

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 742**

51 Int. Cl.:
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07862809 .6**
- 96 Fecha de presentación: **11.12.2007**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2101784**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.09.2009**

54 Título: **Procedimientos para determinar los pronósticos y las intervenciones terapéuticas para los carcinomas de ovario**

30 Prioridad:
11.12.2006 US 869391 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
31.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
31.10.2012

73 Titular/es:
**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
COLORADO (100.0%)
1800 Grant Street, 8th Floor
Denver, CO 80203, US**

72 Inventor/es:
**THORBURN, ANDREW;
FORD, HELDE L. y
BEHBAKHT, KIAN**

74 Agente/Representante:
CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 389 742 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimientos para determinar los pronósticos y las intervenciones terapéuticas para los carcinomas de ovario.

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere de forma general a la determinación del pronóstico y las intervenciones terapéuticas en los carcinomas de ovario y, más específicamente, a la utilización de la expresión de la homeoproteína Six1 para determinar el pronóstico y las intervenciones terapéuticas en los carcinomas de ovario.

10

Derechos gubernamentales

La presente invención se llevó a cabo con el apoyo del Gobierno de los EE.UU con los números de concesión R01 CA095277 y K12 CA086913 concedidos por los US National Institutes of Health. El Gobierno de los EE.UU. posee algunos derechos sobre esta invención.

15

Antecedentes de la invención

El carcinoma de ovario es el cáncer maligno ginecológico más mortal y una de las principales causas de muertes por cáncer entre las mujeres. Debido a que el cáncer de ovario se diagnostica frecuentemente cuando la enfermedad ha alcanzado un estadio avanzado, la mayoría de pacientes requieren un tratamiento adicional después de la extracción quirúrgica del tumor y muchas de estas pacientes incluso mueren después debido a la enfermedad. Aunque un porcentaje superior al 70% de las pacientes con cáncer de ovario avanzado responden a la quimioterapia primaria, a la larga desarrollan resistencia, lo que conduce a un total de supervivencia a 5 años inferior al 20%. Por este motivo se están buscando nuevos enfoques para solventar la quimiorresistencia y desarrollar terapias más eficaces.

20

25

Actualmente, se están considerando las terapias biológicas como un nuevo enfoque en la lucha contra el cáncer de ovario. Estas terapias presentan el potencial de dirigirse selectivamente a los tumores, minimizar la toxicidad, y superar la resistencia que se observa frecuentemente con las terapias convencionales. Esta terapia implica la activación de la vía del ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TRAIL, Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand), que induce selectivamente la apoptosis en las células tumorales mientras que conserva las células normales. Específicamente, el TRAIL desencadena la apoptosis rápidamente a través de la vía apoptótica extrínseca mediada por los receptores de muerte, DR4 y DR5, en la membrana celular. Durante la activación del receptor de muerte por parte del TRAIL mediado por el ligando, su dominio intracelular de muerte atrae a la molécula adaptadora del dominio de muerte asociado a Fas (FADD), que además capta las caspasas iniciadoras 8 y 10 al receptor de muerte para formar el complejo de señalización inductor de muerte (DISC). Este proceso resulta finalmente en la activación de las caspasas efectoras terminales 3, 6 y 7, lo que conduce, por consiguiente a la muerte celular. Es de gran importancia destacar que los experimentos con cultivos celulares y en ratones xenoinjertados han demostrado que el TRAIL puede ejercer una actividad citotóxica selectiva frente a las células del carcinoma de ovario con efectos limitados en las células normales.

30

35

40

El TRAIL ha estado implicado en varios aspectos de la tumorigénesis que incluye la vigilancia inmunológica innata frente a los tumores, la inhibición del inicio del tumor y la metástasis, y en la respuesta a la quimioterapia convencional. Por ejemplo, los ratones deficientes en TRAIL muestran una susceptibilidad superior a tumores en respuesta al carcinógeno químico metilcolantreno, y un aumento de la metástasis experimental y espontánea. Además, las mutaciones en los receptores del TRAIL se han asociado al cáncer de mama metastásico. Por consiguiente, la activación de la vía TRAIL clínicamente podría inducir una muerte celular y evitar la enfermedad metastásica, y estos tumores que crean mecanismos para escapar la apoptosis mediada por TRAIL podrían ser más metastásicos.

45

50

Estas observaciones proporcionan las bases para el desarrollo de agonistas de la vía TRAIL (TRAIL y anticuerpos agonistas de receptores de TRAIL) para los ensayos clínicos que se realizan en la actualidad. Sin embargo, estos ensayos son obstaculizados por el escaso conocimiento sobre las bases subyacentes de la susceptibilidad del tumor a una muerte inducida por la vía TRAIL. Por consiguiente, sigue existiendo la necesidad de identificar los determinantes de la sensibilidad a la vía TRAIL en los tumores de ovario, y en otros cánceres, para mejorar nuestra capacidad para utilizar agonistas de la vía TRAIL que están en desarrollo clínico por separado o en combinación con quimioterapia.

55

60 **Sumario de la invención**

La presente invención se dirige a la utilización de la expresión de la homeoproteína Six1 para determinar las intervenciones terapéuticas en cánceres. La presente invención se dirige también especialmente a los procedimientos para la determinación del pronóstico y las intervenciones terapéuticas para los carcinomas de ovario y para la utilización de la expresión de la homeoproteína Six1 para determinar el pronóstico y las intervenciones terapéuticas para los carcinomas de ovario.

65

La presente invención se basa, por lo menos en parte, en la demostración de que la expresión de la homeoproteína Six1 está relacionada con la tumorigenicidad del carcinoma de ovario y que no sólo provoca un aumento de la proliferación celular del carcinoma de ovario, sino que también protege a las células del carcinoma de ovario de la apoptosis mediada por TRAIL. Además, ya que se ha observado una sobreexpresión de Six1 en muchos cánceres que incluyen, pero no se limita a estos, cáncer de mama, rhabdomyosarcoma, carcinoma hepatocelular, y tumores de Wilms, la utilización de reactivos de TRAIL en terapias para estos y otros cánceres puede resultar ineficaz si no tiene como diana la expresión de Six1.

Una forma de realización ejemplificativa de la presente invención incluye un procedimiento para determinar la intervención terapéutica para el cáncer de ovario que incluye las etapas de obtención de una muestra biológica del sujeto que presenta cáncer el cáncer de ovario, de determinación de si la muestra biológica presenta una sobreexpresión de Six1, y la selección de un agente TRAIL para terapia cuando Six1 no está sobreexpresada. La muestra biológica puede ser una muestra de tumor, que incluye una muestra de tumor de ovario.

Otra forma de realización ejemplificativa de la presente invención incluye un procedimiento para determinar la intervención terapéutica para el carcinoma de ovario que incluye las etapas de obtención de una muestra de tumor de ovario de un sujeto, de determinación la cantidad o por lo menos una de las proteínas Six1 y ARNm de Six1 en la muestra del tumor de ovario, la determinación si la cantidad de proteína Six1 o ARNm de Six1 está sobreexpresada en la muestra del tumor de ovario en comparación con el control, y la selección de un agente TRAIL para terapia si Six1 no está sobreexpresada. Alternativamente, en lugar de seleccionar un agente TRAIL para la terapia, el procedimiento para la determinación de la intervención terapéutica para el carcinoma de ovario puede incluir la etapa de selección una terapia que no incluye TRAIL si Six1 está sobreexpresada.

La presente invención incluye también un procedimiento para la determinación del pronóstico de un sujeto que padece carcinoma de ovario que incluye las etapas de obtención de una muestra de un tumor de ovario de un sujeto, la determinación de la cantidad de proteína Six1 o ARN Six1 expresada en la muestra del tumor de ovario, y la elaboración de un pronóstico en base a la cantidad de proteína Six1 o Six1 ARN. El pronóstico se puede realizar comparando la cantidad de proteína Six1 o del ARN Six1 expresado en la muestra del tumor de ovario con la de un control y realizando un pronóstico de aumento de la mortalidad si los niveles de expresión de Six1 en el tumor de ovario son superiores a 300 fg/ng rARN.

Breve descripción de la figuras

La Fig. 1 muestra la secuencia completa de cADN y la secuencia de aminoácidos deducida de Six1 humano.

Las Figuras 2-7 muestran que Six1 está sobreexpresada en las líneas celulares de carcinoma de ovario en comparación con las células epiteliales normales de la superficie del ovario. La Figura 2 muestra el qRT-PCR para Six1 en tres líneas celulares de carcinoma de ovario (OCC) en comparación con cinco líneas celulares normales de la superficie epitelial del ovario (OSE). La Figura 3 muestra los análisis con Transferencia Western de los extractos nucleares de las mismas células que se muestran en la Figura 2. Las Figuras 4 y 7 muestran la sobreexpresión de ARNm de Six1 en células CaOV3 transfectadas con Six1. La qTR-PCR demuestra una sobreexpresión de 2-5 veces del ARNm de Six1 en clones transfectados de CaOV3-Six1 en comparación con las células CaOV3-CA T controles. La Figura 5 muestra el análisis con Transferencia Western de lisados de células totales para la proteína Six1 en los clones de CaOV3-Six1. (Destacar que no se observan proteínas Six1 endógenas en los lisados de las células completas de células CaOV3 aunque sí se pueden observar en los extractos nucleares de los mismos tipos celulares- Figura 3). La Figura 6 muestra un análisis Transferencia Northern de extractos nucleares de las mismas células que se muestran en la Figura 2.

Las Figuras 8-11 muestran que Six1 aumenta la proliferación concomitante OCC con la inducción de Ciclin A1. Las Figuras 8 y 11 muestran el número de células en células CaOV3-Six1 y en controles transfectados con CAT. En la Figura 8 se observa un número de células superior de células en los días 3 y 5 después de la incubación en las células CaOV3 ($p < 0,001$). Línea negra continua: Six1-A, línea discontinua: Six1-B, línea de puntos CAT-A, línea gris: CAT-B. La Figura 9 muestra las células positivas Ki-67 en clones de CaOV3-Six1 en comparación con los controles CAT. El porcentaje de células positivas en Six1-A y en Six1-B combinado es de $56\% \pm 16\%$ en comparación con CAT-A y CAT-B combinadas que es de $41\% \pm 8\%$; $P = 0,04$. La Figura 10 muestra el análisis Transferencia Western de la expresión de la proteína ciclina A1 (CycA1) en CaOV3-Six1 transfectadas y en los controles de CaOV3-CA T.

Las Figuras 12-13 muestran que la sobreexpresión de Six1 conduce a una disminución de la apoptosis basal y a una resistencia al TRAIL. La Figura 12 muestra el porcentaje de células con núcleos condensados en los clones de CaOV3-Six1 en comparación con las células CaOV3-CAT. La Figura 13 muestra el efecto a las 40 horas de TRAIL en CaOV3 en la sobreexpresión de Six1 y los controles CAT transfectados. Se midió la citotoxicidad utilizando el ensayo MTS.

Las Figuras 14-15 muestran que la inhibición de Six1 sintetiza OCC para la apoptosis mediada por TRAIL. Las células SKOV3 se transfectaron transitoriamente con plásmidos que expresan secuencias ARNsi frente a Six1 y

luciferasa (Luc) como se indica en los procedimientos. La Figura 14 muestra un análisis representativo de Transferencia Western en SIX1 que demuestra la eficacia de la inhibición con constructos de ARNs; sólo el constructo Six1 C inhibe eficazmente la expresión de Six1. Se realizaron análisis Transferencia Western de confirmación para cada experimento y mostraron resultados similares. La Figura 15 muestra el efecto de TRAIL en células transfectadas con un constructo control (Luc, línea discontinua), un constructo Six1 C eficiente que tiene como diana Sic1 (línea negra continua) y un constructo ineficaz (ver Transferencia Western) Six1 F que tiene como diana Six1 (línea discontinua).

Las Figuras 16-17 muestran que el ARNm de Six1 está sobreexpresado en carcinomas de ovario en comparación con los ovarios normales y está asociado con un malo pronóstico en cánceres en estadios avanzados. La Figura 16 muestra la qRT-PCR para Six1 en un ovario normal (n=5), cistadenoma (n=7), estadio temprano (estadio 1) carcinomas de ovario (n=5) y carcinomas de ovario (n=19) metastásicos en estadios avanzados (estadios II-IV). La línea de puntos discurre a través del gráfico a 100 fg Six1/ng ARNm. La Figura 17 muestra las curvas de supervivencia para pacientes con tumores con niveles de Six 1 > 300 fg/ng ARNr (la media alcanza los 17 meses, Log del Rango p=0,02).

La Figura 18 muestra el efecto en Fasl de la sobreexpresión de Six1 en CaOV3.

La Figura 19 es una tabla con el listado de secuencias de ARNm que son dianas de los vectores sRNA pSUPER.

La Figura 20 muestra el efecto sobre FASL de la inhibición de Six1 en SKOV3.

La Figura 21 muestra una lista de cebadores específicos de Six1 y sondas taqman utilizadas para el análisis.

La Figura 22 muestra unas células de tumor de ovario de un paciente con unos niveles diferentes de expresión de Six 1 y sus diferencias en la sensibilidad a TRAIL.

La Figura 23 muestra que el tratamiento con TRAIL no consigue la regresión en las células tumorales in vivo que presentan Six1.

Descripción detallada

La tumorigénesis puede presentarse debido a la activación inadecuada de genes del desarrollo en tejidos maduros. La presente invención se basa, por lo menos en parte, en el descubrimiento de que el regulador del desarrollo Six1 está sobreexpresado en la líneas celulares del carcinoma de ovario (OCC) en comparación con el epitelio normal de la superficie del ovario (OSE), y que su expresión se correlaciona con un fenotipo más maligno. Como se ha observado en otros cánceres, la sobreexpresión de Six1 en OCC conduce a un aumento de la expresión de la ciclina de tipo A y a un aumento de su proliferación. La invención se basa también, por lo menos en parte, en el descubrimiento de que la sobreexpresión de Six1 da como resultado unas OCC resistentes a la apoptosis medida por el ligando inductor de la apoptosis relacionado con TNF (TRAIL), pero no a la apoptosis mediada por Fasl, y la inhibición de Six1 en la línea del carcinoma de ovario agresivo SKOV3 resistente a TRAIL sensibiliza de forma destacada las células a TRAIL. Debido a que la inactivación de la respuesta a TRAIL se ha asociado a la metástasis, y puesto que la activación de la vía apoptótica de TRAIL se encuentra actualmente en fase de ensayos clínicos frente al carcinoma de ovario, se llevo a cabo el cribaje de muestras de ovarios normales y con carcinomas en busca de ARNm de Six1. Six1 estaba sobreexpresada en el 60% de los carcinomas en estadio temprano y en el 68% de los carcinomas en estadio avanzado examinados, en los carcinomas metastásicos que expresan niveles de ARNm de Six1 3 veces más elevados en comparación con los tumores en estadio temprano (no metastásico). Y más importante, en pacientes que presentaban metástasis, la expresión elevada de Six1 se asociaba con una reducción significativa de la supervivencia (p=0,02).

La presente invención se refiere al descubrimiento de que la homeoproteína reguladora del desarrollo Six1 es un modulador de la vía TRAIL. Six1 se expresa durante la embriogénesis pero se pierde en la mayoría de tejidos diferenciados y ha estado implicada en la etiología de muchos cánceres incluyendo el cáncer de mama, rabdomiosarcoma, carcinoma hepatocelular, y tumores de Wilms. Durante el desarrollo normal, Six1 estimula la proliferación y la supervivencia de las células progenitoras, y cuando se expresa fuera de contexto, Six1 puede promover de forma aberrante la proliferación, contribuyendo a la tumorigénesis. La presente invención se refiere al descubrimiento de que la expresión de Six1 está relacionada con la tumorigenicidad del carcinoma de ovario, y que no sólo aumenta la proliferación celular del carcinoma de ovario, sino que también protege las células del carcinoma de ovario contra la apoptosis mediada por TRAIL. Este descubrimiento presenta implicaciones importantes para el uso de reactivos de TRAIL en terapias de cáncer de ovario y otras terapias de cáncer.

Procedimientos

Líneas celulares y cultivos celulares. Las líneas de OCC CaOV3 y SKOV3 se obtuvieron de la ATCC (Rockville, MD). La línea celular SNU251 (44) la proporcionó el Dr. Jeff Holt. Las líneas celulares se mantuvieron en DMEM (CaOV3) o McCoy 5- α (SKOV3) o RPMI-1640 + 1% Insulina-Transferrina-Selenio A (SNU251), todas con un 10% de SBF a 3JDC y 5% de CO₂. Se extrajo el OSE de pacientes que se sometían a ooforectomía. Se comprobó el origen epitelial mediante tinción para pancitoqueratina.

Transfección para la sobreexpresión y inhibición de Six1. Se transfectaron ADNc de Six1 de longitud completa [SIXFL, (22)] o plásmidos control pcADN3,1 (CAT) en células a una concentración de 1×10^6 CaOV3 o SNU251 utilizando Superfect según las especificaciones del fabricante (Qiagen, Valencia, CA). Se seleccionaron los transfectantes con 400 μ g/ml G418. Aproximadamente 2 semanas después, se aislaron los clones individuales y se propagaron. La expresión de Six1 se comprobó mediante qRT-PCR, Transferencias Northern y Western.

Se realizaron transfecciones transitorias para los experimentos de ARN de interferencia corto (ARNsi) mediante la resuspensión de células SKOV3 a 3×10^6 células/ml de tampón de electroporación (Hepes 2 mM pH 7,2, K₂HPO₄/KH₂PO₄ 15 mM, pH 7,2, manitol 250 mM, MgCl₂ 1 mM). Se añadieron 800 μ l de solución de células a 16 μ g de ADN- pSUPER Six1C, o pSUPER Six1F, ó pSUPER luciferasa (ver Figura 19 para la descripción de los constructos). Después, las células se sometieron a electroporación en cubetas de electroporación con ranuras de 4 mm a 250V, con una duración de 2 ms, en intervalos de 1,5 s, 15 veces, y se transfirieron a placas con DMEM + 10% FBS caliente. Se confirmó la inhibición de Six1 mediante Transferencia Western de los extractos del núcleo en el momento de la colocación en las placas para el ensayo de TRAIL (ver a continuación) y en el momento de la finalización del ensayo de TRAIL. Se ensayó la funcionalidad del constructo de la pSUPER Luciferasa mediante la cotransfección con un constructo que expresaba para el promotor de luciferasa D1 (CD1-Luc, un obsequio amable de Justin Lamb y Mark Ewen), seguido de un análisis de la actividad de la luciferasa.

El análisis cuantitativo en tiempo real RT-PCR (qRT-PCR) y análisis Northern blot. Se extrajo el ARN total de las líneas celulares cultivadas o de muestras de pacientes guardados en ARN utilizando después la extracción estándar con TRIzol (Invitrogen Life Technologies). Se comprobaron la pureza, la concentración y la integridad del ARN total utilizando un espectrofotómetro y también en un ensayo con ARN 6000 Nano (Agilent technologies, Palo Alto, CA) y la visualización de las bandas de ARNr a los 18s y a los 28s. El análisis con Transferencia Northern se realizó como se ha descrito anteriormente utilizando 15 μ g de ARN de gran calidad por muestra y se estandarizó con 13-actina y tinción de Bromuro de Etidio (EtBr). Para la qRT-PCR, se analizó 1 μ g de ARN extraído mediante amplificación del ARNr para verificar la integridad del ARN. Después, se analizaron muestras de gran calidad para los niveles de Six1 ARNm utilizando el sistema de detección de secuencia ABI Prism[®] 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA) y los cebadores específicos de Six1 y sondas TaqMan (los cebadores y las sondas se detallan en la Figura 21). Se generaron curvas estándar de Six1 ADNc y ARNr de control en cada experimento. Los resultados se describen como fg Six1/ng 18S ARNr. Los experimentos se repitieron por triplicado y se muestran experimentos representativos.

Aislamiento de la proteína y transferencias Western. Para los lisados celulares totales, las muestras se lisaron con hielo en un tampón RIPA. Los extractos nucleares se realizaron mediante el procedimiento Digman. La concentración de proteínas se determinó mediante el procedimiento Lowry. Se cargaron 30 μ g de cada muestra de proteína en un gel de poliacrilamida al 12% SDS y se transfirieron a PVDF. Las membranas se marcaron con anticuerpos para Six1 y para Ciclina A 1 (BD Biosciences), y se normalizaron para la actina 13 (Sigma- Aldrich Corporation).

Ensayos de proliferación. Se sembraron 10.000 células/pocillos en placas de 6 pocillos. Las células se contaron con tinción por exclusión con azul tripán los días 1, 3 y 5. Los recuentos se describieron como medias de los 3-6 pocillos. Cada ensayo de crecimiento celular se repitió por lo menos una vez, por lo menos por triplicado. Para la evaluación del porcentaje de células en el ciclo celular que utiliza tinción Ki67 (Dako Corporation), se realizó inmunocitoquímica en las secciones 5-8 μ m de bloques celulares de cultivos celulares embebidos en parafina y fijados con formalina. Las secciones se desarrollaron utilizando el procedimiento ABC (Vector Laboratories) y la tinción se contrarrestó con hematoxilina. Se analizaron visualmente por un observador ciego tres campos/tiras de 160X seleccionados aleatoriamente, y se cuantificó y analizó el porcentaje de células teñidas.

Análisis de crecimiento de tumores en ratones SCID: todos los experimentos que implicaban animales fueron aprobados por el UCDHSC Animal Care Use Committee. Se inyectó subcutáneamente a ratones hembra de la cepa CB-17 SCID (Taconic) de 3-4 semanas de edad en ambos lados con 1×10^7 células SKOV3 ó CaOV3 /lado. Se observaron los ratones diariamente. Se registró el tiempo de desarrollo del tumor y los tumores se midieron diariamente después de que aparecieran. Los ratones se sacrificaron antes de que los tumores alcanzaran un diámetro de 2 cms.

Detección de muerte celular apoptótica. Se colocaron líneas celulares en portaobjetos con compartimentos por duplicado en por lo menos dos experimentos por separado. Cuando las células alcanzaron una confluencia de 70%, se fijaron con 40g/l de formaldehído tamponado en PBS al 4% durante 20 minutos y después se tiñeron con Hoechst

33258 (10mg/l). Después, se examinaron los portaobjetos utilizando un microscopio de fluorescencia. Se definieron la células apoptóticas en base a la morfología condensada del núcleo.

5 Se contaron seis campos aleatorios por portaobjeto a un aumento de 100x por un observador ciego, y se registraron las cantidades de células apoptóticas/núcleos totales.

10 Curvas dosis-respuesta para TRAIL e inhibición de crecimiento mediado por el ligando Fas. Para los transfectantes CaOV3 y SNU251, se sembraron 5.000 células en cada pocillo de una placa de 96 pocillos y se trataron con varias concentraciones de recombinante soluble TRAIL de longitud total (rhTrail de R&O Biosystems, Ligando fas (Alexis/Axxora), o Medio +OMSO durante 40 horas. Se evaluó la viabilidad celular utilizando un ensayo MTS (Promega). Para las células SKOV3 en las que Six1 se había inhibido, se colocaron 1000 células/pocillo como antes de las 48 después de la electroporación. El resto del ensayo se realizó como se ha indicado para las células CaOV3 y SNU251. Se describen medias de seis pocillos y los experimentos se repitieron por lo menos una vez por sextuplicado. Se muestran las curvas dosis-respuesta representativas.

15 Muestras de pacientes. Se obtuvieron muestras frescas de tejido bajo aprobación del protocolo IRB inmediatamente después de la evaluación por un patólogo y se guardaron en un tampón de estabilización de ARN (Qiagen, Valencia, CA). Se realizó una estadificación mediante uno o dos autores (KB o SD). Se montó una porción de cada muestra en un compuesto OCT, se congeló mediante inmersión en nitrógeno líquido y se guardó a una temperatura de -80°C y otra porción se fijó en formalina y se embebió en parafina. Se cortaron secciones de 5-8 µm y se verificaron utilizando tinción de hematoxilina y eosina.

20 Análisis estadístico. Los resultados se compararon utilizando la prueba t de Student y ANOVA de un factor para las variables distribuidas normalmente y X², prueba Exacta de Fisher y prueba de Mann-Whitney-U para las variables no paramétricas. Los datos de supervivencia se analizaron utilizando el procedimiento Kaplan-Meier con análisis de significancia a través de la prueba Long-rank. Se utilizó el software de análisis de datos SPSS (SPSS, Inc., Chicago, IL).

30 **Resultados y descubrimientos**

35 La Six1 se expresa en las líneas celulares epiteliales del carcinoma de ovario pero no en las células epiteliales de la superficie del ovario. El gen de homeosecuencia de Six1 está sobreexpresado en varios cánceres, que incluyen cáncer de mama, rhabdomiomas, carcinoma hepatocelular y tumor de Wilm. En relación a la presente invención, se ha encontrado que Six1 también está sobreexpresada en el carcinoma de ovario. Se examinó la expresión de Six1 en varias líneas celulares del carcinoma de ovario (OCC) y en células epiteliales normales de la superficie del ovario (OSE). El ARNm de Six1, medido mediante análisis por Northern blot (Figura 6) y RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR) (Figura 2), está aumentado en OCC (CaOV3, SKOV3 y SNU251) en comparación con OSE. La Figura 3 muestra que la expresión de la proteína Six1 sigue el mismo patrón con niveles elevados observados en la línea celular SKOV3.

40 Se ha descrito que las células SKOV3, que expresan niveles de Six1 más elevados que las células CaOV3, son casi 3,5 veces más resistentes a tratamiento con cisplatino que las células CaOV3, y también son más resistentes a una apoptosis mediada por TRAIL, lo que sugiere que son una línea de OCC más agresiva. Se realizaron ensayos con agar blando en tres líneas OCC (SKOV3, CaOV3, SNU251) para comparar su potencial tumorigénico. Tanto las células CaOV3 como las células SKOV3 crecieron en agar blando mientras que las células SNU251 no formaron colonias en agar blando (no se muestra). Por consiguiente, las células SNU251 son las menos tumorigénicas de las tres líneas OCC. Se inyectaron diez millones de células tanto de las líneas celulares CaOV3 como de las SKOV3 subcutáneamente en ratones SCID para evaluar su potencial tumorigénico *in vivo*. Los tumores crecieron en 4/6 (66%) y 24/24 (100%) de los animales inyectados con células CaOV3 y SKOV3 respectivamente, con una latencia media de 7 semanas para las células CaOV3 en comparación con las 4 semanas para las células SKOV3. Estos datos, conjuntamente con los informes que demuestran que las células SKOV3 muestran un aumento de la resistencia tanto a la apoptosis mediada por TRAIL como a los agentes quimioterapéuticos, demuestran que el aumento de la expresión de Six1 está relacionado con el aumento del potencial tumorigénico en las células del carcinoma de ovario.

55 La sobreexpresión de Six1 promueve un fenotipo proliferativo y antiapoptótico en las células del carcinoma de ovario. La Six1 estaba sobreexpresada tanto en las células CaOV3 como en las SNU251, ambas expresando Six1 endógenamente pero con unos niveles significativamente más bajos que en la línea celular SKOV3. Se generaron transfectantes estables para Six1 y control CAT (cloranfenicol acetil transferasa) y se examinaron para ARNm de Six1 y la proteína como se muestra en las Figuras 4, 5 y 7. Se escogieron dos clones que sobreexpresaban Six1 estable y dos clones de control CAT de cada línea para unos análisis adicionales. Los niveles de sobreexpresión de Six1 (fg/ng ARNr) alcanzados en los clones de CaOV3 y SNU 251 fueron inferiores o equivalentes al nivel de expresión de Six1 endógena en las células SKOV3 determinado mediante qRT-PCR (nivel de expresión medio en clones de SNU 251-Six1= 262 fg/ng ARNr, clones de CaOV3-Six1= 395 fg/ng ARNr, SKOV3= 437 fg/ng ARNr). Por consiguiente, el gen estaba sobreexpresado en los niveles fisiológicos expresados en OCC agresivas.

La Six1 promueve la proliferación de las células precursoras en el desarrollo normal y contribuye a la proliferación celular del cáncer de mama y rhabdomyosarcoma. Se comparó el crecimiento de las células CaOV3-Six1 y SNU251-Six1 con las células control CaOV3-CAT y SNU251-CAT. Las células que sobreexpresan Six1 aumentaron en número y a una velocidad superior a las células control CAT en ambos tipos de células (Figuras 8 y 11). Se midió el índice proliferativo de los transfectantes CaOV3 utilizando la tinción Ki-67 para determinar si la sobreexpresión de Six1 influye sobre la proliferación en las células OCC per se de modo opuesto a una apoptosis que sencillamente es decreciente. En los clones de CaOV3-Six1, el 56% \pm 16% de las células (media de dos clones) fueron positivas para la tinción Ki-67, en comparación con el 41% \pm 8% de las células CaOV3-CAT (media de dos clones); un aumento que es estadísticamente significativo ($p= 0,04$) (Figura 9). De modo coherente con los resultados previos en las células de cáncer de mama en las que los aumentos en la proliferación dependiente de Six1 están mediados por la ciclina A1, la sobreexpresión de Six1 en OCC condujo a una sobreexpresión de la ciclina A1 (Figura 10).

Los órganos en ratones con genes inactivados para Six1 han mostrado una disminución de la proliferación así como un aumento de la apoptosis, lo que sugiere que la proteína Six1 puede proporcionar ventajas tanto proliferativas como de supervivencia. Sin embargo, no se ha establecido el papel de Six1 en la supervivencia de las células cancerosas. La tinción de Hoechst para la condensación de la cromatina nuclear reveló por lo menos una disminución de 3 veces en la apoptosis basal en las células que sobreexpresaban Six1 en comparación con los controles CAT (Figura 12, $p= 0,02$), lo que sugiere que la sobreexpresión de Six1 en OCC hace aumentar la cantidad neta de células mediante la disminución de la apoptosis además de la estimulación de la proliferación.

La resistencia al TRAIL en líneas celulares que sobreexpresan Six1. Como muestra la Figura 13, la sobreexpresión de Six1 en las células CaOV3 hace disminuir la sensibilidad a TRAIL desde una $CI_{50} \sim 3$ ng/ml TRAIL en los clones de CaOV3-CAT a una $CI_{50} \sim 11$ ng/ml TRAIL en los clones de CaOV3-Six1. Se obtuvieron resultados similares en las células SNU251 en las que CI_{50} fue - 7 ng/ml TRAIL en los clones de SNU251-CAT y -15 ng/ml en SNU251-Six1. Por otra parte, la sobreexpresión de Six1 no confirió resistencia al ligando de Fas (FasL) (Figura 18).

La Six1 fue inhibida en las células SKOV3 utilizando ARNs que tiene como diana determinar si los niveles elevados de Six1 en las células SKOV3 son responsables de la resistencia a la apoptosis mediada por TRAIL. Dos constructos de ARNs en base a pSUPER que tienen como diana Six1 se transfectaron en las células SKOV3 (Six1 C y Six1 F). Además, se transfectó un constructo pSUPER que tiene como diana la luciferasa (Luc), que está implicado en la maquinaria del ARNs pero que no afecta a los niveles de Six1, en células SKOV3 como control. Ver la Figura 19 para las secuencias diana de ARNm por los vectores pSUPER ARNs. Cuando se examinó después de finalizar el ensayo TRAIL (5 días después de la transfección), la proteína Six1 estaba ausente casi por completo en las células SKOV3 transfectadas con el constructo pSUPER Six1 C; sin embargo, el constructo pSUPER Six1 F, cuando tenía como diana Six1, fue ineficaz, lo que proporciona un segundo control para los efectos de expresión de Six1 (Figura 14). La pSUPER Luc ARNs no tuvo ningún efecto sobre los niveles de Six1 (Figura 14). Las células SKOV3 transfectadas con pSUPER Six1 C, en el que Six1 se había inhibido eficazmente, fueron casi 100 veces más sensibles al TRAIL ($CI_{50} \sim 9$ ng/ml TRAIL) en comparación con las células SKOV3 transfectadas con pSUPER Six1 F, que no inhibían Six1, o con el control pSUPER luc (CI_{50} tanto para Six1 F como para luc ~ 900 ng/ml TRAIL) (Figura 15). Por el contrario, Six1 inhibida en las células SKOV3 dio como resultado sólo una ligera sensibilización (inferior a 2 veces) a FasL (Figura 20). Estos resultados demuestran que Six1 inhibe especial y significativamente la apoptosis mediada por TRAIL.

La Six1 está sobreexpresada en los carcinomas de ovario. El descubrimiento de que Six1 modula la respuesta de las células del cáncer de ovario para el TRAIL presenta implicaciones significativas tanto para el pronóstico del cáncer de ovario como para las intervenciones terapéuticas. Para determinar si la sobreexpresión de Six1 es frecuente en los carcinomas de ovario, y si su expresión está relacionada con la supervivencia al cáncer, se aisló el ARN de ovarios normales, cistoadenomas, carcinomas de ovario en estadios tempranos (estadio I) y avanzados (estadios II, III y IV, todos metastáticos localmente o distantes) y se realizó una qRT-PCR para examinar los niveles de Six1 ARNm. Utilizando un punto de corte de 100 fg Six1/ng ARNr, 0/5 (0%) de ovarios posmenopáusicos normales, 1/17 (14%) cistoadenomas, 3/5 (60%) cánceres en estadio temprano (estadio I), y 13/19 (68%) cánceres metastáticos (estadios II-IV) mostraron que sobreexpresaban Six1 (Figura 16). Six1 ARNm está elevada en los tumores de ovario en el estadio temprano en comparación con ovarios normales (expresión relativa media 140 ± 53 fg/ng ARNr vs. 14 ± 12 fg/ng ARNr, $p= 0,06$) y en tumores metastáticos en comparación con tumores en estadio temprano (expresión relativa media 369 ± 129 vs. 140 ± 53 , $P= 0,06$). Los números adquieren significancia estadística cuando los tumores metastáticos se comparan con los ovarios normales ($p= 0,003$). Estos datos demuestran que Six1 ARNm está sobreexpresada en el carcinoma de ovario, y sugiere que la expresión de Six1 contribuye a un fenotipo más maligno.

Experimentos adicionales para establecer la viabilidad. Se examinaron tres líneas celulares derivados de pacientes y se ensayaron para observar si las diferencias en los niveles de Six1 ARNm estaban relacionados con la respuesta al TRAIL. Se aislaron las células de tumores de primarios pacientes y se mantuvieron en cultivo. Se midieron los niveles de ARNm de Six1 mediante RT-PCR cuantitativo mostrando unos niveles de expresión variables y después se trataron con concentraciones aumentadas de TRAIL y se ensayó para la apoptosis. Dos líneas celulares (pacientes número 1 y 2) expresaron unos niveles elevados de Six1 mediante qRT-PCR y uno (paciente número 3) expresó unos niveles bajos. (Ver Figura 22). Las células del paciente número 3 que expresaban niveles bajos de Six1 ARNm eran notablemente más sensibles a TRAIL en el ensayo de dosis dosis-respuesta.

En otro experimento, se establecieron los tumores con líneas celulares diferentes y después se trataron los animales durante cinco días empezando el día 0. Tres líneas celulares con Six1 bajo (líneas celulares 1, 2 y 3) mostraron una regresión del tumor mientras que dos líneas celulares con Six1 elevada (líneas celulares 4 y 5) no mostraron regresión en respuesta al tratamiento con TRAIL y siguieron creciendo. (Ver Figura 23). Por consiguiente, se puede trabajar con las líneas celulares de tumor primario para probar su sensibilidad al TRAIL y otros agonistas y para probar si los niveles de Six1 ARNm y los niveles de proteína están relacionados con los efectos funcionales de la señal del receptor de TRAIL.

5 La relación entre los niveles de Six1 ARNm en pacientes con cáncer de ovario metastático y la supervivencia se determinó para examinar si la sobreexpresión de Six1 puede contribuir a un fenotipo más maligno. Apoyando una función de Six1 en la progresión del tumor, los pacientes con cáncer de ovario metastático que expresaban niveles elevados de Six1 (superior a 300 fg/ng 18s ARNr) mostraron una supervivencia media significativamente más corta en un seguimiento completo de 17 meses que los pacientes con cáncer de ovario metastático con niveles más bajos de sobreexpresión de Six1. De 6 pacientes con cáncer de ovario con Six1 > 300 fg/ng ARNr, cuatro fallecieron con una supervivencia media de 17 meses, uno vive y presenta la enfermedad y uno falleció sin enfermedad después de un seguimiento de 19 meses. Por el contrario, los 13 pacientes con cáncer de ovario en estadio avanzado que mostraban unos niveles de Six1 inferiores a 300 fg/ng ARNr, están todos vivos con un seguimiento medio de 16 meses y 9/13 no presentan la enfermedad. Los efectos en la supervivencia observados son independientes del estadio, de la histología, de la extensión de la extirpación o de la sensibilidad a la quimioterapia. Por consiguiente, niveles elevados de sobreexpresión de Six1 están significativamente asociados con un resultado clínico pobre (p=0,02) (Figura 17).

15 La descripción anterior es un ejemplo de una forma de realización de la presente invención. Se debe apreciar que la descripción anterior no pretende limitar: más bien, las formas de realización descritas en la presente memoria tan solo describen ejemplos de aplicaciones del objeto de la presente invención.

1	GGTAGCAGCA	TCCACCGGGC	GGGAGGTCGG	AGGCAGCAAG	GCCTTAAAGG
	CTACTGAGTG				
61	CGCCGGCCGT	TCCGTGTCCA	GAACCTCCCC	TACTCCTCCG	CCTTCTCTTC
	CTTGGCCGCC				
121	CACCGCCAAG	TTCCGACTCC	GGTTTTGCGC	TTTGCAAAGC	CTAAGGAGGA
	GGTTAGGAAC				
181	AGCCGCGCCC	CCCTCCCTGC	GGCCGCCGCC	CCCTGCCTCT	CGGCTCTGCT
	CCCTGCCGCG				
241	TGCGCCTGGG	CCGTGCGCCC	CGGCAGGCGC	CAGCCATGTC	GATGCTGCCG
	TCGTTTGGCT				
301	TTACGCAGGA	GCAAGTGCGG	TGCGTGTGCG	AGGTTCTGCA	GCAAGGCGGA
	AACCTGGAGC				
361	GCCTGGGCAG	GTTCTGTGGG	TCACTGCCCG	CCTGCCAGCA	CCTGCACAAG
	AACGAGAGCG				
421	TACTCAAGGC	CAAGGCGGTG	GTCGCCTTCC	ACCGCGGCAA	CTTCCGTGAG
	CTCTACAAGA				
481	TCCTGGAGAG	CCACCAGTTC	TCGCCTCACA	ACCACCCCAA	ACTGCAGCAA
	CTGTGGCTGA				
541	AGGCGCATT	CGTGGAGGCC	GAGAAGTGC	GCGGCGGACC	CCTGGGCGCC
	GTGGGCAAAT				
601	ATCGGGTGCG	CCGAAAATTT	CCACTGCCGC	GCACCATCTG	GGACGGCGAG
	GAGACCAGCT				
661	ACTGCTTCAA	GGAGAAGTCG	AGGGGTGTCC	TGCGGGAGTG	GTACGGCGAC
	AATCCCTACC				
721	CATGCGCCGG	TGAGAAGCGG	GAGCTGGCCG	AGGCCACCGG	CCTCACCCAC
	ACCCAGSTCA				
781	GCAACTGGTT	TAAGAACCGG	AGGC AAAGAG	ACCGGGCCGC	GGAGGCCAAG
	GAAAGGGAGA				
841	ACACCGAAAA	CAATAACTCC	TCCTCCAACA	AGCAGAACCA	ACTCTCTCCT
	CTGGAAGGGG				
901	GCAAGCCGCT	CATGTCCAGC	TCAGAAGAGG	AATTCTCACC	TCCCCAAAGT
	CCAGACCAGA				
961	ACTCGTCCCT	TCTGTGCAG	GGCAATATGG	GCCACGCCAG	GAGCTCAAAC
	TATTCTCTCC				
1021	CGGGCTTAAC	AGCCTCGCAG	CCCAGTCACG	GCCTGCAGAC	CCACCAGCAT
	CAGCTCCAAG				
1081	ACTCTCTGCT	CGGCCCCCTC	ACCTCCAGTC	TGGTGGACTT	GGGGTCTTAA
	GTGGGGAGGG				
1141	ACTGGGGCCT	CGAAGGGATT	CCTGGAGCAG	CAACCACTGC	AGCGACTAGG
	GACACTTGTA				
1201	AATAGAAATC	AGGAACATTT	FTGCAGCTTG	TTTCTGGAGT	TGTTTGCGCA
	TAAAGGAATG				
1261	GTGGACTTTC	ACAAATATCT	TTTTAAAAAT	CAAACCAAC	AGCGATCTCA
	AGCTTAATCT				
1321	CCTCTTCTCT	CCAACTCTTT	CCACTTTTGC	ATTTTCCTTC	CCAATGCAGA
	GATCAGGG				
1	MSMLPSFGFT	QEQVACVCEV	LQQGGLERL	GRFLWSLPAC	DHLHKNESVL
	KAKAVVAFHR				
61	GNFRELYKIL	ESHQFSPHNH	PKLQQLWKA	HYVEAEKLRG	RPLGAVGKYR
	VRRKFPLPRT				
121	IWDGEETSYC	FKEKSRGVLR	EWYAHNPYPS	PREKRELAEA	TGLTTTQVSN
	WFKNRRQRDR				
181	AAEAKERENT	ENNNSSSNKQ	NQLSPLEGGK	PLMSSSEEEF	SPPQSPDQNS
	VLLLQGNMGH				
241	ARSSNYSLPG	LTASQPSHGL	QTHQHQLQDS	LLGPLTSSLV	DLGS

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para determinar la intervención terapéutica para el carcinoma de ovario que comprende que las etapas que consisten en:
- 5 determinar si una muestra biológica de un sujeto que padece carcinoma de ovario presenta una sobreexpresión de una proteína que resiste al ligando inductor de la apoptosis relacionado con el factor de la necrosis tumoral (TRAIL), en el que la proteína que resiste el TRAIL es Six1; y
- 10 seleccionar un agente no TRAIL para la terapia que no presenta resistencia cruzada a la quimioterapia cuando la muestra biológica presenta una sobreexpresión de Six1, o
- seleccionar un agente TRAIL para terapia si Six1 no está sobreexpresada.
- 15 2. Procedimiento según la reivindicación 1 en el que la muestra biológica es una muestra de un tumor.
3. Procedimiento según la reivindicación 2 en el que la muestra de un tumor es una muestra de un tumor de ovario.
4. Procedimiento según la reivindicación 3 que es un procedimiento para determinar la intervención terapéutica para el carcinoma de ovario que comprende las etapas que consisten en:
- 20 determinar una cantidad de proteína Six1 o ARNm de Six1 expresada en una muestra de tumor de ovario;
- determinar si la cantidad de proteína Six1 o ARNm de Six1 está sobreexpresada en la muestra del tumor de ovario en comparación con un control; y
- 25 seleccionar un agente TRAIL para la terapia si Six1 no está sobreexpresada.
5. Procedimiento para determinar el pronóstico de un sujeto con un carcinoma de ovario que comprende las etapas que consisten en:
- 30 determinar la cantidad de proteína Six1 o ARN de Six1 expresada en una muestra de un tumor de ovario; y
- formar un pronóstico basándose en la cantidad de proteína Six1 o ARN de Six1.
- 35 6. Procedimiento según la reivindicación 5 en el que la etapa de formación del pronóstico comprende las etapas que consisten en:
- comparar la cantidad de proteína Six1 o ARN de Six1 expresada en la muestra del tumor de ovario con un control; y
- 40 y
- formar el pronóstico basándose en la cantidad de proteína Six1 o ARN de Six1 expresada en la muestra del tumor de ovario en comparación con el control.
- 45 7. Procedimiento según la reivindicación 5 en el que la etapa de formación del pronóstico basándose en la cantidad de proteína Six1 o ARN de Six1 expresada en la muestra del tumor de ovario comprende la formación de un pronóstico de la mortalidad aumentada cuando los niveles de expresión de Six1 en el tumor de ovario son superiores a 300 fg/ng ARNr.

```

1  GGTAGCAGCA  TCCACCCGGG  GGGAGGTGG  AGGAGCAAG  GCCTTAAAGG  CTTACTGAGTG
61  CGCCGGCCGT  TCCGTGTCCA  GAACCTCCCC  TACTCCTCCG  CCTTCTCTTC  CTTGGCCCGCC
121  CACCGCCAAG  TTCCGACTCC  GGTTCGCGCC  TTGCAAAAG  CTAAGGAGGA  GGTAGGAAC
181  AGCCGGCCCC  CCCTCCCTGC  GGCAGCCGCC  CCCTCCCTCT  CGGTCTGCT  CCCTGCCCGC
241  TCGCCCTGG  CCGTGCGCC  CGCAGCGCC  CAGCCATGC  GATGCTGCC  TCGTTTGGCT
301  TTACGCAGGA  GCAAGTGGG  TCGGTGTGG  AGGTTCTGCA  GCAAGGCGGA  AACCTGGAGC
361  GCCTGGGCAG  GTTCCTGTGG  TCACTGCCCG  CCTGGACCCA  CCTGCACAAG  AACGAGAGCC

421  TACTCAAGGC  CAAGCGGTG  GTGCGCTTCC  ACCGGGCAA  CTTCCGTGAG  CTTCTACAAGA
481  TCCTGGAGAG  CCACCAGTTC  TCGCCTCACA  ACCACCCCAA  ACTGCAGCAA  CTGTGGCTGA
541  AGCGCATTA  CGTGGAGGCC  GAGAAGCTGC  GCGGCCGACC  CTTGGCGCC  GTGGCAAAT
601  ATCGGGTGCG  CCGAAAATTT  CCACTGCCGC  GCACCATCTG  GGAACGGGAG  GAGACCAAGCT
661  ACTGCTCAA  GGAGAAGTCC  AGGGTGTCC  TGCGGGAGTG  GTACGCGCAC  AATCCCTACC
721  CATGCCGCG  TGAGAAAGCG  GAGCTGGCCG  AGCCACCCGG  CCTCACCCAC  ACCCAGGTCA
781  GCAACTGGTT  TAAGAACCCG  AGGCAAGAG  ACCGGCCCG  GGAGGCCAAG  GAAAGGGAGA
841  ACACCGAAA  CAATAACTCC  TCCTCCAACA  AGCAGAACCA  ACTCTCTCT  CTGGAAAGGG
901  GCAAGCCGCT  CATGTCCAGC  TCAGAAGAGG  AATTCTCAC  TCCCAAAAGT  CCAGACCAGA
961  ACTCGTCC  TCTGTGCAG  GGCAATATGG  GCCACGCCAG  GAGCTCAAAC  TATCTCTCC
1021  CGGGCTTAA  AGCCTCCAG  CCCAGTCACG  GCCTGCAGAC  CCACCAGCAT  CAGCTCCAAG
1081  ACTCTCTGCT  CGGCCCCCTC  ACCTCCAGTC  TGGTGGACTT  GGGTCCCTAA  GTGGGGAGGG
1141  ACTGGGCC  CGAAGGGATT  CCGAGAGCAG  CAACCACTGC  AGCGACTAGG  GACACTTGTA
1201  AATAGAAAT  AGGAACATTT  TTGAGCTTG  TTTCTGGAGT  TGTTCGCGCA  TAAAGGAATG
1261  GTGGACTTTC  ACAAATATCT  TTTTAAAAT  CAAAACCAAAC  AGCGATCTCA  AGCTTAATCT
1321  CCTCTCTCT  CCAACTCTTT  CCACTTTTGC  ATTTCTCTTC  CCAAATGCAGA  GATCAGGG

1  MSMLPSFGFT  QEOVACVCEV  LQGGNLERL  GRFLWSLPAC  DHLHKNESVL  KAKAVVAFHR
61  GNFRELYKIL  ESHQFSPHNH  PKLQQLWLKA  HYVEAEKLRG  RPLGAVGKYR  VRRKFPLPRT
121  IWDGEETSYC  FKEKSRGVLR  EWYAHNPYPS  PREKRELAEA  TGLTTTQVSN  WFKNRRQRDR
181  AAEAKERENT  ENNNSSSNKQ  NQLSPLEGGK  PLMSSSEEEF  SPPQSPDQNS  VLLLQGNMGGH
241  ARSSNYSLPG  LTASQPSHGL  QTHQHQLQDS  LLGPLTSSLV  DLGS

```

FIG.1

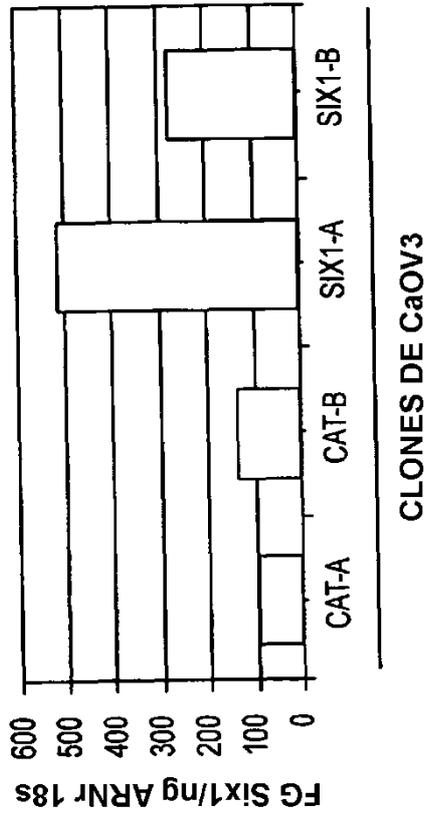


FIG. 4

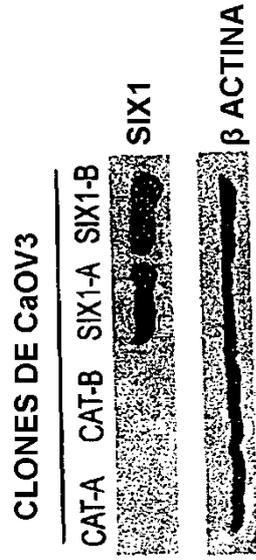


FIG. 5

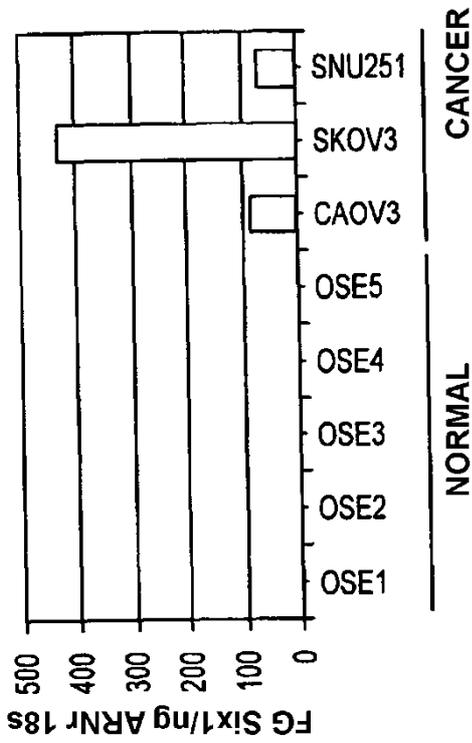


FIG. 2

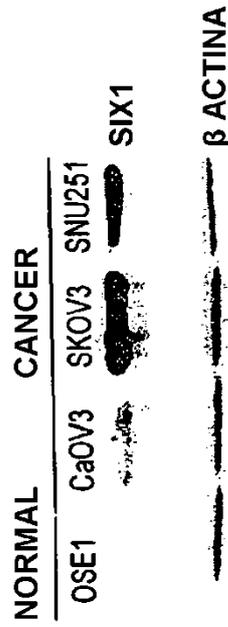


FIG. 3

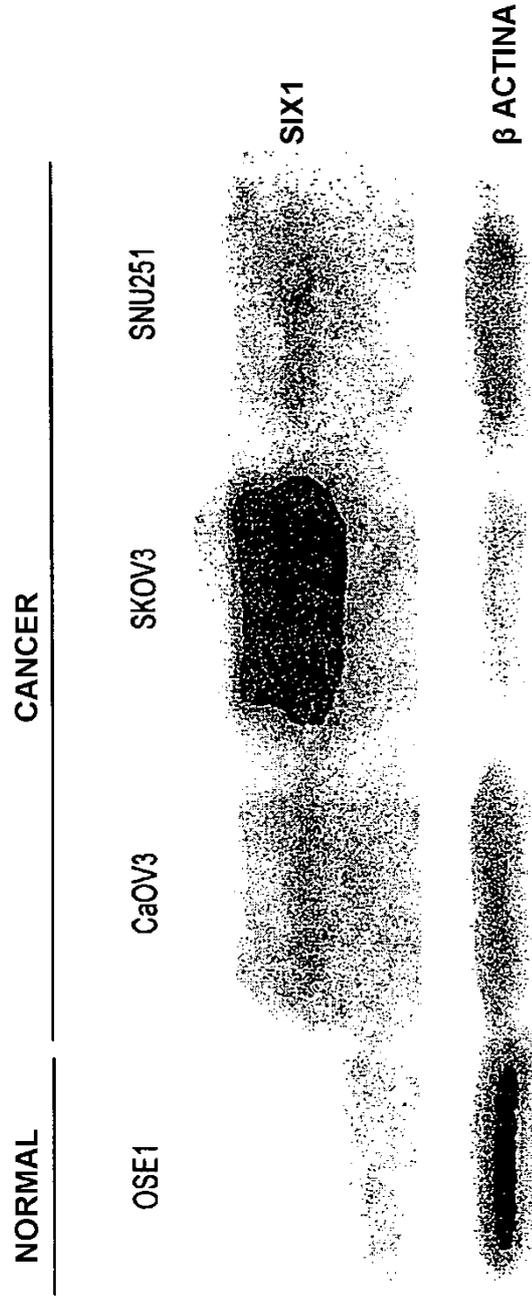


FIG.6

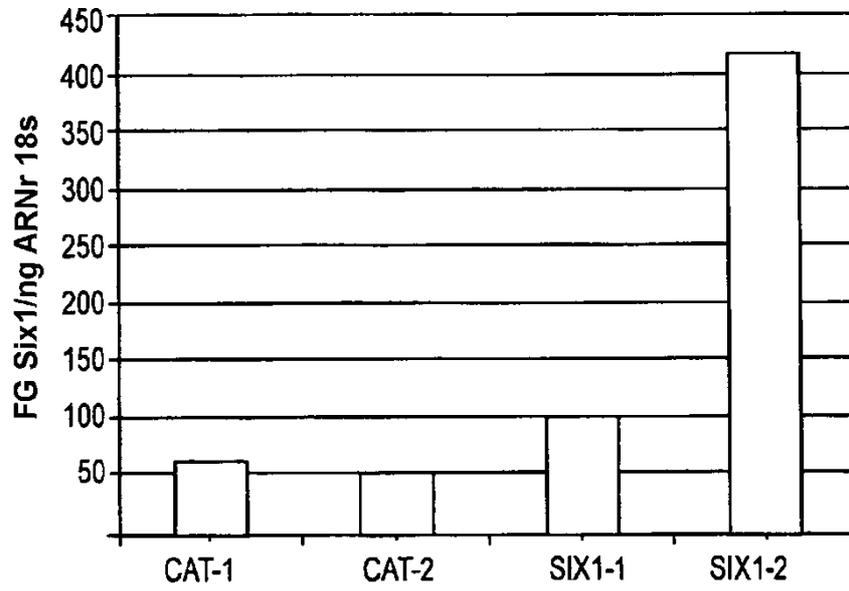


FIG.7

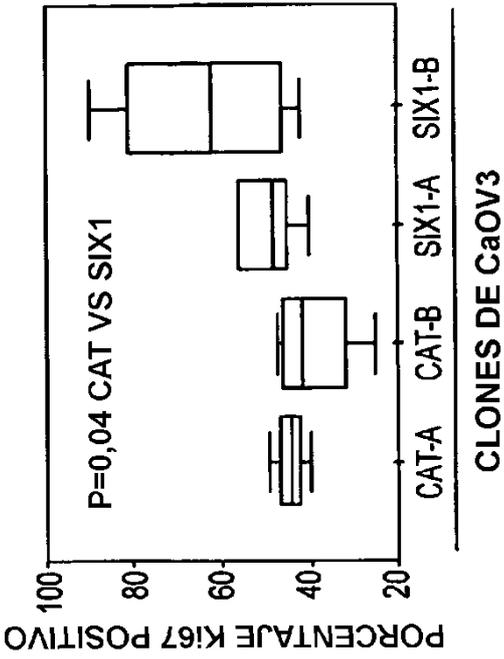


FIG.9

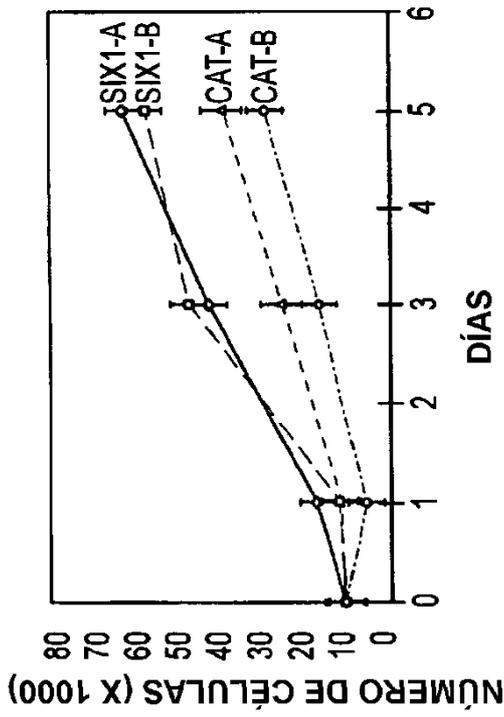


FIG.8

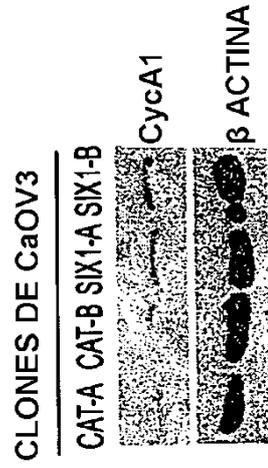


FIG.10

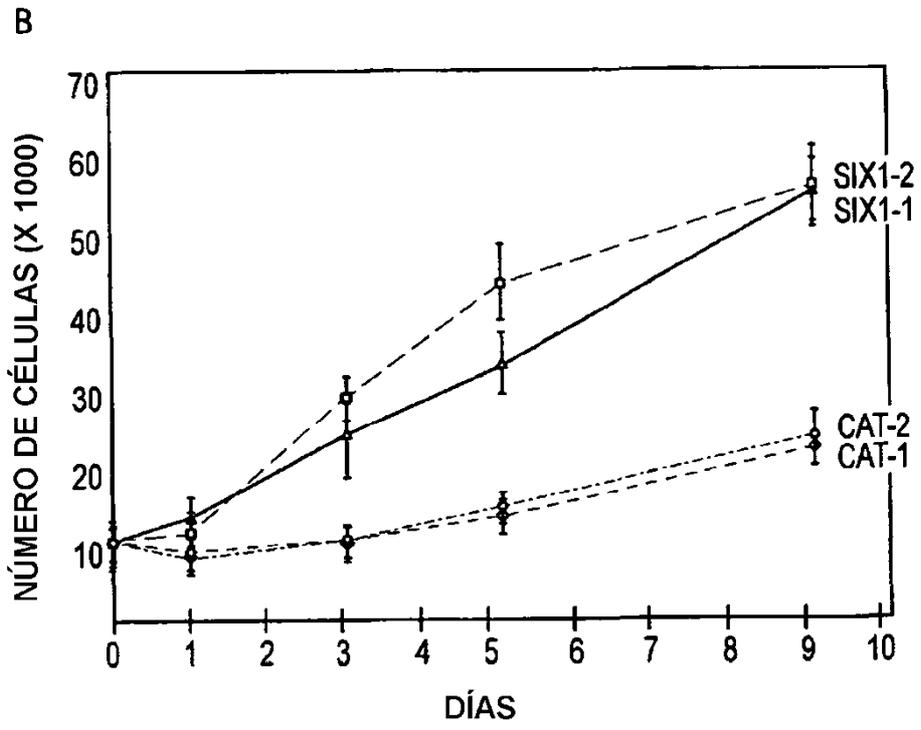
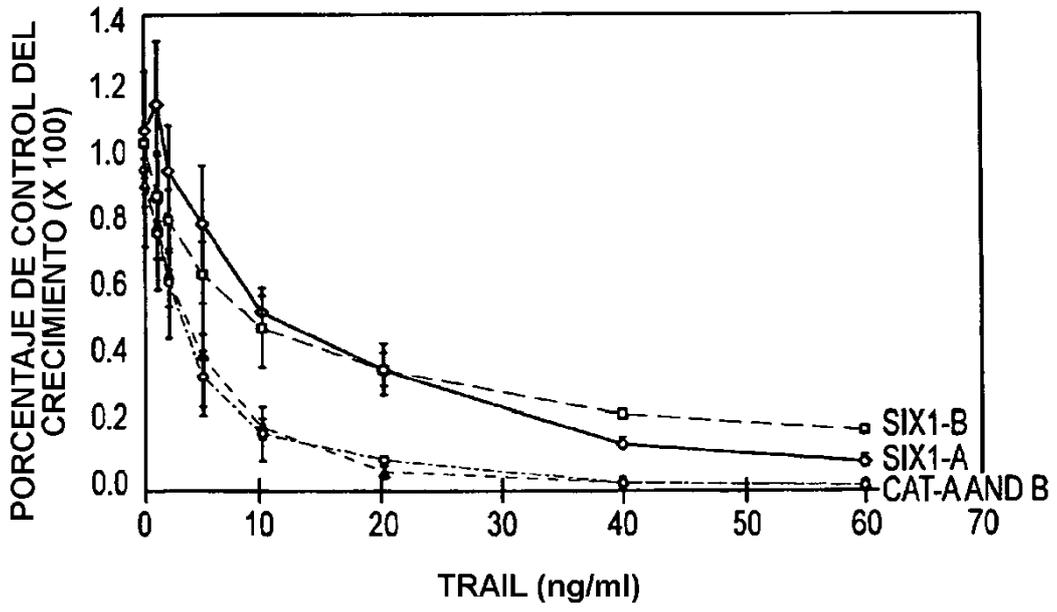
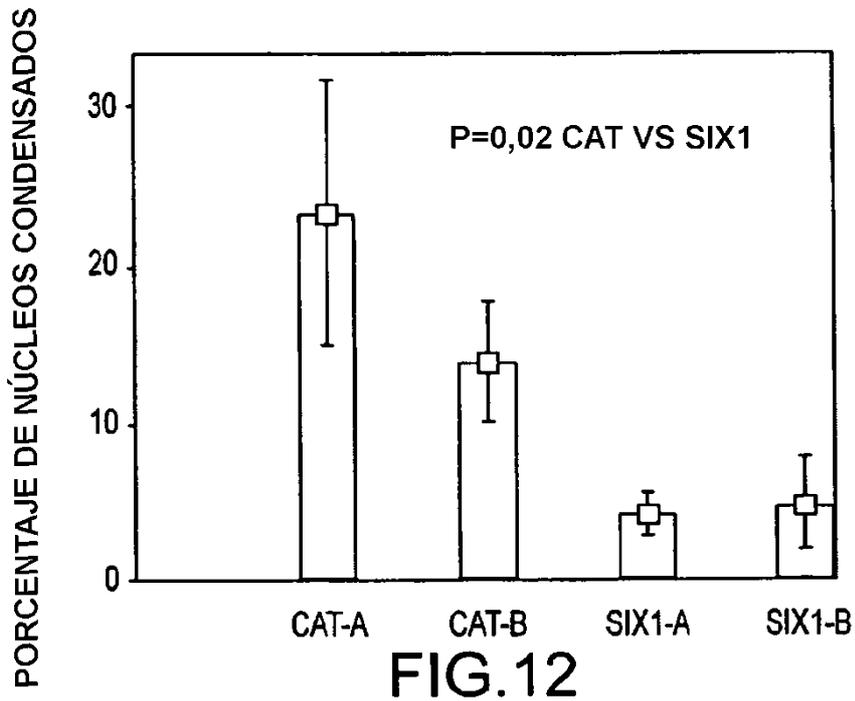


FIG.11



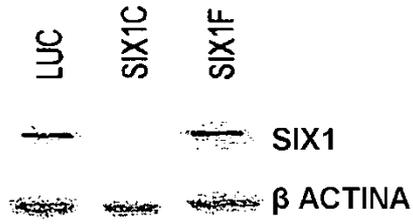


FIG.14

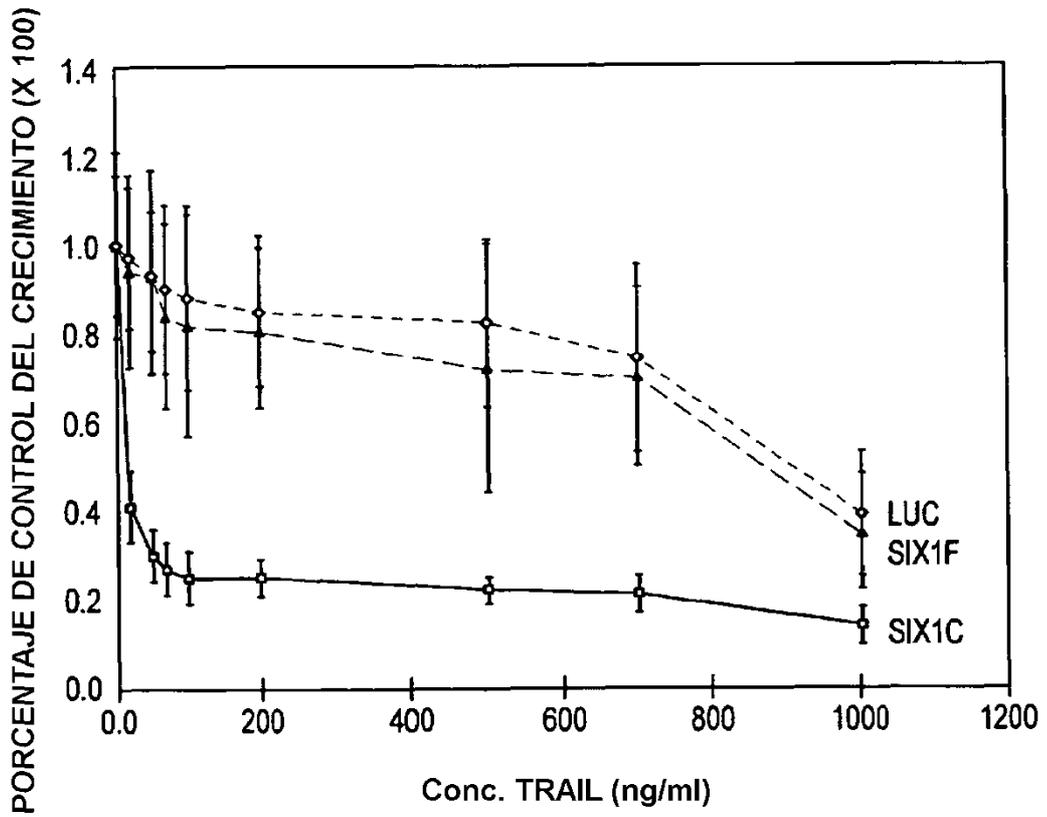


FIG.15

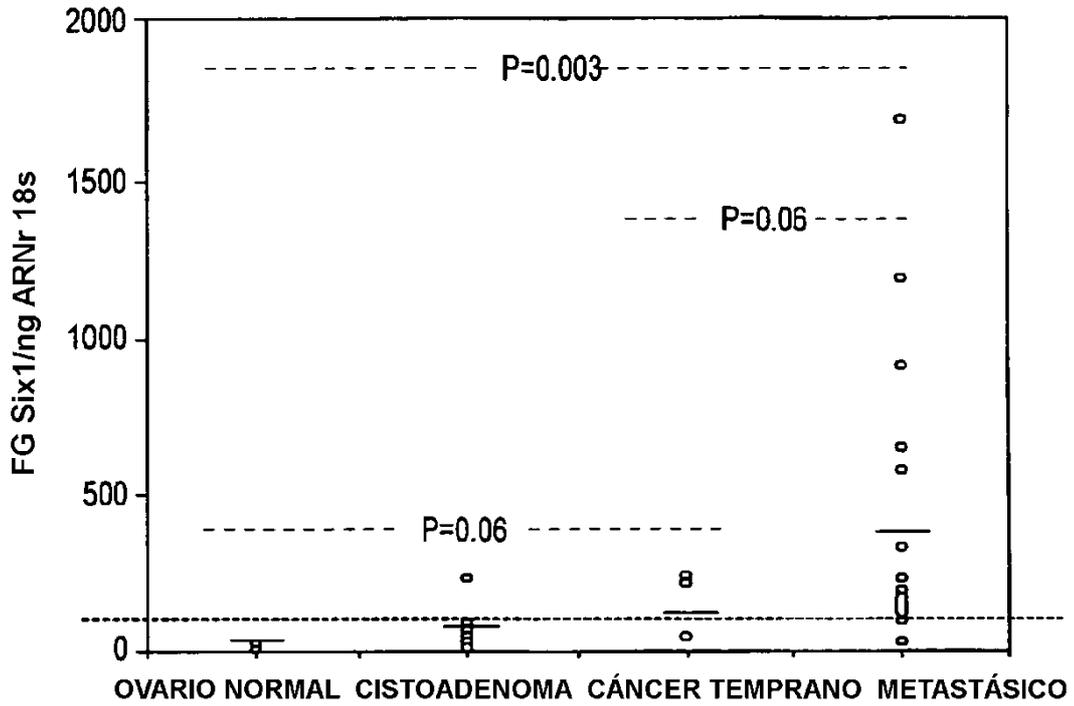


FIG.16

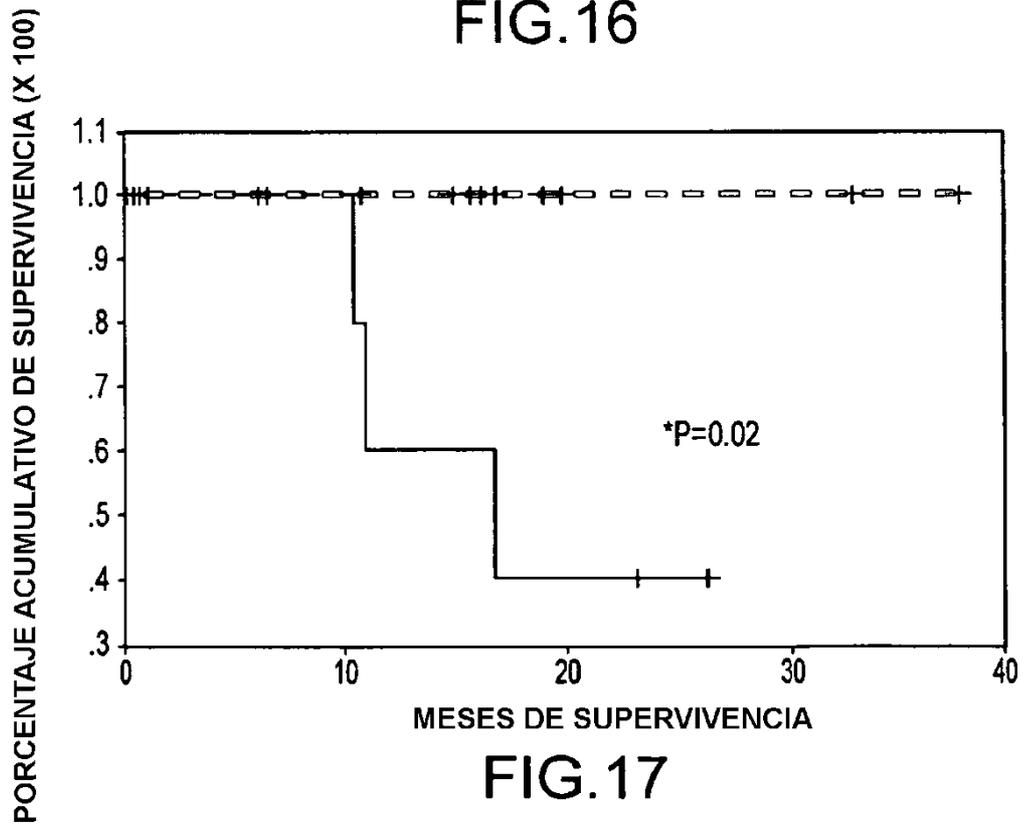


FIG.17

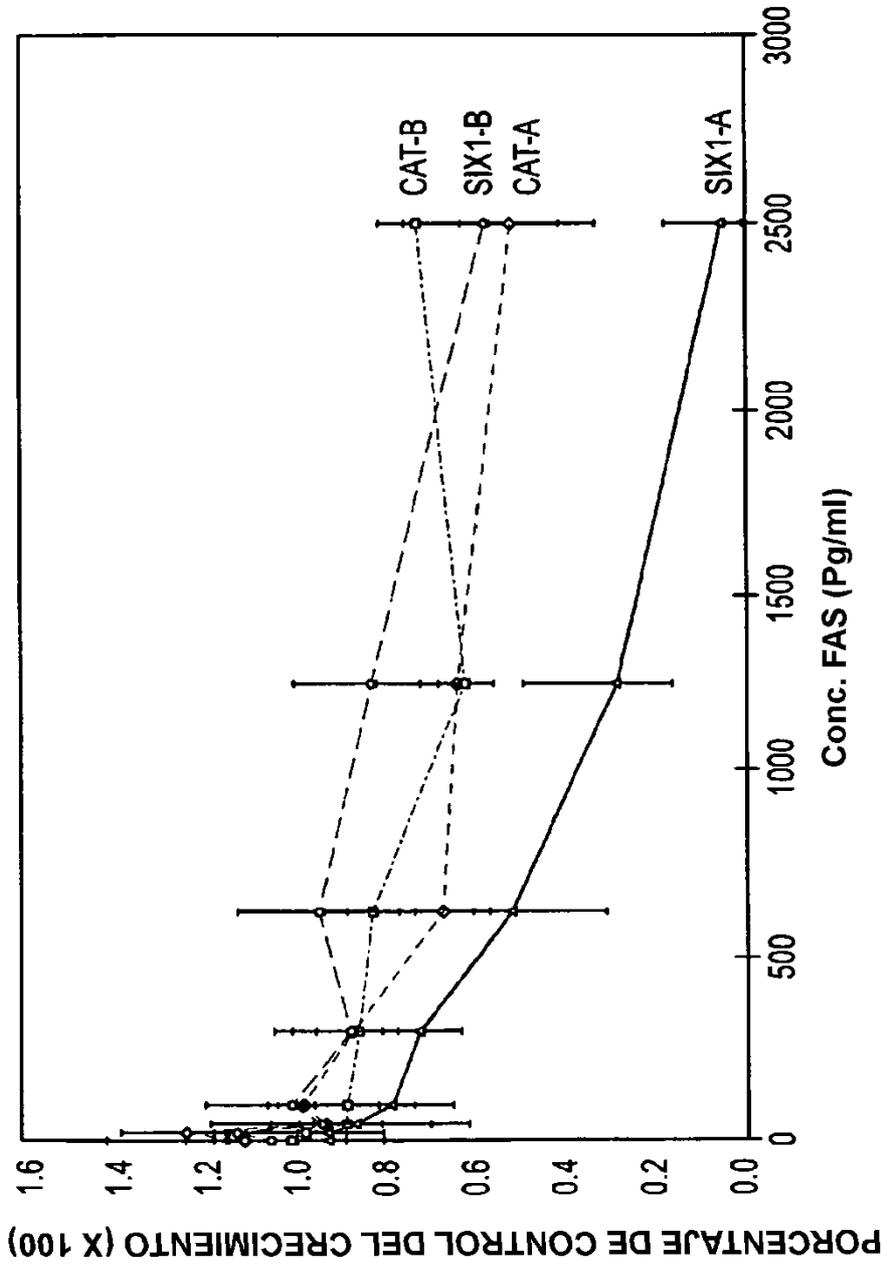
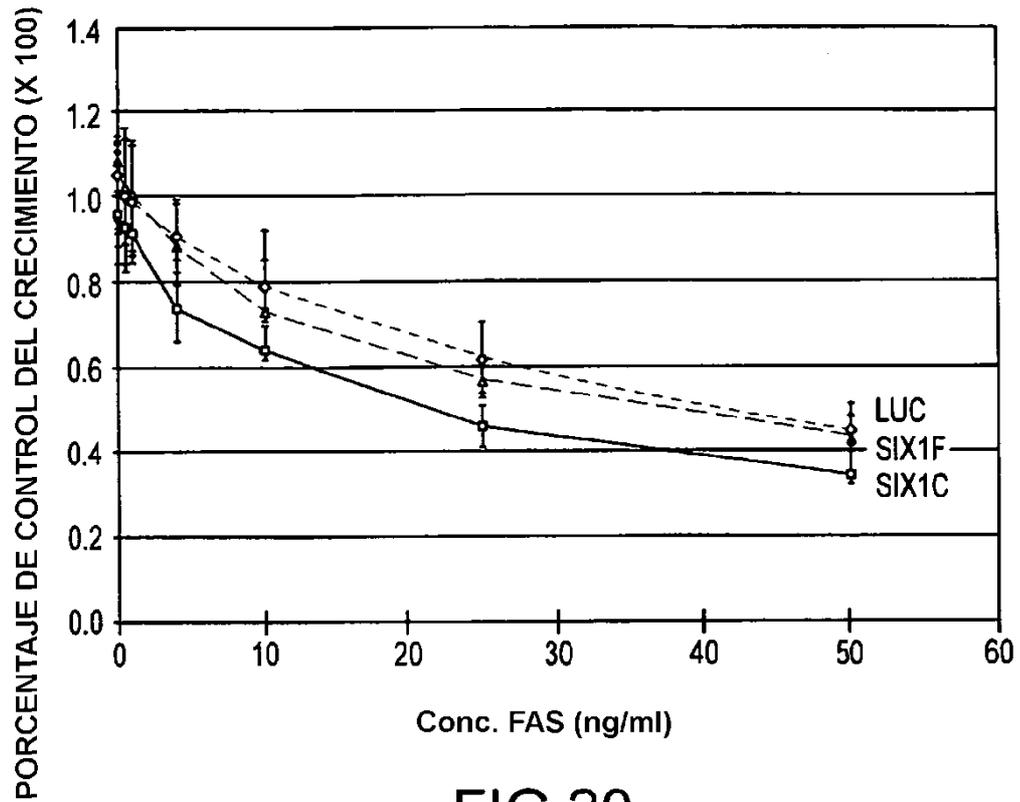


FIG. 18

CONSTRUCTO	SECUENCIA DIANA
SIX 1C (REGION DIANA EN ARNm SIX1)	GAA CGA GAG CGU ACU CAA G
SIX 1F (REGION DIANA EN ARNm SIX1)	AGU CCA GAC CAG AAC UCG G
LUC (REGION DIANA EN ARNm LUCIFERASA)	CGU ACG CGG AAU ACU UCG A

FIG.19



CEBADOR / Sonda	SECUENCIA (5' A 3')
SENTIDO	CAC CTC CCC AAA GTC CAG AC
ANTISENTIDO	CCT GGC GTG GCC CAT A
SONDA	CGG TCC TTC TGC TGC AGG GCA T

FIG.21

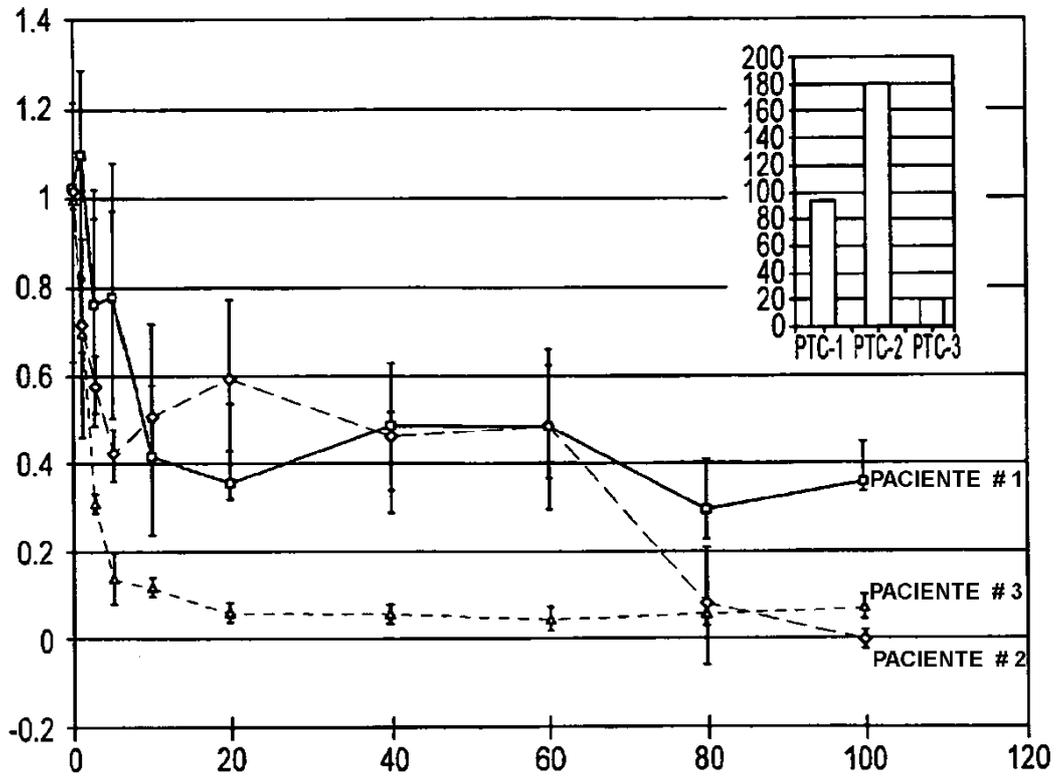


FIG.22

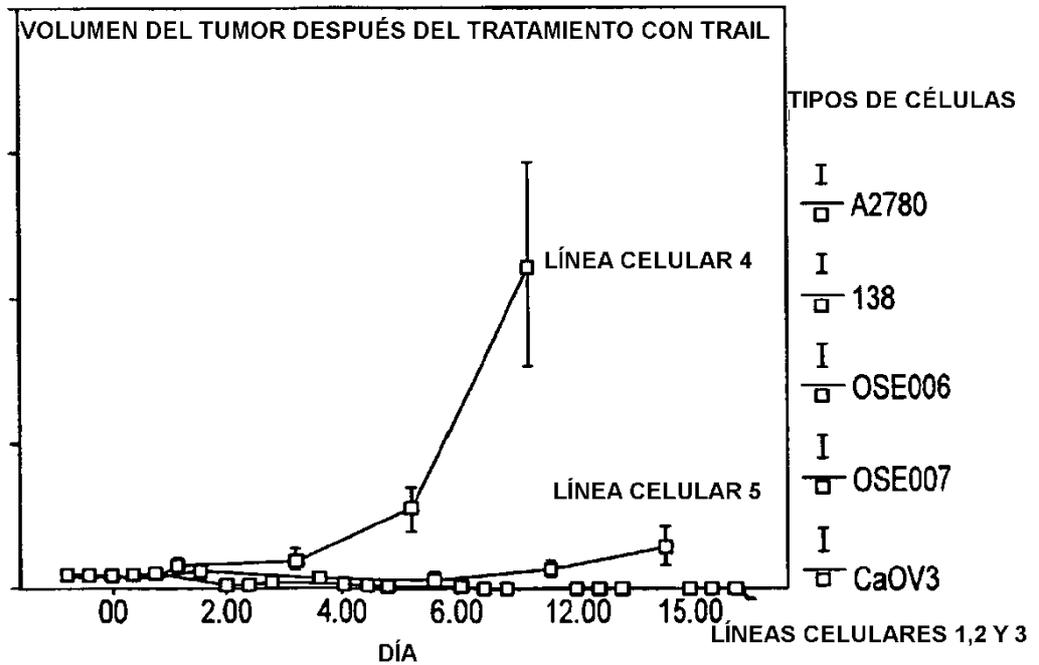


FIG.23