente documento, “isotipo” se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificada por los genes de región constante de cadena pesada.

Las expresiones “un anticuerpo que reconoce un antígeno” y “un anticuerpo específico para un antígeno” se usan de manera intercambiable en el presente documento con el término “un anticuerpo que se une a específicamente a un antígeno”.

Tal como se usa en el presente documento, el término “alta afinidad” por un anticuerpo contra IgG se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10⁻⁷ M o menos, preferiblemente 10⁻⁸ M o menos, más preferiblemente 10⁻⁹ M o menos e incluso más preferiblemente 10⁻¹⁰ M o menos para un antígeno diana. Sin embargo, la unión de “alta afinidad” puede variar para otros isotipos de anticuerpo. Por ejemplo, la unión de “alta afinidad” para un isotipo IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una K_D de 10⁻⁷ M o menos, más preferiblemente 10⁻⁸ M o menos.

En un ejemplo, se describe una composición que comprende un anticuerpo monoclonal que neutraliza la función de

- IGFBP2 inhibiendo la unión de IGFBP2 a IGF1. En un ejemplo, este anticuerpo puede ser un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo no humano, por ejemplo, pero sin limitarse a, un anticuerpo de roedor (ratón o rata), cabra, primate (por ejemplo, pero sin limitarse a, mono), conejo o camello. En un ejemplo, pueden sustituirse uno o más aminoácidos de este anticuerpo monoclonal con el fin de alterar sus propiedades físicas. Estas propiedades incluyen, pero no se limitan a, especificidad de unión, afinidad de unión, inmunogenicidad e isotipo de anticuerpo. Pueden usarse composiciones farmacéuticas que contienen versiones completamente humanas o humanizadas de los anticuerpos descritos anteriormente para tratar trastornos de angiogénesis patológica.
- 10 En un ejemplo, una composición que comprende un anticuerpo neutralizante de IGFBP2 que inhibe que se una IGF1 a IGFBP2 inhibe la evolución tumoral de cáncer de mama y la carga tumoral *in vivo*. En este ejemplo, la administración del anticuerpo descrito anteriormente redujo la carga tumoral de cáncer de mama humano *in vivo* en un modelo de ratón de cáncer humano.
- 15 Pueden usarse composiciones farmacéuticas que contienen versiones completamente humanas o humanizadas de los anticuerpos descritos anteriormente para inhibir metástasis de cáncer de mama en pacientes humanos inhibiendo el reclutamiento endotelial por células metastásicas. En otro ejemplo, pueden usarse composiciones farmacéuticas que contienen versiones completamente humanas o humanizadas de estos anticuerpos para tratar otros tipos de tumores vasculares. Los tumores vascularizados típicos que pueden tratarse con esta composición
- 20 incluyen tumores sólidos, particularmente carcinomas, que requieren una componente vascular para la provisión de oxígeno y nutrientes. Los tumores sólidos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, carcinomas de pulmón, mama, óseo, de ovario, estómago, páncreas, laringe, esófago, testículos, hígado, parotídeo, de vías biliares, colon, recto, cuello uterino, útero, endometrio, riñón, vejiga, próstata, tiroides, carcinomas de células escamosas, adenocarcinomas, carcinomas de células pequeñas, melanomas, gliomas, glioblastomas, neuroblastomas, sarcoma de Kaposi y sarcomas.
- 25 En otro ejemplo, el polipéptido es una forma mutante de la proteína mencionada anteriormente, que interfiere en la ruta mencionada anteriormente y, por tanto, inhibe la angiogénesis y el reclutamiento endotelial. El término "mutante" engloba mutantes que se producen de manera natural y mutantes creados químicamente y/o usando técnicas de ADN recombinantes. Un mutante de uno de los péptidos de tipo natural mencionados anteriormente puede deberse a la alteración, por ejemplo, truncamiento, elongación, sustitución, delección o inserción, de uno o más aminoácidos. La alteración también puede tener un aminoácido modificado, tal como uno que comprende una modificación postraduccional. La actividad proangiogénica de un mutante, si la hay, es sustancialmente menor que la actividad del polipéptido de tipo natural en al menos aproximadamente el 20 % (por ejemplo, el 30 %, el 40 %, el 50 %, el 60 %, el 70 %, el 80 %, el 90 % o el 100 %) tal como se mide usando un ensayo descrito en el presente documento o conocido en la técnica. Un ejemplo es un polipéptido que tiene el dominio extracelular de IGF1-R, pero que carece el dominio intracelular. Competiendo por IGF-1, este mutante puede inhibir la ruta mencionada anteriormente y la actividad proangiogénica de manera dominante negativa.
- 40 Las composiciones de aminoácidos de los anticuerpos o polipéptidos mencionados anteriormente pueden variar con o sin perturbar la capacidad (por ejemplo, afinidad) para unirse a las dianas o los antígenos respectivos, y desencadenar o inhibir la respuesta celular respectiva. Por ejemplo, pueden contener una o más sustituciones de aminoácido conservativas. Una "sustitución de aminoácido conservativa" es una en la que el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido
- 45 familias de residuos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales apolares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales con ramificación β (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por tanto, un residuo de aminoácido no esencial predicho en, por ejemplo, SEQ ID NO: 9 o 10 puede reemplazarse por otro residuo de aminoácido de la misma familia de cadenas laterales. Alternativamente, pueden introducirse mutaciones al azar a lo largo de la totalidad o parte de las secuencias, tal como mediante mutagénesis de saturación, y los
- 50 mutantes resultantes pueden examinarse para determinar la capacidad para unirse al antígeno respectivo y desencadenar la respuesta celular respectiva para identificar mutantes que conservan la actividad.
- 55

Composiciones

- 60 En el presente documento se proporciona una composición que contiene un portador adecuado y uno o más de los agentes descritos anteriormente. La composición puede ser una composición farmacéutica que contiene un portador farmacéuticamente aceptable, una composición dietética que contiene un portador dietéticamente aceptable adecuado, o una composición cosmética que contiene un portador cosméticamente aceptable.
- 65 El término "composición farmacéutica" se refiere a la combinación de un agente activo con un portador, inerte o activo, haciendo que la composición sea especialmente adecuada para uso diagnóstico o terapéutico *in vivo* o *ex vivo*. Un "portador farmacéuticamente aceptable", después de administrarse a o sobre un sujeto, no provoca efectos

fisiológicos adversos. El portador en la composición farmacéutica debe ser “aceptable” también en el sentido de que sea compatible con el principio activo y pueda estabilizarlo. Pueden usarse uno o más agentes solubilizantes como portadores farmacéuticos para la administración de un compuesto activo. Los ejemplos de un portador farmacéuticamente aceptable incluyen, pero no se limitan a, vehículos, adyuvantes, aditivos y diluyentes biocompatibles para obtener una composición que puede usarse como forma de dosificación. Los ejemplos de otros portadores incluyen óxido de silicio coloidal, estearato de magnesio, celulosa, laurilsulfato de sodio y amarillo D&C n.º 10.

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

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

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

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

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

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

Métodos de tratamiento

La presente descripción proporciona métodos para tratar en un sujeto un trastorno angiogénico o un trastorno de la angiogénesis.

Los términos “trastorno angiogénico”, “trastorno de la angiogénesis” y “trastorno de la angiogénesis” se usan de manera intercambiable en el presente documento, y se refieren a un trastorno caracterizado por angiogénesis patológica. Un trastorno caracterizado por angiogénesis patológica se refiere a un trastorno en el que angiogénesis anómala o aberrante, sola o en combinación con otros, contribuye a la causalidad, el origen o síntoma del trastorno. Los ejemplos de este trastorno incluyen diversos cánceres (por ejemplo, tumores vascularizados), trastornos oculares, trastornos inflamatorios, y otros.

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

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

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

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

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

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

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

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

El agente puede administrarse *in vivo* o *ex vivo*, solo o coadministrarse junto con otros fármacos o terapias, es decir, una terapia de cóctel. Tal como se usa en el presente documento, el término “coadministración” o “coadministrarse” se refiere a la administración de al menos dos agente(s) o terapias a un sujeto. Por ejemplo, en el tratamiento de

tumores, particularmente tumores vascularizados, malignos, los agentes pueden usarse solos o en combinación con, por ejemplo, agentes quimioterápicos, radioterápicos, apoptóticos, antiangiogénicos y/o inmunotoxinas o coaguligandos.

- 5 En algunos ejemplos, la coadministración de dos o más agentes/terapias es concurrente. En otros ejemplos, un primer agente/terapia se administra antes del segundo agente/terapia. Los expertos en la técnica entienden que las formulaciones y/o vías de administración de los diversos agentes/terapias usados pueden variar.

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

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

25 Diagnóstico

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

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

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

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

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

contienen una región corta entremedias. En condiciones apropiadas y con reactivos apropiados, tales cebadores permiten la amplificación de una molécula de ácido nucleico que tiene la secuencia de nucleótidos flanqueada por los cebadores.

- 5 Para métodos *in situ*, puede prepararse una muestra de células o tejido e inmovilizarse sobre un soporte, tal como, pero sin limitarse a, un portaobjetos de vidrio, y luego ponerse en contacto con una sonda que puede hibridar con ADN genómico en cromosomas o ARNm que codifica para el polipéptido correspondiente.

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

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

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

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

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

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

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

60 **EJEMPLO 1: Métodos y materiales**

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

Cultivo celular

- 65 Todas las líneas celulares se propagaron tal como se describe en Tavazoie, S. F. *et al.*, Nature 451 (7175), 147

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

Estudios con animales

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

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

Generación de Lentivirus, Retrovirus, silenciamiento y células de sobreexpresión

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

Reclutamiento endotelial

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

Ensayo de quimiotaxia

Se dejó que Matrigel (250 µl, BD BIOSCIENCES, n.º 356231) que contenía cantidades dadas de albúmina sérica bovina (A2153, Sigma Aldrich), rhIGFBP2 (674-B2, R&D SYSTEMS), rhGas6 (885-GS, R&D SYSTEMS), anticuerpo

anti-IGF1R (MAB391, R&D SYSTEMS) y MerFc (891-MR-100, R&D SYSTEMS) solidificara en el fondo de una placa de 24 pocillos durante 30 min antes de que se añadieran 250 µl de medios HUVEC que contenían FBS al 0,2 %. Entonces se colocó un inserto HTS Fluroblock de 3,0 µm (351151, BD Falcon) en cada pocillo. Se marcaron las células HUVEC con colorante CellTracker Red CMTPX (C34552, Invitrogen) antes de resuspender 300 K HUVEC por ml de EGM-2 con FBS al 0,2 %. Entonces se añadieron 0,5 ml de la resuspensión a cada inserto Fluoroblock y se dejó que el ensayo continuara durante 20 h. Entonces se fijaron las piezas de inserción durante 15 min en paraformaldehído al 4 % y se montaron en portaobjetos con medios de montaje VectaShield (H-1000, Vector Laboratories). Entonces se tomaron imágenes de 5 campos del lado basal de cada inserto y se analizaron las imágenes usando ImageJ (NIH).

Ensayo de migración

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

Adhesión endotelial

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

Proliferación endotelial

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

Ensayo de formación de tubos

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

Análisis de expresión de miARN y expresión de ARNm

Se extrajo el ARN total de diversas líneas celulares usando el kit MIRVANA (AM1560, APPLIED BIOSYSTEMS, Austin, TX). Se usó el ensayo de microARN TAQMAN (4427975-0002228, APPLIED BIOSYSTEMS) para cuantificar los niveles de expresión de miARN maduro tal como se describe en Tavazoie, S. F. *et al.*, Nature 451 (7175), 147 (2008). Para la cuantificación del ARNm, se sometieron a transcripción inversa 400 ng del ARN total usando el kit de síntesis de primera cadena de ADNc (18080-051, INVITROGEN). Entonces se mezclaron aproximadamente 4 ng del ADNc resultante con el reactivo SYBR green PCR MASTER MIX (4309155, APPLIED BIOSYSTEMS) y cebadores apropiados (tabla 1). Se obtuvieron datos de expresión de ARNm cuantitativos usando un sistema de PCR en tiempo

real ABI PRISM 7900HT (APPLIED BIOSYSTEMS). Se usó Smad4 como control endógeno para normalización. Se realizó análisis de expresión de cánceres de mama humanos en diversos estadios de enfermedad usando los paneles 2 y 3 de cáncer de mama en serie mediante qPCR ISSUESCAN (BCRT102 & BCRT103, ORIGENE, Rockville, MD).

5

Tabla 1. Cebadores de qPCR con SYBR green

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

Predicción de diana de miR-126

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

Ensayo de indicador de luciferasa

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

- 25 CDS de ABCB9

ATGCGGCTGTGGAAGGCGGTGGTGGTGACTTTGGCCTTCATGAGTGTGGACATCTGCGTGACCACG
 GCCATCTATGTCTTCAGCCACCTGGACCGCAGCCTCCTGGAGGACATCCGCCACTTCAACATCTTT
 GACTCGGTGCTGGATCTCTGGGCAGCCTGCCTGTACCGCAGCTGCCTGCTGCTGGGAGCCACCATT
 GGTGTGGCCAAGAACAGTGCCTGGGGCCCCGGCGGCTGCGGGCCTCGTGGCTGGTTCATCACCCCTC
 GTGTGCCTCTTCGTGGGCATCTATGCCATGGTGAAGCTGCTGCTCTTCTCAGAGGTGCGCAGGCCC
 ATCCGGGACCCCTGGTTTTGGGGCCTGTTTCGTGTGGACGTACATTTCACTCGGCGCATCCTTCCTG
 CTCTGGTGGCTGCTGTCCACCGTGCGGCCAGGCACCCAGGCCCTGGAGCCAGGGGCGGCCACCGAG
 GCTGAGGGCTTCCCTGGGAGCGGCCGGCCACCGCCCCGAGCAGGCGCTCTGGGGCCACGCTGCAGAAG
 CTGCTCTCCTACACCAAGCCCCGACGTGGCCTTCCTCGTGGCCGCTCCTTCTTCCTCATCGTGGCA
 GCTCTGGGAGAGACCTTCCTGCCCTACTACACGGGCCGCGCCATTGATGGCATCGTTCATCCAGAAA
 AGCATGGATCAGTTCAGCACGGCTGTCTGTCATCGTGTGCCTGCTGGCCATTGGCAGCTCATTTGCC
 GCAGGTATTCGGGGCGGCATTTTTACCCTCATATTTGCCAGACTGAACATTCGCCCTTCGAAACTGT
 CTCTTCCGCTCACTGGTGTCCCAGGAGACAAGCTTCTTTGATGAGAACCGCACAGGGGACCTCATC
 TCCCGCCTGACCTCGGACACCACCATGGTCAGCGACCTGGTCTCCAGAACATCAATGTCTTCCCTG
 CGGAACACAGTCAAGGTACGGGCGTGGTGGTCTTCATGTTTACGCTCTCATGGCAGCTCTCCTTG
 GTCACCTTCATGGGCTTCCCCATCATCATGATGGTGTCCAACATCTACGGCAAGTACTACAAGAGG
 CTCTCCAAAGAGGTCCAGAATGCCCTGGCCAGAGCCAGCAACACGGCGGAGGAGACCATCAGTGCC
 ATGAAGACTGTCCGGAGCTTCGCCAATGAGGAGGAGGAGGCAGAGGTGTACCTGCGGAAGCTGCAG
 CAGGTGTACAAGCTGAACAGGAAGGAGGCAGCTGCCTACATGTACTACGTCTGGGGCAGCGGGCTC
 ACACTGCTGGTGGTCCAGGTCAGCATCCTCTACTACGGGGGCCACCTTGTTCATCTCAGGCCAGATG
 ACCAGCGGCAACCTCATCGCCTTCATCATCTACGAGTTTGTCTGGGAGATTGTATGGAGTCCGTG
 GGCTCCGTCTACAGTGGCCTGATGCAGGGAGTGGGGGCTGCTGAGAAGGTGTTTCGAGTTCATCGAC
 CGGCAGCCGACCATGGTGCACGATGGCAGCTTGGCCCCGACCACCTGGAGGGCCGGGTGGACTTT
 GAGAATGTGACCTTCACCTACCGCACTCGGCCCCACACCCAGGTCTGCAGAATGTCTCCTTCAGC
 CTGTCCCCCGCAAGGTGACGGCCCTGGTGGGGCCCTCGGGCAGTGGGAAGAGCTCCTGTGTCAAC
 ATCCTGGAGAATTCTACCCCTGGAGGGGGGGCGGGGTGCTGCTGGACGGCAAGCCCATCAGCGCC
 TACGACCACAAGTACTTGCACCGTGTGATCTCCCTGGTGGAGCCAGGAGCCCGTGTGTTCGCCCCG
 TCCATCACGGATAACATCTCCTACGGCCTGCCCACTGTGCCTTTTCGAGATGGTGGTGGAGCCGCA
 CAGAAGGCCAATGCCCACGGCTTCATCATGGAATCCAGGACGGCTACAGCACAGAGACAGGGGAG
 AAGGGCGCCAGCTGTCTAGGTGGCCAGAAGCAGCGGGTGGCCATGGCCCGGGCTCTGGTGCAGAAC
 CCCCCAGTCTCATCTGGATGAAGCCACAGCGCTTTGGATGCCGAGAGCGAGTATCTGATCCAG
 CAGGCCATCCATGGCAACCTGCAGAAGCACACGGTACTCATCATCGCGCACCGGCTGAGCACCGTG
 GAGCACGGCACCTCATTGTGGTGTCTGGACAAGGGCCGCGTAGTGCAGAGGGCACCCACCAGCAG
 CTGCTGGCCAGGGCGGCTCTACGCCAAGCTGGTGCAGCGGCAGATGCTGGGGCTTCAGCCCGCC
 GCAGACTTCACAGCTGGCCACAACGAGCCTGTAGCCAACGGCAGTCACAAGGCCCTGA

3'UTR de ABCB9

5

TGGGGGGCCCCCTGCTTCTCCCGGTGGGGCAGAGGACCCGGTGCCTGCCTGGCAGATGTGCCCACGG
 AGGCCCCCAGCTGCCCTCCGAGCCCAGGCCTGCAGCACTGAAAGACGACCTGCCATGTCCCATGGA
 TCACCGCTTCTGCATCTTGCCCCCTGGTCCCTGCCCATTTCCAGGGCACTCCTTACCCCTGTCTG
 CCTGAGCCAACGCCTTCACGGACCTCCCTAGCCTCCTAAGCAAAGGTAGAGCTGCCTTTTTAAACC
 TAGGTCTTACCAGGGTTTTTACTGTTTGGTTTGGAGGCACCCAGTCAACTCCTAGATTTTCAAAAC
 CTTTTTCTAATTGGGAGTAATGGCGGGCACTTTCACCAAGATGTTCTAGAAACTTCTGAGCCAGGA
 GTGAATGGCCCTTCCCTTAGTAGCCTGGGGGATGTCCAGAGACTAGGCCTCTCCCCTTTACCCCTCC
 AGAGAAGGGGCTTCCCTGTCCCCGAGGGAGACACGGGAACGGGATTTCCGTCTCTCCCTCTTGC
 CAGCTCTGTGAGTCTGGCCAGGGCGGGTAGGGAGCGTGGAGGGCATCTGTCTGCCATCGCCCGCTG
 CCAATCTAAGCCAGTCTCACTGTGAACCACACGAAACCTCAACTGGGGGAGTGAGGGGCTGGCCAG
 GTCTGGAGGGGCTCAGGGGTGCCCCAGCCCGGCACCCAGCGCTTTTCGCCCTCGTCCACCCACC
 CCTGGCTGGCAGCCTCCCTCCCCACACCCGCCCTGTGCTCTGCTGTCTGGAGGCCACGTGGATGT
 TCATGAGATGCATTCTTCTGTCTTTGGTGGATGGGATGGTGGCAAAGCCCAGGATCTGGCTTTG
 CCAGAGGTTGCAACATGTTGAGAGAACCCGGTCAATAAAGTGTACTACCTCTTACCCCTAA

CDS de IGFBP2

ATGCTGCCGAGAGTGGGCTGCCCCGCGCTGCCGCTGCCGCCGCCGCCGCTGCTGCCGCTGCTGCTG
CTGCTACTGGGCGCGAGTGGCGGGCGGGCGGGGGCGCGCGCGGAGGTGCTGTTCCGCTGCCCGCCC
TGCACACCCGAGCGCCTGGCCGCGCTGCGGGCCCCCGCGGTTGCGCCGCCCGCGCGGTGGCCGCA
GTGGCCGGAGGCGCCCCGATGCCATGCGCGGAGCTCGTCCGGGAGCCGGGCTGCCGCTGCTGCTCG
GTGTGCGCCCCGCTGGAGGGCGAGGCGTGCGGCGTCTACACCCCGCGCTGCCGCCAGGGGCTGCGC
TGCTATCCCCACCCGGGCTCCGAGCTGCCCCCTGCAGGCGCTGGTCATGGGCGAGGGCACTTGTGAG
AAGCGCCGGGACGCCGAGTATGGCGCCAGCCCGGAGCAGGTTGCAGACAATGGCGATGACCACTCA
GAAGGAGGCTGGTGGAGAACCACGTGGACAGCACCATGAACATGTTGGGCGGGGGAGGCAGTGCT
GGCCGGAAGCCCCCTCAAGTCGGGTATGAAGGAGCTGGCCGTGTTCCGGGAGAAGGTCACTGAGCAG
CACCGGCAGATGGGCAAGGGTGGCAAGCATCACCTTGGCCTGGAGGAGCCCAAGAAGCTGCGACCA
CCCCCTGCCAGGACTCCCTGCCAACAGGAAGTGGACCAGGTCTTGGAGCGGATCTCCACCATGCGC
CTTCCGGATGAGCGGGGCCCTCTGGAGCACCTCTACTCCCTGCACATCCCCAACTGTGACAAGCAT
GGCCTGTACAACCTCAAACAGTGCAAGATGTCTCTGAACGGGCAGCGTGGGGAGTGCTGGTGTGTG
AACCCCAACACCGGGAAGCTGATCCAGGGAGCCCCCACCATCCGGGGGAGCCCCGAGTGTCATCTC
TTCTACAATGAGCAGCAGGAGGCTCGCGGGGTGCACACCCAGCGGATGCAGTAG

5 3'UTR de IGFBP2

ACCGCAGCCAGCCGGTGCCTGGCGCCCCCTGCCCCCGCCCCCTCTCCAAACACCGGCAGAAAACGGA
GAGTGCTTGGGTGGTGGGTGCTGGAGGATTTTCCAGTTCTGACACACGTATTTATATTTGGAAAGA
GACCAGCACCGAGCTCGGCACCTCCCCGGCCTCTCTCTTCCCAGCTGCAGATGCCACACCTGCTCC
TTCTTGCTTTCCCCGGGGGAGGAAGGGGGTTGTGGTCCGGGAGCTGGGGTACAGGTTTGGGGAGGG
GGAAGAGAAATTTTTATTTTTGAACCCCTGTGTCCCTTTTGCATAAGATTAAAGGAAGGAAAAGTA
A

CDS de MERTK

10

ATGGGGCCGGCCCCGCTGCCGCTGCTGCTGGGCTCTTCCCTCCCCGCGCTCTGGCGTAGAGCTATC
ACTGAGGCAAGGGAAGAAGCCAAGCCTTACCCGCTATTCCCGGGACCTTTTCCAGGGAGCCTGCAA
ACTGACCACACACCGCTGTTATCCCTTCCTCAGCCAGTGGGTACCAGCCTGCCTTGATGTTTTCA
CCAACCCAGCCTGGAAGACCACATACAGGAAACGTAGCCATTCCCAGGTGACCTCTGTGCAATCA
AAGCCCCTACCGCCTCTTGCCCTTCAAACACACAGTTGGACACATAATACTTTCTGAACATAAAGGT
GTCAAATTTAATTGCTCAATCAGTGTACCTAATATATACCAGGACACCACAATTTCTTGGTGGAAA
GATGGGAAGGAATTGCTTGGGGCACATCATGCAATTACACAGTTTTATCCAGATGATGAAGTTACA
GCAATAATCGCTTCCTTCAGCATAACCAGTGTGCAGCGTTCAGACAATGGGTGCTATATCTGTAAG
ATGAAAATAAACAATGAAGAGATCGTGTCTGATCCCATCTACATCGAAGTACAAGGACTTCCTCAC
TTTACTAAGCAGCCTGAGAGCATGAATGTCACCAGAAACACAGCCTTCAACCTCACCTGTCAGGCT
GTGGGCCCGCCTGAGCCCGTCAACATTTTCTGGGTTCAAACAGTAGCCGTGTTAACGAACAGCCT
GAAAAATCCCCCTCCGTGCTAACTGTTCCAGGCCTGACGGAGATGGCGGTCTTCAGTTGTGAGGCC
CACAATGACAAAGGGCTGACCGTGTCCAAGGGAGTGAGATCAACATCAAAGCAATTCCCTCCCCA
CCAACTGAAGTCAGCATCCGTAACAGCACTGCACACAGCATTCTGATCTCCTGGGTTTCTGGTTTT
GATGGATACTCCCCGTTTCAAGGAATTGCAGCATTCAAGGTCAAGGAAGCTGATCCGCTGAGTAATGGC

TCAGTCATGATTTTTAACACCTCTGCCTTACCACATCTGTACCAAATCAAGCAGCTGCAAGCCCTG
GCTAATTACAGCATTGGTGTTCCTGCATGAATGAAATAGGCTGGTCTGCAGTGAGCCCTTGGATT
CTAGCCAGCAGACTGAAGGAGCCCCATCAGTAGCACCTTTAAATGTCACTGTGTTTCTGAATGAA
TCTAGTGATAATGTGGACATCAGATGGATGAAGCCTCCGACTAAGCAGCAGGATGGAGAAGTGGTG
GGCTACCGGATATCCCACGTGTGGCAGAGTGCAGGGATTTCCAAAGAGCTCTTGGAGGAAGTGGC
CAGAATGGCAGCCGAGCTCGGATCTCTGTTCAAGTCCACAATGCTACGTGCACAGTGAGGATTGCA
GCCGTACCCAGAGGGGGAGTTGGGCCCTTCAAGTATCCAGTGAAAATATTTATCCCTGCACACGGT
TGGGTAGATTATGCCCCCTCTTCAACTCCGGCGCCTGGCAACGCAGATCCTGTGCTCATCATCTTT
GGCTGCTTTTGTGGATTTATTTTGTATTGGGTGATTATTTATACATCTCCTTGGCCATCAGAAAAAGA
GTCCAGGAGACAAAGTTTGGGAATGCATTACAGAGGAGGATTCTGAATTAGTGGTGAATTATATA
GCAAAGAAATCCTTCTGTGCGCGAGCCATTGAACCTTACCTACATAGCTTGGGAGTCAGTGAGGAA
CTACAAAATAAACTAGAAGATGTTGTGATTGACAGGAATCTTCTAATTCTTGGAAAAATTCTGGGT
GAAGGAGAGTTTGGGTCTGTAATGGAAGGAAATCTTAAGCAGGAAGATGGGACCTCTCTGAAAGTG
GCAGTGAAGACCATGAAGTTGGACAACCTTCACAGCGGGAGATCGAGGAGTTTCTCAGTGAGGCA
GCGTGCATGAAAGACTTCAGCCACCCAAATGTCATTGCACTTCTAGGTGTGTGTATAGAAATGAGC
TCTCAAGGCATCCCAAAGCCCATGGTAATTTTACCCTTCATGAAATACGGGGACCTGCATACTTAC
TTACTTTTATCCCGATTGGAGACAGGACCAAGCATATTCCTCTGCAGACACTATTGAAGTTTCATG
GTGGATATTGCCCTGGGAATGGAGTATCTGAGCAACAGGAATTTTCTTCATCGAGATTTAGCTGCT
CGAAACTGCATGTTGCGAGATGACATGACTGTCTGTGTTGCGGACTTCGGCCTCTCTAAGAAGATT
TACAGTGGCGATTATTACCGCCAAGGCCGCATTGCTAAGATGCCTGTTAAATGGATCGCCATAGAA
AGTCTTGCAGACCGAGTCTACACAAGTAAAAGTGATGTGTGGGCATTTGGCGTGACCATGTGGGAA
ATAGCTACGCGGGGAATGACTCCCTATCCTGGGGTCCAGAACCATGAGATGTATGACTATCTTCTC
CATGGCCACAGGTTGAAGCAGCCCGAAGACTGCCTGGATGAACTGTATGAAATAATGTACTCTTGC
TGGAGAACCGATCCCTTAGACCGCCCCACCTTTTTCAGTATTGAGGCTGCAGCTAGAAAACTCTTA
GAAAGTTTGCCTGACGTTCCGGAACCAAGCAGACGTTATTTACGTCAATACACAGTTGCTGGAGAGC
TCTGAGGGCCTGGCCCAGGGCTCCACCCTTGTCTCACTGGACTTGAACATCGACCCTGACTCTATA
ATTGCCCTCCTGCACTCCCCGCGCTGCCATCAGTGTGGTCACAGCAGAAGTTTCATGACAGCAAACCT
CATGAAGGACGGTACATCCTGAATGGGGGCAGTGAGGAATGGGAAGATCTGACTTCTGCCCCCTCT
GCTGCAGTCACAGCTGAAAAGAACAGTGTTTTACCAGGGGAGAGACTTGTTAGGAATGGGGTCTCC
TGGTCCCATTCGAGCATGCTGCCCTTGGGAAGCTCATTGCCCGATGAACTTTTGTGTTGCTGACGAC
TCCTCAGAAGGCTCAGAAGTCCTGATGTGA

3'UTR de MERTK

GGAGAGGTGCGGGGAGACATTCCAAAAATCAAGCCAATTCTTCTGCTGTAGGAGAATCCAATTGTA
CCTGATGTTTTTGGTATTTGTCTTCCTTACCAAGTGAACCTCCATGGCCCCAAAGCACCAGATGAAT
GTTGTAAAGTAAGCTGTCAATTAATAATACATAATATATATTTATTTAAAGAGAAAAATATGTGTA
TATCATGGAAGAACAGGATATTTTAATAAAACATTACTTATTTCAATTCATCTATCTGCATA
TCTTAAATTAAGCTTCAGCTGCTCCTTGATATTAACATTTGTACAGAGTTGAAGTTGTTTTTCA
AGTTCTTTTCTTTTTCATGACTATTAAATGTAAAAATATTTGTAAATGAAATGCCATATTTGACT
TGGCTTCTGGTCTTGATGTATTTGATAAGAATGATTCATTCAATGTTTAAAGTTGTATAACTGATT
AATTTTCTGATATGGCTTCCTAATAAAATATGAATAAGGAAG

5

CDS de isoforma A de PITPNC1

ATGCTGCTGA	AAGAGTACCG	GATCTGCATG	CCGCTCACCG	TAGACGAGTA	CAAAATTGGA
CAGCTGTACA	TGATCAGCAA	ACACAGCCAT	GAACAGAGTG	ACCGGGGAGA	AGGGGTGGAG
GTCGTCCAGA	ATGAGCCCTT	TGAGGACCCT	CACCATGGCA	ATGGGCAGTT	CACCGAGAAG
CGGGTGTATC	TCAACAGCAA	ACTGCCTAGT	TGGGCTAGAG	CTGTTGTCCC	CAAAATATTT
TATGTGACAG	AGAAGGCTTG	GAACATTAT	CCCTACACAA	TTACAGAATA	CACATGTTCC
TTTCTGCCGA	AATTCTCCAT	TCATATAGAA	ACCAAGTATG	AGGACAACAA	AGGAAGCAAT
GACACCATTT	TCGACAATGA	AGCCAAAGAC	GTGGAGAGAG	AAGTTTGCTT	TATTGATATT
GCCTGCGATG	AAATTCCAGA	GCGCTACTAC	AAAGAATCTG	AGGATCCTAA	GCATTCAAG
TCAGAGAAGA	CAGGACGGGG	ACAGTTGAGG	GAAGGCTGGA	GAGATAGTCA	TCAGCCTATC
ATGTGCTCCT	ACAAGCTGGT	GACTGTGAAG	TTTGAGGTCT	GGGGGCTTCA	GACCAGAGTG
GAACAATTTG	TACACAAGGT	GGTCCGAGAC	ATTCTGCTGA	TTGGACATAG	ACAGGCTTTT
GCATGGGTG	ATGAGTGGTA	TGACATGACA	ATGGATGAAG	TCCGAGAATT	TGAACGAGCC
ACTCAGGAAG	CCACCAACAA	GAAATCGGC	ATTTTCCAC	CTGCAATTC	TATCTCCAGC
ATCCCCCTGC	TGCCTTCTTC	CGTCCGAGT	GCGCCTTCTA	GTGCTCCATC	CACCCCTCTC
TCCACAGACG	CACCCGAATT	TCTGTCCGTT	CCCAAAGATC	GGCCCCGGAA	AAAGTCTGCC

CCAGAAACTC TCACACTTCC AGACCCTGAG AAAAAAGCCA CCCTGAATTT ACCCGGCATG
CACTCTTCAG ATAAGCCATG TCGGCCCAA TCTGAGTAA

CDS de isoforma B de PITPNC1

ATGCTGCTGAAAGAGTACCGGATCTGCATGCCGCTCACCGTAGACGAGTACAAAATTGGACAGCTG
TACATGATCAGCAAACACAGCCATGAACAGAGTGACCGGGGAGAAGGGGTGGAGGTCGTCCAGAAT
GAGCCCTTTGAGGACCCCTCACCATGGCAATGGGCAGTTACCCGAGAAGCGGGTGTATCTCAACAGC
AACTGCCCTAGTTGGGCTAGAGCTGTTGTCCCCAAAATATTTTATGTGACAGAGAAGGCTTGGAAC
TATTATCCCTACACAATTACAGAATACACATGTTCCCTTTCTGCCGAAATTTCTCCATTCATATAGAA
ACCAAGTATGAGGACAACAAAGGAAGCAATGACACCATTTTCGACAATGAAGCCAAAGACGTGGAG
AGAGAAGTTTGCTTTATTGATATTGCCTGCGATGAAATTCAGAGCGCTACTACAAAGAATCTGAG
GATCCTAAGCACTTCAAGTCAGAGAAGACAGGACGGGGACAGTTGAGGGAAGGCTGGAGAGATAGT
CATCAGCCATCATGTGCTCCTACAAGCTGGTGACTGTGAAGTTTGAGGTCTGGGGGCTTCAGACC
AGATGGAAACAAATTTGTACACAAGGTGGTCCGAGACATTCTGCTGATTGGACATAGACAGGCTTTT
GCATGGGTGATGAGTGGTATGATATGACAATGGATGATGTTTCGGGAATACGAGAAAAACATGCAT
GAACAAACCAACATAAAAGTTTGCAATCAGCATTCCTCCCCTGTGGATGACATAGAGAGTCATGCC
CAAACAAGTACATGA

5

3'UTR de PITPNC1

CAATGGATGAAGTCCGAGAATTTGAACGAGCCACTCAGGAAGCCACCAACAAGAAAATCGGCATTT
TCCCACCTGCAATTTCTATCTCCAGCATCCCCCTGCTGCCTTCTTCCGTCCGCAGTGCGCCTTCTA
GTGCTCCATCCACCCCTCTCTCCACAGACGCACCCGAATTTCTGTCCGTTCCCAAAGATCGGCCCC
GGAAAAAGTCTGCCCCAGAACTCTCACACTTCCAGACCCTGAGAAAAAGCCACCCTGAATTTAC
CCGGCATGCACTCTTCAGATAAGCCATGTCCGGCCAAATCTGAGTAACTTTATATAAATATCTCAT
GGGGTTTTATATTTTCAATTTGTTGTTGTTGTTTTTTTTTAAGAATCTTCTGATAGAGAAAAAGACT
GCTTTGTCACTCAAACATGTTCCCTTCGACCTTTCACTGTGCATGTGACTCAGTAACTTCACATAGA
ATATGATTCCTTAAGTATGCTACACAGCATCATATTAGATGTAAGATGTAAGACTTGCAAAGGACA
GAAGGAATCTTCTGTAACCACATAGCTGTATGCCAGAGAGGAAGCCTTGTTATTGGGCATTTGATG
AGGTTTGGCATGGACTTCAAGGATAAATGAATGAAAACCTTTCACCACTTTTGTTACAAGGTACGG
TAGAAAAAGTGAAGTCAGTTTCCCTCTCATCAAATCTAAAATTCTCCAAAATACTCTCAGGCATAA
CATACTTAGCTGTTAAATTTTGAAGTCTAATTAATACTTGAATACCAATAGTTACTGAGATT
CCTATTTTGTGGTGTGCTGACTCAGGATTTGGAGCCTAATTAAGTCTAACTTTTGAAAAATTTA
ATCATCAAGCTATAGAGGCTCCAAGTGCAATTAATAATAACTCATTTATACCTTCCACAGAATTTA
ATAAAGATTCTACTTGTCTTCTGTCTTTTAA

10

CDS de PSAT1

ATGGACGCCCCCAGGCAGGTGGTCAACTTTGGGCCTGGTCCCGCCAAGCTGCCGCACTCAGTGTTG
TTAGAGATACAAAAGGAATTATTAGACTACAAAGGAGTTGGCATTAGTGTTCTTGAAATGAGTCAC
AGGTCATCAGATTTTGCCAAGATTATTAACAATACAGAGAATCTTGTGCGGGAATTGCTAGCTGTT
CCAGACAACATAAGGTGATTTTCTGCAAGGAGGTGGGTGCGGCCAGTTCAAGTGTGTCCCTTA
AACCTCATTTGGCTTGAAAGCAGGAAGGTGTGCTGACTATGTGGTGACAGGAGCTTGGTCAGCTAAG
GCCGCAAGAAGCCAAGAAGTTTGGGACTATAAATATCGTTACCCCTAACTTTGGGAGTTATACA
AAAATTCAGATCCAAGCACCTGGAACCTCAACCCAGATGCCTCCTACGTGATTATTGCGCAAAAT
GAGACGGTGATGGTGTGGAGTTTGACTTTATACCCGATGTCAAGGGAGCAGTACTGGTTTGTGAC
ATGTCCTCAAACCTTCCTGTCCAAGCCAGTGGATGTTTCCAAGTTTGGTGTGATTTTGTGCTGGTGCC
CAGAAGAATGTTGGCTCTGCTGGGGTCAACGCTGGTGATTGTCCGTGATGACCTGCTGGGGTTTGCC
CTCCGAGAGTGCCCCCTCGGTCTGGAATACAAGGTGCAGGCTGGAAACAGCTCCTTGTACAACACG
CCTCCATGTTTTCAGCATCTACGTGATGGGCTTGGTTCTGGAGTGGATTAAAAACAATGGAGGTGCC
GCGGCCATGGAGAAGCTTAGCTCCATCAAATCTCAAACAATTTATGAGATTATTGATAATTCTCAA
GGATTCTACGTTTGTCCAGTGGAGCCCCAAAATAGAAGCAAGATGAATATTCCATTCCGCATTGGC
AATGCCAAAGGAGATGATGCTTTAGAAAAAGATTTCTTGATAAAGCTCTTGAAGTCAATATGTTG
TCCTTGAAAGGGCATAGGTCTGTGGGAGGCATCCGGGCCTCTCTGTATAATGCTGTCAACAATTGAA
GACGTTCAAGAGCTGGCCGCCTTCATGAAAAATTTTGGAGATGCATCAGCTATGA

15

3'UTR de PSAT1

ACACATCCTAACCAGGATATACTCTGTTCTTGAACAACATACAAAGTTTAAAGTAACTTGGGGATG
GCTACAAAAAGTTAACACAGTATTTTTCTCAAATGAACATGTTTATTGCAGATTCTTCTTTTTTGA
AAGAACAACAGCAAAACATCCACAACCTCTGTAAAGCTGGTGGGACCTAATGTCACCTTAATTCTGA
CTTGAACCTGGAAGCATTTTAAGAAATCTTGTGCTTTTCTAACAATTCGCGCTATTTTGCCTTT
GCTGCTACTTTTTCTAGTTAGATTTCAAACCTTGCTGTGGACTTAATAATGCAAGTTGCGATTAAT
TATTTCTGGAGTCATGGGAACACACAGCACAGAGGGTAGGGGGGCCCTCTAGGTGCTGAATCTACA
CATCTGTGGGGTCTCCTGGGTTTCAAGCGCTGTTGATTCAAGGTCAACATTGACCATTGGAGGAGTG
GTTTAAGAGTGCCAGGCGAAGGGCAAACCTGTAGATCGATCTTTATGCTGTTATTACAGGAGAAGTG
ACATACTTTATATATGTTTATATTAGCAAGGTCTGTTTTTAATACCATATACTTTATATTTCTATA
CATTTATATTTCTAATAATACAGTTATCACTGATATATGTAGACACTTTTAGAATTTATTAAATCC
TTGACCTTGTGCATTATAGCATTCCATTAGCAAGAGTTGTACCCCTCCCGAGTCTTCGCCTTCCT
CTTTTAAAGCTGTTTTATGAAAAGACCTAGAAGTTCTTGATTCAATTTTACCATTCTTTCCATAG
GTAGAAGAGAAAGTTGATTGGTTGGTTGTTTTTCAATTATGCCATTAAACTAAACATTTCTGTAA
ATTACCTATCCTTTGTTCTCTACTGTTTTCTTTGTAATGTATGACTACGAGAGTGATACTTTGCT
GAAAAGTCTTTCCCTATTGTTTATCTATTGTCTAGTATTTTATGTTGAATATGTAAAGAACATTAA
AGTCCATAAACATCTAA

5 CDS de PYGB

ATGGCGAAGCCGCTGACGGACAGCGAGAAGCGGAAGCAGATCAGCGTGCGCGGCCCTGGCGGGGCTA
GGCGACGTGGCCGAGGTGCGGAAGAGCTTCAACCGGCACTTGCACTTCACGCTGGTCAAGGACCGC
AATGTGGCCACGCCCCGCGACTACTTCTTCGCGCTGGCGCACACGGTGCGCGACCACCTCGTGGGC
CGCTGGATCCGCACGCAGCAGCACTACTACGAGCGCGAACCACAAGCGCATTATTATCTTTCCCTG
GAATTCTACATGGGTGCGACGCTGCAGAACACGATGGTGAACCTGGGCCTTCAGAATGCCGTGCGAT
GAAGCCATCTATCAGTTGGGGTTAGACTTGGAGGAACCTCGAGGAGATAGAAGAAGATGCTGGCCTT
GGGAATGGAGGCCTGGGGAGGCTGGCAGCGTGTTCCTTGACTCAATGGCTACCTTGGGCCTGGCA
GCATACGGCTATGGAATCCGCTATGAATTTGGGATTTTAAACCAGAAGATTGTCAATGGCTGGCAG
GTAGAGGAGCCGATGACTGGCTGCGCTACGGCAACCCCTGGGAGAAAGCGCGGCCCTGAGTATATG
CTTCCCGTGCCATTCTACGGACGCGTGGAGCACACCCCGACGGCGTGAAGTGGCTGGACACACAG
GTGGTGCTGGCCATGCCCTACGACACCCAGTGCCTGGCTACAAGAACAACACCGTCAACACCATG
CGGCTGTGGTCCGCCAAGGCTCCCAACGACTTCAAGCTGCAGGACTTCAACGTGGGAGACTACATC
GAGGCGGTCTTGACCCGAACCTTGGCTGAGAACATCTCCAGGGTCTGTATCCAAATGATAACTTC
TTTGAGGGGAAGGAGCTGCGGCTGAAGCAGGAGTACTTCGTGGTGGCCGCCACGCTCCAGGACATC
ATCCGCCGCTTCAAGTCGTCCAAGTTCGGCTGCCGGGACCTGTGAGAACCTGTTTCGAGACGTTTC
CCAGACAAGGTGGCCATCCAGCTGAACGACACCCACCCCGCCCTCTCCATCCCTGAGCTCATGCGG
ATCCTGGTGGACGTGGAGAAGGTGGACTGGGACAAGGCCTGGGAAATCACGAAGAAGACCTGTGCA
TACACCAACCACACTGTGCTGCCTGAGGCCTTGGAGCGCTGGCCCGTGTCCATGTTTGAGAAGCTG
CTGCCGCGGCACCTGGAGATAATCTATGCCATCAACCAGCGCACCTGGACCACGTGGCCGCGCTG
TTTCCCGCGGATGTGGACCGCTGCGCAGGATGTCTGTGATCGAGGAGGGGGACTGCAAGCGGATC
AACATGGCCCACCTGTGTGTGATTGGGTCCCATGCTGTCAATGGTGTGGCGAGGATCCACTCGGAG
ATCGTGAAACAGTCGGTCTTTAAGGATTTTTATGAACTGGAGCCAGAGAAGTTCCAGAATAAGACC
AATGGCATCACCCCCCGCGGTGGCTGCTGTGTGCAACCCGGGGCTGGCCGATACCATCGTGGAG
AAAATTGGGGAGGAGTTCTGACTGACCTGAGCCAGCTGAAGAAGCTGCTGCCGCTGGTCAGTGAC
GAGGTGTTTCATCAGGGACGTGGCCAAGGTCAAACAGGAGAACAAGCTCAAGTTCTCGGCCCTTCTG
GAGAAGGAGTACAAGGTGAAGATCAACCCCTCCTCCATGTTTCGATGTGCATGTGAAGAGGATCCAC
GAGTACAAGCGGCAGCTGCTCAACTGCCTGCACGTCGTCACCTGTACAATCGAATCAAGAGAGAC
CCGGCCAAGGCTTTTGTGCCCAGGACTGTTATGATTGGGGGCAAGGCAGCGCCCGTTACCACATG
GCCAAGCTGATCATCAAGTTGGTCACTCCATCGGCGACGTCGTCAATCATGACCCAGTTGTGGGT
GACAGGTTGAAAGTGATCTTCTGGGAACTACCGTGTGTCTTGGCTGAGAAAGTGATCCCGGCC
GCTGATCTGTGCGCAGCAGATCTCCACTGCAGGCACCCAGGCTCAGGCACAGGCAACATGAAGTTC
ATGCTCAACGGGGCCCTCACCATCGGCACCATGGACGGCGCCAACGTGGAGATGGCCGAGGAGGCC
GGGGCCGAGAACCTCTTCATCTTCGGCTGCGGGTGGAGGATGTCGAGGCCTTGGACCGGAAAGGG
TACAATGCCAGGGAGTACTACGACCACCTGCCGAGCTGAAGCAGGCCGTGGACCAGATCAGCAGT
GGCTTTTTTCTCCCAAGGAGCCAGACTGCTTCAAGGACATCGTGAACATGCTGATGCACCATGAC
AGGTTCAAGGTGTTTGCAGACTATGAAGCCTACATGCAGTGCCAGGCACAGGTGGACCAGCTGTAC
CGGAACCCCAAGGAGTGGACCAAGAAGGTTCATCAGGAACATCGCCTGCTCGGGCAAGTTCTCCAGT
GACCGGACCATCACGGAGTATGCACGGGAGATCTGGGGTGTGGAGCCCTCCGACCTGCAGATCCCG
CCCCCAACATCCCCCGGACTAG

3'UTR de PYGB

GCACACCCTGCCTTGGCGGGACCAGCGGGCATTGTTTTCTTGCTGACTTTGCACCTCCTTTTTTC
 CCCAAACACTTTGCCAGCCACTGGTGGTCCCTGCTTTTCTGAGTACCATGTTTCCAGGAGGGGCCA
 TGGGGGTGAGGGTGGTTTTGAGAGAGCAGGGTAAGGAAGGAATGTGCTAGAAAGTCTCTAGTTTC
 TTGTAAAGGAAGCCAGAGTTGACAGTACAAAGGTCGTGGCCAGCCCTGCAGCTTCAGCACCTGCC
 CCACCCAGAGTGGGAGTCAGGTGGAGCCACCTGCTGGGCTCCCCCAGAACTTTGCACACATCTTGC
 TATGTATTAGCCGATGTCTTTAGTGTGAGCCTCTGGATTCTGGGGTCTGGGCCAGTGGCCATAGT
 GAAGCCTGGGAATGAGTGTACTGCAGCATCTGGGCTGCCAGCCACAGGGAAGGGCCAAGCCCCAT
 GTAGCCCCAGTCATCCTGCCCAGCCCTGCCCTCTGGCCATGCCGGGAGGGGTCCGATCCTCTAGGC
 ATCGCCTTCACAGCCCCCTGCCCCCTGCCCTCTGTCTGGCTCTGCACCTGGTATATGGGTCTAGG
 ACCCAGATGGGGCTTTCCCTTTGTAGCCATCCAATGGGCATTGTGTGGGTGCTTGGAAACCCGGGAT
 GACTGAGGGGACACTGGAGTGGGTGCTTGTGTCTGTCTCAGAGGCCTTGGTCAGGATGAAGT
 TGGCTGACACAGCTTAGCTTGGTTTTGCTTATTCAAAGAGAAAATAACTACACATGGAAATGAAA
 CTAGCTGAAGCCTTTTCTTGTTTTAGCAACTGAAAATTGTACTTGGTCACTTTTGTGCTTGAGGAG
 GCCCATTTTCTGCCTGGCAGGGGGCAGGTCTGTGCCCTCCCGCTGACTCCTGCTGTGTCTGAGGT
 GCATTTCTGTGTGTACACACAAGGGCCAGGCTCCATTCTCCCTCCCTTTCCACCAGTGGCCACAGCC
 TCGTCTGGAAAAAGGACCAGGGGTCCCGGAGGAACCCATTGTGCTCTGCTTGGACAGCAGGCCTG
 GCACTGGGAGGTGGGGGTGAGCCCCCTCACAGCCTTGCCCCCTCCCCAAGGCTGGCAACCTGCCTCCC
 ATTGCCCAAGAGAGAGGGCAGGGAACAGGCTACTGTCTTCCCTGTGGAATTGCCGAGAAATCTAG
 CACCTTGCATGCTGGATCTGGGCTGCGGGGAGGCTCTTTTTCTCCCTGGCCTCCAGTGGCCACCAG
 GAGGATCTGCGCACGGTGCACAGCCCACCAGAGCACTACAGCCTTTTATTGAGTGGGGCAAGTGCT
 GGGCTGTGGTCTGTGCCCTGACAGCATCTTCCCCAGGCAGCGGCTCTGTGGAGGAGGCCATACTCCC
 CTAGTTGGCCACTGGGGCCACCACCTGACCACCACTGTGCCCTCATTGTTACTGCCTTGTGAGA
 TAAAACTGATTAAACCTTTGTGGCTGTGGTTGGCTGA

5 CDS de SHMT2

ATGCTGTACTTCTCTTTGTTTTGGGCGGCTCGGCCTCTGCAGAGATGTGGGCAGCTGGTCAGGATG
 GCCATTTCGGGCTCAGCACAGCAACGCAGCCAGACTCAGACTGGGGAAGCAAACAGGGGCTGGACA
 GGCCAGGAGAGCCTGTCCGACAGTGATCCTGAGATGTGGGAGTTGCTGCAGAGGGAGAAGGACAGG
 CAGTGTCTGTGGCCTGGAGCTCATTTGCCCTCAGAGAACTTCTGCAGCCGAGCTGCGCTGGAGGGCCTG
 GGGTCTGTCTGAACAACAAGTACTCGGAGGGTTATCCTGGCAAGAGATACTATGGGGGAGCAGAG
 GTGGTGGATGAAATTGAGCTGCTGTGCCAGCGCCGGGCCTTGGAAAGCCTTTGACCTGGATCCTGCA
 CAGTGGGGAGTCAATGTCCAGCCCTACTCCGGGTCCCCAGCCAACCTGGCCGTCTACACAGCCCTT
 CTGCAACCTCACGACCGGATCATGGGGCTGGACCTGCCCGATGGGGGCCATCTCACCCACGGCTAC
 ATGTCTGACGTCAAGCGGATATCAGCCACGTCCATCTTCTTCGAGTCTATGCCCTATAAGCTCAAC
 CCCAAACTGGCCTCATTGACTACAACCAGCTGGCACTGACTGCTCGACTTTTCCGGCCACGGCTC
 ATCATAGCTGGCACCAGCGCCTATGCTCGCCTCATTGACTACGCCCGCATGAGAGAGGTGTGTGAT
 GAAGTCAAAGCACACCTGCTGGCAGACATGGCCACATCAGTGGCCTGGTGGCTGCCAAGGTGATT
 CCCTCGCCTTTCAAGCACGCGGACATCGTCACCACCACTACTCACAAGACTCTTCGAGGGGCCAGG
 TCAGGGCTCATCTTCTACCGGAAAGGGGTGAAGGCTGTGGACCCCAAGACTGGCCGGGAGATCCCT
 TACACATTTGAGGACCGAATCAACTTTGCCGTGTTCCCATCCCTGCAGGGGGGGCCCCACAATCAT
 GCCATTGCTGCAGTAGCTGTGGCCCTAAAGCAGGCCTGCACCCCATGTTCCGGGAGTACTCCCTG
 CAGGTTCTGAAGAATGCTCGGGCCATGGCAGATGCCCTGCTAGAGCGAGGCTACTCACTGGTATCA
 GGTGGTACTGACAACCACCTGGTGTGGTGGACCTGCGGCCCAAGGGCCTGGATGGAGCTCGGGCT
 GAGCGGGTGTAGAGCTTGTATCCATCACTGCCAACAAGAACACCTGTCTGGAGACCGAAGTGCC
 ATCACACCGGGCGGCCCTGCGGCTTGGGGCCCCAGCCTTAACCTTCTCGACAGTTCCGTGAGGATGAC
 TTCCGGAGAGTTGTGGACTTTATAGATGAAGGGGTCAACATTGGCTTAGAGGTGAAGAGCAAGACT
 GCCAAGCTCCAGGATTTCAAATCCTTCTGTCTTAAGGACTCAGAAACAAGTCAGCGTCTGGCCAAC
 CTCAGGCAACGGGTGGAGCAGTTTGCCAGGGCCTTCCCCATGCCTGGTTTTTGATGAGCATTGA

3'UTR de SHMT2

10

AGGCACCTGGGAAATGAGGCCACAGACTCAAAGTTACTCTCCTTCCCCCTACCTGGGGCAGTGAA
 ATAGAAAGCCTTTCTATTTTTTGGTGGGGAGGGAAGACCTCTCACTTAGGGCAAGAGCCAGGTAT
 AGTCTCCCTTCCAGAAATTTGTAAGTGAAGAATCTTTTCTTTTTTCTTTTTTGGTAACAAGACT
 TAGAAGGAGGGGCCAGGCACTTTCTGTTTGAACCCCTGTCTATGATCACAGTGTGAGAGACGCGTCC
 TCTTTCTTGGGGAAGTTGAGGAGTGCCCTTCAGAGCCAGTAGCAGGCAGGGGTGGGTAGGCACCT
 CCTTCTGTTTTTATCTAATAAAATGCTAACCTGCCCTGAGTTTCCATTACTGTGGGTGGGGTTCC

CCTGGGCCAAACAGTGATTGTCTCCCTCAATGTGTACACCGCTCCGCTCCCACCACCGCTACCAC
AAGGACCCCCGGGGCTGCAGCCTCCTCTTCTGTCTCTGATCAGAGCCGACACCAGACGTGATTAG
CAGGCGCAGCAAATTCAATTTGTTAAATGAAATTGTATTTG

CDS de VIPR1

ATGCGCCCGCCAAGTCCGCTGCCCCGCGCTGGCTATGCGTGCTGGCAGGCGCCCTCGCCTGGGCC
CTTGGGCCGGCGGGCGGCCAGGCGGCCAGGCTGCAGGAGGAGTGTGACTATGTGCAGATGATCGAG
GTGCAGCACAAGCAGTGCCCTGGAGGAGGCCAGCTGGAGAATGAGACAATAGGCTGCAGCAAGATG
TGGGACAACCTCACCTGCTGGCCAGCCACCCCTCGGGGCCAGGTAGTTGTCTTGGCCTGTCCCTC
ATCTTCAAGCTCTTCTCCTCCATTCAAGGCCGCAATGTAAGCCGACAGCTGCACCGACGAAGGCTGG
ACGCACCTGGAGCCTGGCCCGTACCCCATTTGCCTGTGGTTTGGATGACAAGGCAGCGAGTTTGGAT
GAGCAGCAGACCATGTTCTACGGTTCTGTGAAGACCGGCTACACCATTTGGCTACGGCCTGTCCCTC
GCCACCCCTTCTGGTCGCCACAGCTATCCTGAGCCTGTTTCAGGAAGCTCCACTGCACGCGGAACCTAC
ATCCACATGCACCTCTTTCATATCCTTTCATCCTGAGGGCTGCCGCTGTCTTCATCAAAGACTTGGCC
CTCTTCGACAGCGGGGAGTCGGACCAAGTGTCTCCGAGGGCTCGGTGGGCTGTAAGGCAGCCATGGTC
TTTTTCCAATATTGTGTGTCATGGCTAACTTCTTCTGGCTGCTGGTGGAGGGCCTCTACCTGTACACC
CTGCTTGCCGCTCCTCTTCTCTGAGCGGAAGTACTTCTGGGGGTACATACTCATCTGGCTGGGGG
GTACCCAGCACAATTCACCATGGTGTGGACCATCGCCAGGATCCATTTTGGAGATTATGGGTGCTGG
GACACCATCAACTCCTCCTGCTGGTGGATCATAAAGGGCCCCATCCTCACCTCCATCTTGGTAAAC
TTCATCCTGTTTATTTGCATCATCCGAATCCTGCTTCAGAACTGCGGCCCCCAGATATCAGGAAG
AGTGACAGCAGTCCATACTCAAGGCTAGCCAGGTCCACACTCCTGCTGATCCCCCTGTTTGGAGTA
CACTACATCATGTTCCGCTTCTTTCCGGACAATTTTAAGCCTGAAGTGAAGATGGTCTTTGAGCTC
GTCGTGGGGTCTTTCCAGGGTTTGTGGTGGCTATCCTCTACTGCTTCCTCAATGGTGAGGTGCAG
GCGGAGCTGAGGCGGAAGTGGCGGGCGCTGGCACCTGCAGGGCGTCTGGGCTGGAACCCCCAAATAC
CGGCACCCGTCGGGAGGCAGCAACGGCGCCACGTGCAGCACGCAGGTTTCCATGCTGACCCGCGTC
AGCCCAGGTGCCCCGCGCTCCTCCAGCTTCCAAGCCGAAGTCTCCCTGGTCTGA

5

3'UTR de VIPR1

CCACCAGGATCCCAGGGGGCCCAAGGCGGGCCCTCCCCGCCCTTCCCACTCACCCCGGCAGACGCG
GGGACAGAGGCCTGCCCCGGGCGCGGCCAGCCCCGGCCCTGGGCTCGGAGGCTGCCCCGGCCCCCT
GGTCTCTGGTCCGGACACTCCTAGAGAACGCAGCCCTAGAGCCTGCCTGGAGCGTTTCTAGCAAGT
GAGAGAGATGGGAGCTCCTCTCCTGGAGGATTGCAGGTGGAACCTCAGTCATTAGACTCCTCCTCCA
AAGGCCCCCTACGCCAATCAAGGGCAAAAAGTCTACATACTTTTCATCCTGACTCTGCCCCCTGCTG
GCTCTTCTGCCCAATTGGAGGAAAGCAACCGGTGGATCCTCAAACAACACTGGTGTGACCTGAGGG
CAGAAAGGTCTGCCCCGGAAGGTACCAGCACCAACACCACGGTAGTGCCTGAAATTTACCATTT
GCTGTCAAGTTTCTTTGGGTAAAGCATTACCCTCAGGCATTTGACTGAAGATGCAGCTCACTACC
CTATTCTCTCTTTACGCTTAGTTATCAGCTTTTTAAAGTGGGTATTCTGGAGTTTTTGTGGAG
AGCACACCTATCTTAGTGGTTCCCCACCGAAGTGGACTGGCCCTGGGTGAGTCTGGTGGGAGGAC
GGTGCAACCCAAGGACTGAGGGACTCTGAAGCCTCTGGGAAATGAGAAGGCAGCCACCAGCGAATG
CTAGGTCTCGGACTAAGCCTACCTGCTCTCCAAGTCTCAGTGGCTTCATCTGTCAAGTGGGATCTG
TCACACCAGCCATACTTATCTCTCTGTGCTGTGGAAGCAACAGGAATCAAGAGCTGCCCTCCTTGT
CCACCCACCTATGTGCCAAGTGTGTAAGTGGCTCAGAGATGTGCACCCATGGGCTCTGACAGAA
AGCAGATACCTCACCTGCTACACATACAGGATTTGAACTCAGATCTGTCTGATAGGAATGTGAAA
GCACGGACTCTTACTGCTAACTTTTGTGTATCGTAACCAGCCAGATCCTCTTGGTTATTTGTTTAC
CACTTGTATTTAATGCCATTATCCCTGAATCCCCCTTGCCACCCACCCCTCCCTGGAGTGTGGC
TGAGGAGGCCTCCATCTCATGTATCATCTGGATAGGAGCCTGCTGGTCACAGCCTCCTCTGTCTGC
CCTTCACCCAGTGGCCACTCAGCTTCTTACCCACACCTCTGCCAGAAGATCCCCCTCAGGACTGCA
ACAGGCTTGTGCAACAATAAATGTTGGCTTGA

10

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

15

Tabla 2. Cebadores de clonación

Gene	Forward	Reverse
3'UTR de ABCB9	CCGGCCCTCGAGTGGGGGGCCCTGCTTCTC C	CCGGCCGCGGCCGCTTAGGGGTAAGAGG TAGTAC
CDS de ABCB9	CCGGCCCTCGAGATGCGGCTGTGGAAGGCGG T	CCGGCCGCGGCCGCTCAGGCCTTGTGAC TGCCGT
3'UTR de IGFBP2	CCGGCCCTCGAGACCGCAGCCAGCCGGTGCC T	CCGGCCGCGGCCGCTTACTTTTCCTTCC TTTAAT
CDS de IGFBP2	CCGGCCCTCGAG ATGCTGCCGAGAGTGGGCTG	CCGGCCGCGGCCGCTACTGCATCCGCT GGGTGT
3'UTR de MERTK	CCGGCCCTCGAGGGAGAGGTGCGGGGAGACA T	CCGGCCGCGGCCGCTTCCTTATTTCATA TTTTAT
CDS de MERTK	CCGGCCCTCGAGATGGGGCCGGCCCCGCTGC C	CCGGCCGCGGCCGCTCACATCAGGACTT CTGAGC
3'UTR de PITPNC1	CCGGCCCTCGAG CAATGGATGAAGTCCGAGAA	CCGGCCGCGGCCGCTTAAAAGACAGAAA CAAGTA
CDS de PITPNC1	CCGGCCCTCGAG ATGCTGCTGAAAGAGTACCG	CCGGCCGCGGCCGCTCATGTACTTGT GGGCAT
3'UTR de PSAT1	CCGGCCCTCGAGACACATCCTAACCCAGGATA T	CCGGCCGCGGCCGCTTAGATGTTTTAGG ACTTTA
CDS de PSAT1	CCGGCCGCGGCCGCTCATAGCTGATGCATCT CCA	CCGGCCCTCGAGATGGACGCCCCCAGGC AGGT
3'UTR de PYGB	CCGGCCCTCGAGGCACACCTGCCTTGGCGG G	CCGGCCGCGGCCGCTCAGCCAACCACAG CCACAA
CDS de PYGB	CCGGCCGTTTAAACATGGCGAAGCCGCTGAC GGA	CCGGCCGCGGCCGCTAGTCCCGGGGGA TGTGG
3'UTR de SHMT2	CCGGCCCTCGAGAGGCACCTGGGAAATGAGG C	CCGGCCGCGGCCGCCAAAATACAATTTT ATTAA
CDS de SHMT2	CCGGCCCTCGAGATGCTGTACTTCTCTTTGT T	CCGGCCGCGGCCGCTCAATGCTCATCAA AACCAG
CDS de VIPR	CCGGCCGTTTAAACTCAGACCAGGGAGACTT CGG	CCGGCCCTCGAGATGCGCCCGCCAAGTC CGCT
3'UTR de VIPR1	CCGGCCCTCGAGCCACCAGGATCCCAGGGGC C	CCGGCCGCGGCCGCTCCAAGCCAACATT TATTGT

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

Tabla 3. Cebadores de mutagénesis

Gen	Directo
3'UTR de IGFBP2	AAGGGGGTTGTGGTTCGGGGAGCTGGCACACAGGTTTGGGGAGGGGGAAGAGAA
3'UTR de MERTK	ATTCTAGGCGATCGCTCGAGGGAGACACGCGGGGAGACATTCCAAAAATCAAG
CDS de PITPNC1	TATGACAATGGATGATGTTTCGGGAAGTAGAGAAAAACATGCATGAACAAACCA
CDS de SHMT2	GCGAGGCTACTCACTGGTATCAGGTCACACTGACAACCACCTGGTGCTGGTGG
	Inverso
3'UTR de IGFBP2	TTCTCTTCCCCCTCCCCAAACCTGTGTGCCAGCTCCCCGACCACAACCCCCTT
3'UTR de MERTK	CTTGATTTTGGGAATGTCTCCCCGCGTGTCTCCCTCGAGCGATCGCCTAGAAT

Gen	Directo
CDS de PITPNC1	TGGTTTGTTCATGCATGTTTTCTCTACTTCCCGAACATCATCCATTGTCATA
CDS de SHMT2	CCACCAGCACCAGGTGGTTGTCAGTGTGACCTGATACCAGTGAGTAGCCTCGC

Proliferación de células cancerosas

Se sembraron células LM2 ($2,5 \times 10^4$) que expresan una horquilla de control o IGFBP2, PITPNC1 o MERTK de selección como diana en horquillas cortas por triplicado en placas de 6 pocillos y se contaron las células viables a los 5 días tras la siembra.

Histología

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

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

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

ELISA

Se determinaron los niveles de IGFBP2 en medios acondicionados usando un ELISA de IGFBP2 (AAHBLG-1-2, RAYBIOTECH, Norgross, GA).

Inmunotransferencia de tipo Western

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

Análisis de supervivencia libre de metástasis

Tras identificar los ocho genes regulados por miR-126 a través de un análisis integrador, se determinó si la expresión de estos genes en agregado se correlaciona con metástasis clínica humana. Se usaron datos de microalineamientos publicados de series de UCSF46, NKI47 y MSKCC13 para obtener valores de expresión a nivel

de sonda. Para los genes que estaban representados por múltiples sondas, se usaron sondas que presentaban una intensidad de señal suficiente, así como el mayor coeficiente de variación (en su mayor parte informativo) en un conjunto de datos independiente. Cada cáncer de mama se clasificó como positivo para rasgo distintivo de miR-126 si la suma de puntuaciones Z para los valores de expresión de los 8 genes era mayor que la media de la población.

Se generaron curvas de supervivencia libre de metástasis de Kaplan-Meier usando el software GRAPHPAD PRISM 5 (GRAPHPAD Software, Inc., LA Jolla, CA). Se determinó la significación estadística para las diferencias entre curvas de supervivencia de pacientes usando la prueba de rangos logarítmicos de Mantel-Cox usando el software GRAPHPAD Prism 5.

10 *Análisis de la densidad de vasos*

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

15 **EJEMPLO 2: Colonización metastásica sistémica suprimida de miR-126 endógeno**

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

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

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

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

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

65 **EJEMPLO 3: miR-126 suprime el reclutamiento endotelial metastásico por células de cáncer de mama**

Los hallazgos anteriores sugieren que el silenciamiento de miR-126 puede dar a las células metastásicas y a la metástasis incipiente una ventaja durante la colonización metastásica. Aunque se consideró la base de esta ventaja, se observó que las metástasis con silenciamiento de miR-126 mostraban densidades de vasos superiores

en visualización microscópica de cortes tisulares de pulmón con H&E. Para cuantificar esto, se realizó co-inmunotinción para vimentina humana, que marca células de cáncer de mama MDA-231, y el marcador endotelial MECA-32, que permitía cuantificar la densidad endotelial dentro de nódulos metastásicos en pulmones de ratones a los que se inyectaron o bien células de cáncer de mama de control o con miR-126 KD. El análisis de imágenes y la cuantificación revelaron que las metástasis derivadas de células miR-126 KD tenían una densidad endotelial significativamente superior (figura 2a; aumento del 35 %; $P = 0,02$).

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

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

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

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

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

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

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

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

Los hallazgos anteriores revelaron que miR-126 regula selectivamente el reclutamiento endotelial a células de

cáncer de mama independientemente de su ubicación anatómica.

EJEMPLO 5: El regulón de miR-126 promueve el reclutamiento endotelial

5 En este ejemplo, se realizó una investigación sistemática para identificar las dianas moleculares de miR-126 que median el reclutamiento endotelial y la colonización metastásica. Específicamente, se realizó análisis de transcriptomas de células LM2 que sobreexpresan miR-126 y se compararon alteraciones de transcrito global en células MDA-231 escasamente metastásicas y células LM2 altamente metastásicas.

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

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

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

30 positiva y fuertemente con recidiva metastásica humana.

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

35 mutación de las CDS de PIPNC1 y SHMT2 anularon la selección como diana mediada por miARN (figura 3f).

40

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

Nombre del gen	Veces	Nombre del gen	Veces	Nombre del gen	Veces	Nombre del gen	Veces
GDF15	-4,15	CTAGE5	-1,93	PRKAR1A	-1,80	KIAA0746	-1,71
RARA	-3,53	CDA	-1,93	CHAC1	-1,80	PADI4	-1,71
P8	-2,98	FLJ46385	-1,92	SCD	-1,80	BEX2	-1,71
RPS6KA2	-2,54	RALGPS2	-1,92	PCK2	-1,80	TAF13	-1,70
C20orf100	-2,47	BDNFOS	-1,91	CDC42BPB	-1,79	KLF4	-1,70
C12orf39	-2,38	MBNL1	-1,91	DSCR1	-1,79	DLG1	-1,70
HERPUD1	-2,37	MKX	-1,91	TCF7L2	-1,79	DDEFL1	-1,70
CTH	-2,36	LPIN1	-1,90	TNRC6C	-1,79	MID1IP1	-1,70
LOC23117	-2,35	DNAJB9	-1,90	TncRNA	-1,78	LOC124220	-1,70
LOC23117	-2,35	TncRNA	-1,90	CLDN23	-1,78	C10orf58	-1,70
ASNS	-2,35	BCL2L1	-1,90	GPR153	-1,78	CDKN1C	-1,70
RGC32	-2,33	DNAJB9	-1,90	KRTHA4	-1,78	DTX3	-1,70
CTH	-2,33	ENTH	-1,89	SCD	-1,78	SETD5	-1,70

ES 2 763 087 T3

Nombre del gen	Veces	Nombre del gen	Veces	Nombre del gen	Veces	Nombre del gen	Veces
NRP1	-2,28	S100A5	-1,89	VIPR1	-1,78	SLC7A11	-1,69
RIT1	-2,26	CST4	-1,89	SLC1A4	-1,77	WSB1	-1,69
HMGA1	-2,24	TRIB3	-1,89	PNPLA3	-1,77	KIAA1618	-1,69
DDIT3	-2,20	PHLDA1	-1,89	PPP1R11	-1,77	PYGB	-1,69
MBNL1	-2,20	RGNEF	-1,89	CFLAR	-1,77	CSNK1A1	-1,69
SUPT6H	-2,16	GFPT1	-1,88	NSF	-1,77	THBD	-1,68
LPIN1	-2,15	TMTC2	-1,88	ABHD4	-1,77	CG012	-1,68
ZNF451	-2,12	TPARL	-1,87	SOCS2	-1,77	DDX17	-1,68
THBD	-2,10	INHBB	-1,87	TACSTD2	-1,76	BGLAP	-1,68
ITGB4	-2,10	FASN	-1,87	SESN2	-1,76	MAGI1	-1,68
BHLHB8	-2,09	CALB2	-1,86	CTNNB1	-1,76	WARS	-1,68
SLCO4C1	-2,09	IGFBP2	-1,86	MAP1LC3B	-1,76	LOC283050	-1,68
AFF4	-2,07	SLC6A9	-1,86	LOC165186	-1,76	AQP3	-1,68
ATP6V0D2	-2,05	PLAT	-1,86	FLJ20054	-1,75	LOC400581	-1,68
KRT19	-2,05	SIN3B	-1,86	ZNF69	-1,74	CILN2	-1,68
SMAD3	-2,04	S100A6	-1,85	TNFSF4	-1,74	CD97	-1,68
ARHGAP5	-2,04	WSB1	-1,85	LOC441453	-1,74	CNTNAP3	-1,67
DNAJB9	-2,04	C20orf18	-1,85	MARS	-1,74	PDE2A	-1,67
ATF3	-2,03	HMGCS1	-1,85	LOC647135	-1,74	AOF1	-1,67
LOC440092	-2,03	MBNL1	-1,85	ACSL3	-1,74	IDS	-1,67
RIT1	-2,03	MBNL1	-1,85	SCD	-1,74	SCD	-1,67
ZNF499	-2,02	WHSC1L1	-1,85	SERINC2	-1,73	SHMT2	-1,67
ATXN1	-2,02	NCF2	-1,85	ZCCHC7	-1,73	RNF10	-1,67
CST6	-2,01	MERTK	-1,84	ETNK1	-1,73	CRLF3	-1,67
WBP2	-2,00	PFAAP5	-1,84	CHRM3	-1,73	PSAT1	-1,67
ZFAND3	-2,00	RTN4	-1,83	DCAMKL1	-1,73	FNBP1	-1,67
FLJ38717	-1,99	LARP6	-1,83	C20orf119	-1,73	LOC554203	-1,66
LOC158160	-1,99	TRIB3	-1,83	CDKN1C	-1,73	MYADM	-1,66
PITPNC1	-1,99	RAB37	-1,83	CXorf33	-1,72	ATXN1	-1,66
JMJD1C	-1,99	LOC399959	-1,83	LPIN1	-1,72	CA12	-1,66
PRO2852	-1,98	SYTL1	-1,82	GEM	-1,72	SF3B4	-1,66
AGR2	-1,97	SDF2L1	-1,82	KIAA0746	-1,72	KHDRBS1	-1,66
SLC7A5	-1,94	RPH3AL	-1,82	LOC115648	-1,72	EGFR	-1,66
NSF	-1,94	OGDH	-1,82	TIA1	-1,72	FRMD5	-1,65
BCL2L1	-1,94	CDIL	-1,81	FLJ10120	-1,71	ZNF252	-1,65
KIAA1267	-1,93	RHOQ	-1,81	DUSP5	-1,71	FNBP1	-1,65
NT5C2	-1,93	ITGB4	-1,81	RNF12	-1,71	TNKS2	-1,65
C9orf3	-1,65	C14orf118	-1,61				
AOF1	-1,65	PIAS1	-1,61				

ES 2 763 087 T3

Nombre del gen	Veces	Nombre del gen	Veces	Nombre del gen	Veces	Nombre del gen	Veces
PDP2	-1,65	PXN	-1,61				
MLLT10	-1,65	C14orf118	-1,61				
WIRE	-1,65	PIAS1	-1,61				
ATXN1	-1,65	FLJ43663	-1,65				
WARS	-1,65	SOS2	-1,61				
RAB5B	-1,64	FLJ43663	-1,60				
SQLE	-1,64	HCRP1	-1,60				
SCNN1A	-1,64	LOC646916	-1,60				
C14orf78	-1,64	NUP43	-1,60				
SHMT2	-1,63	PEBP1	-1,60				
PSCD3	-1,63	FLJ23556	-1,60				
LOC643998	-1,63	NRP1	-1,60				
PHGDH	-1,63	JUP	-1,60				
HEXA	-1,63						
CDRT4	-1,63						
ACTN4	-1,63						
C6orf155	-1,63						
EXT1	-1,63						
JDP2	-1,63						
LSS	-1,63						
PITPNC1	-1,63						
C20orf18	-1,63						
CLDN7	-1,63						
NPC1	-1,62						
IDH1	-1,62						
THBD	-1,62						
GSTM4	-1,62						
ATP5C1	-1,62						
PMM1	-1,62						
C9orf5	-1,62						
COL8A2	-1,62						
CST1	-1,62						
MAGI1	-1,62						
G6PD	-1,62						
FOSL1	-1,61						
RASD1	-1,61						
PITX1	-1,61						
P2RY2	-1,61						
HYOU1	-1,61						

Nombre del gen	Veces	Nombre del gen	Veces	Nombre del gen	Veces	Nombre del gen	Veces
CSF2RA	-1,61						
SLC16A4	-1,61						
SQLE	-1,61						
EFHD2	-1,61						
ABCB9	-1,61						
SYDE1	-1,61						
MAGI1	-1,61						
SLC7A11	-1,61						
HSPA5	-1,61						

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

5

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

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

10

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

15

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

20

25

Se encontró que, de manera importante, el silenciamiento de IGFBP2 usando horquillas cortas independientes suprimió significativamente la colonización al pulmón (sh₁ (donde sh es la forma siglada de *short hairpin*: horquilla corta): 10 veces; sh₂: 6,25 veces; figura 4c). Además, el silenciamiento de PITPNC1 y MERTK también inhibió fuertemente la colonización metastásica (PITPNC1sh₁: 7,69 veces; PITPNC1sh₂: 4,55 veces, figura 4d; MERTKsh₁: 3,91 veces; MERTKsh₂: 3,08 veces, figura 4e). Las secuencias de ARNhc usadas se enumeran en la tabla 5 a continuación.

30

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

35

Tabla 5. Secuencias de ARNhc

Gen	Secuencia
IGFBP2_sh1	CCGGCCAGTTCTGACACACGTATTTCTCGAGAAATACGTGTGTCAGAACTGGTTTTT (SEQ ID NO: 1)
IGFBP2_sh2	CCGGCAGGTTGCAGACAATGGCGATCTCGAGATCGCCATTGTCTGCAACCTGTTTTT (SEQ ID NO: 2)
MERTK_sh1	CCGGGCTTCTGGTCTTGATGTATTTCTCGAGAAATACATCAAGACCAGAAGCTTTTT (SEQ ID NO: 3)

Gen	Secuencia
MERTK_sh2	CCGGCCTGCATACTTACTTACTTTACTCGAGTAAAGTAAGTAAGTATGCAGGTTTTT (SEQ ID NO: 4)
PITPNC1_sh1	CCGGCGGGTGTATCTCAACAGCAAACCTCGAGTTTGCTGTTGAGATACACCCGTTTTTG (SEQ ID NO: 5)
PITPNC1_sh2	CCGGCAATGGATGAAGTCCGAGAATCTCGAGATTCTCGGACTTCATCCATTGTTTTTG (SEQ ID NO: 6)
SHMT2sh (sh: forma siglada de <i>short hairpin</i> , horquilla corta)	CCGGCCGGAGAGTTGTGGACTTTATCTCGAGATAAAGTCCACAACCTCTCCGGTTTTTG (SEQ ID NO: 7)
Controlsh (sh: forma siglada de <i>short hairpin</i> , horquilla corta)	CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCACCTC-GAGTTGGTGCTCTTCATCTTGTTGTTTTT (SEQ ID NO: 8)

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

De las dianas de miR-126, IGFBP2 es un factor secretado y, como tal, dispuesto para mediar la comunicación intercelular entre células de cáncer metastásicas y células endoteliales. Por tanto, se examinó si las células metastásicas secretan niveles aumentados de IGFBP2. Se encontró que, de hecho, los análisis de ELISA revelaron que las células LM2 metastásicas secretan niveles 2,1 veces superiores de este factor que la línea parental MDA-231 escasamente metastásica (figura 5a).

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

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

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

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

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

Los hallazgos anteriores están de acuerdo con el reclutamiento endotelial metastásico que resulta de la secreción de IGFBP2 de gen diana de miR-126, que se une a IGF1 en el espacio extracelular y potencia la activación dependiente

de IGF1 del receptor de IGF1 en células endoteliales. La activación de IGF1R potenciada en células endoteliales estimula a su vez la migración endotelial hacia las células de cáncer de mama metastásicas. De acuerdo con este modelo, fue suficiente la proteína IGFBP2 recombinante, de un modo dependiente de la dosis, para promover la quimiotaxia endotelial (figura 5g) y la migración (figura 15) de una manera dependiente de IGF1R.

EJEMPLO 8: MERTK media el reclutamiento a través de GAS6

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

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

Para determinar el mecanismo por el que el receptor de MERTK media el reclutamiento, se llevaron a cabo ensayos para someter a prueba el impacto de su ligando soluble GAS6 sobre el reclutamiento endotelial mediado por cáncer. La adición de GAS6 recombinante al sistema de cocultivo, a la concentración fisiológica encontrada en el suero humano (Balogh, I. *et al.*, Arterioscler Thromb Vasc Biol 25 (6), 1280 (2005)) redujo potencialmente el reclutamiento dependiente de miR-126 (figura 6b), lo que sugiere que GAS6 actúa como inhibidor del reclutamiento endotelial. El receptor de MERTK existe tanto en formas unidas a membrana como solubles, donde se ha escindido el dominio extracelular y por tanto se cree generalmente que actúa como un receptor señuelo para regular negativamente la activación del receptor de MERTK en células que lo expresan (Sather, S. *et al.*, Blood (3), 1026 (2007). Se detectó MERTK soluble en medios acondicionados de células MDA-MB-231 (figura 16). Sin restringirse a la teoría, MERTK soluble liberada de células cancerosas puede promover el reclutamiento endotelial a través de la unión e inhibición de GAS6. De acuerdo con esto, la adición de la forma soluble recombinante del dominio extracelular de MERTK (MerFc) suprimió la inhibición mediada por GAS6 exógeno así como sérico del reclutamiento endotelial por células cancerosas (figura 6b). De manera importante, ese efecto fue dependiente de miR-126 (figura 6b). Estos hallazgos sugieren que MERTK secretada de células metastásicas actúa como un receptor señuelo para GAS6, reduciendo de ese modo los efectos supresores de GAS6 en el reclutamiento de células endoteliales. A continuación, se enumeran secuencias de aminoácidos de tres isoformas de GAS6.

Isoforma 1

MAPSLSPGPAALRRAPQLLLLLLLAAECALAAALLPAREATQFLRPRQRRAFQVFEEAKQGH
LERECVEELCSREEAREVFENDPETDYFYPRYLDCINKYGSPTKNSGFATCVQNLDPQC
TPNPDCDRKGTQACQDLGNFFCLCKAGWGGRLCDKDVNECSQENGGLQICHNKPGSFHC
SCHSGFELSSDGRTCQDIDECADSEACGEARCKNLPGSYSLCDEGFAYSSQEKACRDVD
ECLQGRCEQVCVNSPGSYTCHCDGRGGLKLSQDMTDCEDILPCVPFVSVAKSVKSLYLGRM
FSGTPVIRLRFRKRLQPTRLVAEFDFTFDPEGILLFAGGHQDSTWIVLALRAGRLELQLR
YNGVGRVTSSGPVINHGMWQTISVEELARNLVIKVNDAVMKIAVAGDLFQPERGLYHLN
LTVGGIPFHEKDLVQPINPRLDGCMRSWNWLNGETTTIQETVKVNTRMQCFVTERGSFY
PGSGFAFYSLDYMRTPLDVGTESTWEVEVVAHIRPAADTGVLFAFWAPDLRAVPLSVALV
DYHSTKKLKKQLVVLAVEHTALALMEIKVCDGQEHVVTVSLRDGEATLEVDGTRGQSEVS
AAQLQERLAVLERHLRSPVLTTFAGGLPDVPVTSAPVTAIFYRGCMTELVNRRLLDLDEAAY
KHSDITAHSCPPVEPAAA

Isoforma 2

MDTCEIILPCVPFVSVAKSVKSLYLGRMFSGTPVIRLRFRKRLQPTRLVAEFDFTFDPEGI
LLFAGGHQDSTWIVLALRAGRLELQLRYNGVGRVTSSGPVINHGMWQTISVEELARNLVI
KVNDAVMKIAVAGDLFQPERGLYHLNLTVGGIPFHEKDLVQPINPRLDGCMRSWNWLN
EDTTIQETVKVNTRMQCFVTERGSFYPGSGFAFYSLDYMRTPLDVGTESTWEVEVVAHI
RPAADTGVLFAFWAPDLRAVPLSVALVDYHSTKKLKKQLVVLAVEHTALALMEIKVCDGQ
EHVVTVSLRDGEATLEVDGTRGQSEVSAAQLQERLAVLERHLRSPVLTTFAGGLPDVPVTS
APVTAIFYRGCMTELVNRRLLDLDEAAYKHSDITAHSCPPVEPAAA

Isoforma 3

MFSGTFVIRLRFRKRLQPTRLVAEFDRTFDPEGILLFAGGHQDSTWIVLALRAGRLELQL
 RYNGVGRVTSSGPFVINHGMWQTISSVEELARNLVIKVNRDAVMKIAVAGDLFQPERGLYHL
 NLTVGGI PFHEKDLVQPINRLDGCMSWNWLNGETTTIQETVKVNTRMQCFSVTERGSF
 YPGSGFAFYSLDYMRTPLDVGTESTWEVEVVAHIRPAADTGVLFALWAPDLRAVPLSVAL
 VDYHSTKKLKKQLVVLAVEHTALALMEIKVCDGQEHVTVSLRDGEATLEVDGTRGQSEV
 SAAQLQERLAVLERHLRSPVLTTFAGGLPDVPVTSAPVTA FYRGCMTLEVNRRLLDLDEAA
 YKHS DITAHSCPFVEPAAA

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

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

Los hallazgos anteriores, que comprenden ensayos *in vitro* así como análisis *in vivo* tanto de reclutamiento endotelial mediado por células de cáncer como de reclutamiento mediado por proteínas recombinantes, demostraron que IGFBP2 y MERTK expresados en cáncer son necesarios y bastan para mediar el reclutamiento endotelial y transmiten rutas paralelas que emanan de células de cáncer metastásicas (figura 6e).

EJEMPLO 9. Regulón de miARN que media angiogénesis metastásica

Los hallazgos descritos anteriormente revelaron que un miARN expresado en células cancerosas puede regular de manera autónoma no celular el complejo proceso de perfusión vascular y reclutamiento endotelial metastásicos a través de la regulación coordinada de IGFBP2, MERTK y PTPN1 (un conjunto novedoso de genes de angiogénesis y metástasis).

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

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

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

Aunque se identificó IGFBP2 como regulador positivo positivo del reclutamiento endotelial a través de su activación

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

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

En vista de su papel como promotor de angiogénesis, resultó inesperado que miR-126 también suprimía la angiogénesis en, por ejemplo, cáncer de mama, tal como se da a conocer en el presente documento. Resultó inesperado que miR-126 pudiera actuar al menos de dos modos diferentes. Por una parte, actúa de forma específica del tipo celular para suprimir la angiogénesis patológica tal como se da a conocer en esta solicitud. Tal como se da a conocer en esta solicitud, miR-126 suprimía la migración endotelial patológica hacia metástasis. Por otra parte, mientras está en desarrollo, la expresión de miR-126 mantiene la integridad de los vasos. De hecho, se demostró que miR-126 endotelial regula la angiogénesis en desarrollo a través de la selección como diana de Spred-1 y PIK3R2, genes no se regularon significativamente por miR-126 en células de cáncer de mama (Wang, S. *et al.*, Dev Cell 15 (2), 261 (2008) y Fish, J. E. *et al.*, Dev Cell 15 (2), 272 (2008)). Véase la tabla 6. A la inversa, se encontró que la inhibición de miR-126 en células endoteliales no potencia el reclutamiento endotelial por células endoteliales (figura 18) como lo hace en células de cáncer de mama. De acuerdo con esto, la inhibición de miR-126 en células endoteliales no alteró la expresión de PITPNC1, MERTK o IGF2BP2, mientras que aumentó la expresión de las dianas de miR-126 endoteliales establecidas, SPRED1 y PIK3R2 (figura 19).

Tabla 6

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

EJEMPLO 10. Identificación de genes o ARN no codificantes que regulan la colonización de cáncer metastásico de cualquier tejido corporal

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

1. Enfoque de Lenti-miR

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

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

Identificación de microARN que modulan la colonización hepática

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

Los amplicones de PCR resultantes fueron un material compuesto de diferentes microARN precursores con secuencias de promotor de T7 y se usaron como moldes para la transcripción *in vitro* para obtener una biblioteca de precursores biotinilada. La biblioteca biotinilada obtenida de los tumores y el conjunto de referencia se marcaron con

Cy3 y Cy5, respectivamente y se hibridaron con un microalineamiento diseñado para detectar las secuencias de microARN (Genosensor). Se realizó un experimento de intercambio de colorante para controlar la diferencia de colorantes.

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

2. Enfoque de Lentiplex

Transducción de biblioteca Lentiplex en células e inyección en animales

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

Se transdujeron poblaciones parenterales de las líneas celulares SW620, LS174T y WiDR (2×10^6 células) con la biblioteca a una MOI de 1, dando como resultado un conjunto población heterogénea, expresando las células individuales un único ARNhc. Se tradujo cada ARNhc a una representación de aproximadamente 100X. 48 h tras la transducción; se seleccionaron las células transducidas con puromicina durante 48 h para retirar las células no transducidas. Tras la selección con antibióticos, se dejó que las células restantes se recuperaran durante una semana antes de los experimentos posteriores. Se apartó la mitad de las células seleccionadas y se extrajo el ADN genómico. Este fue el conjunto de referencia de ADN genómico antes de la presión selectiva de la colonización hepática. La mitad de la población restante se inyectó en los hígados de ratones NOD/SCID. 3-5 semanas tras la inyección, se extrajo el ADN genómico de los tumores que se formaron en los hígados. Se realizaron transducciones e inyecciones en repeticiones para las tres líneas celulares.

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

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

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

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

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

En resumen, se inmunizaron ratones con péptido total IGFBP2 recombinante para generar una respuesta de anticuerpo policlonal. A continuación, se generaron bibliotecas de hibridomas mediante la fusión de células B aisladas de los ratones inmunizados a líneas celulares de mieloma. Entonces se aisló el sobrenadante de estos

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

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

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

Tabla 7

Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de M14	QVQLEQSGGGLVQPGGSLKLSGASGFTFSDYYMYWIRQTPEKRLEWVAYISNG GGITYYPDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSRLKSEDTAVYYCVRRSDGSWFVYW QGGLTVTVSA (SEQ ID NO: 9)
Secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de M14	DIVITQSPSSLAVSVGEKVTLSCKSSQSLLYSSNQKNCLAWYQQKPGQSPKLLIYW ASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYYSYLTFGAGTKLEL KRADAAPTVS (SEQ ID NO: 10)

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

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

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> THE ROCKEFELLER UNIVERSITY

<120> TRATAMIENTO DE TRASTORNOS DE LA ANGIOGÉNESIS

<130> JA69378P.EPPD1

<150> PCT/US2012/24697

<151> 10-02-2012

<150> US 61/441.738

<151> 11-02-2011

<160> 140

<170> PatentIn versión 3.5

5	<210> 1 <211> 57 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<400> 1 ccggccagtt ctgacacacg tatttctcga gaaatacgtg tgcagaact ggTTTT	57
15	<210> 2 <211> 57 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<400> 2 ccggcaggtt gcagacaatg gcgatctcga gatcgccatt gtctgcaacc tgTTTT	57
25	<210> 3 <211> 57 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 3 ccgggcttct ggtcttgatg tatttctcga gaaatacatc aagaccagaa gctTTTT	57
35	<210> 4 <211> 57 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
40	<400> 4 ccggcctgca tacttactta ctttactcga gtaaagtaag taagtatgca ggTTTT	57
45	<210> 5 <211> 58 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
50	<400> 5 ccggcgggtg tatctcaaca gcaaaactcga gtttgctgtt gagatacacc cgTTTTg	58
55	<210> 6 <211> 58 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
60	<400> 6 ccggcaatgg atgaagtccg agaatctcga gattctcgga cttcatccat tgtTTTTg	58
65	<210> 7 <211> 58 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 7 ccggccggag agttgtggac ttatctcga gataaagtc acaactctcc ggTTTTg	58
	<210> 8 <211> 57 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 8 ccggcaacaa gatgaagagc accaaactcga gttggtgctc ttcatttgtt tgTTTT	57

<210> 9
 <211> 118
 <212> PRT
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal M14 de
 10 IGFBP2
 <400> 9

 Gln Val Gln Leu Glu Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Gly Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

 Tyr Met Tyr Trp Ile Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

 Ala Tyr Ile Ser Asn Gly Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60

 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

 Leu Gln Met Ser Arg Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

 Val Arg Arg Ser Asp Gly Ser Trp Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

 Leu Val Thr Val Ser Ala
 115
 15
 <210> 10
 <211> 121
 <212> PRT
 20 <213> Artificial

 <220>
 <223> secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal M14 de
 IGFBP2
 25 <400> 10

Asp Ile Val Ile Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Cys Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

Tyr Tyr Ser Tyr Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser
115 120

<210> 11
<211> 328
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 11

Met Leu Pro Arg Val Gly Cys Pro Ala Leu Pro Leu Pro Pro Pro Pro
1 5 10 15

Leu Leu Pro Leu Leu Pro Leu Leu Leu Leu Leu Gly Ala Ser Gly
20 25 30

5

10

Gly Gly Gly Gly Ala Arg Ala Glu Val Leu Phe Arg Cys Pro Pro Cys
 35 40 45
 Thr Pro Glu Arg Leu Ala Ala Cys Gly Pro Pro Pro Val Ala Pro Pro
 50 55 60
 Ala Ala Val Ala Ala Val Ala Gly Gly Ala Arg Met Pro Cys Ala Glu
 65 70 75 80
 Leu Val Arg Glu Pro Gly Cys Gly Cys Cys Ser Val Cys Ala Arg Leu
 85 90 95
 Glu Gly Glu Ala Cys Gly Val Tyr Thr Pro Arg Cys Gly Gln Gly Leu
 100 105 110
 Arg Cys Tyr Pro His Pro Gly Ser Glu Leu Pro Leu Gln Ala Leu Val
 115 120 125
 Met Gly Glu Gly Thr Cys Glu Lys Arg Arg Asp Ala Glu Tyr Gly Ala
 130 135 140
 Ser Pro Glu Gln Val Ala Asp Asn Gly Asp Asp His Ser Glu Gly Gly
 145 150 155 160
 Leu Val Glu Asn His Val Asp Ser Thr Met Asn Met Leu Gly Gly Gly
 165 170 175
 Gly Ser Ala Gly Arg Lys Pro Leu Lys Ser Gly Met Lys Glu Leu Ala
 180 185 190
 Val Phe Arg Glu Lys Val Thr Glu Gln His Arg Gln Met Gly Lys Gly
 195 200 205
 Gly Lys His His Leu Gly Leu Glu Glu Pro Lys Lys Leu Arg Pro Pro
 210 215 220
 Pro Ala Arg Thr Pro Cys Gln Gln Glu Leu Asp Gln Val Leu Glu Arg
 225 230 235 240
 Ile Ser Thr Met Arg Leu Pro Asp Glu Arg Gly Pro Leu Glu His Leu
 245 250 255
 Tyr Ser Leu His Ile Pro Asn Cys Asp Lys His Gly Leu Tyr Asn Leu
 260 265 270
 Lys Gln Cys Lys Met Ser Leu Asn Gly Gln Arg Gly Glu Cys Trp Cys

275

280

285

Val Asn Pro Asn Thr Gly Lys Leu Ile Gln Gly Ala Pro Thr Ile Arg
290 295 300

Gly Asp Pro Glu Cys His Leu Phe Tyr Asn Glu Gln Gln Glu Ala Arg
305 310 315 320

Gly Val His Thr Gln Arg Met Gln
325

<210> 12
<211> 158
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 12

Met Gly Lys Ile Ser Ser Leu Pro Thr Gln Leu Phe Lys Cys Cys Phe
1 5 10 15

Cys Asp Phe Leu Lys Val Lys Met His Thr Met Ser Ser Ser His Leu
20 25 30

Phe Tyr Leu Ala Leu Cys Leu Leu Thr Phe Thr Ser Ser Ala Thr Ala
35 40 45

Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe
50 55 60

Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly
65 70 75 80

Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys
85 90 95

Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu
100 105 110

Lys Pro Ala Lys Ser Ala Arg Ser Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp
115 120 125

Met Pro Lys Thr Gln Lys Tyr Gln Pro Pro Ser Thr Asn Lys Asn Thr
130 135 140

Lys Ser Gln Arg Arg Lys Gly Ser Thr Phe Glu Glu Arg Lys
145 150 155

10

<210> 13

<211> 137
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 13

```

Met Ile Thr Pro Thr Val Lys Met His Thr Met Ser Ser Ser His Leu
1           5           10           15

Phe Tyr Leu Ala Leu Cys Leu Leu Thr Phe Thr Ser Ser Ala Thr Ala
          20           25           30

Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe
          35           40           45

Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly
50           55           60

Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys
65           70           75           80

Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu
          85           90           95

Lys Pro Ala Lys Ser Ala Arg Ser Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp
          100          105          110

Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly
          115          120          125

Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg Met
130           135
    
```

<210> 14
 <211> 195
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 14

15

Met	Gly	Lys	Ile	Ser	Ser	Leu	Pro	Thr	Gln	Leu	Phe	Lys	Cys	Cys	Phe	1	5	10	15
Cys	Asp	Phe	Leu	Lys	Val	Lys	Met	His	Thr	Met	Ser	Ser	Ser	His	Leu	20	25	30	
Phe	Tyr	Leu	Ala	Leu	Cys	Leu	Leu	Thr	Phe	Thr	Ser	Ser	Ala	Thr	Ala	35	40	45	
Gly	Pro	Glu	Thr	Leu	Cys	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Asp	Ala	Leu	Gln	Phe	50	55	60	
Val	Cys	Gly	Asp	Arg	Gly	Phe	Tyr	Phe	Asn	Lys	Pro	Thr	Gly	Tyr	Gly	65	70	75	80
Ser	Ser	Ser	Arg	Arg	Ala	Pro	Gln	Thr	Gly	Ile	Val	Asp	Glu	Cys	Cys	85	90	95	
Phe	Arg	Ser	Cys	Asp	Leu	Arg	Arg	Leu	Glu	Met	Tyr	Cys	Ala	Pro	Leu	100	105	110	
Lys	Pro	Ala	Lys	Ser	Ala	Arg	Ser	Val	Arg	Ala	Gln	Arg	His	Thr	Asp	115	120	125	
Met	Pro	Lys	Thr	Gln	Lys	Tyr	Gln	Pro	Pro	Ser	Thr	Asn	Lys	Asn	Thr	130	135	140	
Lys	Ser	Gln	Arg	Arg	Lys	Gly	Trp	Pro	Lys	Thr	His	Pro	Gly	Gly	Glu	145	150	155	160
Gln	Lys	Glu	Gly	Thr	Glu	Ala	Ser	Leu	Gln	Ile	Arg	Gly	Lys	Lys	Lys	165	170	175	
Glu	Gln	Arg	Arg	Glu	Ile	Gly	Ser	Arg	Asn	Ala	Glu	Cys	Arg	Gly	Lys	180	185	190	
Lys	Gly	Lys														195			

<210> 15
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 15

Met Gly Lys Ile Ser Ser Leu Pro Thr Gln Leu Phe Lys Cys Cys Phe
1 5 10 15

Cys Asp Phe Leu Lys Val Lys Met His Thr Met Ser Ser Ser His Leu
20 25 30

Phe Tyr Leu Ala Leu Cys Leu Leu Thr Phe Thr Ser Ser Ala Thr Ala
35 40 45

Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe
50 55 60

Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly
65 70 75 80

Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys
85 90 95

Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu
100 105 110

Lys Pro Ala Lys Ser Ala Arg Ser Val Arg Ala Gln Arg His Thr Asp
115 120 125

Met Pro Lys Thr Gln Lys Glu Val His Leu Lys Asn Ala Ser Arg Gly
130 135 140

Ser Ala Gly Asn Lys Asn Tyr Arg Met
145 150

<210> 16
<211> 1367
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 16

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

Lys Asn Ala Asp Leu Cys Tyr Leu Ser Thr Val Asp Trp Ser Leu Ile
 145 150 155 160

Leu Asp Ala Val Ser Asn Asn Tyr Ile Val Gly Asn Lys Pro Pro Lys
 165 170 175

Glu Cys Gly Asp Leu Cys Pro Gly Thr Met Glu Glu Lys Pro Met Cys
 180 185 190

Glu Lys Thr Thr Ile Asn Asn Glu Tyr Asn Tyr Arg Cys Trp Thr Thr
 195 200 205

Asn Arg Cys Gln Lys Met Cys Pro Ser Thr Cys Gly Lys Arg Ala Cys
 210 215 220

Thr Glu Asn Asn Glu Cys Cys His Pro Glu Cys Leu Gly Ser Cys Ser
 225 230 235 240

Ala Pro Asp Asn Asp Thr Ala Cys Val Ala Cys Arg His Tyr Tyr Tyr
 245 250 255

Ala Gly Val Cys Val Pro Ala Cys Pro Pro Asn Thr Tyr Arg Phe Glu
 260 265 270

Gly Trp Arg Cys Val Asp Arg Asp Phe Cys Ala Asn Ile Leu Ser Ala
 275 280 285

Glu Ser Ser Asp Ser Glu Gly Phe Val Ile His Asp Gly Glu Cys Met
 290 295 300

Gln Glu Cys Pro Ser Gly Phe Ile Arg Asn Gly Ser Gln Ser Met Tyr
 305 310 315 320

Cys Ile Pro Cys Glu Gly Pro Cys Pro Lys Val Cys Glu Glu Glu Lys
 325 330 335

Lys Thr Lys Thr Ile Asp Ser Val Thr Ser Ala Gln Met Leu Gln Gly
 340 345 350

Cys Thr Ile Phe Lys Gly Asn Leu Leu Ile Asn Ile Arg Arg Gly Asn
 355 360 365

Asn Ile Ala Ser Glu Leu Glu Asn Phe Met Gly Leu Ile Glu Val Val
 370 375 380

Thr Gly Tyr Val Lys Ile Arg His Ser His Ala Leu Val Ser Leu Ser

385		390		395		400									
Phe	Leu	Lys	Asn	Leu	Arg	Leu	Ile	Leu	Gly	Glu	Glu	Gln	Leu	Glu	Gly
				405					410					415	
Asn	Tyr	Ser	Phe	Tyr	Val	Leu	Asp	Asn	Gln	Asn	Leu	Gln	Gln	Leu	Trp
			420					425					430		
Asp	Trp	Asp	His	Arg	Asn	Leu	Thr	Ile	Lys	Ala	Gly	Lys	Met	Tyr	Phe
		435					440					445			
Ala	Phe	Asn	Pro	Lys	Leu	Cys	Val	Ser	Glu	Ile	Tyr	Arg	Met	Glu	Glu
	450					455					460				
Val	Thr	Gly	Thr	Lys	Gly	Arg	Gln	Ser	Lys	Gly	Asp	Ile	Asn	Thr	Arg
465					470					475					480
Asn	Asn	Gly	Glu	Arg	Ala	Ser	Cys	Glu	Ser	Asp	Val	Leu	His	Phe	Thr
				485					490					495	
Ser	Thr	Thr	Thr	Ser	Lys	Asn	Arg	Ile	Ile	Ile	Thr	Trp	His	Arg	Tyr
			500					505					510		
Arg	Pro	Pro	Asp	Tyr	Arg	Asp	Leu	Ile	Ser	Phe	Thr	Val	Tyr	Tyr	Lys
		515					520					525			
Glu	Ala	Pro	Phe	Lys	Asn	Val	Thr	Glu	Tyr	Asp	Gly	Gln	Asp	Ala	Cys
	530					535					540				
Gly	Ser	Asn	Ser	Trp	Asn	Met	Val	Asp	Val	Asp	Leu	Pro	Pro	Asn	Lys
545					550					555					560
Asp	Val	Glu	Pro	Gly	Ile	Leu	Leu	His	Gly	Leu	Lys	Pro	Trp	Thr	Gln
				565					570					575	
Tyr	Ala	Val	Tyr	Val	Lys	Ala	Val	Thr	Leu	Thr	Met	Val	Glu	Asn	Asp
			580					585					590		
His	Ile	Arg	Gly	Ala	Lys	Ser	Glu	Ile	Leu	Tyr	Ile	Arg	Thr	Asn	Ala
		595					600					605			
Ser	Val	Pro	Ser	Ile	Pro	Leu	Asp	Val	Leu	Ser	Ala	Ser	Asn	Ser	Ser
	610					615					620				
Ser	Gln	Leu	Ile	Val	Lys	Trp	Asn	Pro	Pro	Ser	Leu	Pro	Asn	Gly	Asn
625					630					635					640

Leu Ser Tyr Tyr Ile Val Arg Trp Gln Arg Gln Pro Gln Asp Gly Tyr
 645 650 655

Leu Tyr Arg His Asn Tyr Cys Ser Lys Asp Lys Ile Pro Ile Arg Lys
 660 665 670

Tyr Ala Asp Gly Thr Ile Asp Ile Glu Glu Val Thr Glu Asn Pro Lys
 675 680 685

Thr Glu Val Cys Gly Gly Glu Lys Gly Pro Cys Cys Ala Cys Pro Lys
 690 695 700

Thr Glu Ala Glu Lys Gln Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Tyr Arg Lys
 705 710 715 720

Val Phe Glu Asn Phe Leu His Asn Ser Ile Phe Val Pro Arg Pro Glu
 725 730 735

Arg Lys Arg Arg Asp Val Met Gln Val Ala Asn Thr Thr Met Ser Ser
 740 745 750

Arg Ser Arg Asn Thr Thr Ala Ala Asp Thr Tyr Asn Ile Thr Asp Pro
 755 760 765

Glu Glu Leu Glu Thr Glu Tyr Pro Phe Phe Glu Ser Arg Val Asp Asn
 770 775 780

Lys Glu Arg Thr Val Ile Ser Asn Leu Arg Pro Phe Thr Leu Tyr Arg
 785 790 795 800

Ile Asp Ile His Ser Cys Asn His Glu Ala Glu Lys Leu Gly Cys Ser
 805 810 815

Ala Ser Asn Phe Val Phe Ala Arg Thr Met Pro Ala Glu Gly Ala Asp
 820 825 830

Asp Ile Pro Gly Pro Val Thr Trp Glu Pro Arg Pro Glu Asn Ser Ile
 835 840 845

Phe Leu Lys Trp Pro Glu Pro Glu Asn Pro Asn Gly Leu Ile Leu Met
 850 855 860

Tyr Glu Ile Lys Tyr Gly Ser Gln Val Glu Asp Gln Arg Glu Cys Val
 865 870 875 880

Ser Arg Gln Glu Tyr Arg Lys Tyr Gly Gly Ala Lys Leu Asn Arg Leu
 885 890 895

Asn Pro Gly Asn Tyr Thr Ala Arg Ile Gln Ala Thr Ser Leu Ser Gly
 900 905 910

Asn Gly Ser Trp Thr Asp Pro Val Phe Phe Tyr Val Gln Ala Lys Thr
 915 920 925

Gly Tyr Glu Asn Phe Ile His Leu Ile Ile Ala Leu Pro Val Ala Val
 930 935 940

Leu Leu Ile Val Gly Gly Leu Val Ile Met Leu Tyr Val Phe His Arg
 945 950 955 960

Lys Arg Asn Asn Ser Arg Leu Gly Asn Gly Val Leu Tyr Ala Ser Val
 965 970 975

Asn Pro Glu Tyr Phe Ser Ala Ala Asp Val Tyr Val Pro Asp Glu Trp
 980 985 990

Glu Val Ala Arg Glu Lys Ile Thr Met Ser Arg Glu Leu Gly Gln Gly
 995 1000 1005

Ser Phe Gly Met Val Tyr Glu Gly Val Ala Lys Gly Val Val Lys
 1010 1015 1020

Asp Glu Pro Glu Thr Arg Val Ala Ile Lys Thr Val Asn Glu Ala
 1025 1030 1035

Ala Ser Met Arg Glu Arg Ile Glu Phe Leu Asn Glu Ala Ser Val
 1040 1045 1050

Met Lys Glu Phe Asn Cys His His Val Val Arg Leu Leu Gly Val
 1055 1060 1065

Val Ser Gln Gly Gln Pro Thr Leu Val Ile Met Glu Leu Met Thr
 1070 1075 1080

Arg Gly Asp Leu Lys Ser Tyr Leu Arg Ser Leu Arg Pro Glu Met
 1085 1090 1095

Glu Asn Asn Pro Val Leu Ala Pro Pro Ser Leu Ser Lys Met Ile
 1100 1105 1110

Gln Met Ala Gly Glu Ile Ala Asp Gly Met Ala Tyr Leu Asn Ala
 1115 1120 1125

Asn Lys Phe Val His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Val
 1130 1135 1140

Ala Glu 1145	Asp Phe Thr Val 1150	Lys Ile Gly Asp Phe Gly 1155	Met Thr Arg
Asp Ile 1160	Tyr Glu Thr Asp Tyr 1165	Tyr Arg Lys Gly Gly 1170	Lys Gly Leu
Leu Pro 1175	Val Arg Trp Met Ser 1180	Pro Glu Ser Leu Lys 1185	Asp Gly Val
Phe Thr 1190	Thr Tyr Ser Asp Val 1195	Trp Ser Phe Gly Val 1200	Val Leu Trp
Glu Ile 1205	Ala Thr Leu Ala Glu 1210	Gln Pro Tyr Gln Gly 1215	Leu Ser Asn
Glu Gln 1220	Val Leu Arg Phe Val 1225	Met Glu Gly Gly Leu 1230	Leu Asp Lys
Pro Asp 1235	Asn Cys Pro Asp Met 1240	Leu Phe Glu Leu Met 1245	Arg Met Cys
Trp Gln 1250	Tyr Asn Pro Lys Met 1255	Arg Pro Ser Phe Leu 1260	Glu Ile Ile
Ser Ser 1265	Ile Lys Glu Glu Met 1270	Glu Pro Gly Phe Arg 1275	Glu Val Ser
Phe Tyr 1280	Tyr Ser Glu Glu Asn 1285	Lys Leu Pro Glu Pro 1290	Glu Glu Leu
Asp Leu 1295	Glu Pro Glu Asn Met 1300	Glu Ser Val Pro Leu 1305	Asp Pro Ser
Ala Ser 1310	Ser Ser Ser Leu Pro 1315	Leu Pro Asp Arg His 1320	Ser Gly His
Lys Ala 1325	Glu Asn Gly Pro Gly 1330	Pro Gly Val Leu Val 1335	Leu Arg Ala
Ser Phe 1340	Asp Glu Arg Gln Pro 1345	Tyr Ala His Met Asn 1350	Gly Gly Arg
Lys Asn 1355	Glu Arg Ala Leu Pro 1360	Leu Pro Gln Ser Ser 1365	Thr Cys

<210> 17
 <211> 999
 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 17

```

Met Gly Pro Ala Pro Leu Pro Leu Leu Leu Gly Leu Phe Leu Pro Ala
1          5          10          15

Leu Trp Arg Arg Ala Ile Thr Glu Ala Arg Glu Glu Ala Lys Pro Tyr
          20          25          30

Pro Leu Phe Pro Gly Pro Phe Pro Gly Ser Leu Gln Thr Asp His Thr
          35          40          45

Pro Leu Leu Ser Leu Pro His Ala Ser Gly Tyr Gln Pro Ala Leu Met
          50          55          60

Phe Ser Pro Thr Gln Pro Gly Arg Pro His Thr Gly Asn Val Ala Ile
65          70          75          80

Pro Gln Val Thr Ser Val Glu Ser Lys Pro Leu Pro Pro Leu Ala Phe
          85          90          95

Lys His Thr Val Gly His Ile Ile Leu Ser Glu His Lys Gly Val Lys
          100          105          110

Phe Asn Cys Ser Ile Ser Val Pro Asn Ile Tyr Gln Asp Thr Thr Ile
          115          120          125

Ser Trp Trp Lys Asp Gly Lys Glu Leu Leu Gly Ala His His Ala Ile
          130          135          140

Thr Gln Phe Tyr Pro Asp Asp Glu Val Thr Ala Ile Ile Ala Ser Phe
          145          150          155          160

Ser Ile Thr Ser Val Gln Arg Ser Asp Asn Gly Ser Tyr Ile Cys Lys
          165          170          175

Met Lys Ile Asn Asn Glu Glu Ile Val Ser Asp Pro Ile Tyr Ile Glu
          180          185          190

Val Gln Gly Leu Pro His Phe Thr Lys Gln Pro Glu Ser Met Asn Val
          195          200          205

Thr Arg Asn Thr Ala Phe Asn Leu Thr Cys Gln Ala Val Gly Pro Pro
          210          215          220

Glu Pro Val Asn Ile Phe Trp Val Gln Asn Ser Ser Arg Val Asn Glu

```

225					230					235					240				
Gln	Pro	Glu	Lys	Ser	Pro	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Pro	Gly	Leu	Thr	Glu				
				245					250					255					
Met	Ala	Val	Phe	Ser	Cys	Glu	Ala	His	Asn	Asp	Lys	Gly	Leu	Thr	Val				
			260					265					270						
Ser	Lys	Gly	Val	Gln	Ile	Asn	Ile	Lys	Ala	Ile	Pro	Ser	Pro	Pro	Thr				
		275					280					285							
Glu	Val	Ser	Ile	Arg	Asn	Ser	Thr	Ala	His	Ser	Ile	Leu	Ile	Ser	Trp				
	290					295					300								
Val	Pro	Gly	Phe	Asp	Gly	Tyr	Ser	Pro	Phe	Arg	Asn	Cys	Ser	Ile	Gln				
305					310					315					320				
Val	Lys	Glu	Ala	Asp	Pro	Leu	Ser	Asn	Gly	Ser	Val	Met	Ile	Phe	Asn				
				325					330					335					
Thr	Ser	Ala	Leu	Pro	His	Leu	Tyr	Gln	Ile	Lys	Gln	Leu	Gln	Ala	Leu				
			340					345					350						
Ala	Asn	Tyr	Ser	Ile	Gly	Val	Ser	Cys	Met	Asn	Glu	Ile	Gly	Trp	Ser				
		355					360					365							
Ala	Val	Ser	Pro	Trp	Ile	Leu	Ala	Ser	Thr	Thr	Glu	Gly	Ala	Pro	Ser				
	370					375					380								
Val	Ala	Pro	Leu	Asn	Val	Thr	Val	Phe	Leu	Asn	Glu	Ser	Ser	Asp	Asn				
385				390						395					400				
Val	Asp	Ile	Arg	Trp	Met	Lys	Pro	Pro	Thr	Lys	Gln	Gln	Asp	Gly	Glu				
				405					410					415					
Leu	Val	Gly	Tyr	Arg	Ile	Ser	His	Val	Trp	Gln	Ser	Ala	Gly	Ile	Ser				
			420					425					430						
Lys	Glu	Leu	Leu	Glu	Glu	Val	Gly	Gln	Asn	Gly	Ser	Arg	Ala	Arg	Ile				
		435					440					445							
Ser	Val	Gln	Val	His	Asn	Ala	Thr	Cys	Thr	Val	Arg	Ile	Ala	Ala	Val				
	450					455					460								
Thr	Arg	Gly	Gly	Val	Gly	Pro	Phe	Ser	Asp	Pro	Val	Lys	Ile	Phe	Ile				
465					470					475					480				

Pro Ala His Gly Trp Val Asp Tyr Ala Pro Ser Ser Thr Pro Ala Pro
 485 490 495

Gly Asn Ala Asp Pro Val Leu Ile Ile Phe Gly Cys Phe Cys Gly Phe
 500 505 510

Ile Leu Ile Gly Leu Ile Leu Tyr Ile Ser Leu Ala Ile Arg Lys Arg
 515 520 525

Val Gln Glu Thr Lys Phe Gly Asn Ala Phe Thr Glu Glu Asp Ser Glu
 530 535 540

Leu Val Val Asn Tyr Ile Ala Lys Lys Ser Phe Cys Arg Arg Ala Ile
 545 550 555 560

Glu Leu Thr Leu His Ser Leu Gly Val Ser Glu Glu Leu Gln Asn Lys
 565 570 575

Leu Glu Asp Val Val Ile Asp Arg Asn Leu Leu Ile Leu Gly Lys Ile
 580 585 590

Leu Gly Glu Gly Glu Phe Gly Ser Val Met Glu Gly Asn Leu Lys Gln
 595 600 605

Glu Asp Gly Thr Ser Leu Lys Val Ala Val Lys Thr Met Lys Leu Asp
 610 615 620

Asn Ser Ser Gln Arg Glu Ile Glu Glu Phe Leu Ser Glu Ala Ala Cys
 625 630 635 640

Met Lys Asp Phe Ser His Pro Asn Val Ile Arg Leu Leu Gly Val Cys
 645 650 655

Ile Glu Met Ser Ser Gln Gly Ile Pro Lys Pro Met Val Ile Leu Pro
 660 665 670

Phe Met Lys Tyr Gly Asp Leu His Thr Tyr Leu Leu Tyr Ser Arg Leu
 675 680 685

Glu Thr Gly Pro Lys His Ile Pro Leu Gln Thr Leu Leu Lys Phe Met
 690 695 700

Val Asp Ile Ala Leu Gly Met Glu Tyr Leu Ser Asn Arg Asn Phe Leu
 705 710 715 720

His Arg Asp Leu Ala Ala Arg Asn Cys Met Leu Arg Asp Asp Met Thr
 725 730 735

Val Cys Val Ala Asp Phe Gly Leu Ser Lys Lys Ile Tyr Ser Gly Asp
 740 745 750
 Tyr Tyr Arg Gln Gly Arg Ile Ala Lys Met Pro Val Lys Trp Ile Ala
 755 760 765
 Ile Glu Ser Leu Ala Asp Arg Val Tyr Thr Ser Lys Ser Asp Val Trp
 770 775 780
 Ala Phe Gly Val Thr Met Trp Glu Ile Ala Thr Arg Gly Met Thr Pro
 785 790 795 800
 Tyr Pro Gly Val Gln Asn His Glu Met Tyr Asp Tyr Leu Leu His Gly
 805 810 815
 His Arg Leu Lys Gln Pro Glu Asp Cys Leu Asp Glu Leu Tyr Glu Ile
 820 825 830
 Met Tyr Ser Cys Trp Arg Thr Asp Pro Leu Asp Arg Pro Thr Phe Ser
 835 840 845
 Val Leu Arg Leu Gln Leu Glu Lys Leu Leu Glu Ser Leu Pro Asp Val
 850 855 860
 Arg Asn Gln Ala Asp Val Ile Tyr Val Asn Thr Gln Leu Leu Glu Ser
 865 870 875 880
 Ser Glu Gly Leu Ala Gln Gly Ser Thr Leu Ala Pro Leu Asp Leu Asn
 885 890 895
 Ile Asp Pro Asp Ser Ile Ile Ala Ser Cys Thr Pro Arg Ala Ala Ile
 900 905 910
 Ser Val Val Thr Ala Glu Val His Asp Ser Lys Pro His Glu Gly Arg
 915 920 925
 Tyr Ile Leu Asn Gly Gly Ser Glu Glu Trp Glu Asp Leu Thr Ser Ala
 930 935 940
 Pro Ser Ala Ala Val Thr Ala Glu Lys Asn Ser Val Leu Pro Gly Glu
 945 950 955 960
 Arg Leu Val Arg Asn Gly Val Ser Trp Ser His Ser Ser Met Leu Pro
 965 970 975
 Leu Gly Ser Ser Leu Pro Asp Glu Leu Leu Phe Ala Asp Asp Ser Ser
 980 985 990

Glu Gly Ser Glu Val Leu Met
995

<210> 18
<211> 332
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 18

Met Leu Leu Lys Glu Tyr Arg Ile Cys Met Pro Leu Thr Val Asp Glu
1 5 10 15

Tyr Lys Ile Gly Gln Leu Tyr Met Ile Ser Lys His Ser His Glu Gln
20 25 30

Ser Asp Arg Gly Glu Gly Val Glu Val Val Gln Asn Glu Pro Phe Glu
35 40 45

Asp Pro His His Gly Asn Gly Gln Phe Thr Glu Lys Arg Val Tyr Leu
50 55 60

Asn Ser Lys Leu Pro Ser Trp Ala Arg Ala Val Val Pro Lys Ile Phe
65 70 75 80

Tyr Val Thr Glu Lys Ala Trp Asn Tyr Tyr Pro Tyr Thr Ile Thr Glu
85 90 95

Tyr Thr Cys Ser Phe Leu Pro Lys Phe Ser Ile His Ile Glu Thr Lys
100 105 110

Tyr Glu Asp Asn Lys Gly Ser Asn Asp Thr Ile Phe Asp Asn Glu Ala
115 120 125

Lys Asp Val Glu Arg Glu Val Cys Phe Ile Asp Ile Ala Cys Asp Glu
130 135 140

Ile Pro Glu Arg Tyr Tyr Lys Glu Ser Glu Asp Pro Lys His Phe Lys
145 150 155 160

Ser Glu Lys Thr Gly Arg Gly Gln Leu Arg Glu Gly Trp Arg Asp Ser
165 170 175

His Gln Pro Ile Met Cys Ser Tyr Lys Leu Val Thr Val Lys Phe Glu
180 185 190

Val Trp Gly Leu Gln Thr Arg Val Glu Gln Phe Val His Lys Val Val
195 200 205

Arg Asp Ile Leu Leu Ile Gly His Arg Gln Ala Phe Ala Trp Val Asp
210 215 220

Glu Trp Tyr Asp Met Thr Met Asp Glu Val Arg Glu Phe Glu Arg Ala
225 230 235 240

Thr Gln Glu Ala Thr Asn Lys Lys Ile Gly Ile Phe Pro Pro Ala Ile
245 250 255

Ser Ile Ser Ser Ile Pro Leu Leu Pro Ser Ser Val Arg Ser Ala Pro
260 265 270

Ser Ser Ala Pro Ser Thr Pro Leu Ser Thr Asp Ala Pro Glu Phe Leu
275 280 285

Ser Val Pro Lys Asp Arg Pro Arg Lys Lys Ser Ala Pro Glu Thr Leu
290 295 300

Thr Leu Pro Asp Pro Glu Lys Lys Ala Thr Leu Asn Leu Pro Gly Met
305 310 315 320

His Ser Ser Asp Lys Pro Cys Arg Pro Lys Ser Glu
325 330

<210> 19
<211> 268
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 19

Met Leu Leu Lys Glu Tyr Arg Ile Cys Met Pro Leu Thr Val Asp Glu
1 5 10 15

Tyr Lys Ile Gly Gln Leu Tyr Met Ile Ser Lys His Ser His Glu Gln
20 25 30

Ser Asp Arg Gly Glu Gly Val Glu Val Val Gln Asn Glu Pro Phe Glu
35 40 45

Asp Pro His His Gly Asn Gly Gln Phe Thr Glu Lys Arg Val Tyr Leu
50 55 60

Asn Ser Lys Leu Pro Ser Trp Ala Arg Ala Val Val Pro Lys Ile Phe
65 70 75 80

Tyr Val Thr Glu Lys Ala Trp Asn Tyr Tyr Pro Tyr Thr Ile Thr Glu
85 90 95

Tyr Thr Cys Ser Phe Leu Pro Lys Phe Ser Ile His Ile Glu Thr Lys
 100 105 110
 Tyr Glu Asp Asn Lys Gly Ser Asn Asp Thr Ile Phe Asp Asn Glu Ala
 115 120 125
 Lys Asp Val Glu Arg Glu Val Cys Phe Ile Asp Ile Ala Cys Asp Glu
 130 135 140
 Ile Pro Glu Arg Tyr Tyr Lys Glu Ser Glu Asp Pro Lys His Phe Lys
 145 150 155 160
 Ser Glu Lys Thr Gly Arg Gly Gln Leu Arg Glu Gly Trp Arg Asp Ser
 165 170 175
 His Gln Pro Ile Met Cys Ser Tyr Lys Leu Val Thr Val Lys Phe Glu
 180 185 190
 Val Trp Gly Leu Gln Thr Arg Val Glu Gln Phe Val His Lys Val Val
 195 200 205
 Arg Asp Ile Leu Leu Ile Gly His Arg Gln Ala Phe Ala Trp Val Asp
 210 215 220
 Glu Trp Tyr Asp Met Thr Met Asp Asp Val Arg Glu Tyr Glu Lys Asn
 225 230 235 240
 Met His Glu Gln Thr Asn Ile Lys Val Cys Asn Gln His Ser Ser Pro
 245 250 255
 Val Asp Asp Ile Glu Ser His Ala Gln Thr Ser Thr
 260 265

<210> 20
 <211> 766
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 20

Met Arg Leu Trp Lys Ala Val Val Val Thr Leu Ala Phe Met Ser Val
 1 5 10 15
 Asp Ile Cys Val Thr Thr Ala Ile Tyr Val Phe Ser His Leu Asp Arg
 20 25 30
 Ser Leu Leu Glu Asp Ile Arg His Phe Asn Ile Phe Asp Ser Val Leu
 35 40 45

Asp Leu Trp Ala Ala Cys Leu Tyr Arg Ser Cys Leu Leu Leu Gly Ala
 50 55 60
 Thr Ile Gly Val Ala Lys Asn Ser Ala Leu Gly Pro Arg Arg Leu Arg
 65 70 75 80
 Ala Ser Trp Leu Val Ile Thr Leu Val Cys Leu Phe Val Gly Ile Tyr
 85 90 95
 Ala Met Val Lys Leu Leu Leu Phe Ser Glu Val Arg Arg Pro Ile Arg
 100 105 110
 Asp Pro Trp Phe Trp Ala Leu Phe Val Trp Thr Tyr Ile Ser Leu Gly
 115 120 125
 Ala Ser Phe Leu Leu Trp Trp Leu Leu Ser Thr Val Arg Pro Gly Thr
 130 135 140
 Gln Ala Leu Glu Pro Gly Ala Ala Thr Glu Ala Glu Gly Phe Pro Gly
 145 150 155 160
 Ser Gly Arg Pro Pro Pro Glu Gln Ala Ser Gly Ala Thr Leu Gln Lys
 165 170 175
 Leu Leu Ser Tyr Thr Lys Pro Asp Val Ala Phe Leu Val Ala Ala Ser
 180 185 190
 Phe Phe Leu Ile Val Ala Ala Leu Gly Glu Thr Phe Leu Pro Tyr Tyr
 195 200 205
 Thr Gly Arg Ala Ile Asp Gly Ile Val Ile Gln Lys Ser Met Asp Gln
 210 215 220
 Phe Ser Thr Ala Val Val Ile Val Cys Leu Leu Ala Ile Gly Ser Ser
 225 230 235 240
 Phe Ala Ala Gly Ile Arg Gly Gly Ile Phe Thr Leu Ile Phe Ala Arg
 245 250 255
 Leu Asn Ile Arg Leu Arg Asn Cys Leu Phe Arg Ser Leu Val Ser Gln
 260 265 270
 Glu Thr Ser Phe Phe Asp Glu Asn Arg Thr Gly Asp Leu Ile Ser Arg
 275 280 285
 Leu Thr Ser Asp Thr Thr Met Val Ser Asp Leu Val Ser Gln Asn Ile

290	295	300
Asn Val Phe Leu Arg 305	Asn Thr Val Lys Val 310	Thr Gly Val Val Val Phe 315 320
Met Phe Ser Leu Ser 325	Trp Gln Leu Ser Leu 330	Val Thr Phe Met Gly Phe 335
Pro Ile Ile Met Met 340	Val Ser Asn Ile Tyr 345	Gly Lys Tyr Tyr Lys Arg 350
Leu Ser Lys Glu Val 355	Gln Asn Ala Leu Ala 360	Arg Ala Ser Asn Thr Ala 365
Glu Glu Thr Ile Ser 370	Ala Met Lys Thr Val 375	Arg Ser Phe Ala Asn Glu 380
Glu Glu Glu Ala Glu 385	Val Tyr Leu Arg Lys 390	Leu Gln Gln Val Tyr Lys 395 400
Leu Asn Arg Lys Glu 405	Ala Ala Ala Tyr Met 410	Tyr Tyr Val Trp Gly Ser 415
Gly Leu Thr Leu Leu 420	Val Val Gln Val Ser 425	Ile Leu Tyr Tyr Gly Gly 430
His Leu Val Ile Ser 435	Gly Gln Met Thr Ser 440	Gly Asn Leu Ile Ala Phe 445
Ile Ile Tyr Glu Phe Val 450	Leu Gly Asp Cys Met 455	Glu Ser Val Gly Ser 460
Val Tyr Ser Gly Leu 465	Met Gln Gly Val Gly 470	Ala Ala Glu Lys Val Phe 475 480
Glu Phe Ile Asp Arg 485	Gln Pro Thr Met Val 490	His Asp Gly Ser Leu Ala 495
Pro Asp His Leu Glu 500	Gly Arg Val Asp Phe 505	Glu Asn Val Thr Phe Thr 510
Tyr Arg Thr Arg Pro 515	His Thr Gln Val Leu 520	Gln Asn Val Ser Phe Ser 525
Leu Ser Pro Gly Lys Val 530	Thr Ala Leu Val Gly 535	Pro Ser Gly Ser Gly 540

Lys Ser Ser Cys Val Asn Ile Leu Glu Asn Phe Tyr Pro Leu Glu Gly
545 550 555 560

Gly Arg Val Leu Leu Asp Gly Lys Pro Ile Ser Ala Tyr Asp His Lys
565 570 575

Tyr Leu His Arg Val Ile Ser Leu Val Ser Gln Glu Pro Val Leu Phe
580 585 590

Ala Arg Ser Ile Thr Asp Asn Ile Ser Tyr Gly Leu Pro Thr Val Pro
595 600 605

Phe Glu Met Val Val Glu Ala Ala Gln Lys Ala Asn Ala His Gly Phe
610 615 620

Ile Met Glu Leu Gln Asp Gly Tyr Ser Thr Glu Thr Gly Glu Lys Gly
625 630 635 640

Ala Gln Leu Ser Gly Gly Gln Lys Gln Arg Val Ala Met Ala Arg Ala
645 650 655

Leu Val Arg Asn Pro Pro Val Leu Ile Leu Asp Glu Ala Thr Ser Ala
660 665 670

Leu Asp Ala Glu Ser Glu Tyr Leu Ile Gln Gln Ala Ile His Gly Asn
675 680 685

Leu Gln Lys His Thr Val Leu Ile Ile Ala His Arg Leu Ser Thr Val
690 695 700

Glu His Ala His Leu Ile Val Val Leu Asp Lys Gly Arg Val Val Gln
705 710 715 720

Gln Gly Thr His Gln Gln Leu Leu Ala Gln Gly Gly Leu Tyr Ala Lys
725 730 735

Leu Val Gln Arg Gln Met Leu Gly Leu Gln Pro Ala Ala Asp Phe Thr
740 745 750

Ala Gly His Asn Glu Pro Val Ala Asn Gly Ser His Lys Ala
755 760 765

<210> 21
<211> 370
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 21

Met Asp Ala Pro Arg Gln Val Val Asn Phe Gly Pro Gly Pro Ala Lys
 1 5 10 15
 Leu Pro His Ser Val Leu Leu Glu Ile Gln Lys Glu Leu Leu Asp Tyr
 20 25 30
 Lys Gly Val Gly Ile Ser Val Leu Glu Met Ser His Arg Ser Ser Asp
 35 40 45
 Phe Ala Lys Ile Ile Asn Asn Thr Glu Asn Leu Val Arg Glu Leu Leu
 50 55 60
 Ala Val Pro Asp Asn Tyr Lys Val Ile Phe Leu Gln Gly Gly Gly Cys
 65 70 75 80
 Gly Gln Phe Ser Ala Val Pro Leu Asn Leu Ile Gly Leu Lys Ala Gly
 85 90 95
 Arg Cys Ala Asp Tyr Val Val Thr Gly Ala Trp Ser Ala Lys Ala Ala
 100 105 110
 Glu Glu Ala Lys Lys Phe Gly Thr Ile Asn Ile Val His Pro Lys Leu
 115 120 125
 Gly Ser Tyr Thr Lys Ile Pro Asp Pro Ser Thr Trp Asn Leu Asn Pro
 130 135 140
 Asp Ala Ser Tyr Val Tyr Tyr Cys Ala Asn Glu Thr Val His Gly Val
 145 150 155 160
 Glu Phe Asp Phe Ile Pro Asp Val Lys Gly Ala Val Leu Val Cys Asp
 165 170 175
 Met Ser Ser Asn Phe Leu Ser Lys Pro Val Asp Val Ser Lys Phe Gly
 180 185 190
 Val Ile Phe Ala Gly Ala Gln Lys Asn Val Gly Ser Ala Gly Val Thr
 195 200 205
 Val Val Ile Val Arg Asp Asp Leu Leu Gly Phe Ala Leu Arg Glu Cys
 210 215 220
 Pro Ser Val Leu Glu Tyr Lys Val Gln Ala Gly Asn Ser Ser Leu Tyr
 225 230 235 240
 Asn Thr Pro Pro Cys Phe Ser Ile Tyr Val Met Gly Leu Val Leu Glu
 245 250 255

Trp Ile Lys Asn Asn Gly Gly Ala Ala Ala Met Glu Lys Leu Ser Ser
260 265 270

Ile Lys Ser Gln Thr Ile Tyr Glu Ile Ile Asp Asn Ser Gln Gly Phe
275 280 285

Tyr Val Cys Pro Val Glu Pro Gln Asn Arg Ser Lys Met Asn Ile Pro
290 295 300

Phe Arg Ile Gly Asn Ala Lys Gly Asp Asp Ala Leu Glu Lys Arg Phe
305 310 315 320

Leu Asp Lys Ala Leu Glu Leu Asn Met Leu Ser Leu Lys Gly His Arg
325 330 335

Ser Val Gly Gly Ile Arg Ala Ser Leu Tyr Asn Ala Val Thr Ile Glu
340 345 350

Asp Val Gln Lys Leu Ala Ala Phe Met Lys Lys Phe Leu Glu Met His
355 360 365

Gln Leu
370

<210> 22
<211> 324
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 22

Met Asp Ala Pro Arg Gln Val Val Asn Phe Gly Pro Gly Pro Ala Lys
1 5 10 15

Leu Pro His Ser Val Leu Leu Glu Ile Gln Lys Glu Leu Leu Asp Tyr
20 25 30

Lys Gly Val Gly Ile Ser Val Leu Glu Met Ser His Arg Ser Ser Asp
35 40 45

Phe Ala Lys Ile Ile Asn Asn Thr Glu Asn Leu Val Arg Glu Leu Leu
50 55 60

Ala Val Pro Asp Asn Tyr Lys Val Ile Phe Leu Gln Gly Gly Gly Cys
65 70 75 80

Gly Gln Phe Ser Ala Val Pro Leu Asn Leu Ile Gly Leu Lys Ala Gly
85 90 95

```

Arg Cys Ala Asp Tyr Val Val Thr Gly Ala Trp Ser Ala Lys Ala Ala
      100                      105                      110

Glu Glu Ala Lys Lys Phe Gly Thr Ile Asn Ile Val His Pro Lys Leu
      115                      120                      125

Gly Ser Tyr Thr Lys Ile Pro Asp Pro Ser Thr Trp Asn Leu Asn Pro
      130                      135                      140

Asp Ala Ser Tyr Val Tyr Tyr Cys Ala Asn Glu Thr Val His Gly Val
      145                      150                      155                      160

Glu Phe Asp Phe Ile Pro Asp Val Lys Gly Ala Val Leu Val Cys Asp
      165                      170                      175

Met Ser Ser Asn Phe Leu Ser Lys Pro Val Asp Val Ser Lys Phe Gly
      180                      185                      190

Val Ile Phe Ala Gly Ala Gln Lys Asn Val Gly Ser Ala Gly Val Thr
      195                      200                      205

Val Val Ile Val Arg Asp Asp Leu Leu Gly Phe Ala Leu Arg Glu Cys
      210                      215                      220

Pro Ser Val Leu Glu Tyr Lys Val Gln Ala Gly Asn Ser Ser Leu Tyr
      225                      230                      235                      240

Asn Thr Pro Pro Cys Phe Ser Ile Tyr Val Met Gly Leu Val Leu Glu
      245                      250                      255

Trp Ile Lys Asn Asn Gly Gly Ala Ala Ala Met Glu Lys Leu Ser Ser
      260                      265                      270

Ile Lys Ser Gln Thr Ile Tyr Glu Ile Ile Asp Asn Ser Gln Gly Phe
      275                      280                      285

Tyr Val Ser Val Gly Gly Ile Arg Ala Ser Leu Tyr Asn Ala Val Thr
      290                      295                      300

Ile Glu Asp Val Gln Lys Leu Ala Ala Phe Met Lys Lys Phe Leu Glu
      305                      310                      315                      320

Met His Gln Leu

```

<210> 23
 <211> 843
 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 23

```

Met Ala Lys Pro Leu Thr Asp Ser Glu Lys Arg Lys Gln Ile Ser Val
1      5      10      15

Arg Gly Leu Ala Gly Leu Gly Asp Val Ala Glu Val Arg Lys Ser Phe
      20      25      30

Asn Arg His Leu His Phe Thr Leu Val Lys Asp Arg Asn Val Ala Thr
      35      40      45

Pro Arg Asp Tyr Phe Phe Ala Leu Ala His Thr Val Arg Asp His Leu
      50      55      60

Val Gly Arg Trp Ile Arg Thr Gln Gln His Tyr Tyr Glu Arg Asp Pro
65      70      75      80

Lys Arg Ile Tyr Tyr Leu Ser Leu Glu Phe Tyr Met Gly Arg Thr Leu
      85      90      95

Gln Asn Thr Met Val Asn Leu Gly Leu Gln Asn Ala Cys Asp Glu Ala
      100      105      110

Ile Tyr Gln Leu Gly Leu Asp Leu Glu Glu Leu Glu Glu Ile Glu Glu
      115      120      125

Asp Ala Gly Leu Gly Asn Gly Gly Leu Gly Arg Leu Ala Ala Cys Phe
      130      135      140

Leu Asp Ser Met Ala Thr Leu Gly Leu Ala Ala Tyr Gly Tyr Gly Ile
145      150      155      160

Arg Tyr Glu Phe Gly Ile Phe Asn Gln Lys Ile Val Asn Gly Trp Gln
      165      170      175

Val Glu Glu Ala Asp Asp Trp Leu Arg Tyr Gly Asn Pro Trp Glu Lys
      180      185      190

Ala Arg Pro Glu Tyr Met Leu Pro Val His Phe Tyr Gly Arg Val Glu
      195      200      205

His Thr Pro Asp Gly Val Lys Trp Leu Asp Thr Gln Val Val Leu Ala
      210      215      220

Met Pro Tyr Asp Thr Pro Val Pro Gly Tyr Lys Asn Asn Thr Val Asn
225      230      235      240

```

Thr Met Arg Leu Trp Ser Ala Lys Ala Pro Asn Asp Phe Lys Leu Gln
 245 250 255

Asp Phe Asn Val Gly Asp Tyr Ile Glu Ala Val Leu Asp Arg Asn Leu
 260 265 270

Ala Glu Asn Ile Ser Arg Val Leu Tyr Pro Asn Asp Asn Phe Phe Glu
 275 280 285

Gly Lys Glu Leu Arg Leu Lys Gln Glu Tyr Phe Val Val Ala Ala Thr
 290 295 300

Leu Gln Asp Ile Ile Arg Arg Phe Lys Ser Ser Lys Phe Gly Cys Arg
 305 310 315 320

Asp Pro Val Arg Thr Cys Phe Glu Thr Phe Pro Asp Lys Val Ala Ile
 325 330 335

Gln Leu Asn Asp Thr His Pro Ala Leu Ser Ile Pro Glu Leu Met Arg
 340 345 350

Ile Leu Val Asp Val Glu Lys Val Asp Trp Asp Lys Ala Trp Glu Ile
 355 360 365

Thr Lys Lys Thr Cys Ala Tyr Thr Asn His Thr Val Leu Pro Glu Ala
 370 375 380

Leu Glu Arg Trp Pro Val Ser Met Phe Glu Lys Leu Leu Pro Arg His
 385 390 395 400

Leu Glu Ile Ile Tyr Ala Ile Asn Gln Arg His Leu Asp His Val Ala
 405 410 415

Ala Leu Phe Pro Gly Asp Val Asp Arg Leu Arg Arg Met Ser Val Ile
 420 425 430

Glu Glu Gly Asp Cys Lys Arg Ile Asn Met Ala His Leu Cys Val Ile
 435 440 445

Gly Ser His Ala Val Asn Gly Val Ala Arg Ile His Ser Glu Ile Val
 450 455 460

Lys Gln Ser Val Phe Lys Asp Phe Tyr Glu Leu Glu Pro Glu Lys Phe
 465 470 475 480

Gln Asn Lys Thr Asn Gly Ile Thr Pro Arg Arg Trp Leu Leu Leu Cys

485								490					495				
Asn	Pro	Gly	Leu	Ala	Asp	Thr	Ile	Val	Glu	Lys	Ile	Gly	Glu	Glu	Phe		
			500					505					510				
Leu	Thr	Asp	Leu	Ser	Gln	Leu	Lys	Lys	Leu	Leu	Pro	Leu	Val	Ser	Asp		
		515					520					525					
Glu	Val	Phe	Ile	Arg	Asp	Val	Ala	Lys	Val	Lys	Gln	Glu	Asn	Lys	Leu		
	530					535					540						
Lys	Phe	Ser	Ala	Phe	Leu	Glu	Lys	Glu	Tyr	Lys	Val	Lys	Ile	Asn	Pro		
545					550					555					560		
Ser	Ser	Met	Phe	Asp	Val	His	Val	Lys	Arg	Ile	His	Glu	Tyr	Lys	Arg		
				565					570					575			
Gln	Leu	Leu	Asn	Cys	Leu	His	Val	Val	Thr	Leu	Tyr	Asn	Arg	Ile	Lys		
			580					585					590				
Arg	Asp	Pro	Ala	Lys	Ala	Phe	Val	Pro	Arg	Thr	Val	Met	Ile	Gly	Gly		
		595					600					605					
Lys	Ala	Ala	Pro	Gly	Tyr	His	Met	Ala	Lys	Leu	Ile	Ile	Lys	Leu	Val		
	610					615					620						
Thr	Ser	Ile	Gly	Asp	Val	Val	Asn	His	Asp	Pro	Val	Val	Gly	Asp	Arg		
625					630					635					640		
Leu	Lys	Val	Ile	Phe	Leu	Glu	Asn	Tyr	Arg	Val	Ser	Leu	Ala	Glu	Lys		
				645					650					655			
Val	Ile	Pro	Ala	Ala	Asp	Leu	Ser	Gln	Gln	Ile	Ser	Thr	Ala	Gly	Thr		
			660					665					670				
Glu	Ala	Ser	Gly	Thr	Gly	Asn	Met	Lys	Phe	Met	Leu	Asn	Gly	Ala	Leu		
		675					680					685					
Thr	Ile	Gly	Thr	Met	Asp	Gly	Ala	Asn	Val	Glu	Met	Ala	Glu	Glu	Ala		
	690					695					700						
Gly	Ala	Glu	Asn	Leu	Phe	Ile	Phe	Gly	Leu	Arg	Val	Glu	Asp	Val	Glu		
705					710					715					720		
Ala	Leu	Asp	Arg	Lys	Gly	Tyr	Asn	Ala	Arg	Glu	Tyr	Tyr	Asp	His	Leu		
				725					730					735			

Pro Glu Leu Lys Gln Ala Val Asp Gln Ile Ser Ser Gly Phe Phe Ser
740 745 750

Pro Lys Glu Pro Asp Cys Phe Lys Asp Ile Val Asn Met Leu Met His
755 760 765

His Asp Arg Phe Lys Val Phe Ala Asp Tyr Glu Ala Tyr Met Gln Cys
770 775 780

Gln Ala Gln Val Asp Gln Leu Tyr Arg Asn Pro Lys Glu Trp Thr Lys
785 790 795 800

Lys Val Ile Arg Asn Ile Ala Cys Ser Gly Lys Phe Ser Ser Asp Arg
805 810 815

Thr Ile Thr Glu Tyr Ala Arg Glu Ile Trp Gly Val Glu Pro Ser Asp
820 825 830

Leu Gln Ile Pro Pro Pro Asn Ile Pro Arg Asp
835 840

<210> 24
<211> 504
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 24

Met Leu Tyr Phe Ser Leu Phe Trp Ala Ala Arg Pro Leu Gln Arg Cys
1 5 10 15

Gly Gln Leu Val Arg Met Ala Ile Arg Ala Gln His Ser Asn Ala Ala
20 25 30

Gln Thr Gln Thr Gly Glu Ala Asn Arg Gly Trp Thr Gly Gln Glu Ser
35 40 45

Leu Ser Asp Ser Asp Pro Glu Met Trp Glu Leu Leu Gln Arg Glu Lys
50 55 60

Asp Arg Gln Cys Arg Gly Leu Glu Leu Ile Ala Ser Glu Asn Phe Cys
65 70 75 80

Ser Arg Ala Ala Leu Glu Ala Leu Gly Ser Cys Leu Asn Asn Lys Tyr
85 90 95

Ser Glu Gly Tyr Pro Gly Lys Arg Tyr Tyr Gly Gly Ala Glu Val Val
100 105 110

Asp Glu Ile Glu Leu Leu Cys Gln Arg Arg Ala Leu Glu Ala Phe Asp
 115 120 125

Leu Asp Pro Ala Gln Trp Gly Val Asn Val Gln Pro Tyr Ser Gly Ser
 130 135 140

Pro Ala Asn Leu Ala Val Tyr Thr Ala Leu Leu Gln Pro His Asp Arg
 145 150 155 160

Ile Met Gly Leu Asp Leu Pro Asp Gly Gly His Leu Thr His Gly Tyr
 165 170 175

Met Ser Asp Val Lys Arg Ile Ser Ala Thr Ser Ile Phe Phe Glu Ser
 180 185 190

Met Pro Tyr Lys Leu Asn Pro Lys Thr Gly Leu Ile Asp Tyr Asn Gln
 195 200 205

Leu Ala Leu Thr Ala Arg Leu Phe Arg Pro Arg Leu Ile Ile Ala Gly
 210 215 220

Thr Ser Ala Tyr Ala Arg Leu Ile Asp Tyr Ala Arg Met Arg Glu Val
 225 230 235 240

Cys Asp Glu Val Lys Ala His Leu Leu Ala Asp Met Ala His Ile Ser
 245 250 255

Gly Leu Val Ala Ala Lys Val Ile Pro Ser Pro Phe Lys His Ala Asp
 260 265 270

Ile Val Thr Thr Thr Thr His Lys Thr Leu Arg Gly Ala Arg Ser Gly
 275 280 285

Leu Ile Phe Tyr Arg Lys Gly Val Lys Ala Val Asp Pro Lys Thr Gly
 290 295 300

Arg Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Glu Asp Arg Ile Asn Phe Ala Val Phe
 305 310 315 320

Pro Ser Leu Gln Gly Gly Pro His Asn His Ala Ile Ala Ala Val Ala
 325 330 335

Val Ala Leu Lys Gln Ala Cys Thr Pro Met Phe Arg Glu Tyr Ser Leu
 340 345 350

Gln Val Leu Lys Asn Ala Arg Ala Met Ala Asp Ala Leu Leu Glu Arg
 355 360 365

Gly Tyr Ser Leu Val Ser Gly Gly Thr Asp Asn His Leu Val Leu Val
370 375 380

Asp Leu Arg Pro Lys Gly Leu Asp Gly Ala Arg Ala Glu Arg Val Leu
385 390 395 400

Glu Leu Val Ser Ile Thr Ala Asn Lys Asn Thr Cys Pro Gly Asp Arg
405 410 415

Ser Ala Ile Thr Pro Gly Gly Leu Arg Leu Gly Ala Pro Ala Leu Thr
420 425 430

Ser Arg Gln Phe Arg Glu Asp Asp Phe Arg Arg Val Val Asp Phe Ile
435 440 445

Asp Glu Gly Val Asn Ile Gly Leu Glu Val Lys Ser Lys Thr Ala Lys
450 455 460

Leu Gln Asp Phe Lys Ser Phe Leu Leu Lys Asp Ser Glu Thr Ser Gln
465 470 475 480

Arg Leu Ala Asn Leu Arg Gln Arg Val Glu Gln Phe Ala Arg Ala Phe
485 490 495

Pro Met Pro Gly Phe Asp Glu His
500

<210> 25
<211> 494
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 25

Met Leu Tyr Phe Ser Leu Phe Trp Ala Ala Arg Pro Leu Gln Arg Cys
1 5 10 15

Gly Gln Leu Val Arg Met Ala Ile Arg Ala Gln His Ser Asn Ala Ala
20 25 30

Gln Thr Gln Thr Gly Glu Ala Asn Arg Gly Trp Thr Gly Gln Glu Ser
35 40 45

Leu Ser Asp Ser Asp Pro Glu Met Trp Glu Leu Leu Gln Arg Glu Lys
50 55 60

Asp Arg Gln Cys Arg Gly Leu Glu Leu Ile Ala Ser Glu Asn Phe Cys
65 70 75 80

Ser Arg Ala Ala Leu Glu Ala Leu Gly Ser Cys Leu Asn Asn Lys Tyr
 85 90 95
 Ser Glu Gly Tyr Pro Gly Lys Arg Tyr Tyr Gly Gly Ala Glu Val Val
 100 105 110
 Asp Glu Ile Glu Leu Leu Cys Gln Arg Arg Ala Leu Glu Ala Phe Asp
 115 120 125
 Leu Asp Pro Ala Gln Trp Gly Val Asn Val Gln Pro Tyr Ser Gly Ser
 130 135 140
 Pro Ala Asn Leu Ala Val Tyr Thr Ala Leu Leu Gln Pro His Asp Arg
 145 150 155 160
 Ile Met Gly Leu Asp Leu Pro Asp Gly Gly His Leu Thr His Gly Tyr
 165 170 175
 Met Ser Asp Val Lys Arg Ile Ser Ala Thr Ser Ile Phe Phe Glu Ser
 180 185 190
 Met Pro Tyr Lys Leu Asn Leu Ala Leu Thr Ala Arg Leu Phe Arg Pro
 195 200 205
 Arg Leu Ile Ile Ala Gly Thr Ser Ala Tyr Ala Arg Leu Ile Asp Tyr
 210 215 220
 Ala Arg Met Arg Glu Val Cys Asp Glu Val Lys Ala His Leu Leu Ala
 225 230 235 240
 Asp Met Ala His Ile Ser Gly Leu Val Ala Ala Lys Val Ile Pro Ser
 245 250 255
 Pro Phe Lys His Ala Asp Ile Val Thr Thr Thr Thr His Lys Thr Leu
 260 265 270
 Arg Gly Ala Arg Ser Gly Leu Ile Phe Tyr Arg Lys Gly Val Lys Ala
 275 280 285
 Val Asp Pro Lys Thr Gly Arg Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Glu Asp Arg
 290 295 300
 Ile Asn Phe Ala Val Phe Pro Ser Leu Gln Gly Gly Pro His Asn His
 305 310 315 320
 Ala Ile Ala Ala Val Ala Val Ala Leu Lys Gln Ala Cys Thr Pro Met
 325 330 335

Phe Arg Glu Tyr Ser Leu Gln Val Leu Lys Asn Ala Arg Ala Met Ala
340 345 350

Asp Ala Leu Leu Glu Arg Gly Tyr Ser Leu Val Ser Gly Gly Thr Asp
355 360 365

Asn His Leu Val Leu Val Asp Leu Arg Pro Lys Gly Leu Asp Gly Ala
370 375 380

Arg Ala Glu Arg Val Leu Glu Leu Val Ser Ile Thr Ala Asn Lys Asn
385 390 395 400

Thr Cys Pro Gly Asp Arg Ser Ala Ile Thr Pro Gly Gly Leu Arg Leu
405 410 415

Gly Ala Pro Ala Leu Thr Ser Arg Gln Phe Arg Glu Asp Asp Phe Arg
420 425 430

Arg Val Val Asp Phe Ile Asp Glu Gly Val Asn Ile Gly Leu Glu Val
435 440 445

Lys Ser Lys Thr Ala Lys Leu Gln Asp Phe Lys Ser Phe Leu Leu Lys
450 455 460

Asp Ser Glu Thr Ser Gln Arg Leu Ala Asn Leu Arg Gln Arg Val Glu
465 470 475 480

Gln Phe Ala Arg Ala Phe Pro Met Pro Gly Phe Asp Glu His
485 490

<210> 26
<211> 483
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 26

Met Ala Ile Arg Ala Gln His Ser Asn Ala Ala Gln Thr Gln Thr Gly
1 5 10 15

Glu Ala Asn Arg Gly Trp Thr Gly Gln Glu Ser Leu Ser Asp Ser Asp
20 25 30

Pro Glu Met Trp Glu Leu Leu Gln Arg Glu Lys Asp Arg Gln Cys Arg
35 40 45

Gly Leu Glu Leu Ile Ala Ser Glu Asn Phe Cys Ser Arg Ala Ala Leu
50 55 60

Glu Ala Leu Gly Ser Cys Leu Asn Asn Lys Tyr Ser Glu Gly Tyr Pro
 65 70 75 80

Gly Lys Arg Tyr Tyr Gly Gly Ala Glu Val Val Asp Glu Ile Glu Leu
 85 90 95

Leu Cys Gln Arg Arg Ala Leu Glu Ala Phe Asp Leu Asp Pro Ala Gln
 100 105 110

Trp Gly Val Asn Val Gln Pro Tyr Ser Gly Ser Pro Ala Asn Leu Ala
 115 120 125

Val Tyr Thr Ala Leu Leu Gln Pro His Asp Arg Ile Met Gly Leu Asp
 130 135 140

Leu Pro Asp Gly Gly His Leu Thr His Gly Tyr Met Ser Asp Val Lys
 145 150 155 160

Arg Ile Ser Ala Thr Ser Ile Phe Phe Glu Ser Met Pro Tyr Lys Leu
 165 170 175

Asn Pro Lys Thr Gly Leu Ile Asp Tyr Asn Gln Leu Ala Leu Thr Ala
 180 185 190

Arg Leu Phe Arg Pro Arg Leu Ile Ile Ala Gly Thr Ser Ala Tyr Ala
 195 200 205

Arg Leu Ile Asp Tyr Ala Arg Met Arg Glu Val Cys Asp Glu Val Lys
 210 215 220

Ala His Leu Leu Ala Asp Met Ala His Ile Ser Gly Leu Val Ala Ala
 225 230 235 240

Lys Val Ile Pro Ser Pro Phe Lys His Ala Asp Ile Val Thr Thr Thr
 245 250 255

Thr His Lys Thr Leu Arg Gly Ala Arg Ser Gly Leu Ile Phe Tyr Arg
 260 265 270

Lys Gly Val Lys Ala Val Asp Pro Lys Thr Gly Arg Glu Ile Pro Tyr
 275 280 285

Thr Phe Glu Asp Arg Ile Asn Phe Ala Val Phe Pro Ser Leu Gln Gly
 290 295 300

Gly Pro His Asn His Ala Ile Ala Ala Val Ala Val Ala Leu Lys Gln

305		310		315		320
Ala Cys Thr Pro Met Phe Arg Glu Tyr Ser Leu Gln Val Leu Lys Asn						
		325		330		335
Ala Arg Ala Met Ala Asp Ala Leu Leu Glu Arg Gly Tyr Ser Leu Val						
		340		345		350
Ser Gly Gly Thr Asp Asn His Leu Val Leu Val Asp Leu Arg Pro Lys						
		355		360		365
Gly Leu Asp Gly Ala Arg Ala Glu Arg Val Leu Glu Leu Val Ser Ile						
		370		375		380
Thr Ala Asn Lys Asn Thr Cys Pro Gly Asp Arg Ser Ala Ile Thr Pro						
		385		390		400
Gly Gly Leu Arg Leu Gly Ala Pro Ala Leu Thr Ser Arg Gln Phe Arg						
		405		410		415
Glu Asp Asp Phe Arg Arg Val Val Asp Phe Ile Asp Glu Gly Val Asn						
		420		425		430
Ile Gly Leu Glu Val Lys Ser Lys Thr Ala Lys Leu Gln Asp Phe Lys						
		435		440		445
Ser Phe Leu Leu Lys Asp Ser Glu Thr Ser Gln Arg Leu Ala Asn Leu						
		450		455		460
Arg Gln Arg Val Glu Gln Phe Ala Arg Ala Phe Pro Met Pro Gly Phe						
		465		470		480
Asp Glu His						

<210> 27
 <211> 457
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 27

Met Arg Pro Pro Ser Pro Leu Pro Ala Arg Trp Leu Cys Val Leu Ala						
1		5		10		15
Gly Ala Leu Ala Trp Ala Leu Gly Pro Ala Gly Gly Gln Ala Ala Arg						
		20		25		30
Leu Gln Glu Glu Cys Asp Tyr Val Gln Met Ile Glu Val Gln His Lys						

35					40					45					
Gln	Cys	Leu	Glu	Glu	Ala	Gln	Leu	Glu	Asn	Glu	Thr	Ile	Gly	Cys	Ser
50						55					60				
Lys	Met	Trp	Asp	Asn	Leu	Thr	Cys	Trp	Pro	Ala	Thr	Pro	Arg	Gly	Gln
65					70					75					80
Val	Val	Val	Leu	Ala	Cys	Pro	Leu	Ile	Phe	Lys	Leu	Phe	Ser	Ser	Ile
				85					90					95	
Gln	Gly	Arg	Asn	Val	Ser	Arg	Ser	Cys	Thr	Asp	Glu	Gly	Trp	Thr	His
			100					105					110		
Leu	Glu	Pro	Gly	Pro	Tyr	Pro	Ile	Ala	Cys	Gly	Leu	Asp	Asp	Lys	Ala
		115					120					125			
Ala	Ser	Leu	Asp	Glu	Gln	Gln	Thr	Met	Phe	Tyr	Gly	Ser	Val	Lys	Thr
	130					135					140				
Gly	Tyr	Thr	Ile	Gly	Tyr	Gly	Leu	Ser	Leu	Ala	Thr	Leu	Leu	Val	Ala
145					150					155					160
Thr	Ala	Ile	Leu	Ser	Leu	Phe	Arg	Lys	Leu	His	Cys	Thr	Arg	Asn	Tyr
			165						170					175	
Ile	His	Met	His	Leu	Phe	Ile	Ser	Phe	Ile	Leu	Arg	Ala	Ala	Ala	Val
			180					185					190		
Phe	Ile	Lys	Asp	Leu	Ala	Leu	Phe	Asp	Ser	Gly	Glu	Ser	Asp	Gln	Cys
		195					200					205			
Ser	Glu	Gly	Ser	Val	Gly	Cys	Lys	Ala	Ala	Met	Val	Phe	Phe	Gln	Tyr
	210					215					220				
Cys	Val	Met	Ala	Asn	Phe	Phe	Trp	Leu	Leu	Val	Glu	Gly	Leu	Tyr	Leu
225					230					235					240
Tyr	Thr	Leu	Leu	Ala	Val	Ser	Phe	Phe	Ser	Glu	Arg	Lys	Tyr	Phe	Trp
				245					250					255	
Gly	Tyr	Ile	Leu	Ile	Gly	Trp	Gly	Val	Pro	Ser	Thr	Phe	Thr	Met	Val
			260					265					270		
Trp	Thr	Ile	Ala	Arg	Ile	His	Phe	Glu	Asp	Tyr	Gly	Cys	Trp	Asp	Thr
		275					280					285			

Ile Asn Ser Ser Leu Trp Trp Ile Ile Lys Gly Pro Ile Leu Thr Ser
 290 295 300

Ile Leu Val Asn Phe Ile Leu Phe Ile Cys Ile Ile Arg Ile Leu Leu
 305 310 315 320

Gln Lys Leu Arg Pro Pro Asp Ile Arg Lys Ser Asp Ser Ser Pro Tyr
 325 330 335

Ser Arg Leu Ala Arg Ser Thr Leu Leu Leu Ile Pro Leu Phe Gly Val
 340 345 350

His Tyr Ile Met Phe Ala Phe Phe Pro Asp Asn Phe Lys Pro Glu Val
 355 360 365

Lys Met Val Phe Glu Leu Val Val Gly Ser Phe Gln Gly Phe Val Val
 370 375 380

Ala Ile Leu Tyr Cys Phe Leu Asn Gly Glu Val Gln Ala Glu Leu Arg
 385 390 395 400

Arg Lys Trp Arg Arg Trp His Leu Gln Gly Val Leu Gly Trp Asn Pro
 405 410 415

Lys Tyr Arg His Pro Ser Gly Gly Ser Asn Gly Ala Thr Cys Ser Thr
 420 425 430

Gln Val Ser Met Leu Thr Arg Val Ser Pro Gly Ala Arg Arg Ser Ser
 435 440 445

Ser Phe Gln Ala Glu Val Ser Leu Val
 450 455

<210> 28
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador directo para ABCB9

<400> 28
 gaccttcacc taccgcactc

<210> 29
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Cebador inverso para ABCB9

<400> 29

20

	cacaggagct cttcccactg	20
5	<210> 30 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador directo para BEX2	
	<400> 30 gccccgaaag taggaagc	18
15	<210> 31 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> cebador inverso para BEX2	
	<400> 31 ctccattact cctgggccta t	21
25	<210> 32 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador directo para BGLAP	
35	<400> 32 ggcgctacct gtatcaatgg	20
40	<210> 33 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador inverso para BGLAP	
45	<400> 33 tcagccaact cgtcacagtc	20
50	<210> 34 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador directo para CA12	
55	<400> 34 ccaaggctac aatctgtctg c	21
60	<210> 35 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> cebador inverso para CA12	
	<400> 35	

	gggcagggttc agcttcact	19
5	<210> 36 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador directo para GDF15	
	<400> 36 ccggatactc acgccaga	18
15	<210> 37 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> cebador inverso para GDF15	
25	<400> 37 agagatacgc aggtgcaggt	20
30	<210> 38 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> cebador directo para GEM	
40	<400> 38 gacagcatgg acagcgact	19
45	<210> 39 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> cebador inverso para GEM	
55	<400> 39 aaccatcagg gttcgttcac	20
60	<210> 40 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> cebador directo para IGFBP2	
	<400> 40 ccaagaagct gcgaccac	18
	<210> 41 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador inverso para IGFBP2	
	<400> 41	

	gggatgtgca gggagtagag	20
5	<210> 42 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador directo para ITGB4	
	<400> 42 tcagcctctc tgggacctt	19
15	<210> 43 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> cebador inverso para ITGB4	
	<400> 43 tatccacacg gacacactcc	20
25	<210> 44 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador directo para KIAA0746	
35	<400> 44 gttgtctgtg cagatgtacg c	21
40	<210> 45 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador inverso para KIAA0746	
45	<400> 45 tagcagggcc aggttaaaaa	20
50	<210> 46 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador directo para KLF4	
55	<400> 46 gccgctccat taccaaga	18
60	<210> 47 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> cebador inverso para KLF4	
	<400> 47	

	tcttcccctc ttggcttg	19
5	<210> 48 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador directo para MARS	
	<400> 48 aacaacctgg gcaactcat	20
15	<210> 49 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> cebador inverso para MARS	
	<400> 49 accatctcag gcacatagcc	20
25	<210> 50 <211> 17 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador directo para MERTK	
35	<400> 50 ggagacagga ccaaagc	17
40	<210> 51 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador inverso para MERTK	
45	<400> 51 gggcaatatc caccatgaac	20
50	<210> 52 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador directo para PADI4	
55	<400> 52 aagtgaagc tgaccatctg	20
60	<210> 53 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> cebador inverso para PADI4	
	<400> 53	

	gccgatctcc atttcatcc	19
5	<210> 54 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador directo para PHGDH	
	<400> 54 tggaggaaaa gcagaacctt	20
15	<210> 55 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> cebador inverso para PHGDH	
	<400> 55 aacaataagg ccttcacagt cc	22
25	<210> 56 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador directo para PITPNC1	
35	<400> 56 gcgctactac aaagaatctg agg	23
40	<210> 57 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador inverso para PITPNC1	
45	<400> 57 gagcacatga taggctgatg ac	22
50	<210> 58 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador directo para PSAT1	
55	<400> 58 tcttgtaggg gaattgcta	19
60	<210> 59 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> cebador inverso para PSAT1	
	<400> 59	

	aaggggacag cactgaactg	20
5	<210> 60 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador directo para PYGB	
	<400> 60 tccaggggtcc tgtatccaaa	20
15	<210> 61 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> cebador inverso para PYGB	
	<400> 61 ccacgaagta ctctgcttc a	21
25	<210> 62 <211> 24 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador directo para RGC32	
35	<400> 62 tgctgatctt gacaaaactt tagc	24
40	<210> 63 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador inverso para RGC32	
45	<400> 63 gcaggtcctc ggaactttct	20
50	<210> 64 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador directo para SHMT2	
55	<400> 64 gagggagaag gacaggcagt	20
60	<210> 65 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> cebador inverso para SHMT2	
	<400> 65	

	ctcggctgca gaagttctct	20
5	<210> 66 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador directo para SMAD4	
	<400> 66 tggcccagga tcagtaggt	19
15	<210> 67 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> cebador inverso para SMAD4	
	<400> 67 catcaacacc aattccagca	20
25	<210> 68 <211> 19 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador directo para THBD	
35	<400> 68 aattgggagc ttgggaatg	19
40	<210> 69 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador inverso para THBD	
45	<400> 69 tgaggacctg attaaggcta gg	22
50	<210> 70 <211> 27 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> cebador directo para TNFSF4	
55	<400> 70 gtatcctcga attcaaagta tcaaagt	27
60	<210> 71 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> cebador inverso para TNFSF4	
	<400> 71	

	ctgagttgtt ctgcaccttc a	21
5	<210> 72 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador directo para VIPR1	
	<400> 72 ctgtccctc atctcaagc	20
15	<210> 73 <211> 18 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> cebador inverso para VIPR1	
	<400> 73 cagctgcggc ttacattg	18
25	<210> 74 <211> 2301 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 74	
	atgaggctgt ggaaggcggg ggtgggtgact ttggccttca tgagtgtgga catctgcgtg	60
	accacggcca tctatgtctt cagccacctg gaccgcagcc tcttggagga catccgccac	120
	ttcaacatct ttgactcggg gctggatctc tgggcagcct gcctgtaccg cagctgcctg	180
	ctgctgggag ccaccattgg tgtggccaag aacagtgcgc tggggccccc gcggctgcgg	240
	gcctcgtggc tggatcatcac cctcgtgtgc ctcttcgtgg gcatctatgc catggtgaag	300
	ctgctgctct tctcagaggt gcgcaggccc atccgggacc cctggttttg ggccctgttc	360
	gtgtggacgt acatttcaact cggcgcacac ttctctgctct ggtggctgct gtccaccgtg	420
	cggccaggca ccaggccct ggagccaggg gcggccaccg aggtgaggg ctccctggg	480
	agcggccggc caccgcccga gcaggcgtct gggggccacgc tgcagaagct gctctcctac	540
	accaagcccg acgtggcctt cctcgtggcc gcctccttct tctcatcgt ggcagctctg	600
	ggagagacct tctgcccta ctacacgggc cgcgccattg atggcatcgt catccagaaa	660
	agcatggatc agttcagcac ggctgtgtgc atcgtgtgcc tgcctggccat tggcagctca	720
	tttgcgcag gtattcgggg cggcattttt accctcatat ttgccagact gaacattcgc	780
	cttcgaaact gtctcttcgg ctcaactggtg tcccaggaga caagcttctt tgatgagaac	840

cgcacagggg acctcatctc ccgctgacc tcggacacca ccatgggtcag cgacctggtc 900
 tcccagaaca tcaatgtctt cctgcggaac acagtcaagg tcacgggcgt ggtggtcttc 960
 atgttcagcc tctcatggca gctctccttg gtcaccttca tgggcttccc catcatcatg 1020
 atgggtgtcca acatctacgg caagtactac aagaggctct ccaaagaggt ccagaatgcc 1080
 ctggccagag cgagcaaacac ggcgaggag accatcagtg ccatgaagac tgtccggagc 1140
 ttcgccaatg aggaggagga ggcagagggtg tacctgcgga agctgcagca ggtgtacaag 1200
 ctgaacagga aggaggcagc tgcctacatg tactacgtct ggggcagcgg gctcacactg 1260
 ctggtggtcc aggtcagcat cctctactac gggggccacc ttgtcatctc aggccagatg 1320
 accagcggca acctcatcgc ctctcatcct taagagtttg tctggggaga ttgtatggag 1380
 tccgtgggct ccgtctacag tggcctgatg caggaggtgg gggctgctga gaagggtgtc 1440
 gagttcatcg accggcagcc gacctgggtg cacgatggca gcttggcccc cgaccacctg 1500
 gagggccggg tggactttga gaatgtgacc ttcacctacc gactcggcc ccacaccag 1560
 gtcctgcaga atgtctcctt cagcctgtcc ccgggcaagg tgacggccct ggtggggccc 1620
 tcgggcagtg ggaagagctc ctgtgtcaac atcctggaga acttctaccc cctggagggg 1680
 ggccgggtgc tgcctggacg caagcccatc agcgctacg accacaagta cttgcaccgt 1740
 gtgatctccc tgggtgagcca ggagcccggtg ctgttcgccc gctccatcac ggataacatc 1800
 tctacggcc tgcctactgt gcctttogag atggtgggtg aggcgcgaca gaaggccaat 1860
 gccacgggt tcatcatgga actccaggac ggctacagca cagagacagg ggagaagggc 1920
 gccagctgt caggtggcca gaagcagcgg gtggccatgg ccgggctct ggtgcggaac 1980
 ccccgagtc tcatcctgga tgaagccacc agcgcttttg atgccgagag cgagtatctg 2040
 atccagcagg ccatccatgg caacctgcag aagcacacgg tactcatcat cgcgaccgg 2100
 ctgagcaccg tggagcagc gcacctcatt gtggtgctgg acaagggccg cgtagtgcag 2160
 cagggcacc accagcagct gctggcccag ggcggcctct acgccaagct ggtgcagcgg 2220
 cagatgctgg ggcttcagcc cgccgcagac ttcacagctg gccacaacga gcctgtagcc 2280
 aacggcagtc acaaggcctg a 2301

<210> 75
 <211> 919
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 75

tggggggccc ctgcttctcc cgggtgggga gaggaccgg tgctgcctg gcagatgtgc 60
 ccacggaggg cccagctgc cctccgagcc caggcctgca gactgaaag acgacctgcc 120
 atgtcccatg gatcaccgct tctgtcatct tgccccgtgt ccctgcccc ttcccagggc 180

actccttacc cctgctgccc tgagccaacg ccttcacgga cctccctagc ctocctaagca	240
aaggtagagc tgcccttttta aacctagggtc ttaccagggt ttttactgtt tggtttgagg	300
caccccagtc aactcctaga tttcaaaaac ctttttctaa ttggggagtaa tggcggggcac	360
tttcaccaag atgttctaga aacttctgag ccaggagtga atggcccttc cttagtagcc	420
tgggggatgt ccagagacta ggcctctccc ctttaccct ccagagaagg ggcttccctg	480
tcccgagggg agacacgggg aacgggattt tccgtctctc cctcttgcca gctctgtgag	540
tctggccagg gcgggtaggg agcgtggagg gcatctgtct gccatcgccc gctgccaatc	600
taagccagtc tcaactgtgaa ccacacgaaa cctcaactgg gggagtgagg ggctggccag	660
gtctggaggg gcctcagggg tgcccccagc ccggcaccca gcgctttcgc ccctcgtcca	720
cccacccctg gctggcagcc tccctcccca caccgcccc tgtgctctgc tgtctggagg	780
ccacgtggat gttcatgaga tgcattctct tctgtctttg gtggatggga tgggaggaaa	840
gcccaggatc tggctttgcc agaggttgca acatgttgag agaaccgggt caataaagtg	900
tactacctct taccocctaa	919

<210> 76
 <211> 978
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 76

atgctgcoga gagtgggctg ccccgcgctg ccgctgccgc cgcgcgcgct gctgcgcgctg 60
ctgctgctgc tactgggctg gagtggcgcc ggccggcggg cgccgcgcga ggtgctgttc 120
cgctgccccg cctgcacacc cgagcgccctg gccgcctgcg ggcccccgcc ggttgccgccc 180
cccgcccgcg tggccgcagt ggccggaggg gcccgcatgc catgcgcgga gctcgtccgg 240
gagccgggct gcggctgctg ctccgtgtgc gcccgctgg agggcgaggg gtgcggcgctc 300
tacacccgcg gctgcggcca ggggctgcgc tgctatcccc acccgggctc cgagctgcc 360
ctgcaggcgc tggcatggg cgagggcact tgtgagaagc gccgggacgc cgagtatggc 420
gccagcccgg agcaggttgc agacaatggc gatgaccact cagaaggagg octggtggag 480
aaccacgtgg acagcaccat gaacatgttg ggccggggag gcagtgtctg ccggaagccc 540
ctcaagtcgg gtatgaagga gctggccgtg ttccgggaga aggtcactga gcagcacccg 600
cagatgggca aggggtggca gcatcacctt ggccctggagg agcccaagaa gctgcgacca 660
cccctgcca ggactccctg ccaacaggaa ctggaccagg tccctggagcg gatctccacc 720
atgcgccttc cggatgagcg gggccctctg gagcacctct actccctgca catccccaac 780
tgtgacaagc atggcctgta caacctcaaa cagtgcgaaga tgtctctgaa cgggcagcgt 840
ggggagtgtt ggtgtgtgaa ccccaacacc gggaagctga tccagggagc cccaccatc 900

cggggggacc ccgagtgtca tctctctac aatgagcagc agggagctcg cggggtgcac 960
accagcggga tgcagtag 978

5 <210> 77
<211> 331
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 77

accgcagcca gccggtgcct ggcccccctg ccccccgcgc ctctccaaac accggcagaa 60
aacggagagt gcttgggtgg tgggtgctgg aggatcttcc agttctgaca cacgtattta 120
tatttggaag gagaccagca ccgagctcgg cacctccccg gcctctctct tccagctgc 180
agatgccaca cctgctcctt cttgctttcc ccgggggagg aaggggggtg tggtcgggga 240
gctgggggtac aggtttgggg agggggaaga gaaattttta tttttgaacc cctgtgtccc 300
ttttgcataa gattaaagga aggaaaagta a 331

15 <210> 78
<211> 3000
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 78

atggggccgg ccccgctgcc gctgctgctg ggctctctcc tccccgcgct ctggcgtaga	60
gctatcactg aggcaaggga agaagccaag ccttaccgcg tattcccggg acottttcca	120
gggagcctgc aaactgacca cacacogctg ttatoccttc ctcacgccag tgggtaaccag	180
cctgccttga tgttttcacc aaccagcct ggaagaccac atacaggaaa cgtagccatt	240
ccccaggtga cctctgtcga atcaaagccc ctaccgcctc ttgccttcaa acacacagtt	300
ggacacataa tactttctga acataaaggt gtcaaattta attgctcaat cagtgtacct	360
aatatatacc aggacaccac aatttcttgg tggaaagatg ggaaggaatt gcttggggca	420
catcatgcaa ttacacagtt ttatccagat gatgaagtta cagcaataat cgcttccttc	480
agcataacca gtgtgcagcg ttcagacaat gggctgtata tctgtaagat gaaaataaac	540
aatgaagaga tcgtgtctga tcccatctac atcgaagtac aaggacttcc tcactttact	600
aagcagcctg agagcatgaa tgtcaccaga aacacagcct tcaacctcac ctgtcaggct	660
gtggggccgc ctgagcccg tcaacattttc tgggttcaaa acagtagccg tgtaaacgaa	720
cagcctgaaa aatccccctc cgtgctaact gttccaggcc tgacggagat ggcggtcttc	780
agttgtgagg ccacaaatga caaagggtg accgtgtcca agggagtgc gatcaacatc	840
aaagcaattc cctccccacc aactgaagtc agcatccgta acagcactgc acacagcatt	900
ctgatctcct gggttcctgg ttttgatgga tactccccgt tcaggaattg cagcattcag	960
gtcaaggaag ctgatccgct gagtaatggc tcagtcatga tttttaacac ctctgcctta	1020

ccacatctgt accaaatcaa gcagctgcaa gccctggcta attacagcat tgggtgtttcc	1080
tgcattgaatg aaataggctg gtctgcagtg agcccttgga ttctagccag cagcactgaa	1140
ggagcccat cagtagcacc tttaaagtgc actgtgtttc tgaatgaatc tagtgataat	1200
gtggacatca gatggatgaa gcctcgact aagcagcagg atggagaact ggtgggctac	1260
cggatatccc acgtgtggca gagtgcaggg atttccaaag agctcttgga ggaagttggc	1320
cagaatggca gccgagctcg gatctctgtt caagtccaca atgctacgtg cacagtgagg	1380
attgcagccg tcaccagagg gggagttggg cccttcagtg atccagtga aatatttatc	1440
cctgcacacg gttgggtaga ttatgcccc tcttcaactc cggcgctgg caacgcagat	1500
cctgtgtctca tcatctttgg ctgcttttgt ggatttattt tgattgggtt gattttatac	1560
atctccttgg ccatcagaaa aagagtccag gagacaaagt ttgggaatgc attcacagag	1620
gaggattctg aattagtggg gaattatata gcaaagaaat ccttctgtcg gcgagccatt	1680
gaacttaoct tacatagctt gggagtcagt gaggaactac aaaataaact agaagatgtt	1740
gtgattgaca ggaatcttct aattcttgga aaaattctgg gtgaaggaga gtttgggtct	1800
gtaatggaag gaaatcttaa gcaggaagat gggacctctc tgaaagtggc agtgaagacc	1860
atgaagttgg acaactcttc acagcgggag atcgaggagt ttctcagtga ggcagcgtgc	1920
atgaaagact tcagccccc aaatgtcatt cgacttctag gtgtgtgtat agaaatgagc	1980
tctcaaggca tcccaaagcc catggttaatt ttaccttca tgaaatacgg ggacctgcat	2040
acttacttac ttatttccc attggagaca ggaccaaagc atattcctct gcagacacta	2100
ttgaagttca tgggtggatat tgcctggga atggagtatc tgagcaacag gaattttctt	2160
catcgagatt tagctgctcg aaactgcatg ttgcgagatg acatgactgt ctgtgttgcg	2220
gacttcggcc tctctaagaa gatttacagt ggcgattatt accgccaagg ccgcattgct	2280
aagatgcctg ttaaattgat cgccatagaa agtcttgagc accgagtcta cacaagtaaa	2340
agtgatgtgt gggcatttgg cgtgacctg tgggaaatag ctacgcgggg aatgactccc	2400
tatcctgggg tccagaacca tgagatgtat gactatcttc tccatggcca caggttgaag	2460
cagcccgaag actgcctgga tgaactgtat gaaataatgt actcttgctg gagaaccgat	2520
cccttagacc gcccacctt ttcagtattg aggtgcagc tagaaaaact cttagaaagt	2580
ttgcctgacg ttcggaacca agcagacgtt atttaogtca atacacagtt gctggagagc	2640
tctgagggcc tggcccaggg ctccaccctt gctccactgg acttgaacat cgacctgac	2700
tctataattg cctcctgcac tccccgcgt gccatcagtg tggtcacagc agaagttcat	2760
gacagcaaac ctcatgaagg acggtacatc ctgaatgggg gcagtgagga atgggaagat	2820
ctgacttctg cccctctgc tgcagtcaca gctgaaaaga acagtgtttt accgggggag	2880

agacttggtta ggaatggggt ctctgggtcc cattcgagca tgctgccott gggaagctca 2940
ttgcccgatg aacttttgtt tgctgacgac tctcagaag gctcagaagt cctgatgtga 3000

5 <210> 79
<211> 504
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 79

ggagaggtgc ggggagacat tccaaaaatc aagccaattc ttctgctgta ggagaatcca 60
attgtacctg atgttttttg tatttgtott ccttaccaag tgaactccat ggccccaaag 120
caccagatga atgttggtta gtaagctgtc attaaaaata cataatatat atttatttaa 180
agagaaaaaa tatgtgtata tcatggaaaa agacaaggat attttaataa aacattactt 240
atttcatttc acttatcttg catatcttaa aattaagctt cagctgctcc ttgatattaa 300
catttgtaga gagttgaagt tgttttttca agttcttttc tttttcatga ctattaaatg 360
taaaaatatt tgtaaaatga aatgccatat ttgacttggc ttctgggtctt gatgtatttg 420
ataagaatga ttcattcaat gtttaaagtt gtataactga ttaattttct gatatggctt 480
10 cctaataaaa tatgaataag gaag 504

15 <210> 80
<211> 999
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 80

atgctgctga aagagtaccg gatctgcatg cgcctcaccg tagacgagta caaaattgga	60
cagctgtaca tgatcagcaa acacagccat gaacagagtg accggggaga aggggtggag	120
gtcgtccaga atgagccctt tgaggaccct caccatggca atgggcagtt caccgagaag	180
cgggtgtatc tcaacagcaa actgcctagt tgggctagag ctgttgctcc caaaatattt	240
tatgtgacag agaaggcttg gaactattat ccctacacaa ttacagaata cacatgttcc	300
tttctgccga aattctccat tcatatagaa accaagtatg aggacaacaa aggaagcaat	360
gacaccattt tcgacaatga agccaaagac gtggagagag aagtttgctt tattgatatt	420
gcctgcgatg aaattccaga gcgctactac aaagaatctg aggatcctaa gcacttcaag	480
tcagagaaga caggacgggg acagttgagg gaaggctgga gagatagtca tcagcctatc	540
atgtgctcct acaagctggt gactgtgaag tttgaggtct gggggcttca gaccagagtg	600
gaacaatttg tacacaaggt ggtccgagac attctgctga ttggacatag acaggctttt	660
gcattgggtg atgagtggta tgacatgaca atggatgaag tccgagaatt tgaacgagcc	720
actcaggaag ccaccaacaa gaaaatcggc attttccac ctgcaatttc tatctccagc	780
atccccctgc tgccttcttc cgtccgcagt ggccttcta gtgctccatc ccccccttc	840
tccacagacg cccccgaatt tctgtccgtt cccaaagatc gggcccggaa aaagtctgcc	900
ccagaaactc tcacacttcc agaccctgag aaaaaagcca ccctgaattt acccggcatg	960
cactcttcag ataagccatg tcggcccaaa tctgagtaa	999

<210> 81
 <211> 807
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 81

atgctgctga aagagtaccg gatctgcatg ccgctcaccg tagacgagta caaaattgga	60
cagctgtaca tgatcagcaa acacagccat gaacagagtg accggggaga aggggtggag	120
gtcgtccaga atgagccctt tgaggaccct caccatggca atgggcagtt caccgagaag	180
cgggtgtatc tcaacagcaa actgcctagt tgggctagag ctgttgtccc caaaatattt	240
tatgtgacag agaaggcttg gaactattat ccctacacaa ttacagaata cacatgttcc	300
tttctgcoga aattctccat tcatatagaa accaagtatg aggacaacaa aggaagcaat	360
gacaccattt tcgacaatga agccaaagac gtggagagag aagtttgctt tattgatatt	420
gcctgcgatg aaattccaga gcgctaactac aaagaatctg aggatccaa gcacttcaag	480
tcagagaaga caggacgggg acagttgagg gaaggctgga gagatagtca tcagcctatc	540
atgtgctcct acaagctggg gactgtgaag tttgaggtct gggggcttca gaccagagtg	600
gaacaatttg tacacaaggt ggtccgagac attctgctga ttggacatag acaggctttt	660
gcattgggtg atgagtggta tgatatgaca atggatgatg ttcggaata cgagaaaaac	720
atgcatgaac aaaccaacat aaaagtttgc aatcagcatt cctccctgt ggatgacata	780
gagagtcatg cccaacaag tacatga	807

<210> 82
 <211> 954
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 82

caatggatga agtccgagaa tttgaacgag ccactcagga agccaccaac aagaaaatcg	60
gcattttccc acctgcaatt tctatctoca gcattccctt gctgccttct tcogtcogca	120
gtgcgccttc tagtgtcca tcacccctc tctccacaga cgcaccgaa tttctgtcog	180
ttcccaaaga tcggccccgg aaaaagtctg cccagaaac tctcacactt ccagaccctg	240
agaaaaaagc caccctgaat ttaccgggca tgcactcttc agataagcca tgtcggccca	300
aatctgagta actttatata aatatctcat ggggttttat attttcattt gttgttgtg	360
ttttttttta agaattctct gatagagaaa aagactgctt tgtcactcaa acatgttcct	420

tcgacctttc agtgtgcatg tgactcagta acttcacata gaatatgatt ccctaagtat	480
gctacacagc atcatattag atgtaagatg taagacttgc aaaggacaga aggaatcttc	540
tgtaaccaca tagctgtatg ccagagagga agccttggtta ttgggcattt gatgaggttt	600
ggcatggact tcaaggataa atgaatgaaa actttgcacc acttttggtta caaggtagcg	660
tagaaaatag tgaagtcagt ttctctcat caaatctaaa attctccaaa atactctcag	720
gcataacata cttagctggt aaattttgaa ctgctaatta ctaatacttg aataccaata	780
gttactgaga ttctattttt gtgggttagtc tgactcagga ttgggagcct aattaactct	840
aaacttttga aaattttaat catcaagcta tagaggctcc aagtgcattt aataataact	900
catttatacc ttccacagaa ttttaataaag attctacttg tttctgtctt ttaa	954

<210> 83
 <211> 1113
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 83

atggacgccc ccaggcaggt ggtcaacttt gggcctggtc ccgccaagct gccgcactca	60
gtgttggttag agatacaaaa ggaattatta gactacaaag gagttggcat tagtgttctt	120
gaaatgagtc acaggtcctc agattttgcc aagattatta acaatacaga gaatcttggtg	180
cgggaattgc tagctgttcc agacaactat aagggtgattt ttctgcaagg aggtgggtgc	240
ggccagttca gtgctgtccc cttaaaccctc attggcttga aagcaggaag gtgtgctgac	300
tatgtggtga caggagcttg gtcagctaag gccgcagaag aagccaagaa gtttgggact	360
ataaatatcg ttcaaccctaa acttgggagt tatacaaaaa ttccagatcc aagcacctgg	420
aacctcaacc cagatgcctc ctacgtgtat tattgcgcaa atgagacggt gcatggtgtg	480
gagtttgact ttataccga tgtcaaggga gcagtaactgg tttgtgacat gtctcaaac	540
ttctgtcca agccagtga tgtttccaag tttggtgtga tttttgctgg tgcccagaag	600
aatgttggtc ctgctgggtt caccgtggtg attgtccgtg atgacctgct ggggtttgcc	660
ctccgagagt gccctcgggt cctggaatac aagggtgcagg ctggaaacag ctcttgtac	720
aacacgcctc catgtttcag catctacgtc atgggcttgg ttctggagtg gattaaaaac	780
aatggaggtg ccgcggccat ggagaagctt agctocatca aatctcaaac aatttatgag	840
attattgata attctcaagg attctacgtt tgtccagtgg agccccaaaa tagaagcaag	900
atgaatatcc cattccgcat tggcaatgcc aaaggagatg atgctttaga aaaaagattt	960
cttgataaag ctcttgaact caatatgttg tccttgaaag ggcataggtc tgtgggaggc	1020
atccgggcct ctctgtataa tgctgtcaca attgaagacg ttcagaagct ggccgccttc	1080
atgaaaaaat ttttgagat gcatcagcta tga	1113

<210> 84

<211> 1007
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

5 <400> 84

```

acacatccta accaggatat actctgttct tgaacaacat acaaagttta aagtaacttg      60
gggatggcta caaaaagtta acacagtatt tttctcaaat gaacatgttt attgcagatt      120
cttctttttt gaaagaacaa cagcaaaaca tccacaactc tgtaaagctg gtgggaacct      180
atgtcacctt aattctgact tgaactggaa gcattttaag aaatcttggt gcttttctaa      240
caaattcccg cgtattttgc ctttgctgct actttttcta gttagatttc aaacttgccct      300
gtggacttaa taatgcaagt tgcgattaat tatttctgga gtcatgggaa cacacagcac      360
agagggtagg ggggccctct aggtgctgaa tctacacatc tgtgggggtct cctgggttca      420
goggctgttg attcaaggtc aacattgacc attggaggag tggtttaaga gtgccaggcg      480
aagggcaaac tgtagatcga tctttatgct gttattacag gagaagtgac atactttata      540
tatgtttata ttagcaaggt ctgtttttta taccatatac tttatatttc tatacattta      600
tatttctaata aatacagtta tcaactgat atgtagacac ttttagaatt tattaaatcc      660
ttgaccttgt gcattatagc attccattag caagagttgt accccctccc cagtcttcgc      720
cttctctttt ttaagctggt ttatgaaaaa gacctagaag ttcttgattc atttttacca      780
ttctttccat aggtagaaga gaaagttgat tggttggttg tttttcaatt atgccattaa      840
actaaacatt tctgttaaata taccctatcc tttgttctct actgttttct ttgtaatgta      900
tgactacgag agtgatactt tgctgaaaag tctttccctc attgtttatc tattgtcagt      960
attttatggt gaatatgtaa agaacattaa agtcctaaaa catctaa      1007

```

<210> 85
<211> 2532
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 85

15

```

atggcgaagc cgctgacgga cagcgagaag cggaagcaga tcagcgtgcg cggcctggcg      60
gggctaggcg acgtggccga ggtgcggaag agcttcaacc ggcacttgca cttcacgctg      120
gtcaaggacc gcaatgtggc cacgccccgc gactacttct tcgcgctggc gcacacgggtg      180
cgcgaccacc tcgtgggccc ctggatccgc acgcagcagc actactacga gcgcgacccc      240
aagcgcattt attatctttc cctggaattc tacatgggtc gcacgctgca gaacacgatg      300
gtgaacctgg gccttcagaa tgccctgcgat gaagccatct atcagttggg gttagacttg      360
gaggaactcg aggagataga agaagatgct ggccttggga atggaggcct ggggaggctg      420
gcagcgtggt tccttgactc aatggctacc ttgggcctgg cagcatacgg ctatggaatc      480

```

cgctatgaat ttgggatttt taaccagaag attgtcaatg gctggcaggt agaggaggcc	540
gatgactggc tgcgctacgg caacccttgg gagaaagcgc ggccctgagta tatgcttccc	600
gtgcacttct acggacgcgt ggagcacacc cccgacggcg tgaagtggct ggacacacag	660
gtggtgctgg ccatgcccta cgacacccca gtgcccggct acaagaacaa caccgtcaac	720
accatgcggc tgtggtccgc caaggctccc aacgacttca agctgcagga cttcaacgtg	780
ggagactaca tcgaggcggc cctggaccgg aacttggtg agaacatctc cagggtcctg	840
tatccaaatg ataacttctt tgaggggaag gagctgcggc tgaagcagga gtacttcgtg	900
gtggccgcca cgctccagga catcatccgc cgcttcaagt cgtccaagtt cggctgccgg	960
gacctgtga gaacctgttt cgagacgttc ccagacaagg tggccatcca gctgaacgac	1020
accaccccg cctctccat ccctgagctc atgoggatcc tggaggacgt ggagaagggtg	1080
gactgggaca aggctggga aatcacgaag aagacctgtg catacaccaa ccacactgtg	1140
ctgcctgagg ccttgagcgc ctggcccggtg tccatgtttg agaagctgct gccgcggcac	1200
ctggagataa tctatgcat caaccagcgc cacctggacc acgtggccgc gctgtttccc	1260
ggcgatgtgg accgcctgcg caggatgtct gtgatcgagg agggggactg caagcggatc	1320
aacatggccc acctgtgtgt gattgggtcc catgctgtca atggtgtggc gaggatccac	1380
tccgagatcg tgaacagtc ggtctttaag gatttttatg aactggagcc agagaagttc	1440
cagaataaga ccaatggcat cccccccgc cggtagctgc tgcgtgcaa cccggggctg	1500
gcgatacca tcgtggagaa aattggggag gatttctga ctgacctgag ccagctgaag	1560
aagctgctgc cgctggtcag tgacgaggtg ttcacaggg acgtggccaa ggtcaaacag	1620
gagaacaagc tcaagttctc ggcccttctg gagaaggagt acaagggtgaa gatcaacccc	1680
tcttccatgt tcgatgtgca tgtgaagagg atccacgagt acaagcggca gctgctcaac	1740
tgccgtcacg tcgtcacct gtacaatcga atcaagagag acccgccaa ggcttttgtg	1800
cccaggactg ttatgattgg gggcaaggca ggcggcggtt accacatggc caagctgac	1860
atcaagttgg tcacctccat oggcgacgtc gtcaatcatg accagttgt gggtagacagg	1920
ttgaaagtga tcttctgga gaactaccgt gtgtccttgg ctgagaaagt gatcccgcc	1980
gctgatctgt cgcagcagat ctccactgca ggcaccgagg cctcaggcac aggcaacatg	2040
aagttcatgc tcaacggggc cctcaccatc ggcaccatgg acggcgccaa cgtggagatg	2100
gcgaggagg ccggggccga gaacctcttc atcttcggcc tgggggtgga ggatgtcgag	2160
gccttgacc ggaaagggtg caatgccagg gactactacg accacctgcc cgagctgaag	2220
caggccgtgg accagatcag cagtggcttt ttttctccca aggagccaga ctgcttcaag	2280
gacatcgtga acatgctgat gcaccatgac aggttcaagg tgtttgcaga ctatgaagcc	2340

tacatgcagt gccaggcaca ggtggaccag ctgtaccgga accccaagga gtggaccaag	2400
aaggtcatca ggaacatcgc ctgctcgggc aagttctcca gtgaccggac catcacggag	2460
tatgcacggg agatctgggg tgtggagccc tccgacctgc agatcccgc cccaacatc	2520
ccccgggact ag	2532

<210> 86
 <211> 1490
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 86

gcacaccctg ccttggcggg accagcgggc atttgttttc ttgctgactt tgcacctoct	60
tttttcccca aacactttgc cagccaactgg tggtcctgc ttttctgagt accatgtttc	120
caggaggggg catgggggtc aggggtgggtt tgagagagca gggtaaggaa ggaatgtgct	180
agaagtgtct ctagtcttct gtaaagggaag ccagagtga cagtacaaag ggtcgtggcc	240
agccctgcag cttcagcacc tgccccaccc agagtgggag tcaggtggag ccacctgctg	300
ggctcccca gaactttgca cacatcttgc tatgtattag ccgatgtctt tagtgttgag	360
cctctggatt ctgggggtct ggccagtggc catagtgaag cctgggaatg agtgttactg	420
cagcatctgg gctgccagcc acagggaagg gccaaagccc atgtagcccc agtcatcctg	480
cccagccctg cctcctggcc atgccgggag gggtcggatc ctctaggcat cgccttcaca	540
gccccctgcc ccctgccctc tgtcctggct ctgcacctgg tatatgggtc atggaccag	600
atgggggctt ccctttgtag ccatccaatg ggcattgtgt ggggtgcttg aaccgggat	660
gactgagggg gacactggag tgggtgcttg tgtctgctgt ctcagaggcc ttggtcagga	720
tgaagtggc tgacacagct tagcttggtt ttgcttattc aaaagagaaa ataactacac	780
atggaaatga aactagctga agccttttct tgttttagca actgaaaatt gtacttggtc	840
acttttgtgc ttgaggaggc ccattttctg cctggcaggg ggcaggctct tgcctcccg	900
ctgactcctg ctgtgtcctg aggtgcattt cctgttgtac acacaagggc caggtccat	960
tctccctccc tttccaccag tgccacagcc tcgtctggaa aaaggaccag gggccccgga	1020
ggaacccatt tgtgctctgc ttggacagca ggcctggcac tgggaggtgg gggtagagccc	1080
ctcacagcct tgccccctcc caaggctggc aacctgcctc ccattgcca agagagaggg	1140
cagggaacag gctactgtcc ttccctgtgg aattgccag aaatctagca ccttgcctgc	1200
tggatctggg ctgcggggag gctctttttc tcctggcct ccagtgccta ccaggaggat	1260
ctgcgcacgg tgcacagccc accagagcac tacagccttt tattgagtgg ggcaagtgt	1320
gggtgtggt cgtgccctga cagcatcttc cccaggcagc ggctctgtgg aggagccat	1380
actccctag ttggccactg gggccaccac cctgaccacc actgtgcccc tcattgttac	1440
tgccctgtga gataaaaact gattaaacct ttgtggctgt ggttggctga	1490

<210> 87
 <211> 1515
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 87

```

atgctgtact tctctttggt ttggggcggt cggcctctgc agagatgtgg gcagctggtc      60
aggatggcca ttcggggtca gcacagcaac gcagcccaga ctgagactgg ggaagcaaac      120
aggggctgga caggccagga gagcctgtcg gacagtgatc ctgagatgtg ggagttgctg      180
cagagggaga aggacaggca gtgtcgtggc ctggagctca ttgcctcaga gaacttctgc      240
agccgagctg cgtctggaggc cctgggggtcc tgtotgaaca acaagtactc ggaggggttat      300
cctggcaaga gatactatgg gggagcagag gtggtggatg aaattgagct gctgtgccag      360
cgccggggcct tgggaagcctt tgacctggat cctgcacagt ggggagtcaa tgtccagccc      420
tactccgggt ccccagccaa cctggccgtc tacacagccc ttctgcaacc tcacgaccgg      480
atcatggggc tggacctgcc cgatgggggc catctcacc acggtacat gtctgacgtc      540
aagcggatat cagccacgtc catcttcttc gagtctatgc cctataagct caaccocaaa      600
actggcctca ttgactacaa ccagctggca ctgactgtc gacttttccg gccacggctc      660
atcatagctg gcaccagcgc ctatgctcgc ctcattgact acgcccgcac gagagagggtg      720
tgtgatgaag tcaaagcaca cctgctggca gacatggccc acatcagtgg cctggtggct      780
gccaaagtga ttccctcgcc tttcaagcac gcggacatcg tcaccaccac tactcacaag      840
actcttcgag gggccaggtc agggctcatc ttctaccgga aaggggtgaa ggctgtggac      900
cccaagactg gccgggagat cccttacaca tttgaggacc gaatcaactt tgccgtgttc      960
ccatccctgc agggggggccc ccacaatcat gccattgctg cagtagctgt ggccctaaag     1020
caggcctgca ccccatggt cggggagtac tcctgcagg ttctgaagaa tgctcgggcc     1080
atggcagatg ccctgctaga gcgaggctac tcaactggtat cagggtgtac tgacaaccac     1140
ctggtgctgg tggacctgog gcccaagggc ctggatggag ctcgggctga gcgggtgcta     1200
gagcttgtat ccactactgc caacaagaac acctgtcctg gagaccgaag tgccatcaca     1260
ccgggcgggc tgccggttgg ggcccagcc ttaacttctc gacagttccg tgaggatgac     1320
ttccggagag ttgtggactt tatagatgaa ggggtcaaca ttggcttaga ggtgaagagc     1380
aagactgcc aagctccagga tttcaaatcc ttctgctta aggactcaga aacaagtcag     1440
cgtctggcca acctcaggca acgggtggag cagtttgcca gggccttccc catgcttggt     1500
tttgatgagc attga                                     1515
    
```

10

<210> 88
 <211> 570
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 88

aggcacctgg gaaatgaggg ccacagactc aaagttactc tccttcccc tacctgggccc	60
agtgaaatag aaagcctttc tatttttttg tgcgggaggg aagacctctc acttagggca	120
agagccaggt atagtctccc ttcccagaat ttgtaactga gaagatcttt tctttttcct	180
ttttttggta acaagactta gaaggagggc ccaggcactt tctgtttgaa ccctgtcat	240
gatcacagtg tcagagacgc gtccctcttc ttggggaagt tgaggagtgc ccttcagagc	300
cagtagcagg caggggtggg taggcacctc ccttcctgtt tttatctaataaaaatgctaa	360
cctgccctga gtttccatta ctgtgggtgg ggttcccttg ggccaaacag tgatttgtct	420
ccctcaatgt gtacaccgct ccgctccac caccgctacc acaaggaccc ccggggctgc	480
agcctcctct ttctgtctct gatcagagcc gacaccagac gtgattagca ggcgagcaa	540
attcaatttg ttaaatgaaa ttgtattttg	570

<210> 89
 <211> 1374
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 89

atgcgcccc caagtccgct gcccgcccc tggctatgog tgctggcagg cgccctcgcc	60
tgggcccctt ggccggcggg cggccaggcg gccaggctgc aggaggagtg tgactatgtg	120
cagatgatcg aggtgcagca caagcagtgc ctggaggagg ccagctgga gaatgagaca	180
ataggctgca gcaagatgtg ggacaacctc acctgctggc cagccacccc tcggggccag	240
gtagttgtct tggcctgtcc cctcatcttc aagctcttct cctccattca aggccgcaat	300
gtaagccgca gctgcaccga cgaaggctgg acgcacctgg agcctggccc gtaccccatt	360
gcctgtggtt tggatgacaa ggcagcgagt ttggatgagc agcagaccat gttctacggt	420
tctgtgaaga ccggctacac cattggctac ggccgtgcc tcgccacct tctggtogcc	480
acagctatcc tgagcctgtt caggaagctc cactgcacgc ggaactacat ccacatgcac	540
ctcttcatat ccttcacct gagggctgcc gctgtcttca tcaaagactt ggccctcttc	600
gacagcgggg agtcggacca gtgctccgag ggctcgggtg gctgtaaggc agccatggtc	660
tttttccaat attgtgtcat ggctaacttc ttctggctgc tgggtggagg cctctacctg	720
tacacccctg ttgcctctc cttctctct gagcggaagt actctgggg gtacatactc	780
atcggctggg gggtaaccag cacattcacc atgggtgtgga ccatcgccag gatccatttt	840
gaggattatg ggtgctggga caccatcaac tcctcactgt ggtggatcat aaagggcccc	900
atcctcacct ccatcttggg aaacttcac ctgtttattt gcatcatccg aatcctgctt	960

cagaaactgc ggccccccaga tatcaggaag agtgacagca gtccatactc aaggctagcc 1020
 aggtccacac tcctgctgat cccoctgttt ggagtaacct acatcatgtt cgccttcttt 1080
 cgggacaatt ttaagcctga agtgaagatg gtctttgagc tcgtcgtggg gtctttocag 1140
 ggttttgtgg tggctatcct ctactgcttc ctcaatggtg aggtgcaggc ggagctgagg 1200
 cggaagtggc ggcgctggca cctgcagggc gtccctgggct ggaaccccaa ataccggcac 1260
 ccgtcgggag gcagcaacgg cgccacgtgc agcacgcagg tttccatgct gacccgcgtc 1320
 agcccagggtg cccgcgcgtc ctccagcttc caagccgaag tctccctggt ctga 1374

<210> 90
 <211> 1287
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 90

ccaccaggat cccagggggc caaggcggcc cctcccgccc cttccactc accccggcag 60
 acgccgggga cagaggcctg cccgggcgcg gccagccccg gccctgggct cggaggctgc 120
 ccccggcccc ctggtctctg gtccggacac tcctagagaa cgcagcccta gagcctgcct 180
 ggagcgtttc tagcaagtga gagagatggg agctcctctc ctggaggatt gcagggtgaa 240
 ctcagtcatt agactcctcc tccaaaggcc ccctacgcca atcaaggga aaaagtctac 300
 atactttcat cctgactctg cccoctgctg gctcttctgc ccaattggag gaaagcaacc 360
 ggtggatcct caaacaacac tgggtgtgacc tgagggcaga aagggttctgc ccgggaagggt 420
 caccagcacc aacaccacgg tagtgccctga aatttcacca ttgctgtcaa gttcctttgg 480
 gttaagcatt accactcagg catttgactg aagatgcagc tcactaccct attctctctt 540
 tacgcttagt tatcagcttt ttaaagtggg ttattctgga gtttttgttt ggagagcaca 600
 cctatcttag tggttcccca cogaagtgga ctggccctg ggtcagtctg gtgggaggac 660
 ggtgcaaccc aaggactgag ggactctgaa gcctctggga aatgagaagg cagccaaccag 720
 cgaatgctag gtctcgact aagcctaact gctctccaag tctcagtggc ttcactctgc 780
 aagtgggatc tgtcacacca gccatactta tctctctgtg ctgtggaagc aacaggaatc 840
 aagagctgcc ctccctgtcc acccacctat gtgccaaactg ttgtaactag gctcagagat 900
 gtgcacccat gggctctgac agaaagcaga tacctacccc tgctacacat acaggatttg 960
 aactcagatc tgtctgatag gaatgtgaaa gcacggactc ttactgctaa cttttgtgta 1020
 tcgtaaccag ccagatcctc ttggttattt gtttaccact tgtattatta atgccattat 1080
 ccctgaatcc cccttgccac cccacccctc ctggagtgtg gctgaggagg cctccatctc 1140
 atgtatcatc tggataggag cctgctggtc acagcctcct ctgtctgccc ttcaccccag 1200
 tggccactca gcttcctacc cacacctctg ccagaagatc ccctcaggac tgcaacaggc 1260
 ttgtgcaaca ataaatgttg gcttgga 1287

	<210> 91	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> cebador directo para clonación del 3'UTR de ABCB9	
	<400> 91	
10	ccggccctcg agtggggggc ccctgcttct cc	32
	<210> 92	
	<211> 34	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso para clonación del 3'UTR de ABCB9	
	<400> 92	
20	ccggccgcgg ccgcttaggg gtaagaggta gtac	34
	<210> 93	
	<211> 32	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo para la CDS de ABCB9	
30	<400> 93	
	ccggccctcg agatgcggct gtggaaggcg gt	32
	<210> 94	
35	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> cebador inverso para la CDS de ABCB9	
	<400> 94	
	ccggccgcgg ccgctcaggc cttgtgactg ccgt	34
45	<210> 95	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> cebador directo para el 3'UTR de IGFBP2	
	<400> 95	
55	ccggccctcg agaccgcagc cagccggtgc ct	32
	<210> 96	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> cebador inverso para el 3'UTR de IGFBP2	
	<400> 96	
65	ccggccgcgg ccgcttactt ttcttcctt taat	34

	<210> 97	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> cebador directo para la CDS de IGFBP2	
	<400> 97	
10	ccggccctcg agatgctgcc gagagtgggc tg	32
	<210> 98	
	<211> 34	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso para la CDS de IGFBP2	
	<400> 98	
20	ccggccgcgg ccgcctactg catccgctgg gtgt	34
	<210> 99	
	<211> 32	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo para el 3'UTR de MERTK	
30	<400> 99	
	ccggccctcg agggagaggt gcggggagac at	32
	<210> 100	
	<211> 34	
35	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> cebador inverso para el 3'UTR de MERTK	
	<400> 100	
	ccggccgcgg ccgccttctt tattcatatt ttat	34
45	<210> 101	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> cebador directo para la CDS de MERTK	
	<400> 101	
55	ccggccctcg agatggggcc ggccccgctg cc	32
	<210> 102	
	<211> 34	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> cebador inverso para la CDS de MERTK	
	<400> 102	
65	ccggccgcgg ccgctcacat caggacttct gage	34

5	<210> 103 <211> 32 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador directo para la 3'UTR de PITPNC1 <400> 103 ccggccctcg agcaatggat gaagtcgag aa	32
15	<210> 104 <211> 34 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> cebador inverso para la 3'UTR de PITPNC1 <400> 104 ccggccgcg cgcgttaaaa gacagaaaca agta	34
25	<210> 105 <211> 32 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador directo para la CDS de PITPNC1 <400> 105 ccggccctcg agatgetget gaaagagtac eg	32
35	<210> 106 <211> 34 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> cebador inverso para la CDS de PITPNC1	
45	<400> 106 ccggccgcg cgcgtcatgt actgtttgg gcat	34
50	<210> 107 <211> 32 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> cebador directo para la 3'UTR de PSAT1 <400> 107 ccggccctcg agacacatcc taaccaggat at	32
60	<210> 108 <211> 34 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> cebador inverso para el 3'UTR de PSAT1 <400> 108 ccggccgcg cgcgttagat gtttaggac tta	34

5	<210> 109 <211> 34 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador directo para la CDS de PSAT1 <400> 109 ccggccgcg cgcgtcatag ctgatcatc tcca	34
15	<210> 110 <211> 32 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> cebador inverso para la CDS de PSAT1 <400> 110 ccggccctcg agatggacgc cccaggcag gt	32
25	<210> 111 <211> 32 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador directo para el 3'UTR de PYGB <400> 111 ccggccctcg aggcacaccc tgccttggcg gg	32
35	<210> 112 <211> 34 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> cebador inverso para el 3'UTR de PYGB	
45	<400> 112 ccggccgcg cgcctcagcc aaccacagcc acaa	34
50	<210> 113 <211> 34 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> cebador directo para la CDS de PYGB <400> 113 ccggccgttt aaacatggcg aagccgctga cgga	34
60	<210> 114 <211> 34 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> cebador inverso para la CDS de PYGB <400> 114 ccggccgcg cgcctagtc ccgggggatg ttgg	34

5	<210> 115 <211> 32 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> cebador directo para el 3'UTR de SHMT2 <400> 115 ccggccctcg agaggcacct gggaaatgag gc	32
15	<210> 116 <211> 34 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> cebador inverso para el 3'UTR de SHMT2 <400> 116 ccggccgcgg ccgcaaaat acaattcat ttaa	34
25	<210> 117 <211> 32 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> cebador directo para la CDS de SHMT2 <400> 117 ccggccctcg agatgctgta cttctcttg tt	32
35	<210> 118 <211> 34 <212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> cebador inverso para la CDS de SHMT2	
45	<400> 118 ccggccgcgg ccgctcaatg ctcatcaaaa ccag	34
50	<210> 119 <211> 34 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> cebador directo para la CDS de VIPR <400> 119 ccggccggtt aaactcagac cagggagact tcgg	34
60	<210> 120 <211> 32 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> cebador inverso para la CDS de VIPR <400> 120 ccggccctcg agatgcgccc gccaaatccg ct	32

5	<210> 121 <211> 32 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador directo para la 3'UTR de VIPR1	
10	<400> 121 ccggccctcg agccaccagg atcccagggg cc	32
15	<210> 122 <211> 34 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador inverso para la 3'UTR de VIPR1	
20	<400> 122 ccggccgcgg ccgctccaag ccaacattta ttgt	34
25	<210> 123 <211> 15 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> Secuencia complementaria de miR-126	
30	<400> 123 ttactcacgg tacga 15	
35	<210> 124 <211> 53 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador directo para la mutagénesis del 3'UTR de IGFBP2	
40	<400> 124 aagggggttg tggtcgggga gctggcacac aggtttgggg agggggaaga gaa	53
45	<210> 125 <211> 53 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador directo para la mutagénesis del 3'UTR de MERTK	
50	<400> 125 attctaggcg atcgctcgag ggagacacgc ggggagacat tcaaaaaatc aag	53
55	<210> 126 <211> 53 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador directo para la mutagénesis de la CDS de PITPNC1	
60	<400> 126 tatgacaatg gatgatgttc gggaagtaga gaaaaacatg catgaacaaa cca	53
65		

5	<210> 127 <211> 53 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador directo para la mutagénesis de la CDS de SHMT2	
10	<400> 127 gcgaggctac tcactggtat caggtcacac tgacaaccac ctggtgctgg tgg	53
15	<210> 128 <211> 53 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador inverso para la mutagénesis del 3'UTR de IGFBP2	
20	<400> 128 ttctctccc cctccccaaa cctgtgtgcc agctccccga ccacaacccc ctt	53
25	<210> 129 <211> 53 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador inverso para la mutagénesis del 3'UTR de MERTK	
30	<400> 129 ctgtatttt ggaatgtctc cccgcgtgtc tccctcgagc gatcgccatg aat	53
35	<210> 130 <211> 53 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador inverso para la mutagénesis de la CDS de PITPNC1	
40	<400> 130 tggttgttc atgcatgttt ttctctactt cccgaacatc atccattgtc ata	53
45	<210> 131 <211> 53 <212> ADN <213> Artificial <220> <223> cebador inverso para la mutagénesis de la CDS de SHMT2	
50	<400> 131 ccaccagcac cagggtggtg tcagtgtgac ctgataccag tgagtagcct cgc	53
55	<210> 132 <211> 678 <212> PRT <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 132	
60	Met Ala Pro Ser Leu Ser Pro Gly Pro Ala Ala Leu Arg Arg Ala Pro	
65		

1		5		10		15													
Gln	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Glu	Cys	Ala	Leu	Ala	Ala	Leu			
			20						25					30					
Leu	Pro	Ala	Arg	Glu	Ala	Thr	Gln	Phe	Leu	Arg	Pro	Arg	Gln	Arg	Arg				
		35					40					45							
Ala	Phe	Gln	Val	Phe	Glu	Glu	Ala	Lys	Gln	Gly	His	Leu	Glu	Arg	Glu				
	50					55					60								
Cys	Val	Glu	Glu	Leu	Cys	Ser	Arg	Glu	Glu	Ala	Arg	Glu	Val	Phe	Glu				
65					70					75					80				
Asn	Asp	Pro	Glu	Thr	Asp	Tyr	Phe	Tyr	Pro	Arg	Tyr	Leu	Asp	Cys	Ile				
				85					90					95					
Asn	Lys	Tyr	Gly	Ser	Pro	Tyr	Thr	Lys	Asn	Ser	Gly	Phe	Ala	Thr	Cys				
			100					105					110						
Val	Gln	Asn	Leu	Pro	Asp	Gln	Cys	Thr	Pro	Asn	Pro	Cys	Asp	Arg	Lys				
		115					120					125							
Gly	Thr	Gln	Ala	Cys	Gln	Asp	Leu	Met	Gly	Asn	Phe	Phe	Cys	Leu	Cys				
	130					135					140								
Lys	Ala	Gly	Trp	Gly	Gly	Arg	Leu	Cys	Asp	Lys	Asp	Val	Asn	Glu	Cys				
145					150					155					160				
Ser	Gln	Glu	Asn	Gly	Gly	Cys	Leu	Gln	Ile	Cys	His	Asn	Lys	Pro	Gly				
				165				170						175					
Ser	Phe	His	Cys	Ser	Cys	His	Ser	Gly	Phe	Glu	Leu	Ser	Ser	Asp	Gly				
			180					185					190						
Arg	Thr	Cys	Gln	Asp	Ile	Asp	Glu	Cys	Ala	Asp	Ser	Glu	Ala	Cys	Gly				
		195					200					205							
Glu	Ala	Arg	Cys	Lys	Asn	Leu	Pro	Gly	Ser	Tyr	Ser	Cys	Leu	Cys	Asp				
	210					215					220								
Glu	Gly	Phe	Ala	Tyr	Ser	Ser	Gln	Glu	Lys	Ala	Cys	Arg	Asp	Val	Asp				
225					230					235					240				
Glu	Cys	Leu	Gln	Gly	Arg	Cys	Glu	Gln	Val	Cys	Val	Asn	Ser	Pro	Gly				
				245				250						255					

Ser Tyr Thr Cys His Cys Asp Gly Arg Gly Gly Leu Lys Leu Ser Gln
 260 265 270

Asp Met Asp Thr Cys Glu Asp Ile Leu Pro Cys Val Pro Phe Ser Val
 275 280 285

Ala Lys Ser Val Lys Ser Leu Tyr Leu Gly Arg Met Phe Ser Gly Thr
 290 295 300

Pro Val Ile Arg Leu Arg Phe Lys Arg Leu Gln Pro Thr Arg Leu Val
 305 310 315 320

Ala Glu Phe Asp Phe Arg Thr Phe Asp Pro Glu Gly Ile Leu Leu Phe
 325 330 335

Ala Gly Gly His Gln Asp Ser Thr Trp Ile Val Leu Ala Leu Arg Ala
 340 345 350

Gly Arg Leu Glu Leu Gln Leu Arg Tyr Asn Gly Val Gly Arg Val Thr
 355 360 365

Ser Ser Gly Pro Val Ile Asn His Gly Met Trp Gln Thr Ile Ser Val
 370 375 380

Glu Glu Leu Ala Arg Asn Leu Val Ile Lys Val Asn Arg Asp Ala Val
 385 390 395 400

Met Lys Ile Ala Val Ala Gly Asp Leu Phe Gln Pro Glu Arg Gly Leu
 405 410 415

Tyr His Leu Asn Leu Thr Val Gly Gly Ile Pro Phe His Glu Lys Asp
 420 425 430

Leu Val Gln Pro Ile Asn Pro Arg Leu Asp Gly Cys Met Arg Ser Trp
 435 440 445

Asn Trp Leu Asn Gly Glu Asp Thr Thr Ile Gln Glu Thr Val Lys Val
 450 455 460

Asn Thr Arg Met Gln Cys Phe Ser Val Thr Glu Arg Gly Ser Phe Tyr
 465 470 475 480

Pro Gly Ser Gly Phe Ala Phe Tyr Ser Leu Asp Tyr Met Arg Thr Pro
 485 490 495

Leu Asp Val Gly Thr Glu Ser Thr Trp Glu Val Glu Val Val Ala His
 500 505 510

Ile Arg Pro Ala Ala Asp Thr Gly Val Leu Phe Ala Leu Trp Ala Pro
515 520 525

Asp Leu Arg Ala Val Pro Leu Ser Val Ala Leu Val Asp Tyr His Ser
530 535 540

Thr Lys Lys Leu Lys Lys Gln Leu Val Val Leu Ala Val Glu His Thr
545 550 555 560

Ala Leu Ala Leu Met Glu Ile Lys Val Cys Asp Gly Gln Glu His Val
565 570 575

Val Thr Val Ser Leu Arg Asp Gly Glu Ala Thr Leu Glu Val Asp Gly
580 585 590

Thr Arg Gly Gln Ser Glu Val Ser Ala Ala Gln Leu Gln Glu Arg Leu
595 600 605

Ala Val Leu Glu Arg His Leu Arg Ser Pro Val Leu Thr Phe Ala Gly
610 615 620

Gly Leu Pro Asp Val Pro Val Thr Ser Ala Pro Val Thr Ala Phe Tyr
625 630 635 640

Arg Gly Cys Met Thr Leu Glu Val Asn Arg Arg Leu Leu Asp Leu Asp
645 650 655

Glu Ala Ala Tyr Lys His Ser Asp Ile Thr Ala His Ser Cys Pro Pro
660 665 670

Val Glu Pro Ala Ala Ala
675

<210> 133
<211> 405
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 133

Met Asp Thr Cys Glu Asp Ile Leu Pro Cys Val Pro Phe Ser Val Ala
1 5 10 15

Lys Ser Val Lys Ser Leu Tyr Leu Gly Arg Met Phe Ser Gly Thr Pro
20 25 30

Val Ile Arg Leu Arg Phe Lys Arg Leu Gln Pro Thr Arg Leu Val Ala
35 40 45

Glu Phe Asp Phe Arg Thr Phe Asp Pro Glu Gly Ile Leu Leu Phe Ala
 50 55 60
 Gly Gly His Gln Asp Ser Thr Trp Ile Val Leu Ala Leu Arg Ala Gly
 65 70 75 80
 Arg Leu Glu Leu Gln Leu Arg Tyr Asn Gly Val Gly Arg Val Thr Ser
 85 90 95
 Ser Gly Pro Val Ile Asn His Gly Met Trp Gln Thr Ile Ser Val Glu
 100 105 110
 Glu Leu Ala Arg Asn Leu Val Ile Lys Val Asn Arg Asp Ala Val Met
 115 120 125
 Lys Ile Ala Val Ala Gly Asp Leu Phe Gln Pro Glu Arg Gly Leu Tyr
 130 135 140
 His Leu Asn Leu Thr Val Gly Gly Ile Pro Phe His Glu Lys Asp Leu
 145 150 155 160
 Val Gln Pro Ile Asn Pro Arg Leu Asp Gly Cys Met Arg Ser Trp Asn
 165 170 175
 Trp Leu Asn Gly Glu Asp Thr Thr Ile Gln Glu Thr Val Lys Val Asn
 180 185 190
 Thr Arg Met Gln Cys Phe Ser Val Thr Glu Arg Gly Ser Phe Tyr Pro
 195 200 205
 Gly Ser Gly Phe Ala Phe Tyr Ser Leu Asp Tyr Met Arg Thr Pro Leu
 210 215 220
 Asp Val Gly Thr Glu Ser Thr Trp Glu Val Glu Val Val Ala His Ile
 225 230 235 240
 Arg Pro Ala Ala Asp Thr Gly Val Leu Phe Ala Leu Trp Ala Pro Asp
 245 250 255
 Leu Arg Ala Val Pro Leu Ser Val Ala Leu Val Asp Tyr His Ser Thr
 260 265 270
 Lys Lys Leu Lys Lys Gln Leu Val Val Leu Ala Val Glu His Thr Ala
 275 280 285
 Leu Ala Leu Met Glu Ile Lys Val Cys Asp Gly Gln Glu His Val Val
 290 295 300

Thr Val Ser Leu Arg Asp Gly Glu Ala Thr Leu Glu Val Asp Gly Thr
305 310 315 320

Arg Gly Gln Ser Glu Val Ser Ala Ala Gln Leu Gln Glu Arg Leu Ala
325 330 335

Val Leu Glu Arg His Leu Arg Ser Pro Val Leu Thr Phe Ala Gly Gly
340 345 350

Leu Pro Asp Val Pro Val Thr Ser Ala Pro Val Thr Ala Phe Tyr Arg
355 360 365

Gly Cys Met Thr Leu Glu Val Asn Arg Arg Leu Leu Asp Leu Asp Glu
370 375 380

Ala Ala Tyr Lys His Ser Asp Ile Thr Ala His Ser Cys Pro Pro Val
385 390 395 400

Glu Pro Ala Ala Ala
405

<210> 134
<211> 379
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 134

Met Phe Ser Gly Thr Pro Val Ile Arg Leu Arg Phe Lys Arg Leu Gln
1 5 10 15

Pro Thr Arg Leu Val Ala Glu Phe Asp Phe Arg Thr Phe Asp Pro Glu
20 25 30

Gly Ile Leu Leu Phe Ala Gly Gly His Gln Asp Ser Thr Trp Ile Val
35 40 45

Leu Ala Leu Arg Ala Gly Arg Leu Glu Leu Gln Leu Arg Tyr Asn Gly
50 55 60

Val Gly Arg Val Thr Ser Ser Gly Pro Val Ile Asn His Gly Met Trp
65 70 75 80

Gln Thr Ile Ser Val Glu Glu Leu Ala Arg Asn Leu Val Ile Lys Val
85 90 95

Asn Arg Asp Ala Val Met Lys Ile Ala Val Ala Gly Asp Leu Phe Gln
100 105 110

5

10

Pro Glu Arg Gly Leu Tyr His Leu Asn Leu Thr Val Gly Gly Ile Pro
 115 120 125

Phe His Glu Lys Asp Leu Val Gln Pro Ile Asn Pro Arg Leu Asp Gly
 130 135 140

Cys Met Arg Ser Trp Asn Trp Leu Asn Gly Glu Asp Thr Thr Ile Gln
 145 150 155 160

Glu Thr Val Lys Val Asn Thr Arg Met Gln Cys Phe Ser Val Thr Glu
 165 170 175

Arg Gly Ser Phe Tyr Pro Gly Ser Gly Phe Ala Phe Tyr Ser Leu Asp
 180 185 190

Tyr Met Arg Thr Pro Leu Asp Val Gly Thr Glu Ser Thr Trp Glu Val
 195 200 205

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

Ala Leu Trp Ala Pro Asp Leu Arg Ala Val Pro Leu Ser Val Ala Leu
 225 230 235 240

Val Asp Tyr His Ser Thr Lys Lys Leu Lys Lys Gln Leu Val Val Leu
 245 250 255

Ala Val Glu His Thr Ala Leu Ala Leu Met Glu Ile Lys Val Cys Asp
 260 265 270

Gly Gln Glu His Val Val Thr Val Ser Leu Arg Asp Gly Glu Ala Thr
 275 280 285

Leu Glu Val Asp Gly Thr Arg Gly Gln Ser Glu Val Ser Ala Ala Gln
 290 295 300

Leu Gln Glu Arg Leu Ala Val Leu Glu Arg His Leu Arg Ser Pro Val
 305 310 315 320

Leu Thr Phe Ala Gly Gly Leu Pro Asp Val Pro Val Thr Ser Ala Pro
 325 330 335

Val Thr Ala Phe Tyr Arg Gly Cys Met Thr Leu Glu Val Asn Arg Arg
 340 345 350

Leu Leu Asp Leu Asp Glu Ala Ala Tyr Lys His Ser Asp Ile Thr Ala

	355	360	365
	His Ser Cys Pro Pro Val Glu Pro Ala Ala Ala 370 375		
5	<210> 135 <211> 47 <212> ADN <213> Artificial		
10	<220> <223> cebador directo que contiene el promotor de T7 <400> 135 gaaattaata cgactcacta tagggcctgg agacgccatc cagctg		47
15	<210> 136 <211> 22 <212> ADN <213> Artificial		
20	<220> <223> cebador inverso que contiene el promotor de T7 <400> 136 gatgtgcgct ctgccactg ac		22
25	<210> 137 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial		
30	<220> <223> Cebador sintético <400> 137 tggactatca tatgcttacc gtaact		26
35	<210> 138 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial		
40	<220> <223> Cebador sintético <400> 138 aaagaggatc tctgtccctg t		21
45	<210> 139 <211> 92 <212> ADN <213> Artificial		
50	<220> <223> Cebador sintético <400> 139 aatgatacgg cgaccaccga gatctacact ctttccctac acgacgctct tccgatctgt		60
55	attcttggct ttatatatct tgtggaaagg ac		92

ES 2 763 087 T3

	<210> 140	
	<211> 65	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Cebador sintético	
	<400> 140	
10	caagcagaag acggcatacg agctcttccg atctggatga atactgccat ttgtctcgag	60
	gtcga	65

REIVINDICACIONES

1. Un método para la identificación de un gen o ARN no codificante que regula la colonización por cáncer metastásico de un tejido corporal, que comprende,

- a) introducir una o más moléculas de ARNhc, ARNi, microARN o ARN no codificante en una población de células cancerosas iniciales para generar una población de células cancerosas modificadas por ingeniería, en donde la población de células cancerosas iniciales se obtiene realizando tandas en serie de trasplante, aislamiento y trasplante repetido de una población de células cancerosas marcadas o no marcadas en un tejido vivo no humano;
- b) trasplantar dicha población de células cancerosas modificadas por ingeniería en un tejido del cuerpo no humano;
- c) aislar células trasplantadas para obtener una población de células cancerosas aisladas; y
- d) evaluar la cantidad de molécula de ARNhc, ARNi, microARN o de ARN no codificante o de gen codificante de proteína en la población de células cancerosas aisladas,

en donde una disminución en la cantidad de dicho ARNhc, ARNi, microARN o ARN no codificante en la población de células aisladas con respecto a su cantidad antes del trasplante indica que el gen o genes diana de dicho ARNhc, ARNi, microARN o ARN no codificante representan un gen necesario para la colonización metastásica de dicho tejido.

2. Un método para la identificación de un gen o un ARN no codificante que regula la colonización por cáncer metastásico de un tejido corporal, que comprende

- a) introducir una o más moléculas de ADN que codifican un gen codificante de proteína en una población de células cancerosas iniciales para generar una población de células cancerosas modificadas por ingeniería, en donde la población de células cancerosas iniciales se obtiene realizando tandas en serie de trasplante, aislamiento y trasplante repetido de una población de células cancerosas marcadas o no marcadas en un tejido vivo no humano;
- b) trasplantar dicha población de células cancerosas modificadas por ingeniería en un tejido del cuerpo no humano;
- c) aislar células trasplantadas para obtener una población de células cancerosas aisladas; y
- d) evaluar la cantidad del gen codificante de proteína en la población de células cancerosas aisladas, en donde un aumento en la cantidad de dicho gen codificante de proteína en la población de células aisladas con respecto a su cantidad antes del trasplante indica que el gen codificante de proteína es necesario para la colonización metastásica de dicho tejido.

3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la etapa de evaluación se realiza utilizando análisis de microalineamientos, tecnología de secuenciación de ADN, tecnología de secuenciación masiva o análisis de clonación.

4. Un método para la identificación de un gen o un ARN no codificante que regula la colonización por cáncer metastásico de un tejido corporal, que comprende,

- a) proporcionar una población de células cancerosas aisladas obtenidas de un sujeto no humano que se ha trasplantado con una población de células cancerosas modificadas por ingeniería, en donde las células cancerosas modificadas por ingeniería se han producido introduciendo una o más moléculas de ARNhc, ARNi, microARN o ARN no codificante en una población de células cancerosas iniciales, en donde la población de células cancerosas iniciales se obtiene realizando tandas en serie de trasplante, aislamiento y trasplante repetido de una población de células cancerosas marcadas o no marcadas en un tejido vivo no humano;
- b) evaluar la cantidad de molécula de ARNhc, ARNi, microARN o ARN no codificante o de gen codificante de proteína en la población de células cancerosas aisladas,

en donde una disminución en la cantidad de dicho ARNhc, ARNi, microARN o ARN no codificante en la población de células aisladas con respecto a su cantidad antes del trasplante indica que el gen o genes diana de dicho ARNhc, ARNi, microARN o ARN no codificantes representan un gen necesario para la colonización metastásica de dicho tejido.

5. Un método para la identificación de un gen o un ARN no codificante que regula la colonización por cáncer metastásico de un tejido corporal, que comprende

- a) proporcionar una población de células cancerosas aisladas obtenidas de un sujeto no humano que se ha trasplantado con una población de células cancerosas modificadas por ingeniería, en donde las células cancerosas modificadas por ingeniería se han producido introduciendo una o más moléculas de ADN que codifican un gen codificante de proteína en una población de células cancerosas iniciales para generar una población de células cancerosas modificadas por ingeniería, en donde la población de células cancerosas

iniciales se obtiene realizando tandas en serie de trasplante, aislamiento y trasplante repetido de una población de células cancerosas marcadas o no marcadas en un tejido vivo no humano;

- 5 b) evaluar la cantidad del gen codificante de proteína en la población de células cancerosas aisladas, en donde un aumento en la cantidad de dicho gen codificante de proteína en la población de células aisladas con respecto a su cantidad antes del trasplante indica que el gen codificante de proteína es necesario para la colonización metastásica de dicho tejido.

- 10 6. El método de la reivindicación 4 o 5, en donde la etapa de evaluación se realiza utilizando análisis de microalineamientos, tecnología de secuenciación de ADN, tecnología de secuenciación masiva o análisis de clonación

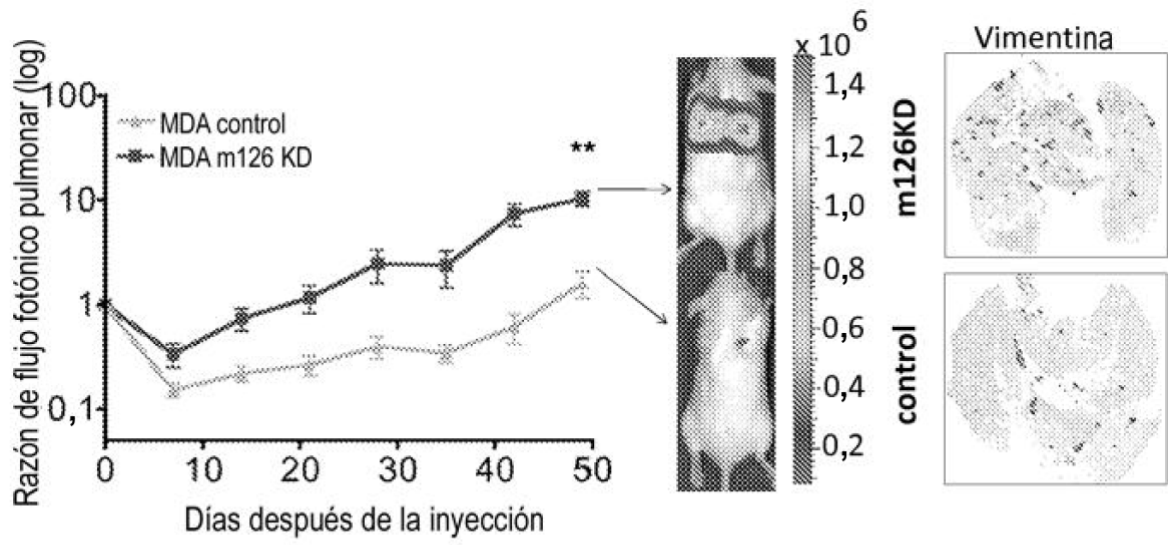


FIG. 1A

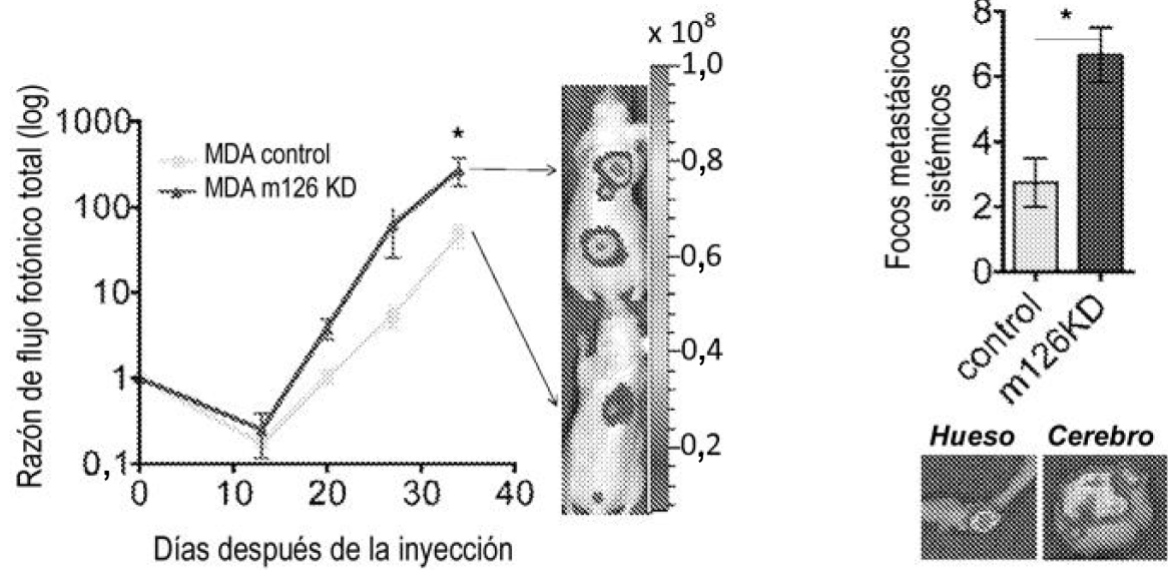


FIG. 1B

FIG. 1C

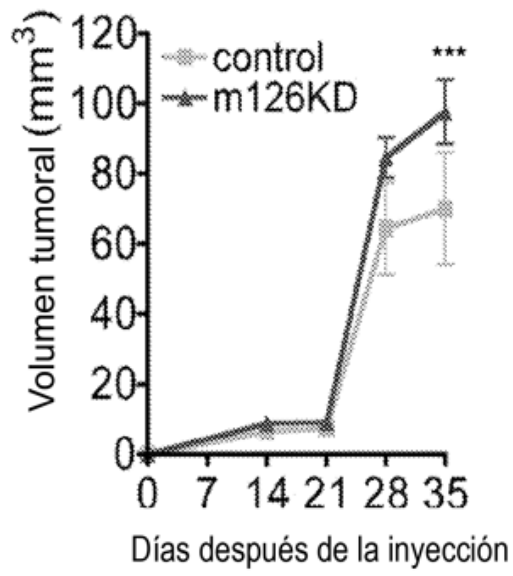


FIG. 1D

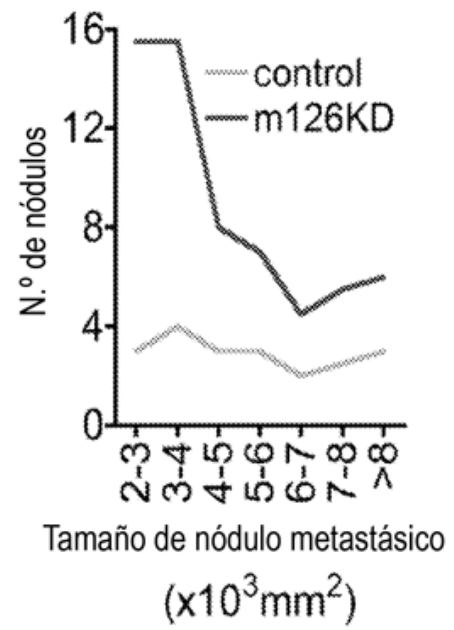


FIG. 1E

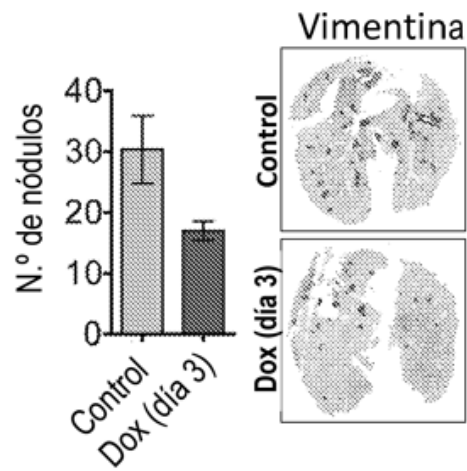


FIG. 1F

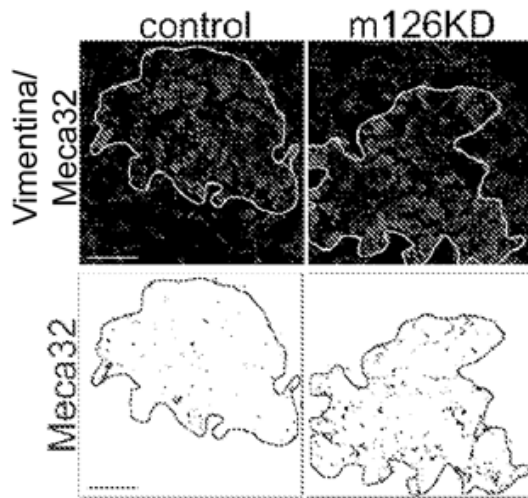


FIG. 2A

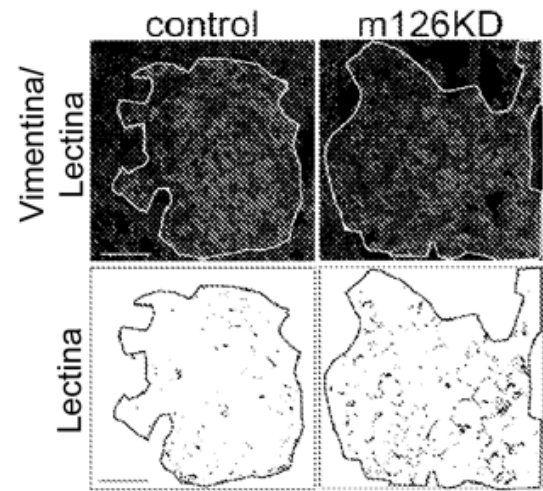


FIG. 2B

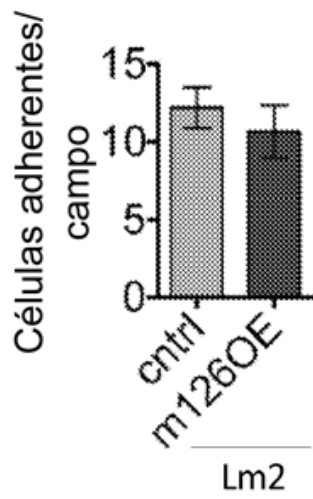


FIG. 2C

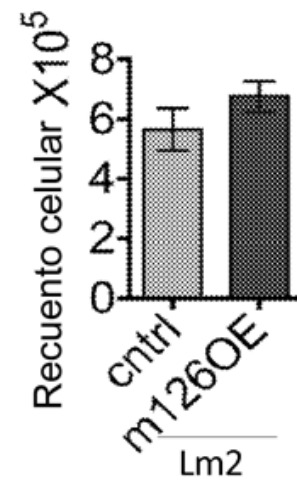


FIG. 2D

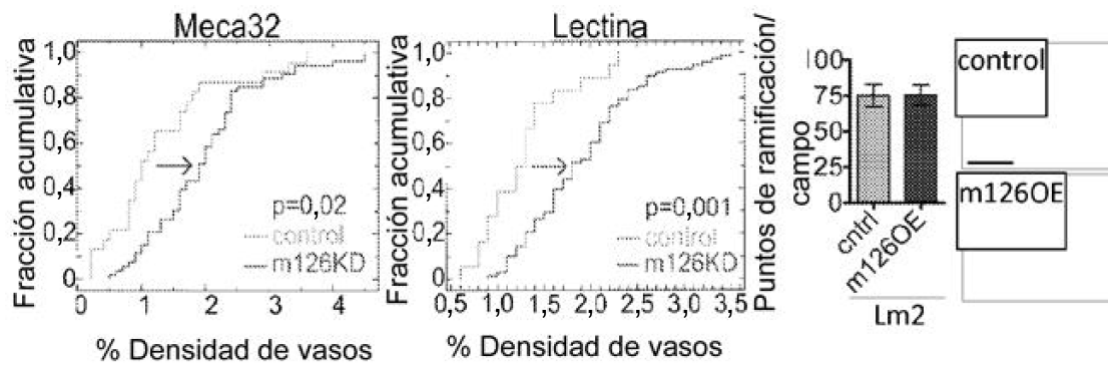


FIG. 2E

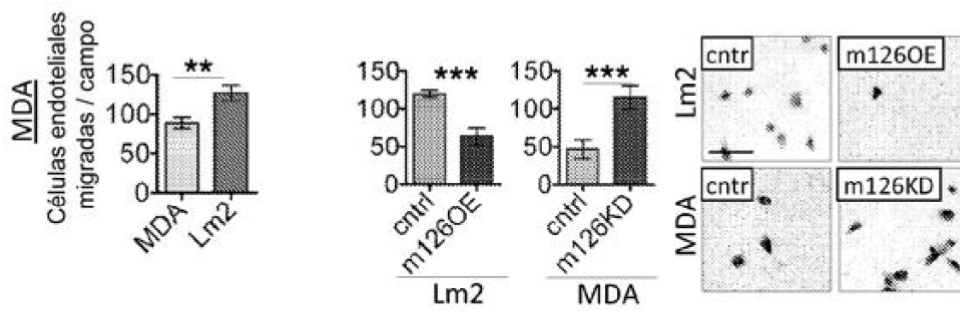


FIG. 2F

Fig. 2G

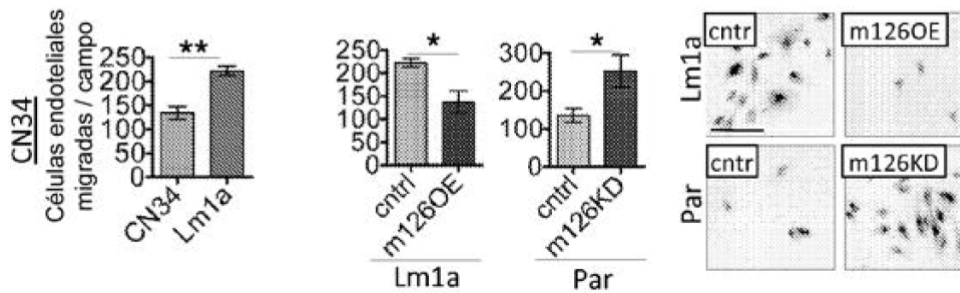


FIG. 2H

Fig. 2I

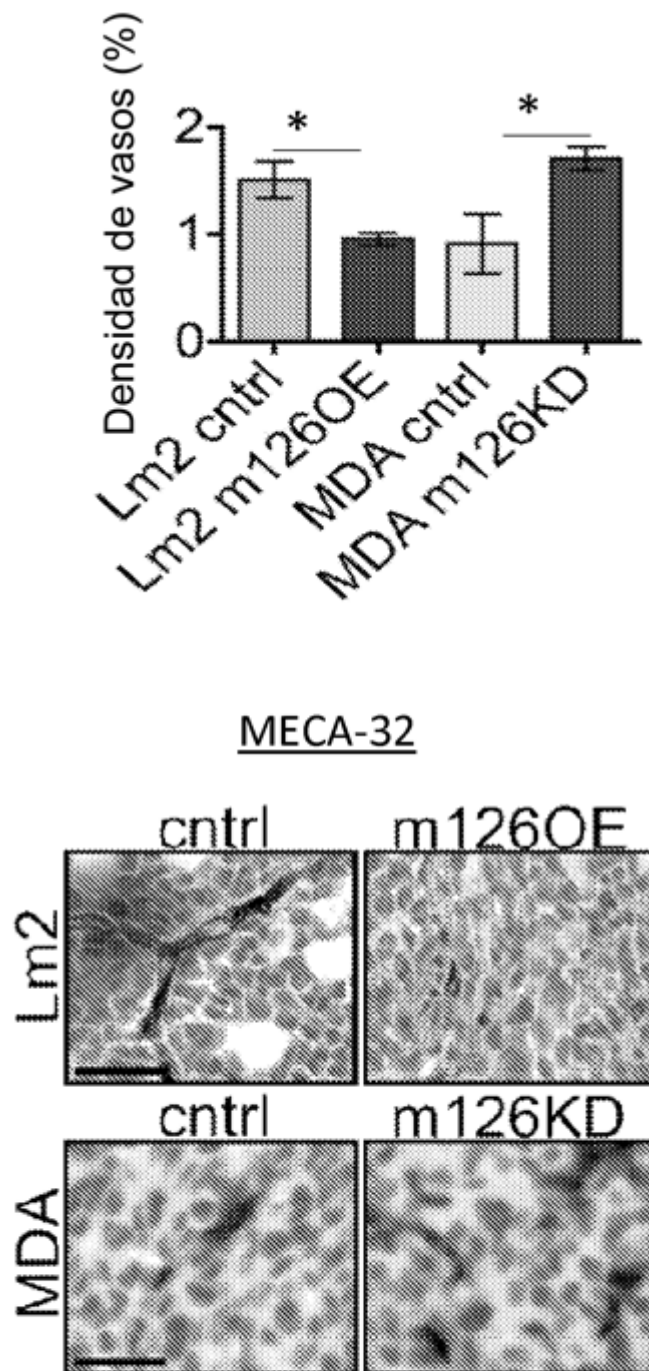


FIG. 2J

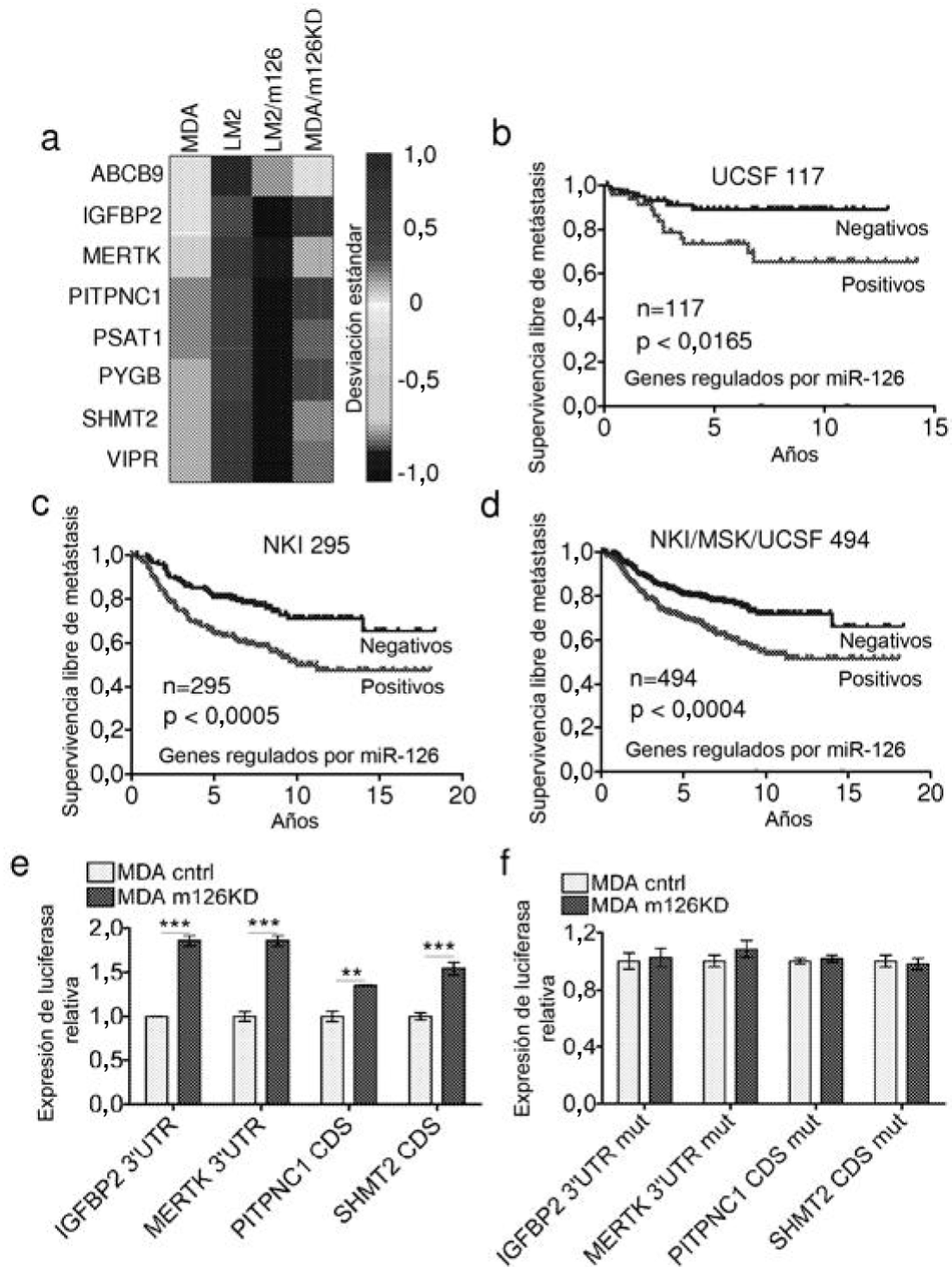


FIG. 3

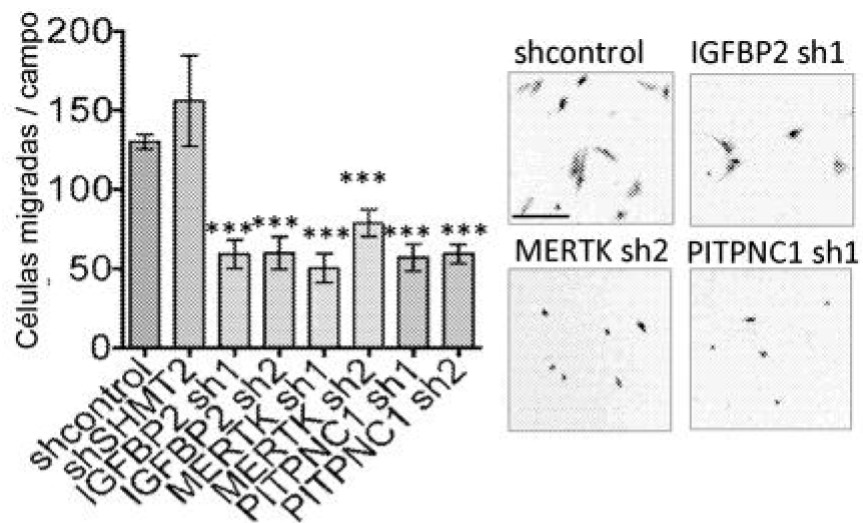


FIG. 4A

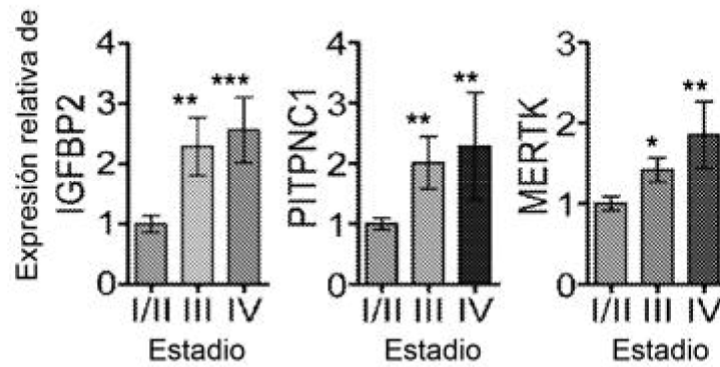


FIG. 4B

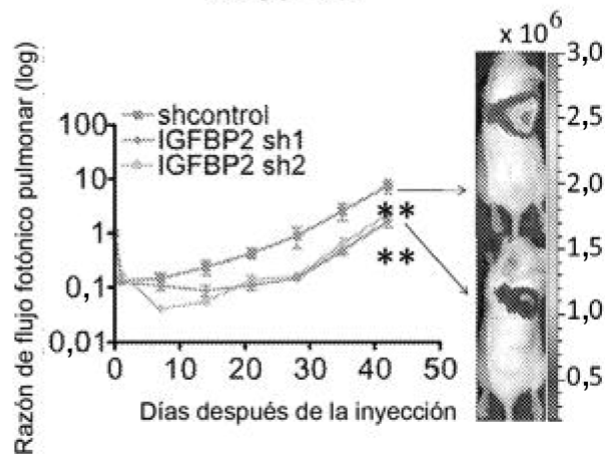


FIG. 4C

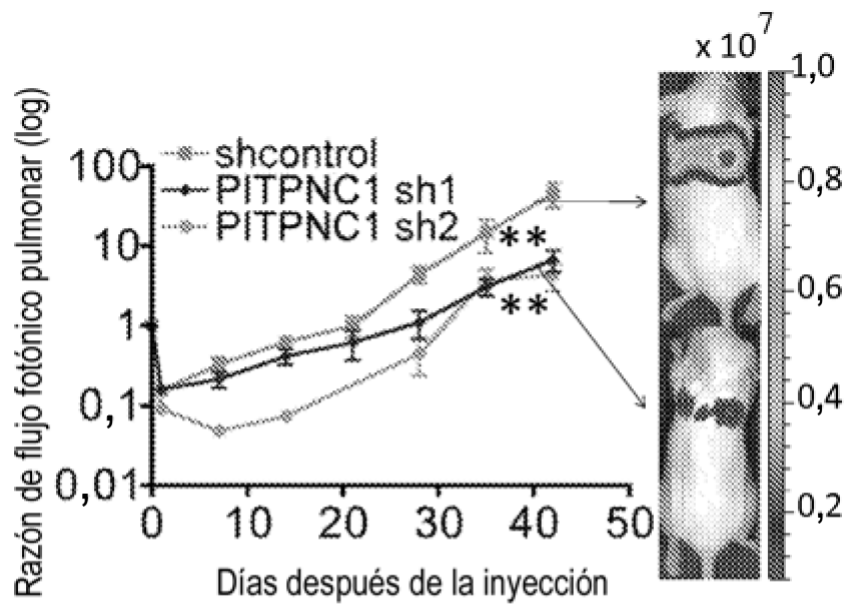


FIG. 4D

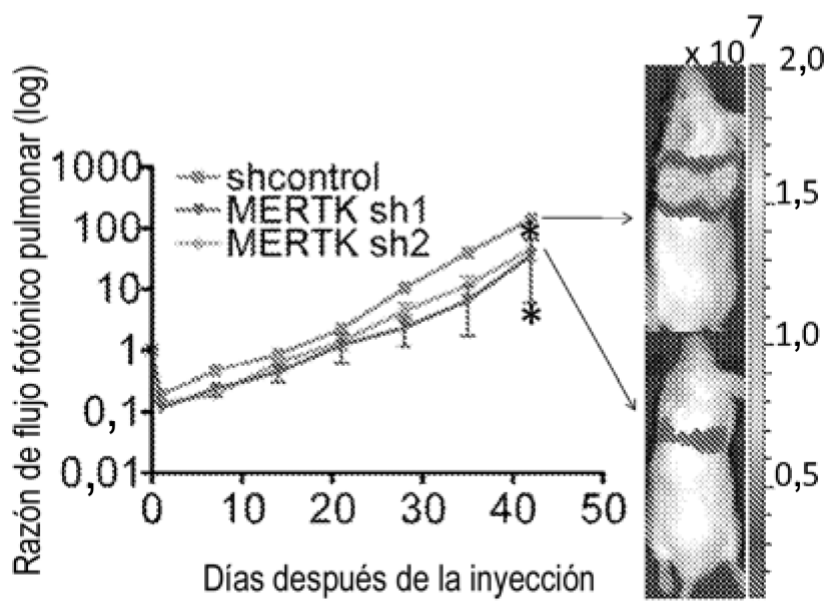


FIG. 4E

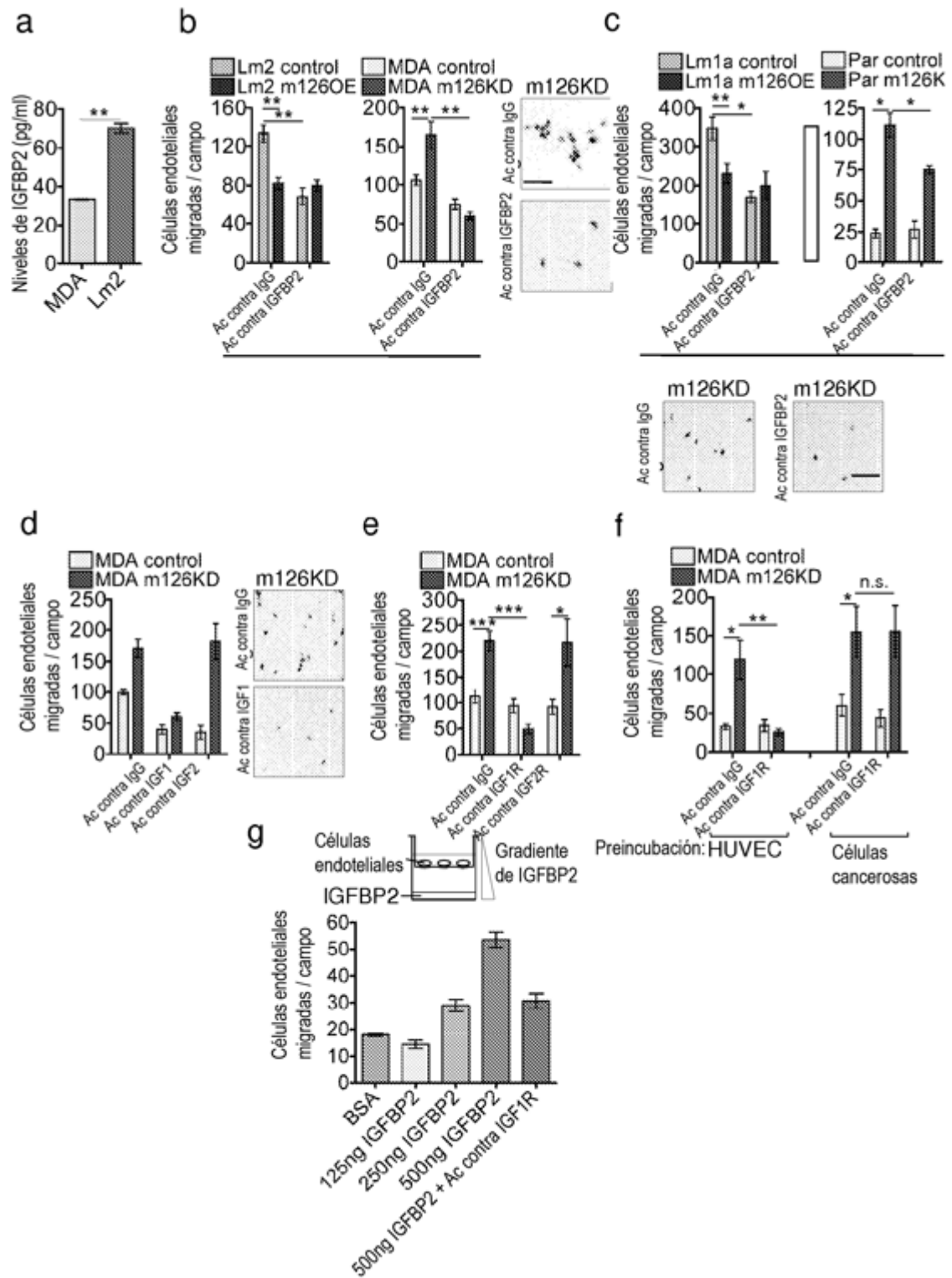


FIG. 5

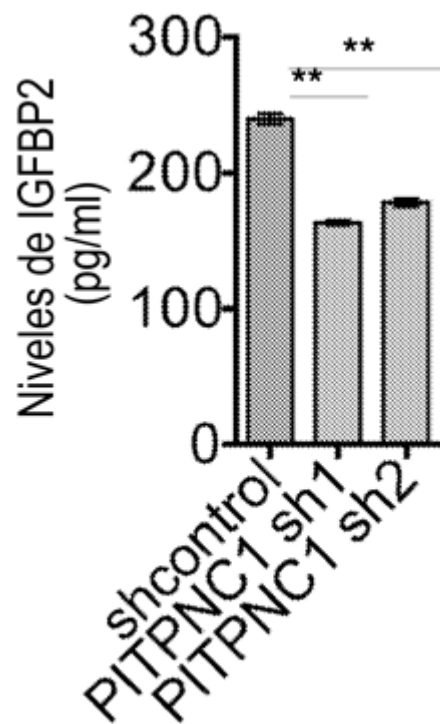


FIG. 6A

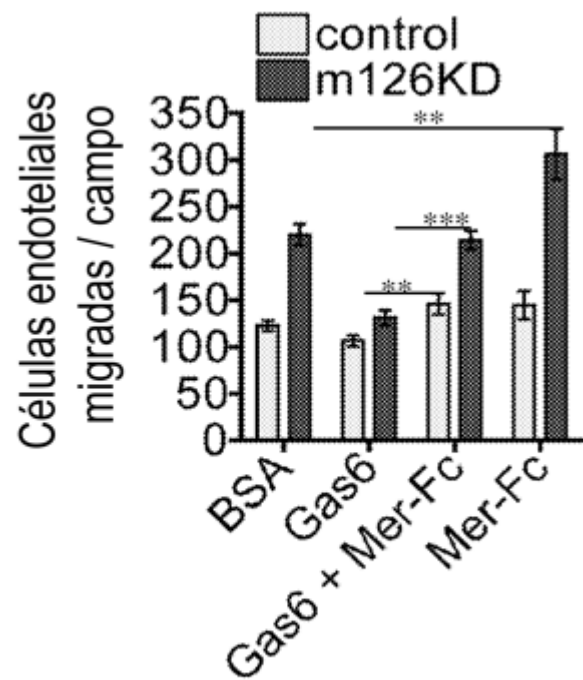


FIG. 6B

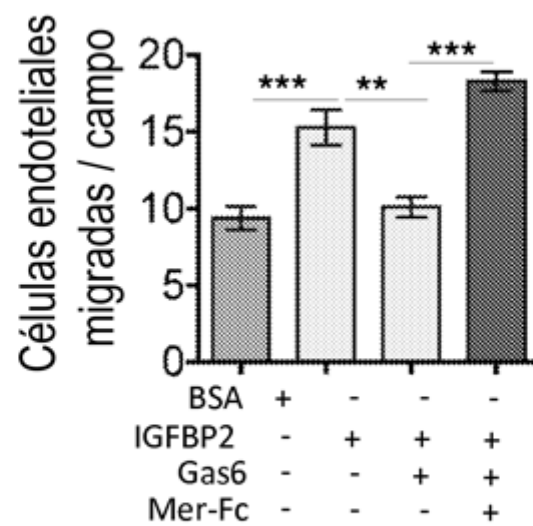


FIG. 6C

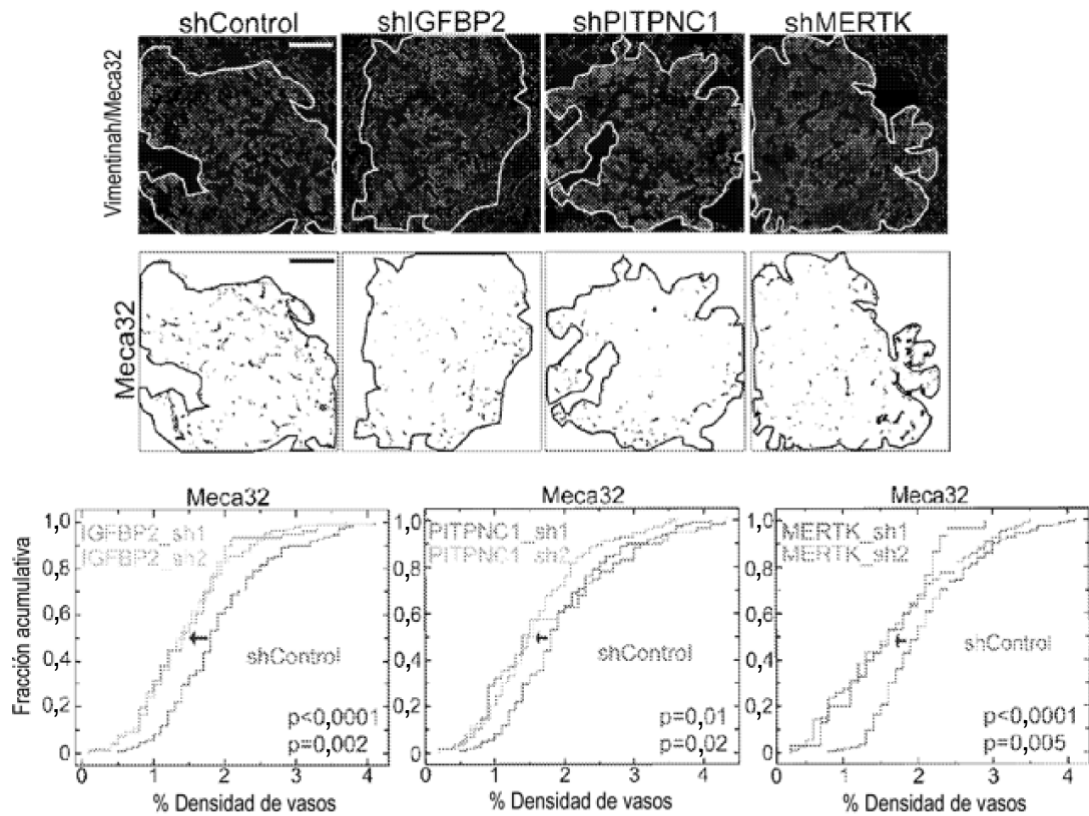


FIG. 6D

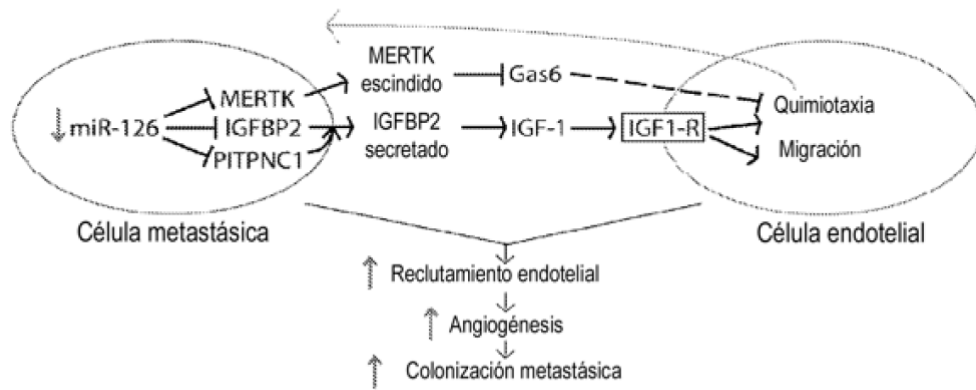


FIG. 6E

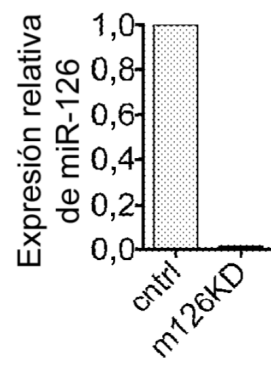


FIG. 7

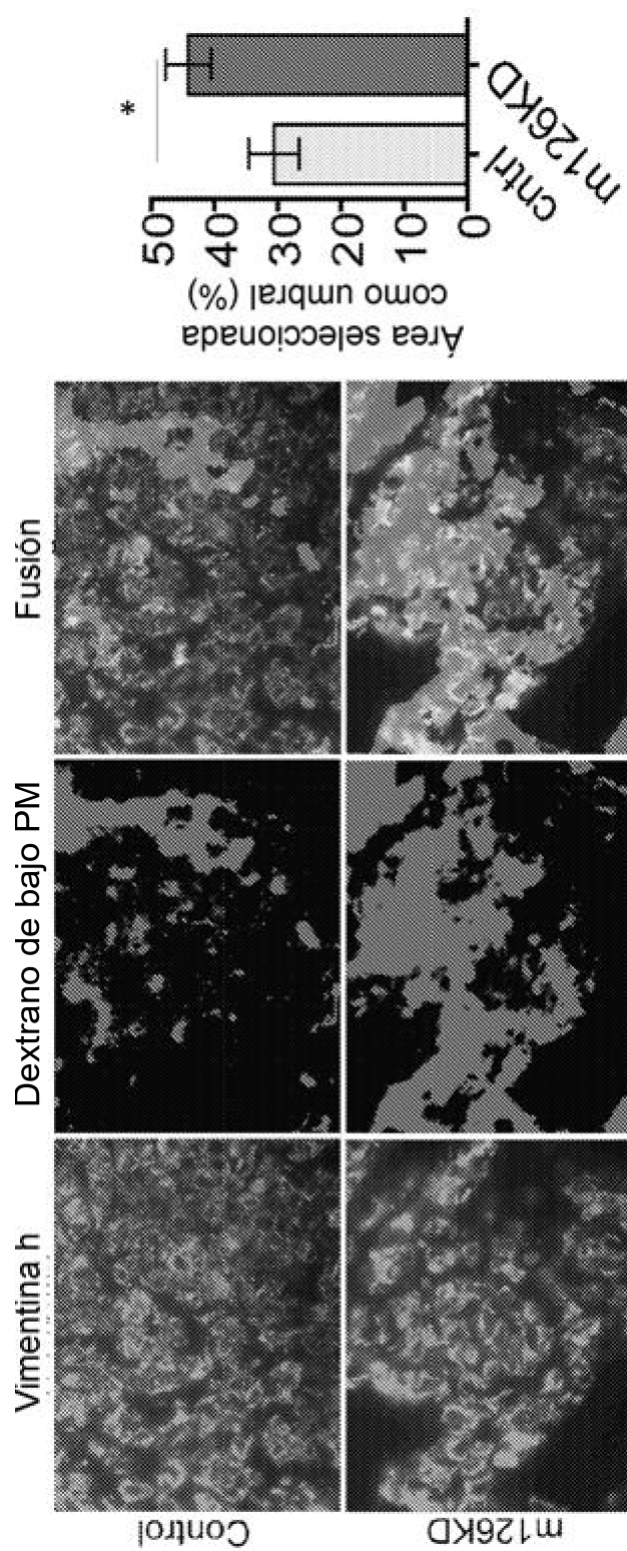


FIG. 8

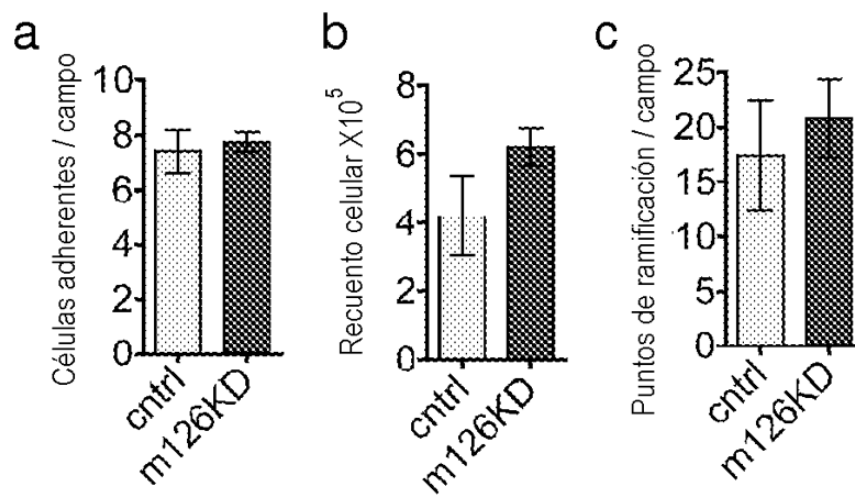


FIG. 9

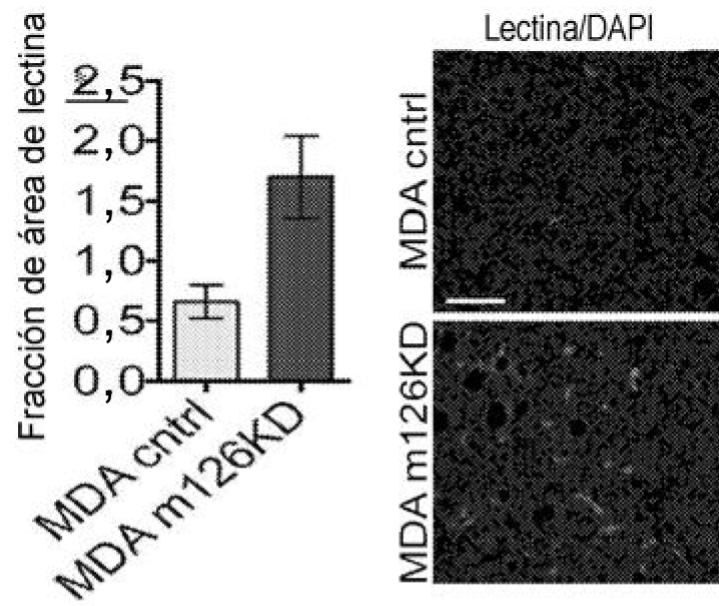


FIG. 10A

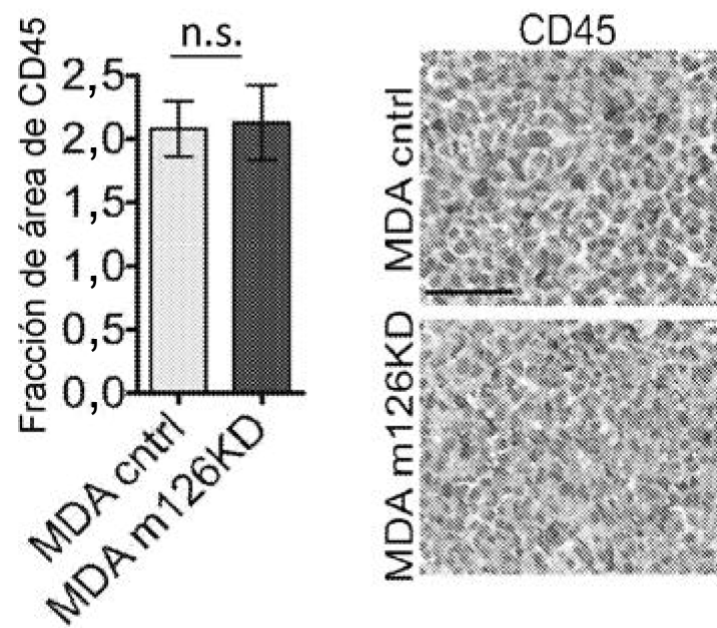


FIG. 10B

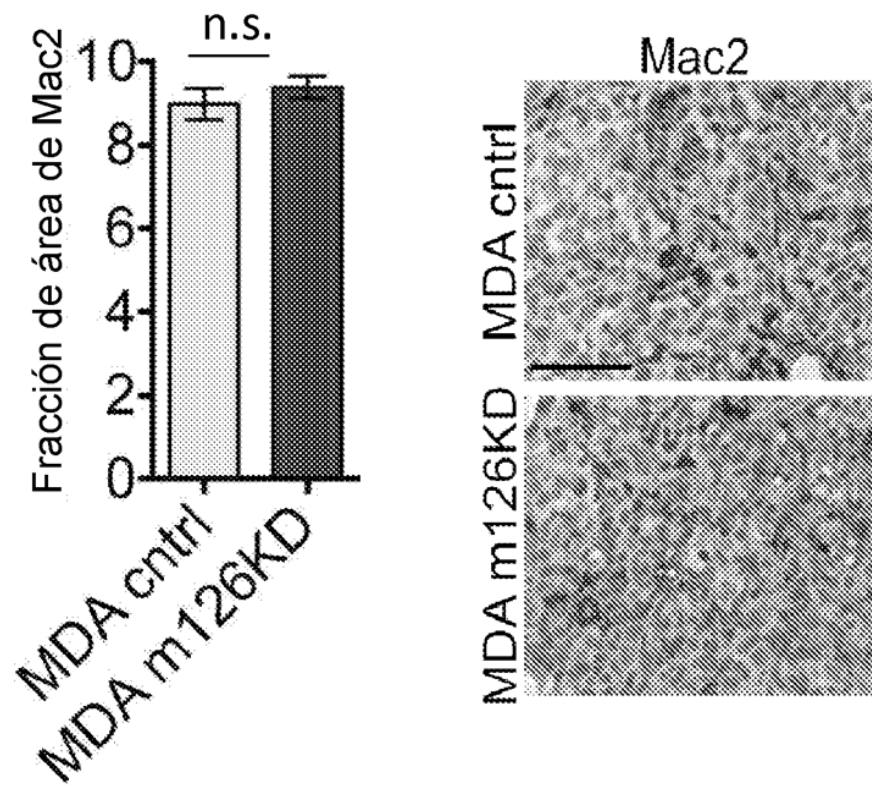


FIG. 10C

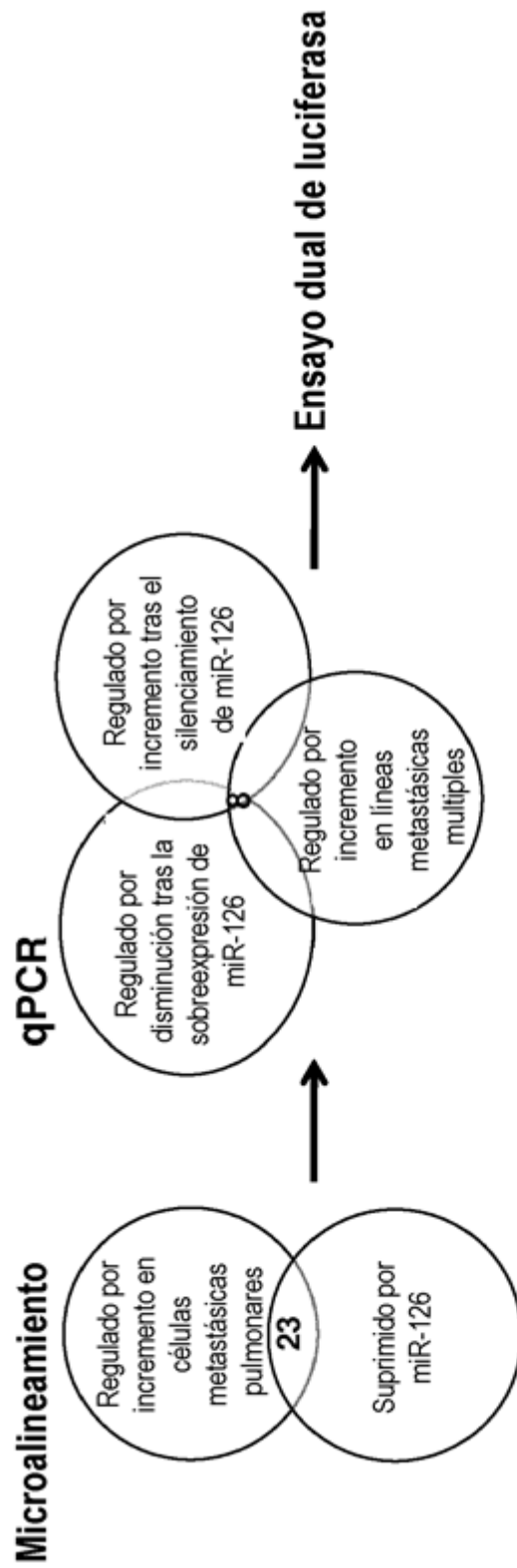


FIG. 11



FIG. 12

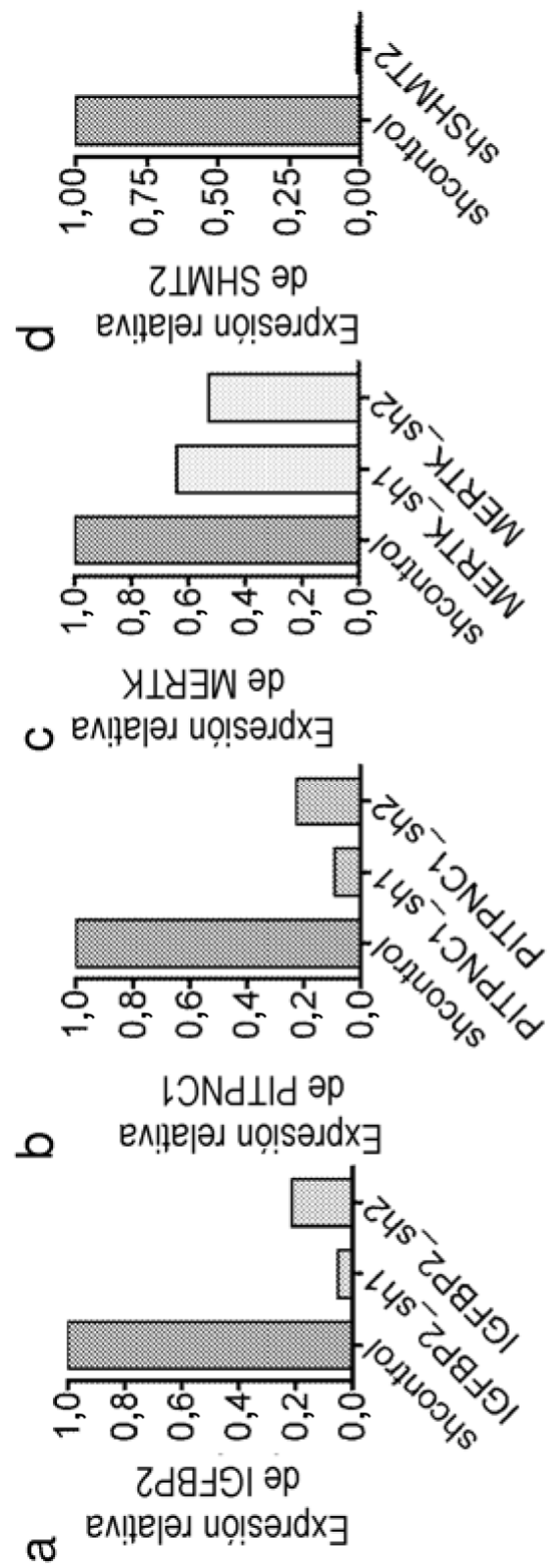


FIG. 13

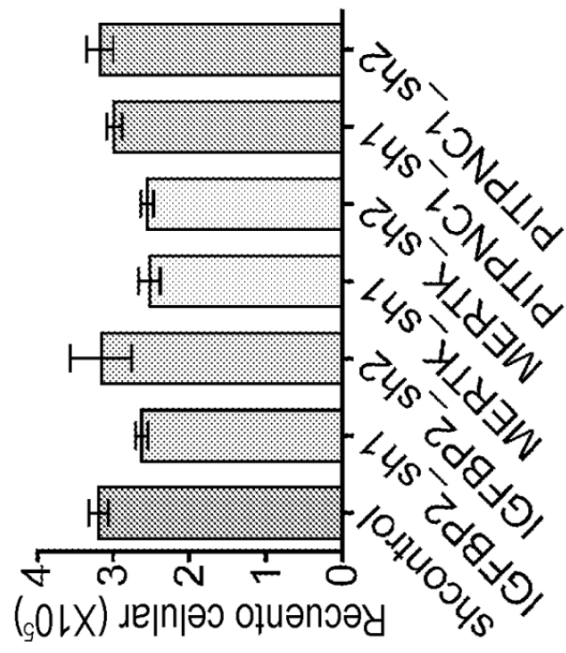


FIG 14

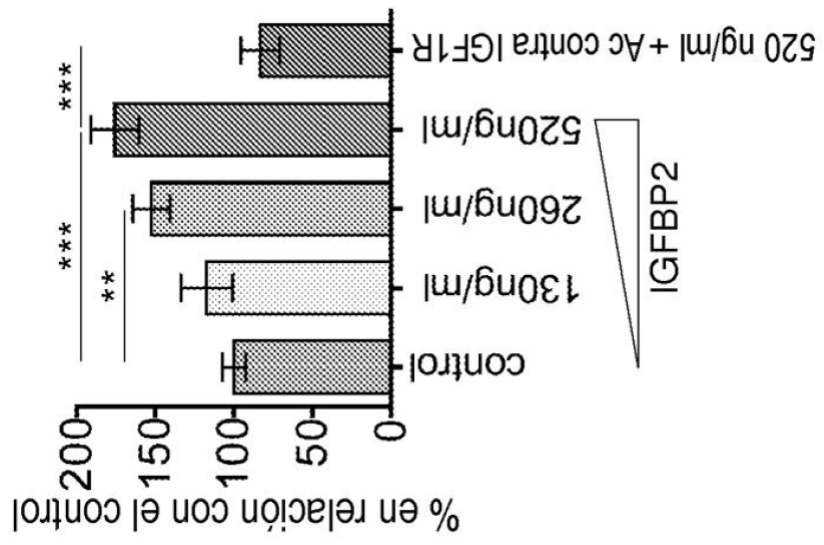


FIG. 15

Células CM



FIG. 16

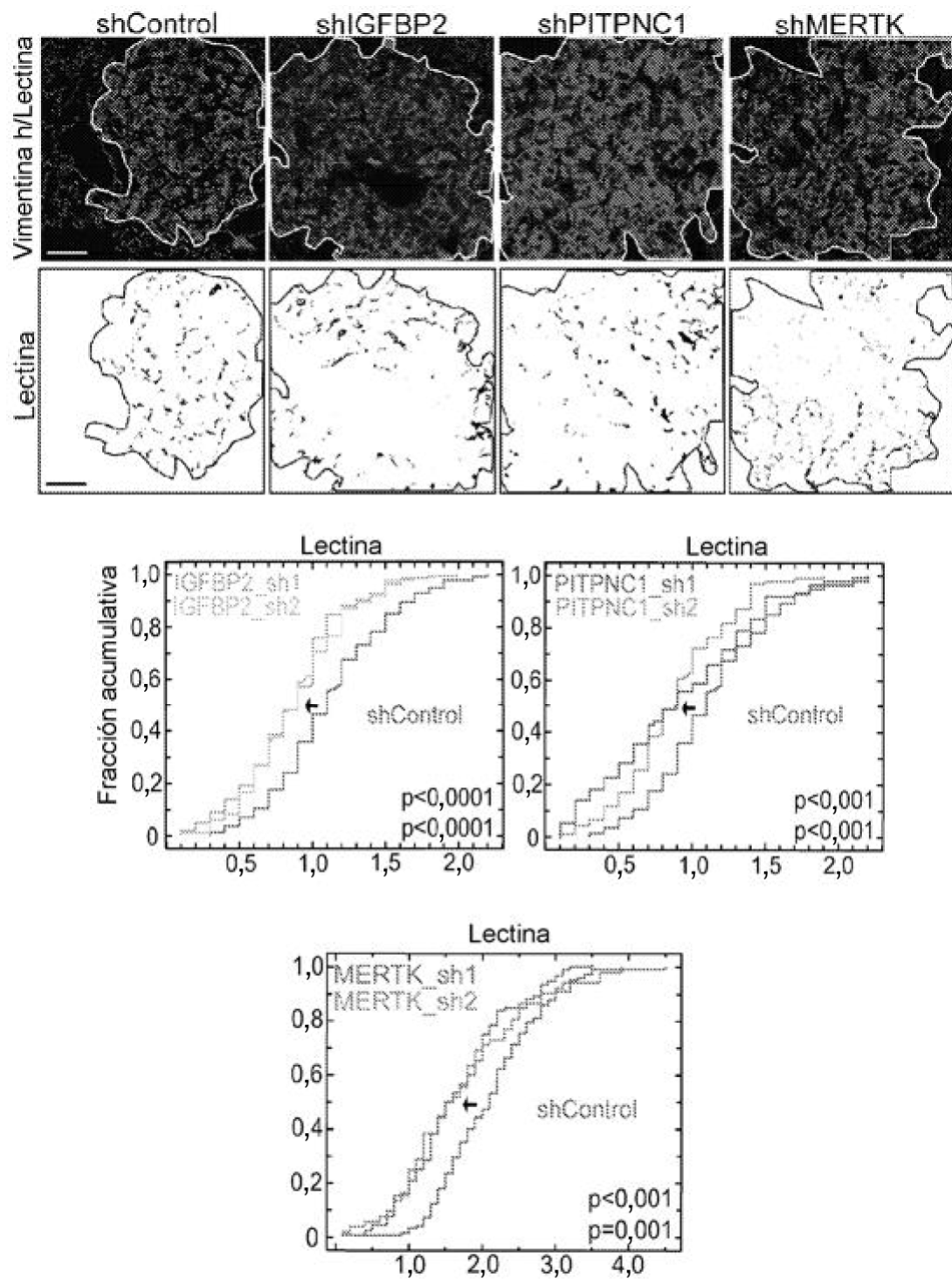


FIG. 17

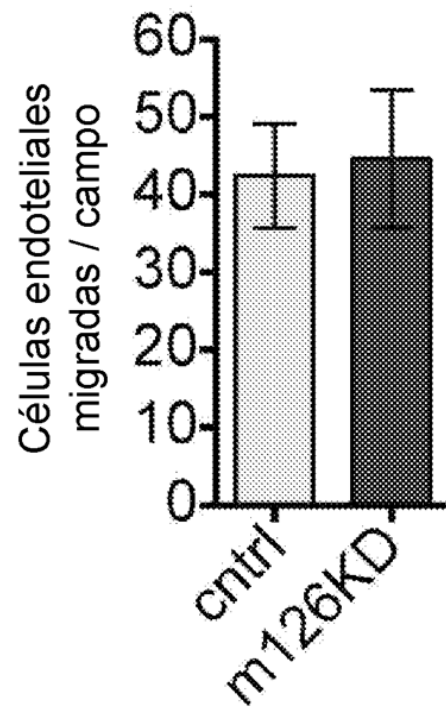


FIG. 18

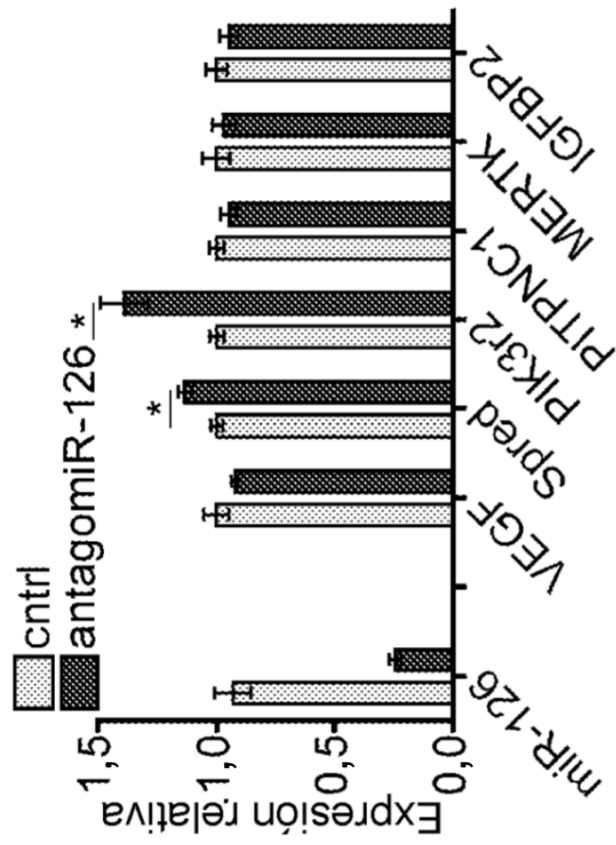
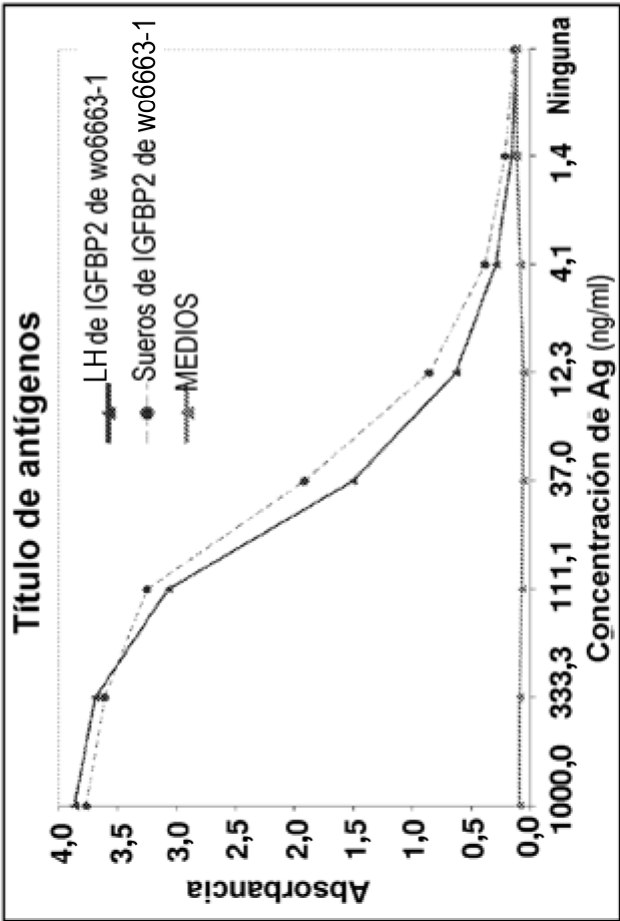


FIG. 19

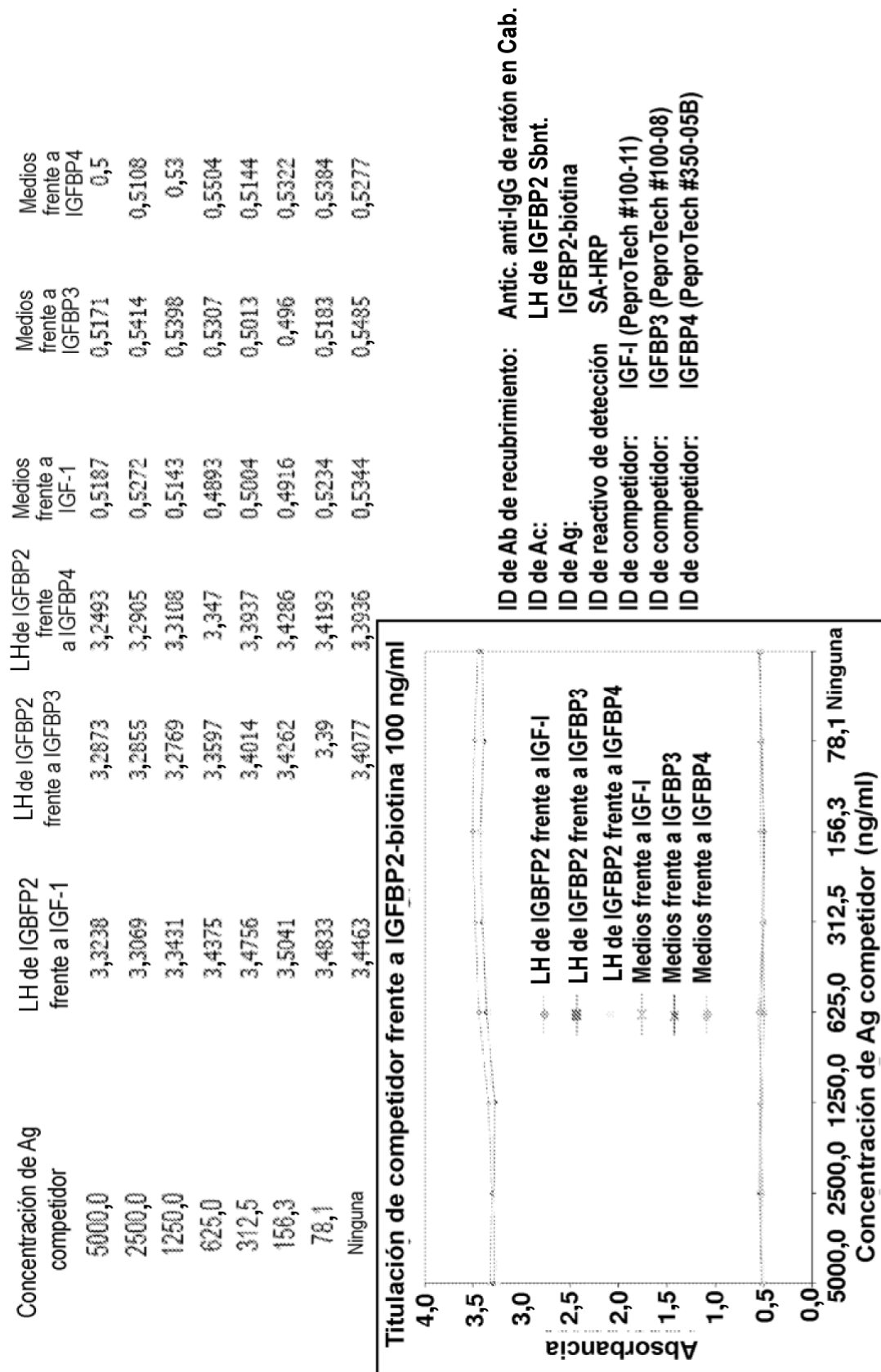
Concentración de Ag	LH de IGFBP2 de wo6663-1	Sueros de IGFBP2 de wo6663-1	MEDIOS PROMEDIO	MEDIOS HT	MEDIOS HT
1000,0	3,8654	3,762	0,0888	0,075	0,1026
333,3	3,6839	3,6066	0,0893	0,0623	0,1162
111,1	3,0672	3,2468	0,0697	0,0564	0,0829
37,0	1,5044	1,9111	0,0631	0,0627	0,0635
12,3	0,6277	0,8578	0,0567	0,0576	0,0557
4,1	0,2915	0,3796	0,0863	0,0758	0,0968
1,4	0,1556	0,2108	0,1110	0,1101	0,1119
Ninguna	0,1196	0,1322	0,1186	0,1228	0,1143



ID de Ac de recubr.: Antic. anti-IgG de ratón en Cab.
ID de Ac: LH de IGFBP2 Sbnt.
ID de Ac: Sueros de ratón de IGFBP2 m1-m3 día 70
ID de Ag: IGFBP2-biotina
ID de reactivo de detección: SA-HRP

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

FIG. 20



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

FIG. 21

Designación T.C.	Pocillo T.C.	D.O. por ELISA frente a IGFBP2- Biotina	D.O. por ELISA frente a IGFBP2- Biotina + IGF-1	Razón	Designación TC	Pocillo T.C.	D.O. por ELISA frente a IGFBP2- Biotina	D.O. por ELISA frente a IGFBP2- Biotina + IGF-1	Razón
IGFBP2_M1	1B1	0,83	0,59	1,44	IGFBP2_M13	5B5	0,83	0,71	1,17
IGFBP2_M2	1C2	2,53	1,82	1,39	IGFBP2_M14	5F5	2,37	2,09	1,13
IGFBP2_M3	1D9	0,82	0,53	1,54	IGFBP2_M15	5F5	0,72	0,60	1,21
IGFBP2_M4	1A11	0,90	0,64	1,41	IGFBP2_M16	5D7	0,84	0,74	1,14
IGFBP2_M5	1E11	0,76	0,52	1,46	IGFBP2_M17	5A8	0,81	0,66	1,24
IGFBP2_M6	2F6	0,80	0,61	1,30	IGFBP2_M18	6D2	0,84	0,70	1,19
IGFBP2_M7	2H7	2,42	2,09	1,16	IGFBP2_M19	6D4	2,39	2,12	1,13
IGFBP2_M8	3D2	0,10	0,38	0,28	IGFBP2_M20	6H9	2,43	2,16	1,12
IGFBP2_M9	3B3	2,27	1,96	1,14		6C12	2,36	2,11	1,12
IGFBP2_M10	3A4	1,65	0,73	2,26		7E4	0,76	0,66	1,15
IGFBP2_M11	3E7	0,58	0,09	5,98		7G4	0,73	0,61	1,20
IGFBP2_M12	4H2	2,43	2,14	1,14		7A7	0,82	0,70	1,16
	4E4	0,71	0,60	1,19	IGFBP2_M17	7E7	0,78	0,61	1,27
	4C8	0,85	0,72	1,17		7E9	0,72	0,62	1,16
	4D8	0,72	0,61	1,19		8H3	0,87	0,83	1,05
	4A9	0,75	0,59	1,27		8A10	0,74	0,74	1,00
	4F10	0,86	0,70	1,22	IGFBP2_M18	8C10	0,56	0,80	0,70
	5B1	0,83	0,70	1,18	IGFBP2_M19	10H1	0,89	0,76	1,17
	5D1	0,89	0,82	1,08	IGFBP2_M20	10E3	0,76	0,66	1,14
	5F2	0,72	0,64	1,13		10A5	2,42	2,22	1,09
	5H2	0,76	0,68	1,13		10F8	0,86	0,79	1,08
	5H4	0,75	0,64	1,17		10C9	0,82	0,74	1,12

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

Controles	D.O. promedio por ELISA frente a IGFBP2-Biotina + IGF-1	D.O. promedio	ID de Ac de recubr.: Antic. anti-IgG de ratón en Cab. (espec. para Fc)
Control positivo	2,43	2,17	ID de Ac: Sobrenadante de biblioteca de hibridomas de IGFBP2
Control positivo	2,76	2,45	ID de Ac: Sueros de ratón de IGFBP2 m1-m3
Control negativo	0,11	0,10	ID de Ag: IGFBP2-Biotina
			ID de Ag comp.: IGF-I (Pepro Tech #100-110)
			ID de reactivo de detección: SA-HRP

FIG. 22

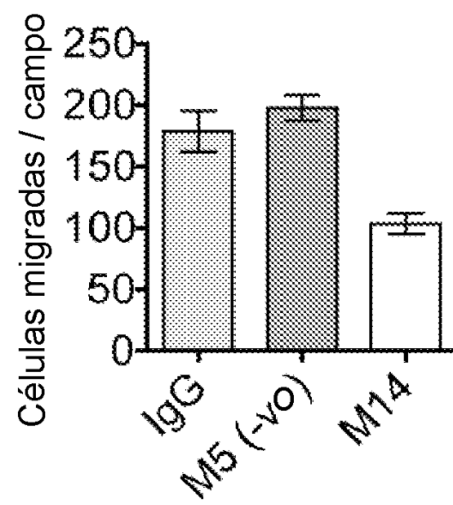


FIG. 23

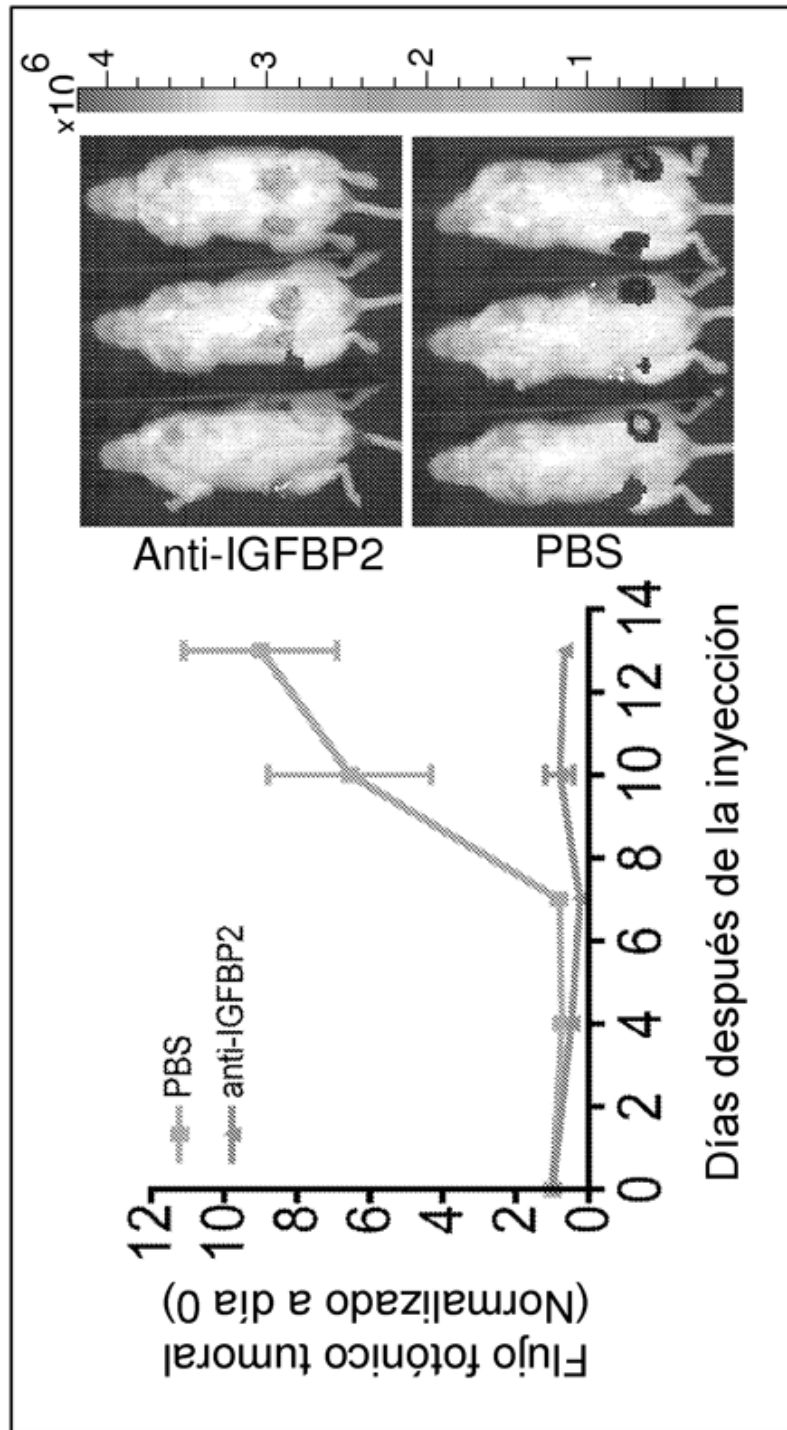


FIG. 24