



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 365 511**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04752867 .4**

96 Fecha de presentación : **21.05.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1625142**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.02.2006**

54 Título: **Marcadores para células precancerosas y cancerosas y método para interferir con la proliferación celular.**

30 Prioridad: **21.05.2003 US 472106 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.10.2011

73 Titular/es: **ANDES BIOTECHNOLOGIES S.A.**
Avda. Zanartu 1482
Nuñoa, Santiago, CL

72 Inventor/es: **Burzio, Luis, O.;**
Villegas, Jaime, E. y
Burzio, Veronica, A.

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

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

Marcadores para células precancerosas y cancerosas y método para interferir con la proliferación celular.

CAMPO DE LA INVENCION

5 Esta invención se relaciona con la terapia del cáncer, el diagnóstico del cáncer y reactivos para la investigación en relación con una nueva familia de ARNs (Ácidos ribonucleicos) mitocondriales humanos, mencionados como ARNs quiméricos mitocondriales. Particularmente la invención concierne a oligonucleótidos dirigidos a los ARNs mitocondriales humanos quiméricos. Los oligonucleótidos de la invención hibridizan con los ARNs mitocondriales humanos quiméricos induciendo la muerte de las células cancerosas. Las composiciones y los métodos provistos en la invención son útiles como una nueva terapia del cáncer. Además, los oligonucleótidos pueden ser usados en el diagnóstico de células cancerosas y precancerosas basado en la expresión diferencial de los ARNs quiméricos mitocondriales en células normales en reposo y en proliferación, células precancerosas y cancerosas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Mitocondrias

15 Las mitocondrias son organelos subcelulares que sintetizan la adenosina trifosfato (ATP), molécula esencial para el metabolismo, mediante la fosforilación oxidativa. El ADN mitocondrial humano (ADNmt) de 16.654 pares de bases (pb) codifica dos ARN ribosomales (ARNr), 22 ARN de transferencia (ARNt) y 13 marcos de lectura (ORF) que codifican un número similar de polipéptidos (Clayton, 2000; Taanman, 1999). En base del contenido de bases G+T, las dos hebras del ADNmt difieren en su densidad de flotación* y pueden ser separadas en gradientes desnaturizantes de cloruro de cesio. La hebra pesada (hebra H) codifica los dos ARN ribosomales (12S y 16S), 14 ARNt y 12 polipéptidos que corresponden a ND 1, ND 2, ND 3, ND4L, ND4, ND 5, COX I COX II, COX III, ATP6, ATP8 y Cyt b. La hebra liviana (hebra L) codifica 8 ARNts y la subunidad ND6 del complejo NAD deshidrogenasa (Clayton, 2000; Taanman, 1999).

25 Una alta proporción del ADNmt contiene una estructura corta de tres hebras llamada el lazo de desplazamiento o lazo D. Esta región, que en seres humanos tiene 1.006 pares de bases está limitada por los genes de los ARNts para fenilalanina (tARN^{Phe}) y para prolina (tARN^{Pro}). Ella contiene una hebra corta de ácido nucleico, complementaria a la hebra L, que desplaza la hebra H (Clayton, 2000; Taanman, 1999). Esta región ha evolucionado como el sitio principal de control de la expresión de ADNmt, conteniendo el origen de la replicación de la hebra H, y los promotores principales de la transcripción de las hebras H (HSP) y L (LSP). A pesar de la cercanía de los sitios HSP y LSP (cerca de 150 pares de bases), estos reguladores son independientemente funcionalmente tanto *in vitro* (Shuey y Atardi, 1985; Taanman, 1999) como *in vivo*, usando el modelo de pacientes con enfermedades mitocondriales (Chinnery y Turnbull, 2000).

35 Ambas hebras se transcriben como ARNs policistrónicos que son luego procesados para liberar los ARNms, ARNts y ARNrs (Taanman, 1999). En seres humanos la ARN polimerasa mitocondrial es una proteína de 1.230 aminoácidos con una homología significativa con la secuencia de la ARN polimerasa mitocondrial de levaduras y las ARN polimerasas de varios bacteriófagos (Tiranti y colab. 1997). Además, se ha caracterizado una familia de factores de transcripción tal como el factor A o TFAM, que es esencial para la transcripción del ADNmt de mamíferos y es un miembro de la familia de proteínas de alta movilidad (HMG-box) que se unen al ADN (Parisi y Clayton, 1991). Recientemente, dos informes independientes han descrito las características de nuevos factores de transcripción, TBF1M y TBF2M en seres humanos y ratones (McCulloch y colab., 2002; Falkenberg y colab., 2002; Rantanen y colab., 2003). A pesar del considerable progreso en los elementos involucrados en la transcripción del ADNmt, que actúan en *cis* y *trans*, los detalles funcionales no se conocen completamente.

Mitocondrias y Apoptosis.

45 Las mitocondrias cumplen un papel central en la apoptosis, un proceso fundamental por el cual las células mueren en un proceso controlado o programado. Este programa de suicidio celular es esencial durante el desarrollo y para la homeostasis de todos los metazoos. La apoptosis es activada para eliminar células superfluas, dañadas, mutadas o envejecidas (Meier y colab., 2000). La desregulación de la apoptosis está implicada en la aparición de diversas patologías. Así la inhibición anormal de la apoptosis es la característica de las neoplasias, mientras que la apoptosis masiva se ha relacionado con enfermedades agudas tales como el infarto, shock séptico y enfermedades neurodegenerativas. Actualmente la apoptosis se describe basada en dos vías principales denominadas la vía extrínseca y la vía intrínseca (Zörnig y colab., 2001). La vía extrínseca corresponde a un proceso iniciado en la membrana celular por la unión de ligandos diferentes a los receptores de muerte celular_(Krammer, 2000; Zörnig y colab., 2001).

Las caspasas son enzimas responsables de la cascada proteolítica en la apoptosis. Las caspasas son sintetizadas como proteínas precursoras inactivas que experimentan una maduración o proceso proteolítico durante la inducción de la apoptosis (Zörnig y colab., 2001). Sin embargo, hay diversas evidencias experimentales nuevas que indican que las proteasas lisosomales constituyen una ruta alternativa de proteólisis luego de daños apoptóticos (Guicciardi y colab., 2004).

Por otra parte se han descrito proteínas antiapoptosis, homólogas a la oncoproteína humana Bcl-2. Esta proteína pertenece a una familia de proteínas que son anti apoptosis (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w) o pro-apoptosis (Bax, Bak, Bim, Bid, etc.) (Zörnig y colab., 2001).

Las mitocondrias son especialmente afectadas en forma temprana durante el proceso de apoptosis y actualmente son reconocidas como las coordinadoras centrales de la muerte celular (Boya y colab., 2003; Ferri y Kroemer, 2001; Zörnig y colab., 2001). Varias rutas de señales pro apoptóticas y de daño convergen en las mitocondrias induciendo la permeabilización de la membrana mitocondrial, fenómeno que está bajo el control de las proteínas Bcl-2 (Boya y colab., 2003; Zörnig y colab., 2001). Después que las células reciben daños apoptóticos, el potencial transmembrana ($\Delta\Psi_m$) se disipa resultando en una completa permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la consecuente salida de proteínas mitocondriales tóxicas. El primer ejemplo de la filtración de una proteína mitocondrial fue la liberación de citocromo c (Liu y colab., 2001). Al estar presente el citocromo c en el citosol, se induce el ensamblaje del complejo de activación de caspasas llamado apoptosoma. El citocromo c se une al Apaf-1 (Factor-1 de activación de proteasas apoptóticas) facilitando la unión de dATP/ATP al complejo y la oligomerización de Apaf-1 (Adrain y colab., 1999; Benedict y colab., 2000). La oligomerización de Apaf-1 permite el reclutamiento de pro-caspasa-9, la que cataliza activación proteolítica del precursor y la producción de caspasa-9 activa. (Adrain y colab., 1994; Benedict y colab., 2000).

Se ha descrito una familia de inhibidores citosólicos de las proteínas de la apoptosis que se conocen como XIAP, c-IAP1 y c-IAP2. Dichas proteínas se unen, e inhiben a las caspasa-3 y la caspasa-9 deteniendo la cascada de degradación. Sin embargo las células contienen mecanismos para eludir esta ruta antiapoptótica. En células en apoptosis las caspasas se liberan de la barrera inhibitoria uniéndose a IAPs de una proteína conocida como Smac* (Segundo activador mitocondrial de caspasas) o DIABLO (Proteína que se une a IAP a pH bajo) (Verhagen y colab., 2002). Al unirse a IAPs, Smac/DIABLO desplazan las caspasas activas de las IAPs promoviendo la muerte celular. Otra proteína, conocida como HtrA2, se libera de la mitocondria al citosol después de un daño apoptótico, lugar donde se une a las IAPs en forma similar a Smac/DIABLO facilitando así la activación de las caspasas (Verhagen y colab., 2002; Martins y colab., 2001; Suzuki y colab., 2001; Hedge y colab., 2002).

El factor de inducción de apoptosis (AIF) es otro componente de la cascada apoptótica. Después de inducida la apoptosis, el AIF se traslada al citosol y al núcleo. En el núcleo, el AIF induce la condensación de la cromatina periférica y la fragmentación del ADN. El AIF también induce otras características de la apoptosis como la disipación de $\Delta\Psi_m$, y la exposición de fosfatidilserina (Zörnig y colab., 2001). Un factor que parece regular la actividad apoptótica de AIF es la proteína de shock térmico 70 (Ravagnan y colab., 2001). Otro factor mitocondrial que se traslada al núcleo igual que el AIF es la endonucleasa G o Endo G. En el núcleo, Endo G produce la fragmentación del ADN incluso en presencia de inhibidores de caspasas (Li y colab., 2001). Endo G puede actuar en forma similar a la CAD (ADNasa activada por caspasa), una nucleasa cuya activación depende críticamente de caspasas (Samejima y colab., 2001).

Cáncer y precáncer.

El cáncer es una enfermedad celular cuya particularidad única es la pérdida del control normal del ciclo celular, resultando en un crecimiento descontrolado, desdiferenciación y habilidad para invadir otros tejidos y crear metástasis. Carcinogénesis es el proceso por el cual una célula normal se transforma en una célula cancerosa. La carcinogénesis es un proceso de múltiples etapas que comienza con un incidente genético de iniciación, seguido durante la etapa de promoción, por la multiplicación selectiva de las células alteradas para formar adenomas tempranos. En ausencia de una continua promoción, el adenoma revierte y desaparece. Con un segundo accidente genético, un pequeño grupo de adenomas promovidos continuamente progresan hasta formar adenomas tardíos, algunos de los cuales pueden sufrir la conversión maligna (McKinnell y colab., 1998).

La etiología del cáncer es compleja e incluye alteraciones de la regulación del ciclo celular, aberraciones cromosómicas y ruptura de cromosomas. Se piensa que agentes infecciosos como varios tipos de oncovirus, sustancias químicas, radiaciones (ultravioleta o ionizantes) y desórdenes inmunológicos son las grandes causas de la carcinogénesis (McKinnell y colab., 1998).

Desde hace tiempo se ha propuesto que el cáncer está también relacionado con la disfunción mitocondrial. Una de estas teorías sugiere que la mutación mitocondrial puede ser la causa primaria de la transformación celular y del cáncer (Warburg, 1956; Carew y Wang, 2002). Se han descrito alteraciones en el ADN mitocondrial (ADNmt) en cánceres hematológicos (Clayton y Vinograd, 1967) y en el cáncer mamario (Tan y colab., 2002; Parrella y colab.,

2001). También se han descrito mutaciones en varias regiones del ADNmt y deleciones en pacientes de cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer ovárico, cáncer gástrico, cáncer pancreático, carcinoma hepatocelular, cáncer de esófago, cáncer renal, cáncer tiroideo y tumores encefálicos (revisión en Carew y Wang, 2002). En general, parece haber dos alteraciones características en el ADNmt en los distintos tipos de tumores. La mayoría de las mutaciones consisten en transiciones de bases de T a C y de G a A. En segundo lugar, aún cuando hay diversidad en los genes particulares en que ocurren las mutaciones, en la mayoría de los tipos tumorales, el asa D parece ser la región en que las mutaciones son más frecuentes en el ADNmt.

Las células precancerosas se definen aquí como células transformadas que pueden evolucionar o diferenciarse en células malignas. Algunos ejemplos de ellas son las células transformadas por el ADN o ARN de oncoviruses.

La presente invención se relaciona con una nueva familia de ARNs mitocondriales y el uso de dichos ARNs como blancos para el diagnóstico y la terapia del cáncer. La invención se refiere a las composiciones y los métodos que son útiles para diferenciar células normales de células tumorales o de células precancerosas o células transformadas por virus oncogénicos. En particular, como se detalla más adelante, la invención describe las composiciones y métodos para ensayos diagnósticos destinados a diferenciar células normales de células cancerosas y precancerosas. En otro contenido, la invención se refiere a las composiciones y métodos para inducir la muerte selectiva y masiva de las células tumorales. Por consiguiente la invención provee materiales y métodos que pueden ser usados en el diagnóstico y terapia del cáncer y precáncer y también en investigación.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención está dirigida a composiciones y métodos útiles para detectar una nueva familia de ARNs mitocondriales humanos, mencionados como ARNs quiméricos mitocondriales, que se expresan diferencialmente en células normales en reposo y en proliferación, células precancerosas y cancerosas.

ARN quimérico mitocondrial sentido.

Un aspecto de esta invención consiste en proporcionar las composiciones y los métodos para detectar un ARN quimérico mitocondrial sentido compuesto por un repetido invertido de 815 nucleótidos unido covalentemente al extremo 5' del ARN ribosómico mitocondrial 16S (SEQ ID NO 1, Figura 1 A). El repetido invertido corresponde a un fragmento de 815 nucleótidos del ARN transcrito desde la hebra L del gen de 16S del ADNmt. Por tanto, la síntesis de este nuevo ARN requiere la transcripción de la hebra L y la hebra H del gen de 16S del ADNmt. Como la transcripción de ambas hebras del ADNmt está regulada por diferentes promotores, en esta nueva invención nos referimos a este nuevo ARN como el ARN quimérico mitocondrial (SEQ ID NO 1). Además, como el repetido invertido de 815 nucleótidos se une al ARN 16S sentido (transcrito desde la hebra H) nos referimos a este nuevo ARN como el "ARN quimérico mitocondrial sentido".

Esta invención aporta métodos y composiciones para detectar la expresión del ARN quimérico mitocondrial sentido en células cultivadas, muestras celulares y cortes de tejidos. La detección puede ser efectuada por hibridación *in situ*.

En otro aspecto de esta invención, pruebas de hibridación *in situ* revelan que el ARN quimérico mitocondrial sentido se expresa en células normales en proliferación, células tumorales en cultivo y en células tumorales presentes en biopsias de diferentes tipos tumorales humanos. El ARN quimérico mitocondrial sentido no se expresa en células normales en reposo proliferativo. Se describen métodos y composiciones para detectar un nuevo segundo ARN quimérico mitocondrial sentido en células transformadas por el virus del papiloma 16 o 18 (Hausen, 1996). En estas células transformadas se expresa un nuevo ARN quimérico mitocondrial sentido compuesto por un repetido invertido de 754 nucleótidos unidos covalentemente al extremo 5' del ARN mitocondrial 16S (SEQ ID NO2, Figura 1 B). Dicho ARN no está presente en células normales en proliferación ni en células tumorales. Los métodos y composiciones moleculares también demostraron un tercer ARN quimérico mitocondrial sentido, que comprende una secuencia invertida de 694 nucleótidos unidos covalentemente al extremo 5' del ARN mitocondrial 16S (SEQ ID NO 3, Figura 1 C), que está presente en células transformadas por HTLV-1.

ARN quimérico mitocondrial antisentido.

En otro aspecto de la invención, se proporcionan composiciones de moléculas de ARN quimérico mitocondrial humano aislado que comprenden el ARN ribosómico mitocondrial 16S antisentido unido covalentemente en su extremo 5' al extremo 3' de un polinucleótido con la secuencia repetida invertida.

Las células normales en proliferación expresan ARNs quiméricos mitocondriales antisentido que corresponden a las SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6. Estos transcritos contienen repetidos invertidos de largo variable (transcritos de la hebra H) unidos al extremo 5' del ARN 16S mitocondrial ribosomal antisentido (transcrito de la hebra L), de allí el nombre de ARN quimérico mitocondrial antisentido. La expresión del ARN quimérico mitocondrial

antisentido está inhibida en cultivos de líneas celulares tumorales y también en células tumorales presentes en biopsias humanas de tipos de tumores diferentes y también en células transformadas o precancerosas. Por tanto, la invención presente provee métodos y composiciones para detectar la expresión de los ARN quimérico mitocondrial sentido y antisentido y así distinguir las células normales en proliferación de las células cancerosas y precancerosas, y por ende entrega un nuevo marcador para células precancerosas y cancerosas.

En este aspecto, la invención se relaciona con un método de detección seleccionado de:

(A) un método para distinguir entre células normales y células pre-cancerosas o cancerosas que comprende las etapas de:

determinar un nivel de al menos uno de los ARNs quiméricos mitocondriales antisentido humanos de SEQ ID Nos. 4-6, y

determinar un nivel del ARN quimérico mitocondrial sentido humano de SEQ ID No. 1;

(B) un método para distinguir entre células normales en reposo proliferativo, células normales en proliferación, células pre-cancerosas y células cancerosas, que comprende las etapas de:

determinar un nivel de al menos uno de los ARNs quiméricos mitocondriales antisentido humanos de SEQ ID Nos. 4-6, y

determinar un nivel del ARN quimérico mitocondrial sentido humano de SEQ ID No. 2; y

(C) un método en el que células transformadas con virus ARN se distinguen de células cancerosas o células normales, que comprende la etapa de determinar el nivel del ARN quimérico mitocondrial sentido humano de SEQ ID No. 3, y

en el que dichas etapas de determinación no se llevan a cabo *in vivo*.

Terapia del Cáncer

En otro contenido de esta invención, se proveen métodos y composiciones que interfieren con los ARNs quiméricos mitocondriales antisentido. Un aspecto preferido consiste en interferir con el ARN quimérico mitocondrial antisentido en células tumorales que contengan un bajo número de copias de este transcrito. La interferencia es realizada usando oligonucleótidos o análogos de oligonucleótidos cuyas secuencias son complementarias a las secuencias del ARN quimérico mitocondrial antisentido (SEQ ID NO 4 y/o SEQ ID NO 5 y/o SEQ ID NO 6). El tratamiento de células tumorales de diferentes tipos con uno o más de estos oligonucleótidos complementarios induce la muerte celular o la apoptosis. El tratamiento del cáncer y precáncer se lleva a cabo con compuestos u oligonucleótidos de 10 a 50 bases de longitud que son suficientemente complementarios a una molécula de ARN quimérico mitocondrial humano que comprende un ARN ribosómico mitocondrial 16S antisentido unido covalentemente en su extremo 5' al extremo 3' de un polinucleótido con una secuencia repetida invertida para poder hibridar con esa molécula de ARN quimérico mitocondrial humano para formar una pareja estable. Los oligonucleótidos son preferiblemente compuestos de 15 a 50 nucleótidos en que al menos 15 bases son complementarias a SEQ ID NO 4 y/o SEQ ID NO 5 y/o SEQ ID NO 6. En SEQ ID NOS 9 al 98 se muestran ejemplos de dichos oligonucleótidos complementarios. La inducción de la apoptosis es selectiva puesto que linfocitos humanos (célula en reposo proliferativo) o linfocitos humanos estimulados con fitohemaglutinina (células normales en proliferación) no sufren apoptosis después del tratamiento con oligonucleótidos complementarios a las secuencias de ARN quimérico mitocondrial antisentido bajo las mismas condiciones experimentales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIGURA 1 A, B y C. Esquemas que muestran la estructura del ARN quimérico mitocondrial correspondiente a las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3. Las flechas indican la posición relativa de los partidores utilizados para amplificar segmentos de ARN. Las flechas bajo las líneas son partidores reversos. Las flechas sobre las líneas corresponden a partidores directos. El partidor 1 está ubicado cercano al extremo 5' del ARN mitocondrial 16S. Las líneas negras continuas corresponden al ARN mitocondrial 16S sentido, mientras que las líneas punteadas corresponden al ARN mitocondrial 16S antisentido.

FIGURA 2. Electroforesis en gel de agarosa para mostrar el producto de amplificación obtenido entre el partidor 1 y el partidor 3 indicados en la Figura 1A. La amplificación se realizó por RT-PCR usando como molde células tumorales (SiHa), keratinocitos transformados por HPV 16 (HFK698) o linfocitos B transformados por HLTV-1. Con el ARN de células SiHa se obtuvo un solo amplicón de 210 pares de bases que corresponde a un segmento de la

SEQ ID NO 1. En ARN total de keratinocitos transformados con HPV 16, además del amplicón de 210 pares de bases se obtuvo un segundo amplicón de 150 pares de bases que corresponde a un segmento de SEQ ID NO 2. Con ARN de células transformadas con HLTV-1, además de los amplicones de 210 pares de bases y de 150 pares de bases se obtuvo un tercer amplicón que corresponde a un fragmento de SEQ ID NO 3.

5 FIGURA 3. Esquemas que muestran la estructura del ARN quimérico mitocondrial correspondiente a las SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 Y SEQ ID NO 6. Las flechas indican la posición relativa de los partidores utilizados para amplificar segmentos de ARN. El partidador 1 está ubicado cercano al extremo 5' del ARN mitocondrial 16S. La estrategia para obtener la secuencia de estos transcritos es similar a la descrita para la Fig. 1.

10 FIGURAS 4A y 4B. Ensayos de hibridación *in situ* realizados con varias líneas de células tumorales en cultivo. Las células fueron hibridadas con sondas oligonucleotídicas complementarias al ARN quimérico mitocondrial sentido marcadas con digoxigenina (columna izquierda). Adicionalmente, cortes paralelos de tumor fueron hibridizados con sondas oligonucleotídicas complementarias al ARN quimérico mitocondrial antisentido marcadas con digoxigenina (columna derecha).

15 FIGURA 5A. Hibridación *in situ* de secciones de biopsias humanas correspondientes a diferentes tipos tumorales. Las secciones de tumores se hibridaron con sondas oligonucleotídicas complementarias al ARN quimérico mitocondrial sentido marcadas con digoxigenina (columna izquierda). Adicionalmente, secciones paralelas de los tumores se hibridaron con sondas oligonucleotídicas complementarias al ARN quimérico mitocondrial antisentido marcadas con digoxigenina (columna derecha).

20 La Figura 5B corresponde a hibridación *in situ* de diferentes tumores humanos con sondas oligonucleotídicas complementarias al ARN quimérico mitocondrial sentido marcadas con digoxigenina.

25 FIGURA 6. Hibridación de células normales en proliferación. Las muestras fueron hibridizadas con sondas dirigidas al ARN quimérico mitocondrial sentido o antisentido marcadas con digoxigenina. Se obtuvo una fuerte señal de hibridación con ambas sondas, una complementaria al ARN quimérico mitocondrial sentido (columna izquierda) y la otra al ARN quimérico mitocondrial antisentido (columna derecha). Los tejidos y células están identificados a la izquierda.

30 FIGURA 7. Inmunocitoquímica e hibridación *in situ* que muestra los cambios de expresión en linfocitos estimulados a proliferar con el mitógeno PHA. Después de 48 horas de estimulación con PHA, los linfocitos expresan los antígenos Ki-67 y PCNA (columna derecha). Estos antígenos no se expresan en los linfocitos control o en reposo (columna izquierda). La hibridación *in situ* fue efectuada con sondas oligonucleotídicas dirigidas al ARN quimérico mitocondrial sentido y antisentido, marcadas con digoxigenina. Los linfocitos estimulados expresan tanto el ARN quimérico mitocondrial sentido como el ARN quimérico mitocondrial antisentido (columna derecha)

FIGURA 8. Hibridación *in situ* de células tumorales mostrando la localización del ARN quimérico mitocondrial sentido en el nucléolo. Las células o los cortes de tumor se individualizan a la izquierda.

35 FIGURA 9. Microscopía fluorescente que revela los cambios que ocurren en células de tumor HL-60 tratadas con oligonucleótidos dirigidos a ARN quimérico mitocondrial antisentido. A, B, C y D muestran la tinción con un compuesto (VAD-fmok) que se une con gran afinidad a caspasas activadas. Este compuesto está marcado con fluorosceína. Las sondas de oligonucleótidos dirigidas al ARN quimérico mitocondrial antisentido inducen la activación de caspasas de manera similar a la droga estaurosporina (compare B con C). No se detectan caspasas activadas en células control no tratadas (A) o en células tratadas con sondas de oligonucleótidos dirigidas al ARN mitocondrial 12S (D), como control. E y F muestran la tinción de células HL-60 con DAPI. Células controles (no tratadas) muestran una tinción homogénea del núcleo (E), en tanto que las células tratadas con sondas de oligonucleótidos dirigidas al ARN quimérico mitocondrial antisentido muestran extensa fragmentación del núcleo (F).

40 FIGURA 10 Porcentaje de células apoptóticas después de diferentes tratamientos de linfocitos en reposo y proliferando. La apoptosis fue medida en linfocitos en reposo o estimulados con PHA mediante tinción con DAPI. Las barras 1 y 2 corresponden a células no tratadas. Se observa un bajo nivel de apoptosis espontánea de células control (1) o linfocitos estimulados por PHA (2). Un nivel similar de apoptosis se observa en linfocitos en reposo (3) o estimulados por PHA (4) tratados con sondas de oligonucleótidos 15 μ M dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido durante 15 h, revelando que la apoptosis no es inducida en células normales. Como control, linfocitos en reposo proliferativo o en proliferación fueron tratados con estaurosporina. En estas condiciones cerca del 90% de los linfocitos en reposo proliferativo (5) o estimulados por PHA sufren apoptosis.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La familia de los ARN quiméricos mitocondriales

La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que las células humanas expresan una familia de nuevos ARN mitocondriales, llamados ARN quiméricos mitocondriales.

Uno de estos transcritos contiene un largo repetido invertido de 815 nucleótidos unido covalentemente al extremo 5' del ARN mitocondrial 16S, y denominado ARN quimérico mitocondrial sentido. Esta larga secuencia invertida es totalmente complementaria al ARN ribosomal 16S desde la posición 51 hasta la 866, formando un largo tallo y un lazo de 50 nucleótidos. Como se ve en la Figura 1A el tallo formado por 815 pares de bases representa un grave problema para que una transcriptasa reversa pueda sintetizar el ADNc correspondiente. Por lo tanto se usó una nueva estrategia para amplificar este ARN por RT-PCR la que está ilustrada en la Figura 1A. Después de obtener la secuencia de cada fragmento traslapado, éstas se ensamblaron como secuencias contiguas para obtener la secuencia completa del ARN quimérico mitocondrial sentido mostrado en SEQ ID N° 1 (Fig. 1A)

Otro aspecto de esta invención es el descubrimiento de otros nuevos ARNs quiméricos mitocondriales sentido que se expresan en células transformadas por el virus oncogénico de papiloma humano 16 o 18 (HPV16- HPV18). Se infectaron queratinocitos de prepucio humano (HFK) con el virus de papiloma humano 16 o 18 (Hausen, 1996). La infección produce la transformación o immortalización de las células HFK. Sin embargo, estas células no son tumorigénicas como las células relacionadas SiHa (infectadas con HPV16) o las células HeLa (infectadas con HPV 18). Estas células expresan el ARN quimérico mitocondrial sentido (SEQ ID NO 1) similar al de las células SiHa y HeLa. Sin embargo, las células transformadas adicionalmente expresan otro ARN mitocondrial sentido que contiene una secuencia invertida de 754 nucleótidos unidos al ARN ribosomal 16S (Fig 1 B) (SEQ ID NO 2). Este nuevo ARN quimérico mitocondrial sentido es inhibido o no expresado en células normales humanas (HFK) o en células tumorigénicas (SiHa or HeLa).

En otro contenido de esta invención determinamos la expresión de un tercer ARN quimérico mitocondrial sentido en células transformadas con HTLV-1 (Kobayashi y colab., 1984). Células MT-2 infectadas con HTLV-1 expresan el ARN quimérico mitocondrial sentido (SEQ ID NO 1) y el ARN quimérico mitocondrial sentido expresado en las células transformadas con HPV 16 o 18 (SEQ ID NO 2). Además de estos transcritos, la célula infectada con HTLV-1 expresa un tercer tipo de ARN quimérico mitocondrial sentido que contiene una secuencia repetitiva de 694 nucleótidos unida al extremo 5' del ARN ribosomal 16S. Este nuevo ARN (Fig. 1C) (SEQ ID NO 3) no se expresa en células normales en proliferación, ni en células tumorales ni en células transformadas por HPV 16 o 18.

Las células normales en proliferación, tal como los queratinocitos de prepucio humano (HFK) descritos en la sección anterior, también sobreexpresan el ARN quimérico mitocondrial sentido (Figura 6) (SEQ ID N°1). Los linfocitos humanos estimulados con mitógenos como la fitohemaglutinina (PHA) entran en fase S del ciclo celular y comienzan la síntesis de ADN (Yu y colab., 1991). Como células en proliferación, los linfocitos también expresan antígenos relacionados a la proliferación tal como Ki-67 y antígenos nucleares de proliferación celular o PCNA (Bantis y colab., 2004). Los linfocitos estimulados también sobreexpresan el ARN quimérico mitocondrial sentido (SEQ ID N° 1). Otras células en proliferación, como los linfocitos en el centro germinal del bazo, espermatogonias y células embrionarias, también sobreexpresan el ARN quimérico mitocondrial sentido (SEQ ID N° 1) (Figura 4). En oposición, las células que no están proliferando tales como linfocitos no estimulados o células musculares no expresan el ARN quimérico mitocondrial sentido (Figura 7).

Otro contenido de la invención, aporta métodos para distinguir células en proliferación normal de células tumorales. Como fue descrito anteriormente, las células tumorales y las células normales en proliferación sobreexpresan el ARN quimérico mitocondrial sentido descrito en SEQ ID N°1. Además, en situaciones específicas de infección con HPV y HTLV-1, se encuentran otros ARN quiméricos (SEQ ID N° 2 y SEQ ID N° 3). Sin embargo, la actual invención se basa también en el sorprendente descubrimiento que las células normales en proliferación también sobreexpresan un ARN quimérico mitocondrial antisentido. La expresión del ARN quimérico mitocondrial antisentido se confirmó en linfocitos humanos estimulados con PHA (Figura 7), en células HFK normales y en otras células normales en proliferación (Figura 6). Otro descubrimiento importante de la presente invención consiste en que, a diferencia de las células normales en proliferación las células tumorales no expresan ARN quimérico mitocondrial antisentido o inhiben marcadamente su producción (compare la Figura 4 con las Figuras 6 y 7).

Usando la misma estrategia descrita anteriormente para amplificar el ARN quimérico por RT-PCR, basada en fragmentos traslapados, se pudo determinar la estructura del ARN quimérico mitocondrial antisentido (Figura 3). La secuenciación y ensamblaje en secuencias contiguas revela una compleja familia de ARNs quiméricos mitocondriales antisentidos que contienen secuencias invertidas de largos diferentes unidas al extremo 5' del ARN ribosomal mitocondrial 16S (Figuras 3A, 3B y 3C) (SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6). La secuencia revela también la formación de estructuras de dos hebras o tallos en esos ARNs y la formación de lazos de 17, 96 y 451 nucleótidos respectivamente (Figuras 3A, B y C. SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6).

Otro contenido de la invención es el aporte de métodos y composiciones para seguir la transformación oncogénica de células por un virus oncogénico. Células HeLa (infectadas con HPV 18) o células SiHa (infectadas con HPV 16) sobreexpresan el ARN quimérico mitocondrial sentido pero inhiben la expresión de los ARNs quiméricos

mitocondriales antisentido. Por otra parte, las células HFK en proliferación normal sobreexpresan tanto el ARN quimérico mitocondrial sentido como los antisentidos. Después de transformar las células HFK con HPV 16 o HPV 18 ellas adquieren el fenotipo tumoral: sobreexpresan el ARN quimérico mitocondrial sentido e inhiben la expresión del ARN quimérico mitocondrial antisentido. La sobreexpresión del ARN quimérico mitocondrial sentido y la inhibición del ARN quimérico mitocondrial antisentido pueden ser determinadas por hibridación *in situ*, amplificación del ARN por RT-PCR u otros métodos para determinar un ARN mediante técnicas conocidas por personas expertas en estas artes. Estos métodos y composiciones pueden ser usado para determinar el cambio en la expresión de la familia de ARNs quiméricos en células transformadas por otros virus oncogénicos o por compuestos que inducen la transformación o carcinogénesis (McKinnell y colab. 1998).

10 Diagnóstico de Cáncer y Precáncer

En la presente invención se aportan los métodos y composiciones para detectar la presencia del ARN quimérico mitocondrial sentido y de los ARNs quiméricos mitocondriales antisentido. Un aspecto preferido es realizar la detección por hibridación *in situ*. La detección del ARN quimérico mitocondrial sentido y del ARN quimérico mitocondrial antisentido en las células de una muestra biológica indica que son células normales en proliferación. En otro contenido, el resultado de la hibridación *in situ* con células tumorales mostrará la expresión del ARN quimérico mitocondrial sentido y la inhibición o ausencia del ARN quimérico mitocondrial antisentido. Si la muestra biológica contiene células normales sin proliferar, la hibridación *in situ* mostrará que ni el ARN quimérico mitocondrial sentido ni el ARN quimérico mitocondrial antisentido se expresan.

Se entiende por muestra biológica, células normales (en reposo proliferativo o células en proliferación) en cultivo o en extendidos de sangre o de médula ósea, células tumorales en cultivo y células normales transformadas por un virus oncogénico. Además, las muestras biológicas incluyen células obtenidas de la orina o lavados de la vejiga de pacientes en que se sospecha la presencia de cáncer renal o vesical, o células de la saliva de pacientes en que se sospecha la presencia de cáncer de la cabeza o cuello o células de lavado broncoalveolar de pacientes en que se sospecha la presencia de cáncer pulmonar. Además, las muestras biológicas incluyen extendidos de sangre de pacientes en que se sospecha la presencia de leucemia o extendidos celulares de sangre o linfa y de nódulos linfáticos de pacientes en que se sospecha la presencia de metástasis.

Las muestras biológicas en la invención incluyen el uso de tejidos congelados rápidamente o preparados de células para análisis histopatológico, técnica muy conocida por aquéllos con experiencia en ese campo de la técnica. Alternativamente las muestras biológicas incluyen las biopsias de secciones fijadas mediante un tratamiento químico que puede ser realizado por una amplia gama de protocolos de fijación conocidos en la técnica (Frederick y colab. 1995; Celis, 1994). Las muestras biológicas pueden ser también materiales biológicos sin fijar que no han sido modificados químicamente o tratados con formalina u otro fijador conocido en la técnica.

Alternativamente, se puede efectuar la hibridación *in situ* usando muestras biológicas embebidas en materiales como parafina sólida u otros polímeros. Los bloques obtenidos pueden ser seccionados en cortes de 4 a 10 µm de espesor mediante un micrótopo. La sección se adhiere a una lámina de vidrio o plástico mediante un adhesivo conocido como polilisina o la proteína adhesiva de cholga (Burzio y colab., 1997)

La hibridación *in situ* de la presente invención puede ser realizada de diversas maneras conocidas por las personas expertas en la técnica. Por ejemplo se pone en contacto en condiciones de hibridación una solución que contenga una o más sondas marcadas, dirigidas a una o más de las secuencias del ARN quimérico mitocondrial sentido (SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3) o al ARN quimérico mitocondrial antisentido (SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6) ubicadas dentro de las células. Luego se compara la señal de hibridación con patrones establecidos de células normales o controles de células cancerosas y precancerosas.

Como se usan aquí, las sondas marcadas utilizadas en la hibridación *in situ* son ARN, ADN o ácidos nucleicos sintéticos que pueden ser preparados por cualquier método conocido en la técnica. Los ácidos nucleicos sintéticos incluyen ribosondas transcritas *in vitro* o fragmentos de PCR. En un aspecto preferido de esta invención se puede usar oligonucleótidos complementarios sintéticos. Las sondas de oligonucleótidos complementarios son de al menos 10 nucleótidos de largo, preferentemente de al menos alrededor de 14 y muy preferentemente de al menos 18 nucleótidos de largo. El técnico competente comprende que el largo puede extenderse desde 10 o más nucleótidos hasta cualquier largo que aún permita la hibridación con los ARNs quiméricos mitocondriales sentido y los ARNs quiméricos mitocondriales antisentido. En una forma preferida el largo es de alrededor de 30 nucleótidos, más preferida de alrededor de 25 nucleótidos y muy preferida de entre 10 a 50 nucleótidos de largo. También pueden usar como sondas ácidos nucleicos más largos. Las secuencias de la sonda son al menos noventa y cinco por ciento homólogas a las secuencias registradas en SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3, SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5 y SEQ ID N° 6.

Las sondas de oligonucleótidos complementarios de la invención actual generalmente contienen uniones fosfodiéster, aunque en algunos casos se incluyen sondas de oligonucleótidos análogos que pueden tener uniones

internucleótidos alternativas que incluyen pero no se limitan, a uniones fosforotioato (Mag y colab., 1991; y U.S. Pat. No 5.644.048), péptido de ácido nucleico o PNA (Egholm, 1993; y U.S. Pat. No. 6,656,687), fosforamida (Beaucage, 1993), fósforoditioato (Capaldi y colab., 2000). Otros análogos de oligonucleótidos complementarios se comprenden pero no se limitan a morfolino (Summerton, 1999), oligonucleótidos bloqueados (Wahlested y colab., 2000), ácidos nucleicos peptídicos o PNA (Nielsen y colab., 1993; Hyrup y Nielsen, 1996) u oligonucleótidos modificados por 2-o-(2-metoxi) etil en los terminales 5' y 3' (McKay y colab., 1999). Los ácidos nucleicos pueden contener cualquiera combinación de desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos y cualquiera combinación de bases incluyendo uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina, hipoxantina, isocitosina, isoguanina, etc.

En otro contenido de la invención las sondas de ácidos nucleicos o de oligonucleótidos deben ser marcadas para detectar la hibridación con ARNs quiméricos mitocondriales sentido o ARNs quiméricos mitocondriales antisentido. Estas sondas pueden ser marcadas con un marcador detectable por cualquier método conocido en la técnica. Los métodos de marcación incluyen utilización de cebadores al azar, marcaje de 3' terminal, PCR y *nick translation*. La marcación enzimática se realiza en presencia de polimerasa de ácido nucleico, de tres nucleótidos no marcados y de un cuarto nucleótido que está directamente marcado o que contiene un brazo al que puede ser unido un marcador, o se conecta a un hapteno o a otra molécula a la cual se pueda unir una molécula marcada. Los marcadores adecuados pueden ser marcadores radioactivos como ^{32}P , ^3H y ^{35}S y marcadores no radiactivos como marcadores fluorescentes. Los fluorocromos (fluoróforos) preferidos incluyen 5(6)-carboxilfluoresceína, ácido 6-((7-amino-4-metilcumarina-3-acetil)amino) hexanoico, 5(y 6)-carboxi-X-rodamina, colorante ciano-derivado 2 (Cy2), colorante ciano-derivado 3 (Cy3), colorante ciano-derivado 3.5 (Cy3.5), colorante ciano-derivado 5 (Cy5), colorante ciano-derivado 5.5 (Cy5.5), colorante ciano-derivado 7 (Cy7), colorante ciano-derivado 9 (Cy9) (los colorantes ciano-derivado 2, 3 3.5, 5 y 5.5 están disponibles como ésteres NHS en Amersham, Arlington Heights. Illinois) o los colorantes Alexa que comprenden Alexa 488, Alexa 532, Alexa 556, Alexa 590, etc. (Molecular Probes, Eugene, Oregon).

Las sondas pueden ser marcadas indirectamente incorporando un nucleótido unido covalentemente a un hapteno u otra molécula. Los haptenos de preferencia, sin estar limitados a ellos, son la 5(6)-carboxilfluoresceína, 2,4 dinitrofenil, digoxigenina y biotina, y efectuando la detección de la sonda con un anticuerpo marcado, dirigido a dicho hapteno o a otra molécula. En el caso de la biotina, la detección puede ser efectuada con avidina o estreptavidina conjugada a una marca detectable. Los anticuerpos, la estreptavidina o avidina pueden ser conjugadas a un marcador fluorescente o a un marcador enzimático como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa de rábano para hacerlas detectables. La estreptavidina o avidina conjugada y anticuerpos anti-digoxigenina están disponibles comercialmente en compañías tales como Vector Laboratories (Burlingame, California) and Boehringer Mannheim (Indianapolis, Indiana). Otra posibilidad es conjugar anticuerpos o estreptavidina con reactivos que permiten emisiones mejores y más estables (*quantum dot*, Wu y colab., 2003).

Las enzimas conjugadas a anticuerpos y estreptavidina pueden ser detectadas en una reacción colorimétrica agregando el sustrato a la enzima. En presencia de varios sustratos, se producen diferentes colores por la reacción, colores que pueden ser visualizados para detectar sondas múltiples por separado. Cualquier sustrato conocido en la técnica puede ser utilizado. Los sustratos preferidos para la fosfatasa alcalina incluyen el 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCIP) y el nitro azul de tetrazolio (NBT). Los sustratos preferidos para la peroxidasa de raíz de rábano es el diaminobenzoato (DAB). Los expertos en la técnica comprenden que también pueden ser usadas otras actividades enzimáticas.

Otro contenido de la presente invención es la descripción de las condiciones para efectuar la hibridación *in situ* y lograr resultados precisos y repetibles. Los expertos en la técnica reconocerán que los factores controlados comúnmente para vigilar la rigurosidad de la hibridación incluyen la concentración de formamida u otro agente desnaturante, la concentración de sales, la fuerza iónica, la temperatura de hibridación, la concentración de detergente, el pH y la presencia o ausencia de agentes caotrópicos. Estos factores pueden ser modulados para así controlar la rigurosidad de la hibridación de los oligonucleótidos sonda para el ARN quimérico. El grado óptimo de exactitud para un ensayo puede ser determinado experimentalmente examinando cada factor hasta que se alcanza el grado deseado de discriminación.

Otras condiciones que deben ser controladas para una hibridación *in situ* óptima son por ejemplo, el uso de reactivos químicos para bloquear la unión inespecífica de la sonda a los componentes químicos presentes en las muestras biológicas, además de los ARN quiméricos. Los agentes bloqueadores incluyen pero no se limitan a, ARN, ADN y oligonucleótidos sin marca. El agente bloqueador incorporado en la solución de hibridación suprimirá la unión inespecífica de la sonda marcada y por ende aumentará la razón señal ruido del ensayo. En un diferente aspecto de la invención la sonda tiene una secuencia complementaria a la secuencia de ARN quimérico mitocondrial sentido o antisentido (ver SEQ ID N°1, SEQ ID N°2, SEQ ID N°3, S EQ ID N°4, SEQ ID N°5 y SEQ ID N°6)

La fijación de la muestra biológica es también un aspecto importante de la hibridación que debe ser determinado experimentalmente. Los fijadores que producen gran cantidad de entrecruzamientos, como el glutaraldehído, no se recomiendan porque pueden bloquear el acceso de la sonda al ARN quimérico mitocondrial sentido o al ARN

quimérico mitocondrial antisentido. El método preferido en esta invención es la fijación de la muestra biológica con formalina, aunque también se prefieren las muestras congeladas. Para exponer a la sonda a los ARNs quiméricos mitocondriales sentido y el ARN quimérico mitocondrial antisentido pueden usarse procedimientos adicionales. Por ejemplo, la muestra biológica puede ser digerida con proteinasa K para eliminar las proteínas que pueden bloquear el acceso de la sonda a los ARNs quiméricos mitocondriales. El tratamiento de las muestras biológicas con proteinasa K u otras proteasas antes de la hibridación *in situ* es bien conocido por los expertos en la técnica.

Como se describió previamente, la presencia de secuencias repetidas invertidas largas en el ARN quimérico y en los ARNs quiméricos mitocondriales antisentido, inducen la formación de estructuras estables de dos hebras. Estas estructuras junto con las estructuras secundarias de la región de hebra única del ARN quimérico pueden constituir barreras al acceso de la sonda a los ARNs quiméricos. Por tanto, en otro aspecto de la invención, la muestra biológica es tratada con 0,2 M HCl por 10 min a temperatura ambiente para desnaturalizar el ARN quimérico. Luego la muestra es rápidamente neutralizada mediante varios lavados de la muestra con una solución tampón a pH 7,4 antes de aplicar el protocolo de hibridación descrito aquí. Sin más ayuda que la experimentación de rutina y el descubrimiento entregado aquí, los versados en la técnica pueden fácilmente determinar condiciones de hibridación adecuadas para efectuar ensayos que utilicen los métodos y especies químicas descritas más arriba. Las condiciones de hibridación *in situ* adecuadas son las condiciones adecuadas para efectuar un procedimiento de hibridación *in situ*. Por tanto las condiciones de hibridación adecuadas serán evidentes usando el descubrimiento y las referencias expuestas aquí; con o sin experimentación adicional de rutina.

Otro aspecto de la presente invención se relaciona con la localización de los ARNs quiméricos mitocondriales sentido, la cual puede tener información importante para el pronóstico y manejo del paciente con cáncer. En células tumorales, el ARN quimérico mitocondrial sentido se encuentra principalmente en el citoplasma en estrecha asociación con endosomas tardíos y lisosomas. Sin embargo, en ciertas células se presenta localizado en el nucléolo. En células tumorales presentes en biopsias humanas la señal de hibridación revela que el ARN quimérico mitocondrial sentido está sólo en el citoplasma o en citoplasma y el nucléolo o en el citoplasma y el núcleo. Por lo tanto las diferentes localizaciones pueden tener un valor pronóstico importante. En un contenido preferido, un panel de biopsias por ejemplo tumores de mama, colorrectales o de la próstata pueden ser estudiados por hibridación *in situ* para detectar el ARN quimérico. Junto con una señal positiva de hibridación (independiente de la marca de la sonda), la localización intracelular (sólo citoplasma, citoplasma y núcleo o citoplasma y nucléolo) debe ser establecida en cada tumor y los resultados comparados con la sobrevida de cada paciente.

En otro aspecto de esta invención, la mezcla de células individuales que contenga células normales y/o células tumorales puede ser sometida a hibridación en suspensión con sondas oligonucleotídicas marcadas con fluorocromos y complementarias al ARN quimérico mitocondrial sentido o al ARN quimérico mitocondrial antisentido. Por ejemplo la sonda o sondas dirigidas al ARN quimérico mitocondrial sentido puede ser marcada con rodamina, y la sonda o sondas dirigidas al ARN quimérico mitocondrial antisentido pueden ser marcadas con Alexa 488. Después de la hibridación y lavados bajo las condiciones anteriormente descritas, las células pueden ser analizadas por citometría de flujo de marcas intracelulares.

El contenido preferido de la invención es usar la hibridación *in situ* puesto que la información obtenida acerca de la localización específica del ARN quimérico en la célula tumoral aporta información importante adicional al pronóstico.

En otro aspecto de la invención, se considera el uso de métodos moleculares alternativos para detectar la expresión del ARN quimérico en células normales, y la expresión diferencial del ARN quimérico sentido y antisentido en células normales, precancerosas y cancerosas. Estos métodos alternativos incluyen, pero no se limitan a, *Northern blot*, hibridación en gota, microarreglos de oligonucleótidos para ARNs quimérico sentido y antisentido, amplificación del ARN por RT-PCR, amplificación del ARN mediada por transcripción *in vitro* o TMA, S1 o ensayos de protección de ribonucleasa, etc.

En un aspecto de la presente invención, el ARN quimérico mitocondrial sentido puede ser detectado con fines diagnósticos con una sonda obtenida por amplificación de una región que contiene parte del extremo 5' del ARN ribosomal 16S y una región parcial o total de la región de la secuencia invertida. Como se muestra en la Figura 1, el cebador inverso puede ser por ejemplo el partidor 1 (SEQ ID NO 139) y los cebadores directos pueden ser los partidores 3, 4, 5, 6 o 7 (SEQ ID NOS 129, 116, 106, 102, 63). También se pueden usar partidores localizados en otras posiciones y que pueden ser fácilmente diseñados por expertos en la técnica. En otro aspecto de la invención, también pueden ser utilizados ADNc sintetizados por una enzima con actividad de transcripción reversa y partidores al azar como hexámeros o más largos, procedimiento familiar a los versados en la técnica.

Los amplicones de 210, 350, 500 u 800 pares de bases obtenidos, o de otros largos resultantes de usar partidores colocados en otras posiciones pueden ser detectados por electroforesis en gel de agarosa o gel de poliacrilamida (Sambrook et al., 1989) y teñidos con bromuro de etidio u otro colorante intercalante. Los amplicones pueden ser purificados según las instrucciones de los fabricantes.

La detección del ARN quimérico mitocondrial puede ser realizada por análisis de *Northern blot* (Sambrook y colab., 1989). Después de separar los ARNs en un gel de agarosa los fragmentos son transferidos a una membrana (de nitrocelulosa o de Nylon) por procedimientos conocidos a los expertos en la técnica (Sambrook y colab., 1989). Para analizar la membrana, se puede amplificar un fragmento de 250 pares de bases que corresponde a las posiciones 1000 a 125 de ARN quimérico mitocondrial sentido. El amplicón es purificado (Wizart, Promega) según las instrucciones del fabricante y se utilizan 10 ng como molde para una segunda amplificación. La amplificación se efectúa con la mezcla estándar de PCR (Invitrogen) mas 5 micro Curie de ^{32}P - α -dCTP (Amersham). El fragmento de amplificación radiactivo es desnaturizado por incubación a 95° por 10 minutos y la sonda desnaturizada se agrega a la mezcla de hibridación. Las membranas son hibridizadas durante 16 horas a 65°C y después lavadas dos veces con tampón SSC doble concentración, dos veces con SSC 0,5 a 60° y SSC 0,2 a 45°C (Sambrook y colab., 1989). Después de los lavados la membrana se expone a película para rayos-X durante la noche a -70°C. La señal de hibridación en la membrana corresponde al componente mayor de cerca de 2.400 nucleótidos que es el tamaño correspondiente al ARN ribosomal 16S (1559 nucleótidos) más la secuencia invertida de 815 nucleótidos.

En otro aspecto de esta invención, parte del ARN quimérico mitocondrial sentido puede ser detectado después de digestión por ribonucleasa del ARN total extraído de células o tejidos. La estructura de dos hebras o tallo del ARN quimérico mitocondrial sentido es resistente a la digestión con ribonucleasa A. El ARN total de células o tejidos extraído por TRIzol(Invitrogen) se disuelve en un pequeño volumen de SSC doble concentración. La solución se incuba con Ribonucleasa A (Sigma) a una concentración final de 50 microgramos por ml. Después de 30 min a 25°C, el ARN resistente a la ribonucleasa es extraído con TRIzol y precipitado con isopropanol a -20° por la noche. El ARN resistente a la nucleasa se disuelve en agua destilada tratada con DEPC y usado como molde para amplificación por RT-PCR. La amplificación, realizada con partidores dirigidos a las posiciones 55 y 790 del ARN ribosomal 16S produce un fragmento de alrededor de 730 pares de bases con una secuencia que exhibe un 100% de identidad con la secuencia del tallo del ARN quimérico mitocondrial sentido (SEQ ID N°1). En contraste, la hebra simple del ARN quimérico correspondiente a la mitad 3', o el ARN 12S mitocondrial ribosómico o el ARNm para GAPDH son totalmente digeridos por el tratamiento con ribonucleasa A por lo que no se obtienen productos de amplificación cuando se usan partidores dirigidos a estos ARNs.

En otro aspecto de esta invención, el tallo del ARN quimérico mitocondrial sentido obtenido por el tratamiento del ARN total con ribonucleasa A puede ser detectado por *Northern blot*. El ARN resistente a nucleasa y recuperado de la extracción con TRIzol y precipitación en isopropanol se separa por electroforesis en gel de agarosa. Después de la transferencia, la membrana es tratada con la sonda descrita más arriba y usada para realizar un *Northern blot* (Sambrook y colab., 1989).

En un contenido adicional, esta invención está dirigida a estuches o kits de diagnóstico adecuados para realizar un ensayo de detección del ARN quimérico mitocondrial sentido o el ARN quimérico mitocondrial antisentido en muestras biológicas. Se han descrito aquí la composiciones y métodos generales y preferidos adecuados para la detección del ARN quimérico mitocondrial sentido y del ARN quimérico mitocondrial antisentido. Se enumeran, aunque sin limitarse a ellas, las secuencias de sondas de oligonucleótidos. Además, aquí se describen los métodos adecuados para usar sondas de oligonucleótidos o conjunto de sondas de oligonucleótidos de un kit o estuche para detectar los ARNs quiméricos sentido o los ARNs quiméricos antisentido.

El estuche o kit de esta invención comprende una o más sondas de oligonucleótidos y otros reactivos o composiciones seleccionadas para realizar la hibridación *in situ* usada para detectar ARN quimérico mitocondrial sentido y ARN quimérico mitocondrial antisentido en una muestra. Cada conjunto de dos o mas sondas de oligonucleótidos son preferentemente marcados con especies detectables independientemente de modo que en una célula individual de la muestra biológica se puedan detectar el ARN quimérico mitocondrial sentido y el ARN quimérico mitocondrial antisentido. En un contenido preferido, las sondas de oligonucleótidos del estuche o kit, que se usan para detectar ARN quimérico mitocondrial sentido o el ARN quimérico mitocondrial antisentido están marcados cada una con un hapteno diferente. El hapteno puede ser biotina, digoxenina o fluorosceína, los que pueden ser reconocidos por el método de hibridación *in situ* con anticuerpos o con estreptavidina marcada con diversas enzimas (p. ej. fosfatasa alcalina o peroxidasa). Alternativamente cada sonda de oligonucleótido de cada conjunto de sondas puede ser marcada con colorantes fluorescentes detectables independientemente. Por ejemplo el conjunto de sondas para detectar ARN quimérico mitocondrial sentido puede ser marcado con rodamina mientras que el conjunto de sondas para detectar el ARN quimérico mitocondrial antisentido puede ser marcados con Alexa 488. Además, se describen los métodos para determinar la localización del ARN quimérico sentido y el ARN quimérico antisentido en células de la muestra biológica. Adicionalmente, pueden usarse las composiciones y los métodos de la invención para determinar la colocalización del ARN quimérico sentido y el ARN quimérico antisentido con marcadores específicos de los diferentes organelos celulares usando el análisis por microscopía confocal.

Las composiciones y métodos provistos aquí se consideran particularmente útiles para la detección y diagnóstico del cáncer y precáncer. El término cáncer incluye células afectadas por cualquiera de las siguientes condiciones anómalas. Estas incluyen leucemia mieloide aguda o crónica, leucemia linfoblástica aguda o crónica, mieloma múltiple, enfermedad de Hodgkin, linfoma de origen no Hodgkin o linfoma maligno; carcinoma gástrico, carcinoma esofágico o adenocarcinoma, adenocarcinoma del conducto pancreático, insulinoma, glucagonoma, gastrinoma,

adenocarcinoma del intestino delgado, carcinomas colorrectales; carcinoma hepatocelular; adenoma hepatocelular; carcinoides del tracto urogenital* como adenocarcinoma renal, tumor de Wilm, carcinoma de vejiga urinaria y uretra y adenocarcinoma prostático, cánceres testiculares como seminoma, teratoma, teratocarcinoma, carcinoma de células intersticiales, carcinoma endometrial carcinoma cervical de útero, carcinoma ovárico, carcinoma de vulva y vagina, tumores de células de Sertoli y Leydig, melanoma y carcinoma de trompas de Falopio; carcinomas alveolar y bronquiolar de pulmón; tumores encefálicos; melanoma maligno de la piel, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y sarcoma de Kaposi. Además fibrosarcoma, angiosarcoma y rhabdomyosarcoma cardíacos, y otras enfermedades tumorales familiares a los expertos en la técnica.

Terapia del cáncer y precáncer.

Las drogas de la quimioterapia pueden inducir una serie de respuestas celulares que impactan en la proliferación y supervivencia tumoral. La más estudiada de estas respuestas celulares es la apoptosis y es evidente actualmente que las drogas anticáncer pueden matar a las células tumorales activando rutas apoptóticas comunes. Desafortunadamente estas drogas también afectan células normales en división rápida tales como las de la médula ósea, células hematopoiéticas normales y células intestinales y queratinocitos de la matriz de los cabellos (McKinnell y colab., 1998; Komarov y colab., 1999; Johnstone y colab., 2002).

Por otra parte, muchas células tumorales tienen mutados factores de iniciación de apoptosis, factores de regulación de apoptosis y factores de ejecución de apoptosis lo que explica por qué células tumorales de diferentes tipos de cáncer se hacen resistentes a una variedad de drogas quimioterapéuticas y radiaciones. Se han descrito mutaciones de factores de la vía intrínseca, de eventos postmitocondriales y de la vía extrínseca de la apoptosis (Rampino y colab., 1997; Vogelstein y colab., 2000; Teitz y colab., 2000; Reed; Johnstone y colab., 2002). Por lo tanto, un paradigma para la terapia del cáncer es un procedimiento que puede desencadenar selectivamente la apoptosis de las células tumorales, sin alterar las células normales en proliferación, evitando los factores alterados o mutados de las diferentes vías apoptóticas.

Las composiciones y métodos de la invención presente se basan en el descubrimiento que las células tumorales y pretumorales sobreexpresan el ARN quimérico mitocondrial sentido a niveles similares a los de las células normales en proliferación. Sin embargo, en contraste con las células normales en proliferación, las células tumorales y pretumorales inhiben la expresión del ARN quimérico mitocondrial antisentido.

Las estructuras de dichos transcritos se muestran en la Figura 1 y la Figura 3 y las secuencias correspondientes en SEQ ID N°1, SEQ ID N°2 SEQ ID N°3, SEQ ID N°4, SEQ ID N° 5 y SEQ ID N°6.

En contraste, y constituyendo otro descubrimiento sorprendente, las células pretumorales y tumorales sobreexpresan el ARN quimérico mitocondrial sentido e inhiben la expresión del ARN quimérico mitocondrial antisentido. La supresión o inhibición de la síntesis del ARN quimérico mitocondrial antisentido constituye una nueva diferencia de fenotipo entre una célula cancerosa y una célula normal en proliferación, lo que se considera uno de los mayores contenidos de la invención presente. Además las células tumorales de biopsias humanas de diferentes tipos cancerosos exhiben también el mismo fenotipo que las células cancerosas en cultivo (Figuras 5A y 5B).

Aunque no está clara la función del ARN quimérico mitocondrial sentido ni la del ARN quimérico mitocondrial antisentido, existe una correlación directa entre la expresión de dichos ARN y la proliferación celular. Por ejemplo, las células en proliferación de tejidos como el hígado, riñón y bazo definidas como tales por la expresión de antígenos como Ki-67, PCNA o histona fosforilada H3 sobreexpresan el ARN quimérico mitocondrial sentido así como el ARN quimérico mitocondrial antisentido. En células en reposo proliferativo de los mismos tejidos, que no expresan Ki-67 o PCNA, ni el ARN quimérico mitocondrial sentido ni el ARN quimérico mitocondrial antisentido no se expresan. Mas aún, como se ilustra en la Figura 7, los linfocitos humanos estimulados con el mitógeno PHA sintetizan ADN y expresan los antígenos de proliferación KI-67 y PCNA. Los linfocitos estimulados sobreexpresan el ARN quimérico mitocondrial sentido y también el ARN quimérico mitocondrial antisentido (Figura 7). Por el contrario, los linfocitos en reposo proliferativo o no estimulados no expresan ni el ARN quimérico mitocondrial sentido ni el ARN quimérico mitocondrial antisentido.

El hallazgo anterior, que es una parte fundamental de la invención presente, muestra que mientras las células normales en proliferación expresan los ARNs quiméricos mitocondriales sentido y antisentido, las células tumorales expresan el ARN quimérico mitocondrial sentido e inhiben la expresión del ARN quimérico mitocondrial antisentido. Para entender la función de dichos ARNs en la proliferación celular, se trataron células cancerosas en cultivo con oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial sentido (SEQ ID N° 1, SEQ ID N° 2, SEQ ID N° 3) o el ARN quimérico mitocondrial antisentido (SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6). Los resultados, que constituyen otro descubrimiento sorprendente, muestran que en esas condiciones las células entran en el proceso de muerte programada o apoptosis. Después del tratamiento con oligonucleótidos complementarios a los ARNs quiméricos mitocondriales sentido o antisentido por 6 a 15 horas, entre 75 y 96% de las células sufren apoptosis (Tabla 2). Los cambios observados en las células fueron condensación de la cromatina, fragmentación nuclear, fragmentación del

ADN, activación de caspasas y alteración de los procesos de la membrana plasmática. Oligonucleótidos control con 4 o más nucleótidos con apareamiento incorrecto o con orden alterado no indujeron apoptosis. Las células fueron afectadas por el tratamiento con oligonucleótidos complementarios al ARN ribosómico mitocondrial 12S sentido o antisentido o complementarios al ARNm o al transcrito antisentido de la subunidad ND 1 mitocondrial. En general, los oligonucleótidos complementarios al ARN quimérico mitocondrial antisentido fueron mucho más efectivos a la misma concentración que los oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial sentido. Este fue un resultado esperado puesto que las células tumorales sobreexpresan el ARN quimérico mitocondrial sentido y por lo tanto es difícil alcanzar una concentración de oligonucleótidos dentro de la célula que interfiera con todas las copias de este transcrito. Por otra parte, como las células tumorales disminuyen la expresión del ARN quimérico mitocondrial antisentido, debería ser más fácil interferir con este ARN por cuanto hay un menor número de copias por células.

La inducción de apoptosis es también selectiva para las células tumorales. Los linfocitos humanos en reposo proliferativo o los linfocitos humanos estimulados por 48 horas con PHA no se afectan por el tratamiento con oligonucleótidos complementarios al ARN quimérico mitocondrial antisentido o dirigidos al ARN quimérico mitocondrial sentido, incluso después de un tratamiento con una alta dosis (15 μ M) de oligonucleótidos complementarios.

La inducción de apoptosis por el tratamiento con oligonucleótidos complementarios dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido (SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6) se ha logrado en células de leucemia promielocítica HL-60, leucemia linfoblástica aguda MOLT-4, células de leucemia T-linfocítica, Jurkat, una leucemia de células T, Devernelle o linfoma B NSO/2 o mieloma, células HeLa, DU145, PC-3 Caco-2, Hep-2 y HepG2, pero no se limita a dichas células. Dos tipos celulares, MCF/7 (carcinoma mamario) y melanoma que pueden ser consideradas como paradigma de células tumorales resistentes al tratamiento (quimioterapia o radioterapia), sufren apoptosis sobre un 80% al tratarse por 15 horas con oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido (SEQ ID N° 4, SEQ ID N° 5, SEQ ID N° 6). Tratándolas con oligonucleótidos complementarios al ARN quimérico sentido (SEQ ID N° 1) se obtiene un menor efecto apoptótico. Como se reportó anteriormente, oligonucleótidos con 4 nucleótidos con apareamiento incorrecto o con orden alterado no indujeron muerte celular.

Más abajo se describen los métodos y composiciones para tratar el cáncer usando los ARNs quiméricos antisentido como agentes terapéuticos. El contenido preferido, aunque no limitado a éste, son los métodos y composiciones para el tratamiento del cáncer usando oligonucleótidos complementarios a los ARNs quiméricos antisentido. El resultado de este tratamiento es por lo menos producir en un sujeto tratado un beneficio en su salud, lo que en el caso del cáncer incluye pero no se limita a la remisión del cáncer, el aminoramiento de los síntomas del cáncer y el control de la diseminación del cáncer por metástasis. Todos dichos métodos implican la inducción de apoptosis en células tumorales con efectos menores en células normales. Oligonucleótidos complementarios dirigidos a ARNs específicos han sido ampliamente utilizados para disminuir o suprimir la expresión de una gran diversidad de ARNm o la síntesis de las proteínas correspondientes (p. ej. Vickers y colab., 2003). Actualmente se estudian cerca de 42 oligonucleótidos antisentido de diferente composición como fármacos potenciales (Stephens and Rivers, 2003; ver también como ejemplos las U. S. Pat. Nos. 5.801.154, 6.576.759; 6.720.413; 6.573.050 y 6.673.917).

En un aspecto de esta invención, se puede usar uno o más oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido. El uso de dos o más oligonucleótidos complementarios es más efectivo y muestra algún grado de sinergia.

Los oligonucleótidos de la invención pueden ser complementarios al ARN quimérico mitocondrial antisentido. Los oligonucleótidos complementarios se unirán los ARNs quiméricos mitocondriales antisentido interfiriendo con sus funciones. Aunque la complementariedad absoluta es favorecida, no es requerida. Un oligonucleótido cuya secuencia se refiere aquí como "complementaria" a una porción de un ARN, significa que tiene suficiente complementariedad con el ARN para formar una pareja estable. La capacidad de hibridizar depende tanto del grado de complementariedad como del largo del oligonucleótido. Generalmente, mientras más largo sea el ácido nucleico hibridizante, éste puede contener un mayor número de apareamientos incorrectos y aún formar un par estable. Los expertos en la técnica pueden determinar un grado aceptable de apareamientos incorrectos usando procedimientos estándar para determinar el punto de fusión del complejo hibridizado.

Los oligonucleótidos complementarios para hibridar con los ARNm para diferentes proteínas están, en general, dirigidos a la región 5' no traducida del ARNm incluyendo el complemento del codón de iniciación AUG, o a la región 3' no traducida para ser más efectivos. Los oligonucleótidos complementarios a las regiones codificantes del ARNm son menos efectivos como inhibidores de la traducción (ver referencias previas). El ARN quimérico mitocondrial antisentido son regiones no codificantes, por lo tanto los oligonucleótidos pueden ser complementarios a cualquiera región de dichos transcritos. Las regiones más efectivas se ubican alrededor de los segmentos de una hebra del ARN quimérico mitocondrial antisentido determinadas explorando las secuencias del ARN quimérico antisentido con oligonucleótidos diseñados cada 30 nucleótidos. Los expertos en la técnica entenderán que otras secuencias comprendidas dentro de las secuencias completas de los transcritos de SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6 son blancos para el diseño de oligonucleótidos complementarios alternativos.

Los oligonucleótidos complementarios dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido que inducen la muerte de células tumorales de acuerdo a la presente invención, generalmente contendrán una columna vertebral diferente a los fosfodiésteres naturales. Los oligonucleótidos pueden tener alternativamente uniones internucleósidos incluyendo, pero no limitados a fosforotioato (Mag y colab., 1991; y U.S. Pat. N° 5.644.048), ácido nucleico con unión peptídica (PNA) (Egholm, 1993 y U.S. Pat. N° 6.656.687), fosforamida (Beaucage, 1993), fosforoditioato (Capaldi y colab., 2000). Otros análogos de oligonucleótidos incluyen, aunque sin estar limitados a, morfolino (Summerton, 1999) oligonucleótidos bloqueados en sus extremos (Wahlestedt y colab., 2000), ácidos nucleicos con unión peptídica (PNA), (Nielsen y colab., 1993; Hyrup y Nielsen, 1996) o nucleótidos modificados en los extremos 5' y 3' por 2-o-(2-metoxi) etilo (McKay y colab., 1999). Los ácidos nucleicos pueden contener cualquier combinación de desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos o cualquiera combinación de bases incluyendo uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina, hipoxantina, isocitosina, isoguanina, etc.

Los oligonucleótidos complementarios según la invención pueden comprender al menos una base modificada, seleccionada del grupo siguiente que incluye, pero sin limitarse a, 5-fluorouracil, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxi)metil uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina*, inosina, N6 isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metil-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético, wybutosine, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, ácido uracil-5-oxiacético metilester, 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w y 2,6-diaminopurina.

Los oligonucleótidos complementarios pueden también incluir al menos un azúcar modificado seleccionado del grupo siguiente, pero sin limitarlo a, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa.

En otro aspecto de la invención presente, los oligonucleótidos complementarios son diseñados para hibridar con cualquiera región del ARN quimérico mitocondrial antisentido. Los oligonucleótidos deben ser al menos de diez nucleótidos de largo, preferentemente oligonucleótidos complementarios de entre 10 y alrededor de 50 nucleótidos de largo. En aspectos específicos el oligonucleótido complementario es al menos 12 nucleótidos, al menos 18 nucleótidos, al menos 22 nucleótidos, al menos 50 nucleótidos de longitud.

Es importante considerar que tanto para experimentos *in vitro* como para experimentos *in vivo* deben utilizarse controles que distinguen entre la interferencia de los oligonucleótidos complementarios con la función del ARN quimérico mitocondrial antisentido en comparación con los efectos biológicos inespecíficos de oligonucleótidos complementarios. Por lo tanto el diseño de los oligonucleótidos debe evitar la presencia en la secuencia de series CpG, series 5'GGGG y otras secuencias que tienen efectos tóxicos en células animales como se informa en la U.S. Pat. N° 6.673.917. También la presencia de la secuencia 5'CGTTA fue evitada debido al efecto previamente descrito (Tidd y colab., 2000).

En otro contenido de la invención presente, los oligonucleótidos complementarios dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido pueden usarse como agentes terapéuticos en animales o en pacientes que tienen cáncer y que inducen sensibilidad a drogas terapéuticas anticáncer o radiaciones. La sensibilidad inducida, conocida también como sensitización o hipersensibilidad, puede ser medida en células tumorales que muestran refractariedad a terapias anticáncer o a radiaciones. Las drogas anticáncer comprenden aquellas conocidas en la técnica y usadas actualmente y las drogas aún no descubiertas. Entre las drogas quimioterapéuticas convencionales están los agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos y agentes antimicrotúbulos. Algunos ejemplos de dichas drogas son la cisplatina metotrexato, doxorubicina, dactinomycin, mitomicina, ciclofosfamida, etc.

En otro aspecto de la invención, junto con o después del tratamiento de animales o pacientes que tienen cáncer con oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido, los pacientes pueden ser tratados con radioterapia, en que la radioterapia incluye radiación ultravioleta, radiación gama, partículas alfa, partículas beta, haces de rayos X y de electrones.

En otro aspecto de esta invención, la interferencia con el ARN quimérico mitocondrial antisentido para inducir la muerte de las células puede ser lograda mediante la interferencia en el ARN o el silenciamiento del ARN. En los últimos seis años la interferencia en el ARN (ARNi) ha surgido como una nueva aproximación al silenciamiento de genes en células de mamíferos (Elbashir y colab., 2001; McManus y colab., 2002). Las moléculas de doble hebra de ARN sintéticas* de cerca de 19 a 21 nucleótidos de largo se hibridan específicamente con su ARNm complementario, produciendo la degradación del ARNm y subsiguiente degradación de las proteínas. Varios genes diferentes han sido exitosamente silenciados por ARN pequeño de interferencia o ARNsi (Lu y colab., 2003; Wachek y colab., 2003). Por tanto, el ARN sintético de doble hebra de cerca de 19 a 21 nucleótidos dirigido al ARN quimérico mitocondrial antisentido o al ARN quimérico mitocondrial sentido puede ser usado para degradar los transcritos e inducir la muerte celular. Las personas familiarizadas en la técnica comprenderán que la secuencia de

ARNsi debe ser complementario a cualquier región de los ARNs quiméricos mitocondriales antisentido (SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6).

En otro contenido de la invención, las ribozimas pueden ser usadas para interferir con el ARN quimérico mitocondrial antisentido para inducir la muerte de células tumorales. La secuencia de la ribozima debe ser diseñada de acuerdo con la secuencia de ARN quimérico mitocondrial antisentido (SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6) para dividir regiones específicas del transcrito que son más eficientes para iniciar la muerte de las células tumorales. Las ribozimas son moléculas enzimáticas de ARN capaces de catalizar la ruptura específica del ARN (Rossi, 1994). El mecanismo de acción de la ribozima incluye la hibridación específica de la molécula de ribozima al ARN complementario blanco, seguida por una ruptura endonucleotídica. La composición de la ribozima debe incluir una o mas secuencias complementarias al ARNm del gen destino y debe incluir la conocida secuencia para la ruptura de ARNm descrita en U.S. Pat. No. 5.093.246. Así, en el ámbito de esta invención, las moléculas de ribozima (cabeza de martillo) son preparadas de modo de catalizar específica y eficientemente la ruptura endonucleotídica de los ARNs quiméricos mitocondriales antisentido o a los ARNs quiméricos mitocondriales sentido. La construcción y producción de ribozimas (cabeza de martillo) es bien conocida en la técnica y ha sido descrita (Haseloff y colab., 1989). Las ribozimas de la invención presente también incluyen endorribonucleasas de ARN (Zaug y colab., 1984).

La terapia génica se refiere al tratamiento o prevención del cáncer mediante la administración de ácido nucleico a un paciente que tiene cáncer o en quien la prevención o inhibición de cáncer es deseable. En este aspecto de la presente invención, el ácido nucleico producido en forma intracelular es un ARN complementario dirigido al ARN quimérico mitocondrial antisentido que intermedia el efecto terapéutico interfiriendo o inhibiendo la función de estos transcritos mitocondriales induciendo la muerte de las células tumorales. Por lo tanto, un procedimiento preferido es utilizar un ADN recombinante artificial en el cual la transcripción del ARN complementario está controlada por promotores fuertes de la ARN polimerasa II o III. La expresión de la secuencia que codifica el ARN complementario puede lograrse por cualquier promotor conocido en la técnica que actúa sobre células de mamíferos, preferentemente humanas. Tales promotores incluyen, aunque no se limitan a, la región promotora temprana del virus SV40 (Benoist y Chambon, 1981), el promotor de la timidina quinasa del virus herpes (Wagner y colab., 1981), las secuencias reguladoras del gene de la metalotionina (Brinster y colab., Nature 296:39-42, 1982) el promotor del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto y colab., 1980), etc. La construcción de ADN recombinante para producir el ARN complementario puede estar basada en un vector viral entre los que se incluye, aunque no se limita al vector de adenovirus, vector de virus adeno-asociado, vector de virus herpes simplex, vector del virus de la viruela y vectores de retrovirus. El vector es introducido en las células tumorales de interés a través de su formulación en un compuesto farmacéutico apropiado, usando métodos familiares para los expertos en la técnica.

Los compuestos farmacéuticos de esta invención incluyen una cantidad efectiva del ácido nucleico complementario (oligonucleótidos complementarios, ARNsi, ribozimas o vectores virales) en un portador aceptable farmacéuticamente, que puede ser administrado a un paciente de cáncer para interferir con la función del ARN quimérico mitocondrial antisentido e inducir la apoptosis de las células cancerosas. Los ácidos nucleicos complementarios pueden ser formulados en un compuesto farmacéutico, que puede incluir portadores, diluyentes, tampones, preservativos, agentes tensioactivos, polietilenimida (PEI), liposomas u otra formulación lipídica conocida en el arte. El compuesto farmacéutico puede ser administrado por aplicación tópica, oral, parenteral o administración rectal. La administración parenteral incluye inyección intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular o administración pulmonar por inhalación o insuflación.

Las composiciones de la invención presente pueden ser utilizadas para el tratamiento terapéutico, diagnóstico, profilaxis y como reactivos y dispositivos para la investigación. Las composiciones y métodos aportados aquí son considerados particularmente útiles para el tratamiento del cáncer. El término cáncer como expuesto aquí, incluye células afectadas por cualquiera de las siguientes condiciones anómalas identificadas. Ellas incluyen leucemia mieloide aguda o crónica, leucemia linfoblástica aguda o crónica, mieloma múltiple, enfermedad de Hodgkin, linfoma de origen no Hodgkin o linfoma maligno; carcinoma gástrico, carcinoma esofágico o adenocarcinoma, adenocarcinoma del conducto pancreático, insulinooma, glucagonoma, gastrinoma, adenocarcinoma del intestino delgado, carcinomas colorrectales; carcinoma hepatocelular; adenoma hepatocelular; carcinoides del tracto urogenital como adenocarcinoma renal, tumor de Wilm, carcinoma de vejiga urinaria y uretra y adenocarcinoma prostático, cánceres testiculares como seminoma, teratoma, teratocarcinoma, carcinoma de células intersticiales, carcinoma endometrial, carcinoma cervical de útero, carcinoma ovárico, carcinoma de vulva y vagina, tumores de células de Sertoli y Leydig, melanoma y carcinoma de trompas de Falopio; carcinomas alveolar y bronquiolar de pulmón; tumores encefálicos; melanoma maligno de la piel, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y sarcoma de Kaposi. Además fibrosarcoma, angiosarcoma y rhabdomyosarcoma cardíacos, y otras enfermedades tumorales familiares a los expertos en la técnica. Así, el término "célula cancerosa" usado aquí, incluye una célula afectada por cualquiera de las condiciones identificadas más arriba.

EJEMPLOS DE REALIZACION

Los siguientes ejemplos sirven para describir la manera de usar la invención descrita anteriormente y también proponer la mejor manera de llevar a cabo varios aspectos de ella. Se entiende que de ninguna manera estos ejemplos son para limitar el ámbito de la invención sino para efectos ilustrativos.

EJEMPLO 1

5 Aislamiento y secuenciación del ARN quimérico mitocondrial humano sentido. (Figura 1A, SEQ ID NO 1)

Los experimentos iniciales indicaron que el ARN quimérico mitocondrial humano sentido contenía una estructura secundaria más compleja y estable que el ARN quimérico de ratón (Villegas y colab., 2002). Por lo tanto, y basándose en la estructura secundaria del ARN quimérico mitocondrial de ratón, se dedujo una estructura secundaria teórica del ARN quimérico mitocondrial humano (Figura 1A). El transcrito teórico humano contenía la secuencia completa del ARN 16S sentido unido en el extremo 5' a un fragmento del ARN mitocondrial 16S formando una asa de largo desconocido (Figura 1A). El segmento del ARN 16S mitocondrial antisentido era completamente complementario al ARN 16S mitocondrial sentido y por lo tanto corresponde a un repetido invertido unido al extremo 5' del transcrito. Basándose en esta estructura se diseñaron partidores para amplificar este transcrito potencial, por RT-PCR. Un partidor reverso ubicado en las posiciones 11 a 31 desde extremo 5' del ARN mitocondrial 16S quimérico humano o al comienzo de la asa teórica (Partidor 1, Figura 1A) (SEQ ID NO 139). La secuencia del partidor directo usado corresponde a las posiciones 213-234 del ARN mitocondrial 16S sentido y se ilustra en la Figura 1A, partidor 3. La amplificación del ARN por RT-PCR de varios tejidos humanos y células incluyendo células HeLa, HL-60, Du145, MCF/7 y linfocitos humanos estimulados con PHA (Ver ejemplo 7) usando los partidores 1 y 3 (Figura 1A) produjo un amplicón único de alrededor de 210 pares de bases (Figura 2). La técnica de RT-PCR se efectuó como se ha descrito anteriormente (Villegas y colab., 2000; Villegas y colab., 2002). Los amplicones de cada tejido o célula humana se clonaron y ambas hebras se secuenciaron. Se obtuvo en todos los casos una secuencia idéntica de 216 pares de bases, que contenía una secuencia repetida de 184 nucleótidos unida a los primeros 31 nucleótidos del terminal 5' del ARN mitocondrial 16S sentido. Después se determinó si el repetido invertido era mayor que 184 nucleótidos y se extendía más hacia el extremo 5' del ARN mitocondrial 16S antisentido (Figura 1A). El ADNc de las células HeLa u otras descritas más arriba se amplificó entre el partidor reverso 1, ubicado en el asa descrita anteriormente, y los partidores 4 a 7, para caminar en dirección del extremo 5' del supuesto repetido invertido (Fig. 1A). De este modo se obtuvieron fragmentos de amplificación de 500, 700 y 800 pares de bases al combinar el partidor 1 con los partidores 4, 5 y 6, respectivamente. Por otra parte, al amplificar el ADNc entre el partidor 1 y el partidor 7 no se obtuvo un producto, indicando que el extremo 5' del repetido inverso estaba entre los partidores 7 y 8 (ver más adelante). La secuencia completa del amplicon de 800 pares de bases revela un repetido invertido de 769 nucleótidos unido a los primeros 31 nucleótidos del ARN mitocondrial 16S sentido (SEQ ID NO 1) (Figura 1A). La secuencia de la región del terminal 3' del repetido invertido unido al ARN mitocondrial 16S sentido es idéntica a la encontrada en la misma región del amplicón de 216 pares de bases. Esto es importante porque indica que en ambos casos estábamos amplificando el mismo ARN. Además, la secuencia mostró que faltaban 50 nucleótidos del extremo 3' del ARN mitocondrial 16S en el repetido invertido del ARN quimérico mitocondrial sentido. En conjunto, estos resultados sugieren que la estructura de dos hebras formada entre el repetido invertido y el ARN mitocondrial 16S sentido comienza en la posición 51 de este último y forma una posible asa de 50 nucleótidos.

Para confirmar el largo de la asa, el ADNc humano se amplificó por PCR entre el partidor directo 2 ubicado en el extremo 3' del repetido invertido y el partidor 3 que es también inverso en las posiciones 213-234 del ARN mitocondrial 16S sentido (Figura 1A). Se obtuvo un amplicón de aproximadamente 240 pares de bases y la secuencia mostró que los primeros 234 nucleótidos del ARN mitocondrial 16S sentido estaban unidos a los últimos 25 nucleótidos del extremo 3' del repetido invertido. La secuencia de los 25 nucleótidos del repetido invertido era totalmente complementaria al ARN mitocondrial sentido entre las posiciones 51 a 75 (Figura 1A).

Si la secuencia del amplicón obtenido con los partidores 1 y 6 y la secuencia obtenida con los partidores 2 y 3 se ensamblan como secuencias contiguas, la estructura del ARN quimérico mitocondrial humano sentido resultante confirma un asa de 50 nucleótidos y una estructura de dos hebras de al menos 769 pares de bases (Figura 1A) (ver también SEQ ID NO 1).

Ya que el ARN de dos hebras no es digerido por ARNasa A, el tallo del ARN quimérico mitocondrial humano sentido debería ser resistente a esta enzima. Por otra parte, el asa de la región 3' del ARN quimérico mitocondrial 16S sentido que se extiende más allá de la estructura de dos hebras debería ser digerida por la enzima. El ARN de HeLa y de otras células fue digerido con ARNasa A (50 µg por ml), seguido por extracción con fenol, y el material resistente a la nucleasa se recuperó por precipitación en etanol. El ADNc del ARN digerido fue amplificado por PCR usando los partidores mostrados en la Figura 1A. El amplicón de alrededor de 800 pares de bases obtenido con los partidores 1 y 6 no fue amplificado después de la digestión con ARNasa A indicando que el asa fue digerida por la enzima. Lo mismo aconteció con el amplicón de 360 pares de bases obtenido con los partidores 10 y 11 como se indica en la Figura 1A. En conjunto, estos resultados indicaron que tanto el asa como la región 3' del ARN quimérico mitocondrial sentido que se extiende más allá del tallo, fueron digeridos por la enzima. Por otra parte la

amplificación del amplicón de 750 pares de bases, correspondiente a la estructura de doble hebra del ARN quimérico mitocondrial sentido y obtenido usando partidores 8 y 6, no fueron afectados por la digestión con ARNasa A. La secuencia del fragmento de doble hebra resistente a la digestión por ribonucleasa era idéntica con la secuencia esperada del tallo. Los mismos resultados se obtuvieron después de digestión del ARN total proveniente de células HL-60 u otras células humanas.

Para determinar el extremo 5' de la secuencia invertida repetida del ARN quimérico mitocondrial sentido, el tallo del transcrito obtenido por digestión con ARNasa A se usó para su análisis por RACE. La determinación del extremo 5' de la secuencia invertida repetida se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Los resultados indicaron que la secuencia invertida se extiende por 46 nucleótidos adicionales desde el extremo 5' del amplicón obtenido por la amplificación del ARN quimérico mitocondrial sentido con los partidores 1 y 6. En resumen, la secuencia invertida de 815 nucleótidos se une al extremo 5' de los primeros 865 nucleótidos del ARN mitocondrial 16S. La secuencia de este transcrito mostró un 99.8% de identidad con el gen mitocondrial humano (hebras H y L) (SEQ ID NO 1). Los terminales 5' de ambos extremos del tallo de doble hebra fueron confirmados por RACE 5'.

Los resultados anteriores indicaban que el ARN mitocondrial sentido contenía un tallo o estructura de 815 pares de bases y un asa de 50 nucleótidos. Sin embargo, esos resultados no comprobaban que el repetido invertido está completamente unido al ARN mitocondrial 16S sentido. El uso de métodos convencionales tales como la síntesis del ADNc completo desde el extremo 3' es infructuoso porque la estructura de doble hebra del transcrito representa un problema insoluble a las transcriptasas reversas, incluyendo Tth (Myers y colab., 1991). Si el repetido invertido de 815 nucleótidos se une a los 1559 nucleótidos del ARN mitocondrial 16S, se esperaría un transcrito de 2,3 Kb. El análisis por *Northern blot* del ARN total de células HeLa, HL-60 y MCF/7 se llevó a cabo con una sonda marcada con ³²P dirigida a la estructura de dos hebras del ARN quimérico mitocondrial sentido. Los resultados revelaron una banda de alrededor de 2,4 Kb además de una banda de 1,6 Kb correspondientes al ARN quimérico mitocondrial sentido y al ARN mitocondrial 16S respectivamente. Si se digiere el ARN con ARNasa A previo al *Northern blot*, se obtiene una banda única de hibridación de aproximadamente 0,8 Kb que corresponde al tamaño del tallo del ARN quimérico mitocondrial sentido. En conjunto, estos resultados demuestran que el ARN quimérico mitocondrial sentido contiene un repetido invertido de 815 nucleótidos unido al extremo 5' del ARN mitocondrial 16S sentido correspondiente al SEQ ID NO 1.

Es posible detectar específicamente la región de unión entre el repetido invertido y el ARN mitocondrial 16S sentido usando una sonda de oligonucleótido. La sonda debe incluir 7 a 10 nucleótidos en cada lado del punto de unión entre el extremo 3' del repetido invertido y el comienzo del ARN mitocondrial 16S. Este oligonucleótido puede ser usado para hibridación *in situ* o para amplificación por RT-PCR u otros de los métodos familiares a los expertos en la técnica para detectar este nuevo ARN.

El ARN quimérico mitocondrial sentido está presente en células normales en proliferación queratinocitos de prepucio humano, bazo, linfocitos estimulados con PHA, embriones de ratón), en células precancerosas (queratinocitos estimulados con HPV 16 o 18, células MT-2 transformadas con HTLV-1) y en células tumorales. No está presente en células normales en reposo proliferativo. En la Tabla 1 (en el Ejemplo 4) se presenta un resumen de estos resultados.

EJEMPLO 2.

Queratinocitos humanos transformados con virus papiloma sintetizan un nuevo ARN quimérico mitocondrial sentido. (Figura 1B, SEQ ID NO 2).

Queratinocitos de prepucio humano (HFK) fueron transformados por incubación con un lisado de células previamente infectadas con el virus del papiloma humano 16 (HPV 16). Las células se cultivaron con 3 partes de K-SFM, una parte de medio DMEM (Invitrogen) 5 ng/ml de EGF, 50 µg/ml de extracto de hipófisis y 10% de suero bovino fetal. Las condiciones del cultivo fueron 37°C y 5% CO₂. Después de 24 horas de infección, las células HFK se transfirieron a otro frasco y fueron cultivadas en las mismas condiciones. Luego, las células (HFK698) fueron sucesivamente transferidas a nuevos frascos de cultivo cada 3 días usando una razón de partición de 1:3 a 1:4. Después del traspaso N° 19 las células (HFK698 transformadas por HPV 16) fueron cosechadas como se describió (Hausen, 1996), colectadas por centrifugación a 300 x g por 10 min y lavadas dos veces con tampón fosfato salino (PBS). El ARN total de las células se extrajo con TRIzol (Invitrogen). Alrededor de 200 nanogramos de ARN se usaron para sintetizar el ADNc con hexámeros al azar como se describió en el Ejemplo 1. El ADNc se amplificó por PCR usando el partidor reverso 1 y el partidor directo 3 como se describe en la Figura 1A. Este protocolo de amplificación produjo el amplicón esperado de 210 pares de bases, en el que los primeros 31 nucleótidos del ARN mitocondrial sentido están unidos al repetido invertido de 184 nucleótidos, según como descrito previamente en el Ejemplo 1. El análisis electroforético de los productos reveló la presencia de un amplicón de 210 pares de bases correspondiente al ARN quimérico mitocondrial sentido además de otro fragmento de 150 pares de bases como se muestra en la Figura 2. La secuencia completa de este nuevo fragmento (SEQ ID NO 2) mostró que los 31 nucleótidos iniciales desde el extremo 5' del ARN mitocondrial 16S sentido se unen a un repetido inverso de 121

nucleótidos, que es 63 nucleótidos más corto que el ARN quimérico mitocondrial sentido de la SEQ ID NO 1. Este repetido más corto genera un asa más larga de 96 nucleótidos (Figura 1B) en la estructura del ARN quimérico mitocondrial sentido. El resto de la secuencia es idéntica a la SEQ ID NO 1. Este nuevo ARN quimérico mitocondrial sentido no está presente ni en células SiHa (Figura 4A) que son células tumorigénicas transformadas con HPV 16 ni en células humanas normales en proliferación, tales como linfocitos humanos estimulados con PHA. Resultados similares se obtuvieron con células HFK transformadas por HPV 18 o en células 18Nco. Las células transformadas o inmortalizadas (pero no tumorigénicas) por HPV 16 o HPV 18 se consideran células precancerosas y por lo tanto el nuevo ARN quimérico mitocondrial sentido es un nuevo marcador potencial de células precancerosas.

Ya que la secuencia del extremo 3' del repetido invertido de la SEQ ID NO 2 unida al ARN mitocondrial 16S es diferente a la misma región de la SEQ ID NO 1, se puede usar una sonda de oligonucleótido para la detección específica de este transcrito. La sonda debe incluir 7 a 10 nucleótidos a cada lado del punto de unión entre el extremo 3' del repetido invertido y el comienzo del ARN mitocondrial 16S sentido, tal como el oligonucleótido de la SEQ ID NO 7. Este oligonucleótido puede ser usado para hibridación *in situ* o para amplificación por RT-PCR o cualquier otro método familiar a los expertos en la técnica para detectar este nuevo marcador específico de células precancerosas.

EJEMPLO 3

Las células transformadas con HTLV-1 inducen la expresión de un nuevo y tercer ARN quimérico mitocondrial sentido (Figura 1C, SEQ ID NO 3)

Células MT-2 humanas transformadas con HTLV-1 fueron cultivadas como se ha descrito previamente (Kobayashi y colab., 1984). Las células fueron cosechadas, centrifugadas a 300 x g por 10 min y lavadas dos veces con PBS. La pella final fue extraída con TRIzol como se describe en el Ejemplo 1. El ADNc fue sintetizado con hexámeros al azar usando el ARN como molde y el ADNc fue amplificado por PCR usando el partidor reverso 1 y el partidor directo 3, como se representan en la Figura 1A. Como se describe anteriormente, este protocolo de amplificación produce un amplicón de 210 pares de bases que contiene los 31 primeros nucleótidos del ARN mitocondrial 16S sentido unido a un repetido invertido de 184 nucleótidos que corresponde al ARN quimérico mitocondrial sentido descrito en el Ejemplo 1. El análisis electroforético de los productos de amplificación reveló, además de la presencia del amplicón de 210 pares de bases mencionado, una banda de cerca de 150 pares de bases (ver Figura 2). La secuencia del amplicón de 150 pares de bases es idéntica a la secuencia del amplicón descrito en el Ejemplo 2, correspondiendo a un segundo ARN quimérico mitocondrial sentido que se expresa también en células transformadas por HPV 16 o HPV 18 (SEQ ID NO 2). Adicionalmente se encontró un nuevo producto de amplificación de cerca de 100 pares de bases (Figura 2). La secuencia de este tercer amplicón revela un repetido invertido de 61 nucleótidos unidos al extremo 5' del ARN mitocondrial 16S sentido que genera un asa de 167 nucleótidos (Figura 1C; SEQ ID NO 3). Este nuevo amplicón no estaba presente en células normales, ni en células tumorales ni en células transformadas con HPV 16 o 18. Por lo tanto este nuevo ARN quimérico mitocondrial sentido es un marcador potencial de células transformadas con el retrovirus oncogénico HTLV-1.

Puesto que la secuencia del terminal 3' del repetido inverso de SEQ ID NO 3 unido al ARN mitocondrial 16S es diferente a la misma región de SEQ ID NO 1 y SEQ ID NO 2, puede usarse una sonda de oligonucleótidos para la detección específica de este transcrito. La sonda debe extenderse 7 a 10 nucleótidos a cada lado del punto de unión entre el extremo 3' del repetido inverso y el comienzo del ARN mitocondrial 16S sentido, tal como el oligonucleótido de la SEQ ID NO 8. Este oligonucleótido puede ser usado para la hibridación *in situ* o la amplificación por RT-PCR o cualquier otro método familiar a los expertos en la técnica para detectar este marcador específico de células transformadas por un retrovirus oncogénico.

EJEMPLO 4

Estructura del ARN quimérico mitocondrial antisentido

Uno de nuestros experimentos iniciales indicó que en algunas de las células estudiadas existía una segunda familia de ARNs quiméricos que corresponden al ARN quimérico mitocondrial antisentido. Para establecer la estructura del ARN quimérico mitocondrial antisentido se utilizó la misma estrategia usada para el ARN quimérico mitocondrial sentido (Figura 1). El ARN quimérico mitocondrial antisentido "teórico" contenía un fragmento del ARN mitocondrial 16S sentido como un repetido inverso unido al extremo 5' del ARN mitocondrial 16S antisentido. Este último ARN es transcrito de la hebra L del ADN mitocondrial y corresponde al gen mitocondrial 16S (Figura 3). Para amplificar este ARN se hibridó un partidor reverso cerca del extremo 5' del ARN mitocondrial 16S antisentido y los partidores directos se hibridaron en diferentes posiciones del posible fragmento del repetido invertido (Figura 3). Se usó ARN total de linfocitos humanos estimulados con PHA por 48 horas como molde. El ADNc fue sintetizado con hexámeros al azar como se describe en el Ejemplo 1. La amplificación de ADNc por PCR se llevó a cabo con el partidor reverso ubicado cerca del comienzo del extremo 5' del ARN mitocondrial 16S antisentido (partidor 1, Figura 3) y diferentes partidores directos ubicados en el repetido invertido (Figura 3). Se obtuvo sólo tres amplicones que diferían en el

tamaño del repetido invertido y en el tamaño del asa. Estos amplicones fueron purificados y secuenciados. Uno de estos ARNs quiméricos mitocondriales antisentido contiene un repetido inverso de 365 nucleótidos y un asa de 17 nucleótidos (SEQ ID NO 4). Otro ARN contiene un asa de 96 nucleótidos y un repetido invertido de 189 nucleótidos (SEQ ID NO 5). Una tercera especie de ARN quimérico mitocondrial antisentido contiene un repetido invertido de 296 nucleótidos y un asa de 451 nucleótidos (SEQ ID NO 6). Las secuencias de los tres ARNs quiméricos mitocondriales antisentido eran 99,8 por ciento homólogas con la secuencia del gen del ADN mitocondrial (hebras H y L).

Los resultados, que serán presentados en los ejemplos siguientes, indican que hay una diferencia importante entre células pretumorales y células tumorales y células normales en proliferación respecto a la expresión del ARN quimérico mitocondrial antisentido. Todas las células en proliferación sobreexpresan el ARN quimérico mitocondrial sentido. Sin embargo, mientras las células normales en proliferación también expresan ARN quimérico mitocondrial antisentido, su transcripción es inhibida en células tumorales. Las células en reposo proliferativo no expresan ningún ARN quimérico mitocondrial. Por lo tanto la expresión diferencial de estos ARN representa un nuevo y poderoso marcador de la carcinogénesis, que puede ser detectado por hibridación *in situ*, Northern blot, RT-PCR o TMA u otros métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Un resumen de la expresión diferencial de los ARNs quiméricos mitocondriales sentido y antisentido se presenta en la Tabla 1

Tabla 1.

Expresión de los ARNs quiméricos en células de diferentes tipos.

ARNs quiméricos	Normal	Normal	Transformadas	Transformadas	Cáncer
mitocondriales	en reposo	proliferando	por HPV	por HTLV-1	
SEQ ID NO1	--	+++++	+++++	+++++	+++++
Sentido					
SEQ ID NO 2	--	--	++++	++++	--
Sentido					
SEQ ID NO 3	--	--	--	++++	--
Sentido					
SEQ ID NO 4	--	+++++	+/-	+/-	+/-
Antisentido					
SEQ ID NO 5	--	+++++	+/-	+/-	+/-
Antisentido					
SEQ ID NO 6	--	+++++	+/-	+/-	+/-
Antisentido					

+ y - : nivel relativo de expresión por hibridación *in situ*.

EJEMPLO 5.

Las células tumorales sobreexpresan el ARN quimérico mitocondrial sentido (SEQ ID NO 1) e inhiben la expresión del ARN quimérico mitocondrial antisentido (SEQ ID NOS 4, 5 y 6).

Se usó la hibridación *in situ* para determinar la expresión del ARN quimérico mitocondrial sentido en líneas de células tumorales en cultivo. Para la hibridación *in situ* se cultivaron células adherentes de tumores en portaobjetos de 8 cámaras (Lab-Tek®, NUNC) por 24 a 48 h a 37°C usando los medios y condiciones apropiados recomendadas por la American Tissue Culture Collection o ATCC. Las células no adherentes (por ejemplo HL-60, Jurkat y Ramos) se cultivaron en frascos pequeños por 48 h a 37°C. Las células fueron recuperadas por centrifugación a 300 x g por 10 min, resuspendidas en un pequeño volumen de PBS y alícuotas de 10 a 20 µl se colocaron en portaobjetos de vidrio previamente cubiertos con polilisina o la proteína adhesiva de cholgas (Burzio y colab., 1997). Se dejaron secar las muestras a temperatura ambiente por 30 min.

Las células fueron lavadas tres veces con PBS y fijadas con paraformaldehído al 4% por 10 min a temperatura ambiente. Los portaobjetos fueron lavados tres veces con PBS por 5 min e incubados en HCl 0,2 N por 10 min a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas otra vez tres veces, primero con PBS y después y luego con SSC 2X por 10 min (SSC 2X: NaCl 0,3 M, citrato de sodio 30 mM, pH 7,0) (Sambrook y colab., 1989) a temperatura ambiente. La prehibridación se llevó a cabo durante 30 min a 37°C en una solución que contenía SSC 4X, sulfato de dextrano 10%, 150 µg/ml de ARNt de levaduras y ADN de espermatozoides de arenque, formamida 50% y solución de Denhardt 1X (Ficol tipo 400 0,2 mg/ml, polivinilpirrolidona 0,2 mg/ml y BSA 0,2 mg/ml). La hibridación se llevó a cabo por 15 horas a 37°C en la mezcla de prehibridación que contiene 3,5 pmoles de las sondas dirigidas a los ARNs quiméricos mitocondriales sentido y antisentido. Las sondas contenían 20 o más deoxinucleótidos dirigidos a diferentes regiones de los ARNs quiméricos mitocondriales sentido y antisentido (ver SEQ ID Nos 99 a 197 y SEQ ID Nos 9 a 98 respectivamente). Las sondas estaban marcadas previamente en el extremo 3' con digoxigenina-11-dUTP (Roche) y transferasa terminal (Promega) como ha sido previamente descrito (Villegas y colab., 2000). Los portaobjetos fueron lavados para eliminar el exceso de sondas, primero con 2X SSC por 10 min a temperatura ambiente, luego con SSC 1X por 30 min a 45°C y finalmente con SSC 0,2X a temperatura ambiente.

Después de la hibridación, las células fueron incubadas por 30 min en tampón de bloqueo (BSA 1%, Triton X-1000 0,3% en PBS) y luego incubadas por 2 h a temperatura ambiente con anticuerpo monoclonal anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (Roche) previamente diluido 1:500 en tampón de bloqueo. Finalmente los portaobjetos se lavaron dos veces con PBS y la reacción colorimétrica se efectuó con una mezcla de sustrato BCIP/NBT (DAKO) como ha sido previamente descrito (Villegas y colab., 2000).. El mismo procedimiento fue empleado para FISH, usando anticuerpos antidigoxigenina conjugados con fluorosceína o rodamina.

Como se muestra en las Figuras 4A y 4B, la hibridación *in situ* con una sonda que corresponde a la SEQ ID NO 63, marcada con digoxigenina revela que las células tumorales humanas sobreexpresan el ARN quimérico mitocondrial sentido. La hibridación *in situ* con la sonda correspondiente a la SEQ ID NO 64 marcada con digoxigenina dió resultado negativo indicando la inhibición de la expresión del ARN quimérico mitocondrial antisentido. Los mismos resultados se obtuvieron con sondas de oligonucleótidos dirigidas a otras regiones del ARN quimérico mitocondrial sentido y antisentido.

EJEMPLO 6

Las células tumorales de biopsias humanas sobreexpresan el ARN quimérico mitocondrial sentido (SEQ ID NO 1) e inhiben la expresión del ARN quimérico mitocondrial antisentido (SEQ ID Nos 4, 5 y 6).

Se obtuvieron biopsias humanas de patólogos o muestras de tejidos de DAKO. La mayor parte de las muestras estaban incluidas en parafina y fijadas en formalina. Otras muestras de tejido se fijaron con reactivo de Boiun y también se utilizaron muestras congeladas.

Secciones de tejidos de 4 a 8 µm fueron dispuestas en portaobjetos previamente cubiertos con polilisina o con la proteína polifenólica adhesiva de la cholga Aulacomya ater (Burzio y colab., 1997). Las secciones embebidas en parafina sólida se incubaron por 1h a 60°C y la parafina se removió por 3 lavados con xilol de 15 min cada uno. Las secciones se secaron al aire y se lavaron cuatro veces con PBS. Luego las secciones se incubaron en HCl 0,2 N por 10 min a temperatura ambiente y luego se lavaron cuidadosamente con PBS. Luego, las muestras fueron hibridadas *in situ* con las sondas antisentido marcadas con digoxigenina según el protocolo descrito en el Ejemplo 4. Un corte paralelo fue hibridizado con una sonda sentido correspondiente a la misma región del ARN quimérico mitocondrial sentido.

Como se ve en la Figura 5A, las células presentes en tumores de glándula mamaria, cervicouterinos, carcinomas de vejiga y de pulmón revelaron una fuerte tinción con las sondas dirigidas al ARN quimérico mitocondrial sentido indicando fuerte presencia de este transcrito. Por otra parte la hibridación *in situ* con la sonda dirigida al ARN quimérico mitocondrial antisentido fue negativa, indicando la inhibición de este transcrito (Fig 5A). Otros tumores también sobreexpresan el ARN quimérico mitocondrial sentido e inhiben la expresión del ARN quimérico mitocondrial antisentido (Figura 5B).

EJEMPLO 7

Las células normales en proliferación sobreexpresan los ARNs quiméricos mitocondriales sentido y antisentido.

Usando el mismo protocolo de hibridación descrito en los Ejemplos 5 y 6, la expresión del ARN quimérico mitocondrial sentido fue determinada en células en proliferación. Como se ve en la Figura 6, células HFK, espermatogonias, células del bazo y células en proliferación de embrión de ratón, mostraron un fuerte señal de hibridación la que indica sobreexpresión del ARN quimérico mitocondrial sentido. Por contraste las células que no proliferan, como las del músculo, cerebro e hígado, no mostraron la señal, indicando que el ARN quimérico mitocondrial sentido no se expresa o la expresión es inhibida en dichas células.

Sin embargo, cuando la hibridación *in situ* en células en proliferación se efectuó con sondas dirigidas al ARN quimérico mitocondrial antisentido, también se observó una fuerte señal (Figura 6). Varios controles analizados paralelamente a las muestras indican que la señal de hibridación con dichas sondas no se debe a un artefacto. La señal de hibridación desaparecía si la hibridación *in situ* se realizaba con la sonda marcada junto a un exceso (50 a 100 veces) de la misma sonda no marcada con digoxigenina. Si antes de la hibridación las muestras eran incubadas con ribonucleasa A por la noche, la señal de hibridación no aparecía. Además, no se observaba señal de hibridación si la hibridación se hacía con una sonda marcada dirigida al ARN quimérico mitocondrial antisentido incluyendo 4 nucleótidos no complementarios.

EJEMPLO 8

Los linfocitos humanos normales, estimulados con fitohemaglutinina (PHA) sobreexpresan los ARNs quiméricos mitocondriales sentido y antisentido.

Cinco ml de sangre proveniente de pacientes sanos se colectaron con EDTA. La sangre se diluyó con un volumen de NaCl 0,9% y la mezcla se colocó sobre 5 ml de Histopaque-1077 (Sigma) en un tubo de centrífuga. Los tubos fueron centrifugados a 800 x g por 20 min a temperatura ambiente. Las células blancas de la interfase fueron colectadas, diluidas con dos volúmenes de NaCl 0,9% y centrifugadas a 250 x g por 10 minutos a temperatura ambiental. Las células colectadas se resuspendieron y lavaron dos veces con medio RPMI 1640 suplementado con 200 mM glutamina, 10 mM aminoácidos no esenciales, penicilina y estreptomycin sin suero fetal de bovino. El sedimento final se resuspendió en el mismo medio con suero fetal de bovino al 10%. El número de linfocitos humanos se determinó por conteo bajo el microscopio en una cámara de Neubauer.

Los linfocitos humanos fueron cultivados en placas de microtitulación de 96 pocillos en medio RPMI 1640 suplementado como se describió más arriba, más 10 % suero bovino fetal a 37°C y con CO₂ al 5%. Cerca de 30.000 linfocitos por pocillo se cultivaron con o sin 10 µg/ml del mitógeno PHA, que induce la proliferación (Yu y colab., 1991). Después de 48 a 72 h de tratamiento con PHA, las células están dedicadas activamente a la síntesis de ADN como se demostró por la incorporación de timidina H3 o BrdU (Yu y colab., 1991). Además, después de 48 horas de estimulación con PHA los linfocitos sobreexpresan otros marcadores de proliferación celular tal como el antígeno nuclear de células en proliferación o PCNA y Ki-67 (Bantis y colab., 2004) (Figura 7). Los linfocitos en reposo o controles no expresaron dichos antígenos (Figura 7).

Para determinar si los linfocitos expresaban los ARNs quiméricos mitocondriales sentido, las células fueron sometidas a hibridación *in situ* con sondas oligonucleotídicas marcadas con digoxigenina y dirigidas al ARN quimérico mitocondrial sentido. El protocolo de hibridación *in situ* empleado fue descrito en Ejemplo 5. Se obtuvo una fuerte señal de hibridación que indican la sobreexpresión de este transcrito (Figura 7). La señal de hibridación fue similar en intensidad a la observada en células tumorales u otras células normales en proliferación (Comparar la Figura 7 con la Figura 4 A y B, Figura 5A y B). No se observó señal de hibridación en los linfocitos controles, incubados sin PHA (Figura7).

Cuando se llevó a cabo la hibridación *in situ* con sondas oligonucleotídicas marcados con digoxigenina y dirigidas al ARN quimérico mitocondrial antisentido, se obtuvo una señal de hibridación igualmente fuerte (Figura 7). Diversos controles se realizaron para descartar la posibilidad que la señal de hibridación se debiera a artefactos. La señal de hibridación desaparece si la hibridación *in situ* se realiza con la sonda marcada junto con un exceso (50 a 100 veces) de la misma sonda sin marcar con digoxigenina. Si se incuban las muestras con ribonucleasa A por la noche, la señal de hibridación desaparece. Tampoco se observa señal de hibridación si ésta se lleva a cabo con una sonda que contenga 4 nucleótidos no complementarios. En contraste, no se obtiene señal en la hibridación *in situ* de linfocitos no estimulados (Figura 7). En conclusión, los linfocitos humanos normales estimulados a proliferar sobreexpresan ambos, el ARN quimérico mitocondrial sentido y el ARN quimérico mitocondrial antisentido. Estos transcritos no se expresan en células en reposo proliferativo.

EJEMPLO 9

El ARN quimérico mitocondrial sentido muestra diferentes localizaciones en células normales y tumorales.

Las hibridaciones *in situ* descritas en los Ejemplos 5 y 6, muestran que en varias líneas de células tumorales y en células tumorales de biopsias humanas el ARN quimérico mitocondrial sentido se localiza preferentemente en el citoplasma. Sin embargo, en algunas biopsias de tumores se identificó una clara localización nuclear de los transcritos (Figura 4 A, B).

- 5 Un hallazgo sorprendente fue la localización del ARN quimérico mitocondrial sentido en el nucléolo. La hibridación *in situ* realizada como se informa en el Ejemplo 5, reveló una señal de hibridación positiva en el nucléolo de células HeLa y SiHa (Figura 8). La señal de hibridación era más fuerte en el nucléolo de célula HFK transformada con HPV 16 (Figura 8). La localización nucleolar ha sido encontrada también en células tumorales en tumores de glándula mamaria y rabdomiosarcoma (Figura 8).
- 10 Estudios de colocalización indican que el ARN quimérico mitocondrial sentido ubicado en el citoplasma está situado fuera de las mitocondrias y asociado a endosomas tardíos/ lisosomas. Si los estudios de colocalización se realizan con marcadores de mitocondrias tal como Mitotrack (Molecular Probes) o anticuerpos anticitocromo c (Promega) o anti endonucleasa G (Chemicon) la hibridación *in situ* muestra una colocalización pobre. Sin embargo, se encontró una colocalización perfecta entre la señal de hibridación y los marcadores inmunoquímicos de endosomas
- 15 tardíos/lisosomas tales como Lysotrack (Molecular Probes) o anticuerpos anti-Lamp-2 (BD Pharmingen) o anticatepsina D (Zymed).

- 20 Células HeLa fueron hibridadas *in situ* con sondas de oligonucleótidos marcadas con digoxigenina como se describe en el Ejemplo 5. Después de los procedimientos de posthibridación y lavado, las células fueron incubadas con un anticuerpo antidigoxigenina marcado con rodamina y un anticuerpo anti Lamp-2 marcado con fluoresceína. Después de incubación por 3 h en la oscuridad, los portaobjetos fueron lavados, montados y analizados en un microscopio confocal Zeiss. Se obtuvo una clara colocalización de la señal de hibridación con la localización de Lamp-2. También se obtuvo colocalización de la señal de hibridación con Lysotrack o anticuerpos anticatepsina D como marcadores de la fracción lisosomal. Hasta donde sabemos, esta es la primera información que un ARN (en especial un transcrito mitocondrial) se asocia a los lisosomas de una célula. La determinación de la localización del
- 25 ARN quimérico mitocondrial sentido en células tumorales puede tener valor predictivo para pacientes de cáncer. En general, en células normales en proliferación, los ARN quimérico mitocondrial sentido y antisentido se localizan principalmente en el núcleo

EJEMPLO 10

- 30 **El tratamiento *in vitro* de células tumorales con oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido induce la muerte celular.**

- Células HL-60 fueron cultivadas en las condiciones óptimas recomendadas por la ATCC. Alrededor de 30.000 células fueron cultivadas en placas de 96 pocillos. Se agregó oligonucleótidos (2 μ M) dirigidos al ARN quimérico mitocondrial sentido o antisentido. Para aumentar la permeabilidad de las células, los oligonucleótidos se agregaron mezclados con lipofectamina u oligofectaminas (Invitrogen) o con polietilenimida (PEI) (Exgen TM 500, Fermentas).
- 35 Se prefirió PEI porque es virtualmente no tóxica para las células. Las células fueron incubadas con los oligonucleótidos por 6 h y el porcentaje de sobrevivencia celular fue establecido por la permeabilidad a Azul Tripan. Después de 6 h de incubación con los oligonucleótidos muere un porcentaje importante de las células. Sin embargo, los oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido fueron más efectivos en inducir la muerte celular (cerca de 90% versus 15% de mortalidad celular). Por otra parte, no se indujo apoptosis cuando las células
- 40 fueron tratadas con oligonucleótidos dirigidos al ARN mitocondrial 12S o el ARNm de la unidad ND1 o con oligonucleótidos con secuencias con orden alterado, o con oligonucleótidos que contienen 4 nucleótidos no complementarios, todos los cuales fueron usados como control. Los oligonucleótidos usados contienen uniones fósforotioato en los primeros 5 nucleótidos del extremo 5' y en los últimos cinco nucleótidos del extremo 3'. En promedio los 10 nucleótidos centrales contienen enlaces fosforodiéster.

- 45 Para establecer si el tratamiento de las células con estos oligonucleótidos induce la fragmentación del ADN, las células HL-60 fueron incubadas con oligonucleótidos por 6 h bajo las mismas condiciones descritas antes. Alrededor de 30.000 células HL-60 fueron cultivadas en 200 μ l de UDMEM más suero bovino fetal al 10 % en placas de 96 pocillos junto con 1 μ M de oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial sentido o dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido. La composición de la mezcla de oligonucleótidos con PEI agregada fue la misma descrita en la sección anterior. Después de una incubación de 6 h con los oligonucleótidos, se analizó la fragmentación del ADN celular usando el ensayo TUNEL (DeadEnd Colorimetric TUNEL System, Promega). Como se ve en la Tabla 2, cerca del 96% de las células mostró fragmentación del ADN después del tratamiento con oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido. El tratamiento con la droga estaurosporina logró una cifra similar. Los oligonucleótidos con secuencias con orden alterado u oligonucleótidos que contienen
- 50 bases no complementarias, no mostraron efectos. En contraste, sólo alrededor de 20% de las células murió cuando fueron tratadas con un oligonucleótido dirigido al ARN quimérico mitocondrial sentido (Tabla 2). Como se mostró previamente, las células tumorales inhiben la expresión del ARN quimérico mitocondrial antisentido y en

consecuencia estas células poseen un bajo número de copias de este transcrito. Por lo tanto, la muerte celular es inducida más eficientemente por los oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido. Estos resultados sugieren poderosamente que el bajo número de copias del ARN quimérico mitocondrial en células tumorales constituye un blanco para la terapia del cáncer.

Tabla 2.

Oligonucleótidos complementarios al ARN quimérico mitocondrial antisentido inducen apoptosis en células HL-60.

Tratamiento		Porcentaje de células apoptóticas
		Determinado por TUNEL
5		
	Control	3.0 %
	Oligonucleótidos complementarios al ARN quimérico antisentido	96.7 %
10	Oligonucleótidos que contienen	
	4 nucleótidos no complementarios	4.0 %
	Oligonucleótidos con secuencia con orden alterado	3.5 %
	Oligonucleótidos complementarios al ARN quimérico sentido	26.7 %
15	Estauosporina	
		98.4 %
	Oligonucleótidos complementarios al ARN sentido 12S.	3.7 %
20	Oligonucleótidos complementarios al ARN antisentido 12S.	
		4,1 %
25		
30	En otro estudio , determinamos si el tratamiento de células con oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido induce la activación de caspasas. Las caspasas son enzimas proteolíticas involucradas activamente en la muerte celular programada o apoptosis. Células HL-60 fueron incubadas con oligonucleótidos dirigidos ARN quimérico mitocondrial antisentido o con estauosporina por 6 h bajo las condiciones de cultivo descritas anteriormente. Luego se agregó VAD-fmk (Caspase FITC-VAD-FMK, Promega) conjugado con fluoresceína al cultivo, y se incubó por 30 min a 37°C. Vad-fmk es un fuerte inhibidor de las caspasas y se une a las proteasas con muy alta afinidad (Gracia-Calvo y colab., 1998). Las células fueron lavadas por centrifugación, montadas en portaobjetos y observadas en un microscopio de fluorescencia. Como se muestra en la Figura 9, el tratamiento de las células HL-60 con el oligonucleótido dirigido al ARN quimérico mitocondrial antisentido indujo activación de las caspasas, hasta un nivel similar al alcanzado con estauosporina. No se obtuvo activación de caspasas con oligonucleótidos dirigidos contra el ARN mitocondrial 12S antisentido usado como control.	
35	Las células tratadas con oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido muestran otros cambios compatibles con apoptosis. La observación al microscopio electrónico muestra fragmentación nuclear y condensación de cromatina. La fragmentación nuclear se demostró también tiñendo los núcleos con DAPI.	

Después del tratamiento con estos oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido, las células sufren fragmentación nuclear como revela la tinción con DAPI (Figuras 9E y 9F).

EJEMPLO 11.

Otras células tumorales también sufren muerte celular cuando son tratadas con oligonucleótidos complementarios al ARN quimérico mitocondrial antisentido.

Otras células tumorales fueron tratadas con oligonucleótidos complementarios al ARN quimérico mitocondrial antisentido según el protocolo descrito en el Ejemplo 10. Las células fueron incubadas en sus condición óptima de acuerdo a la recomendación de la ATCC y se agregó oligonucleótido 2 μ M junto con PEI durante el período inicial de experimento. Seis horas después se efectuó una segunda adición del oligonucleótido a la misma concentración y se determinó el efecto unas 15 h después de iniciar el experimento. La muerte celular se determinó por tinción con DAPI y por recuento del número de células con núcleo fragmentado. Como se ve en la Tabla 3, sobre un 70% de las células tratadas con oligonucleótidos sufren apoptosis. Es importante notar que las células de melanoma, células de linfoma y las del carcinoma mamario MCF/7, conocidas por su resistencia al tratamiento por drogas, sufren apoptosis en gran proporción (Tabla 3).

Tabla 3.

Inducción de apoptosis en células tumorales por tratamiento con oligonucleótidos complementarios al ARN quimérico mitocondrial antisentido.

Células	Porcentaje de Células Apoptóticas* (tinción con DAPI)
MCF/7	89 % $\pm$ 9
Melanoma 4295	86 % $\pm$ 7
Hep G2	93 % $\pm$ 3
Hela	91 % $\pm$ 5
DU145	89 % $\pm$ 6
Linfoma de Devernelle	87 % $\pm$ 5
Caco-2	64 % $\pm$ 7

* El tratamiento fue por 15 h con oligonucleótidos 2 μ M. La apoptosis en células sin tratamiento o tratadas con oligonucleótidos desordenados o no complementarios, varía entre 3 y 10%

Para determinar si hay regiones en el transcrito que sean blancos más eficientes en inducir apoptosis por parte de los oligonucleótidos se realizaron los siguientes experimentos. La inducción de apoptosis se estudió en células HeLa, HL-60 y MCF/7 con oligonucleótidos de alrededor de 20 nucleótidos, dirigidos cada aproximadamente 30 nucleótidos, partiendo de el extremo 5' del ARN quimérico mitocondrial antisentido. Al tiempo cero se agregaron 1 μ M de oligonucleótidos junto con PEI. Este tratamiento fue repetido 6h más tarde. Quince horas después del comienzo del experimento la proporción de células en apoptosis se determinó por tratamiento con DAPI y recuento de las células con núcleos fragmentados. Aún cuando la mayoría de los oligonucleótidos produjeron un grado variable de apoptosis, la región de una hebra del ARN quimérico mitocondrial antisentido resultó un mejor blanco para inducir la muerte celular. Los oligonucleótidos dirigidos a la posible región de doble hebra o la estructura de asa del ARN quimérico mitocondrial antisentido fueron menos efectivos.

La apoptosis puede ser determinada por tinción con azul tripán, tinción de yoduro de propidio e inmunquímica de anexina. En dichas técnicas, las células pueden ser analizadas por microscopía fluorescente o citometría de flujo. La fragmentación del DNA puede ser medida por TUNEL o por electroforesis para revelar el tamaño de los trozos de

ADN. El análisis por *Western blot* puede ser usado para determinar el procesamiento de proteínas tales como las caspasas, poli(ADP-Rib) sintetasa, etc.

EJEMPLO 12

5 **Las células normales en proliferación o en reposo tratadas con oligonucleótidos complementarios al ARN quimérico mitocondrial antisentido son refractarias a la apoptosis.**

Como se describió anteriormente las células normales en proliferación sobreexpresan el ARN quimérico mitocondrial antisentido así como el ARN quimérico mitocondrial sentido. Las células en reposo proliferativo no expresan ninguno de estos transcritos. Por lo tanto es importante determinar si los oligonucleótidos complementarios al ARN quimérico mitocondrial antisentido inducen la muerte de las células normales.

- 10 Linfocitos humanos se estimularon con PHA 10 µg por ml por 48 h como se describe en el Ejemplo 8. Paralelamente linfocitos control se incubaron también 48 h pero sin PHA. A las 48 h se les agregó 15 µM de oligonucleótido mezclado con PEI (ver Ejemplo 10) a los cultivos de células estimuladas y controles, los que después fueron incubados por 15h. La concentración de oligonucleótido fue 10 veces mayor que la concentración usada en experimentos anteriores (1 – 2 µM). Otras muestras de linfocitos estimulados o control se trataron con 0.4 µM estaurosporina por el mismo período de tiempo. Al terminar el experimento la muerte celular fue medida por tinción con azul tripán o DAPI. Como se ve en la Figura 10, los linfocitos control y los linfocitos estimulados con PHA incubados por 15 h sin oligonucleótido mostraron un nivel similar de apoptosis espontánea que variaba entre 7 y 10% en diferentes experimentos. Un resultado similar se obtuvo con una concentración menor (1 – 2 µM) de oligonucleótido. También los linfocitos controles y estimulados incubados con 15 µM de oligonucleótido mostraron un parecido bajo nivel de apoptosis (alrededor de 10%) (Figura 10). Por el contrario, los linfocitos control o estimulados con PHA e incubados con estaurosporina también por 15 h tuvieron sobre el 80% de apoptosis (Figura 10). Este es un resultado muy importante porque demuestra que las células normales en reposo proliferativo o las células normales en proliferación, como los linfocitos humanos son refractarias a la inducción de apoptosis por oligonucleótidos complementarios al ARN quimérico mitocondrial antisentido. En otras palabras, la inducción de apoptosis en células tumorales interfiriendo con el ARN quimérico mitocondrial antisentido es una táctica selectiva para la terapia del cáncer.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Adrain y colab., "Regulation of apoptotic protease activating factor-1 oligomerization and apoptosis by the WD-40 repeat region", *J Biol Chem.* 274:20855-20860, 1999.
- 30 Bantis y colab., "Expression of p129, Ki-67 and PCNA as proliferation markers in imprint smears of prostate carcinoma and their prognostic value", *Cytopathology*, 15:25-31, 2004.
- Beaucage, "Oligodeoxyribonucleotides synthesis. Phosphoramidite approach", *Methods Mol. Biol.* 20:33-61, 1993.
- Benedict y colab., "Expression and functional analysis of Apaf-1 isoforms. Extra Wd-40 repeat is required for cytochrome c binding and regulated activation of procaspase-9", *J Biol Chem.* 275:8461-8468, 2000.
- 35 Benoist y Chambon, "In vivo requirement of the SV40 early promoter region", *Nature* 290:304-310, 1981.
- Boya y colab., "Mitochondrion-targeted apoptosis regulators of viral origin", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304:575-581, 2003.
- Brinster y colab., "Regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion plasmids injected into mouse eggs", *Nature* 296:39-42, 1982.
- 40 Burzio y colab., "Environmental bioadhesion: themes and applications", *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8:309-312, 1997.
- Capaldi y colab., "Highly efficient solid phase synthesis of oligonucleotide analogs containing phosphorodithioate linkages", *Nucleic Acids Res.* 28:E40, 2000..
- Carew y Huang, "Mitochondrial defects in cancer", *Mol. Cancer*, 1:1-12, 2002.
- Celis, "Cell Biology, A Laboratory Handbook", Julio E. Celis, ed., 1994

- Chinnery y Turnbull, "Mitochondrial DNA mutations in the pathogenesis of human disease", *Mol. Med. Today*, 6:425-432, 2000.
- Clayton y Vinograd, "Circular dimer and catenate forms of mitochondrial DNA in human luekaemic leucocytes", *Nature*, 216:652-657, 1967.
- 5 Clayton y Vinograd, "Complex mitochondrialDNA in leukemic and normal human myeloid cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, 62:1077-1084, 1969.
- Clayton, "Transcription and replication of mitochondrial DNA", *Hum Reprod. Suppl* 2:11-17, 2000.
- 10 Comanor y colab., "Successful HCV genotyping of previously failed and low viral load specimens using an HCV RNA qualitative assay based on transcription-mediated amplification in conjunction with the line probe assay.", *J. Clin Virol.*, 28:14-26,2003.
- Egholm y colab., "PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules", *Nature*, 365:566-568, 1993.
- Elbashir y colab., "Duplexes of 21-nucleotides RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells," *Nature* 411:494-498, 2001.
- 15 Falkenberg y colab., "Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA", *Nat Genet.* 31:289-294, 2002.
- Ferri y Kroemer, "Organelle-specific initiation of cell death pathways", *Nature Cell Biol.* 3:E255-263, 2001.
- Frederick y colab., in "Current Protocols In Molecular Biology", Volume 2, Unit 14, Frederick M. Ausubul y colab. eds., 1995.
- 20 Gracia-Calvo y colab., "Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors", *J. Biol. Chem.*, 273:32608-32613, 1998.
- Guicciardi y colab., "Lysosomesin cell death", *Oncogene*, 23:2881-2890, 2004.
- Haseloff y colab., "Sequence required for self-catalysed cleavage of the satellite RNA of tabacco ringspot virus", *Gene*, 82:43-52, 1989.
- 25 Hausen, " Papillomavirus infection- a major cause of human cancer," *Biochim.Biophys. Acta*, 1288:F55-F78, 1996.
- Hedge y colab., "Commitment to apoptosis induced by tumour necrosis factor-alpha is dependent on caspase activity", *Apoptosis*,7:123-132, 2002.
- Hyrup y Nielsen, "Peptide nucleic acids (PNA): synthesis,properties and potential applications", *Bioorg. Med. Chem.*, 4:5-23, 1996.
- 30 Johnstone y colab., "Apoptosis: a link between cancer genetics y chemotherapy", *Cell* 108:153-164, 2002.
- Kobayashi y colab., "Genomic structure of HTLV: detection of defective genome y its amplification in MT2 cells", *EMBO J.*, 3:1339-1343, 1984
- Komarov y colab., "A chemical inhibitor of p53 that protect mice from the side effects of cancer therapy", *Science* 285:1733-1737, 1999.
- 35 Krammer, "CD95's deadly mission in immune system", *Nature* 407:789-795, 2000.
- Li y colab., "Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria", *Nature*, 412:95-99, 2001.
- Liu y colab., "Synthetic peptides y non-peptidic molecules as probes of structure y function of Bcl-2 family proteins y modulators of apoptosis", *Apoptosis*, 6:453-462, 2001..
- 40 Lu y colab., "siRNA-mediatted antitumorigenesis for drug target validation y therapeutics," *Curr. Opin. Mol. Ther.* 5:225-234, 2003.

- Mag y colab., "Synthesis y selective cleavage of an oligodeoxynucleotide containing a bridged internucleotide 5'-phosphorothioate linkage", *Nucleic Acids Res.* 19:1437-1441, 1991; y U.S. Pat. No 5.644.048
- Martins y colab., "The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif", *J. Biol. Chem.* 277:439-444, 2002.
- 5 McCulloch y colab., "A human mitochondrial transcription factor is related to RNA adenine methyltransferases and binds S-adenosylmethionine", *Mol. Cell Biol.* 22:1116-1125, 2002.
- McKay y colab., "Characterization of a potent and specific class of antisense oligonucleotide inhibitor of human protein kinase C- α expression", *J. Biol. Chem.*, 274:1715-1722, 1999.
- 10 McKinnell y colab., "The Biological Basis of Cancer, (R:G:McKinnell, R:E: Parchment, A:O: Perantoni, G:B: Pierce, eds.), Ch.3, Cambridge University Press, UK, 1998
- McManus y colab., "Gene silencing in mammals by small interfering RNAs," *Nature Rev.Genet.* 3: 737-747, 2002.
- Meier y colab., "Apoptosis in development", *Nature* 407:796-801, 2000.
- Myers y colab., "Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase", *Biochemistry*, 30:7661-7666, 1991.
- 15 Nielsen y colab., "Peptide nucleic acids (PNA): oligonucleotide analogs with a polyamide backbone", in S. Crooke, B. Lebleu (eds.) *Antisense Research and Applications*, Ch 9, CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 363-373, 1993.
- Parisi y Clayton, "Similarity of human mitochondrial transcription factor 1 to high mobility group proteins", *Science*. 252:965-969, 1991.
- 20 Parrella y colab., "Detection of mitochondrial DNA mutations in primary breast cancer and fine-needle aspirates", *Cancer Res.*, 61:7623-7626, 2001.
- Rampino y colab., "Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype", *Science*, 275:967-969, 1997.
- Rantanen y colab., "Characterization of the mouse genes for mitochondrial transcription factors B1 and B2", *Mamm Genome*. 14:1-6, 2003.
- 25 Ravagnan y colab., "Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor", *Nat Cell Biol.* 3:839-843, 2001.
- Reed, "Dysregulation of apoptosis in cancer", *J. Clin. Oncol.*, 17:2941-2953, 1999.
- Rossi, "Practical ribozymes. Making ribozymes work in cells", *Curr Biol.* 4:469-471, 1994.
- Sambrook y colab., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, (Sambrook, J., Fritsch, E.T. y Maniatis, T. Eds.), 2nd Edn, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY. 1989.
- 30 Samejima y colab., "CAD/DFF40 nuclease is dispensable for high molecular weight DNA cleavage and stage I chromatin condensation in apoptosis", *J Biol Chem.* 276:45427-45432, 2001.
- Shuey y Attardi, "Characterization of an RNA polymerase activity from HeLa cell mitochondria, which initiates transcription at the heavy strand rRNA promoter and the light strand promoter in human mitochondrial DNA", *J Biol Chem.* 260:1952-1958, 1985.
- 35 Stephens y Rivers, "Antisense oligonucleotide therapy in cancer", *Curr. Opin. Mol. Therapeut.*, 5:118-122, 2003
- Summerton, "Morpholino antisense oligomers: a case for an RNase H-independent structural type", *Biochim. Biophys. Acta*, 1489:141-158, 1999.
- Suzuki y colab., "A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with xiap, inducing cell death", *Mol. Cell*, 8:613-621, 2001.

- Taanman, "The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication", *Biochim. Biophys. Acta*, 1410:103-123, 1999.
- Tan y colab., "Comprehensive scanning of somatic mitochondrial DNA mutations in breast cancer", *Cancer Res.*, 62:972-076, 2002.
- 5 Teitz y colab., "Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN", *Nature Med.* 6:529-535, 2000.
- Tidd y colab., "Oligodeoxynucleotide 5mers containing a 5'-CpG induce apoptosis through a mitochondrial mechanism in T lymphocytic leukemia cells," *Nucleic Acids Res.* , 28:2242-2250 (2000).
- 10 Tiranti y colab., "Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the Expressed Sequence Tags database", *Hum Mol Genet.* 6:615-625, 1997.
- Verhagen y colab., "Cell death regulation by the mammalian IAP antagonist Diablo/Smac", *Apoptosis*, 7:163-166, 2002.
- Vickers y colab., "Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and Rnase H-dependent antisense agents", *J. Biol. Chem.*, 278:7108-7118, 2003.
- 15 Villegas y colab., "A novel chimeric mitochondrial RNA localized in the nucleus of mouse sperm", *DNA & Cell Biol.* 19:579-588, 2000.
- Villegas y colab., "A putative RNA editing from U to C in a mouse mitochondrial transcript", *Nucleic Acids Res.* 30:1895-1901, 2002.
- Vogelstein y colab., "Surfing the p53 network", *Nature* 408: 307-310, 2000.
- 20 Wacheck y colab., " Small interfering RNA targeting Bcl-2 sensitizes malignant melanoma," *Oligonucleotides* 13:393-400, 2003.
- Wagner y colab., "Nucleotide sequence of the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1441-1445, 1981.
- 25 Wahlestedt y colab., "Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids", *Proc. Natl. Acad. Sci. US*, 97:5633-5638, 2000.
- Warburg, "On the origin of cancer cells", *Science*, 123:309-314, 1956.
- Wu y colab., "Immunofluorescentlabeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots," *Nature Biotechnol.* 21:41-46, 2003.
- 30 Yamamoto y colab., "Identification of a functional promoter in the long terminal repeat of Rous sarcoma virus", *Cell* 22:787-797, 1980
- Yu y colab., "Vitamin D receptor expression in human lymphocytes. Signal requirements and characterization by western blots and DNA sequencing", *J. Biol. Chem.*, 266:7588-7595, 1991.
- Zaug y colab., "A labile phosphodiester bond at the ligation junction in a circular intervening sequence RNA", *Science*, 224:574-578, 1984.
- 35 Zörnig y colab., "Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis", *Biochim.Biophys. Acta*, 1551:F1-F37, 2001.

LISTADO DE SECUENCIAS

<100> Información General

<110> Burzio, Luis O.; Villegas, Jaime; Burzio, Verónica A.

5 <120> Marcadores para células pre-cancerosas y cancerosas y el método para interferir con la proliferación celular en ellas

<130> P68863US1

<140>

<141>

10 <150> US 60/472,106

<151> 2003-05-21

<160> NUMERO DE SEQ ID NOS: 197

15 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

<210> SEQ ID NO 1

<211> LONGITUD: 2374

<212> TIPO: DNA

<213> ORGANISMO: Homo sapiens

20 <220> CARACTERISTICAS:

<222> UBICACION:

<223> OTRA INFORMACION

<400> SECUENCIA: 1

25	tctaatactg	gtgatgctag	aggtgatgtt	tttggtaaac	aggcggggta	agatttgccg	60
	agttcctttt	acttttttta	acctttcctt	atgagcatgc	ctgtgttggg	ttgacagtga	120
	gggtaataat	gacttggttg	ttgattgtag	atattgggct	gttaattgtc	agttcagtgt	180
	tttaaatctga	cgcaggctta	tgcgaggag	aatgttttca	tgttacttat	actaacatta	240
	gttcttctat	aggggtgatag	attgggtccaa	ttgggtgtga	ggagttcagt	tatatgtttg	300
30	ggatttttta	ggtagtgggt	gttgagcttg	aacgctttct	taattgggtg	ctgcttttag	360
	gcctactatg	ggtgtttaat	tttttactct	ctctacaagg	ttttttccta	gtgtccaaag	420
	agctgttcct	ctttggacta	acagttaaatt	ttacaagggg	atttagaggg	ttctgtgggc	480
	aaatttaaag	ttgaactaag	attctatctt	ggacaaccag	ctatcaccag	gctcggtagg	540
	tttgtcgctt	ctacctataa	atcttcccac	tatttttgcta	catagacggg	tgtgctcttt	600
35	tagctgttct	taggtagctc	gtctgggttc	gggggtctta	gctttggctc	tccttgcaaa	660
	gttattttcta	gttaatttcat	tatgcagaag	gtataggggt	tagtccttgc	tatattatgc	720
	ttgggtataa	tttttcatct	ttcccttgcg	gtactatatc	tattgcgcca	ggtttcaatt	780
	tctatcgctt	atacttttatt	tgggtaaatg	gtttggctaa	acctagcccc	aaaccctact	840
	caccttacta	ccagacaacc	ttagccaaac	catttaccba	aataaagtat	aggcgataga	900
40	aattgaaacc	tggcgcaata	gatatagtac	cgcaagggaa	agatgaaaaa	ttataaccba	960
	gcataatata	gcaaggacta	accctataac	cttctgcata	atgaattaac	tagaaataac	1020
	tttgcaagga	gagccaaagc	taagaccccc	gaaaccagac	gagctaccta	agaacagcta	1080
	aaagagcaca	cccgtctatg	tagcaaaata	gtgggaagat	ttataggtag	aggcgacaaa	1140
	cctaccgagc	ctgggtgatag	ctgggtgtcc	aagatagaat	cttagttcaa	ctttaaattt	1200
45	gcccacagaa	ccctctaaat	ccccttgtaa	atttaactgt	tagtccaaag	aggaacagct	1260
	ctttggacac	taggaaaaaa	ccttgtagag	agagtaaaaa	atttaacacc	catagtaggc	1320
	ctaaaagcag	ccaccaatta	agaaagcggt	caagctcaac	acccactacc	taaaaaatcc	1380
	caaacatata	actgaactcc	tcacacccaa	ttggaccaat	ctatcacctt	atagaagaac	1440
	taatgttagt	ataagtaaca	tgaaaacatt	ctcctccgca	taagcctgcg	tcagattaaa	1500
50	acactgaact	gacaattaac	agcccaatat	ctacaatcaa	ccaacaagtc	attattaccc	1560
	tcactgtcaa	cccaacacag	gcatgctcat	aaggaaagggt	taaaaaaagt	aaaaggaact	1620
	cggcaaatct	taccccgctt	gtttaccaa	aacatcacct	ctagcatcac	cagtattaga	1680
	ggcaccgcct	gcccagtgac	acatgtttta	cggccgcggt	accctaaccg	tgcaaaggta	1740
	gcataatcac	ttgttcctta	aatagggacc	tgtatgaatg	gctccacgag	ggttcagctg	1800
55	tctcttactt	ttaaccagtg	aaattgacct	gcccgtgaag	aggcgggcat	aacacagcaa	1860
	gacgagaaga	ccctatggag	ctttaattta	ttaatgcaaa	cagtacctaa	caaaccacaa	1920
	ggtcctaacc	taccaaacct	gcattaaaaa	tttcggttgg	ggcgacctcg	gagcagaacc	1980
	caacctccga	gcagtagcatg	ctaagacttc	accagtcaaa	gcgaactact	atactcaatt	2040
	gatccaataa	cttgaccaac	ggaacaagtt	accctagggg	taacagcgca	atcctattct	2100
60	agagtccata	tcaacaatag	ggttttacgac	ctcgatgttg	gatcaggaca	tcccgatggg	2160
	gcagccgcta	ttaaagggttc	gtttgttcaa	cgattaaagt	cctacgtgat	ctgagttcag	2220

```

accggagtaa tccaggtcgg tttctatcta ccttcaaatt cctccctgta cgaaaggaca 2280
agagaaataa ggcctacttc acaaagcgcc ttccccgta aatgatatca tctcaactta 2340
gtattatacc cacacccacc caagaacagg gttt                                     2374

```

5

<200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

<210> SEQ ID NO 2

<211> LONGITUD: 1679

<212> TIPO: DNA

10 <213> ORGANISMO: Homo sapiens

<220> CARACTERISTICAS:

<222> UBICACION:

<223> OTRA INFORMACION

<400> SECUENCIA: 2

15

```

gggggtcttag ctttggctct ccttgcaaag ttatttctag ttaattcatt atgcagaagg      60
tataggggtt agtccttgct atattatgct tggttataat ttttcatctt tcccttgctg      120
tgctaaacct agccccaac ccactccacc ttactaccag acaaccttag ccaaacatt      180
tacccaaata agtatatggc gatagaaatt gaaacctggc gcaatagata tagtaccgca      240
20 agggaaagat gaaaaattat aaccaagcat aatatagcaa ggactaacc ctatacctt      300
tgcataatga attaactaga aataactttg caaggagagc caaagctaag accccgaaa      360
ccagacgagc tacctaagaa cagctaaaag agcacaccgc tctatgtagc aaaatagtgg      420
gaagatttat aggtagaggc gacaaacctt ccgagcctgg tgatagctgg ttgtccaaga      480
tagaatctta gttcaacttt aaatttgccc acagaacctt ctaaattccc ttgtaaattt      540
25 aactgttagt ccaaagagga acagctcttt ggacactagg aaaaaacctt gtagagagag      600
taaaaaattt aacacccata gtaggcctaa aagcagccac caattaagaa agcgttcaag      660
ctcaacaccc actacctaaa aaatcccaaa catataactg aactcctcac acccaattgg      720
accaatctat caccctatag aagaactaat gttagtataa gtaacatgaa aacattctcc      780
tccgcataag cctgcgtcag attaaaacac tgaactgaca attaacagcc caatatctac      840
30 aatcaaccaa caagtcatta ttaccctcac tgtcaaccca acacaggcat gtcataagg      900
aaaggttaaa aaaagtaaaa ggaactcggc aaatcttacc ccgcctgttt accaaaaaca      960
tcacctctag catcaccagt attagaggca ccgcctgccc agtgacacat gtttaacggc     1020
cgcggtaccc taaccgtgca aaggtagcat aatcacttgt tccttaataa gggacctgta     1080
tgaatggctc cagcagggtt cagctgtctc ttacttttaa ccagtgaat tgacctgccc     1140
35 gtgaagaggc gggcataaca cagcaagacg agaagacctt atggagcttt aatttattaa     1200
tgcaaacagt acctaacaaa cccacaggtc ctaaactacc aaacctgcat taaaaatttc     1260
ggttggggcg acctcgagc agaacccaac ctccgagcag tacatgctaa gacttcacca     1320
tgcaaagcga actactatac tcaattgac caataacttg accaacggaa caagttaccc     1380
tagggataac agcgaatcc tattctagag tccatatcaa caatagggtt tacgacctcg     1440
40 atgttggatc aggcatccc aatggtgcag ccgctattaa aggttcgttt gttcaacgat     1500
taaagtccta cgtgatctga gttcagaccg gagtaatcca ggtcggtttc tatctacttc     1560
aaattcctcc ctgtacgaaa ggacaagaga aataaggcct acttcacaaa gcgccttccc     1620
ccgtaaatga tatcatctca acttagtatt ataccacac ccaccaaga acagggttt     1679

```

45

<200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

<210> SEQ ID NO 3

<211> LONGITUD: 1635

<212> TIPO: DNA

50 <213> ORGANISMO: Homo sapiens

<220> CARACTERISTICAS:

<223> OTRA INFORMACION:

<222> UBICACION:

<400> SECUENCIA: 3

55

```

gggggtcttag ctttggctct ccttgcaaag ttatttctag ttaattcatt atgcagaagg      60
tataggggtt agtccttgct aaacctagcc ccaaacccac tccaccttac taccagacaa     120
ccttagccaa accatttacc caaataaagt ataggcgata gaaattgaaa cctggcgcaa     180
tagatatagt accgcaaggg aaagatgaaa aattataacc aagcataata tagcaaggac     240
60 taacccttat accttctgca taatgaatta actagaaata actttgcaag gagagccaaa     300
gctaagaccc ccgaaaccag acgagctacc taagaacagc taaaagagca caccctgcta     360
tgtagcaaaa tagtggaag atttataggt agaggcgaca aacctaccga gcctggtgat     420

```

	agctggttgt	ccaagataga	atcttagttc	aacttttaaat	ttgcccacag	aaccttctaa	480
	atccccctgt	aaatttaact	gttagtccaa	agaggaacag	ctctttggac	actaggaaaa	540
	aaccttgtag	agagagtaaa	aaatttaaca	cccatagtag	gcctaaaagc	agccaccaat	600
	taagaaagcg	ttcaagctca	acaccacta	cctaaaaaat	cccaaacata	taactgaact	660
5	cctcacaccc	aattggacca	atctatcacc	ctatagaaga	actaatgtta	gtataagtaa	720
	catgaaaaca	ttctcctccg	cataagcctg	cgtcagatta	aaacactgaa	ctgacaatta	780
	acagcccaat	atctacaatc	aaccaacaag	tcattattac	cctcactgtc	aacccaacac	840
	aggcatgctc	ataaggaaag	gttaaaaaaa	gtaaaaggaa	ctcggcaaat	cttaccctgc	900
	ctgtttacca	aaaacatcac	ctctagcatc	accagtatta	gaggcaccgc	ctgcccagtg	960
10	acacatgttt	aacggccgcg	gtaccctaac	cgtgcaaagg	tagcataatc	acttgttcct	1020
	taaataggga	cctgtatgaa	tggctccacg	aggggtcagc	tgtctcttac	ttttaaccag	1080
	tgaaattgac	ctgcccgtga	agaggcgggc	ataacacagc	aagacgagaa	gaccctatgg	1140
	agctttaatt	tattaatgca	aacagtacct	aacaaaccca	caggctcctaa	actaccaaac	1200
	ctgcattaaa	aatttcgggt	ggggcgacct	cggagcagaa	cccaacctcc	gagcagtaca	1260
15	tgctaagact	tcaccagtca	aagcgaacta	ctatactcaa	ttgatccaat	aacttgacca	1320
	acggaacaag	ttaccctagg	gataacagcg	caatcctatt	ctagagtcca	tatcaacaat	1380
	agggtttacg	acctcgatgt	tggatcagga	catcccaatg	gtgcagccgc	tattaaaggt	1440
	tcgtttggtc	aacgattaaa	gtcctacgtg	atctgagttc	agaccggagt	aatccagggtc	1500
	ggtttctatc	tacttcaaat	tcctccctgt	acgaaaggac	aagagaaata	aggcctactt	1560
20	cacaaagcgc	cttccccctg	aatgatatac	atctcaactt	agtattatac	ccacaccac	1620
	ccaagaacag	ggttt					1635
<200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:							
25	<210> SEQ ID NO 4						
	<211> LONGITUD: 1921						
	<212> TIPO: DNA						
	<213> ORGANISMO: Homo sapiens						
	<220> CARACTERISTICAS:						
30	<222> UBICACION						
	<223> OTRA INFORMACION						
	<400> SECUENCIA: 4						
	aacctccgag	cagtacatgc	taagacttca	ccagtcaaag	cgaactacta	tactcaattg	60
35	atccaataac	ttgaccaacg	gaacaagtta	ccctagggat	aacagcgcaa	tcctatttcta	120
	gagtccatat	caacaatagg	gtttacgacc	tcgatgttgg	atcaggacat	cccaatggtg	180
	cagccgctat	taaaggttcg	tttgttcaac	gattaaagtc	ctacgtgatc	tgagttcaga	240
	ccggagtaat	ccaggtcggt	ttctatctac	ttcaaattcc	tccctgtacg	aaaggacaag	300
	agaaataagg	cctacttcac	aaagcgcctt	cccccgtaaa	tgatatcatc	tcaacttagt	360
40	attataccct	gttcttgggt	gggtgtgggt	ataataactaa	gttgagatga	tatcatttac	420
	gggggaaggc	gctttgtgaa	gtaggcctta	tttctcttgt	cctttcgtac	agggaggaat	480
	ttgaagtaga	tagaaaccga	cctggattac	tccggtctga	actcagatca	cgtaggactt	540
	taatcgttga	acaaacgaac	ctttaatagc	ggctgcacca	tcgggatgtc	ctgatccaac	600
	atcgaggtcg	taaaccctat	tgttgatatg	gactctagaa	taggattgcg	ctgttatccc	660
45	tagggtaact	tgttccggtg	gtcaagttat	tggatcaatt	gagtatagta	gttcgctttg	720
	actgggtgaag	tcttagcatg	tactgctcgg	agggtgggtt	ctgctccgag	gtcgcccaa	780
	ccgaaatttt	taatgcagg	ttggtagttt	aggacctgtg	ggtttggttag	gtactgtttg	840
	cattaataaaa	ttaaagctcc	atagggtctt	ctcgtcttgc	tgtgttatgc	ccgcctcttc	900
	acgggcagg	caatttcact	ggttaaaagt	aagagacagc	tgaaccctcg	tggagccatt	960
50	catacaggtc	cctattttaag	gaacaagtga	ttatgctacc	tttgacagg	tagggtagcg	1020
	cggccgttaa	acatgtgtca	ctgggcaggc	gggtgcctcta	atactgggtga	tgctagaggt	1080
	gatgtttttg	gtaaacaggc	ggggtaagat	ttgccgagtt	ccttttactt	tttttaacct	1140
	ttccttatga	gcatgcctgt	gttgggttga	cagtgagggt	aataatgact	tgttgggtga	1200
	ttgtagatat	tgggctgtta	attgtcagtt	cagtgtttta	atctgacgca	ggcttatgctg	1260
55	gaggagaatg	ttttcatggt	acttataacta	acattagttc	ttctataggg	tgatagattg	1320
	gtccaatttg	gtgtgaggag	ttcagttata	tgtttgggat	tttttaggta	gtgggtgttg	1380
	agcttgaacg	ctttcttaat	tgggtggctgc	tttttaggcct	actatgggtg	ttaaattttt	1440
	tactctctct	acaaggtttt	ttcctagtgt	caaagagagc	gttcctcttt	ggactaacag	1500
	ttaaattttac	aaggggattt	agaggggttct	gtgggcaaat	ttaaagttga	actaagattc	1560
60	tatcttggac	aaccagctat	caccaggctc	ggtaggtttg	tcgcctctac	ctataaatct	1620
	tcccactatt	ttgctacata	gacgggtgtg	ctcttttagc	tgttcttagg	tagctcgtct	1680

5	ggtttcgggg	gtcttagctt	tggctctcct	tgcaaagtta	tttctagtta	attcattatg	1740
	cagaagggtat	aggggttagt	ccttgctata	ttatgcttgg	ttataatttt	tcattctttcc	1800
	cttgcggtac	tatatctatt	gcgccagggt	tcaatttcta	tcgcctatac	tttatttggg	1860
	taaatggttt	ggctaagggt	gtctggtagt	aagggtggagt	gggtttgggg	ctagggttag	1920
	c						1921
10	<200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA: <210> SEQ ID NO 5 <211> LONGITUD: 1744 <212> TIPO: DNA <213> ORGANISMO: Homo sapiens <220> CARACTERISTICAS: <222> UBICACION: <223> OTRA INFORMACION <400> SECUENCIA: 5						
20	tagggataac	agcgcaatcc	tattctagag	tccatatcaa	caataggggt	tacgacctcg	60
	atgttggatc	aggacatccc	gatggtgcag	ccgctattaa	aggttcgttt	gttcaacgat	120
	taaagtccta	cgtgatctga	gttcagaccg	gagtaatcca	ggtcgggttc	tatctacctt	180
	caaattcctc	cctgttcttg	ggtgggtgtg	ggtataatac	taagttgaga	tgatatcatt	240
	tacgggggaa	ggcgctttgt	gaagtaggcc	ttatttctct	tgtcctttcg	tacagggagg	300
	aatttgaagt	agatagaaac	cgacctggat	tactccgggtc	tgaactcaga	tcacgtagga	360
25	ctttaatcgt	tgaacaaacg	aacctttaat	agcggtcgca	ccatcgggat	gtcctgatcc	420
	aacatcgagg	tcgtaaacc	tattgttgat	atggactcta	gaataggatt	gcgctgttat	480
	ccctagggta	acttggtccg	ttggtcaagt	tattggatca	attgagtata	gtagttcgct	540
	ttgactggtg	aagtcttagc	atgtactgct	cggaggttgg	gttctgctcc	gaggctgccc	600
	caaccgaaat	ttttaatgca	ggtttggtag	tttaggacct	gtgggtttgt	taggtactgt	660
30	ttgcattaat	aaattaaagc	tccatagggt	cttctcgtct	tgctgtgtta	tgcccgcctc	720
	ttcacgggca	ggtcaatttc	actggttaaa	agtaagagac	agctgaaccc	tcgtggagcc	780
	attcatacag	gtccctatit	aaggaacaag	tgattatgct	acctttgcac	ggttagggta	840
	ccgcggccgt	taaacatgtg	tcactgggca	ggcggtgcct	ctaatactgg	tgatgctaga	900
	ggtgatgttt	ttggtaaaca	ggcggggtaa	gatttgccga	gttcctttta	ctttttttta	960
35	cctttcctta	tgagcatgcc	tgtgttgggt	tgacagttag	ggtaataatg	acttgttggg	1020
	tgattgtaga	tattgggctg	ttaattgtca	gttcagtgtt	ttaatctgac	gcaggcttat	1080
	gcggaggaga	atgttttcat	gttacttata	ctaacattag	ttcttctata	gggtgataga	1140
	ttggtccaat	tgggtgtgag	gagttcagtt	atatgtttgg	gatttttttag	gtagtgggtg	1200
	ttgagcttga	acgctttctt	aattgggtgc	tgcttttagg	cctactatgg	gtgttaaatt	1260
40	ttttactctc	tctacaagggt	tttttcctag	tgtccaaaga	gctgttcctc	tttgactaa	1320
	cagttaaatt	tacaagggga	tttagagggt	tctgtgggca	aatttaaagt	tgaactaaga	1380
	ttctatcttg	gacaaccagc	tatcaccagg	ctcggtaggt	ttgtcgccctc	tacctataaa	1440
	tcttccact	atittgtctac	atagacgggt	gtgctctttt	agctgttctt	aggtagctcg	1500
	tctggtttcg	ggggtcttag	ctttggctct	ccttgcaaag	ttatttctag	ttaattcatt	1560
45	atgcagaagg	tataggggtt	agtccttgct	atattatgct	tggttataat	ttttcatctt	1620
	tcccttgccg	tactatatct	attgcgccag	gtttcaattt	ctatcgcccta	tactttatit	1680
	gggtaaatgg	tttggctaag	gttgtctggt	agtaagggtg	agtgggtttg	gggctagggt	1740
	tagc						1744
50	<200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA: <210> SEQ ID NO 6 <211> LONGITUD: 1854 <212> TIPO: DNA <213> ORGANISMO: Homo sapiens						
55	<220> CARACTERISTICAS: <222> UBICACION: <223> OTRA INFORMACION <400> SECUENCIA: 6						
60	gaactcggca	aatcttacc	cgctgttta	ccaaaaacat	cacctctagc	atcaccagta	60
	ttagaggcac	cgctgccc	gtgacacatg	tttaacggcc	gcggtaccct	aaccgtgcaa	120

```

5  aggtagcata atcacttggt ccttaaatag ggacctgtat gaatgggtcc acgaggggtc 180
   agctgtctct tacttttaac cagtgaattt gacctgcccg tgaagaggcg ggcattgacac 240
   agcaagacga gaagacccta tggagcttta atttattaat gcaaacagta cctaacaaac 300
   cctgttcttg ggtgggtgtg ggtataatac taagttgaga tgatatcatt tacgggggaa 360
   ggcgctttgt gaagtaggcc ttatttctct tgtcctttcg tacaggaggg aatttgaagt 420
   agatagaaac cgacctggat tactccggtc tgaactcaga tcacgtagga ctttaatcgt 480
   tgaacaaacg aacctttaat agcggctgca ccatcgggat gtcctgatcc aacatcgagg 540
   tcgtaaaccg tattgttgat atggactcta gaataggatt gcgctgttat ccctagggta 600
   acttgttccg ttggtcaagt tattggatca attgagtata gtagttcgct ttgactgggtg 660
10 aagtcttagc atgtactgct cggagggttg gttctgctcc gaggtcgccc caaccgaaat 720
   ttttaatgca ggtttggtag tttaggacct gtgggtttgt taggtactgt ttgcattaat 780
   aaattaaagc tccatagggt cttctcgtct tgcgtgtgta tgcccgcctc ttcacgggca 840
   ggtcaatttc actggttaaa agtaagagac agctgaaccg tcgtggagcc attcatacag 900
   gtccttattt aaggaacaag tgattatgct accttgcac ggtagggta ccgcggccgt 960
15 taaacatgtg tcaactgggc ggcgggtgcct ctaatactgg tgatgctaga ggtgatgttt 1020
   ttggtaaaac ggcggggtaa gatttgccga gttcctttta ctttttttaa ctttcccta 1080
   tgagcatgcc tgtgttgggt tgacagttag ggtaataatg acttgttggg tgattgtaga 1140
   tattgggctg ttaattgtca gttcagtgtt ttaatctgac gcaggcttat gcggaggaga 1200
   atgttttcat gttacttata ctaacattag ttcttctata ggggtgataga ttggtccaat 1260
20 tgggtgtgag gagttcagtt atatgtttgg gattttttag gtagtgggtg ttgagcttga 1320
   acgctttctt aattgggtggc tgccttttag cctactatgg gtgttaaat ttttactctc 1380
   tctacaaggt ttttccctag tgtccaaaga gctgttcctc tttggactaa cagttaaatt 1440
   tacaagggga tttagagggt tctgtgggca aatttaaagt tgaactaaga ttctatcttg 1500
   gacaaccagc tatcaccagg ctcggtagggt ttgtcgccct tacctataaa tcttcccact 1560
25 attttgctac atagacgggt gtgctctttt agctgttctt aggtagctcg tctggtttcg 1620
   ggggtcttag ctttggctct ccttgcaaag ttatttctag ttaattcatt atgcagaagg 1680
   tataggggtt agtccttgct atattatgct tgggtataat ttttcatctt tcccttgcg 1740
   tactatatct attgcgccag gtttcaattt ctatcgccca tactttattt gggtaaatgg 1800
   tttggctaag gttgtctggt agtaagggtg agtgggtttg gggctagggt tagc 1854
30

```

<200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

<210> SEQ ID NO 7

<211> LONGITUD: 20

35 <212> TIPO: DNA

<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERISTICAS:

<223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido

<400> SECUENCIA: 7

40 taggttttag accgcaagg

<200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

<210> SEQ ID NO 8

45 <211> LONGITUD: 20

<212> TIPO: DNA

<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERISTICAS:

<223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido

50 <400> SECUENCIA: 8

taggttttagc aaggactaac

<200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

<210> SEQ ID NO 9

<211> LONGITUD: 18

<212> TIPO: DNA

<213> ORGANISMO: Secuencia artificial

<220> CARACTERISTICAS:

60 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido

<400> SECUENCIA: 9

ggggtaaagat ttgccgag

5 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 10
 <211> LONGITUD: 22
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 10 <400> SECUENCIA: 10
 atgctagagg tgatgttttt gg

15 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 11
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 20 <400> SECUENCIA: 11
 cggtgcctct aatactgg

25 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 12
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 30 <400> SECUENCIA: 12
 gttaaacaatg tgtcactggg

35 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 13
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 40 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 13
 ttgcacggtt aggggtacc

45 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 14
 <211> LONGITUD: 21
 <212> TIPO: DNA
 50 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 14
 ggaacaagtg attatgctac c

55 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 15
 <211> LONGITUD: 21
 60 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 15

ggagccattc atacaggtcc c

- 5 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 16
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 10 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 16
 agtaagagac agctgaaccc
- 15 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 17
 <211> LONGITUD: 19
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 20 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 17
 ggcaggtcaa tttcactgg
- 25 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 18
 <211> LONGITUD: 19
 <212> TIPO: DNA
 30 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 18
 gctgtgttat gccgcctc
- 35 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 19
 <211> LONGITUD: 19
 40 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 19
 45 agctccatag ggtcttctc
- 50 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 20
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 55 <400> SECUENCIA: 20
 gtttaggtact gtttgatta
- 60 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 21
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:

<223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 21
 aagtccttagc atgtactg

5

<200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 22
 <211> LONGITUD: 19
 <212> TIPO: DNA

10

<213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 22
 tagtagttcg ctttgactg

15

<200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 23
 <211> LONGITUD: 19
 <212> TIPO: DNA

20

<213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 23
 caagttattg gatcaattg

25

<200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 24
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 24

30

35

gggtaacttg ttccgttg

<200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 25
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 25
 aataggattg cgctgtta

40

45

<200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 26
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 26
 cctattgttg atatggac

50

55

60

<200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 27
 <211> LONGITUD: 17
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial

5 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 27
 ctgatccaac atcgagg

10 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 28
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 28
 15 tagcggctgc accattgg

20 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 29
 <211> LONGITUD: 19
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 29
 25 gttgaacaaa cgaaccttt

30 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 30
 <211> LONGITUD: 19
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 35 <400> SECUENCIA: 30
 aactcagatc acgtaggac

40 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 31
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 45 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 31
 cgacctggat tactccgg

50 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 32
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 55 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 32
 ggaatttgaa gtagatag

60 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 33
 <211> LONGITUD: 19
 <212> TIPO: DNA

<213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 33
 5 ctcttgtcct ttcgtacag

<200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 34
 10 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 15 <400> SECUENCIA: 34
 ggcgctttgt gaagtagg

<200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 35
 20 <211> LONGITUD: 22
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 25 <400> SECUENCIA: 35
 gttgagatga tatcatttac gg

<200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 36
 30 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 35 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 36
 caccaccca agaacagg

<200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 37
 40 <211> LONGITUD: 25
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 45 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 37
 caacttagta ttataccac accca

50 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 38
 <211> LONGITUD: 22
 <212> TIPO: DNA
 55 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 38
 tccccgtaa atgattacat ct

60 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 39
 <211> LONGITUD: 25

<212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 5 <400> SECUENCIA: 39
 gagaaataag gcctacttca caaag

10 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 40
 <211> LONGITUD: 22
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 15 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 40
 caaatcctc cctgtacgaa ag

20 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 41
 <211> LONGITUD: 24
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 25 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 41
 agtaatccag gtcggtttct atct

30 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 42
 <211> LONGITUD: 24
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 35 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 42
 aagtcctagc tgatctgagt tcag

40 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 43
 <211> LONGITUD: 25
 <212> TIPO: DNA
 45 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 43
 gctattaaag gttcgtttgt tcaac

50 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 44
 <211> LONGITUD: 16
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 55 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 44
 60 tccccgatggt gcagcc

<200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 45

<211> LONGITUD: 22
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 5 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 45
 ttacgacctc gatgttgat ca

10 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 46
 <211> LONGITUD: 25
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 15 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 46
 atcctattct agagtcata tcaac

20 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 47
 <211> LONGITUD: 24
 <212> TIPO: DNA
 25 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 47
 aataggattg cgctgttatc ccta

30 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 48
 <211> LONGITUD: 20
 35 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 48
 40 tagggataac agcgcatacc tatt

45 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 49
 <211> LONGITUD: 23
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 50 <400> SECUENCIA: 49
 ggaacaagtt accctaggga taa

55 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 50
 <211> LONGITUD: 23
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 60 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 50
 ttgatccaat aacttgacca acg

5 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 51
 <211> LONGITUD: 21
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 51
 acttcaccag tcaaagcgaa c

10

15 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 52
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 52
 aaccaacct ccgagcag

20

25 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 53
 <211> LONGITUD: 16
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 54
 gttggggcga cctcgg

30

35 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 55
 <211> LONGITUD: 23
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 55
 aaactaccaa acctgctta aaa

40

45 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 56
 <211> LONGITUD: 24
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 56
 aaacagtacc taacaaaccc acag

50

55 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 57
 <211> LONGITUD: 25
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 57
 gaccctatgg agctttaatt tatta

60

5 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 58
 <211> LONGITUD: 23
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 58
 cataacacag caagacgaga aga

10

15 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 59
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 59
 tgacctgccc gtgaagag

20

25 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 60
 <211> LONGITUD: 26
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 60
 cagctgtctc ttacttttaa ccagtg

30

35 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 61
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 61
 ctgtatgaat ggctccacga

40

45 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 62
 <211> LONGITUD: 26
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 62
 agcataatca cttgttcctt aaatag

50

55 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 63
 <211> LONGITUD: 23
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 63
 accgtgcaaa ggtagcataa tca

60

5 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 64
 <211> LONGITUD: 23
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 64
 10 tgattatgct acctttgcac ggt

15 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 65
 <211> LONGITUD: 19
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 65
 20 gtaccctaac cgtgcaaag

25 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 66
 <211> LONGITUD: 21
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 66
 30 cctgcccagtgacacatgtt t

35 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 67
 <211> LONGITUD: 25
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 67
 40 cacctctagc atcaccagta ttaga

45 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 68
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 68
 50 cttaccccg cgtgttacca

55 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 69
 <211> LONGITUD: 26
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 69
 60 aggttaaaaa aagtaaaagg aactcg

5 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 70
 <211> LONGITUD: 19
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 70
 10 cccaacacag gcatgtctca

15 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 71
 <211> LONGITUD: 24
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 71
 20 accaacaagt cattattacc ctca

25 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 72
 <211> LONGITUD: 24
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 72
 30 tgacaattaa cagcccaata tcta

35 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 73
 <211> LONGITUD: 21
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 73
 40 gcctgcgtca gattaaaca c

45 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 74
 <211> LONGITUD: 24
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 74
 50 gtaacatgaa aacattctcc tccg

55 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 75
 <211> LONGITUD: 28
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 75
 60 tatcaccta tagaagaact aatgtag

5 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 76
 <211> LONGITUD: 21
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 76
 ctgaactcct cacacccaat t

10

15 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 77
 <211> LONGITUD: 23
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 77
 cactacctaa aaaatcccaa aca

20

25 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 78
 <211> LONGITUD: 21
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 78
 ttaagaaagc gttcaagctc a

30

35 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 79
 <211> LONGITUD: 21
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 79
 catagtaggc ctaaaagcag c

40

45 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 80
 <211> LONGITUD: 26
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 80
 aaaccttgta gagagagtaa aaaatt

50

55 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 81
 <211> LONGITUD: 24
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 81
 aaagaggaac agctctttgg acac

60

5 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 82
 <211> LONGITUD: 24
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 82
 aatccccttg taaatttaac tggt

10

15 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 83
 <211> LONGITUD: 21
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 83
 ctttaaattt gccacagaa c

20

25 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 84
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 84
 ggttgtccaa gatagaatct

30

35 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 85
 <211> LONGITUD: 19
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 85
 acaaactac cgagctgg

40

45 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 86
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 86
 aagatttata ggtagaggcg

50

55 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 87
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 87
 cccgtctatg tagcaaaata

60

5 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 88
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 88
 10 acctaagaac agctaaaaga

15 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 89
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 89
 20 taagaccccc gaaaccagac

25 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 90
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 30 <400> SECUENCIA: 90
 ataactttgc aaggagagcc

35 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 91
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 40 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 91
 cttctgcata atgaattaac

45 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 92
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 50 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 92
 atatagcaag gactaaccac

55 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 93
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 60 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 93
 agatgaaaaa ttataaccaa

5 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 94
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 94
 caatagatat agtaccgcaa

10

15 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 95
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 95
 aggcgataga aattgaaacc

20

25 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 96
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 96
 tagccaaacc atttacccaa

30

35 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 97
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 97
 caccttacta ccagacaacc

40

45 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 98
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 98
 ctaaacctag ccccaaacc

50

55 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 99
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 99
 ctagcatcac cagtattaga

60

5 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 100
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 100
 ttaccaaaaa catcacctct

10

15 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 101
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 101
 gaactcggca aatcttacct

20

25 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 102
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido codificante
 <400> SECUENCIA: 102
 gggttaagatt tgccgagttc

30

35 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 103
 <211> LONGITUD: 21
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 103
 ggtcataagg aaagggttaa a

40

45 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 104
 <211> LONGITUD: 17
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 104
 gtcaacccaa cacaggc

50

55 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 105
 <211> LONGITUD: 21
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 105
 accaacaagt cattattacc c

60

5 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 106
 <211> LONGITUD: 22
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido codificante
 <400> SECUENCIA: 106
 ggttgattgt agatattggg ct

10

15 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 107
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 107
 attaacagcc caatatctac

20

25 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 108
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 108
 tgcgtcagat taaaacactg

30

35 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 109
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 109
 aaaacattct cctccgata

40

45 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 110
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 110
 gttagtataa gtaacatg

50

55 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 111
 <211> LONGITUD: 19
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 111
 tggaccaatc tatcaccct

60

5 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 112
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 112
 10 acatataact gaactcctca

15 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 113
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 113
 20 caccactac ctaaaaaatc

25 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 114
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 114
 30 caccaattaa gaaagcgttg

35 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 115
 <211> LONGITUD: 22
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 115
 40 taggcctaaa agcagccacc aa

45 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 116
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido codificante
 <400> SECUENCIA: 116
 50 ttggtggctg cttttaggccta

55 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 117
 <211> LONGITUD: 19
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 117
 60 taacacccat agtaggcct

5 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 118
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 118
 aacctttag agagagtaaa

10

15 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 119
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 119
 aacagctctt tggacactag

20

25 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 120
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 120
 aactgttagt ccaaagag

30

35 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 121
 <211> LONGITUD: 19
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 121
 ctctaaatcc ccttgtaaa

40

45 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 122
 <211> LONGITUD: 19
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 122
 actttaatt tgccacag

50

55 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 123
 <211> LONGITUD: 19
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 123
 ggttgtccaa gatagaatc

60

5 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 124
 <211> LONGITUD: 190
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 124
 10 acaaacctac cgagcctcc

15 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 125
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 125
 20 atttataggt tagaggcg

25 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 126
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 126
 30 atgtagcaaa atagtgggaa

35 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 127
 <211> LONGITUD: 21
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 127
 40 taagaacagc taaaagagca c

45 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 128
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 50 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 128
 cgaaaccaga cgagctac

55 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 129
 <211> LONGITUD: 22
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 60 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido codificante
 <400> SECUENCIA: 129
 ggggtcttag ctttggtct cc

5 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 130
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 130
 taacttttgca aggagagcca

10

15 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 131
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 131
 accttctgca taatgaat

20

25 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 132
 <211> LONGITUD: 19
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 132
 atatagcaag gactaacc

30

35 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 133
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 133
 gatgaaaaat tataaccaag

40

45 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 134
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 134
 aatagatata gtaccgcaag

50

55 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 135
 <211> LONGITUD: 17
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 135
 cgatagaaat tgaaacc

60

5 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 136
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido codificante
 <400> SECUENCIA: 136
 tactttatattt gggtaaatgg

10

15 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 137
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 137
 ccatttacc c aaataaagta

20

25 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 138
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 138
 ttagccaaac catttacc ca

30

35 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 139
 <211> LONGITUD: 21
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 139
 aaggtggagt gggtttgggg c

40

45 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 140
 <211> LONGITUD: 17
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 140
 gctaaggttg tctggta

50

55 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 141
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 141
 atcgctata ctttatttgg

60

5 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 142
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 142
 atctattgcg ccaggtttca

10

15 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 143
 <211> LONGITUD: 19
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 143
 ttttcatctt tcccttgcg

20

25 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 144
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 144
 tccttgctat attatgcttg

30

35 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 145
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 145
 cattatgcag aaggtatagg

40

45 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 146
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 146
 tctccttgca aagttatt

50

55 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 147
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 147
 tttcgggggt cttagctttg

60

5 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 148
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 148
 ctgttcttag gtagctcg

10

15 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 149
 <211> LONGITUD: 19
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 149
 tgctacatag acgggtgtg

20

25 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 150
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 150
 cctctaccta taaatcttcc

30

35 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 151
 <211> LONGITUD: 17
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 151
 gctatcacca ggctcgg

40

45 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 152
 <211> LONGITUD: 17
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 152
 aagttgaact aagattc

50

55 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 153
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 153
 gagggttctg tgggcaaatt

60

5 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 154
 <211> LONGITUD: 19
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 154
 acagttaaatttacaaggg

10

15 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 155
 <211> LONGITUD: 19
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 155
 20 gtgtccaaag agctgttcc

25 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 156
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 156
 30 tactctctct acaaggtttt

35 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 157
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 40 <400> SECUENCIA: 157
 taggcctact atgggtgtta

45 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 158
 <211> LONGITUD: 21
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 50 <400> SECUENCIA: 158
 aacgctttct taattggtgg c

55 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 159
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 60 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 159
 ttttaggttag tgggtgttga

5 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 160
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 160
 ggagttcagt tatatgtttg

10

15 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 161
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 161
 tgatagattg gtccaattgg

20

25 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 162
 <211> LONGITUD: 21
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 162
 ctaacattag ttcttctata g

30

35 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 163
 <211> LONGITUD: 18
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 163
 atgcggagga gaatgttt

40

45 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 164
 <211> LONGITUD: 19
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 164
 tcagtgtttt aatctgacg

50

55 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:
 <210> SEQ ID NO 165
 <211> LONGITUD: 21
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION: Oligonucleótido antisentido
 <400> SECUENCIA: 165
 gtagatattg ggctgttaatt

60

5 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA
 <210> SEQ ID Nº 166
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION
 <400> SECUENCIA: 166
 10 gtgagggttaa taatgacttg

15 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA
 <210> SEQ ID Nº 167
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION
 <400> SECUENCIA: 167
 20 atgagcatgc ctgtgttggt

25 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA
 <210> SEQ ID Nº 168
 <211> LONGITUD: 19
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION
 30 <400> SECUENCIA: 168
 ggtaagattt gccgagttc

35 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA
 <210> SEQ ID Nº 169
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 40 <223> OTRA INFORMACION
 <400> SECUENCIA: 169
 tggatgatgct agaggtgatg

45 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA
 <210> SEQ ID Nº 170
 <211> LONGITUD: 15
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 50 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION
 <400> SECUENCIA: 170
 gcggtgcctc taata

55 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA
 <210> SEQ ID Nº 171
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 60 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION
 <400> SECUENCIA: 171
 ggccgttaaa catgtgtcac

5 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA
 <210> SEQ ID Nº 172
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION
 <400> SECUENCIA: 172
 10 tgattatgct acctttgcac

15 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA
 <210> SEQ ID Nº 173
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION
 <400> SECUENCIA: 173
 20 ttaaggaaca agtgattatg

25 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA
 <210> SEQ ID Nº 174
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION
 30 <400> SECUENCIA: 174
 tggagccatt catacaggtc

35 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA
 <210> SEQ ID Nº 175
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 40 <223> OTRA INFORMACION
 <400> SECUENCIA: 175
 aaaagtaaga gacagctgaa

45 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA
 <210> SEQ ID Nº 176
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 50 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION
 <400> SECUENCIA: 176
 cacgggcagg tcaatttcac

55 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA
 <210> SEQ ID Nº 177
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 60 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION
 <400> SECUENCIA: 177
 gtcttgctgt gttatgcccg

5 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA
 <210> SEQ ID Nº 178
 <211> LONGITUD: 19
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION
 <400> SECUENCIA: 178
 aattaaagct ccatagggt

10 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA
 <210> SEQ ID Nº 179
 <211> LONGITUD: 21
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION
 <400> SECUENCIA: 179
 gtttgtagg tactgtttgc a

15 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA
 <210> SEQ ID Nº 180
 <211> LONGITUD: 19
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION
 <400> SECUENCIA: 180
 aggtttggta gtttaggac

20 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA
 <210> SEQ ID Nº 181
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION
 <400> SECUENCIA: 181
 gcccacaccg aaatttttaa

25 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA
 <210> SEQ ID Nº 182
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION
 <400> SECUENCIA: 182
 ctcggagggtt gggttctgct

30 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA
 <210> SEQ ID Nº 183
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION
 <400> SECUENCIA: 183
 ctggtgaagt ctagcatgt

5 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA
 <210> SEQ ID Nº 184
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION
 <400> SECUENCIA: 184
 caattgagta tagtagttcg

10

15 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA
 <210> SEQ ID Nº 185
 <211> LONGITUD: 19
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION
 <400> SECUENCIA: 185
 tggtccggtg gtcaagtta

20

25 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA
 <210> SEQ ID Nº 186
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION
 <400> SECUENCIA: 186
 aataggattg cgctgttadc

30

35 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA
 <210> SEQ ID Nº 187
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION
 <400> SECUENCIA: 187
 attgttgata tggactctag

40

45 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA
 <210> SEQ ID Nº 188
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION
 <400> SECUENCIA: 188
 atccaacatc gaggtcgtaa

50

55 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA
 <210> SEQ ID Nº 189
 <211> LONGITUD: 19
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION
 <400> SECUENCIA: 189
 gcggctgcac catcgggat

60

5 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA
 <210> SEQ ID Nº 190
 <211> LONGITUD: 19
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION
 <400> SECUENCIA: 190
 10 ttgaacaaac gaaccttta

15 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA
 <210> SEQ ID Nº 191
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION
 <400> SECUENCIA: 191
 20 aactcagatc acgtaggact

25 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA
 <210> SEQ ID Nº 192
 <211> LONGITUD: 19
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION
 30 <400> SECUENCIA: 192
 aaaccgacct ggattactc

35 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA
 <210> SEQ ID Nº 193
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 40 <223> OTRA INFORMACION
 <400> SECUENCIA: 193
 agggaggaat ttgaaggtag

45 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA
 <210> SEQ ID Nº 194
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 50 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION
 <400> SECUENCIA: 194
 ggccttatatt ctcttgcct

55 <200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA
 <210> SEQ ID Nº 195
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 60 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION
 <400> SECUENCIA: 195
 ggaaggcgct ttgtgaagta

<200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA
 <210> SEQ ID Nº 196
 <211> LONGITUD: 20
 <212> TIPO: DNA
 5 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION
 <400> SECUENCIA: 196
 10 aagttgagat gatatacattt

<200> CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA
 <210> SEQ ID Nº 197
 <211> LONGITUD: 17
 15 <212> TIPO: DNA
 <213> ORGANISMO: Secuencia artificial
 <220> CARACTERISTICAS:
 <223> OTRA INFORMACION
 <400> SECUENCIA: 197
 20 cctgttccttg ggtgggt

REIVINDICACIONES

1. Moléculas de ARN quimérico mitocondrial humano aislado que comprenden el ARN ribosómico mitocondrial 16S antisentido unido covalentemente en su extremo 5' al extremo 3' de un polinucleótido con una secuencia repetida invertida.
- 5 2. Moléculas de ARN quimérico mitocondrial antisentido según la reivindicación 1, en las que dichos ARNs comprenden la secuencia de nucleótidos seleccionada de SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, y SEQ ID NO 6.
3. Moléculas de ARN quimérico mitocondrial antisentido según la reivindicación 1, en las que dichos ARNs comprenden la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO 4.
- 10 4. Moléculas de ARN quimérico mitocondrial antisentido según la reivindicación 1, en las que dichos ARNs comprenden la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO 5.
5. Moléculas de ARN quimérico mitocondrial antisentido según la reivindicación 1, en las que dichos ARNs comprenden la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO 6.
- 15 6. Uso de uno o más compuestos u oligonucleótidos de 10 a 50 bases de longitud que son suficientemente complementarios a dicha molécula de ARN quimérico mitocondrial humano según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para poder hibridar con esa molécula de ARN quimérico mitocondrial humano para formar una pareja estable, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer o precáncer.
7. Uso según la reivindicación 6, en el que los compuestos u oligonucleótidos se seleccionan de las SEQ ID NOS. 9-97.
- 20 8. Uso según la reivindicación 6, en el que los compuestos u oligonucleótidos son oligonucleótidos de 15 a 50 bases de longitud en los que al menos 15 bases son complementarias a SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5 y/o SEQ ID No. 6.
9. Uso según la reivindicación 8, en el que en los oligonucleótidos tienen 18-50 bases de longitud.
- 25 10. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 6-9, en el que dicho medicamento puede inducir al menos una de muerte de células precancerosas y muerte de células cancerosas en células o tejidos.
11. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 6-10, en el que dicho medicamento está adaptado para la administración conjuntamente con una droga quimioterapéutica para el tratamiento del cáncer.
12. Método de detección seleccionado de
 - 30 (A) un método para distinguir entre células normales y células pre-cancerosas o cancerosas que comprende las etapas de:

determinar un nivel de al menos uno de los ARNs quiméricos mitocondriales antisentido humanos de SEQ ID Nos. 4-6, y

determinar un nivel del ARN quimérico mitocondrial sentido humano de SEQ ID No. 1;
 - 35 (B) un método para distinguir entre células normales en reposo proliferativo, células normales en proliferación, células pre-cancerosas y células cancerosas, que comprende las etapas de:

determinar un nivel de al menos uno de los ARNs quiméricos mitocondriales antisentido humanos de SEQ ID Nos. 4-6, y

determinar un nivel del ARN quimérico mitocondrial sentido humano de SEQ ID No. 2; y
 - 40 (C) un método en el que células transformadas con virus ARN se distinguen de células cancerosas o células normales, que comprende la etapa de determinar el nivel del ARN quimérico mitocondrial sentido humano de SEQ ID No. 3, y

en el que dichas etapas de determinación no se llevan a cabo *in vivo*.

13. Método de detección para distinguir entre células normales y células precancerosas o cancerosas según la reivindicación 12, que comprende las etapas de:

determinar un nivel de al menos uno de los ARNs quiméricos mitocondriales antisentido humanos de SEQ ID Nos. 4-6, y

5 determinar un nivel del ARN quimérico mitocondrial sentido humano de SEQ ID No. 1.
14. Método de detección para distinguir entre células normales en reposo proliferativo, células normales en proliferación, células precancerosas y células cancerosas según la reivindicación 12, que comprende las etapas de:

10 determinar un nivel de al menos uno de los ARNs quiméricos mitocondriales antisentido humanos de SEQ ID Nos. 4-6, y

determinar un nivel del ARN quimérico mitocondrial sentido humano de SEQ ID No 2.
15. Método de detección según la reivindicación 12, en el que células transformadas con virus ARN se distinguen de células cancerosas o células normales mediante la determinación del nivel del ARN quimérico mitocondrial sentido humano de SEQ ID No 3.
- 15 16. Método de detección según una cualquiera de las reivindicaciones 12-15, en el que cada una de dichas etapas de determinación comprende la identificación y cuantificación de al menos uno de los ARNs quiméricos mitocondriales sentido y antisentido mediante al menos uno de los procedimientos siguientes: hibridación *in situ*, hibridación fluorescente *in situ*, Northern blot, hibridación en gota, amplificación de ADNc mediante PCR, TMA o ensayo de protección de ribonucleasa.
- 20 17. Método de detección según una cualquiera de las reivindicaciones 12-16, en el que dichas etapas de determinación se llevan a cabo en muestras humanas.
18. Método de detección según la reivindicación 17, en el que dichas muestras humanas comprenden una muestra seleccionada de cortes de tejido congelados o fijados de biopsias humanas, frotis citológicos o suspensiones de células en saliva, orina, sangre, médula ósea, colonocitos, lavado pulmonar, células metastásicas de sangre y linfa.

25
19. Compuestos u oligonucleótidos de 10 a 50 bases de longitud que son suficientemente complementarios a una molécula de ARN quimérico mitocondrial humano según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para poder hibridar con esa molécula de ARN quimérico mitocondrial humano para formar una pareja estable, para su uso como medicamento para el tratamiento del cáncer o precáncer.
- 30 20. Compuestos u oligonucleótidos según la reivindicación 19, en los que los compuestos u oligonucleótidos se seleccionan de SEQ ID NOS. 9-97.
21. Compuestos u oligonucleótidos según la reivindicación 19, en los que los compuestos u oligonucleótidos son oligonucleótidos de 15 a 50 bases de longitud en los que al menos 15 bases son complementarias a SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5 y/o SEQ ID No. 6.
- 35 22. Compuestos u oligonucleótidos según la reivindicación 21, en los que los oligonucleótidos tienen 18-50 bases de longitud.
23. Compuestos u oligonucleótidos según una cualquiera de las reivindicaciones 19-22, en los que dicho medicamento puede inducir al menos una de muerte de células precancerosas y muerte de células cancerosas en células o tejidos.
- 40 24. Compuestos u oligonucleótidos según una cualquiera de las reivindicaciones 19-23, en los que dicho medicamento está adaptado para la administración conjuntamente con una droga quimioterapéutica para el tratamiento del cáncer.
25. Kit para hibridación *in situ* útil para distinguir entre células en proliferación humanas normales y células humanas transformadas o malignas mediante el método de detección según la reivindicación 12, incluyendo el kit:

45

- (a) uno o más oligonucleótidos según una cualquiera de las reivindicaciones 19-24, en el que dichos oligonucleótidos se marcan para poder detectarse,
- (b) reactivo de anticuerpo conjugado para la detección del marcador,
- (e) tampón de hibridación y lavado, y
- 5 (d) uno o más portaobjetos de células en proliferación humanas normales transformadas o fijadas y uno o más portaobjetos de células malignas o transformadas fijadas, como controles.
26. Uso de las moléculas de ARN quimérico mitocondrial según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 como blancos que tras interferencia inducen muerte de células cancerosas y precancerosas.
- 10 27. Uso de las moléculas de ARN quimérico mitocondrial según la reivindicación 26, en el que dicha interferencia se lleva a cabo mediante un material seleccionado de oligonucleótidos complementarios y ARN de interferencia pequeño.
28. Uso de las moléculas de ARN quimérico mitocondrial humano según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 como blancos para el diagnóstico de cáncer y precáncer mediante la distinción entre células normales y células cancerosas y precancerosas mediante:
- 15 la determinación de un nivel de al menos uno de los ARNs mitocondriales antisentido humanos según las reivindicaciones 1-5, y
- la determinación de un nivel de un ARN mitocondrial sentido humano de SEQ ID No. 1.
29. Uso de las moléculas de ARN quimérico mitocondrial humano según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 como blancos para el diagnóstico de cáncer y precáncer mediante la distinción entre células normales en reposo proliferativo, células normales en proliferación, células precancerosas y cancerosas mediante:
- 20 la determinación de un nivel de al menos uno de los ARNs mitocondriales antisentido humanos según las reivindicaciones 1-5, y
- la determinación de un nivel de un ARN mitocondrial sentido humano de SEQ ID No. 2.
30. Uso de la molécula de ARN quimérico mitocondrial de SEQ ID No. 3 como blanco para distinguir células transformadas con virus ARN de células cancerosas o células normales mediante la determinación del nivel de ARN quimérico mitocondrial sentido humano de SEQ ID No. 3.
- 25

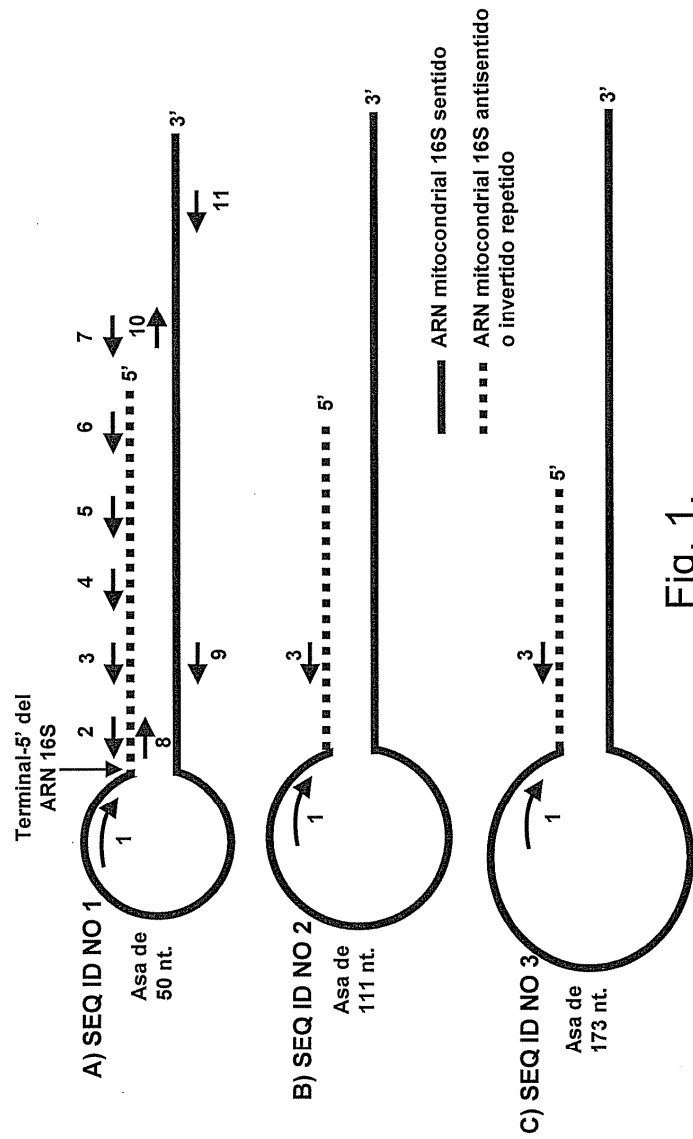


Fig. 1.



FIG. 2.

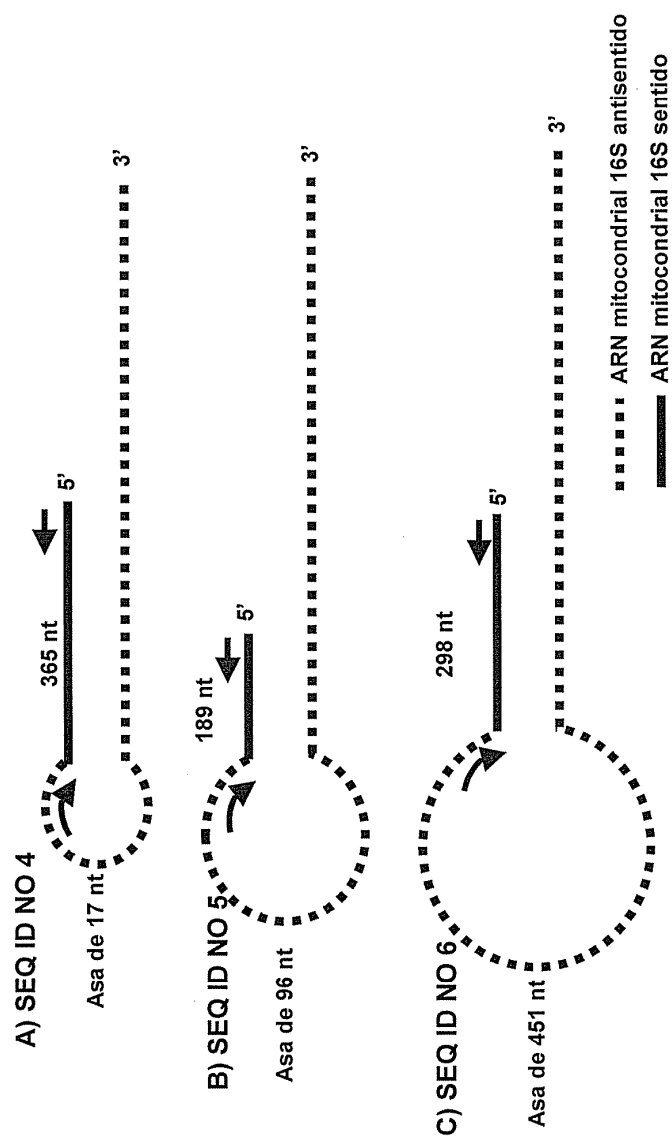


Fig. 3

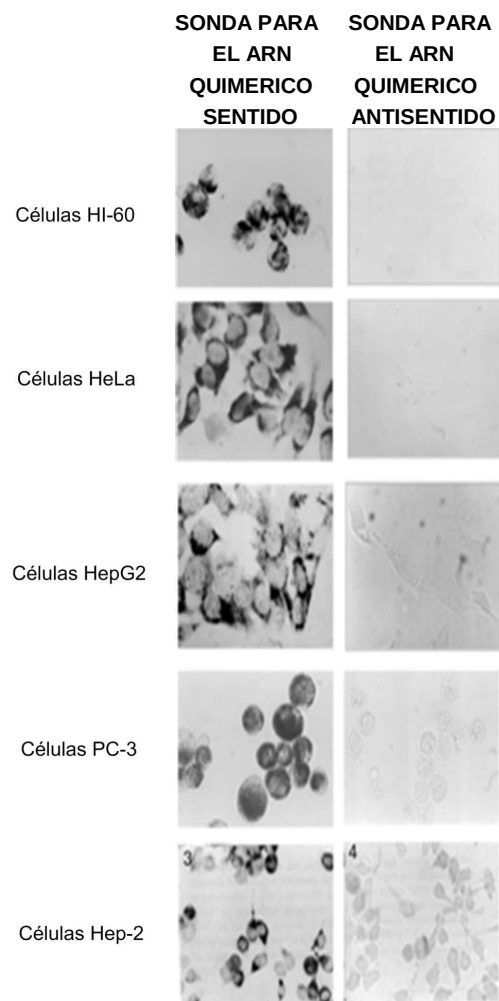


Fig. 4A

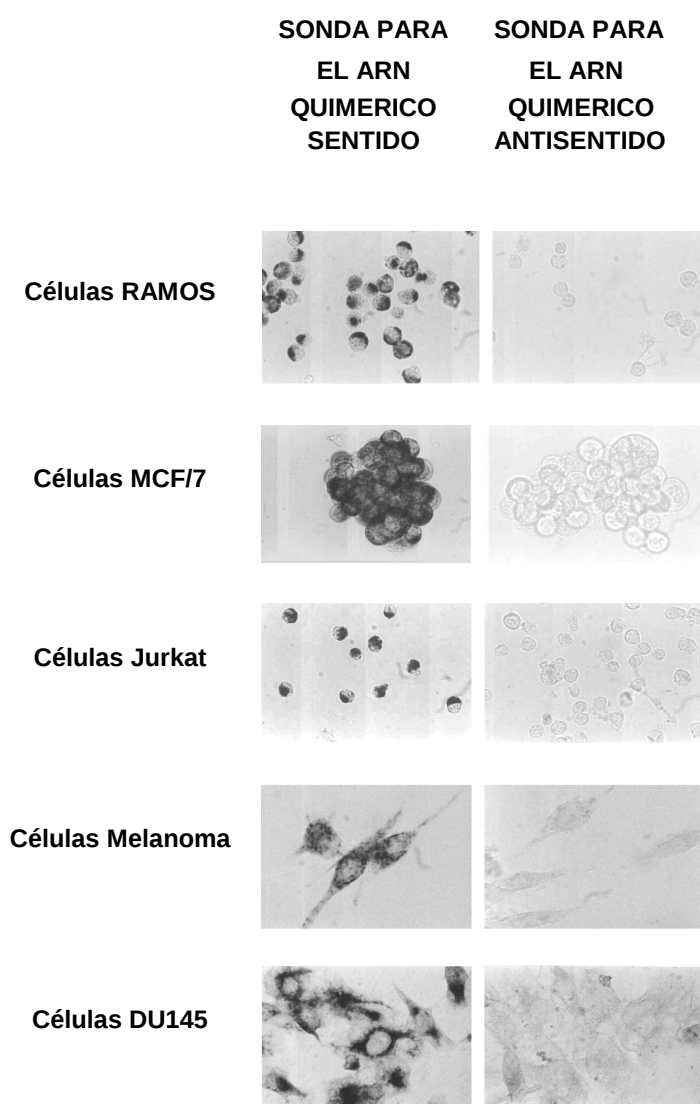


Fig. 4B.

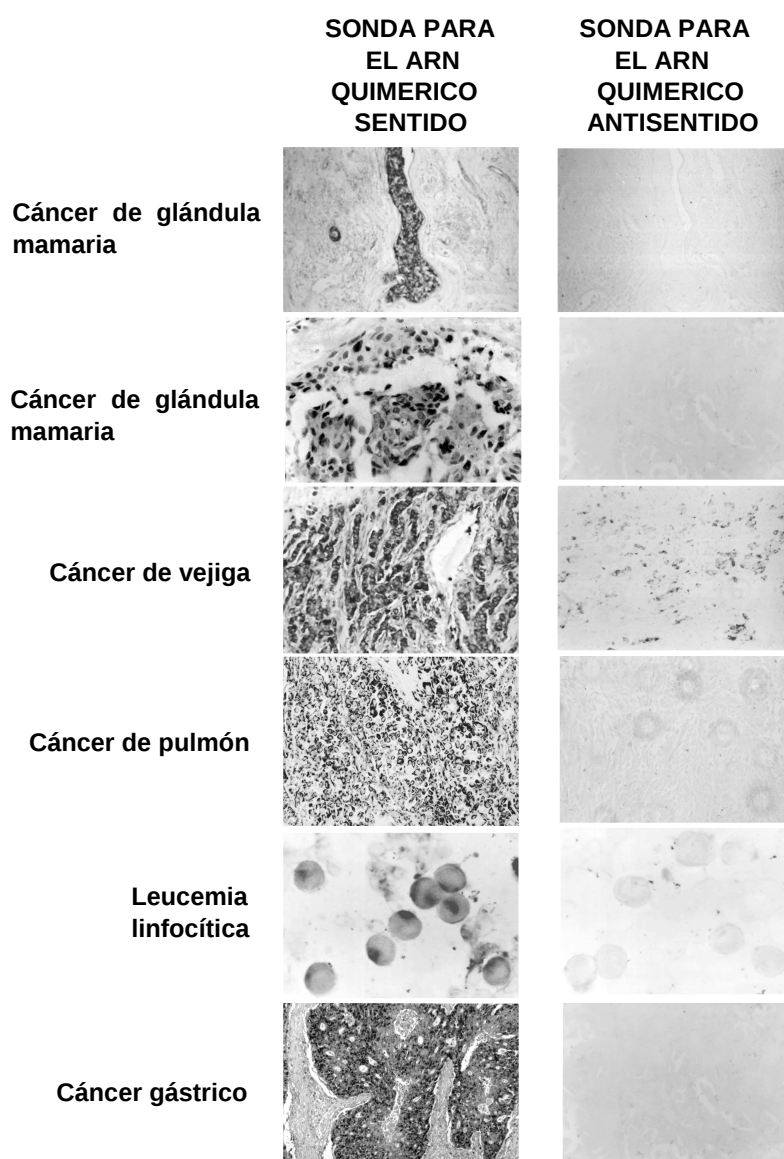


Fig. 5A.

**SONDA PARA EL ARN
QUIMERICO MITOCONDRIAL**

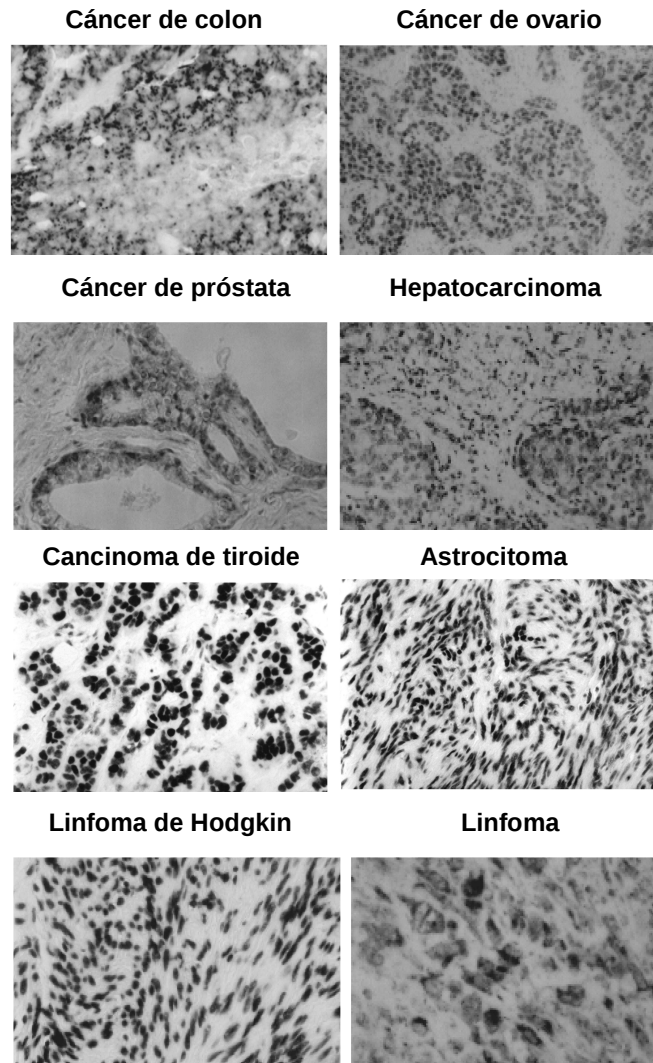


Fig. 5B.

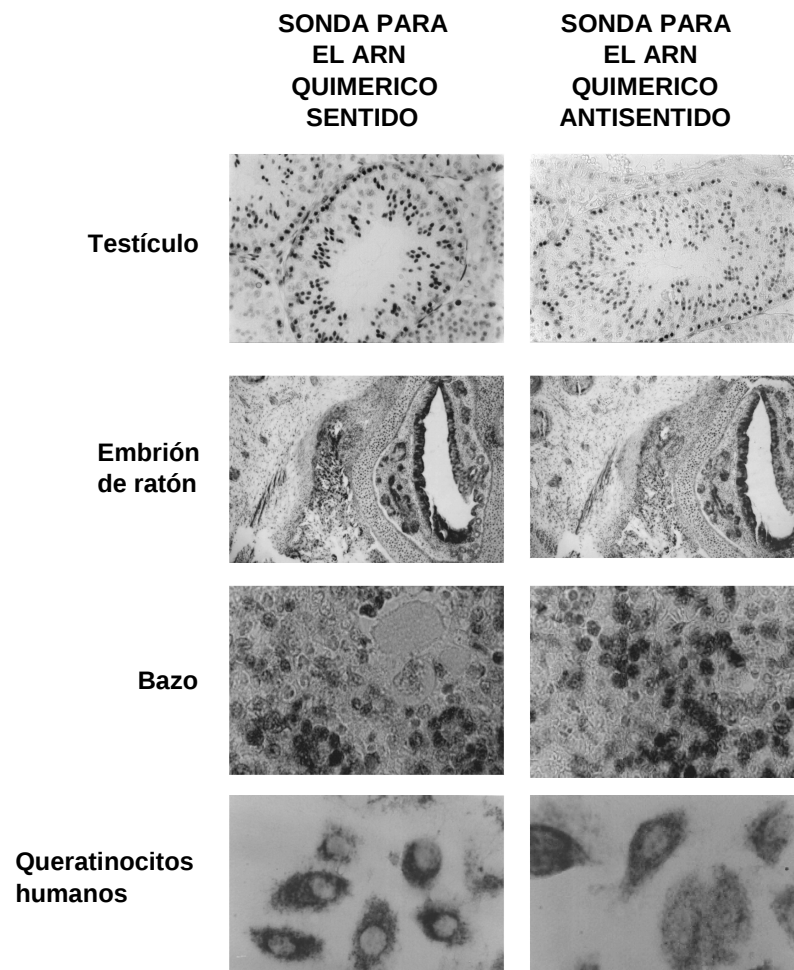


Fig. 6.

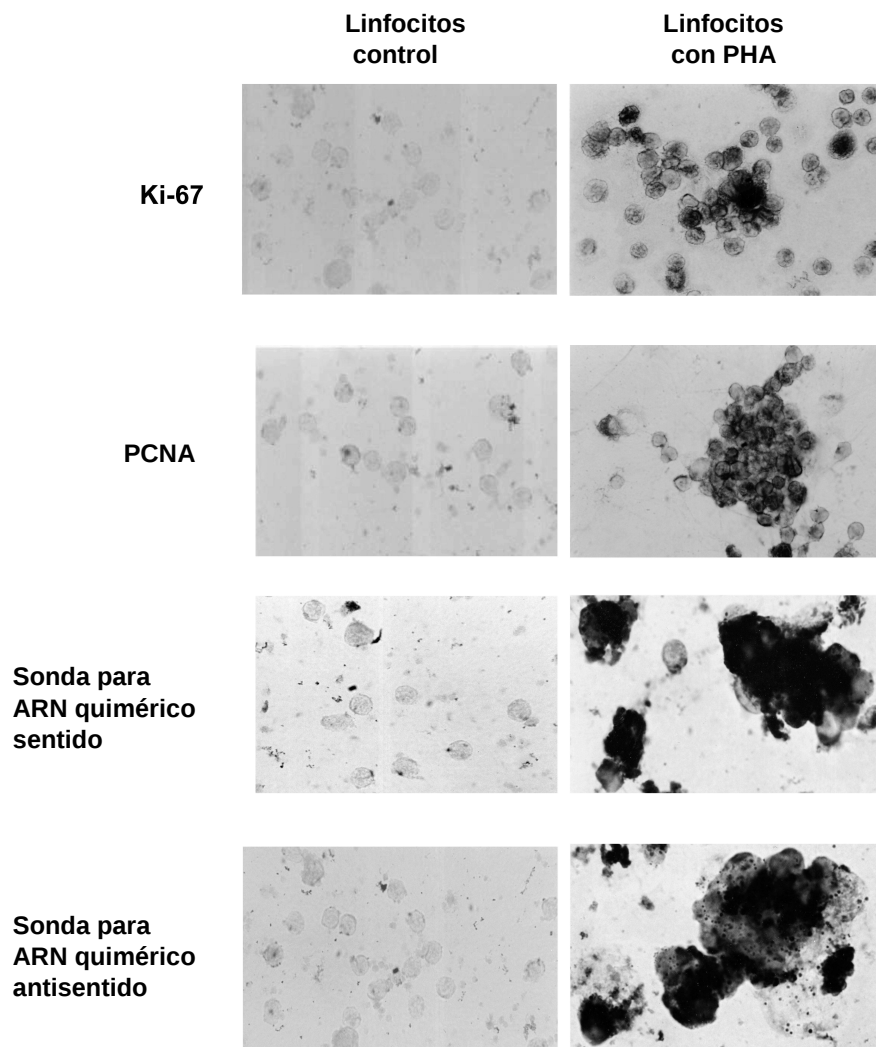


Fig. 7.

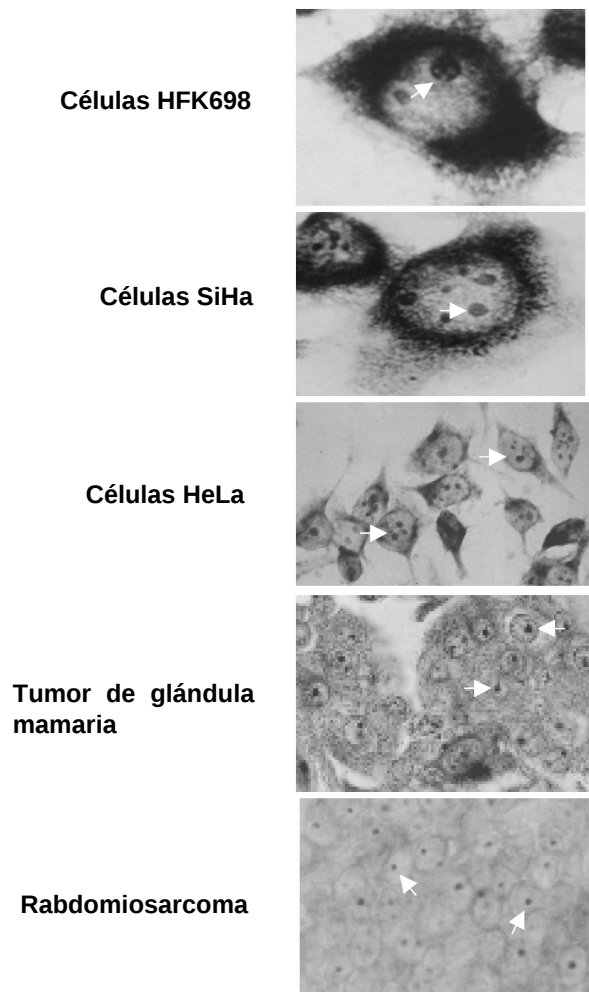


Fig. 8

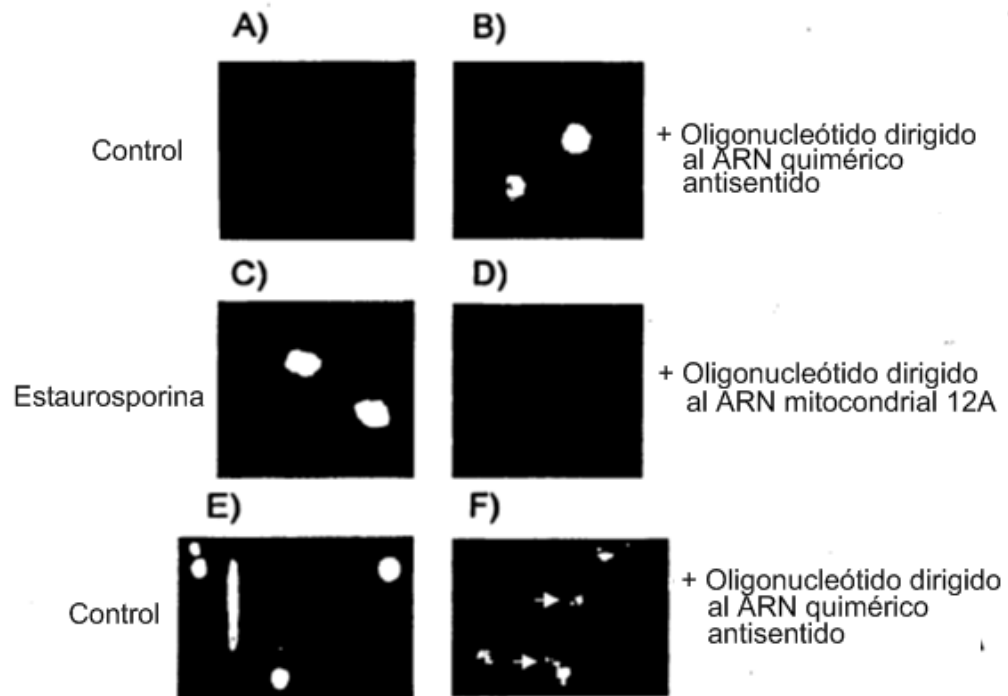


Fig. 9

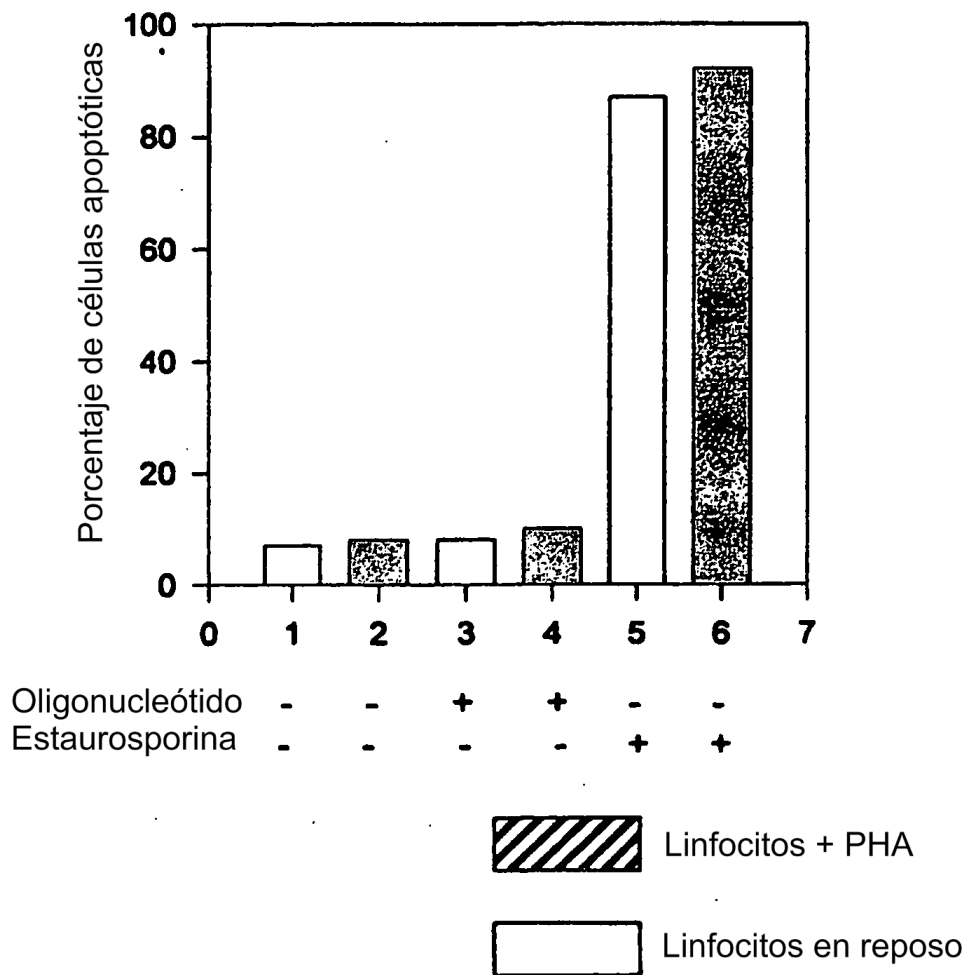


Fig. 10.