



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 500**

51 Int. Cl.:
C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04715568 .4**

96 Fecha de presentación : **27.02.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1599586**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.11.2005**

54 Título: **ARN interferente para el gen ZNFN3A1 como método para inhibir el crecimiento de células cancerosas.**

30 Prioridad: **28.02.2003 US 450644 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.08.2011

73 Titular/es: **ONCOTHERAPY SCIENCE, Inc.**
2-1, Sakado 3-chome
Takatsu-ku, Kawwasaki-shi
Kanagawa 213-0012, JP

72 Inventor/es: **Nakamura, Yusuke y**
Furukawa, Yoichi

74 Agente: **Arias Sanz, Juan**

ES 2 363 500 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

ARN interferente para el gen ZNFN3A1 como método para inhibir el crecimiento de células cancerosas.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere al campo de la ciencia biológica, más específicamente al campo de investigación en cáncer. En particular, la presente invención se refiere a una composición que comprende un ARN interferente pequeño (ARNip) de ZNFN3A1.

10

Antecedentes técnicos

El carcinoma hepatocelular (CHC) está entre los cinco tipos más frecuentes de cánceres y es la cuarta causa principal de muerte por cáncer en el mundo. Aunque recientes avances médicos han hecho gran progreso en diagnosticar la enfermedad, un gran número de pacientes con CHC son aún diagnosticados en fases avanzadas. La mayoría de los pacientes no se curan por resección quirúrgica debido a la grave disfunción del hígado, tumores expandidos y/o múltiples, o alta incidencia de recaída. Por tanto el desarrollo de fármacos de gran eficacia quimioterapéutica y estrategias preventivas son asuntos de interés apremiante.

15

20 **Divulgación de la invención**

La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que ARN interferentes pequeños (ARNip) selectivos para ZNFN3A1 son eficaces para inhibir el crecimiento celular de varias células cancerosas, incluyendo las implicadas en CHC.

25

La invención proporciona métodos para inhibir el crecimiento celular. Entre los métodos proporcionados están los que comprenden poner en contacto una célula con una composición que comprende un ARN interferente pequeño (ARNip) de ZNFN3A1. La invención también proporciona métodos para inhibir el crecimiento de células tumorales. Tales métodos incluyen el uso de una composición que comprende un ARN interferente pequeño (ARNip) de ZNFN3A1. Otro aspecto de la invención proporciona métodos para inhibir la expresión del gen ZNFN3A1 en una célula de una muestra biológica. La expresión del gen se puede inhibir mediante la introducción de una molécula de ácido ribonucleico (ARN) bicatenario en la célula en una cantidad suficiente para inhibir la expresión del gen ZNFN3A1. Otro aspecto de la invención se refiere a productos que incluyen secuencias de ácido nucleico y vectores así como composiciones que los comprenden, útiles, por ejemplo, en los métodos proporcionados. Entre los productos proporcionados están moléculas de ARNip que tienen la propiedad de inhibir la expresión del gen ZNFN3A1 cuando se introducen en una célula que expresa dicho gen. Entre tales moléculas están las que comprenden una hebra sentido y una hebra antisentido, en donde la hebra sentido comprende una secuencia de ribonucleótidos que corresponde a una secuencia diana de ZNFN3A1, y en donde la hebra antisentido comprende una secuencia de ribonucleótidos que es complementaria a dicha hebra sentido. Las hebras sentido y antisentido de la molécula hibridan entre sí para formar una molécula bicatenaria.

30

35

40

Como se usa aquí el término "organismo" se refiere a cualquier entidad viva que comprende al menos una célula. Un organismo vivo puede ser tan simple como, por ejemplo, un única célula eucariota o tan complejo como un mamífero, incluyendo un ser humano.

45

Como se usa aquí, el término "muestra biológica" se refiere a un organismo entero o un subconjunto de sus tejidos, células o partes componentes (por ejemplo, líquidos corporales, incluyendo pero no limitados a sangre, moco, líquido linfático, líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, saliva, líquido amniótico, sangre de cordón amniótico, orina, líquido vaginal y semen). "Muestra biológica" se refiere además a un homogenado, lisado, extracto, cultivo celular o cultivo de tejido preparado de un organismo entero o un subconjunto de sus células, tejidos o partes componentes, o una fracción o parte de los mismos. Por último, "muestra biológica" se refiere a un medio, tal como un caldo nutriente o gel en el que se ha propagado un organismo, que contiene componentes celulares, tales como proteínas o polinucleótidos.

50

55

La invención presenta métodos de inhibir el crecimiento celular. El crecimiento celular se inhibe poniendo en contacto una célula con una composición de un ARN interferente pequeño (ARNip) de ZNFN3A1. ZNFN3A1 es una proteína con dedos de zinc que se sobreexpresa en tumores tales como carcinoma hepatocelular o adenocarcinoma colorrectal. El crecimiento de la célula que expresa ZNFN3A1 se puede inhibir por la presente invención. La célula se pone en contacto además con un agente potenciador de la transfección. La célula se suministra *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. El sujeto es un mamífero, por ejemplo, un ser humano, un primate no humano, ratón, rata, perro, gato, caballo o vaca. La célula es una célula hepática o una célula de colon. De forma alternativa, la célula es una célula tumoral (es decir, célula cancerosa) tal como una célula de cáncer colorrectal o una célula de cáncer de hígado. Por ejemplo, la célula es una célula de adenocarcinoma colorrectal o una célula de carcinoma hepatocelular. Mediante inhibir el crecimiento celular se quiere decir que la célula tratada prolifera a una velocidad menor o tiene una viabilidad disminuida que una célula sin tratar. El crecimiento celular se mide mediante ensayos de proliferación conocidos en la técnica.

60

65

Mediante el término “ARNip” se quiere decir una molécula bicatenaria de ARN que previene la traducción de un ARNm diana. Se usan técnicas estándar de introducir ARNip en la célula, incluyendo esas en las que el ADN es un molde partir del que se transcribe ARN. El ARNip incluye una secuencia de ácido nucleico de ZNFN3A1 sentido, una
 5 secuencia de ácido nucleico de ZNFN3A1 antisentido o ambas. El ARNip se construye de modo que un único transcrito tiene las secuencias tanto sentido como antisentido complementaria del gen diana, por ejemplo, una horquilla.

El método se usa para alterar la expresión génica en una célula en la que la expresión de ZNFN3A1 está
 10 aumentada, por ejemplo, como resultado de transformación maligna de las células. La unión del ARNip a un transcrito de ZNFN3A1 en la célula diana produce una reducción en la producción de ZNFN3A1 por la célula. La longitud del oligonucleótido es al menos de 10 nucleótidos y puede ser tan larga como el transcrito ZNFN3A1 natural. Preferiblemente, el oligonucleótido tiene de 19-25 nucleótidos de longitud. Lo más preferiblemente, el oligonucleótido tiene menos de 75, 50 o 25 nucleótidos de longitud. Ejemplos de oligonucleótidos ARNip de
 15 ZNFN3A1 que inhiben la expresión de ZNFN3A1 en células de mamífero incluyen oligonucleótidos que contienen secuencias diana, por ejemplo, los nucleótidos 451-471, 532-552, 623-643, 625-645, 636-656, 726-746, 923-943, 1065-1085 y 1258-1278 de SEQ ID NO: 1.

Se conocen métodos para diseñar ARN bicatenarios que tengan la capacidad de inhibir la expresión génica en una
 20 célula diana. (Véase, por ejemplo, la patente de EE UU No. 6.506.559). Por ejemplo, un programa de ordenador para diseñar ARNip está disponible del sitio web a Ambion (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html).

El programa de ordenador selecciona secuencias de nucleótidos para la síntesis de ARNip basado en el siguiente
 25 protocolo.

Selección de sitios diana de ARNip

1. Empezando con el codón de iniciación AUG del transcrito, rastrear en dirección 3' para secuencias de
 30 dinucleótidos AA. Registrar la aparición de cada AA y los 19 nucleótidos adyacentes en 3' como potenciales sitios diana del ARNip. Tuschl y col. recomiendan en contra de diseñar ARNip en las regiones 5' y 3' no traducidas (UTR) y regiones cerca del codón de iniciación (en 75 bases) ya que pueden ser más ricas en sitios de unión de proteínas reguladoras. Las proteínas de unión a las UTR y/o complejos de iniciación de la traducción pueden interferir con la unión del complejo ARNip endonucleasa.
2. Comparar los potenciales sitios diana con la base de datos genómica apropiada (humana, de ratón, rata, etc.)
 35 y eliminar de consideración cualquier secuencia diana con homología significativa a otras secuencias codificantes. Se sugiere usar BLAST, que se puede encontrar en el servidor del NCBI en: www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
3. Seleccionar secuencias dianas cualificadas para síntesis. Es típico seleccionar varias secuencias diana en la
 40 longitud del gen para evaluar.

También se incluyen en la invención polinucleótidos aislados que incluyen las secuencias de ácido nucleico de
 45 secuencias diana, por ejemplo, los nucleótidos 451-471 (SEQ ID NO: 58), 532-552 (SEQ ID NO: 60), 623-643 (SEQ ID NO: 61), 625-645 (SEQ ID NO: 62), 636-656 (SEQ ID NO: 63), 726-746 (SEQ ID NO: 64), 923-943 (SEQ ID NO: 66), 1065-1085 (SEQ ID NO: 68) y 1258-1278 (SEQ ID NO: 69) de SEQ ID NO: 1 o un polinucleótido que es complementario a la secuencia de ácido nucleico de los nucleótidos 451-471, 532-552, 623-643, 625-645, 636-656, 726-746, 923-943, 1065-1085 y 1258-1278 de SEQ ID NO: 1. Como se usa aquí, un “ácido nucleico aislado” es un ácido nucleico extraído de su entorno original (por ejemplo, el medio ambiente natural si se da de forma natural) y
 50 por tanto, alterado de forma sintética de su estado natural. En la presente invención, ácido nucleico aislado incluye ADN, ARN y derivados de los mismos. Cuando el ácido nucleico aislado es ARN o derivados del mismo, la base “t” se debe sustituir con “u” en las secuencias de nucleótidos. Como se usa aquí, el término “complementario” se refiere a apareamiento de bases de Watson-Crick o Hoogsteen entre unidades de nucleótidos de un polinucleótido, y el término “unión” significa la interacción física o química entre dos polipéptidos o compuestos o polipéptidos o
 55 compuestos asociados o combinaciones de los mismos. Las secuencias de ácido nucleico complementarias hibridan en condiciones apropiadas para formar dúplex estables que contienen pocos o ningún mal emparejamiento. Además, la hebra sentido y la hebra antisentido del nucleótido aislado de la presente invención, pueden formar un nucleótido bicatenario o estructura de horquilla con bucle por la hibridación. En una forma de realización preferida, tales dúplex contienen no más de 1 mal emparejamiento por cada 10 emparejamientos. En una forma de realización especialmente preferida, donde las hebras del dúplex son totalmente complementarias, tales dúplex no contienen malos emparejamientos. El polinucleótido tiene menos de 1622 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, el polinucleótido tiene menos de 500, 200 o 75 nucleótidos de longitud. También se incluye en la invención un vector que contiene uno o más de los ácidos nucleicos descritos aquí, y una célula que contiene los vectores. Los ácidos nucleicos aislados de la presente invención son útiles para ARNip contra ZNFN3A1 o ADN que codifica el ARNip.
 65 Cuando se usan los ácidos nucleicos para ARNip o ADN codificante del mismo, la hebra sentido es preferiblemente más larga de 19 nucleótidos y más preferiblemente más larga de 21 nucleótidos.

La invención se basa en parte en el descubrimiento de que el gen que codifica una proteína con dedos de zinc, ZNFN3A1 se sobreexpresa en carcinoma hepatocelular (CHC) comparado con tejido hepático no canceroso. El ADNc de ZNFN3A tiene 1622 nucleótidos de longitud. La ORF de 1284 codifica una proteína de 428 aminoácidos con un motivo de dedos de zinc. Las secuencias de ácido nucleico y polipéptido de ZNFN3A1 se muestran en las tablas 1 y 2. En la tabla 1, la región sin traducir 5' y 3' se muestra en cursiva, los codones de inicio y terminación están en negrita. La localización subcelular de la proteína ZNFN3A1 se altera durante la progresión del ciclo celular y por la densidad de células cultivadas. La proteína ZNFN3A1 se acumula en el núcleo cuando las células están en fase S de media a tardía o cultivadas en condiciones dispersas. Mientras que, la proteína ZNFN3A1 se localiza en el citoplasma así como en el núcleo cuando las células están en otras fases del ciclo celular o han crecido en una condición densa. ZNFN3A1 forma un complejo ternario con la proteína KIAA0054 y la ARN polimerasa II *in vivo*, que activa la transcripción de genes posteriores incluyendo receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) mediante unión directa del complejo con un elemento de "5'-CCCTCC-3'" en la región flanqueante 5'.

Tabla 1 Secuencia de ácido nucleico de ZNFN3A1 (SEQ ID NO: 1)

<i>gtgcgcgcag</i>	<i>ggcgcaggcg</i>	<i>cgcggtccc</i>	<i>ggcagcccg</i>	<i>gagacgccg</i>	<i>ctgctgacg</i>	60
cggttagccg	tctgaggtgc	cggagctgcg	ggagg atg	gag ccg ctg aag gtg		113
gaa aag ttc gca acc gcc aac agg gga aac ggg ctg cgc gcc gtg acc						161
ccg ctg cgc ccc gga gag cta ctc ttc cgc tcg gat ccc ttg gcg tac						209
acg gtg tgc aag ggg agt cgt ggc gtc gtc tgc gac cgc tgc ctt ctc						257
ggg aag gaa aag ctg atg cga tgc tct cag tgc cgc gtc gcc aaa tac						305
tgt agt gct aag tgt cag aaa aaa gct tgg cca gac cac aag cgg gaa						353
tgc aaa tgc ctt aaa agc tgc aaa ccc aga tat cct cca gac tcc gtt						401
cga ctt ctt ggc aga gtt gtc ttc aaa ctt atg gat gga gca cct tca						449
gaa tca gag aag ctt tac tca ttt tat gat ctg gag tca aat att aac						497
aaa ctg act gaa gat aag aaa gag ggc ctc agg caa ctc gta atg aca						545
ttt caa cat ttc atg aga gaa gaa ata cag gat gcc tct cag ctg cca						593
cct gcc ttt gac ctt ttt gaa gcc ttt gca aaa gtg atc tgc aac tct						641
ttc acc atc tgt aat gcg gag atg cag gaa gtt ggt gtt ggc cta tat						689
ccc agt atc tct ttg ctc aat cac agc tgt gac ccc aac tgt tcg att						737
gtg ttc aat ggg ccc cac ctc tta ctg cga gca gtc cga gac atc gag						785
gtg gga gag gag ctc acc atc tgc tac ctg gat atg ctg atg acc agt						833
gag gag cgc cgg aag cag ctg agg gac cag tac tgc ttt gaa tgt gac						881
tgt ttc cgt tgc caa acc cag gac aag gat gct gat atg cta act ggt						929
gat gag caa gta tgg aag gaa gtt caa gaa tcc ctg aaa aaa att gaa						977
gaa ctg aag gca cac tgg aag tgg gag cag gtt ctg gcc atg tgc cag						1025
gcg atc ata agc agc aat tct gaa cgg ctt ccc gat atc aac atc tac						1073
cag ctg aag gtg ctc gac tgc gcc atg gat gcc tgc atc aac ctc ggc						1121
ctg ttg gag gaa gcc ttg ttc tat ggt act cgg acc atg gag cca tac						1169
agg att ttt ttc cca gga agc cat ccc gtc aga ggg gtt caa gtg atg						1217
aaa gtt ggc aaa ctg cag cta cat caa ggc atg ttt ccc caa gca atg						1265
aag aat ctg aga ctg gct ttt gat att atg aga gtg aca cat ggc aga						1313
gaa cac agc ctg att gaa gat ttg att cta ctt tta gaa gaa tgc gac						1361
gcc aac atc aga gca tcc taa ggaacgcag tcagagggaa atacggcgtg						1412
<i>tgtctttgtt</i>	<i>gaatgcctta</i>	<i>ttgaggtcac</i>	<i>acactctatg</i>	<i>ctttgttagc</i>	<i>tgtgtgaacc</i>	1472
<i>tctcttattg</i>	<i>gaaattctgt</i>	<i>tccgtgtttg</i>	<i>tgtaggtaaa</i>	<i>taaaggcaga</i>	<i>catggtttgc</i>	1532
<i>aaaccacaag</i>	<i>aatcattagt</i>	<i>tgtagagaag</i>	<i>cacgattata</i>	<i>ataaattcaa</i>	<i>aacatttgggt</i>	1592
<i>tgaggatgcc</i>	<i>aaaaaaaaaa</i>	<i>aaaaaaaaaa</i>				1622

15

Tabla 2 Secuencia polipeptídica de ZNFN3A1 (SEQ ID NO: 2)

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

Asp	Met	Leu	Met	Thr	Ser	Glu	Glu	Arg	Arg	Lys	Gln	Leu	Arg	Asp	Gln	
				245					250					255		
Tyr	Cys	Phe	Glu	Cys	Asp	Cys	Phe	Arg	Cys	Gln	Thr	Gln	Asp	Lys	Asp	
			260					265					270			
Ala	Asp	Met	Leu	Thr	Gly	Asp	Glu	Gln	Val	Trp	Lys	Glu	Val	Gln	Glu	
		275					280					285				
Ser	Leu	Lys	Lys	Ile	Glu	Glu	Leu	Lys	Ala	His	Trp	Lys	Trp	Glu	Gln	
	290					295					300					
Val	Leu	Ala	Met	Cys	Gln	Ala	Ile	Ile	Ser	Ser	Asn	Ser	Glu	Arg	Leu	
305					310				315						320	
Pro	Asp	Ile	Asn	Ile	Tyr	Gln	Leu	Lys	Val	Leu	Asp	Cys	Ala	Met	Asp	
			325						330						335	
Ala	Cys	Ile	Asn	Leu	Gly	Leu	Leu	Glu	Glu	Ala	Leu	Phe	Tyr	Gly	Thr	
			340					345						350		
Arg	Thr	Met	Glu	Pro	Tyr	Arg	Ile	Phe	Phe	Pro	Gly	Ser	His	Pro	Val	
		355					360					365				
Arg	Gly	Val	Gln	Val	Met	Lys	Val	Gly	Lys	Leu	Gln	Leu	His	Gln	Gly	
	370					375					380					
Met	Phe	Pro	Gln	Ala	Met	Lys	Asn	Leu	Arg	Leu	Ala	Phe	Asp	Ile	Met	
385					390					395					400	
Arg	Val	Thr	His	Gly	Arg	Glu	His	Ser	Leu	Ile	Glu	Asp	Leu	Ile	Leu	
				405					410					415		
Leu	Leu	Glu	Glu	Cys	Asp	Ala	Asn	Ile	Arg	Ala	Ser					
			420					425								

La expresión exógena de ZNFN3A1 en células NIH3T3 produjo crecimiento celular aumentado. Por el contrario, la supresión de su expresión con S-oligonucleótidos antisentido produjo una inhibición de crecimiento de células de hepatoma.

Métodos de inhibición del crecimiento celular

La presente invención se refiere a la inhibición del crecimiento celular, por ejemplo, crecimiento de células cancerosas inhibiendo la expresión de ZNFN3A1. La expresión de ZNFN3A1 se inhibe por ARN interferente pequeño (ARNip) que se dirige específicamente al gen ZNFN3A1. Una diana de ZNFN3A1 incluye, por ejemplo, los nucleótidos 451-471, 532-552, 623-643, 625-645, 636-656, 726-746, 923-943, 1065-1085 y 1258-1278 de SEQ ID NO: 1.

En células de no mamífero, se ha mostrado que el ARN bicatenario (ARNbc) ejerce un efecto de silenciamiento fuerte y específico sobre la expresión génica, que se denomina interferencia de ARN (ARNi) (3). El ARNbc se procesa a ARNbc de 20-23 nucleótidos denominado ARN interferente pequeño (ARNip) por una enzima que contiene un motivo RNasa III. El ARNip se dirige específicamente al ARNm complementario con un complejo nucleasa multicomponente (4, 5). En células de mamífero, se ha mostrado que ARNip compuesto de ARNbc de 20- o 21-meros con 19 nucleótidos complementarios y dímeros 3' terminales no complementarios de timidina o uridina tienen un efecto específico de disminución de un gen sin inducir cambios globales en la expresión génica (6). Además, plásmidos que contienen promotor de ARN nuclear pequeño (ARNnp) U6 o ARN polimerasa III H1 producen de forma eficaz tal reclutamiento de ARN pequeño de clase de tipo III de ARN polimerasa III y por tanto pueden suprimir de forma constitutiva su ARNm diana (7,8).

Se construyeron 13 plásmidos de expresión diferentes para expresar ARNip-ZNFN3A1 horquilla con bucle (véase el ejemplo 2). Se probó la capacidad de los plásmidos de inhibir el crecimiento celular. Cuatro plásmidos (psiU6BX-ZNFN3A1-4, -8, -12 y -13) suprimieron de forma marcada y cinco plásmidos (psiU6BX-ZNFN3A1-2, -5, -6, -7 y -10) de forma moderada la expresión de ZNFN3A1 endógena, mientras que los restantes cuatro plásmidos (psiU6BX-

ZNFN3A1-1, -3, -9 y -11) mostraron poco o ningún efecto sobre la expresión (figura 1). Varias células de cáncer colorrectal y de hepatoma humanos transfectadas con psiU6BX-siZNFN3A1-12, mostraron un número reducido de células supervivientes comparado con plásmidos control. El análisis por FACS reveló que su muerte era debida a apoptosis.

5 El crecimiento de células se inhibe al poner en contacto una célula con una composición que contiene un ARNip de ZNFN3A1. La célula se pone en contacto además con un agente de transfección. En la técnica se conocen agentes de transfección adecuados. Mediante inhibición del crecimiento celular se quiere decir que la célula prolifera a una velocidad menor o tiene viabilidad disminuida comparada con una célula no expuesta a la composición. El crecimiento celular se mide por métodos conocidos en la técnica, tal como el ensayo de proliferación celular con MTT.

15 El ARNip-ZNFN3A1 se dirige a una única secuencia diana del gen ZNFN3A1. De forma alternativa, el ARNip se dirige a múltiples secuencias diana del gen ZNFN3A1. Por ejemplo, la composición contiene ARNip-ZNFN3A1 dirigido a dos, tres, cuatro o cinco o más secuencias diana de ZNFN3A1. Mediante secuencia diana de ZNFN3A1 se quiere decir una secuencia de nucleótidos que es idéntica a una parte del gen ZNFN3A1. La secuencia diana puede incluir la región 5' sin traducir (UT), el marco abierto de lectura (ORF) o la región 3' sin traducir del gen ZNFN3A1 humano. De forma alternativa, el ARNip es una secuencia de ácido nucleico complementaria a un modulador anterior o posterior de la expresión del gen ZNFN3A1. Ejemplos de moduladores anteriores o posteriores incluyen, un factor de transcripción que se une a promotor del gen ZNFN3A1, una quinasa o fosfatasa que interacciona con el polipéptido ZNFN3A1, un promotor o potenciador de ZNFN3A1.

25 El ARNip-ZNFN3A1 que hibrida con el ARNm diana disminuye o inhibe la producción del producto polipeptídico ZNFN3A1 codificado por el gen ZNFN3A1 mediante asociación con el transcrito de ARNm normalmente monocatenario, interfiriendo así con la traducción y por tanto, la expresión de la proteína. El ARNip tiene menos de 500, 200, 100, 50 o 25 nucleótidos de longitud. Preferiblemente, el ARNip tiene de 19-25 nucleótidos de longitud. Secuencias de ácidos nucleico de ejemplo para la producción de ARNip-ZNFN3A1 incluyen las secuencias de nucleótidos 451-471 (SEQ ID NO: 58), 532-552 (SEQ ID NO: 60), 623-643 (SEQ ID NO: 61), 625-645 (SEQ ID NO: 62), 636-656 (SEQ ID NO: 63), 726-746 (SEQ ID NO: 64), 923-943 (SEQ ID NO: 66), 1065-1085 (SEQ ID NO: 68) o 1258-1278 (SEQ ID NO: 69) de SEQ ID NO: 1 como secuencia diana. Además, para aumentar la actividad de inhibición del ARNip, se puede añadir el nucleótido "u" al extremo 3' de la hebra antisentido de la secuencia diana. El número de "u"es que se van a añadir es de al menos 2, en general de 2 a 10, preferiblemente de 2 a 5. Las "u"es añadidas forman una hebra individual en el extremo 3' de la hebra antisentido del ARNip.

35 La célula es cualquier célula que expresa o sobreexpresa ZNFN3A1. La célula es una célula hepática o una célula epitelial tal como una célula de colon. De forma alternativa, la célula es una célula tumoral tal como un carcinoma, adenocarcinoma, blastoma, leucemia, mieloma o sarcoma. La célula es una célula de carcinoma hepatocelular o de adenocarcinoma colorrectal.

40 Un ARNip-ZNFN3A1 se introduce directamente en las células en una forma que es capaz de unirse a los transcritos de ARNm. De forma alternativa, el ADN que codifica el ARNip-ZNFN3A1 está en un vector.

45 Los vectores se producen, por ejemplo, clonando una secuencia diana de ZNFN3A1 en un vector de expresión operativamente unido a secuencias reguladoras que flanquean la secuencia ZNFN3A1 de una manera que permita la expresión (por transcripción de la molécula de ADN) de ambas hebras (Lee, N.S., Dohjima, T., Bauer, G., Li, H., Li, M.-J., Ehsani, A., Salvaterra, P. y Rossi, J. (2002) Expression of small interfering RNAs targeted against HV-1 rev transcripts in human cells. Nature Biotechnology 20: 500-505). Una molécula de ARN que es antisentido al ARNm de ZNFN3A1 se transcribe por un primer promotor (por ejemplo, una secuencia promotora en 3' del ADN clonado) y una molécula de ARN que es la hebra sentido para el ARNm de ZNFN3A1 se transcribe por un segundo promotor (por ejemplo, una secuencia promotora en 5' del ADN clonado). Las hebras sentido y antisentido hibridan *in vivo* para generar construcciones ARNip para silenciar el gen ZNFN3A1. De forma alternativa, se utilizan dos construcciones para crear las hebras sentido y antisentido de una construcción ARNip. El ZNFN3A1 clonado puede codificar una construcción que tenga estructura secundaria, por ejemplo, horquillas, en donde un único transcrito tiene las secuencias tanto sentido como antisentido complementaria del gen diana.

55 Se puede localizar una secuencia bucle que consista en una secuencia arbitraria de nucleótidos entre la secuencia sentido y antisentido para formar la estructura de horquilla con bucle. De esta manera, la presente invención también proporciona un ARNip que tiene la fórmula general 5'-[A]-[B]-[A']-3', en donde [A] es una secuencia de ribonucleótidos que corresponde a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en nucleótidos 451-471 (SEQ ID NO: 58), 532-552 (SEQ ID NO: 60), 623-643 (SEQ ID NO: 61), 625-645 (SEQ ID NO: 62), 636-656 (SEQ ID NO: 63), 726-746 (SEQ ID NO: 64), 923-943 (SEQ ID NO: 66), 1065-1085 (SEQ ID NO: 68) o 1258-1278 (SEQ ID NO: 69) de SEQ ID NO: 1, [B] es una secuencia de ribonucleótidos que consiste en 3 a 23 nucleótidos, y [A'] es una secuencia de ribonucleótidos que consiste en la secuencia complementaria a [A].

65

La región [A] híbrida con [A'] y entonces se forma un bucle que consiste en la región [B]. La secuencia bucle puede tener preferiblemente de 3 a 23 nucleótidos de longitud. La secuencia bucle, por ejemplo, se puede seleccionar del grupo que consiste en las siguientes secuencias (http://www.ambion.com/techlib/tb/tb_506.html). Además, una secuencia bucle que consiste en 23 nucleótidos también proporciona ARNip activo (Jacque, J.-M., Triques, K. y Stevenson, M. (2002) Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 418: 435-438).

AUG: Sui, G., Soohoo, C., Affar, E.B., Gay, F., Shi, Y., Forrester, W.C. y Shi, Y. (2002) A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(8): 5515-5520.

CCC, CCACC o CCACACC: Paul, C.P., Good, P.D., Winer, I. y Engelke, D.R. (2002) Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nature Biotechnology* 20: 505-508.

UUCG: Lee, N.S., Dohjima, T., Bauer, G., Li, H., Li, M.-J., Ehsani, A., Salvaterra, P. y Rossi, J. (2002) Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nature Biotechnology* 20: 500-505.

CTCGAG o AAGCUU: Editores de *Nature Cell Biology* (2003) Whither RNAi? *Nat Cell Biol.* 5:489-490.

UUCAAGAGA: Yu, J.-Y., DeRuiter, S.L. y Turner, D.L. (2002) RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99(9): 6047-6052.

Por ejemplo, a continuación se muestran los ARNip preferibles que tienen estructura de horquilla con bucle de la presente invención. En la siguiente estructura, la secuencia bucle se puede seleccionar del grupo que consiste en AUG, CCC, UUCG, CCACC, CTCGAG, AAGCUU, CCACACC y UUCAAGAGA. La secuencia bucle preferida es UUCAAGAGA ("ttcaagaga" en ADN).

aacagagaagcuuuacucau-[B]-augaguaaagcuucugauu (para la secuencia diana de SEQ ID NO:58)
 aacucguaaagacauuucaac-[B]-guugaaaugcaguacgaguu (para la secuencia diana de SEQ ID NO: 60)
 aaaagugaucugcaacucuuu-[B]-aaagaguugcagaucauuuu (para la secuencia diana de SEQ ID NO: 61)
 aagugaucugcaacucuuuca-[B]-ugaagaguugcagaucauu (para la secuencia diana de SEQ ID NO: 62)
 aacucuuuacacucuguaau-[B]-auuacagauuggugaagaguu (para la secuencia diana de SEQ ID NO: 63)
 aacuguuuacacucuguaau-[B]-auuacagauuggugaagaguu (para la secuencia diana de SEQ ID NO: 64)
 aacuggugaugagcaaguau-[B]-cauacuugcucauaccaguu (para la secuencia diana de SEQ ID NO: 66)
 aacaucacacagcugaaggug-[B]-cacuucagcugguaguu (para la secuencia diana de SEQ ID NO: 68)
 aagcaugaagaucugagac-[B]-gucucagauucuucauuguu (para la secuencia diana de SEQ ID NO: 69).

Las secuencias reguladoras que flanquean la secuencia ZNFN3A1 son idénticas o son diferentes, de modo que su expresión se puede modular de forma independiente, o de una forma temporal o espacial. Los ARNip se transcriben intracelularmente clonando moldes del gen ZNFN3A1 en un vector que contiene, por ejemplo, una unidad de transcripción de ARN pol III de ARN nuclear pequeño (ARNnp) U6 o el promotor de ARN H1 humano. Para introducir el vector en la célula, se puede usar un agente potenciador de la transfección. FuGENE (Rochediagnostics), Lipofectamin 2000 (Invitrogen), Oligofectamin (Invitrogen) y Nucleofactor (Wako pure Chemical) son útiles como agente potenciador de la transfección.

Se probó la capacidad *in vitro* de oligonucleótidos y oligonucleótidos complementarios a varias partes del ARNm de ZNFN3A1 de disminuir la producción de ZNFN3A1 en células tumorales (por ejemplo, usando la línea celular de carcinoma hepatocelular (CHC) Alexander y HepG2 y la línea de células de cáncer colorrectal HCT116 y SW948) según métodos estándar. Se detecta una reducción en el producto del gen ZNFN3A1 en células puestas en contacto con la composición de ARNip candidato comparado con células cultivadas en ausencia de la composición candidata usando anticuerpos específicos para ZNFN3A1 u otras estrategias de detección. Se prueban luego los efectos inhibidores de las secuencias que disminuyen la producción de ZNFN3A1 en ensayos *in vitro* con células o sin células sobre el crecimiento celular. Las secuencias que inhiben el crecimiento celular en un ensayo *in vivo* con células se prueban en ratas o ratones *in vivo* para confirmar la producción disminuida de ZNFN3A1 y crecimiento tumoral disminuido en animales con neoplasias malignas.

Métodos de tratar tumores malignos

Se tratan pacientes con tumores caracterizados como que sobreexpresan ZNFN3A1 mediante administración de ARNip-ZNFN3A1. Se usa terapia de ARNip para inhibir la expresión de ZNFN3A1 en pacientes que padecen o tienen riesgo de desarrollar, por ejemplo, carcinomas hepatocelulares o cáncer colorrectal. Tales pacientes se identifican por métodos estándar del tipo particular de tumor. El carcinoma hepatocelular se diagnostica por ejemplo, por agrandamiento del hígado, tomografía, ultrasonido o biopsia. El cáncer colorrectal se diagnostica, por ejemplo, por sangre en las heces, colonoscopia, sigmoidoscopia flexible, ensayo CEA, escáner TAC con enema de bario de doble contraste, tomografía o biopsia.

El tratamiento es eficaz si el tratamiento produce beneficio clínico tal como, una reducción en la expresión de ZNFN3A1 o una disminución en el tamaño, prevalencia o potencial metastásico del tumor en el sujeto. Cuando el

tratamiento se aplica de forma profiláctica, “eficaz” significa que el tratamiento retrasa o previene que se formen tumores o previene o alivia un síntoma de síntoma clínico del tumor. La eficacia se determina junto con cualquier método conocido para diagnosticar o tratar el tipo de tumor particular.

5 La terapia de ARNip se lleva a cabo administrando a un paciente un ARNip mediante vectores estándar y/o sistemas de distribución de genes. Los sistemas de distribución de genes adecuados pueden incluir liposomas, sistemas de distribución mediados por receptor o vectores víricos tales como virus del herpes, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados, entre otros. Una reducción en la producción de ZNFN3A1 produce una disminución en la formación de complejos de ZNFN3A1 con la proteína KIAA0054 y ARN polimerasa II o una disminución en la expresión de la
10 proteína ZNFN3A1. Una composición terapéutica de ácido nucleico se formula en un soporte farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica también puede incluir un sistema de distribución de genes como se ha descrito anteriormente. Los soportes farmacéuticamente aceptables son vehículos biológicamente compatibles que son adecuados para la administración a un animal, por ejemplo, solución salina fisiológica. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto es una cantidad que es capaz de producir un resultado médicamente deseable tal como producción reducida de un producto del gen ZNFN3A1, reducción del crecimiento celular, por
15 ejemplo, proliferación, o una reducción en crecimiento tumoral en un animal tratado.

Se puede usar administración parenteral, tal como las vías de administración intravenosa, subcutánea, intramuscular e intraperitoneal, para administrar composiciones de ARNip-ZNFN3A1. Para el tratamiento de tumores hepáticos, la
20 infusión directa en la vena porta es útil.

La dosis para cualquier paciente depende de muchos factores, incluyendo el tamaño del paciente, área de superficie corporal, edad, el ácido nucleico particular que se va a administrar, sexo, tiempo y vía de administración, estado general de salud y otros fármacos que se administran al mismo tiempo. La dosis para la administración intravenosa de ácidos nucleicos es desde aproximadamente 10^6 hasta 10^{22} copias del polinucleótido.
25

Los polinucleótidos se administran por métodos estándar, tal como por inyección en el espacio intersticial de tejidos tales como músculos o piel, introducción en la circulación o en cavidades corporales o por inhalación o insuflación. Los polinucleótidos se inyectan o administran de otra manera al animal con un soporte líquido farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, un soporte líquido, que es acuoso o parcialmente acuoso. Los polinucleótidos se asocian con un liposoma (por ejemplo, un liposoma catiónico o aniónico). El polinucleótido incluye información genética necesaria para la expresión por una célula diana, tal como un promotor.
30

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que el que entiende normalmente un experto en la materia a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí en la práctica o prueba de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. En caso de conflicto, la presente especificación, incluyendo definiciones, controlará. Además, los materiales, métodos y ejemplos son ilustrativos solo y no pretenden ser limitantes.
35

40 **Breve descripción de las figuras**

La figura 1 es una fotografía de una inmunotransferencia que muestra el efecto de los ARNip de ZNFN3A1 en la expresión de ZNFN3A1 exógena en células COS-7.
45

La figura 2 es una fotografía de una inmunotransferencia que muestra la expresión de la proteína ZNFN3A1 en líneas de células de hepatoma y cáncer de colon.

La figura 3 es una fotografía de una inmunotransferencia que muestra el efecto de los ARNip de ZNFN3A1 en la expresión de ZNFN3A1 endógena en células SNU475 transfectadas con los plásmidos psiU6BX-ZNFN3A1-1, -4, -12 o psiU6BX-vacio.
50

Las figuras 4A-B son diagramas de barras que muestran el efecto de los ARNip de ZNFN3A1 sobre el crecimiento celular en células SNU475. Se midió la viabilidad de las células transfectadas mediante ensayo con MTT, 6 (panel A) y 9 (panel B) días después de la transfección.
55

La figura 5 son diagramas de barras que muestran el efecto supresor del crecimiento de los ARNip de ZNFN3A1 en varias células de hepatoma y cáncer de colon humanos. Se midió la viabilidad de las células transfectadas mediante ensayo con MTT, 9 y 12 días después de la transfección.
60

La figura 6 es una ilustración que muestra la muerte celular en respuesta los ARNip de ZNFN3A1 en células SNU475 detectada por análisis de FACS.

Mejor manera de llevar a cabo la invención

La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el ámbito de la invención descrita en las reivindicaciones.

5

[Ejemplo 1] Métodos generalesLíneas celulares y muestras de tejidos

10 Se obtuvieron las líneas de células de hepatoma humano Alexander y HepG2, las líneas de cáncer de colon humano HCT116 y SW948 y la línea de fibroblastos de mono COS7 de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC). La línea de células de hepatoma humano Huh7 se obtuvo de la Colección Japonesa de Biorrecursos de Investigación (JCRB). Las líneas celulares de hepatoma humano SNU398, SNU423, SNU449 y SNU475 se obtuvieron del banco de líneas celulares de Corea. Todas estas células están públicamente disponibles.

15

Todas las líneas celulares se hicieron crecer en monocapas en medios apropiados: medio de Eagle modificado por Dulbecco para Alexander, Huh7, HepG2 y COS7; de McCoy 5A para HCT116; de Leibovitz L-15 para SW948; RPMI1640 para SNU398, SNU423, SNU449 y SNU475 suplementados con suero bovino fetal al 10% y solución de antibióticos/antimicóticos al 1% (Sigma). Todas las células se mantuvieron a 37°C en aire húmedo con CO₂ al 5% (Alexander, Huh7, HepG2, SNU398, SNU423, SNU449, SNU475, HCT116 y COS7) o sin CO₂ (SW948).

20

Clonación de ZNFN3A1

25 La clonación de ZNFN3A1 se hizo mediante PCR usando KOD-plus (TOYOBO). Para la expresión en *E. coli*, la región codificante de ZNFN3A1 se clonó en el sitio EcoRI-KpnI de pET21a. Para la expresión en células de mamífero, la región codificante de ZNFN3A1 se clonó en el sitio EcoRI-KpnI de pcDNA3.1 (+) y (-) (Invitrogen), sitio EcoRI-KpnI de pFLAG y sitio EcoRI-KpnI de pEGFP (Clontech). La región codificante de KIAA0054 se clonó en el sitio EcoRI-XhoI de pCMV-HA (Clontech).

25

Producción de anticuerpo policlonal contra ZNFN3A1

30 Se generó un anticuerpo policlonal de conejo anti-ZNFN3A1. Se amplificó la secuencia codificante completa de ZNFN3A1 mediante reacción de PCR usando ADNc de testículo como molde y se clonó en pET21 a (Novagen). El vector clonado se transfirió en células competentes BL21-CodonPlus® (Stratagene). La proteína recombinante ZNFN3A1 se indujo por IPTG 1,0 mM a 30°C durante 6 horas. Se purificó la proteína de fusión His-ZNFN3A1 usando la resina Pro Bond™ (Invitrogen). Los conejos se inmunizaron diez veces con His-ZNFN3A1. La inmunotransferencia con este anticuerpo policlonal mostró una única banda de 50 kD de ZNFN3A1 etiquetada con FLAG, que era un patrón idéntico al detectado usando anticuerpo monoclonal anti-FLAG (Sigma) (datos no mostrados).

35

Preparación de ARN y RT-PCR

40 Se extrajo ARN total con reactivo Trizol (Life technologies) según el protocolo del fabricante. Se sometieron alícuotas de 10 microgramos de ARN total a transcripción inversa para ADNc monocatenario usando el cebador poli dT₁₂₋₁₈ (Amersham Biosciences) con la transcriptasa inversa Superscript II (Life Technologies). Cada ADNc monocatenario se diluyó para la posterior amplificación por PCR. La RT-PCR estándar se llevó a cabo en un volumen de 20 µl de tampón de PCR (TAKARA) y se amplificó durante 4 minutos a 94°C para desnaturalización, seguido por 20 (para GADPH) o 30 (para ZNFN3A1) ciclos de 94°C durante 30 segundos, 56°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos, en el sistema de PCR Gene Amp 9700 (Perkin-Elmer). Las secuencias de los cebadores fueron como sigue,

45

50 para GADPH

directo 5'-ACAACAGCCTCAAGATCATCAG-3' (SEQ ID NO: 29) e
inverso 5'-GGTCCACCACTGACACGTTG-3' (SEQ ID NO: 30),

para ZNFN3A1

55

directo 5'-TTCCCGATATCAACATCTACCAG-3' (SEQ ID NO: 31) e
inverso 5'-AGTGTGTGACCTCAATAAGGCAT-3' (SEQ ID NO: 32).

Construcción del plásmido psiU6BX660

El fragmento de ADN que codifica el ARN^{lip} se insertó en el hueco en el nucleótido 485-490 como indica (-) en la siguiente secuencia de plásmido (SEQ ID NO: 33).

GACGGATCGGGAGATCTCCGATCCCTATGGTGCACCTCAGTACAATCTGCTCTGGAT
 CCAC TAGTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCGGCTTGGGGATCAGCGTTTGAGTAAGA
 GCCC GCGTCTGAACCTCCGCGCCGCCCGCCCGCCAGTGGAAAGACGCGCAGGCAAAACG
 CACCAGTGCAGGAGCGTGACCGCGCGCCGAGCGCGCCCAAGGTCGGGCAGGAAGAGGG
 CCTATTTCCCATGATTCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAAT
 TAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTA
 ATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTAAAATTTATGTTTAAAATGGACTATCATATGCT
 TACCGTAACTTGAAGTATTTGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGAAAGGACGAAA
 CACC-----TTTTACATCAGGTTGTTTTCTGTTTGGTTTTTTTTTTACACCACGTTT
 ATACGCCGGTGCACGGTTTACCCTGAAAACACCTTTTCATCTACAGGTGATATCTTTTAA
 CACAAATAAAATGTAGTAGTCCTAGGAGACGGAATAGAAGGAGGTGGGGCCTAAGCCGA
 ATTCTGCAGATATCCATCACACTGGCGCCGCTCGAGTGAGGCGGAAAGAACAGCTGGG
 GCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAGCGCGGGCGGGTGTGGTGG
 TTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCT
 TCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCCCGGCTTFCGCCGTCAGCTCTAAATCGGGGGCTCC
 CTTTAGGGTTCCGATTTAGTGTCTTACGGCACCTCCACCCAAAAAACTTCATTAGGGTG
 ATGCTTCAGCTAGTGGCCATCCCCCTGATACACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGT
 CCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTCTTCCAAACTGGACAACACTCAACCTATCTCGE
 TCTATTCTTTTCAATTTATAAGGCATTTTCCCAATTTCCGCCCTATTCGTTAAAAAATGACC
 TGATTTAACAAAAATTAACGCGAATTAATCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGG
 AAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGC

AACCAGGTGTGAAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCT
 CAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCC
 CAGTTCCGCCCATTCGCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTATTCAGAGGCCGA
 GCGCGCCTCTCCCTCTCAGCTATTCAGAACTAGTCAGGAGCCTTTTTTTCAGGCCCTAGC
 CTTTTGCAAAAAGCTCCCGGACCTTGTATATCCATTTTCCGATCTGATCAAGAGACAGG
 ATCAGGATCGTTTCCGATGATTCAAACAAGATGCATTCACCCAGGTTCTCCGCCCTTG
 GGTGAGAGGCTATTCCGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCCGCTGCTCTGATCCGCC
 CGTGTTCGCCCTCTCAGCCAGGGCGCCCGCTCTTTTTTCTCAAGACCGACTCTCCCG
 TCGCCCTGAATGAATTCAGGACAGGGCAGCCCGGCTATCCGTGGCTGGCCAGCAGGGCGT
 TCCTTGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGACTGGCTGCTATTGGG
 CGAAGTCCCGGGCAGGATCTCCTGTATCTCACCTTGCCTCCTGCCAGAAAATATCCAT
 CATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCA
 CCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCA
 GGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAGTTCGCCAGGCTCAA
 GCGCGCATGCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAA
 TATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGC
 GGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGA
 ATGGGCTGACCGCTTCTCGTCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTCCGAGCGCATCGC
 CTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGAC
 CAAGCGACGCCAACCTGCCATCACGAGATTCGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGG
 TTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGGATCTC
 ATGCTGGAGTTCTTCGCCCAACCACTTGTATTGTCAGCTTATAATGGTTACAAATAA
 AGCAATAGCATCAAAATTCACAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTTAGTTGTGGT
 TTGTCAAACATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACCGTCGACCTCTAGCTAGAGC
 TTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATGTTATCCGCTCACAATCCA
 CACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAA
 CTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAACCTGTGCTGCCAG
 CTGCATTAATGAATCGGCCAACCGCGGGGAGAGCGGTTTTCGCTATTGGGCGCTCTTCC
 GCTTCTCGCTCACTGACTCGCTCGCTCGGTCGTTCCGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCT
 CACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAATG
 TGAGCAAAGGCCAGCAAAGGCCAGGAACCGTAAAAGGCCGCTGCTGGCGTTTTTTC
 CATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGA
 AACCCGACAGCACTATAAAGATACCAGCGCTTTCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGGCTCT
 CCTTTCCGACCCCTCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGCGAAGCGTG
 GCGCTTTCATAGCTCAGCCTGTAGGTATCTCAGTTCGCTGTAGGTGCTTCCCTCCAAG
 CTGGGCTGTGTCCAGAACCCCGCTTCCAGCCCGACCGCTCCGCTTATCCGCTAAGTAT
 CGTCTTGAATCCAACCCGCTAAGACACCACTTATCCGCACTGGCAGCAECCACTGCTAAC
 AGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAAC
 TACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTC

```

GGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTTTTTTT
CTTTGCCAACCCAGCAGATTACCGCCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTT
TCTACGGGCTCTGACCGCTCAGTTCGAACGAAAACTCAGGTTAAGGGATTTTGGTCAFCAGA
TTATCAAAAAGGATCTTCACTTACATCCCTTTTAAATTAAAAATGAACCTTTTAAATCAATC
TAAAGFATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAAATCACTGAGGCACCT
ATCTCAGCGATCTGCTTATTTGCTTCATCCATAGTTCCCTGACTCCCGCTGCTGTACATA
ACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGCCCCAGTCTGCAATGATACCGCGAGACCCA
CCCTCAGCGCTCCAGATTATCAGCAATAAAACAGCCAGCCGGGAGGGCCGAGCCGAGA
AGTGTCTCTGCAACTTTATCCGCCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTTCCCGGGAAGCTAGA
GTAAGTACTTCCCCAGTTAATAGTTTGCCECAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTG
GFTCAGCGCTCGTCTGTTGCTATGCTTCATTGAGTCCGCTCCCAACGATCAAGCGCA
GTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTT
GTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACGTCATAATCTT
CTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCA
TTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAAT
ACCGCGCCACATAGCAGAACTTAAAAGTGTCTATCATTTGAAAACGTTCTTCGGGGCGA
AACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCC
AACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAG
CAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACCGAAATGTTGAATACTCATACTCTTC
CTTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTT
GAATGATTTTAGAAAAATAACAATAGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCA
CCTGACGTC
    
```

5 Se ha descrito que el gen de ARNnp U6 se transcribe por la ARN polimerasa III, que produce transcritos cortos con uridinas en el extremo 3'. Se amplificó por PCR el fragmento genómico del gen ARNnp U6 que contiene la región promotora usando un conjunto de cebadores,

5'-GGGGATCAGCGTTTGAGTAA-3' (SEQ ID No: 34), y

5'-TAGGCCCCACCTCCTTCTAT-3' (SEQ ID No: 35) y ADN humano de placenta como molde. El producto

10 se purificó y se clonó en un vector plásmido pCR usando un kit de clonación TA según el protocolo del suministrador (Invitrogen). El fragmento BamHI, XhoI que contenía el gen ARNnp U6 se purificó y clonó en el fragmento del nucleótido 1257 a 56 del plásmido pcDNA3.1(+), que se amplificó por PCR con un conjunto de cebadores,

5'-TGCGGATCCAGAGCAGATTGTAAGTACTGAGAGT-3' (SEQ ID No: 36) y

5'-CTCTATCTCGAGTGAGGCGGAAAGAACCA-3' (SEQ ID No: 37). El ADN ligado se usó como molde de PCR con los cebadores,

15 5'-TTTAAAGCTTGAAGACTATTTTTACATCAGGTTGTTTTTCT-3' (SEQ ID No: 38) y

5'-TTTAAAGCTTGAAGACACGGTGTTCGTCCTTTCCACA-3' (SEQ ID No: 39). El producto se digirió con HindIII, que posteriormente se autoligó para producir el plásmido vector psiU6BX. Para el control, se preparó psiU6BX-EGFP clonando oligonucleótidos bicatenarios de

5'-CACCGAAGCAGCAGACTTCTTCTTCAAGAGAGAAGAAGTCGTGCTGCTTC-3' (SEQ ID No: 40) y

20 5'-AAAAGAAGCAGCAGACTTCTTCTTCTTGAAGAAGAAGTCGTGCTGCTTC-3' (SEQ ID No: 41) en el sitio BbsI en el vector psiU6BX.

Immunotransferencia

25 El anticuerpo policlonal contra ZNFN3A1 se purificó previamente de suero de conejos inmunizados con proteína recombinante ZNFN3A1 etiquetada con His. Las proteínas se separaron por SDS-PAGE al 10% y se inmunotransfirieron con el anticuerpo anti-ZNFN3A1. IgG de cabra anti-conejo conjugada con HRP (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) sirvió como el anticuerpo secundario para el sistema de detección de ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). La inmunotransferencia con el anticuerpo anti-ZNFN3A1 mostró

30 una única banda de 50 kD de ZNFN3A1 etiquetada con FLAG, que era un patrón idéntico al detectado usando anticuerpo anti-FLAG.

Ensayo con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)

Las células se transfectaron psiU6BX-ZNFN3A1ip o plásmidos control y se mantuvieron en el medio de cultivo suplementado con concentración óptima de geneticina. De seis a doce días después de la transfección, el medio se sustituyó con medio reciente que contenía MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (Sigma) 500 µg/ml y las placas se incubaron durante cuatro horas a 37°C. Posteriormente, las células se lisaron mediante la adición de 1 ml de HCl 0,01 N/SDS al 10% y se midió la absorbancia de los lisados con un lector de placas de ELISA a una longitud de onda de prueba de 570 nm (referencia, 630 nm). La viabilidad celular se representó por la absorbancia comparada con la de células control.

Citometría de flujo

Se determinó el efecto de ZNFN3A1 en la progresión del ciclo celular mediante citometría de flujo. Las células se sembraron a una densidad de 1×10^5 células/placa de 100 mm. Las células se tripsinizaron en la evolución temporal determinada, se recogieron en PBS y se fijaron en etanol frío al 70%. Después de tratamiento con RNasa, las células se tiñeron con yoduro de propidio (50 µg/ml) en PBS. La citometría de flujo se realizó en un FACScan de Becton Dickinson y se analizó mediante el software CellQuest y ModFit (Verity Software House). Se determinaron los porcentajes de núcleos en las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular y cualquier población sub-G1 a partir de al menos 20.000 células no restringidas.

Para examinar el papel de los ARNip-ZNFN3A1 en el ciclo celular, 1×10^5 células SNU475 transfectadas con plásmidos psiU6BX-ZNFN3A1 o control se recogieron por tripsinización 5 días después de la transfección. Después de fijar en etanol frío al 70%, las células se trataron con RNasa y yoduro de propidio (50 µg/ml) en PBS y se analizaron mediante un FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA). Se determinaron los porcentajes de células en las fases G0/G1, S y G2/M del ciclo celular y cualquier población sub-G1 a partir de al menos 20.000 células no restringidas usando el software ModFit (Verity Software House).

[Ejemplo 2] Producción y caracterización de plásmidos que expresan ARNip de ZNFN3A1

La secuencia codificante completa de ZNFN3A1 se amplificó con un conjunto de cebadores, 5'-GGGGTACCAGGATGGAGCCGCTGAAGGTGG-3' (SEQ ID No: 42), y 5'-GGGAATTCTTAGGATGCTCTGATGTTGGCGTCG-3' (SEQ ID No: 43) y se clonó en los sitios de clonación apropiados del vector pcDNA3.1(+) (Invitrogen) (pcDNA-ZNFN3A1). Se prepararon plásmidos que expresaban ARNip de ZNFN3A1 mediante clonación de oligonucleótidos bicatenarios en el vector psiU6BX.

Las secuencias de nucleótidos de los ARNip se diseñaron usando un programa informático de diseño de ARNip disponible del sitio web de Ambion (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html). Brevemente, las secuencias de nucleótidos para la síntesis de ARNip se seleccionan usando el siguiente protocolo.

Selección de sitios diana de ARNip

1. Empezando con el codón de iniciación AUG del transcrito ZNFN3A, rastrear en dirección 3' para secuencias de dinucleótidos AA. La aparición de cada AA y los 19 nucleótidos adyacentes en 3' se registran como potenciales sitios diana de ARNip. Tuschl y col. recomiendan en contra de diseñar ARNip en las regiones in traducir (UTR) 5' y 3' y regiones cerca del codón de iniciación (en 75 bases) ya que estas pueden ser más ricas en sitios de unión de proteínas reguladoras. Las proteínas de unión a UTR y/o complejos de iniciación de la traducción pueden interferir con la unión del complejo endonucleasa de ARNip.

2. Los potenciales sitios diana se comparan con las bases de datos genómicas apropiadas (humana, de ratón, rata, etc.) para eliminar secuencias diana con homología significativa a otras secuencias codificantes.

3. Las secuencias diana calificadas se seleccionan para síntesis. Se seleccionan varias secuencias diana en la longitud del gen para evaluación.

Los oligonucleótidos usados para los ARNip de ZNFN3A1 se muestran posteriormente. Se prepararon psiU6BX-ZNFN3A1 1-13 (ARNip 1-13) clonando los siguientes oligonucleótidos bicatenarios en el sitio BbsI del vector psiU6. La posición de los nucleótidos correspondientes relativa a la secuencia de ácido nucleico de ZNFN3A1 de SEQ ID NO: 1 se enumera para cada secuencia de oligonucleótidos. Cada oligonucleótido es una combinación de una secuencia de nucleótidos sentido y una secuencia de nucleótidos antisentido de la secuencia diana de ZNFN3A1. Las secuencias de nucleótidos de la estructura de horquilla con bucle y secuencia diana de ARNip 1 a 13 se muestran en SEQ ID NO: 44 a SEQ ID NO: 56 y SEQ ID NO: 57 a SEQ ID NO: 69, respectivamente (los sitios de reconocimiento de endonucleasas están eliminados de cada secuencia de estructura horquilla bucle).

psiU6BX-ZNFN3A1-1/ARNip1: (números de nucleótidos 426-446 de SEQ ID No: 1)
5'-CACCAAACCTTATGGATGGAGCACCTTTCAAGAGAAGGTGCTCCATCCATAAGTTT-3' (SEQ ID NO: 3) y

5'-AAAAAACTTATGGATGGAGCACCTTCTCTTGAAAGGTGCTCCATCCATAAGTTT-3' (SEQ ID NO: 4)

psiU6BX-ZNFN3A1-2/ARNip2: (números de nucleótidos 451-471 de SEQ ID No: 1)

5'-CACCAATCAGAGAAGCTTTACTCATTTCAAGAGAATGAGTAAAGCTTCTCTGATT-3' (SEQ ID NO: 5) y

5'-AAAAAATCAGAGAAGCTTTACTCATTCTCTTGAATGAGTAAAGCTTCTCTGATT-3' (SEQ ID NO: 6)

psiU6BX-ZNFN3A1-3/ARNip3 : (números de nucleótidos 495-515 de SEQ ID No: 1) ARNip2;

5'-CACCAACAACTGACTGAAGATAAGTTCAAGAGACTTATCTTCAGTCAGTTTGTT-3' (SEQ ID NO: 7) y

5'-AAAAAACAACTGACTGAAGATAAGTCTCTTGAACCTTATCTTCAGTCAGTTTGTT-3' (SEQ ID NO: 8)

psiU6BX-ZNFN3A1-4/ARNip4: (números de nucleótidos 532-552 de SEQ ID No: 1)

5'-CACCAACTCGTAATGACATTTCAACTTCAAGAGAGTTGAAATGTCATTACGAGTT-3' (SEQ ID NO: 9) y

5'-AAAAAATCGTAATGACATTTCAACTCTCTTGAAGTTGAAATGTCATTACGAGTT-3' (SEQ ID NO: 10)

psiU6BX-ZNFN3A1-5/ARNip5: (números de nucleótidos 623-643 de SEQ ID No: 1)

5'-CACCAAAAGTGATCTGCAACTCTTTTTCAAGAGAAAAGAGTTGCAGATCACTTTT-3' (SEQ ID NO: 11) y

5'-AAAAAAAAGTGATCTGCAACTCTTTTTCTCTTGA AAAAGAGTTGCAGATCACTTTT-3'(SEQ ID NO: 12)

psiU6BX-ZNFN3A1-6/ARNip6: (números de nucleótidos 625-645 de SEQ ID No: 1)

5'-CACCAAGTGATCTGCAACTCTTTCATTCAAGAGATGAAAGAGTTGCAGATCACTT-3' (SEQ ID NO: 13) y

5'-AAAAAAGTGATCTGCAACTCTTTCATCTCTTGAATGAAAGAGTTGCAGATCACTT-3' (SEQ ID NO: 14)

psiU6BX-ZNFN3A1-7/ARNip7: (números de nucleótidos 636-656 de SEQ ID No: 1)

5'-CACCAACTCTTTCACCATCTGTAATTTCAAGAGAATTACAGATGGTGAAGAGTT-3' (SEQ ID NO: 15) y

5'-AAAAAATCTTTCACCATCTGTAATTCTCTTGA AATTACAGATGGTGAAGAGTT-3' (SEQ ID NO: 16)

psiU6BX-ZNFN3A1-8 /ARNip8: (números de nucleótidos 726-746 de SEQ ID No: 1)

5'-CACCAACTGTTTCGATTGTGTTCAATTTCAAGAGAATTGAACACAATCGAACAGTT-3' (SEQ ID NO: 17) y

5'-AAAAAATGTTTCGATTGTGTTCAATTCTCTTGA AATTGAACACAATCGAACAGTT-3' (SEQ ID NO: 18)

psiU6BX-ZNFN3A1-9/ARNip9: (números de nucleótidos 906-926 de SE0 ID No: 1)

5'-CACCAAGGATGCTGATATGCTAACTTCAAGAGAAGTTAGCATATCAGCATCCTT-3' (SEQ ID NO: 19) y

5'-AAAAAAGGATGCTGATATGCTAACTTCTCTTGA AAGTTAGCATATCAGCATCCTT-3' (SEQ ID NO: 20)

psiU6BX-ZNFN3A1-10/ARNip10: (números de nucleótidos 923-943 de SEQ ID No: 1)

5'-CACCAACTGGTGATGAGCAAGTATGTTCAAGAGACATACTTGCTCATCACCAGTT-3' (SEQ ID NO: 21) y

5'-AAAAAATGGTGATGAGCAAGTATGTCTCTTGA ACATACTTGCTCATCACCAGTT-3' (SEQ ID NO: 22)

psiU6BX-ZNFN3A1-11/ARNip11: (números de nucleótidos 937-957 de SEQ ID No: 1)

5'-CACCAAGTATGGAAGGAAGTTCAAGTTCAAGAGACTTGAACCTTCCCTTCCATACTT-3' (SEQ ID NO: 23) y

5'-AAAAAAGTATGGAAGGAAGTTCAAGTCTCTTGA ACTTGAACCTTCCCTTCCATACTT-3' (SEQ ID NO: 24)

psiU6BX-ZNFN3A1-12/ARNip12: (números de nucleótidos 1065-1085 de SEQ ID No: 1)

5'-CACCAACATCTACCAGCTGAAGGTGTTCAAGAGACACCTTCAGCTGGTAGATGTT-3' (SEQ ID NO: 25) y

5'-AAAAAACATCTACCAGCTGAAGGTGTTCTCTTGA ACACCTTCAGCTGGTAGATGTT-3' (SEQ ID NO: 26)

psiU6BX-ZNFN3A1-13/ARNip13: (números de nucleótidos 1258-1278 de SEQ ID No: 1)

5'-CACCAAGCAATGAAGAATCTGAGACTTCAAGAGAGTCTCAGATTCTTCATTGCTT-3' (SEQ ID NO: 27) y

5'-AAAAAAGCAATGAAGAATCTGAGACTCTCTTGA AGTCTCAGATTCTTCATTGCTT-3' (SEQ ID NO: 28)

Se transflectaron plásmidos psiU6BX-ZNFN3A1ip o psiU6BX-vacios con pcDNA-ZNFN3A1 en células COS7 usando el reactivo FuGENE6 según las recomendaciones del suministrador (Roche). Los plásmidos se transflectaron únicamente en células SNU479 que expresan una cantidad abundante de ZNFN3A1 endógena. Se lisaron extractos enteros de las células 2 días después de la transfección y se utilizaron para análisis de inmunotransferencia.

Entre los 13 plásmidos de expresión diferentes que expresan los ARNip de ZNFN3A1, psiU6BX-ZNFN3A1-8, -12 y -13 redujeron lo más significativamente la expresión de ZNFN3A1 exógena mediante análisis de inmunotransferencia, cuando se transflectaron en células COS7 junto con pcDNA-ZNFN3A1. Entre otros plásmidos, psiU6BX-ZNFN3A1-4 mostró marcada reducción y psiU6BX-ZNFN3A1-2, -5, -6, -7 y -10 ejercieron supresión moderada, mientras que psiU6BX-ZNFN3A1-1, -3, -9 y -11 tuvieron poco o ningún efecto sobre la expresión (figura 1). Para examinar adicionalmente la actividad iARN de los ARNip de ZNFN3A1, se transflectaron psiU6BX-ZNFN3A1-1, -4, -12 o psiU6BX-ZNFN3A1-vacío en células SNU475 que expresan una cantidad abundante de ZNFN3A1 (figura 2). El análisis por inmunotransferencia usando los extractos de las células transflectadas demostró una reducción marcada de ZNFN3A1 endógena por psiU6BX-ZNFN3A1-12 y supresión moderada por psiU6BX-ZNFN3A1-4 comparada con células transflectadas con psiU6BX-ZNFN3A1-vacío. Por otra parte la transfección con psiU6BX-ZNFN3A1-1 no afectó a la expresión de ZNFN3A1 (figura 3).

[Ejemplo 3] Supresión de crecimiento de células de hepatoma y cáncer de colon por ARNip de ZNFN3A1

Para probar si la supresión de ZNFN3A1 podía producir supresión de crecimiento de células de hepatoma, se transfectoron células SNU475 con psiU6BX-ZNFN3A1-12, el vector que demostró el mayor efecto de disminución en la expresión; psiU6BX-ZNFN3A1-4 que demostró un efecto de silenciamiento moderado; psiU6BX-ZNFN3A1-1 que no demostró efecto de silenciamiento o psiU6BX-vacío. Los ensayos con MTT tanto a 6 días como a 9 días de transfección mostraron que psiU6BX-ZNFN3A1-12 tenía el mayor efecto de inhibición de crecimiento y que psiU6BX-ZNFN3A1-1 no cambió el número de células supervivientes comparadas con las células transfectadas con psiU6BX-vacío (figura 4). El efecto inhibitor del crecimiento se correlacionó con su actividad silenciadora de genes. Para demostrar adicionalmente el efecto inhibitor de crecimiento de los ARNip-ZNFN3A1, psiU6BX-ZNFN3A1-12; psiU6BX-EGFP Para el control se preparó psiU6BX-EGFP clonando el siguiente oligonucleótido bicatenario 5'-CACCGAAGCAGCAGCACTTCTTCTTCAAGAGAGAAGAAGTCGTGCTGCTTC-3' (SEQ ID No: 40) y 5'-AAAAGAAGCAGCAGCACTTCTTCTTCTTGAAGAAGAAGTCGTGCTGCTTC-3' (SEQ ID No: 41) en el sitio BbsI del vector psiU6BX.

o psiU6BX-vacío se transfeció en varias líneas celulares de hepatoma incluyendo SNU398, SNU423, SNU449, Huh7, Alexander y HepG2 y dos líneas celulares de cáncer de colon, SW948 y HCT116. La transfección de psiU6BX-ZNFN3A1-12 redujo significativamente el número de células supervivientes comparado con la de psiU6BX-EGFP o psiU6BX-vacío (figura 5). Además, el análisis por FACS demostró que la transfección de psiU6BX-ZNFN3A1-12 aumentó el número de células en fase subG1 (figura 6). Estos resultados indican que ZNFN3A1 contribuye al crecimiento y/o supervivencia celular anormal en una amplia gama de células cancerosas humanas.

Aplicabilidad industrial

Los presentes inventores han mostrado que el crecimiento celular se suprime por ARN interferentes pequeños (ARNip) que se dirigen específicamente al gen ZNFN3A1. De esta manera, estos nuevos ARNip son dianas útiles para el desarrollo de medicamentos anticancerosos. Por ejemplo, los agentes que bloquean la expresión de ZNFN3A1 o previenen su actividad pueden encontrar utilidad terapéutica como agentes anticancerosos, particularmente agentes anticancerosos para el tratamiento de cáncer de hígado o cáncer de colon, tal como CHC o adenocarcinoma colorrectal.

Mientras que la invención se ha descrito en detalle y con referencia a formas de realización específicas de la misma, será aparente para el experto en la materia que se pueden hacer varios cambios y modificaciones en la misma sin separarse del ámbito de la invención.

Referencias

- (1) Akriviadis EA, Lloyd JM, Efremidis SC, Shouval D, Canelo R, Ringe B, Meyers WC. Hepatocellular carcinoma. *Br J Surg.* Oct 1998; 85(10):1319-31.
- (2) Okabe H, Satoh S, Kato T, Kitahara O, Yanagawa R, Yamaoka Y, Tsunoda T, Furukawa Y, Nakamura Y. Genome-wide analysis of gene expression in human hepatocellular carcinomas using cDNA microarray: identification of genes involved in viral carcinogenesis and tumor progression. *Cancer Res.* 1 Marzo 2001; 61(5):2129-37.
- (3) Sharp PA. RNAi and double-strand RNA. *Genes. Dev.* 15 Enero 1999; 13(2):139-41.
- (4) Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon G.J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature.* 16 Marzo 2000; 404(6775):293-6.
- (5) Hannon GJ. RNA interference. *Nature.* 11 Julio 2002; 418(6894):244-51.
- (6) Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 24 Mayo 2001; 411(6836):494-8.
- (7) Miyagishi M, Taira K. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol.* Mayo 2002; 20(5):497-500.
- (8) Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells *Science.* 296(5567):550-553, 19 de abril, 2002.

Lista de secuencias

<110> ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.
 JAPÓN REPRESENTADO POR EL PRESIDENTE DE LA UNIVERSIDAD DE TOKIO

5 <120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR

<130> ONC-A0301P

<150> US 60/450.644

10 <151> 28-02-2003

<160> 69

<170> PatentIn versión 3.1

15

<210> 1

<211> 1622

<212> ADN

<213> Homo sapiens

20

<220>

<221> CDS

<222> (96)..(1382)

<223>

25

<400> 1

gtgcgcgcag ggcgcaggcg cgcgggtccc ggcagcccgt gagacgccg ctgctggacg 60

cgggtagccg tctgaggtgc cggagctgcg ggagg atg gag ccg ctg aag gtg 113
 Met Glu Pro Leu Lys Val
 1 5

gaa aag ttc gca acc gcc aac agg gga aac ggg ctg cgc gcc gtg acc 161
 Glu Lys Phe Ala Thr Ala Asn Arg Gly Asn Gly Leu Arg Ala Val Thr
 10 15 20

ccg ctg cgc ccc gga gag cta ctc ttc cgc tcg gat ccc ttg gcg tac 209
 Pro Leu Arg Pro Gly Glu Leu Leu Phe Arg Ser Asp Pro Leu Ala Tyr
 25 30 35

acg gtg tgc aag ggg agt cgt ggc gtc gtc tgc gac cgc tgc ctt ctc 257
 Thr Val Cys Lys Gly Ser Arg Gly Val Val Cys Asp Arg Cys Leu Leu

40	45	50	
ggg aag gaa aag ctg atg cga tgc tct cag tgc cgc gtc gcc aaa tac			305
Gly Lys Glu Lys Leu Met Arg Cys Ser Gln Cys Arg Val Ala Lys Tyr			
55	60	65	70
tgt agt gct aag tgt cag aaa aaa gct tgg cca gac cac aag cgg gaa			353
Cys Ser Ala Lys Cys Gln Lys Lys Ala Trp Pro Asp His Lys Arg Glu			
	75	80	85
tgc aaa tgc ctt aaa agc tgc aaa ccc aga tat cct cca gac tcc gtt			401
Cys Lys Cys Leu Lys Ser Cys Lys Pro Arg Tyr Pro Pro Asp Ser Val			
	90	95	100
cga ctt ctt ggc aga gtt gtc ttc aaa ctt atg gat gga gca cct tca			449
Arg Leu Leu Gly Arg Val Val Phe Lys Leu Met Asp Gly Ala Pro Ser			
	105	110	115
gaa tca gag aag ctt tac tca ttt tat gat ctg gag tca aat att aac			497
Glu Ser Glu Lys Leu Tyr Ser Phe Tyr Asp Leu Glu Ser Asn Ile Asn			
	120	125	130
aaa ctg act gaa gat aag aaa gag ggc ctc agg caa ctc gta atg aca			545
Lys Leu Thr Glu Asp Lys Lys Glu Gly Leu Arg Gln Leu Val Met Thr			
135	140	145	150
ttt caa cat ttc atg aga gaa gaa ata cag gat gcc tct cag ctg cca			593
Phe Gln His Phe Met Arg Glu Glu Ile Gln Asp Ala Ser Gln Leu Pro			
	155	160	165
cct gcc ttt gac ctt ttt gaa gcc ttt gca aaa gtg atc tgc aac tct			641
Pro Ala Phe Asp Leu Phe Glu Ala Phe Ala Lys Val Ile Cys Asn Ser			
	170	175	180
ttc acc atc tgt aat gcg gag atg cag gaa gtt ggt gtt ggc cta tat			689
Phe Thr Ile Cys Asn Ala Glu Met Gln Glu Val Gly Val Gly Leu Tyr			
	185	190	195
ccc agt atc tct ttg ctc aat cac agc tgt gac ccc aac tgt tcg att			737
Pro Ser Ile Ser Leu Leu Asn His Ser Cys Asp Pro Asn Cys Ser Ile			
200	205	210	
gtg ttc aat ggg ccc cac ctc tta ctg cga gca gtc cga gac atc gag			785

aag aat ctg aga ctg gct ttt gat att atg aga gtg aca cat ggc aga 1313
 Lys Asn Leu Arg Leu Ala Phe Asp Ile Met Arg Val Thr His Gly Arg
 395 400 405

gaa cac agc ctg att gaa gat ttg att cta ctt tta gaa gaa tgc gac 1361
 Glu His Ser Leu Ile Glu Asp Leu Ile Leu Leu Leu Glu Glu Cys Asp
 410 415 420

gcc aac atc aga gca tcc taa gggaacgcag tcagagggaa atacggcgtg 1412
 Ala Asn Ile Arg Ala Ser
 425

tgtctttggt gaatgcctta ttgaggtcac acactctatg ctttgtttagc tgtgtgaacc 1472
 tctcttattg gaaattctgt tccgtgtttg ttaggtaaa taaaggcaga catggtttgc 1532
 aaaccacaag aatcattagt ttagagaag cagcattata ataaattcaa aacatttggt 1592
 tgaggatgcc aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1622

<210> 2
 <211> 428
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 2
 Met Glu Pro Leu Lys Val Glu Lys Phe Ala Thr Ala Asn Arg Gly Asn
 1 5 10 15
 Gly Leu Arg Ala Val Thr Pro Leu Arg Pro Gly Glu Leu Leu Phe Arg
 20 25 30
 Ser Asp Pro Leu Ala Tyr Thr Val Cys Lys Gly Ser Arg Gly Val Val
 35 40 45
 Cys Asp Arg Cys Leu Leu Gly Lys Glu Lys Leu Met Arg Cys Ser Gln
 50 55 60
 Cys Arg Val Ala Lys Tyr Cys Ser Ala Lys Cys Gln Lys Lys Ala Trp
 65 70 75 80
 Pro Asp His Lys Arg Glu Cys Lys Cys Leu Lys Ser Cys Lys Pro Arg
 85 90 95
 Tyr Pro Pro Asp Ser Val Arg Leu Leu Gly Arg Val Val Phe Lys Leu

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

Ala Cys Ile Asn Leu Gly Leu Leu Glu Glu Ala Leu Phe Tyr Gly Thr
 340 345 350

Arg Thr Met Glu Pro Tyr Arg Ile Phe Phe Pro Gly Ser His Pro Val
 355 360 365

Arg Gly Val Gln Val Met Lys Val Gly Lys Leu Gln Leu His Gln Gly
 370 375 380

Met Phe Pro Gln Ala Met Lys Asn Leu Arg Leu Ala Phe Asp Ile Met
 385 390 395 400

Arg Val Thr His Gly Arg Glu His Ser Leu Ile Glu Asp Leu Ile Leu
 405 410 415

Leu Leu Glu Glu Cys Asp Ala Asn Ile Arg Ala Ser
 420 425

<210> 3
 <211> 55
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia de oligonucleótidos sintetizada artificialmente para ARNip

10 <400> 3
 caccaaactt atggatggag cacctttcaa gagaaggtgc tccatccata agttt 55

15 <210> 4
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Una secuencia de oligonucleótidos sintetizada artificialmente para ARNip

<400> 4
 aaaaaaactt atggatggag cacctttctt tgaaaggtgc tccatccata agttt 55

25 <210> 5
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Una secuencia de oligonucleótidos sintetizada artificialmente para ARNip

<400> 5
 caccaatcag agaagcttta ctcatctcaa gagaatgagt aaagcttctc tgatt 55

35 <210> 6
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Artificial

	<220>		
	<223> Una secuencia de oligonucleótidos sintetizada artificialmente para ARNip		
	<400> 6		
5	aaaaaatcag agaagcttta ctcattctct tgaatgagt aaagcttctc tgatt		55
	<210> 7		
	<211> 55		
10	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Una secuencia de oligonucleótidos sintetizada artificialmente para ARNip		
15	<400>7		
	caccaacaaa ctgactgaag ataagttcaa gagacttata ttcagtcagt ttgtt		55
	<210> 8		
	<211> 55		
20	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Una secuencia de oligonucleótidos sintetizada artificialmente para ARNip		
25	<400> 8		
	aaaaaacaaa ctgactgaag ataagtctct tgaacttata ttcagtcagt ttgtt		55
	<210> 9		
30	<211> 55		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
35	<223> Una secuencia de oligonucleótidos sintetizada artificialmente para ARNip		
	<400> 9		
	caccaactcg taatgacatt tcaacttcaa gagagttgaa atgtcattac gagtt		55
40	<210> 10		
	<211> 55		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Una secuencia de oligonucleótidos sintetizada artificialmente para ARNip		
	<400> 10		
50	aaaaaactcg taatgacatt tcaactctct tgaagttgaa atgtcattac gagtt		55
	<210> 11		
	<211> 55		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Una secuencia de oligonucleótidos sintetizada artificialmente para ARNip		
	<400> 11		
60	cacaaaaagt gatctgcaac tctttttcaa gagaaaagag ttgcagatca ctttt		55

<210> 12
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Una secuencia de oligonucleótidos sintetizada artificialmente para ARNip
 <400> 12
 10 **aaaaaaaaagt gatctgcaac tcttttctct tgaaaaagag ttgcagatca ctttt** 55
 <210> 13
 <211> 55
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Una secuencia de oligonucleótidos sintetizada artificialmente para ARNip
 20 <400> 13
caccaagtga tctgcaacte tttcattcaa gagatgaaag agttgcagat cactt 55
 <210> 14
 <211> 55
 25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Una secuencia de oligonucleótidos sintetizada artificialmente para ARNip
 30 <400> 14
aaaaaagtga tctgcaacte tttcatctct tgaatgaaag agttgcagat cactt 55
 <210> 15
 <211> 55
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 40 <223> Una secuencia de oligonucleótidos sintetizada artificialmente para ARNip
 <400> 15
caccaactct ttcaccatct gtaattcaa gagaattaca gatggtgaaa gagtt 55
 45 <210> 16
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Una secuencia de oligonucleótidos sintetizada artificialmente para ARNip
 <400> 16
 55 **aaaaaactct ttcaccatct gtaattctct tgaattaca gatggtgaaa gagtt** 55
 <210> 17
 <211> 55
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Una secuencia de oligonucleótidos sintetizada artificialmente para ARNip
 <400> 17

	caccaactgt tcgattgtgt tcaatttcaa gagaattgaa cacaatcgaa cagtt	55
	<210> 18 <211> 55	
5	<212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Una secuencia de oligonucleótidos sintetizada artificialmente para ARNip	
10	<400> 18 aaaaaactgt tcgattgtgt tcaatttctct tgaattgaa cacaatcgaa cagtt	55
	<210> 19 <211> 55	
15	<212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Una secuencia de oligonucleótidos sintetizada artificialmente para ARNip	
20	<400> 19 caccaaggat gctgatatgc taactttcaa gagaagttag catatcagca tcctt	55
25	<210> 20 <211> 55	
	<212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Una secuencia de oligonucleótidos sintetizada artificialmente para ARNip	
	<400> 20 aaaaaaggat gctgatatgc taacttctct tgaagttag catatcagca tcctt	55
35	<210> 21 <211> 55	
	<212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Una secuencia de oligonucleótidos sintetizada artificialmente para ARNip	
45	<400> 21 caccaactgg tgatgagcaa gtatgttcaa gagacatact tgctcatcac cagtt	55
	<210> 22 <211> 55	
50	<212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Una secuencia de oligonucleótidos sintetizada artificialmente para ARNip	
55	<400> 22 aaaaaactgg tgatgagcaa gtatgtctct tgaacatact tgctcatcac cagtt	55
	<210> 23 <211> 55	
60	<212> ADN <213> Artificial	

<220>
 <223> Una secuencia de oligonucleótidos sintetizada artificialmente para ARNip

<400> 23
 5 **caccaagtat ggaaggaagt tcaagttcaa gagacttgaa cttccttcca tactt** 55

<210> 24
 <211> 55
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia de oligonucleótidos sintetizada artificialmente para ARNip

<400> 24
 15 **aaaaaagtat ggaaggaagt tcaagtctct tgaacttgaa cttccttcca tactt** 55

<210> 25
 <211> 55
 <212> ADN
 20 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia de oligonucleótidos sintetizada artificialmente para ARNip

<400> 25
 25 **caccaacatc taccagctga aggtgttcaa gagacacctt cagctggtag atggt** 55

<210> 26
 <211> 55
 <212> ADN
 30 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia de oligonucleótidos sintetizada artificialmente para ARNip

<400> 26
 35 **aaaaaacatc taccagctga aggtgtctct tgaacacctt cagctggtag atggt** 55

<210> 27
 <211> 55
 <212> ADN
 40 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia de oligonucleótidos sintetizada artificialmente para ARNip

<400> 27
 45 **caccaagcaa tgaagaatct gagacttcaa gagagtctca gattcttcat tgctt** 55

<210> 28
 <211> 55
 <212> ADN
 50 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia de oligonucleótidos sintetizada artificialmente para ARNip

<400> 28
 55 **aaaaaagcaa tgaagaatct gagactctct tgaagtctca gattcttcat tgctt** 55

<210> 29

<211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente

<400> 29

10 **acaacagcct caagatcatc ag** 22

<210> 30
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente

<400> 30

20 **ggtccaccac tgacacgttg** 20

<210> 31
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente

30 <400> 31

ttcccgatat caacatctac cag 23

<210> 32
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente

40 <400> 32

agtgtgtgac ctcaataagg cat 23

<210> 33
 <211> 4869
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> Una secuencia de plásmido sintetizada artificialmente

<220>
 <221> característica mezcla
 <222> (485)..(490)
 <223> "n" indica hueco

55 <400> 33

gacggatcgg	gagatctccc	gatcccctat	ggtgcactct	cagtacaatc	tgctctggat	60
ccactagtaa	cgcccgccag	tgtgctggaa	ttcggttgg	ggatcagcgt	ttgagtaaga	120
gccccgctct	gaaccctccg	cgccgccccg	gccccagtgg	aaagacgcgc	aggcaaacg	180
caccacgtga	cgagcgtga	ccgcgcgccg	agcgcgcgcc	aaggtcgggc	aggaagaggg	240
cctatttccc	atgattcctt	catatttgca	tatacgatac	aaggctgta	gagagataat	300
tagaattaat	ttgactgtaa	acacaaagat	attagtacaa	aatacgtgac	gtagaaagta	360
ataatttctt	gggtagtttg	cagttttaa	attatgtttt	aaaatggact	atcatatgct	420
taccgtaact	tgaagatatt	tcgatttctt	ggctttatat	atcttgtgga	aaggacgaaa	480
caccnnnnn	tttttacatc	aggttgtttt	tctgtttggt	tttttttta	caccacgttt	540
atacgccggt	gcacggttta	ccactgaaaa	cacetttcat	ctacaggtga	tatcttttaa	600
cacaaataaa	atgtagtagt	cctaggagac	ggaatagaag	gaggtggggc	ctaaagccga	660
attctgcaga	tatccatcac	actggcggcc	gctcgagtga	ggcggaaaga	accagctggg	720
gctctagggg	gtatccccac	gcgccctgta	gcggcgcatt	aagcgcggcg	ggtgtggtgg	780
ttacgcgcag	cgtgaccgct	acacttgcca	gcgccctagc	gcccgtcct	ttcgctttct	840
tcccttccct	tctcgccacg	ttcgccggct	ttccccgta	agctctaaat	cgggggctcc	900
ctttaggggt	ccgatttagt	gctttacggc	acctcgacce	caaaaaactt	gatttaggggt	960
atggttcacg	tagtgggcca	tcgccctgat	agacggtttt	tcgccctttg	acgttggagt	1020
ccacgttctt	taatagtgga	ctcttgttcc	aaactggaac	aacactcaac	cctatctcgg	1080
tctattcttt	tgatttataa	gggattttgc	cgatttcggc	ctattggta	aaaaatgagc	1140
tgatttaaca	aaaatttaac	gcgaattaat	tctgtggaat	gtgtgtcagt	taggggtgtg	1200
aaagtcccca	ggctccccag	caggcagaag	tatgcaaagc	atgcatctca	attagtcagc	1260
aaccaggtgt	ggaaagtccc	caggctcccc	agcaggcaga	agtatgcaaa	gcatgcatct	1320
caattagtea	gcaaccatag	tcccgcacct	aactccgccc	atcccgcccc	taactccgcc	1380
cagttccgcc	cattctccgc	cccatggctg	actaattttt	tttatttatg	cagaggccga	1440
ggccgcctct	gcctctgagc	tattccagaa	gtagtgagga	ggcttttttg	gaggcctagg	1500
cttttgcaaa	aagctcccgg	gagcttgtat	atccatttcc	ggatctgata	aagagacagg	1560
atgaggatcg	tttcgcatga	ttgaacaaga	tggattgcac	gcaggttctc	cggccgcttg	1620
ggtggagagg	ctattcggct	atgactgggc	acaacagaca	atcggctgct	ctgatgccgc	1680
cgtgttccgg	ctgtcagcgc	aggggcgccc	ggttctttt	gtcaagaccg	acctgtccgg	1740
tgccctgaat	gaactgcagg	acgaggcagc	gcggctatcg	tggtggcca	cgacgggcgt	1800
tccttgcgca	gctgtgctcg	acgttgtcac	tgaagcggga	agggactggc	tgctattggg	1860
cgaagtgccg	gggcaggatc	tectgtcate	tcaccttget	cctgccgaga	aagtatccat	1920
catggctgat	gcaatgcggc	ggctgcatac	gcttgatccg	gctacctgcc	cattcgacca	1980
ccaagcgaag	catcgcacg	agcgcagcag	tactcggatg	gaagccggtc	ttgtcgatca	2040
ggatgatctg	gacgaagagc	atcaggggct	cgcccgacc	gaactgttcc	ccaggtcaa	2100
ggcgcgatg	cccgaaggcg	aggatctcgt	cgtgacctat	ggcgatgcct	gcttgccgaa	2160

tatcatggtg	gaaaatggcc	gcttttctgg	attcatcgac	tgtggccggc	tgggtgtggc	2220
ggaccgctat	caggacatag	cgttggctac	ccgtgatatt	gctgaagagc	ttggcggcga	2280
atgggctgac	cgcttctctg	tgctttacgg	tatcgccgct	cccgatctgc	agcgcacgcg	2340
cttctatcgc	cttcttgaacg	agttcttctg	agcgggactc	tggggttcga	aatgaccgac	2400
caagcgacgc	ccaacctgcc	atcacgagat	ttcgattcca	ccgccgcctt	ctatgaaagg	2460
ttgggcttcg	gaatcgtttt	ccgggacgcc	ggctggatga	tcctccagcg	cggggatctc	2520
atgctggagt	tcttegecca	ccccaaactg	tttattgcag	cttataatgg	ttacaaataa	2580
agcaatagca	tcacaaatct	cacaaataaa	gcattttttt	cactgcattc	tagttgtggg	2640
ttgtccaaac	tcataaatgt	atcttateat	gtctgtatac	cgtegacctc	tagctagagc	2700
ttggcgtaat	catggtcata	gctgtttcct	gtgtgaaatt	gttatccgct	cacaattcca	2760
cacaacatac	gagccggaag	cataaagtgt	aaagcctggg	gtgcctaata	agtgagctaa	2820
ctcacattaa	ttgcgttgcg	ctcactgccc	gctttccagt	cgggaaacct	gtcgtgccag	2880
ctgcattaa	gaatcggcca	acgcgcgggg	agaggcggtt	tgcgtattgg	gcgctcttcc	2940
gcttctctgc	tactgactc	gctgcgctcg	gtcgttcggc	tgcggcgagc	ggtatcagct	3000
cactcaaagg	cgtaataacg	gttatccaca	gaatcagggg	ataacgcagg	aaagaacatg	3060
tgagcaaaag	gccagcaaaa	ggccaggaac	cgtaaaaagg	ccgcgttgct	ggcgtttttc	3120
cataggctcc	gccccctga	cgagcatcac	aaaaatcgac	gctcaagtca	gaggtggcga	3180
aaccgcagac	gactataaag	ataccaggcg	tttccccctg	gaagctccct	cgtgcgctct	3240
cctgtttccg	ccctgccgct	taccggatac	ctgtccgctt	ttctcccttc	gggaagcgtg	3300
gcgctttctc	atagctcacg	ctgtaggtat	ctcagttcgg	tgtaggtcgt	tcgctccaag	3360
ctgggctgtg	tgacgaacc	ccccgttcag	cccgaccgct	gcgccttate	cggttaactat	3420
cgtcttgagt	ccaaccgggt	aagacacgac	ttatcgccac	tggcagcagc	cacttggtaac	3480
aggattagca	gagcgaggta	tgtaggcggt	gctacagagt	tcttgaagtg	gtggcctaac	3540
tacggctaca	ctagaagaac	agtatttggg	atctgcgctc	tgctgaagcc	agttaccttc	3600
ggaaaaagag	ttggtagctc	ttgatccggc	aaacaaacca	ccgctggtag	cgtttttttt	3660
gtttgcaagc	agcagattac	gcgcagaaaa	aaaggatctc	aagaagatcc	tttgatcttt	3720
tctacggggt	ctgacgctca	gtggaacgaa	aactcacggt	aagggatttt	ggtcatgaga	3780
ttatcaaaaa	ggatcttcac	ctagatcctt	ttaaattaaa	aatgaagttt	taaataaatc	3840
taaagtatat	atgagtaaac	ttggtctgac	agttaccaat	gcttaatcag	tgaggcacct	3900
atctcagcga	tctgtctatt	tcgttccatc	atagttgcct	gactccccgt	cgtgtagata	3960
actacgatac	gggagggcct	accatctggc	cccagtgtctg	caatgatacc	gcgagaccca	4020
cgctcacogg	ctccagatct	atcagcaata	aaccagccag	ccggaagggc	cgagcgcaga	4080
agtggctctg	caactttatc	cgctctcctc	cagtctatta	attggtgccc	ggaagctaga	4140
gtaagtagtt	cgccagttaa	tagtttgcgc	aacgttggtg	ccattgctac	aggcatcgtg	4200
gtgtcacgct	cgctggttgg	tatggcttca	ttcagctccg	gttcccaacg	atcaaggcga	4260
_gttacatgat	cccccatggt	gtgcaaaaaa	gcggttagct	ccttcggctc	tccgatcgtt	4320
gtcagaagta	agttggccgc	agtgittatca	ctcatggtta	tggcagcaact	gcataattct	4380
cttactgtca	tgccatccgt	aagatgcttt	tctgtgactg	gtgagtactc	aaccaagtca	4440
ttctgagaat	agtgtatgcg	gcgaccgagt	tgctcttggc	cgcgctcaat	acgggataat	4500
accgcgccac	atagcagaac	tttaaaagtg	ctcatcattg	gaaaacgttc	ttcggggcga	4560
aaactctcaa	ggatcttacc	gctgttgaga	tccagttcga	tgtaaccac	tcgtgcacce	4620
aactgatctt	cagcatcttt	tactttcacc	agcgtttctg	ggtgagcaaa	aacaggaagg	4680
caaaatgccg	caaaaaaggg	aataagggcg	acacggaaat	gttgaatact	catactcttc	4740

	ctttttcaat attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt	4800
	gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg aaaagtgcc	4860
	cctgacgtc	4869
	<210> 34	
	<211> 20	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente	
10	<400> 34	
	ggggatcagc gtttgagtaa	20
	<210> 35	
15	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente	
	<400> 35	
	taggccccac ctctttctat	20
25	<210> 36	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
30	<220>	
	<223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente	
	<400> 36	
	tgcggatcca gagcagattg tactgagagt	30
35	<210> 37	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
40	<220>	
	<223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente	
	<400> 37	
45	ctctatctcg agtgaggcgg aaagaacca	29
	<210> 38	
	<211> 40	
50	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente	
55	<400> 38	
	tttaagcttg aagactattt ttacatcagg ttgttttct	40
	<210> 39	
60	<211> 37	
	<212> ADN	

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente	
5	<400> 39	
	tttaagcttg aagacacggt gtttcgtcct ttccaca	37
	<210> 40	
10	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
15	<223> Una secuencia de oligonucleótidos bicatenaria sintetizada artificialmente	
	<400> 40	
	caccgaagca gcacgacttc ttcttcaaga gagaagaagt cgtgctgctt c	51
20	<210> 41	
	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
25	<220>	
	<223> Una secuencia de oligonucleótidos bicatenaria sintetizada artificialmente	
	<400> 41	
	aaaagaagca gcacgacttc ttctctcttg aagaagaagt cgtgctgctt c	51
30	<210> 42	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
35	<220>	
	<223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente	
	<400> 42	
40	ggggtaccag gatggagccg ctgaaggtgg	30
	<210> 43	
	<211> 33	
	<212> ADN	
45	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Una secuencia cebadora sintetizada artificialmente	
50	<400> 43	
	gggaattctt aggatgctct gatgttggcg tcg	33
	<210> 44	
	<211> 51	
55	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Una secuencia ARNip horquilla sintetizada artificialmente	
60	<400> 44	
	aaacttatgg atggagcacc ttcaagaga aggtgctcca tccataagtt t	51
	<210> 45	

<211> 51
 <212> ADN
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Una secuencia ARNip horquilla sintetizada artificialmente

<400> 45
aatcagagaa gctttactca tttcaagaga atgagtaaag cttctctgat t 51

10 <210> 46
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Una secuencia ARNip horquilla sintetizada artificialmente

<400> 46
 20 **aacaaactga ctgaagataa gttcaagaga cttatcttca gtcagtttgt t** 51

<210> 47
 <211> 51
 <212> ADN
 25 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia ARNip horquilla sintetizada artificialmente

30 <400> 47
aactcgtaat gacatttcaa cttcaagaga gttgaaatgt cattacgagt t 51

<210> 48
 <211> 51
 35 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia ARNip horquilla sintetizada artificialmente

40 <400> 48
aaaagtgatc tgcaactctt tttcaagaga aaagagttgc agatcacttt t 51

<210> 49
 45 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 50 <223> Una secuencia ARNip horquilla sintetizada artificialmente

<400> 49
aagtgatctg caactcttctc attcaagaga tgaagagtt gcagatcact t 51

55 <210> 50
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> Una secuencia ARNip horquilla sintetizada artificialmente

<400> 50

	aactctttca ccatctgtaa tttcaagaga attacagatg gtgaaagagt t	51
	<210> 51 <211> 51	
5	<212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Una secuencia ARNip horquilla sintetizada artificialmente	
10	<400> 51 aactggttoga ttgtgttcaa tttcaagaga attgaacaca atcgaacagt t	51
	<210> 52 <211> 51	
15	<212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Una secuencia ARNip horquilla sintetizada artificialmente	
20	<400> 52 aaggatgctg atatgctaac tttcaagaga agttagcata tcagatcct t	51
	<210> 53 <211> 51	
25	<212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> Una secuencia ARNip horquilla sintetizada artificialmente	
30	<400> 53 aactggtgat gagcaagtat gttcaagaga cataacttgct catcaccagt t	51
35	<210> 54 <211> 51	
	<212> ADN <213> Artificial	
40	<220> <223> Una secuencia ARNip horquilla sintetizada artificialmente	
	<400> 54 aagtatggaa ggaagttcaa gttcaagaga cttgaacttc cttccatact t	51
45	<210> 55 <211> 51	
	<212> ADN <213> Artificial	
50	<220> <223> Una secuencia ARNip horquilla sintetizada artificialmente	
	<400> 55 aacatctacc agctgaaggt gttcaagaga caccttcage tggtagatgt t	51
55	<210> 56 <211> 51	
60	<212> ADN <213> Artificial	

	<220>		
	<223> Una secuencia ARNip horquilla sintetizada artificialmente		
	<400> 56		
5	aagcaatgaa gaatctgaga cttcaagaga gtctcagatt cttcattgct t		51
	<210> 57		
	<211> 21		
10	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Una secuencia diana para ARNip sintetizada artificialmente		
15	<400> 57		
	aaacttatgg atggagcacc t		21
	<210> 58		
	<211> 21		
20	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Una secuencia diana para ARNip sintetizada artificialmente		
25	<400> 58		
	aatcagagaa gctttactca t		21
	<210> 59		
	<211> 21		
30	<212> ADN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Una secuencia diana para ARNip sintetizada artificialmente		
35	<400> 59		
	aacaaactga ctgaagataa g		21
40	<210> 60		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
45	<220>		
	<223> Una secuencia diana para ARNip sintetizada artificialmente		
	<400> 60		
	aactcgtaat gacatttcaa c		21
50	<210> 61		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
55	<220>		
	<223> Una secuencia diana para ARNip sintetizada artificialmente		
	<400> 61		
60	aaaagtgatc tgcaactctt t		21
	<210> 62		

	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Una secuencia diana para ARNip sintetizada artificialmente	
	<400> 62	
	aagtgatctg caactctttc a	21
10	<210> 63	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> Una secuencia diana para ARNip sintetizada artificialmente	
	<400> 63	
20	aactcttttca ccatctgtaa t	21
	<210> 64	
	<211> 21	
	<212> ADN	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Una secuencia diana para ARNip sintetizada artificialmente	
30	<400> 64	
	aactgtttoga ttgtgttcaa t	21
	<210> 65	
	<211> 21	
35	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Una secuencia diana para ARNip sintetizada artificialmente	
40	<400> 65	
	aaggatgctg atatgctaac t	21
	<210> 66	
45	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
50	<223> Una secuencia diana para ARNip sintetizada artificialmente	
	<400> 66	
	aactggtgat gagcaagtat g	21
55	<210> 67	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> Una secuencia diana para ARNip sintetizada artificialmente	
	<400> 67	

	aagtatggaa ggaagttcaa g	21
	<210> 68	
	<211> 21	
5	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Una secuencia diana para ARNip sintetizada artificialmente	
10	<400> 68	
	aacatctacc agctgaaggt g	21
	<210> 69	
15	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
20	<223> Una secuencia diana para ARNip sintetizada artificialmente	
	<400> 69	
	aagcaatgaa gaatctgaga c	21

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un ARN interferente pequeño (ARNip) de ZNFN3A1 para su uso en tratar un tumor caracterizado por la sobreexpresión de ZNFN3A1 en un sujeto, en donde dicho ARNip comprende un ácido nucleico ZNFN3A1 sentido y un ácido nucleico ZNFN3A1 antisentido, y en donde dicho ARNip es específico para una diana de ZNFN3A1 seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos 451-471, 532-552, 623-643, 625-645, 636-656, 726-746, 923-943, 1065-1085 y 1258-1278 de SEQ ID NO:1, en donde dicho ARNip de ZNFN3A1 tiene entre 19 y 25 nucleótidos de longitud.
2. Uso de una composición que comprende un ARN interferente pequeño (ARNip) de ZNFN3A1 para la preparación de una composición farmacéutica para tratar un tumor caracterizado por la sobreexpresión de ZNFN3A1 en un sujeto, en donde dicho ARNip comprende un ácido nucleico ZNFN3A1 sentido y un ácido nucleico ZNFN3A1 antisentido, y en donde dicho ARNip es específico para una diana de ZNFN3A1 seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos 451-471, 532-552, 623-643, 625-645, 636-656, 726-746, 923-943, 1065-1085 y 1258-1278 de SEQ ID NO:1, en donde dicho ARNip de ZNFN3A1 tiene entre 19 y 25 nucleótidos de longitud.
3. La composición para uso de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en donde dicho ARNip tiene la fórmula general 5'-[A]-[B]-[A']-3', en donde [A] es una secuencia de ribonucleótidos que corresponde a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos 451-471, 532-552, 623-643, 625-645, 636-656, 726-746, 923-943, 1065-1085 y 1258-1278 de SEQ ID NO:1, [B] es una secuencia de ribonucleótidos que consiste en de 3 a 23 nucleótidos, y [A'] es una secuencia de ribonucleótidos que consiste en la secuencia complementaria de [A].
4. La composición para uso de la reivindicación 3 o el uso de la reivindicación 3, en donde dicha composición comprende un agente potenciador de la transfección.
5. Un polinucleótido para el uso en el tratamiento de un tumor caracterizado por la sobreexpresión de ZNFN3A1, en donde el polinucleótido comprende una combinación de un ácido nucleico de cadena sentido y un ácido nucleico de cadena antisentido, en donde dicho ácido nucleico de cadena sentido comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos 451-471, 532-552, 623-643, 625-645, 636-656, 726-746, 923-943, 1065-1085 y 1258-1278 de SEQ ID NO:1, y dicho ácido nucleico de cadena antisentido consiste en la secuencia complementaria de dicha secuencia de nucleótidos, en donde dicho polinucleótido es un oligonucleótido que tiene entre 19 y 25 nucleótidos de longitud.
6. El polinucleótido para uso de la reivindicación 5, en donde dichos ácido nucleico de cadena sentido y ácido nucleico de cadena antisentido están en la misma cadena.
7. Un vector para uso en el tratamiento de un tumor caracterizado por la sobreexpresión de ZNFN3A1, en donde el vector comprende un polinucleótido que comprende una combinación de secuencia de un ácido nucleico de cadena sentido y un ácido nucleico de cadena antisentido, en donde dicho ácido nucleico de cadena sentido comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos 451-471, 532-552, 623-643, 625-645, 636-656, 726-746, 923-943, 1065-1085 y 1258-1278 de SEQ ID NO:1, y dicho ácido nucleico de cadena antisentido consiste en la secuencia complementaria de dicha secuencia de nucleótidos, en donde dicho polinucleótido es un oligonucleótido que tiene entre 19 y 25 nucleótidos de longitud.
8. El vector para uso de la reivindicación 7, en donde dicho polinucleótido tiene la fórmula general 5'-[A]-[B]-[A']-3', en donde [A] es una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos 451-471, 532-552, 623-643, 625-645, 636-656, 726-746, 923-943, 1065-1085 y 1258-1278 de SEQ ID NO:1, [B] es una secuencia de nucleótidos que consiste en de 3 a 23 nucleótidos, y [A'] es una secuencia de nucleótidos que consiste en la secuencia complementaria de [A].
9. Una composición para uso en el tratamiento de un tumor caracterizado por la sobreexpresión de ZNFN3A1, en donde la composición comprende al menos un ARNip que comprende una combinación de un ácido nucleico de cadena sentido y un ácido nucleico de cadena antisentido, en donde dicho ácido nucleico de cadena sentido comprende una secuencia de ribonucleótidos que corresponde a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos 451-471, 532-552, 623-643, 625-645, 636-656, 726-746, 923-943, 1065-1085 y 1258-1278 de SEQ ID NO:1, y dicho ácido nucleico de cadena antisentido consiste en la secuencia complementaria de dicha secuencia de nucleótidos, en donde dicho ARNip tiene entre 19 y 25 nucleótidos de longitud.
10. Una molécula bicatenaria para su uso en el tratamiento de un tumor caracterizado por la sobreexpresión de ZNFN3A1, en donde la molécula bicatenaria comprende una cadena sentido y una cadena antisentido, en donde la cadena sentido comprende una secuencia de ribonucleótidos que corresponde a una secuencia diana de ZNFN3A1, y en donde la cadena antisentido comprende una secuencia de ribonucleótidos que es

- 5 complementaria a dicha cadena sentido, en donde dicha cadena sentido y dicha cadena antisentido hibridan entre sí para formar dicha molécula bicatenaria, en donde dicha molécula bicatenaria, cuando se introduce en una célula que expresa el gen ZNFN3A1, inhibe la expresión de dicho gen, y en donde dicha secuencia diana de ZNFN3A1 se selecciona del grupo que consiste en los nucleótidos 451-471, 532-552, 623-643, 625-645, 636-656, 726-746, 923-943, 1065-1085 y 1258-1278 de SEQ ID NO:1, y dicha molécula bicatenaria es un oligonucleótido de entre 19 y 25 nucleótidos de longitud.
- 10 11. La molécula bicatenaria para uso de la reivindicación 10, en donde un único transcrito de ribonucleótidos comprende la cadena sentido y la cadena antisentido, dicha molécula bicatenaria comprende además una secuencia monocatenaria de ribonucleótidos que une dicha cadena sentido y dicha cadena antisentido.
- 15 12. Un vector que codifica la molécula bicatenaria de la reivindicación 10 o 11, para uso de la reivindicación 10.
13. El vector para uso de la reivindicación 12, en donde el vector codifica un transcrito que tiene una estructura secundaria, en donde el transcrito comprende la cadena sentido y la cadena antisentido.
- 20 14. El vector para uso de la reivindicación 13, en donde el transcrito comprende además una secuencia monocatenaria de ribonucleótidos que une dicha cadena sentido y dicha cadena antisentido.
15. La composición para uso de la reivindicación 1 o 11, el uso de la reivindicación 2, el polinucleótido para uso de la reivindicación 5, el vector para uso de la reivindicación 7 o la molécula bicatenaria para uso de la reivindicación 10, en donde dicho tumor es un cáncer colorrectal o cáncer de hígado.
- 25 16. La composición para uso, el uso, el polinucleótido para uso, el vector para uso o la molécula bicatenaria para uso de la reivindicación 15, en donde
 (a) el cáncer colorrectal es un adenocarcinoma; o
 (b) el cáncer de hígado es un carcinoma hepatocelular.

Figura 1

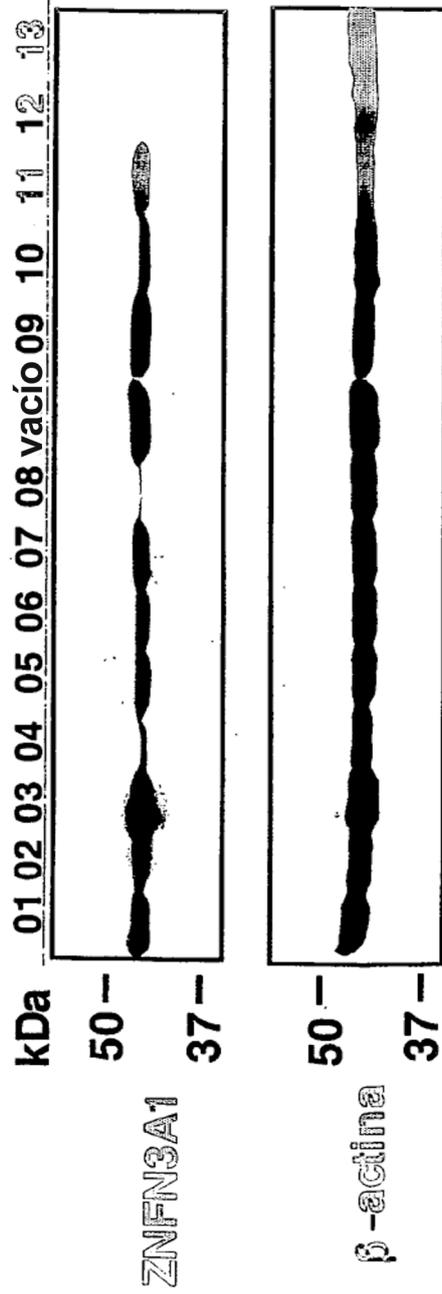


Figura 2

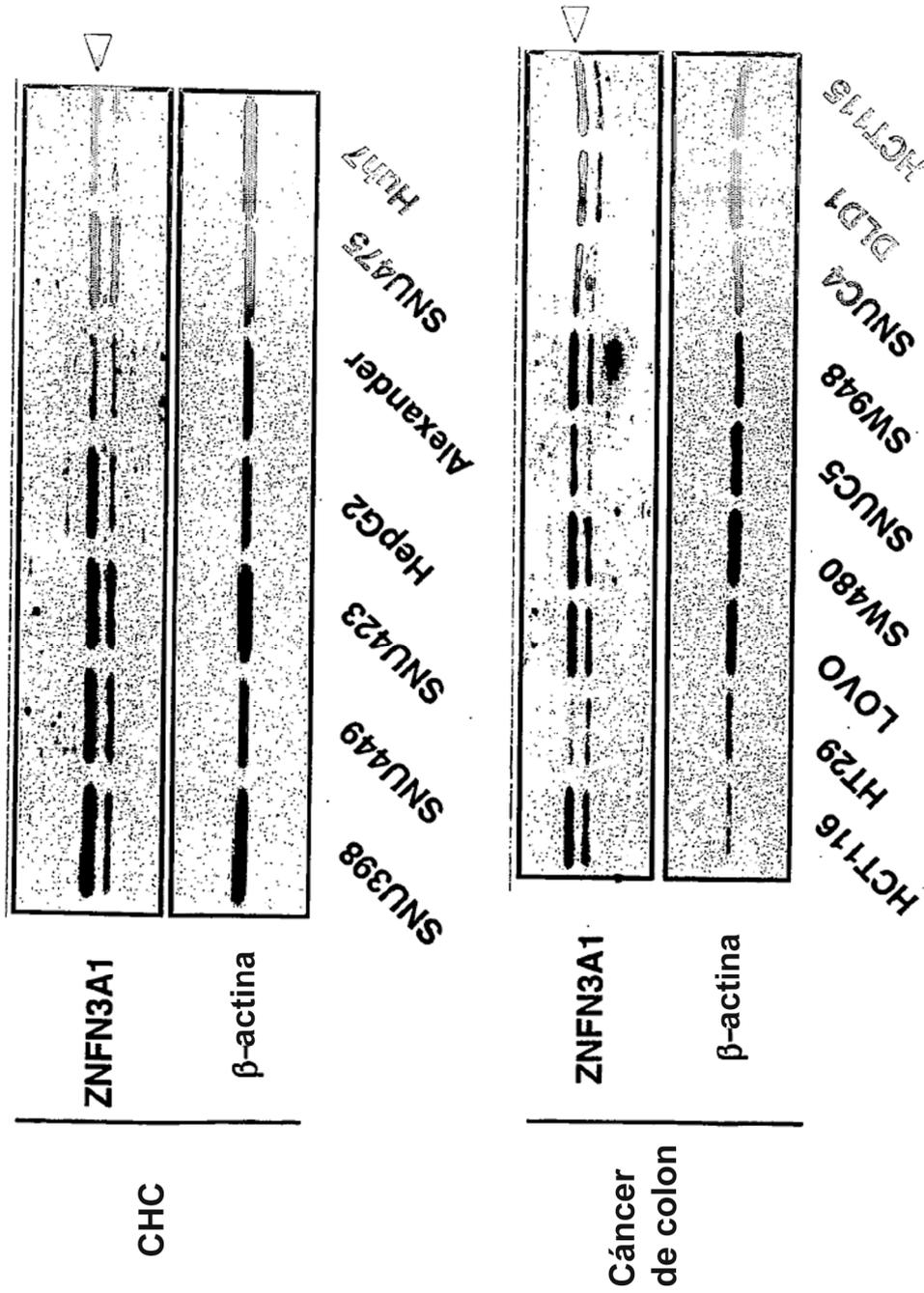


Figura 3

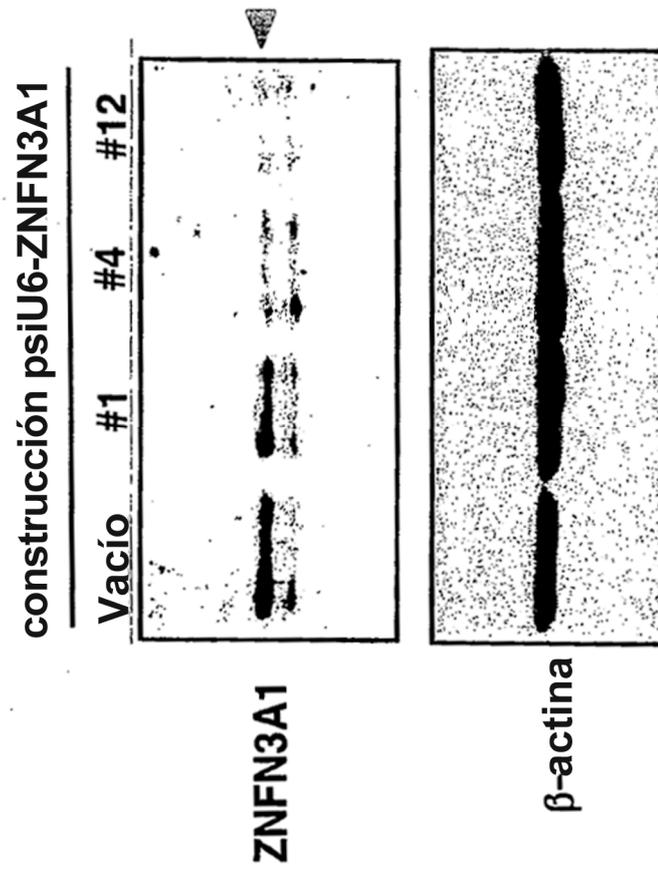


Figura 4

ensayo con MTT

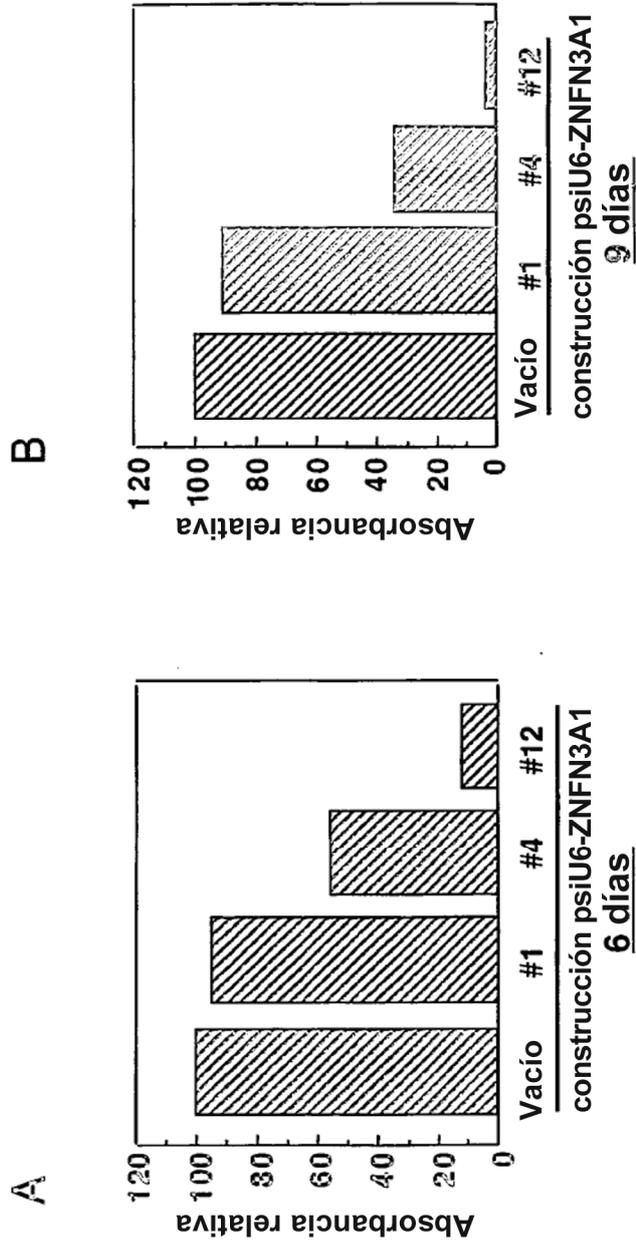


Figura 5

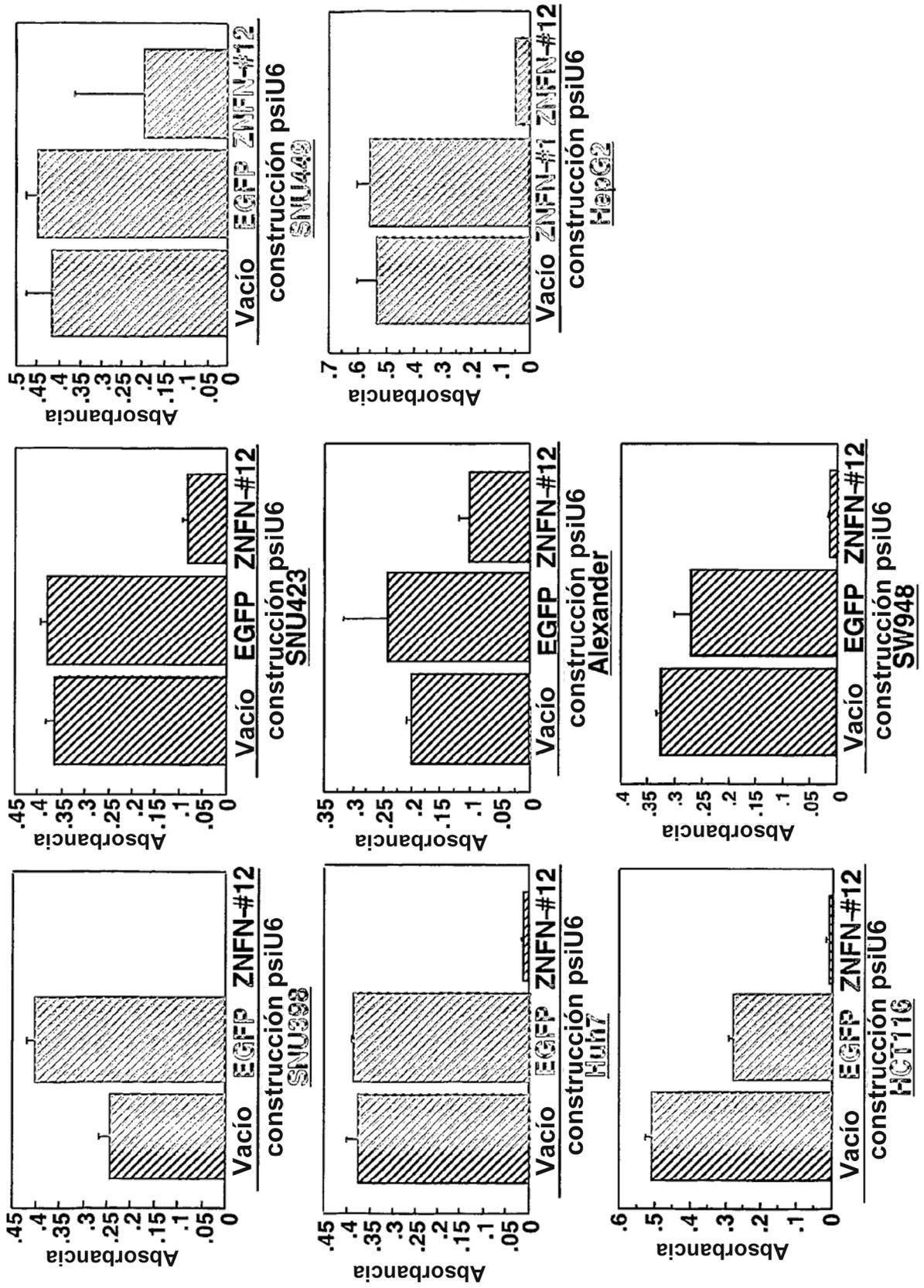
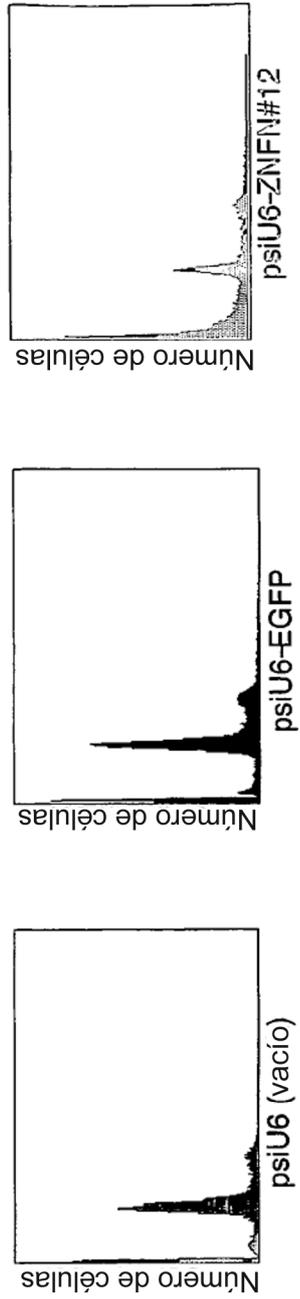


Figura 6

Análisis por FACS



Plásmidos transfectados	Región (%)			
	Sub-G1	G0/G1	S	G2/M
psiU6 (Vacío)	16,01	71,18	5,07	7,15
psiU6-EGFP	16,32	58,87	10,91	12,43
psiU6-ZNFN#12	62,30	26,23	4,42	6,53