

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 002**

51 Int. Cl.:

C07F 9/6561 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2004 E 10171926 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2270159**

54 Título: **Marcadores para células pre-cancerígenas y cancerígenas y el método para interferir con la proliferación celular en ellas**

30 Prioridad:

21.05.2003 US 472106 P

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

19.05.2015

73 Titular/es:

**ANDES BIOTECHNOLOGIES S.A. (100.0%)
Avda. Zanartu 1482
Nuñoa, Santiago, CL**

72 Inventor/es:

**BURZIO, LUIS O.;
VILLEGAS, JAIME E. y
BURZIO, VERONICA A.**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 536 002 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

Marcadores para células pre-cancerígenas y cancerígenas y el método para interferir con la proliferación celular en ellas

5

Campo de la invención

La invención se refiere a terapia contra el cáncer y a reactivos de investigación a propósito de una novedosa familia de ARN mitocondriales humanos denominados ARN quiméricos mitocondriales humanos. En particular, la presente invención se refiere a oligonucleótidos dirigidos a los ARN quiméricos mitocondriales humanos. Los oligonucleótidos de la invención se hibridan con los ARN quiméricos que inducen la muerte de células cancerígenas. La composición y métodos proporcionados en la invención son útiles como una nueva terapia contra el cáncer.

10

Antecedentes de la invención

15

Las mitocondrias son orgánulos subcelulares que fabrican la molécula esencial adenosina trifosfato (ATP) por fosforilación oxidativa. El ADN mitocondrial humano (ADNmt) de 16.654 pares de bases codifica dos ARN ribosómicos, 22 ARN de transferencia (ARNt) y 13 marcos de lectura abiertos (ORF) que codifican un número similar de polipéptidos (Clayton, Hum Reprod., Suppl. 2:11-17, 2000; Taanman, Biochim. Biophys. Acta, 1410:103-123, 1999). Basándose en el contenido de la composición de bases G+T, las dos hebras del ADNmt se diferencian en la densidad de flotación y pueden separarse en gradientes de cloruro de cesio desnaturalizantes. La hebra pesada o hebra H codifica los dos ARN ribosómicos (12S y 16S), 14 ARNt y 12 polipéptidos correspondientes a ND 1, ND 2, ND 3, ND4L, ND4, ND 5, COX I, COX II, COX III, ATP6, ATP8 y Cyt b. La hebra ligera o hebra L codifica 8 ARNt y la subunidad del complejo NAD deshidrogenasa ND6 (Clayton, Hum Reprod., Suppl. 2:11-17, 2000; Taanman, Biochim. Biophys. Acta, 1410:103-123, 1999).

20

25

Una gran proporción del ADNmt contiene una estructura de tres hebras cortas llamada el bucle de desplazamiento o bucle D. Esta región, que en seres humanos tiene 1.006 pares de bases, está flanqueada por los genes para ARNt de fenilalanina (ARNt^{Phe}) y el ARNt de prolina (ARNt^{Pro}) y contiene una hebra de ácido nucleico corta complementaria a la hebra L y que desplaza la hebra H (Clayton, Hum Reprod., Suppl. 2:11 -17, 2000; Taanman, Biochim. Biophys. Acta, 1410:103-123, 1999). Esta región se ha desarrollado como el principal sitio de control para la expresión del ADNmt y contiene el origen de replicación de hebra conductora o hebra H y los principales promotores para la transcripción de la hebra H (HSP) y L (LSP). A pesar de la estrecha proximidad de HSP y LSP (aproximadamente 150 pb), estos elementos reguladores son funcionalmente independientes *in vitro* (Shuey y Attardi, J. Biol. Chem., 260:1952-1958, 1985; Taanman, Biochim. Biophys. Acta, 1410:103-123, 1999), además de *in vivo*, utilizando pacientes modelo con enfermedades mitocondriales (Chinnery y Turnbull, Mol. Med. Today, 6:425432, 2000).

30

35

Ambas hebras se transcriben como ARN policistrónicos que luego se procesan para liberar los ARNm individuales, ARNt y los ARNr (Taanman, Biochim. Biophys. Acta, 1410:103-123, 1999). En seres humanos, la ARN polimerasa mitocondrial es una proteína de 1.230 aminoácidos con homología significativa con la secuencia de ARN polimerasa mitocondrial de levadura y con las ARN polimerasas de varios bacteriófagos (Tiranti et al., Hum Mol Genet., 6:615-625, 1997). Además, se ha caracterizado una familia de factores de transcripción tal como el factor de transcripción mitocondrial A o TFAM que es esencial para la transcripción de ADNmt de mamífero y es un miembro de la familia de la caja del grupo de alta movilidad (HMG) de proteínas de unión a ADN (Paris) y Clayton, Science, 252:965-969, 1991). Recientemente, dos informes independientes describieron las características de los nuevos factores de transcripción, TFB1M y TFB2M, en ser humano y ratón (McCulloch et al., Mol. Cell Biol., 22, 1116-1125, 2002; Falkenberg et al., Nat. Genet., 31:289-294, 2002; Rantanen et al., Mamm. Genome, 14:1-6, 2003). A pesar del considerable progreso logrado en los elementos que actúan en *cis* y *trans* que participan en la transcripción de ADNmt, no se entienden completamente los detalles funcionales.

40

45

50

Mitocondrias y apoptosis

Las mitocondrias desempeñan una función central en la apoptosis, un proceso biológico fundamental por el que las células mueren de una manera controlada o programada. Este programa suicida de células es esencial durante el desarrollo y para la homeostasis adulta de todos los animales metazoos. La apoptosis se activa para erradicar células superfluas, dañadas, mutadas y envejecidas (Meter et al., Nature, 407:796-801, 2000). La desregulación de la apoptosis participa en la aparición de varias patologías. Así, la inhibición anormal de la apoptosis es un distintivo de neoplasia, mientras que la apoptosis masiva se ha ligado a enfermedades agudas tales como accidente cerebrovascular, choque séptico y trastornos neurodegenerativos. Actualmente, el proceso de apoptosis se describe como dos rutas importantes conocidas como las rutas extrínsecas e intrínsecas (Zornig et al., Biochim. Biophys. Acta, 1551:F1-F37, 2001). La ruta extrínseca es un proceso que se inicia en la membrana celular por la unión de diferentes ligandos a los receptores de muerte (Krammer, Nature, 407:789-795, 2000; Zornig et al., Biochim. Biophys. Acta, 1551:F1-f37, 2001).

55

60

65

Las caspasas son responsables de la cascada proteolítica en la apoptosis. Las caspasas se sintetizan como

proteínas precursoras inactivas que experimentan maduración proteolítica o procesamiento tras la inducción de la apoptosis (Zornig et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1551:F1 - F37, 2001). Sin embargo, más recientemente, varios estudios experimentales indican que las proteasas lisosómicas constituyen una ruta de proteólisis alternativa después de las lesiones apoptóticas (Guicciardi et al., *Oncogene*, 23:2881-2890, 2004). Por otra parte, se han descrito proteínas antiapoptóticas homólogas a la oncoproteína Bcl-2 humana. Esta proteína pertenece a una familia de proteínas que son tanto antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w) como pro-apoptóticas (Bax, Bak, Bim, Bid, etc.) (Zornig et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1551:F1-F37, 2001).

Las mitocondrias se afectan particularmente pronto durante el proceso apoptótico y actualmente son reconocidas como los coordinadores centrales de la muerte celular (Boya et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 304:575-581, 2003; Ferri y Kroemer, *Nature Cell Biol.*, 3:E255-E263, 2001; Zornig et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1551:F1-F37, 2001). Varias rutas de señalización y daño pro-apoptóticas convergen sobre las mitocondrias para inducir la permeabilización de la membrana mitocondrial, un fenómeno que está bajo el control de las proteínas Bcl-2 (Boya et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 304:575-581, 2003; Zornig et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1551:F1-F37, 2001). Después de que las células reciban ataques apoptóticos, el potencial transmembrana ($\Delta\psi_m$) se disipa produciendo la permeabilización completa de la membrana mitocondrial externa y la consecuente fuga de proteínas intermembrana mitocondriales tóxicas. El primer ejemplo de la fuga de una proteína mitocondrial fue la liberación de citocromo c (Liu et al., *Apoptosis*, 6:453-462, 2001). Cuando el citocromo c está presente en el citosol, conduce al ensamblaje del complejo de activación de caspasas llamado el apoptosoma. El citocromo c se une a Apaf-1 (factor de activación de proteasas apoptóticas-1), facilitando la unión de dATP/ATP al complejo y la oligomerización de Apaf-1 (Adrain et al., *J. Biol. Chem.*, 274:20855-20860, 1999; Benedict et al., *J. Biol. Chem.*, 275:8461-8468, 2000). La oligomerización de Apaf-1 permite el reclutamiento de pro-caspasa-9, que cataliza la activación proteolítica del precursor y la generación de caspasa-9 activa (Adrain et al., *J. Biol. Chem.*, 274:20855-20860, 1999; Benedict et al., *J. Biol. Chem.*, 275:8461-8468, 2000).

Se ha descrito una familia del inhibidor citosólico de las proteínas de la apoptosis y se conoce como XIAP, c-IAP1 y c-IAP2. Estas proteínas se unen a e inhiben la caspasa-3 y caspasa-9 procesadas y, por consiguiente, detienen la cascada de degradación. Sin embargo, la célula también contiene mecanismos de contraminado para eludir esta ruta antiapoptótica. En células que experimentan apoptosis, las caspasas son liberadas de este efecto inhibidor uniéndose a IAP de una proteína conocida como Smac (segundo activador mitocondrial de caspasas) o DIABLO (proteína de unión a IAP directa con bajo pI) (Verhagen et al., *Apoptosis*, 7:163-166, 2002). Uniéndose a IAP, Smac/DIABLO desplazan caspasas activas de IAP y así promueven la muerte celular. Otra proteína, conocida como HtrA2, es liberada de las mitocondrias en el citosol después del ataque apoptótico en el que la proteína se une a IAP de un modo similar a como lo hace Smac/DIABLO y facilitando así la activación de caspasas (Verhagen et al., *Apoptosis*, 7:163-166, 2002; Martins et al., 2001; Suzuki et al., *Mol. Cell*, 8:613- 621, 2001; Hedge et al., *Apoptosis*, 7:123-132, 2002).

El factor inductor de la apoptosis (AIF) es otro componente de la cascada apoptótica. Después de la inducción de la apoptosis, AIF se transloca al citosol y al núcleo. En el núcleo, AIF induce la condensación de cromatina periférica y fragmentación de ADN. AIF también induce varios distintivos de apoptosis como disipación de $\Delta\psi_m$ y exposición de fosfatidilserina (Zornig et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1551:F1- F37, 2001). Un factor que parece regular la actividad apoptótica de AIF es la proteína 70 de choque térmico (Ravagnan et al., *Nature Cell Biol.*, 3:839-843, 2001). Otro factor mitocondrial que sale de las mitocondrias y se transloca en el núcleo como AIF es la endonucleasa G o Endo G. En el núcleo, Endo G genera la fragmentación de ADN incluso en presencia de inhibidores de caspasa (Li et al., *Nature*, 412:95- 99, 2001). Endo G puede actuar de forma similar a CAD (DNasa activada por caspasa), una nucleasa cuya activación se basa críticamente en caspasas (Samejima et al., *J. Biol. Chem.*, 276:45427-45432, 2001).

Cáncer y pre-cáncer

El cáncer es un tumor maligno celular cuyo único rasgo, la pérdida de control normal del ciclo celular, produce crecimiento no regulado, falta de diferenciación y capacidad para invadir otros tejidos y metastatizar. La carcinogénesis es el proceso por el que una célula normal se transforma en una célula maligna. La carcinogénesis es un proceso de múltiples etapas que empieza con el evento genético de la iniciación seguido de la expansión selectiva de células alteradas durante la promoción para formar adenomas tempranos. En ausencia de promoción continua, el adenoma retrocede y desaparece. Con un segundo evento genético, un pequeño número de adenomas promovidos progresan para formar adenomas tardíos, algunos de los cuales pueden entonces experimentar conversión maligna (McKinnell et al., "The Biology Basis of Cancer", Ch. 3, 1998).

La etiología del cáncer es compleja e incluye la alteración de la regulación del ciclo celular, anomalías cromosómicas y rotura de cromosomas. Se cree que los agentes infecciosos, tales como varios tipos de virus oncogénicos, sustancias químicas, radiación (radiación ultravioleta o ionizante) y trastornos inmunológicos, son las principales causas de la carcinogénesis (McKinnell et al., "The Biology Basis of Cancer", Ch. 3, 1998).

Se ha propuesto durante un largo tiempo que el cáncer también está relacionado con la disfunción mitocondrial. Una de estas teorías sugiere que la mutación mitocondrial podría ser la causa primaria de la transformación de células y

cáncer (Warburg, 1956; Carew y Huang, Mol. Cancer, 1:1-12, 2002). Se informaron alteraciones del ADN mitocondrial (ADNmt) en tumores malignos hematológicos (Clayton y Vinograd, Nature, 216:652-657, 1967) y en cáncer de mama (Tan et al., 2002; Parrella et al., 2001). También se han identificado mutaciones de varias regiones del ADNmt y deleciones en pacientes con cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer gástrico, 5 cáncer pancreático, carcinoma hepatocelular, cáncer esofágico, cáncer de riñón, cáncer de tiroides y tumores cerebrales (revisado por Carew y Huang, Mol. Cancer, 1:1-12, 2002). En general, parece que hay dos características principales de alteraciones de ADNmt en el cáncer independientemente del tipo de tumor. La mayoría de las mutaciones son transiciones de bases de T a C y G a A. Segundo, aunque hay diversidad en los genes particulares en los que se producen las mutaciones, el bucle D parece ser la región mutada somática más frecuente del ADNmt 10 en la mayoría de los tipos de tumor.

Las células pre-cancerígenas se definen aquí como una célula transformada que puede evolucionar o diferenciarse en una célula maligna. Algunos ejemplos son células transformadas por oncovirus de ADN o ARN.

15 La presente invención está relacionada con una novedosa familia de ARN mitocondriales y el uso en el presente documento de estos ARN para la terapia contra el cáncer. En otra realización de la invención, se proporcionan composición y métodos para inducir la muerte de células tumorales masiva y selectiva. Por tanto, la presente invención proporciona composiciones y métodos que pueden usarse en terapia contra el cáncer y pre-cáncer para 20 investigación.

Resumen de la invención

ARN quiméricos mitocondriales sentido

25 Los presentes inventores describen composiciones de moléculas de ARN quimérico mitocondrial humano aisladas que comprenden el ARN ribosómico mitocondrial 16S sentido covalentemente ligado en su extremo 5' al extremo 3' de un polinucleótido con una secuencia de repetición invertida. Un ARN quimérico mitocondrial sentido comprende una repetición invertida de 815 nucleótidos unidos covalentemente al extremo 5' del ARN ribosómico mitocondrial 16S (SEC ID N°: 1). La repetición invertida se corresponde con un fragmento de 815 nucleótidos del ARN transcrito 30 de la hebra L del gen 16S del ADNmt. Así, la síntesis de este novedoso ARN requiere la transcripción de la hebra L y la hebra H del gen 16S del ADNmt. Como la transcripción de ambas hebras del ADNmt está regulada por diferentes promotores, los presentes inventores se refieren a este novedoso ARN en la presente invención como el ARN quimérico mitocondrial (SEC ID N°: 1). Además, como la repetición invertida de 815 nucleótidos está unida al ARN 16S "sentido" (transcrito de la hebra H), los presentes inventores se refieren a este novedoso ARN como el 35 "ARN quimérico mitocondrial sentido".

Ensayos de hibridación *in situ* revelaron que el ARN quimérico mitocondrial sentido se expresa en células proliferantes normales, en células tumorales en cultivo, además de en células tumorales presentes en biopsia humana de diferentes tipos de tumor. El ARN quimérico mitocondrial sentido no se expresa en células en reposo 40 normales. En ARN quimérico mitocondrial sentido en células transformadas con el virus del papiloma 16 ó 18 (Heusen, Biochim. Biophys. Acta, 1288:F55-F78, 1996), se expresa un nuevo ARN quimérico mitocondrial sentido que comprende una repetición invertida de 754 nucleótidos unidos covalentemente al extremo 5' del ARN mitocondrial 16S (SEC ID N°: 2). Este ARN no está presente en células proliferantes normales o en células tumorales. Los métodos y composiciones también demostraron que un tercer ARN quimérico mitocondrial sentido, 45 que comprende una repetición invertida de 694 nucleótidos unidos covalentemente al extremo 5' del ARN mitocondrial 16S (SEC ID N°: 3), está presente en células transformadas con HTLV-1.

Así, según la presente invención, se proporciona una molécula de ARN quimérico mitocondrial aislada que comprende ARN ribosómico mitocondrial 16S sentido covalentemente ligado en su extremo 5' al extremo 3' de un polinucleótido con una secuencia de repetición invertida, en la que la molécula de ARN quimérica comprende una 50 secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 3.

En otro aspecto, la presente invención proporciona uno o más compuestos o oligonucleótidos de 10 a 50 nucleobases de longitud para su uso en el tratamiento de cáncer o pre-cáncer en el que dicho uno o más 55 compuestos u oligonucleótidos son suficientemente complementarios a una molécula de ARN quimérico mitocondrial que comprende un ARN ribosómico mitocondrial 16S sentido covalentemente ligado en su extremo 5' a un extremo 3' de un polinucleótido con una secuencia de repetición invertida que es capaz de hibridarse con la molécula de ARN quimérico mitocondrial para formar un dúplex estable.

60 Terapia contra el cáncer

Las composiciones se proporcionan para su uso para interferir con los ARN quiméricos mitocondriales sentido. Una realización preferida es interferir con el ARN quimérico mitocondrial antisentido en células tumorales que contienen un bajo número de copias de este transcrito. La interferencia se lleva a cabo con oligonucleótidos o análogos de 65 oligonucleótidos, cuyas secuencias son complementarias a las secuencias del ARN quimérico mitocondrial sentido (SEC ID N° 1 y/o SEC ID N° 2 y/o SEC ID N° 3). El tratamiento de células tumorales de diferentes tipos con uno o

más de estos oligonucleótidos complementarios induce muerte celular o apoptosis. El tratamiento de pre-cáncer o cáncer se lleva a cabo con compuestos u oligonucleótidos de 10 a 50 nucleobases de longitud que son suficientemente complementarios a una molécula de ARN quimérico mitocondrial humano que comprende un ARN ribosómico mitocondrial 16S sentido covalentemente ligado en su extremo 5' al extremo 3' de un polinucleótido con una secuencia de repetición invertida que es capaz de hibridarse con esa molécula de ARN quimérico mitocondrial humano para formar un dúplex estable. Los oligonucleótidos son preferentemente compuestos de 15 a 50 nucleótidos en los que al menos 15 nucleobases son complementarias a SEC ID N° 1 y/o SEC ID N° 2 y/o SEC ID N° 3. Ejemplos de estos oligonucleótidos complementarios se muestran en SEC ID N° 98 a 196. La inducción de la apoptosis es selectiva, ya que el tratamiento de linfocitos humanos (célula en reposo normal) o linfocitos humanos estimulados con fitohemaglutinina (células proliferantes normales) no experimentan apoptosis después del tratamiento con oligonucleótidos complementarios a las secuencias del ARN quimérico mitocondrial antisentido bajo las mismas condiciones. Si las células tumorales se tratan con oligonucleótidos dirigidos o complementarios al ARN quimérico mitocondrial sentido (SEC ID N° 1 y/o SEC ID N° 2 y/o SEC ID N° 3), se obtiene una inducción reducida de la muerte celular o apoptosis.

Breve descripción de los dibujos

FIG. 1A, B y C. Dibujos de líneas que muestran la estructura de ARN quiméricos mitocondriales sentido correspondientes a SEC ID N° 1, SEC ID N° 2 y SEC ID N° 3. Las flechas indican la posición relativa de los cebadores usados para amplificar el ARN por trozos. Las flechas debajo de las líneas son cebadores inversos y las flechas encima de las líneas son cebadores directos. El cebador 1 está posicionado próximo al extremo 5' del ARN mitocondrial 16S. Las líneas negras se corresponden con el ARN mitocondrial 16S sentido, mientras que las líneas de puntos se corresponden con el ARN mitocondrial 16S antisentido.

Fig. 2. Electroforesis en gel de agarosa para mostrar el producto de amplificación obtenido entre el cebador 1 y el cebador 3 indicado en la FIG. 1A. La amplificación se llevó a cabo por RT-PCR usando como molde una célula tumoral (SiHa), queratinocitos humanos transformados con VPH 16 (HFK698) o linfocitos B transformados con HTLV-1. Con ARN de células SiHa solo se obtuvo un único amplicón de 210 pb y se corresponde con un segmento de SEC ID N° 1. En ARN total de los queratinocitos transformados con VPH 16, además del amplicón de 210 pb, se obtuvo un segundo amplicón de 150 pb y se corresponde con un segmento de SEC ID N° 2. Con ARN de células transformadas con HTLV-1, además de los amplicones de 210 pb y 150 pb, se obtuvo un tercer amplicón y se corresponde con un segmento de SEC ID N° 3.

FIG. 3. Dibujos de líneas que muestran la estructura de los ARN quiméricos mitocondriales antisentido correspondientes a SEC ID N° 4, SEC ID N° 5 y SEC ID N° 6. Las flechas representan el cebador usado para la amplificación, y el cebador 1 está posicionado próximo al extremo 5' del ARN mitocondrial 16S antisentido. La estrategia para obtener la secuencia de estos transcritos es similar a la descrita en la Fig. 1.

FIG. 4A y 4B. Ensayos de hibridación *in situ* llevados a cabo con varias líneas celulares tumorales en cultivo. Las células se hibridaron con sondas de oligonucleótidos complementarias al ARN quimérico mitocondrial sentido, y se marcaron con digoxigenina (paneles izquierdos). Además, las células también se hibridaron en paralelo con sondas de oligonucleótidos complementarias al ARN quimérico mitocondrial antisentido marcado con digoxigenina (paneles derechos). Las líneas de células se identifican a la izquierda.

FIG. 5A. Hibridación *in situ* de varias secciones de biopsia humana correspondientes a diferentes tipos de tumor. Las secciones de tumor se hibridaron con sondas de oligonucleótidos complementarias al ARN quimérico mitocondrial sentido, y se marcaron con digoxigenina (paneles izquierdos). Además, se hibridaron secciones paralelas de tumor con sondas de oligonucleótidos complementarias al ARN quimérico mitocondrial antisentido marcado con digoxigenina (paneles derechos).

La Fig. 5B muestra la hibridación *in situ* de diferentes tumores humanos llevados a cabo con sondas de oligonucleótidos complementarias al ARN quimérico mitocondrial sentido marcado con digoxigenina.

La FIG. 6 muestra la hibridación *in situ* de células proliferantes normales. Las muestras se hibridaron con sondas dirigidas al ARN quimérico mitocondrial sentido o antisentido y se marcaron con digoxigenina. Se obtuvo una fuerte señal de hibridación con ambas sondas, una complementaria al ARN quimérico mitocondrial sentido (paneles izquierdos), además de al ARN quimérico mitocondrial antisentido (paneles derechos). Los tejidos o células se identifican a la izquierda.

FIG. 7. Inmunoquímica e hibridación *in situ* para mostrar cambios de expresión en linfocitos humanos estimulados para proliferar con el mitógeno PHA. Después de 48 horas de estimulación con PHA, los linfocitos expresan los antígenos Ki-67 y PCNA (paneles derechos). Estos antígenos no se expresan en los linfocitos de control o en reposo (paneles izquierdos). La hibridación *in situ* se llevó a cabo con sondas de oligonucleótidos dirigidas al ARN quimérico mitocondrial sentido y antisentido y marcado con digoxigenina. Los linfocitos estimulados expresan en exceso el ARN quimérico mitocondrial sentido, además del antisentido (paneles derechos).

Fig. 8. Hibridación *in situ* de células tumorales que muestran la localización del ARN quimérico mitocondrial sentido en el nucléolo. Las células o secciones de tumor se indican a la izquierda.

5 FIG. 9. Microscopía fluorescente para revelar cambios que se producen en células HL-60 tumorales tratadas con sondas de oligonucleótidos dirigidas al ARN quimérico mitocondrial antisentido. A, B, C y D muestran la tinción con un compuesto (VAD-fmok) que se une con alta afinidad a caspasas activadas. Este compuesto se marca con fluoresceína. Las sondas de oligonucleótidos dirigidas al ARN quimérico mitocondrial antisentido inducen la activación de caspasas de manera similar al fármaco estaurosporina (comparar B y C). Las caspasas activadas no son detectadas en células sin tratar de control (A) o en células tratadas con sondas de oligonucleótidos dirigidas al ARN mitocondrial 12S (D), como control. E y F muestran tinción de células HL-60 con DAPI. Las células de control (sin tratar) muestran tinción homogénea del núcleo (E), mientras que las células tratadas con las sondas de oligonucleótidos dirigidas al ARN quimérico mitocondrial antisentido muestran fragmentación masiva del núcleo (F).

15 FIG. 10. El porcentaje de células apoptóticas después de diferentes condiciones de tratamiento de linfocitos en reposo y proliferantes. La apoptosis se midió en linfocitos en reposo o linfocitos estimulados por PHA por tinción con DAPI. Las barras 1 y 2 se corresponden con células sin tratar. Se observó una apoptosis espontánea baja de control (1) o linfocitos estimulados por PHA (2). Se observó un nivel bajo similar de apoptosis en linfocitos en reposo (3) o linfocitos estimulados por PHA (4) tratados con sondas de oligonucleótidos 15 uM dirigidas al ARN quimérico mitocondrial antisentido durante 15 horas, que muestra que la apoptosis no se induce en células normales. Como control, linfocitos en reposo y linfocitos estimulados con PHA se trataron con estaurosporina. Bajo estas condiciones, aproximadamente el 90 % de los linfocitos en reposo (5) o linfocitos estimulados por PHA (6) experimentan apoptosis.

25

Descripción detallada de la invención

La familia del ARN quimérico mitocondrial humano

30 La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que las células humanas expresan una familia de novedosos ARN mitocondriales, denominados los ARN quiméricos mitocondriales humanos.

Uno de estos transcritos contiene una repetición invertida larga de 815 nucleótidos unidos covalentemente al extremo 5' del ARN ribosómico 16S mitocondrial, llamado ARN quimérico mitocondrial sentido. La repetición invertida larga es completamente complementaria al ARN ribosómico 16S de las posiciones 51 a 866, formando un tallo bicatenario largo y un bucle de 50 nucleótidos. Como se muestra en la Fig. 1A, el tallo de 815 pares de bases representa un problema significativo para cualquier transcriptasa inversa para sintetizar el ADNc correspondiente. Por tanto, se usó una nueva estrategia para amplificar este ARN por RT-PCR que se ilustra en la Fig. 1A. Después de obtener la secuencia de cada fragmento solapante, se ensamblaron como contiguos para obtener la secuencia completa del ARN quimérico mitocondrial sentido mostrada en SEC ID N° 1 (Fig. 1A).

40

Otro aspecto de la presente invención es el descubrimiento de otros ARN quiméricos mitocondriales sentido novedosos que se expresan en células transformadas con el virus del papiloma humano oncogénico 16 ó 18. Se infectaron queratinocitos del prepucio humano (HFK) con VPH 16 ó 18 (Heusen, Biochim. Biophys. Acta, 1288:F55-F78, 1996). La infección induce la transformación o inmortalización de los HFK. Sin embargo, estas células no son tumorigénicas, tales como las células SiHa relacionadas (infectadas con VPH 16) o células HeLa (infectadas con VPH 18). Estas células expresan el ARN quimérico mitocondrial sentido (SEC ID N° 1) similar a células SiHa y HeLa. Sin embargo, las células transformadas también expresan otro segundo ARN quimérico mitocondrial sentido que contiene una repetición invertida de 754 nucleótidos unidos al ARN ribosómico 16S (Fig. 1B) (SEC ID N° 2). Este nuevo ARN quimérico mitocondrial sentido se regula por disminución o no se expresa en células humanas normales (HFK) o en células tumorigénicas (células SiHa o HeLa).

50

En otra realización de la presente invención, los presentes inventores determinaron la expresión de un tercer ARN quimérico mitocondrial sentido en células transformadas con HTLV-1 (Kobayashi et al., EMBO J., 3:1339-1343, 1984). Células MT-2 infectadas con HTLV-1 expresan el ARN quimérico mitocondrial sentido (SEC ID N° 1) y el ARN quimérico mitocondrial sentido expresado en células transformadas con VPH 16 ó 18 (SEC ID N° 2). Además de estos transcritos, la célula infectada con HTLV-1 expresa un tercer ARN quimérico mitocondrial sentido que contiene una repetición invertida de 694 nucleótidos unidos al extremo 5' del ARN ribosómico 16S. Este ARN novedoso (Fig. 1C) (SEC ID N° 3) no se expresa en células proliferantes normales, en células tumorales o en HFK transformados con VPH 16 ó 18.

60

Células proliferantes normales tales como queratinocitos del prepucio humano (HFK) como se describen en la sección previa también expresan en exceso el ARN quimérico mitocondrial sentido (Fig. 6) (SEC ID N° 1). Linfocitos humanos estimulados con mitógenos tales como fitohemaglutinina (PHA) entran en la fase del ciclo celular S y empiezan la síntesis de ADN (Yu et al., J. Biol. Chem., 266:7588-7595, 1991). Como células proliferantes, los linfocitos también expresan antígenos relacionados con la proliferación tales como Ki-67 y antígeno nuclear de

65

células proliferantes o PCNA (Bantis et al., *Cytopathology*, 15:25-31, 2004). Los linfocitos estimulados también expresan en exceso el ARN quimérico mitocondrial sentido (SEC ID N° 1). Otras células proliferantes tales como linfocitos en el centro germinal del bazo, espermatogonia, y células embrionarias también expresan en exceso el ARN quimérico mitocondrial sentido (SEC ID N° 1) (Fig. 4). A diferencia, células no proliferantes tales como linfocitos no estimulados, o células de músculo, no expresan el ARN quimérico mitocondrial sentido (Fig. 7).

Como se ha descrito antes, células tumorales y proliferantes normales expresan en exceso el ARN quimérico mitocondrial sentido descrito en SEC ID N° 1. Además, en situaciones específicas de infección con VPH y HTLV-1, se encuentra ARN quimérico adicional (SEC ID N° 2 y SEC ID N° 3). Sin embargo, la presente invención también se basa en el sorprendente descubrimiento de que las células proliferantes normales también expresan en exceso un ARN quimérico mitocondrial antisentido. La expresión del ARN quimérico mitocondrial antisentido se confirmó en linfocitos humanos estimulados con PHA (Fig. 7), en HFK normales y en otras células proliferantes normales (Fig. 6). Otro descubrimiento sorprendente de la presente invención es que, a diferencia de las células proliferantes normales, las células tumorales no expresan el ARN quimérico mitocondrial antisentido ni regulan notablemente por disminución la producción (compárese la Fig. 4 con la Fig. 6 y Fig. 7).

Células HeLa (infectadas con VPH 18) o células SiHa (infectadas con VPH 16) expresan en exceso el ARN quimérico mitocondrial sentido, pero regulan por disminución la expresión de ARN quiméricos mitocondriales antisentido. Por otra parte, HFK como células proliferantes normales, expresan en exceso tanto los ARN quiméricos mitocondriales sentido, además de los antisentido. Después de la transformación de HFK con VPH 16 o VPH 18, las células adquieren el fenotipo del tumor: expresan en exceso el ARN quimérico mitocondrial sentido y regulan por disminución la expresión del ARN quimérico mitocondrial antisentido. La expresión en exceso del ARN quimérico mitocondrial sentido y la regulación por disminución del ARN quimérico mitocondrial antisentido pueden determinarse por hibridación *in situ*, amplificación del ARN por RT-PCR o usando otros métodos para determinar un ARN por formas muy conocidos para el experto en la materia. Estos métodos y composiciones pueden usarse también para determinar el cambio en la expresión de la familia de ARN quimérico en células transformadas con otro virus oncogénico o por compuestos que inducen transformaciones o carcinogénesis (McKinnell et al., "The biological basis of cancer", Cambridge University Press 1998).

30 **Terapia contra el cáncer y pre-cáncer**

Los fármacos quimioterapéuticos pueden inducir una serie de respuestas celulares que afectan la proliferación y supervivencia de células tumorales. La mejor estudiada de estas respuestas celulares es la apoptosis y actualmente es evidente que los fármacos antineoplásicos pueden destruir células tumorales activando rutas apoptóticas comunes. Desafortunadamente, estos fármacos también afectan las células normales que se dividen rápidamente de la médula ósea, células hematopoyéticas e intestinales normales y queratinocitos de la matriz pilosa (McKinnell et al., *The biological Basis of Cancer*, 1998; Komarov et al., *Science*, 285:1733-1737, 1999; Johnstone et al., *Cell*, 108:153-164, 2002).

Por otra parte, muchas células tumorales tienen factores iniciadores apoptóticos mutados, factores reguladores y factores de ejecución de la apoptosis, que explican por qué las células tumorales de diferentes tipos de cáncer se vuelven resistentes a una variedad de fármacos quimioterapéuticos y radiación. Se ha informado de mutaciones de factores de la ruta intrínseca, eventos post-mitocondriales y la ruta extrínseca de la apoptosis (Ramping et al., *Science*, 275:967-969, 1997; Vogelstein et al., *Nature*, 408: 307-310, 2000; Teitz et al., *Nature Med.*, 6:529-535, 2000; Reed, *J. Clin. Oncol.*, 17:2941- 2953, 1999; Johnston et al., *Cell*, 108:153-164, 2002). Por tanto, un paradigma de un tratamiento de terapia para el cáncer es un procedimiento que desencadena selectivamente la apoptosis de células tumorales, que no altera células proliferantes normales y que elude los factores alterados o mutados de las diferentes rutas apoptóticas.

Las composiciones y métodos de la presente invención se basan en el descubrimiento de que las células tumorales y pre-tumorales expresan en exceso el ARN quimérico mitocondrial sentido a niveles similares de las células proliferantes normales. Sin embargo, y a diferencia de las células proliferantes normales, las células tumorales y pre-tumorales regulan por disminución la expresión del ARN quimérico mitocondrial antisentido.

Las estructuras de estos transcritos se muestran en la Fig. 1 y la Fig. 3, y las secuencias correspondientes en SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3, SEC ID N° 4, SEC ID N° 5 y SEC ID N° 6.

A diferencia, y constituyendo otro descubrimiento sorprendente, las células pre-tumorales y tumorales expresan en exceso el ARN quimérico mitocondrial sentido y regulan por disminución la expresión del ARN quimérico mitocondrial antisentido. La supresión o inhibición de la síntesis del ARN quimérico mitocondrial antisentido en las células pre-tumorales y tumorales constituye una novedosa diferencia en el fenotipo entre una célula cancerígena y una célula proliferante normal, que se considera una de las principales realizaciones de la presente invención. Además, las células tumorales en biopsia humana de diferentes tipos de cáncer también presentan el mismo fenotipo de células cancerígenas en cultivo (Fig. 5A y 5B).

Aunque la función del ARN quimérico mitocondrial sentido y el ARN quimérico mitocondrial antisentido no está clara,

5 existe una estrecha correlación entre la expresión de estos ARN y la proliferación celular. Por ejemplo, células proliferantes normales en tejidos como hígado, riñón y bazo, y definidas como tales por la expresión de antígenos tales como Ki-67, PCNA o histona H3 fosforilada, expresan en exceso el ARN quimérico mitocondrial sentido, además del ARN quimérico mitocondrial antisentido. En las células no proliferantes de los mismos tejidos, que no expresan Ki-67 o PCNA, el ARN quimérico mitocondrial sentido y el ARN quimérico mitocondrial antisentido no se expresan. Además, y como se ilustra en la Fig. 7, los linfocitos humanos estimulados con el mitógeno PHA sintetizan ADN y expresan los antígenos proliferantes Ki-67 y PCNA. Los linfocitos estimulados también expresan en exceso el ARN quimérico mitocondrial sentido, además del ARN quimérico mitocondrial antisentido (Fig. 7). A diferencia, los linfocitos en reposo o linfocitos no estimulados no expresan ni el ARN quimérico mitocondrial sentido ni el ARN quimérico mitocondrial antisentido.

15 El hallazgo previo, que es parte fundamental de la presente invención, muestra que mientras que las células proliferantes normales expresan los ARN quiméricos mitocondriales sentido y antisentido, células tumorales expresan el ARN quimérico mitocondrial sentido y regulan por disminución la expresión del ARN quimérico mitocondrial antisentido. Para entender la función de estos ARN en la proliferación celular, células cancerígenas en cultivo se trataron con oligonucleótidos antisentido dirigidos a los ARN quiméricos mitocondriales sentido (SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3) o al ARN quimérico mitocondrial antisentido (SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6). Los resultados, que constituyen otro descubrimiento sorprendente, mostraron que bajo estas condiciones las células experimentan muerte celular programada o apoptosis. Después del tratamiento con los oligonucleótidos complementarios a los ARN quiméricos mitocondriales sentido o antisentido durante 6 a 15 horas, entre el 75 y el 96 % de las células experimentan apoptosis (Tabla 2). Los cambios observados en las células tratadas fueron condensación de cromatina, fragmentación nuclear, fragmentación de ADN, activación de caspasas y proceso alterado de la membrana celular. Los oligonucleótidos de control con 4 o más desapareamientos u oligonucleótidos desordenados no indujeron apoptosis. Por tanto, las células no se afectaron si se trataron con oligonucleótidos dirigidos al ARN mitocondrial 12S sentido o antisentido o dirigidos al ARNm o el transcrito antisentido de la subunidad ND1 mitocondrial. En general, los oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido fueron mucho más eficaces, a la misma concentración, que los oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial sentido. Esto fue un resultado esperado, ya que las células tumorales expresan en exceso el ARN quimérico mitocondrial sentido y, por tanto, es más difícil de alcanzar una concentración de oligonucleótidos dentro de la célula para interferir con todas las copias de este transcrito. Por otra parte, como las células tumorales regulan por disminución el ARN quimérico mitocondrial antisentido, debe ser más fácil interferir con este ARN, ya que hay un menor número de copias por célula.

35 La inducción de la apoptosis también es selectiva para células tumorales. Linfocitos en reposo humanos o linfocitos humanos estimulados durante 48 horas con PHA no son afectados por el tratamiento con oligonucleótidos complementarios a los ARN quiméricos mitocondriales antisentido o dirigidos al ARN quimérico mitocondrial sentido incluso después de tratamiento durante la noche y con una dosis alta de oligonucleótidos complementarios (15 μ M).

40 La inducción de la apoptosis mediante tratamiento con oligonucleótidos complementarios dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido (SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6) se ha conseguido por, pero no se limita a, célula de leucemia promielocítica HL-60, leucemia linfoblástica aguda MOLT- 4, células de leucemia linfocítica T, Jurkat, una leucemia de linfocitos T, Devernelle o linfoma B, NSO/2 o mieloma, células HeLa, DU145, PC- 3, Caco-2, Hep-2 y HepG2. Dos células, MCF/7 (carcinoma de mama) y melanoma, que pueden considerarse un paradigma de células tumorales resistentes al tratamiento (quimioterapia o radioterapia), experimentan apoptosis a una tasa de más del 80 % cuando se tratan durante 15 horas con oligonucleótidos complementarios dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido (SEC ID N° 4, SEC ID N° 5, SEC ID N° 6). Se obtuvo un efecto apoptótico menor con oligonucleótidos complementarios al ARN quimérico sentido (SEC ID N° 1). Como se ha informado antes, los oligonucleótidos con 4 desapareamientos u oligonucleótidos desordenados no inducen muerte celular.

50 Más adelante se describen métodos y composiciones para tratar cáncer usando los ARN quiméricos sentido como diana terapéutica.

55 Las realizaciones preferidas son métodos y composiciones para tratar cáncer usando oligonucleótidos complementarios a los ARN quiméricos. El resultado de este tratamiento es producir al menos en un sujeto tratado un beneficio saludable, que en el caso del cáncer incluye, pero no se limita a, remisión del cáncer, paliación de los síntomas del cáncer y control de la diseminación metastásica del cáncer. Todos aquellos métodos implican la inducción de la apoptosis en las células tumorales y con menor efecto en células normales. Se han usado oligonucleótidos complementarios que se dirigen a ARN específicos para disminuir o abolir la expresión de una gran variedad de ARNm o la síntesis de las proteínas correspondientes (por ejemplo, Vickers et al., J. Biol. Chem., 278:7108-7118, 2003). Actualmente, aproximadamente 42 oligonucleótidos antisentido con diferentes químicas están siendo actualmente cribados como posibles fármacos (Stephens y Rivers, Burr. Opin. Mol. Therapeut., 5:118-122, 2003) (véanse también como ejemplos las patentes de EE.UU. n° 5.801.154; 6.576.759; 6.720.413; 6.573.050 y 6.673.917).

65 En un aspecto de la presente invención, pueden usarse uno o más oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial. El uso de dos o más oligonucleótidos complementarios es más eficaz y muestra algún grado de

sinergia.

El oligonucleótido de la invención puede ser complementario al ARN quimérico mitocondrial sentido. Los oligonucleótidos complementarios se unirán a los ARN quiméricos mitocondriales sentido e interferirán con sus funciones. No se requiere complementariedad absoluta, aunque se prefiere. Una secuencia de oligonucleótidos "complementaria" a una porción de un ARN, como se cita en el presente documento, significa una secuencia que tiene complementariedad suficiente que es capaz de hibridarse con el ARN, formando un dúplex estable. La capacidad para hibridarse dependerá de tanto el grado de complementariedad como la longitud del oligonucleótido. Generalmente, cuanto más largo sea el ácido nucleico que se hibrida, más desapareamientos de base con un ARN puede contener y todavía formar un dúplex estable. Aquellos expertos en la materia pueden determinar un grado tolerable de desapareamiento por el uso de procedimientos convencionales para determinar el punto de fusión del complejo hibridado.

En general, los oligonucleótidos complementarios para hibridarse con los ARNm para diferentes proteínas se dirigen a la región sin traducir de 5' del ARNm que incluye el complemento del codón de iniciación AUG, o la región sin traducir de 3' para ser más eficaz. Oligonucleótidos complementarios a regiones codificantes de ARNm son inhibidores menos eficaces de la traducción (véanse las referencias previas). Los ARN quiméricos mitocondriales sentido son ARN no codificante y, por tanto, la región diana de los oligonucleótidos puede ser complementaria a cualquier región de estos transcritos. Las regiones más eficaces se localizan alrededor de los segmentos monocatenarios del ARN quimérico mitocondrial antisentido determinados por cribado de las secuencias del ARN quimérico mitocondrial sentido con oligonucleótidos complementarios diseñados cada 30 nucleótidos. Aquellos expertos en la materia entenderán que otras secuencias dentro de las secuencias completas de los transcritos de SEC ID N° 1, SEC ID N° 2 y SEC ID N° 3 son dianas para diseñar oligonucleótidos complementarios alternativos.

Los oligonucleótidos complementarios dirigidos al ARN quimérico mitocondrial sentido que producen la inducción de muerte de células tumorales según la presente invención contendrán generalmente esqueletos diferentes a los enlaces fosfodiéster naturales. Los oligonucleótidos pueden tener enlaces internucleosídicos alternativos, que comprenden, pero no se limitan a, fosforotioato (Mag et al., *Nucleic Acids Res.*, 19:1437-1441, 1991; y la patente de EE.UU. n° 5.644.048), ácido nucleico peptídico o PNA (Egholm, *Nature*, 365:566-568, 1993; y la patente de EE.UU. n° 6.656.687), fosforamida (Beaucage, *Methods Mol. Biol.*, 20:33-61, 1993), fosforoditioato (Capaldi et al., *Nucleic Acid Res.*, 28:E40, 2000). Otros análogos de oligonucleótidos incluyen, pero no se limitan a, morfolino (Summerton, *Biochim. Biophys. Acta*, 1489:141-158, 1999), oligonucleótidos bloqueados (Wahlestedt et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., US*, 97:5633-5638, 2000), ácidos nucleicos peptídicos o PNA (Nielsen et al., 1993; Hyrup y Nielsen, 1996) u oligonucleótidos del extremo 5' y 3' modificados con 2-o-(2-metoxi)etilo (McKay et al., *J. Biol. Chem.*, 274:1715-1722, 1999). Los ácidos nucleicos pueden contener cualquier combinación de desoxirribos- y ribonucleótidos, y cualquier combinación de bases, que incluyen uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina, hipoxantina, isocitosina, isoguanina, etc. Los oligonucleótidos complementarios según la invención pueden comprender al menos un resto de base modificada que está seleccionado del grupo que incluye, pero no se limita a, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)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 (v), wybutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo, (acp3)w y 2,6-diaminoporina.

Los oligonucleótidos complementarios también pueden comprender al menos un resto de azúcar modificado seleccionado del grupo que incluye, pero no se limita a, arabinosa, 2-fluoroarabinosa, xilulosa y hexosa.

En otra realización de la presente invención, los oligonucleótidos complementarios se diseñan para hibridarse con cualquier región del ARN quimérico mitocondrial sentido. Los oligonucleótidos complementarios deben tener al menos diez nucleótidos de longitud, y son preferentemente oligonucleótidos complementarios que oscilan de 10 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. En aspectos específicos, el oligonucleótido complementario tiene al menos 12 nucleótidos, al menos 18 nucleótidos, al menos 22 nucleótidos, al menos 30 nucleótidos, al menos 50 nucleótidos.

Es importante considerar, para experimentos *in vitro*, además de para *in vivo*, utilizar controles que distinguen entre interferencia antisentido con la función del ARN quimérico mitocondrial sentido con efectos biológicos no específicos de oligonucleótidos antisentido o complementarios. Por tanto, el diseño de los oligonucleótidos tiene que evitar la presencia en la secuencia de rastros de CpG, rastros de 5' GGGG y otras secuencias que tienen efecto tóxico en células de animales como se informa en la patente de EE.UU. n° 6.673.917. También se evitó la presencia de la secuencia 5' CGTTA para el efecto no antisentido que se informó (Tidd et al., *Nucleic Acids Res.*, 28:2242-2250, 2000).

En otra realización de la presente invención, los oligonucleótidos complementarios dirigidos a los ARN quiméricos mitocondriales sentido usados como agentes terapéuticos para animales o para pacientes que tienen cáncer pueden

inducir sensibilidad a fármacos terapéuticos antineoplásicos y radiación. La sensibilidad inducida, también conocida como sensibilización o hipersensibilidad, puede medirse en células tumorales que muestran tolerancia a terapéutico antineoplásico o radiación. Los fármacos antineoplásicos comprenden aquellos ya conocidos en la técnica y en uso o fármacos todavía no descubiertos. Entre los fármacos quimioterapéuticos convencionales están los agentes alquilantes, antimetabolito, antibióticos y agentes antimicrotúbulos. Algunos ejemplos de estos fármacos son cisplatino, metotrexato, doxorubicina, dactinomicina, mitomicina, ciclofosfamida, etc.

En otro aspecto de la invención, junto con o después del tratamiento de un animal o un paciente que tiene cáncer con oligonucleótidos complementarios dirigidos al ARN quimérico mitocondrial sentido, el paciente puede tratarse con radioterapia, en el que dicha radioterapia incluye radiación ultravioleta, radiación gamma, partículas alfa, partículas beta, rayos X y haces de electrones.

En otro aspecto de la presente invención, la interferencia con la función del ARN quimérico mitocondrial sentido para inducir muerte de células tumorales puede lograrse por interferencia por ARN o silenciamiento por ARN. Durante los últimos seis años, la interferencia por ARN (iARN) ha emergido como un enfoque novedoso y prometedor para el silenciamiento de genes en células de mamífero (Elbashir et al., *Nature*, 411:494- 498, 2001; McManus et al., *Nature Rev. Genet.*, 3:737-747, 2002). Las moléculas de ARN bicatenario sintéticamente sintetizadas de aproximadamente 19 a 21 nucleótidos de longitud se hibridan específicamente con su ARNm diana complementario, conduciendo a la degradación del ARNm y posterior inactivación de proteínas. Se han silenciado satisfactoriamente varios genes diferentes por ARN interferente pequeño o ARNip (Lu et al., *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 5:225-234, 2003.; Wacheck et al., *Oligonucleotides*, 13:393-400, 2003). Por tanto, el ARN bicatenario sintético de aproximadamente 19 a 21 nucleótidos dirigido al ARN quimérico mitocondrial antisentido o al ARN quimérico mitocondrial sentido puede usarse para degradar estos transcritos e inducir la muerte de células tumorales. Aquellos familiarizados con la materia entenderán que la secuencia del ARNip tiene que ser complementaria a cualquier región de los ARN quiméricos mitocondriales antisentido o a los ARN quiméricos mitocondriales sentido (SEC ID N° 1, SEC ID N° 2 y SEC ID N° 3).

En otra realización de la invención, pueden usarse ribozimas para interferir con el ARN quimérico mitocondrial sentido para inducir la muerte de células tumorales. La secuencia de la ribozima tiene que diseñarse según la secuencia del ARN quimérico mitocondrial sentido (SEC ID N° 1, SEC ID N° 2, SEC ID N° 3) para escindir regiones específicas del transcrito que son más eficaces en desencadenar la muerte de células tumorales. Las ribozimas son moléculas de ARN enzimáticas que pueden catalizar la escisión de ARN específica (Ross), *Curr. Biology*, 4:469-471, 1994). El mecanismo de la acción de ribozimas implica la hibridación específica de secuencia de la molécula de ribozima con ARN diana complementario, seguido de una escisión endonucleolítica. La composición de moléculas de ribozima debe incluir una o más secuencias complementarias al ARNm del gen diana, y debe incluir la secuencia catalítica muy conocida responsable de la escisión del ARNm, y descrita en la patente de EE.UU. n° 5.093.246. Como tal, dentro del alcance de la invención se manipulan moléculas de ribozima de cabeza de martillo que catalizan específicamente y eficazmente la escisión endonucleolítica de los ARN quiméricos mitocondriales antisentido o los ARN quiméricos mitocondriales sentido. La construcción y producción de ribozimas de cabeza de martillo es muy conocida en la técnica y se describió (Haseloff et al., *Gene*, 82:43-52, 1989). Las ribozimas de la presente invención también incluyen endorribonucleasas de ARN (Zaug et al., *Science*, 224:574-578, 1984).

Terapia génica se refiere al tratamiento o prevención del cáncer realizado por la administración de un ácido nucleico a un paciente que tiene cáncer o en el cual se desea la prevención o inhibición del cáncer. En esta realización de la presente invención, el ácido nucleico terapéutico producido intracelularmente es un ARN complementario dirigido al ARN quimérico mitocondrial sentido que media en el efecto terapéutico interfiriendo o inhibiendo la función de estos transcritos mitocondriales, que inducen la muerte de células tumorales. Por tanto, un enfoque preferido es utilizar una construcción de ADN recombinante en la que la transcripción del ARN antisentido se pone bajo el control de promotores fuertes de la ARN polimerasa II o III. La expresión de la secuencia que codifica el ARN complementario puede ser por cualquier promotor conocido en la técnica para actuar en células de mamífero, preferentemente humanas. Tales promotores incluyen, pero no se limitan a, región del promotor temprano del SV40 (Benoist y Chambon, *Nature*, 290:304-310, 1981), el promotor de la timidina cinasa del herpes (Wagner et al., *Pro. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78:1441- 1445, 1981), las secuencias reguladoras del gen metalotioneína (Brinster et al., *Nature*, 296:39-42, 1982), un promotor del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto et al., *Cell*, 22:787-797, 1980), etc. La construcción de ADN recombinante para producir el ARN complementario puede ser un vector viral que incluye, pero no se limita a, vector de adenovirus, vector de virus adeno-asociado, vector del virus del herpes simple, vector del virus de la variolovacuna y vectores de retrovirus. El vector se introduce en las células tumorales diana, en una composición farmacéutica, usando métodos conocidos para aquellos expertos en la materia.

Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden una cantidad eficaz de un ácido nucleico complementario (oligonucleótidos complementarios, ARNip, ribozimas o vectores virales) en un vehículo farmacéuticamente aceptable, que pueden administrarse a un paciente que tiene cáncer para interferir con la función del ARN quimérico mitocondrial sentido e inducir la apoptosis de las células tumorales. Los ácidos nucleicos complementarios pueden formularse en una composición farmacéutica, que puede incluir vehículos, diluyentes, tampones, conservantes, agentes tensioactivos, polietilimida (PEI), liposomas u otra formulación de lípidos conocida en la técnica. La composición farmacéutica puede administrarse por administración 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 presente invención pueden utilizarse para terapéuticos, profilaxis y como reactivos de investigación y kits.

5 Las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento se consideran particularmente útiles para el tratamiento del cáncer. El término cáncer, como se usa en el presente documento, incluye células afectadas por una cualquiera de las siguientes afecciones anómalas identificadas. Éstas incluyen leucemia mieloide aguda o crónica, leucemia linfoblástica aguda o crónica, mieloma múltiple, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin o linfoma maligno; carcinoma del estómago, carcinoma de esófago o adenocarcinoma, adenocarcinoma ductal del páncreas, insulinoma, glucagonoma, gastrinoma, adenocarcinoma del intestino delgado, carcinomas colorrectales; carcinoma hepatocelular, adenoma hepatocelular; carcinoides, adenocarcinoma de las vías genitourinarias tal como de riñón, tumor de Wilm, carcinoma de vejiga y uretra y adenocarcinoma de próstata, cáncer de testículos como seminoma, teratoma, teratocarcinoma, carcinoma de células intersticiales; carcinoma endometrial del útero, carcinoma cervical, carcinoma de ovario, carcinoma de vulva y vagina, tumores de células de Sertoli-Leydig, melanoma y carcinoma de las trompas de Falopio; carcinomas de pulmón, alveolar y bronquiolar; tumores cerebrales; melanoma maligno de la piel, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y sarcoma de Kaposi. También fibrosarcoma, angiosarcoma y rhabdomyosarcoma del corazón y otros tumores malignos conocidos para aquellos expertos en la materia. Así, el término "célula cancerígena", como se proporciona en el presente documento, incluye una célula afectada por una cualquiera de las afecciones anteriormente identificadas.

20 Los siguientes ejemplos sirven para describir el modo de uso de la invención anteriormente descrita, además de exponer la mejor forma para llevar a cabo diversos aspectos de la invención. Se entiende que de ninguna forma estos ejemplos pretenden limitar el alcance de la presente invención, sino que se presentan para fines ilustrativos.

25 EJEMPLO 1

Aislamiento y secuencia del ARN quimérico humano mitocondrial sentido (Fig. 1A, SEC ID N° 1)

30 Experimentos iniciales indicaron que el ARN quimérico mitocondrial sentido humano putativo contuvo una estructura secundaria más compleja y estable que el ARN quimérico de ratón (Villegas et al., DNA & Cell Biol., 19:579-588, 2000; Villegas et al., Nucleic Acids Res., 30:1895-1901, 2002). Por tanto, y basándose en la estructura secundaria del ARN quimérico mitocondrial de ratón, se dedujo una estructura secundaria teórica del ARN quimérico mitocondrial sentido humana (Fig. 1A). El transcrito humano teórico contuvo la secuencia completa del ARN mitocondrial 16S sentido unido por el extremo 5' a un fragmento del ARN mitocondrial 16S antisentido que formaba un bucle de longitud desconocida (Fig. 1A). El segmento del ARN mitocondrial 16S antisentido fue completamente complementario al ARN mitocondrial 16S sentido y, por tanto, se correspondió con una repetición invertida unida al extremo 5' del transcrito 16S sentido. Basándose en esta estructura, los cebadores se diseñaron para amplificar este transcrito putativo por RT-PCR. Un cebador inverso estuvo en la posición 11 a 31 del extremo 5' del ARN mitocondrial 16S sentido humano o al principio del bucle teórico (cebador 1, Fig. 1A) (SEC ID N° 139). La secuencia del cebador directo usada fue aquella de las posiciones 213-234 del ARN mitocondrial 16S sentido, y se corresponde con el cebador 3 en la Fig. 1A. La amplificación de ARN de varios tejidos humanos y células que incluyen HeLa, HL-60, Du145, MCF/7 y linfocitos humanos estimulados con PHA (véase el Ejemplo 7) por RT-PCR usando los cebadores 1 y 3 (Fig. 1A) dio un único amplicón de aproximadamente 210 pb (Figura 2). Se llevó a cabo RT-PCR como se ha descrito antes (Villegas et al., DNA & Cell Biol., 19:579-588, 2000; Villegas et al., Nucleic Acids Res., 30:1895-1901, 2002). Se clonaron los amplicones de cada tejido humano o células y se secuenciaron ambas hebras. En todos los casos, se obtuvo una secuencia idéntica de 216 pb, que contenía una repetición invertida de 184 nucleótidos unidos a los 31 primeros nucleótidos del extremo 5' del ARN mitocondrial 16S sentido. Entonces, los presentes inventores determinaron si la repetición invertida era más larga de 184 nucleótidos y se extendió adicionalmente hacia el extremo 5' del ARN mitocondrial 16S antisentido (Fig. 1A). El ADNc de HeLa u otras células descritas antes se amplificó entre el cebador inverso 1 posicionado en el bucle como se ha descrito antes, y los cebadores 4 a 7 que caminan hacia el extremo 5' de la repetición invertida más larga putativa (Fig. 1A). Usando este enfoque, se obtuvieron fragmentos de amplificación de aproximadamente 500, 700 y 800 pb cuando el cebador 1 se usó en combinación con los cebadores 4, 5 y 6, respectivamente. Por otra parte, cuando el ADNc se amplificó entre el cebador 1 y el cebador 7 no se obtuvo producto de amplificación, sugiriendo que el extremo 5' de la repetición invertida estaba entre los cebadores 7 y 8 (véase más adelante). La secuencia completa del amplicón de 800 pb revela una repetición invertida de 769 nucleótidos unidos a los 31 primeros nucleótidos del ARN mitocondrial 16S sentido (SEC ID N° 1) (Fig. 1A). La secuencia en el extremo 3' de la repetición invertida unida al ARN mitocondrial 16S sentido fue idéntica a la encontrada en la misma región del amplicón de 216 pb. Esto es importante debido a que indica que en ambos casos los presentes inventores estuvieron amplificando el mismo ARN. Además, la secuencia mostró que 50 nucleótidos del extremo 3' del ARN mitocondrial 16S antisentido faltaban en la repetición invertida del ARN quimérico mitocondrial sentido. En general, estos resultados sugieren que la estructura bicatenaria formada entre la repetición invertida y el ARN mitocondrial 16S sentido empieza en la posición 51 de la última, y forma un bucle putativo de nucleótidos.

65 Para confirmar el tamaño del bucle, se amplificó ADNc humano por PCR entre el cebador directo 2 posicionado en el extremo 3' de la repetición invertida y el cebador 3, que también está invertido en las posiciones 213-234 del ARN

mitocondrial 16S sentido (Fig.1A). Se obtuvo un amplicón de aproximadamente 240 pb y la secuencia mostró que los 234 primeros nucleótidos del ARN mitocondrial 16S sentido estaba unidos a los últimos 25 nucleótidos del extremo 3' de la repetición invertida. La secuencia de los 25 nucleótidos de la repetición invertida fue completamente complementaria al ARN mitocondrial 16S sentido de las posiciones 51 a 75 (Fig. 1A).

Si la secuencia del amplicón obtenida con los cebadores 1 y 6 y la secuencia del amplicón obtenida con los cebadores 2 y 3 se ensamblan como cóntigos, la estructura emergente del ARN quimérico mitocondrial sentido humano confirmó un bucle de 50 nucleótidos y una estructura bicatenaria de al menos 769 pb (Fig. 1A) (véase también SEC ID N° 1).

Como el ARN bicatenario no es digerido por RNasa A, el tallo del ARN quimérico mitocondrial sentido humano debe ser resistente a esta enzima. Por otra parte, el bucle o la región de 3' de la hebra del ARN mitocondrial 16S sentido que se extendió más allá de la estructura bicatenaria debería digerirse por la enzima. ARN de HeLa u otras células se digirió con RNasa A (50 ug por ml), seguido de extracción con fenol, y el material resistente a la nucleasa se recuperó por precipitación con etanol. Entonces, el ADNc del ARN digerido se amplificó por PCR usando los cebadores mostrados en la Fig. 1A. El amplicón de aproximadamente 800 pb obtenido con los cebadores 1 y 6 no se amplificó después de la digestión con RNasa A, que indica que el bucle se digirió por la enzima. Lo mismo fue cierto con el amplicón de 360 pb obtenido con los cebadores 10 y 11 como se indica en la Fig. 1A. En general, estos resultados indicaron que el bucle, además de la región 3' del ARN quimérico mitocondrial sentido que se extiende más allá del tallo, se digirieron por la enzima. Por otra parte, la amplificación del amplicón de 750 pb, correspondiente a la estructura bicatenaria del ARN quimérico mitocondrial sentido y obtenida con los cebadores 8 y 6, no se afectó por la digestión con RNasa A. La secuencia del fragmento bicatenario resistente a la digestión con ribonucleasa fue idéntica a la secuencia esperada del tallo. Se obtuvieron los mismos resultados después de la digestión de ARN total de células HL-60 u otras células humanas.

Para determinar el extremo 5' de la repetición invertida del ARN quimérico mitocondrial sentido, el tallo del transcrito obtenido después de la digestión con RNasa A se usó durante el análisis 5' RACE. La determinación del extremo 5' de la repetición invertida se llevó a cabo según las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Los resultados indicaron que la repetición invertida se extiende 46 nucleótidos adicionales desde el extremo 5' del amplicón obtenido después de la amplificación del ARN quimérico mitocondrial sentido con los cebadores 1 y 6. En resumen, la repetición invertida de 815 nucleótidos se une al extremo 5' de los 865 primeros nucleótidos del ARN mitocondrial 16S. La secuencia de este transcrito mostró el 99,8 % de identidad con el gen mitocondrial 16S humano (hebra H y L) (SEC ID N° 1). Los extremos 5' de ambos extremos del tallo bicatenario se confirmaron por 5' RACE.

Los resultados anteriores indicaron que el ARN quimérico mitocondrial sentido contuvo un tallo o estructura bicatenaria de 815 pares de bases y un bucle de 50 nucleótidos. Sin embargo, estos resultados no demuestran que la repetición invertida esté unida al ARN mitocondrial sentido 16S completo. El uso de enfoques convencionales tales como la síntesis del ADNc completo a partir del extremo 3' es inútil, ya que la estructura bicatenaria del transcrito representa un problema insuperable para las transcriptasas inversas, que incluyen Tth (Myers y Gelfand, *Biochemistry*, 30:7661- 7666, 1991). Si la repetición invertida de 815 nucleótidos está unida a los 1559 nucleótidos del ARN mitocondrial 16S cabría esperar un transcrito de 2,3 Kb. Se llevó a cabo análisis de transferencia Northern de ARN total de células HeLa, HL-60 y MCF/7 con una sonda marcada con ³²P y dirigida a la estructura bicatenaria del ARN quimérico mitocondrial sentido. Los resultados revelaron una banda de aproximadamente 2,4 Kb, además de una banda de 1,6 Kb, correspondientes al ARN quimérico mitocondrial sentido y el ARN mitocondrial 16S sentido, respectivamente. Si el ARN se digirió con RNasa A antes de la transferencia Northern, se obtuvo una única banda de hibridación de aproximadamente 0,8 Kb, que se corresponde con el tamaño del tallo del ARN quimérico mitocondrial sentido. En general, estos resultados demostraron fuertemente que el ARN quimérico mitocondrial sentido contuvo una repetición invertida de 815 nucleótidos unidos al extremo 5' del ARN mitocondrial 16S sentido completo, y correspondiente a SEC ID N° 1.

Es posible detectar específicamente la región de empalme entre la repetición invertida y el ARN mitocondrial 16S sentido, usando una sonda de oligonucleótidos. La sonda tiene que incluir 7 a 10 nucleótidos en cada lado del punto de unión entre el extremo 3' de la repetición invertida y el inicio del ARN mitocondrial 16S sentido. Este oligonucleótido puede usarse para la hibridación *in situ* o amplificación por RT-PCR o cualquier otro método conocido para aquellos expertos en la materia para detectar este novedoso ARN.

El ARN quimérico mitocondrial sentido está presente en células proliferantes normales (queratinocitos del prepucio humano, bazo, linfocitos estimulados con PHA, embriones de ratón), en células pre-cancerígenas (queratinocitos transformados con VPH 16 ó 18, células MT-2 transformadas con HTLV-1) y en células tumorales. No está presente en células en reposo normales. Un resumen de estos resultados se presenta en la Tabla 1 (en el Ejemplo 4).

EJEMPLO 2.**Queratinocitos humanos transformados con el virus del papiloma sintetizan un novedoso ARN quimérico mitocondrial sentido (Fig. 1B, SEC ID N° 2).**

5 Se transformaron queratinocitos del prepucio humano (HFK) por incubación con un lisado de células previamente infectadas con el virus del papiloma humano 16 (VPH 16). Las células se cultivaron con 3 partes de K-SFM, una parte de medio DMEM (Invitrogen), 5 ng/ml de EGF, 50 ug/ml de extracto de pituitaria y 10 % de suero bovino fetal. Las condiciones de cultivo fueron 37 °C y 5 % de CO₂. Después de 24 horas de infección, los HFK transformados se transfirieron a un nuevo matraz y se cultivaron bajo las mismas condiciones. Después de este tiempo, las células (HFK698) se transfirieron sucesivamente a nuevos matraces de cultivo cada 3 días usando una relación de fraccionamiento de 1:3 a 1:4. Después del pase 19 las células (HFK698 transformadas con VPH 16) se recogieron como se ha descrito (Heusen, Biochim. Biophys. Acta, 1288:F55-F78, 1996), se recogieron por centrifugación a 300x g durante 10 min y se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Se extrajo ARN total de las células lavadas con Trizol (Invitrogen). Se usaron aproximadamente 200 nanogramos de ARN para sintetizar el ADNc con hexámeros aleatorios como se ha descrito en el Ejemplo 1. El ADNc se amplificó por PCR usando el cebador inverso 1 y el cebador directo 3 como se describe en la Fig. 1A. Este protocolo de amplificación dio el amplicón esperado de 210 pb en el que los 31 primeros nucleótidos del ARN mitocondrial 16S sentido se unen a la repetición invertida de 184 nucleótidos como se ha descrito antes en el Ejemplo 1. El análisis de electroforesis de los productos de amplificación reveló la presencia del amplicón de 210 pares de bases correspondientes al ARN quimérico mitocondrial sentido, más otro fragmento de amplificación de aproximadamente 150 pares de bases como se muestra en la Fig. 2. La secuencia completa de este nuevo fragmento (SEC ID N° 2) mostró que los 31 nucleótidos iniciales del extremo 5' del ARN mitocondrial 16S sentido se unen a una repetición invertida de 121 nucleótidos, que es más corta por 63 nucleótidos si se compara con la repetición invertida del ARN quimérico mitocondrial sentido de SEC ID N° 1. Esta repetición invertida más corta genera un bucle más largo de 96 nucleótidos (Fig. 1B) en la estructura del ARN quimérico mitocondrial. El resto de la secuencia es idéntico a SEC ID N° 1. Este novedoso ARN quimérico mitocondrial sentido no está presente en células SiHa (Fig. 4A), que son células tumorigénicas transformadas con VPH 16, ni en células proliferantes normales humanas como linfocitos humanos estimulados con PHA (véase Ejemplo). Se obtuvieron resultados similares con HFK transformados con VPH 18 o células 18Nco. Las células transformadas o inmortalizadas (pero no tumorigénicas) con VPH 16 o VPH 18 se consideran células pre-malignas y, por tanto, el ARN quimérico mitocondrial sentido novedoso es un nuevo posible marcador para células pre-malignas.

35 Como la secuencia del extremo 3' de la repetición invertida de SEC ID N° 2 unida al ARN mitocondrial 16S es diferente de la misma región de SEC ID N° 1, puede usarse una sonda de oligonucleótidos para la detección específica de este transcrito. La sonda tiene que incluir 7 a 10 nucleótidos en cada lado del punto de unión entre el extremo 3' de la repetición invertida y el inicio del ARN mitocondrial 16S sentido, tal como el oligonucleótido de SEC ID N° 7. Este oligonucleótido puede usarse para la hibridación *in situ* o amplificación por RT-PCR o cualquier otro método conocido para aquellos expertos en la materia para detectar este marcador novedoso y específico de células pre-cancerígenas.

EJEMPLO 3:**Células transformadas con HTLV-1 inducen la expresión de un tercer ARN quimérico mitocondrial sentido novedoso (Fig. 1C, SEC ID N° 3).**

45 Se cultivaron células MT-2 humanas transformadas con HTLV-1 como se ha descrito (Kobayashi et al., EMBO J., 3:1339-1343, 1984). Las células se recogieron, se centrifugaron a 300 x g durante 10 min y se lavaron dos veces con PBS. El sedimento final de células se extrajo con Trizol como se ha descrito en el Ejemplo 1. El ADNc se sintetizó con hexámeros aleatorios usando ARN como molde y el ADNc se amplificó por PCR usando el cebador inverso 1 y el cebador directo 3 como se describe en la Fig. 1A. Como se ha descrito antes, este protocolo de amplificación da un amplicón de 210 pares de bases que contiene los 31 primeros nucleótidos del ARN mitocondrial 16S sentido unidos a una repetición invertida de 184 nucleótidos que se corresponde con el ARN quimérico mitocondrial sentido como se describe en el Ejemplo 1. El análisis de electroforesis de los productos de amplificación reveló, además de la presencia del amplicón ya tratado de 210 pares de bases, una banda de aproximadamente 150 pares de bases (véase Fig. 2). La secuencia del amplicón de 150 pares de bases es idéntica a la secuencia del amplicón descrita en el Ejemplo 2, correspondiente a un segundo ARN quimérico mitocondrial sentido expresado en células transformadas con VPH 16 o VPH 18 (SEC ID N° 2). Además, se encontró un nuevo producto de amplificación de aproximadamente 100 pb (Fig. 2). La secuencia de este tercer amplicón reveló una repetición invertida de 61 nucleótidos unida al extremo 5' del ARN mitocondrial 16S sentido y generó un bucle de 167 nucleótidos (Fig. 1C; SEC ID N° 3). Este novedoso amplicón no estuvo presente en células normales, en células tumorales y en células transformadas con VPH 16 ó 18. Por tanto, este nuevo ARN quimérico mitocondrial sentido es un posible marcador de células transformadas con el retrovirus oncogénico HTLV-1.

65 Como la secuencia del extremo 3' de la repetición invertida de SEC ID N° 3 unida al ARN mitocondrial 16S es diferente de la misma región de SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2, puede usarse una sonda de oligonucleótidos para la

detección específica de este transcrito. La sonda tiene que englobar entre 7 y 10 nucleótidos en cada sitio del punto de unión entre el extremo 3' de la repetición invertida y el inicio del ARN mitocondrial 16S sentido, tal como un oligonucleótido de SEC ID N° 8. Este oligonucleótido puede usarse para la hibridación *in situ* o amplificación por RT-PCR o cualquier otro método conocido para aquellos expertos en la materia para detectar este marcador específico de células transformadas con un virus oncogénico retroviral.

EJEMPLO 4.

Linfocitos humanos normales estimulados con fitohemaglutinina (PHA) expresan en exceso los ARN quiméricos mitocondriales sentido y antisentido.

Se recogieron cinco ml de sangre de donantes sanos con EDTA. La sangre se diluyó con un volumen del 0,9 % de NaCl y la mezcla se aplicó sobre 5 ml de Histopaque-1077 (Sigma) en un tubo de centrifuga. Los tubos se centrifugaron a 800 x g durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se recogieron los leucocitos en la interfase, se diluyeron con 2 volúmenes de 0,9 % de NaCl y se centrifugaron a 250 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células recogidas se suspendieron y se lavaron dos veces con medio RPMI 1640 complementado con glutamina 200 mM, aminoácidos no esenciales 10 mM, penicilina y estreptomycin que carece de suero bovino fetal. El sedimento final se resuspendió en el mismo medio con 10 % de suero bovino fetal y el número de linfocitos humanos por ml se determinó contando bajo el microscopio en una cámara Neubauer.

Se cultivaron linfocitos humanos en placas de microtitulación de 96 pocillos con el medio RPMI 1640 complementado como se ha descrito más 10 % de suero bovino fetal a 37 °C y con 5 % de CO₂. Se cultivaron aproximadamente 30.000 linfocitos por pocillo con o sin 10 ug por ml del mitógeno PHA, que inducen la proliferación celular (Yu et al., J. Biol. Chem., 266:7588-7595, 1991). Después de 48 a 72 horas de tratamiento con PHA, las células interaccionaron activamente en la síntesis de ADN como se demuestra por la incorporación de H3-timidina o BrdU (Yu et al., J. Biol. Chem., 266:7588-7595, 1991). Por tanto, 48 horas después de la estimulación con PHA, los linfocitos expresaron en exceso otros marcadores de proliferación celular tales como el antígeno nuclear de células proliferantes o PCNA y Ki-67 (Bantis et al., Cytopathology, 15:25-31, 2004) (Fig. 7). Los linfocitos en reposo o de control no expresaron estos antígenos (Fig. 7).

Para determinar si los linfocitos estimulados expresaron los ARN quiméricos mitocondriales sentido, las células se sometieron a hibridación *in situ* con sondas de oligonucleótidos marcadas con digoxigenina y dirigidas al ARN quimérico mitocondrial sentido. El protocolo de hibridación *in situ* empleado se describió en el Ejemplo 5. Se obtuvo una señal de hibridación fuerte que indica la expresión en exceso de este transcrito (Fig. 7). La señal de hibridación fue similar en intensidad a la observada sobre células tumorales u otras células proliferantes normales (compárese la Fig. 7 con la Fig. 4A y B. Fig. 5A y B). No se observó señal de hibridación sobre los linfocitos de control incubados sin PHA (Fig. 7).

Si la hibridación *in situ* se llevó a cabo con sondas de oligonucleótidos sentido marcadas con digoxigenina y dirigidas al ARN quimérico mitocondrial antisentido, se obtuvo una señal de hibridación igual de fuerte (Fig. 7). Se llevaron a cabo varios controles para descartar la posibilidad de que la señal de hibridación fuera debida a artefactos. La señal de hibridación desaparece si la hibridación *in situ* se lleva a cabo con la sonda sentido marcada junto con exceso (50 a 100 veces) de la misma sonda sentido, pero sin marcar con digoxigenina. Si antes de la hibridación las muestras se incuban con ribonucleasa A durante la noche, desaparece la señal de hibridación. Por tanto, no se observa señal de hibridación si la hibridación se lleva a cabo con sondas sentido con 4 desapareamientos. A diferencia, la hibridación *in situ* de linfocitos no estimulados no mostró señal de hibridación (Fig. 7). En conclusión, linfocitos humanos normales estimulados para proliferar expresan en exceso ambos, el ARN quimérico mitocondrial sentido y el ARN quimérico mitocondrial antisentido. Estos transcritos no se expresan en células en reposo.

EJEMPLO 5.

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

Las hibridaciones *in situ* informadas en los Ejemplos 5 y 6 indicaron que en varias líneas celulares tumorales, además de en células tumorales de biopsia humana, el ARN quimérico mitocondrial sentido está localizado preferencialmente en el citoplasma. Sin embargo, en algunas biopsias de tumor también se encontró una clara localización de los transcritos en el núcleo (FIG. 4A, B).

Un hallazgo sorprendente fue la localización del ARN quimérico mitocondrial sentido en el nucléolo. La hibridación *in situ* llevada a cabo como se informa en el Ejemplo 5 reveló señal de hibridación positiva en el nucléolo de células HeLa y SiHa (FIG. 8). La señal de hibridación fue más fuerte en el nucléolo de HFK transformados con VPH 16 (FIG. 8). También se ha encontrado localización nucleolar en células tumorales de tumores de mama y rhabdomyosarcoma (FIG. 8).

Estudios de co-localización indicaron que el ARN quimérico mitocondrial sentido localizado en el citoplasma está fuera de las mitocondrias y asociado a endosomas/lisosomas tardíos. Si los estudios de co-localización se llevan a

5 cabo con marcadores de mitocondrias tales como Mitotrack (Molecular Probes), o anticuerpos anti-citocromo c (Promega) o anti-endonucleasa G (Chemicon), la hibridación *in situ* mostró una mala co-localización. Sin embargo, se encontró una perfecta co-localización entre la señal de hibridación con la inmunocitoquímica de marcadores de endosomas/lisosomas tardíos marcadores tales como Lysotrack (Molecular Probes), o anticuerpos anti-Lamp-2 (BD Pharmingen) o anti-catepsina D (Zymed).

10 Se sometieron células HeLa a hibridación *in situ* con sondas de oligonucleótidos marcadas con digoxigenina como se ha descrito en el Ejemplo 5. Después de los procedimientos de post-hibridación y lavado, las células se incubaron con un anticuerpo anti-digoxigenina marcado con rodamina (Roche) y un anticuerpo anti-Lamp-2 marcado con fluoresceína (BD Pharmingen). Después de la incubación a temperatura ambiente durante 3 horas en la oscuridad, los portaobjetos se lavaron, se montaron y se analizaron con un microscopio confocal Zeiss. Se obtuvo una clara co-localización de la señal de hibridación con la localización de Lamp-2. Se obtuvieron resultados de co-localización similares de la señal de hibridación cuando se usaron Lysotrack o anticuerpos anti-catepsina D como marcadores de la fracción lisosómica. Hasta donde saben los presentes inventores, este es el primer informe que muestra que un ARN (especialmente un transcrito mitocondrial) está asociado a los lisosomas de la célula. La determinación de la localización del ARN quimérico mitocondrial sentido en células tumorales puede tener importante valor de pronóstico para pacientes con cáncer. En general, en células proliferantes normales, los ARN quiméricos mitocondriales sentido y antisentido están principalmente localizados en el núcleo.

20 EJEMPLO 6.

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

25 Se cultivaron células HL-60 bajo las condiciones óptimas recomendadas por ATCC. Se cultivaron aproximadamente 30.000 células en placas de microtitulación de 96 pocillos. Se añadieron los oligonucleótidos (2 uM) dirigidos al ARN quimérico mitocondrial sentido o antisentido. Para potenciar la permeabilidad de las células, los oligonucleótidos se añadieron a una mezcla con lipofectamina u oligofectamina (Invitrogen) o con polietilenimida (PEI) (Exgen TM500, Fermentas). Se prefirió PEI debido a que es prácticamente no tóxico para las células. Las células se incubaron con los oligonucleótidos durante 6 horas y el porcentaje de supervivencia celular se determinó por permeabilidad al azul de tripano. Después de 6 horas de incubación con los oligonucleótidos murió un porcentaje importante de las células. Sin embargo, los oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido fueron más eficaces para inducir muerte celular (aproximadamente el 90 % frente al 15 % de muerte celular). Por otra parte, no se indujo apoptosis cuando las células se trataron con oligonucleótidos dirigidos al ARN mitocondrial 12S sentido o antisentido o el ARNm de la subunidad ND1 o con oligonucleótidos desordenados u oligonucleótidos con cuatro desapareamientos, todos los cuales se usaron como controles. Los oligonucleótidos usados en estos estudios contienen enlace fosforotioato en los 5 primeros nucleótidos en el extremo 5' y los cinco últimos nucleótidos en el extremo 3'. En promedio, los 10 nucleótidos centrales contienen enlaces fosfodiéster.

40 Para establecer si el tratamiento de las células con estos oligonucleótidos induce fragmentación de ADN, se incubaron células HL-60 bajo las mismas condiciones descritas antes con oligonucleótidos durante 6 horas. Se cultivaron aproximadamente 30.000 células HL-60 en 200 ul de IDMEM más 10 % de suero bovino fetal en placa de microtitulación de 96 pocillos junto con 1 uM de oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial sentido o dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido. La química de los oligonucleótidos añadidos en mezcla con PEI fue la misma descrita en la sección previa. Después de una incubación de 6 horas con los oligonucleótidos, las células se ensayaron para fragmentación de ADN usando el ensayo TUNEL (DeadEnd Colorimetric TUNEL System, Promega). Como se muestra en la Tabla 2, aproximadamente el 96 % de las células mostró fragmentación de ADN después del tratamiento con el oligonucleótido dirigido al ARN quimérico mitocondrial antisentido. Se obtuvo una tasa similar de fragmentación de ADN con el fármaco estaurosporina. Oligonucleótidos desordenados u oligonucleótidos con desapareamientos no mostraron efecto. A diferencia, solo aproximadamente el 20 % de las células murieron cuando se trataron con oligonucleótido dirigido al ARN quimérico mitocondrial sentido (Tabla 2). Como se muestra previamente, las células tumorales regulan por disminución la expresión del ARN quimérico mitocondrial antisentido y, por consiguiente, estas células llevan un bajo número de copias de este transcrito. Por tanto, la muerte celular se induce más eficazmente con oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido. Estos resultados sugieren fuertemente que el bajo número de copias del ARN quimérico mitocondrial antisentido en células tumorales constituye una diana para terapia.

Tabla 2.

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

Tratamiento	Porcentaje de células apoptóticas ensayadas por TUNEL
Control	3,0 %
Oligonucleótidos complementarios al ARN quimérico antisentido	96,7 %
Oligonucleótidos con desapareamientos	4,0 %

Oligonucleótidos desordenados				3,5 %
Oligonucleótidos complementarios al ARN quimérico sentido				26,7 %
Estaurosporina				98,4 %
Oligonucleótidos complementarios al ARN mitocondrial 12S sentido				3,7 %
Oligonucleótidos complementarios al ARN mitocondrial 12S antisentido				4,1 %

- En otro estudio, los presentes inventores determinaron si el tratamiento de las células con oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido indujeron activación de caspasas. Las caspasas son enzimas proteolíticas, que participan activamente en la muerte celular programada o apoptosis. Se incubaron HL-60 con oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido o con estaurosporina durante 6 horas bajo las condiciones de cultivo descritas antes. Entonces, VAD-fmk (CaspACE FITC-VAD-FMK, Promega) conjugado con fluoresceína se añadió al cultivo y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. VAD-fmk es un fuerte inhibidor de las caspasas y se une a las proteasas con afinidad muy alta (Gracia-Calvo et al., J. Biol. Chem., 273:32608-32613, 1998). Las células se lavaron por centrifugación, se montaron y se observaron con un microscopio de fluorescencia. Como se muestra en la Fig. 9, células HL-60 tratadas con el oligonucleótido dirigido al ARN quimérico mitocondrial antisentido indujeron la activación de caspasas, a un nivel similar a la activación lograda con estaurosporina. No se obtuvo activación de caspasas con oligonucleótidos antisentido dirigidos al ARN mitocondrial 12S usado como control.
- Las células tratadas con oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido también presentan otros cambios que son congruentes con la apoptosis. El análisis de microscopía electrónica mostró fragmentación nuclear y condensación de cromatina. También se demostró fragmentación nuclear por tinción de los núcleos con DAPI. Después del tratamiento con estos oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido, las células experimentan fragmentación nuclear como se reveló por tinción con DAPI (Fig. 9E y 9F).
- También puede determinarse apoptosis por tinción con azul de tripano, tinción con yoduro de propidio, inmunquímica con anexina. En estas técnicas, las células pueden analizarse por microscopía fluorescente o por citometría de flujo. La fragmentación de ADN puede medirse por TUNEL o por electroforesis para revelar la escalera de ADN. También puede usarse análisis de transferencia Western para determinar el procesamiento de proteínas tales como caspasas, poli(ADP-Rib) sintasa, etc.

EJEMPLO 7.

El tratamiento de células proliferantes o en reposo normales con oligonucleótidos complementarios al ARN quimérico mitocondrial antisentido son resistentes a la apoptosis.

Como se ha descrito antes, células proliferantes normales expresan en exceso el ARN quimérico mitocondrial sentido, además del ARN quimérico mitocondrial antisentido. Por otra parte, células en reposo no expresan ninguno de estos transcritos. Por tanto, fue importante determinar si los oligonucleótidos complementarios al ARN quimérico mitocondrial antisentido inducían muerte celular en células normales.

Se estimularon linfocitos humanos con 10 ug por ml de PHA durante 48 horas como se ha descrito en el Ejemplo 8. En paralelo, se incubaron linfocitos de control también durante 48 horas pero sin PHA. A las 48 horas de cultivo, 15 uM de oligonucleótido mezclados con PEI (véase Ejemplo 10) se añadieron a los linfocitos estimulados y de control y se incubaron adicionalmente 15 horas. La concentración del oligonucleótido fue 10 veces superior a la concentración usada en experimentos previos (1-2 uM). Otras muestras de linfocitos estimulados o de control se trataron con estaurosporina 0,4 uM durante el mismo periodo de tiempo. Al final del experimento, se midió la muerte celular por tanto tinción con azul de tripano como tinción con DAPI. Como se muestra en la Fig. 10, linfocitos de control o linfocitos estimulados con PHA incubados durante 15 horas sin oligonucleótido mostraron un nivel similar de apoptosis espontánea que varió entre el 7 y el 10 % en diferentes experimentos. Se obtuvo un resultado similar con una menor concentración (1-2 uM) de oligonucleótido. Por tanto, linfocitos de control y estimulados incubados con oligonucleótido antisentido 15 uM durante 15 horas mostraron un nivel bajo similar de apoptosis (aproximadamente el 10 %) (Fig. 10). A diferencia, los linfocitos de control o linfocitos estimulados con PHA y también incubados con estaurosporina durante 15 horas mostraron que más del 80 % de las células experimentan apoptosis (Fig. 10). Esto es un resultado muy importante debido a que muestra que las células en reposo normales o células proliferantes normales tales como linfocitos humanos son resistentes a la inducción de apoptosis por los oligonucleótidos complementarios al ARN quimérico mitocondrial antisentido. En otras palabras, la inducción de la apoptosis en células tumorales por interferencia con el ARN quimérico mitocondrial antisentido es un enfoque terapéutico selectivo para el cáncer.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Andes Biotechnologies S.A.

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

<130> P68863WO1

5

<140> PCT/US2004/015929

<141> 21-5-2004

<150> US 60/472.106

10

<151> 21-05-2003

<160> 196

<210> 1

15

<211> 2374

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

20

tctaatactg	gtgatgctag	aggatgatggt	tttggtaaac	aggcggggta	agatttgccg	60
agttcccttt	acttttttta	acctttccct	atgagcatgc	ctgtgttggg	ttgacagtga	120
gggtaataat	gacttggttg	ttgattgtag	atattgggct	gttaattgtc	agttcagtg	180
tttaacttga	cgcaggctta	tgccggaggag	aatgttttca	tgttacttat	actaacatta	240
gttcttctat	agggtgatag	attgggtccaa	ttgggtgtga	ggagttcagt	tatatgtttg	300
ggatttttta	ggtagtgggt	gttgagcttg	aacgctttct	taattgggtg	ctgcttttag	360
gcctactatg	ggtgttaaat	tttttactct	ctctacaagg	tttttccta	gtgtccaaag	420
agctgttcct	ctttggacta	acagttaaat	ttacaagggg	atttagaggg	ttctgtgggc	480
aaatttaag	ttgaactaag	attctatctt	ggacaaccag	ctatcaccag	gctcggtagg	540
tttgtcgcct	ctacctataa	atcttcccac	tattttgcta	catagacggg	tgctgtcttt	600
tagctgttct	taggtagctc	gtctggtttc	gggggtctta	gctttggctc	tccttgcaaa	660
gttatttcta	gttaattcat	tatgcagaag	gtataggggt	tagtccttgc	tatattatgc	720
ttggttataa	tttttcatct	ttcccttgcg	gtactatatc	tattgcgcca	ggtttcaatt	780
tctatgcct	atactttatt	tgggtaaatg	gtttggctaa	acctagcccc	aaaccactc	840
caccttacta	ccagacaacc	ttagccaaac	catttaccca	aataaagtat	aggcgataga	900
aattgaaacc	tggcgcaata	gatatagtac	cgcaagggaa	agatgaaaaa	ttataaccaa	960
gcataatata	gcaaggacta	acccctatac	cttctgcata	atgaattaac	tagaaataac	1020
tttgcaagga	gagccaaagc	taagaccccc	gaaaccagac	gagctaccta	agaacagcta	1080
aaagagcaca	cccgtctatg	tagcaaaaata	gtgggaagat	ttataggtag	aggcgacaaa	1140
cctaccgagc	ctggtgatag	ctggttgtcc	aagatagaat	cttagttcaa	ctttaaattt	1200
gcccacagaa	ccctctaaat	ccccttgtaa	atttaactgt	tagtccaaag	aggaacagct	1260
ctttggacac	taggaaaaaa	ccttgtagag	agagtaaaaa	atttaacacc	catagtaggc	1320
ctaaaagcag	ccaccaatta	agaaagcggt	caagctcaac	accactacc	taaaaaatcc	1380
caaacatata	actgaactcc	tcacacccaa	ttggaccaat	ctatcacctc	atagaagaac	1440
taatgttagt	ataagtaaca	tgaaaacatt	ctcctccgca	taagcctgcg	tcagattaaa	1500
acactgaact	gacaattaac	agcccaatat	ctacaatcaa	ccaacaagtc	attattacc	1560
tcactgtcaa	cccaacacag	gcatgctcat	aaggaaaggt	taaaaaaagt	aaaaggaact	1620
cggcaaatct	taccccgctt	gtttaccaaa	aacatcacct	ctagcatcac	cagtattaga	1680
ggcacccgct	gcccagtgac	acatgtttaa	cggccgcggt	accctaaccg	tgcaaaagga	1740
gcataatcac	ttgttcttta	aatagggacc	tgtatgaatg	gctccacgag	ggttcagctg	1800
tctcttactt	tttaaccagtg	aaattgacct	gcccgtgaag	aggcgggcat	aacacagcaa	1860
gacgagaaga	ccctatggag	ctttaattta	ttaatgcaaa	cagtacctaa	caaaccaca	1920
ggtcctaacc	taccaaacct	gcattaaaaa	tttcggttgg	ggcgacctcg	gagcagaacc	1980
caacctccga	gcagtacatg	ctaagacttc	accagtcaaa	gcgaactact	atactcaatt	2040
gatccaataa	cttgaccaac	ggaacaagtt	accctagggg	taacagcgca	atcctattct	2100
agagtccata	tcaacaatag	ggtttacgac	ctcgatgttg	gatcaggaca	tcccgatggg	2160
gcagccgcta	ttaaaggttc	gtttgttcaa	cgattaaagt	cctacgtgat	ctgagttcag	2220
accggagtaa	tccaggtcgg	tttctatcta	ctttcaaat	cctccctgta	cgaaaggaca	2280
agagaaataa	ggcctacttc	acaaagcgcc	ttccccgcta	aatgatatca	tctcaactta	2340
gfattatacc	cacaccacc	caagaacagg	gttt			2374

<210> 2

25

<211> 1679

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

ggggtcttag	ctttggctct	ccttgcaaag	ttatttctag	ttaattcatt	atgcagaagg	60
tataggggtt	agtccttgct	atattatgct	tggttataat	ttttcatcct	tcccttgctg	120
tgctaaacct	agccccaaac	ccactccacc	ttactaccag	acaaccttag	ccaaaccatt	180
tacccaata	aagtataggc	gatagaaatt	gaaacctggc	gcaatagata	tagtaccgca	240
agggaaagat	gaaaaattat	aaccaagcat	aatatagcaa	ggactaacc	ctataccttc	300
tgcataatga	attaactaga	aataactttg	caaggagagc	caaagctaag	acccccgaaa	360
ccagacgagc	tacctaagaa	cagctaaaag	agcacaccgc	tctatgtagc	aaaatagtgg	420
gaagatttat	aggtagaggc	gacaaacct	ccgagcctgg	tgatagctgg	ttgtccaaga	480
tagaatctta	gttcaacttt	aaatthgccc	acagaaccct	ctaaatcccc	ttgtaaattt	540
aactgttagt	ccaaagagga	acagctcttt	ggacactagg	aaaaaacctt	gtagagagag	600
taaaaaattt	aacaccata	gtaggcctaa	aagcagccac	caattaagaa	agcgttcaag	660
ctcaacacc	actacctaaa	aaatcccaaa	catataactg	aactcctcac	acccaattgg	720
accaatctat	caccctatag	aagaactaat	gtagtataaa	gtaacatgaa	aacattctcc	780
tccgcataag	cctgcgtcag	attaaaacac	tgaactgaca	attaacagcc	caatatctac	840
aatcaaccaa	caagtcatta	ttaccctcac	tgteaacc	acacaggcat	gctcataagg	900
aaaggttaaa	aaaagtaaaa	ggaactcggc	aaatcttacc	ccgcctgttt	accaaaaaa	960
tcacctctag	catcaccagt	attagaggca	ccgcctgccc	agtgcacat	gtttaaaggc	1020
cgcggtaccc	taaccgtgca	aaggtagcat	aatcacttgt	tccttaaata	gggacctgta	1080
tgaatggctc	cacgagggtt	cagctgtctc	ttacttttaa	ccagtgaat	tgacctgccc	1140
gtgaagaggc	gggcataaca	cagcaagagc	agaagaccct	atggagcttt	aatttattaa	1200
tgcaaacagt	acctaacaaa	cccacaggtc	ctaaactacc	aaacctgcat	taaaaatttc	1260
ggttggggcg	acctcggagc	agaaccacac	ctccgagcag	tacatgctaa	gacttcacca	1320
gtcaaaagca	actactatac	tcaattgatc	caataacttg	accaacggaa	caagttaccc	1380
tagggataac	agcgcaatcc	tattctagag	tccatatcaa	caatagggtt	tacgacctcg	1440
atgtttgatc	aggacatccc	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

<210> 3
 <211> 1635
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

ggggtcttag	ctttggctct	ccttgcaaag	ttatttctag	ttaattcatt	atgcagaagg	60
tataggggtt	agtccttgct	aaacctagcc	ccaaaccac	tccaccttac	taccagacaa	120
ccttagccaa	accatttacc	caaataaagt	atagggcagata	gaaattgaaa	cctggcgcaa	180
tagatatagt	accgcaaggg	aaagatgaaa	aattataacc	aagcataata	tagcaaggac	240
taaccctat	accttctgca	taatgaatta	actagaata	actttgcaag	gagagccaaa	300
gctaagacc	ccgaaaccag	acgagctacc	taaagacagc	taaaagagca	caccctcta	360
tgtagcaaaa	tagtgggaag	atthtataggt	agaggcgaca	aacctaccga	gcctgggtgat	420
agctggtgt	ccaagataga	atcttagttc	aactttaaat	ttgcccacag	aacctctaa	480
atcccctgt	aaatttaact	gttagtccaa	agaggaacag	ctctttggac	actagggaaa	540
aacctgtag	agagagtaaa	aaatttaaca	cccatagtag	gcctaaaagc	agccaccaat	600
taagaaagcg	ttcaagctca	acaccacta	cctaaaaaat	cccaaacata	taactgaact	660
cctcacacc	aattggacca	atctatcacc	ctatagaaga	actaatgtta	gtataagtaa	720
catgaaaaca	ttctcctccg	cataagcctg	cgtcagatta	aaacactgaa	ctgacaatta	780
acagcccaat	atctacaatc	aaccaacaag	tcattattac	cctcactgtc	aacccaacac	840
aggcatgctc	ataaggaaaag	gttaaaaaaa	gtaaaaggaa	ctcggcaaat	cttaccctgc	900
ctgtttacca	aaaacatcac	ctctagcatc	accagtatta	gaggcaccgc	ctgcccagtg	960
acacatgttt	aacggccgcg	gtaccctaac	cgtgcaaagg	tagcataatc	acttgttctt	1020
taaatagggg	cctgtatgaa	tggctccacg	agggttcagc	tgtctcttac	ttttaaccag	1080
tgaattgac	ctgcccgtga	agaggcgggc	ataacacagc	aagacgagaa	gacctatgg	1140
agctttaat	tattaatgca	aacagtacct	aacaaacca	caggtcctaa	actaccaaac	1200
ctgcattaaa	aatttcggtt	ggggcgacct	cggagcagaa	cccaacctcc	gagcagtaca	1260
tgctaagact	tcaccagtca	aagcgaacta	ctatactcaa	ttgatccaat	aacttgacca	1320
acggaacaag	ttaccctagg	gataacagcg	caatcttatt	ctagagtcca	tatcaacaat	1380
agggtttacg	acctcgatgt	tggatcagga	catcccaatg	gtgcagccgc	tattaaaggt	1440
tcgtttggtc	aacgattaaa	gtcctacgtg	atctgagttc	agaccggagt	aatccaggtc	1500
ggtttctatc	tacttcaaat	tcctccctgt	acgaaaggac	aagagaaata	aggcctactt	1560
cacaaagcgc	cttccccctg	aaatgatatc	atctcaactt	agtattatac	ccacaccac	1620
ccaagaacag	ggttt					1635

<210> 4
 <211> 1921
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10

15

<400> 4

```

aacctccgag cagtacatgc taagacttca ccagtcaaag cgaactacta tactcaattg 60
atccaataac ttgaccaacg gaacaagtta ccctagggat aacagcgcaa tcctattcta 120
gagtccatat caacaatagg gtttacgacc tcgatgttgg atcaggacat cccaatgggtg 180
cagccgctat taaaggttcg tttgttcaac gattaaagtc ctacgtgatc tgagttcaga 240
ccggagtaat ccaggtcggt ttctatctac ttcaaattcc tccctgtacg aaaggacaag 300
agaaataagg cctacttcac aaagcgctt cccccgtaa tgatatcatc tcaacttagt 360
attataccct gttcttgggt ggggtgtgggt ataatactaa gttgagatga tatcatttac 420
gggggaaggc gctttgtgaa gtaggcctta tttctcttgt cctttcgtac agggaggaat 480
ttgaagtaga tagaaaccga cctggattac tccggctcga actcagatca cgtaggactt 540
taatcgttga acaaacgaac cttaaatagc ggtgcacca tcgggatgtc ctgatccaac 600
atcgaggtcg taaaccctat tgttgatatg gactctagaa taggattgcy ctgttatccc 660
tagggtaact tgttccgttg gtcaagttat tggatcaatt gagtatagta gttcgccttg 720
actggtgaag tcttagcatg tactgctcgg aggttgggtt ctgctccgag gtcgccccaa 780
ccgaaatttt taatgcaggt ttggtagttt aggacctgtg ggtttgttag gtactgtttg 840
cattaataaa ttaaagctcc atagggctt ctgctcttgc tgtgttatgc ccgctcttc 900
acgggcaggt caatttctact ggttaaaagt aagagacagc tgaaccctcg tggagccatt 960
catacaggtc cctattttaag gaacaagtga ttatgctacc tttgcacggg taggggtaccg 1020
cggccgttaa acatgtgtca ctgggcaggc ggtgcctcta atactgggtg tgctagaggt 1080
gatgtttttg gtaaacaggc ggggtaagat ttgccgagtt ccttttactt tttttaacct 1140
ttccttatga gcatgcctgt gttgggttga cagtgagggt aataatgact tgttggttga 1200
ttgtagatat tgggctgtta attgtcagtt cagtgtttta atctgacgca ggcttatgcy 1260
gaggagaatg ttttcatggt acttatacta acattagttc ttctataggg tgatagattg 1320
gtccaattgg gtgtgaggag ttcagttata tgtttgggat ttttaggta gtgggtgttg 1380
agcttgaacg ctttcttaat tggtgctgc ttttagcct actatgggtg ttaaattttt 1440
tactctctct acaaggtttt ttcctagtgt ccaaagagct gttcctcttt ggactaacag 1500
ttaaattttac aaggggattt agagggttct gtgggcaaat ttaaagttga actaagattc 1560
tatcttggac aaccagctat caccaggctc ggtaggtttg tcgcctctac ctataaatct 1620
tcccactatt ttgctacata gacgggtgtg ctcttttagc tgttcttagg tagctcgtct 1680
ggtttcgggg gtcttagcct tggctctcct tgcaaagtta tttctagtta attcattatg 1740
cagaaggtat aggggttagt ccttgcata ttatgcttgg ttataatttt tcatctttcc 1800
cttgcggtac tatactatt gcgccagggt tcaatttcta tcgcctatac tttatttggg 1860
taaattggtt ggctaagggt gtctggtagt aaggtggagt gggtttgggg ctaggtttag 1920
c

```

5 <210> 5
 <211> 1744
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 5

ES 2 536 002 T3

tagggataac	agcgcaatcc	tattctagag	tccatatcaa	caatagggtt	tacgacctcg	60
atgttggatc	aggacatccc	gatggtgcag	ccgctattaa	aggttcgttt	gttcaacgat	120
taaagtccta	cgtgatctga	gttcagaccg	gagtaatcca	ggtcggtttc	tatctacctt	180
caaattcctc	cctgttcttg	ggtgggtgtg	ggtataatac	taagttgaga	tgatatcatt	240
tacgggggaa	ggcgctttgt	gaagtaggcc	ttatttctct	tgtcctttcg	tacagggagg	300
aatttgaagt	agatagaaac	cgacctggat	tactccggtc	tgaactcaga	tcacgtagga	360
ctttaatcgt	tgaacaaacg	aacctttaat	agcggctgca	ccatcgggat	gtcctgatcc	420
aacatcgagg	tcgtaaacc	tattgttgat	atggactcta	gaataggatt	gcgctgttat	480
ccctagggtg	actgttccg	ttggtcaagt	tattggatca	attgagtata	gtagtctcgt	540
ttgactggtg	aagtcttagc	atgtactgct	cggaggttgg	gttctgctcc	gaggtcgccc	600
caaccgaaat	ttttaatgca	ggtttggtag	tttaggacct	gtgggtttgt	taggtactgt	660
ttgcattaat	aaattaaagc	tccatagggt	cttctcgtct	tgctgtgta	tgcccgcctc	720
ttcacgggca	ggtcaatttc	actggttaaa	agtaagagac	agctgaaccc	tcgtggagcc	780
atccatacag	gtccctattt	aaggaacaag	tgattatgct	acctttgcac	ggttagggta	840
ccgcggccgt	taaacatgtg	tcactgggca	ggcgggtgcct	ctaatactgg	tgatgctaga	900
ggtgatgttt	ttggtaaaca	ggcggggtaa	gatttgccga	gttcctttta	ctttttttaa	960
cctttcctta	tgagcatgcc	tgtgttgggt	tgacagtgag	ggtaataatg	acttgttgggt	1020
tgattgtaga	tattgggctg	ttaattgtca	gttcagtggt	ttaatctgac	gcaggcttat	1080
gcggaggaga	atgttttcat	gttacttata	ctaacattag	ttcttctata	gggtgataga	1140
ttggtccaat	tgggtgtgag	gagttcagtt	atatgtttgg	gatttttttag	gtagtgggtg	1200

ttgagcttga	acgctttcct	aattggtggc	tgcttttagg	cctactatgg	gtgttaaatt	1260
ttttactctc	tctacaaggt	tttttcttag	tgtccaaaga	gctgttcctc	tttggactaa	1320
cagttaaatt	tacaagggga	tttagagggt	tctgtgggca	aatttaaagt	tgaactaaga	1380
ttctatcttg	gacaaccagc	tatcaccagg	ctcggtaggt	ttgtcgccctc	tacctataaa	1440
tcttcccaact	attttgctac	atagacgggt	gtgctctttt	agctgttctt	aggtagctcg	1500
tctggtttctg	ggggtcttag	ctttggctct	ccttgcaaag	ttatttctag	ttaatcatt	1560
atgcagaagg	tataggggtt	agtccttgct	atattatgct	tggttataat	ttttcatctt	1620
tcccttgccg	tactatatct	attgcgccag	gtttcaattt	ctatcgcccta	tactttatct	1680
gggtaaattgg	tttggctaag	gttgtctggg	agtaagggtg	agtgggtttg	gggctagggt	1740
tagc						1744

- <210> 6
- <211> 1854
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 6

5

```

gaactcggca aatcttaccg cgctgttta ccaaaaacat cacctctagc atcaccagta 60
ttagaggcac cgctgcccc gtgacacatg tttaacggcc gcggtaccct aaccgtgcaa 120
aggtagcata atcacttggt ccttaaatag ggacctgtat gaatggctcc acgaggggtc 180
agctgtctct tacttttaac cagtgaaatt gacctgcccg tgaagaggcg ggcacgacac 240
agcaagacga gaagacccta tggagcttta atttattaat gcaaacagta cctaacaac 300
cctgttcttg ggtgggtgtg ggtataatac taagttgaga tgatatcatt tacgggggaa 360
ggcgctttgt gaagtaggac ttatttctct tgcctttcgc tacagggagg aatttgaagt 420
agatagaaac cgacctggat tactccggtc tgaactcaga tcacgtagga ctttaatcgt 480
tgaacaaacg aacctttaat agcggctgca ccatcgggat gtcctgatcc aacatcgagg 540
tcgtaaaccg tattgttgat atggactcta gaataggatt gcgctgttat ccctagggta 600
acttgttccg ttggccaagt tattggatca attgagtata gtagttcget ttgactgggtg 660
aagtcttagc atgtactgct cggagggttg gttctgctcc gaggtcgcac caaccgaaat 720
ttttaatgca ggtttggtag tttaggacct gtgggtttgt taggtactgt ttgcattaat 780
aaattaaagc tccatagggt cttctcgtct tgcctgttta tgcccgcctc ttcacgggca 840
ggtcaatttc actggttaaa agtaagagac agctgaacc tcgtggagcc attcatacag 900
gtccctatct aaggaacaag tgattatgct accttgcac ggttagggta ccgcccgt 960
taaacatgtg tcaactggca ggcgggtgct ctaatactgg tgatgctaga ggtgatgttt 1020
ttggtaaaca ggcggggtaa gatttggcga gttcctttta ctttttttaa ctttctcta 1080
tgagcatgcc tgtgttgggt tgacagtgag ggtaataatg acttgttggg tgattgtaga 1140
tattgggctg ttaattgtca gttcagtgtt ttaatctgac gcaggcttat gcggaggaga 1200
atgttttcat gttacttata ctaacattag ttcttctata gggatgata ttggccaat 1260
tgggtgtgag gagttcagtt atatgtttgg gatttttttag gtagtgggtg ttgagcttga 1320
acgctttctt aattgggtggc tgcttttagg cctactatgg gtgttaaatt ttttactctc 1380
tctacaaggt ttttcttag tgccaaaga gctgttcttc tttggactaa cagttaaatt 1440
tacaagggga tttagagggt tctgtgggca aatttaaagt tgaactaaga ttctatcttg 1500
gacaaccagc tatcaccagg ctcggtaggt ttgtgcctc tacctataaa tcttcccact 1560
attttgctac atagacgggt gtgctctttt agctgttctt aggtagctcg tctggtttcg 1620
ggggtcttag ctttggctct ccttgcaaag ttatttctag ttaattcatt atgcagaagg 1680
tatagggtgt agtccttgct atattatgct tggttataat ttttcatctt tcccttgcgg 1740
tactatatct attgcgccag gtttcaattt ctatcgctta tactttattt gggtaaattg 1800
tttggtcaag gttgtctggt agtaagggtg agtgggtttg gggctaggtt tagc 1854

```

- 5
 - <210> 7
 - <211> 20
 - <212> ADN
 - <213> Secuencia artificial

- 10
 - <220>
 - <223> Oligonucleótido antisentido

- 15
 - <400> 7
 - taggttagc accgcaaggg 20

- 20
 - <210> 8
 - <211> 20
 - <212> ADN
 - <213> Secuencia artificial

- 25
 - <220>
 - <223> Oligonucleótido antisentido

- 30
 - <400> 8
 - taggttagc aaggactaac 20

- 35
 - <210> 9
 - <211> 18
 - <212> ADN
 - <213> Secuencia artificial

- <220>
 - <223> Oligonucleótido antisentido

- <400> 9
 - gggtaagat ttgccgag 18

- <210> 10
 - <211> 22

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 10
 atgctagagg tgatgtttt gg 22

 10 <210> 11
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 11
 20 cggtgcctct aactactgg 18

 <210> 12
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 12
 30 gttaaacatg tgtcactggg 20

 <210> 13
 <211> 18
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 13
 40 ttgcacggtt aggtacc 18

 <210> 14
 <211> 21
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 14
 50 ggaacaagtg attatgctac c 21

 <210> 15
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 15
 60 ggagccattc atacaggtcc c 21

 <210> 16
 65 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 16
 agtaagagac agctgaaccc 20

 10 <210> 17
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 17
 20 ggcaggtaa tttcactgg 19

 <210> 18
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 18
 30 gctgtgttat gccgcctc 19

 <210> 19
 <211> 19
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 19
 40 agtccatag ggtcttctc 19

 <210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 20
 50 gttaggtagt gttgcatta 20

 <210> 21
 <211> 18
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 21
 60 aagtcttagc atgtactg 18

 <210> 22
 65 <211> 19

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 22
 tagtagttcg cttgactg 19

 10 <210> 23
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 23
 20 caagttattg gatcaattg 19

 <210> 24
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 24
 30 gggtaacttg ttccgttg 18

 <210> 25
 <211> 18
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 25
 40 aataggattg cgctgtta 18

 <210> 26
 <211> 18
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 50
 <400> 26
 cctattgttg atatggac 18

 <210> 27
 <211> 17
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 60
 <400> 27
 ctgatccaac atcgagg 17

 <210> 28
 65 <211> 18

ES 2 536 002 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 5 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 28
 tagcggctgc accattgg 18

 10 <210> 29
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 29
 gttgaacaaa cgaacctt 19
 20
 <210> 30
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 30
 aactcagatc acgtaggac 19
 30
 <210> 31
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 31
 cgacctggat tactccgg 18
 40
 <210> 32
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 50
 <400> 32
 ggaattgaa gtagatag 18

 <210> 33
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 60
 <400> 33
 ctctgtcct ttcgtacag 19

 <210> 34
 <211> 18
 65

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 34
 ggcgcttgt gaagtagg 18

10
 <210> 35
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

20
 <400> 35
 gttgagatga tatcatttac gg 22

25
 <210> 36
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 36
 caccaccca agaacagg 18

35
 <210> 37
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 37
 caacttagta ttataccac accca 25

45
 <210> 38
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 38
 tccccgtaa atgattacat ct 22

55
 <210> 39
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 39
 gagaaataag gcctactca caaag 25

65
 <210> 40
 <211> 22

ES 2 536 002 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 40 caaattcctc cctgtacgaa ag	22
10	<210> 41 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
20	<400> 41 agtaatccag gtcggttct atct	24
25	<210> 42 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 42 aagtcctagc tgatctgagt tcag	24
35	<210> 43 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 43 gctattaaag gttcgttgt tcaac	25
45	<210> 44 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 44 tcccgatggt gcagcc	16
55	<210> 45 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 45 ttacgacctc gatgttgat ca	22
65	<210> 46 <211> 25	

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 46
 atcctattct agagtcata tcaac 25

10

<210> 47
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 47
 aataggattg cgctgttata ccta 24

20

<210> 48
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 48
 tagggataac agcgatacc tatt 24

30

<210> 49
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 49
 ggaacaagtt accctagga taa 23

40

<210> 50
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 50
 ttgatccaat aactgacca acg 23

50

<210> 51
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 51
 acttcaccag tcaaagcgaa c 21

60

<210> 52
 <211> 18

65

ES 2 536 002 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 52 aaccacaacct cggagcag	18
10	<210> 53 <211> 16 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
20	<400> 53 gtggggcga cctcgg	16
25	<210> 54 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 54 aaactaccaa acctgcttaa aa	22
35	<210> 55 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 55 aaacagtacc taacaacc acag	24
45	<210> 56 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 56 gaccctatgg agctttaatt tatta	25
55	<210> 57 <211> 23 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 57 cataacacag caagacgaga aga	23
65	<210> 58 <211> 18	

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 58
 tgacctgccc gtgaagag 18

 10 <210> 59
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 59
 20 cagctgtctc ttactttaa ccagtg 26

 <210> 60
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 60
 30 ctgtatgaat ggctccacga 20

 <210> 61
 <211> 26
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 61
 40 agcataatca ctgttcctt aaatag 26

 <210> 62
 <211> 23
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 62
 50 accgtgcaaa ggtagcataa tca 23

 <210> 63
 <211> 23
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 63
 60 tgattatgct accttgcac ggt 23

 <210> 64
 <211> 19
 65

ES 2 536 002 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 64
 gtaccctaac cgtgcaaag 19

 10 <210> 65
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 65
 20 cctgccagtgacacatgtt t 21

 <210> 66
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 66
 30 cacctctagc atcaccagta ttaga 25

 <210> 67
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 67
 40 cttacccgc ctgttacca 20

 <210> 68
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 68
 50 aggttaaaaa aagtaaaagg aactcg 26

 <210> 69
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 69
 60 cccaacacag gcatgctca 19

 <210> 70
 <211> 24
 65

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 70
 accaacaagt cattattacc ctca 24

 10 <210> 71
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 71
 20 tgacaattaa cagccaata tcta 24

 <210> 72
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 72
 30 gcctgcgtca gattaaaca c 21

 <210> 73
 <211> 24
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 73
 40 gtaacatgaa aacattctcc tccg 24

 <210> 74
 <211> 28
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 50

 <400> 74
 tatcaccta tagaagaact aatgtag 28

 <210> 75
 <211> 21
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 60

 <400> 75
 ctgaactcct cacaccaat t 21

 65 <210> 76
 <211> 23

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 76
 cactacctaa aaaatcccaa aca 23

10
 <210> 77
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

20
 <400> 77
 ttaagaaagc gttcaagctc a 21

25
 <210> 78
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 78
 catagtaggc ctaaagcag c 21

35
 <210> 79
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 79
 aaaccttgta gagagagtaa aaaatt 26

45
 <210> 80
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 80
 aaagaggaac agctcttgg acac 24

55
 <210> 81
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 81
 aatccccttg taaatttaac tggt 24

65
 <210> 82
 <211> 21

ES 2 536 002 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 82 cttaaattt gccacagaa c	21
10	<210> 83 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
20	<400> 83 ggtgtccaa gatagaatct	20
25	<210> 84 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 84 acaaacctac cgagcctgg	19
35	<210> 85 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 85 aagatttata ggtagaggcg	20
45	<210> 86 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 86 cccgctatg tagcaaaata	20
55	<210> 87 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 87 acctaagaac agctaaaaga	20
65	<210> 88 <211> 20	

ES 2 536 002 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 88
 taagaccccc gaaaccagac 20

10 <210> 89
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

20 <400> 89
 ataacttgc aaggagagcc 20

25 <210> 90
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 90
 cttctgcata atgaattaac 20

35 <210> 91
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 91
 atatagcaag gactaacccc 20

45 <210> 92
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 92
 agatgaaaaa ttataaccaa 20

55 <210> 93
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

<400> 93
 caatagatat agtaccgcaa 20

65 <210> 94
 <211> 20

ES 2 536 002 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 94 aggc gataga aattgaaacc	20
10	<210> 95 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
20	<400> 95 tagccaaacc atttaccaa	20
25	<210> 96 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 96 caccttacta ccagacaacc	20
35	<210> 97 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 97 ctaaacctag ccccaaacc	19
45	<210> 98 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 98 ctagcatcac cagtattaga	20
55	<210> 99 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 99 ttaccaaaaa catcacctct	20
65	<210> 100 <211> 20	

ES 2 536 002 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 100 gaactcggca aatcttacc	20
10	<210> 101 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido sentido	
20	<400> 101 gggtaagatt tgccgagtc	20
25	<210> 102 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 102 gctcataagg aaaggtaaa a	21
35	<210> 103 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 103 gtcaacccaa cacaggc	17
45	<210> 104 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 104 accaacaagt cattattacc c	21
55	<210> 105 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido sentido	
	<400> 105 ggttgattgt agatattggg ct	22
65	<210> 106 <211> 20	

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 5 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 106
 attaacagcc caatatctac 20

 10 <210> 107
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 107
 20 tgcgtcagat taaaacactg 20

 <210> 108
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 108
 30 aaaacattct cctccgcata 20

 <210> 109
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 109
 40 gttagtataa gtaacatg 18

 <210> 110
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 110
 50 tggaccaatc taccacct 19

 <210> 111
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 55 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 111
 60 acatataact gaactcctca 20

 <210> 112
 <211> 20

ES 2 536 002 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 112
 caccactac ctaaaaaatc 20

 10 <210> 113
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 113
 20 caccaattaa gaaagcgtg 20

 <210> 114
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 114
 30 taggcctaaa agcagccacc aa 22

 <210> 115
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35

 <220>
 <223> Oligonucleótido sentido

 <400> 115
 40 ttggtggctg ctttaggcc ta 22

 <210> 116
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 50

 <400> 116
 taacacccat agtaggcct 19

 <210> 117
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 60

 <400> 117
 aacctgtag agagagtaaa 20

 <210> 118
 <211> 20
 65

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 118
 aacagctctt tggacactag 20

 10 <210> 119
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 119
 20 aactgtagt ccaaagag 18

 <210> 120
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 120
 30 ctctaaatcc ccttgtaa 19

 <210> 121
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 121
 40 actttaaatt tgcccacag 19

 <210> 122
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 50

 <400> 122
 ggttgtccaa gatagaatc 19

 <210> 123
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 60

 <400> 123
 acaaacctac cgagcctcc 19

 <210> 124
 <211> 18
 65

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 5 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 124
 atttataggt tagaggcg 18

 10 <210> 125
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 125
 atgtagcaaa atagtggaa 20
 20
 <210> 126
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 126
 taagaacagc taaaagagca c 21
 30
 <210> 127
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 127
 cgaaaccaga cgagctac 18
 40
 <210> 128
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Oligonucleótido sentido
 50
 <400> 128
 ggggtcttag cttggctct cc 22

 <210> 129
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 60
 <400> 129
 taacttgca aggagagcca 20

 <210> 130
 <211> 18
 65

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 130
 accttctgca taatgaat 18

 10 <210> 131
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 131
 20 atatagcaag gactaaccc 19

 <210> 132
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 132
 30 gatgaaaaat tataaccaag 20

 <210> 133
 <211> 20
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 133
 40 aatagatata gtaccgcaag 20

 <210> 134
 <211> 17
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 50
 <400> 134
 cgatagaaat tgaacc 17

 <210> 135
 <211> 20
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> Oligonucleótido sentido

 <400> 135
 tactttattt gggtaatgg 20

 65 <210> 136
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 136
 ccatttacc aaataaagta 20

 10 <210> 137
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 137
 20 ttagccaac catttaccca 20

 <210> 138
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 138
 30 aaggtggagt gggttgggg c 21

 <210> 139
 <211> 17
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 139
 40 gctaaggtg tctgta 17

 <210> 140
 <211> 20
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 50

 <400> 140
 atcgctata ctttattgg 20

 <210> 141
 <211> 20
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 60

 <400> 141
 atctattgcg ccaggttca 20

 <210> 142
 <211> 19
 65

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 142
 tttcatctt tccctgcg 19

 10 <210> 143
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 143
 20 tccttgctat attatgcttg 20

 <210> 144
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 144
 30 cattatgcag aaggataggg 20

 <210> 145
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 145
 40 ttccttgca aagttatt 18

 <210> 146
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 50
 <400> 146
 tttcgggggt ctagctttg 20

 <210> 147
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 60
 <400> 147
 ctgttcttag gtagctcg 18

 <210> 148
 <211> 19
 65

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 148
 tgctacatag acgggtgtg 19

 10 <210> 149
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 149
 20 cctctaccta taaatcttc 20

 <210> 150
 <211> 17
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 150
 30 gctatcacca ggctcgg 17

 <210> 151
 <211> 17
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 151
 40 aagttgaact aagattc 17

 <210> 152
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 50

 <400> 152
 gagggttctg tgggcaaatt 20

 <210> 153
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 60

 <400> 153
 acagttaat ttacaaggg 19

 <210> 154
 <211> 19
 65

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 5 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 154
 ggtcctcaag agctgttc 19

 10 <210> 155
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 155
 20 tactctct acaaggttt 20

 <210> 156
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 25 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 156
 30 taggcctact atgggtgta 20

 <210> 157
 <211> 21
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 157
 40 aacgcttct taattggtgg c 21

 <210> 158
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 50 <400> 158
 ttttaggtag tgggtgtga 20

 <210> 159
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 60 <400> 159
 ggagttcagt tatatgttg 20

 <210> 160
 <211> 20

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 5 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 160
 tgatagattg gtccaattgg 20

 10 <210> 161
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 15 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 161
 ctaacattag ttcttctata g 21
 20
 <210> 162
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 162
 atgcgaggga gaatgttt 18
 30
 <210> 163
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido

 <400> 163
 tcagtgtttt aatctgacg 19
 40
 <210> 164
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Oligonucleótido antisentido
 50
 <400> 164
 gtagatattg ggctgttaatt 21

 <210> 165
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 55
 <220>
 <223> Oligonucleótido
 60
 <400> 165
 gtgagggtaa taatgacttg 20

 <210> 166
 <211> 20
 65

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 166 atgagcatgc ctgtgttgg	20
10	<210> 167 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido	
20	<400> 167 ggtaagatt gccgagttc	19
25	<210> 168 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 168 tggatgct agaggatg	20
35	<210> 169 <211> 15 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 169 gcggtgcctc taata	15
45	<210> 170 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 170 ggccgtaaa catgtgtcac	20
55	<210> 171 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 171 tgattatgct accttgcac	20
65	<210> 172 <211> 20	

ES 2 536 002 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 172 ttaaaggaaca agtgattatg	20
10	<210> 173 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido	
20	<400> 173 tggagccatt catacaggtc	20
25	<210> 174 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 174 aaaagtaaga gacagctgaa	20
35	<210> 175 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 175 cacgggcagg tcaatttcac	20
45	<210> 176 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 176 gtcttgctgt gttatgcccg	20
55	<210> 177 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 177 aattaaagct ccatagggt	19
65	<210> 178 <211> 21	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 178 gttgttagg tactgttgc a	21
10	<210> 179 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido	
20	<400> 179 aggttgga gtttaggac	19
25	<210> 180 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 180 gccccaacgc aaattttaa	20
35	<210> 181 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 181 ctcggagggt gggttctgct	20
45	<210> 182 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 182 ctggtgaagt ctagcatgt	20
55	<210> 183 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 183 caattgagta tagtagttcg	20
65	<210> 184 <211> 19	

ES 2 536 002 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 184 tgttccgttg gtcaagtta	19
10	<210> 185 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido	
20	<400> 185 aataggattg cgctgttata	20
25	<210> 186 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 186 attgttgata tggactctag	20
35	<210> 187 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 187 atccaacatc gaggtcgtaa	20
45	<210> 188 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 188 gcggctgcac catcgggat	19
55	<210> 189 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 189 ttgaacaac gaaccttta	19
65	<210> 190 <211> 20	

ES 2 536 002 T3

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 190 aactcagatc acgtaggact	20
10	<210> 191 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido	
20	<400> 191 aaaccgacct ggattactc	19
25	<210> 192 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 192 agggaggaat ttgaaggtag	20
35	<210> 193 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 193 ggccttattt ctctgtcct	20
45	<210> 194 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 194 ggaaggcgct ttgtgaagta	20
55	<210> 195 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido	
	<400> 195 aagttgagat gatatacatt	20
65	<210> 196 <211> 17	

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Oligonucleótido

<400> 196
cctgttcttg ggtgggt 17

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de ARN quimérico mitocondrial aislada que comprende ARN ribosómico mitocondrial 16S sentido covalentemente ligado en su extremo 5' al extremo 3' de un polinucleótido con una secuencia de repetición invertida, en la que la molécula de ARN quimérica comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2 y SEC ID N°: 3.
- 10 2. Uno o más compuestos u oligonucleótidos de 10 a 50 nucleobases de longitud para su uso en el tratamiento de cáncer o pre-cáncer, donde dichos uno o más compuestos o oligonucleótidos son suficientemente complementarios a una molécula de ARN quimérico mitocondrial que comprende un ARN ribosómico mitocondrial 16S sentido covalentemente ligado en su extremo 5' a un extremo 3' de un polinucleótido con una secuencia de repetición invertida que es capaz de hibridarse con la molécula de ARN quimérico mitocondrial para formar un dúplex estable.
- 15 3. Los compuestos u oligonucleótidos para su uso según la reivindicación 2, en los que los compuestos u oligonucleótidos están seleccionados de SEC ID N°: 98-196.
- 20 4. Los compuestos u oligonucleótidos para su uso según la reivindicación 2, en los que los compuestos u oligonucleótidos son oligonucleótidos de 15 a 50 nucleobases de longitud en los que al menos 15 nucleobases son complementarias a SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 2 y/o SEC ID N°: 3.
- 25 5. Los compuestos u oligonucleótidos para su uso según la reivindicación 4, en los que los compuestos u oligonucleótidos son oligonucleótidos de 18 a 50 nucleobases de longitud.
6. Los compuestos u oligonucleótidos para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en los que los compuestos u oligonucleótidos pueden inducir al menos una muerte de células pre-cancerígenas y muerte de células cancerígenas en células o tejidos.
- 30 7. Los compuestos u oligonucleótidos para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en los que los compuestos u oligonucleótidos están adaptados para administración conjuntamente con un fármaco quimioterapéutico para el tratamiento de cáncer.
- 35 8. Uso de una molécula de ARN quimérico mitocondrial que comprende un ARN ribosómico mitocondrial 16S sentido covalentemente ligado en su extremo 5' a un extremo 3' de un polinucleótido con una secuencia de repetición invertida como diana que tras la interferencia induce muerte de células cancerígenas y pre-cancerígenas.
- 40 9. El uso de la reivindicación 8, en el que la interferencia se lleva a cabo por un material seleccionado de oligonucleótidos complementarios y ARN interferente pequeño.
- 45 10. El uso de la reivindicación 9, en el que dicho oligonucleótido complementario o ARN interferente pequeño comprende al menos un resto seleccionado del grupo que consiste en: un enlace internucleosídico alternativo, un resto de azúcar modificado y un resto de base modificado.
- 50 11. El uso de la reivindicación 9, en el que dicho oligonucleótido complementario o ARN interferente pequeño comprende uno o más enlaces internucleosídicos alternativos.
- 55 12. El uso de la reivindicación 11, en el que dicho enlace internucleosídico alternativo es un enlace internucleosídico de fosforotioato.
13. El uso de la reivindicación 12, en el que dicho oligonucleótido complementario o ARN interferente pequeño comprende además uno o más oligonucleótidos del extremo 5' modificados con 2-o-(2-metoxi)etilo y uno o más oligonucleótidos del extremo 3' modificados con 2-o-(2-metoxi)etilo.
14. El uso de la reivindicación 9, en el que dicho oligonucleótido complementario o ARN interferente pequeño comprende uno o más oligonucleótidos bloqueados o uno o más ácidos nucleicos peptídicos.

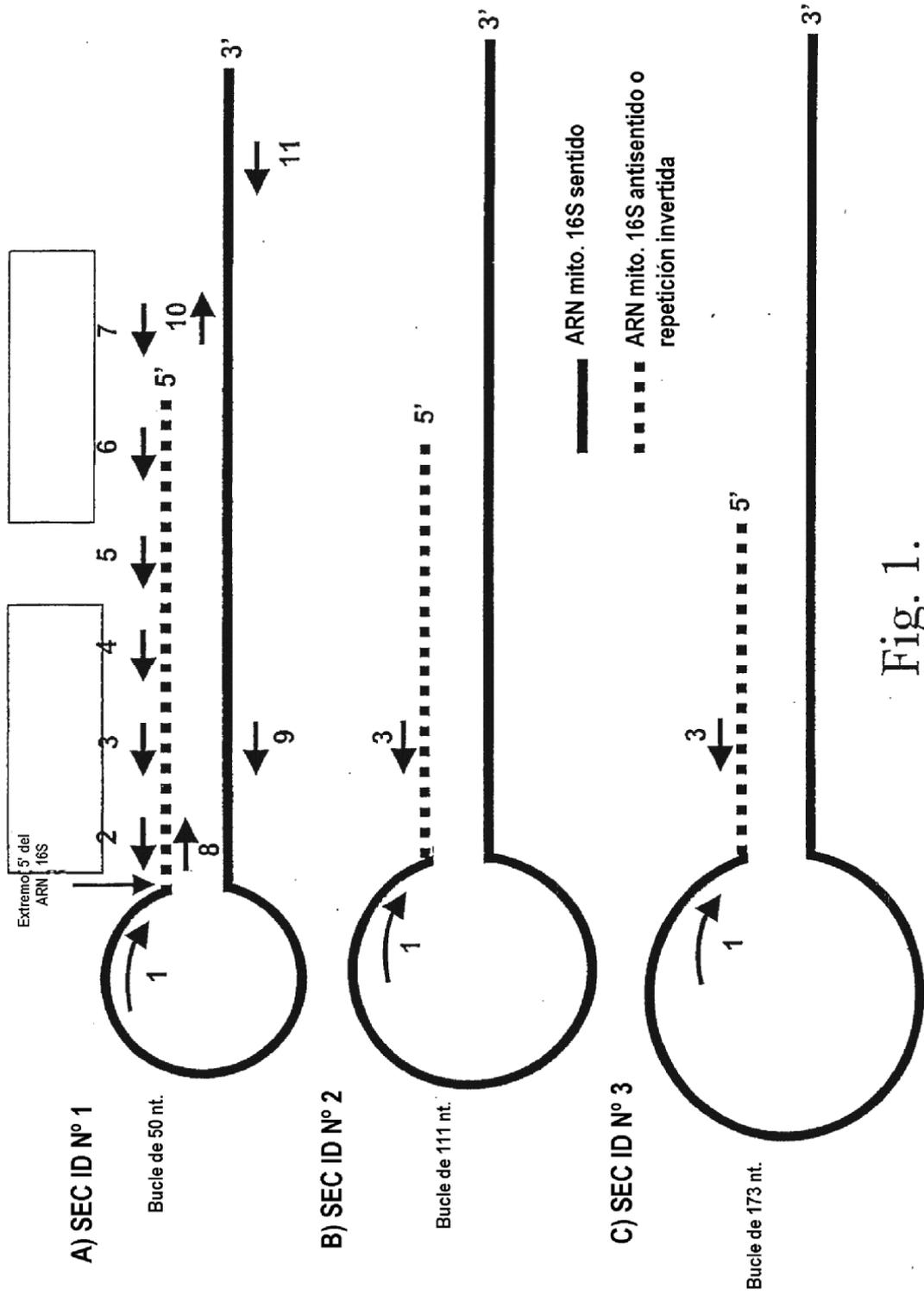


Fig. 1.

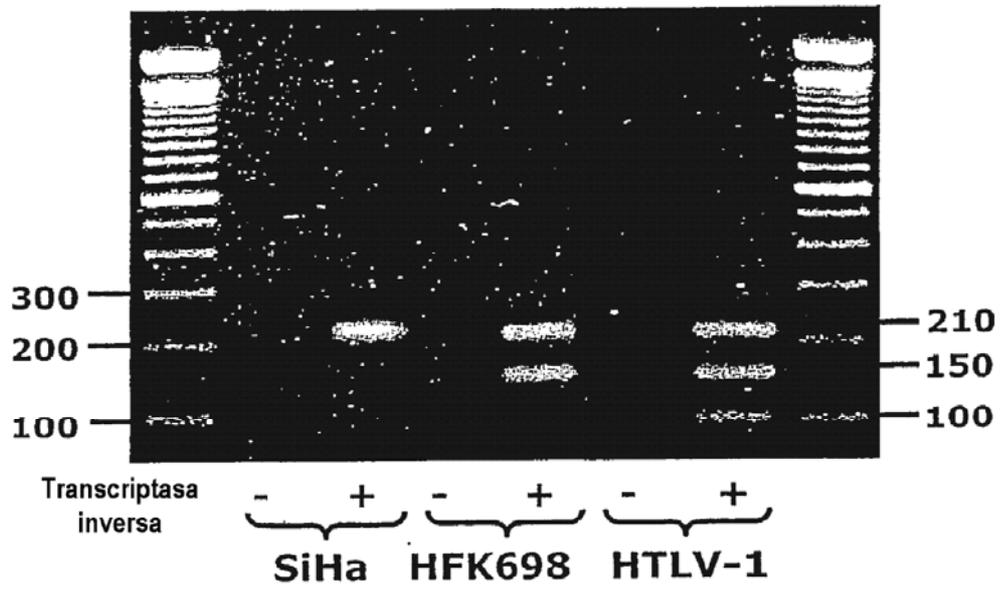


FIG. 2.

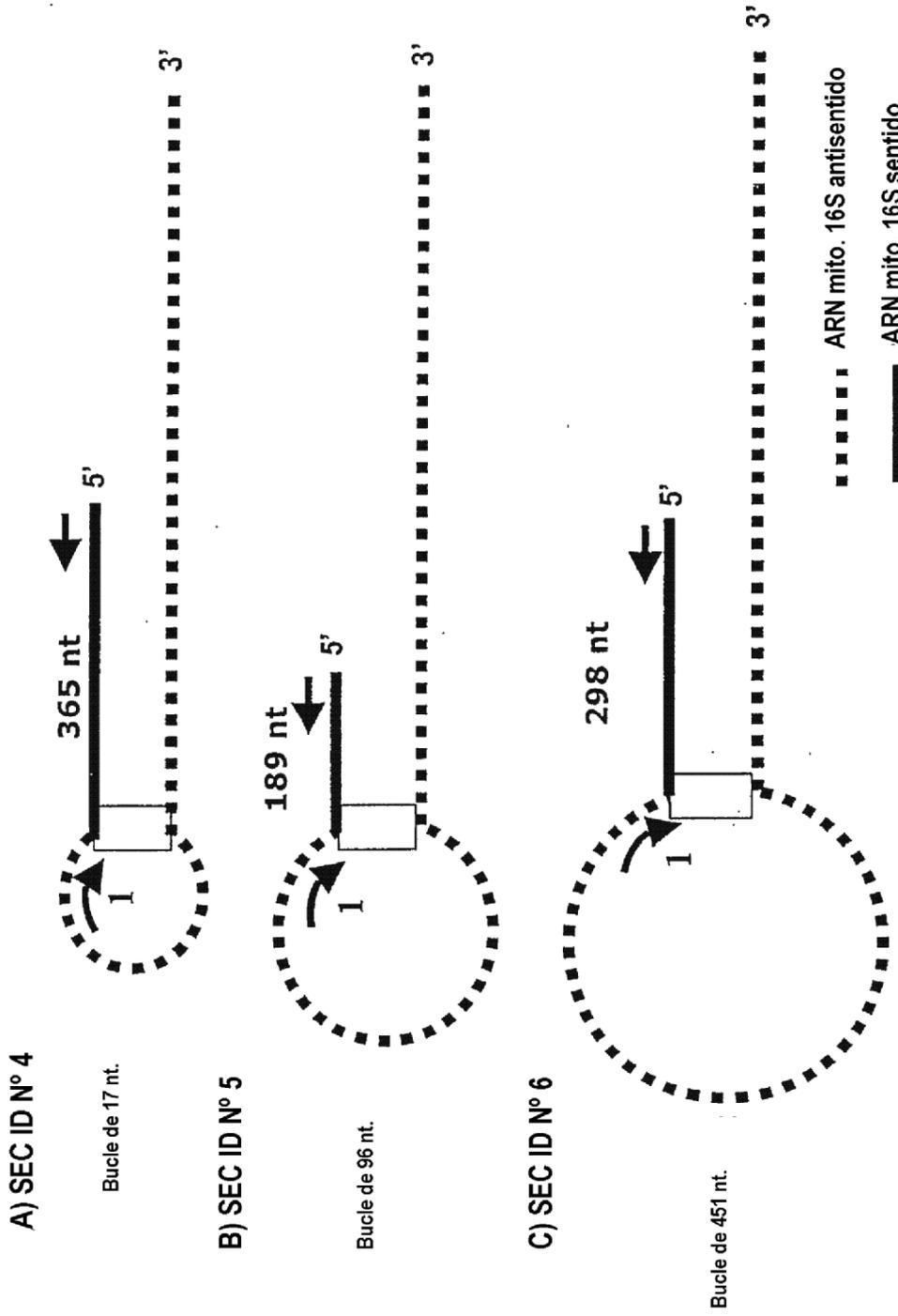


Fig. 3

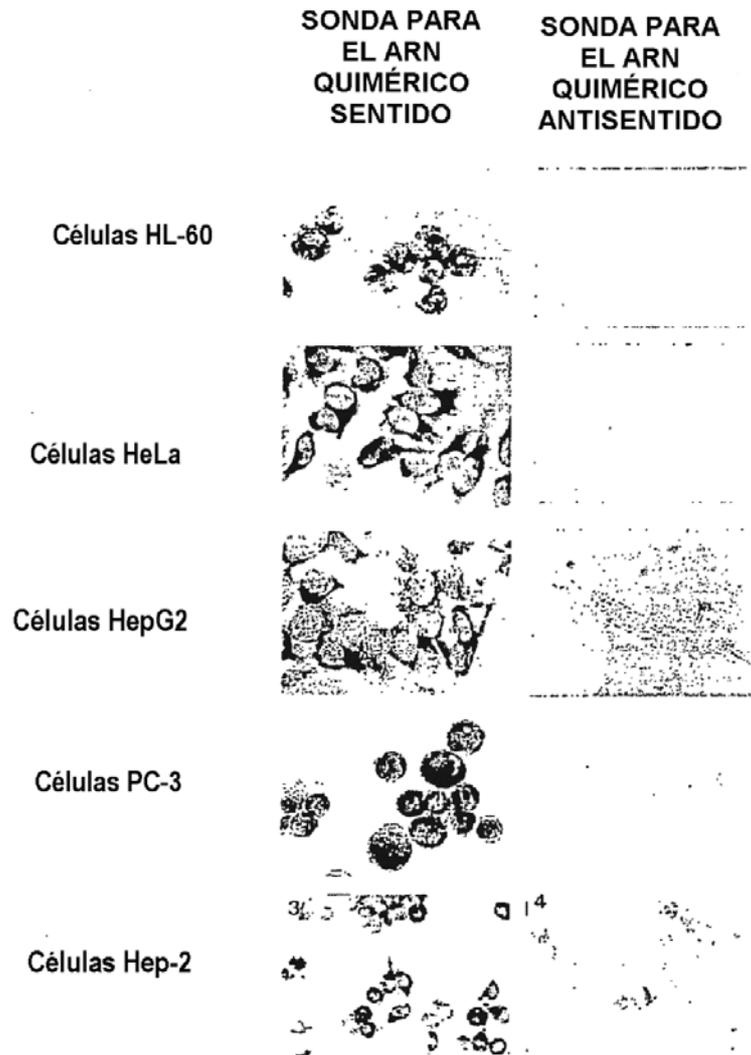


Fig. 4A

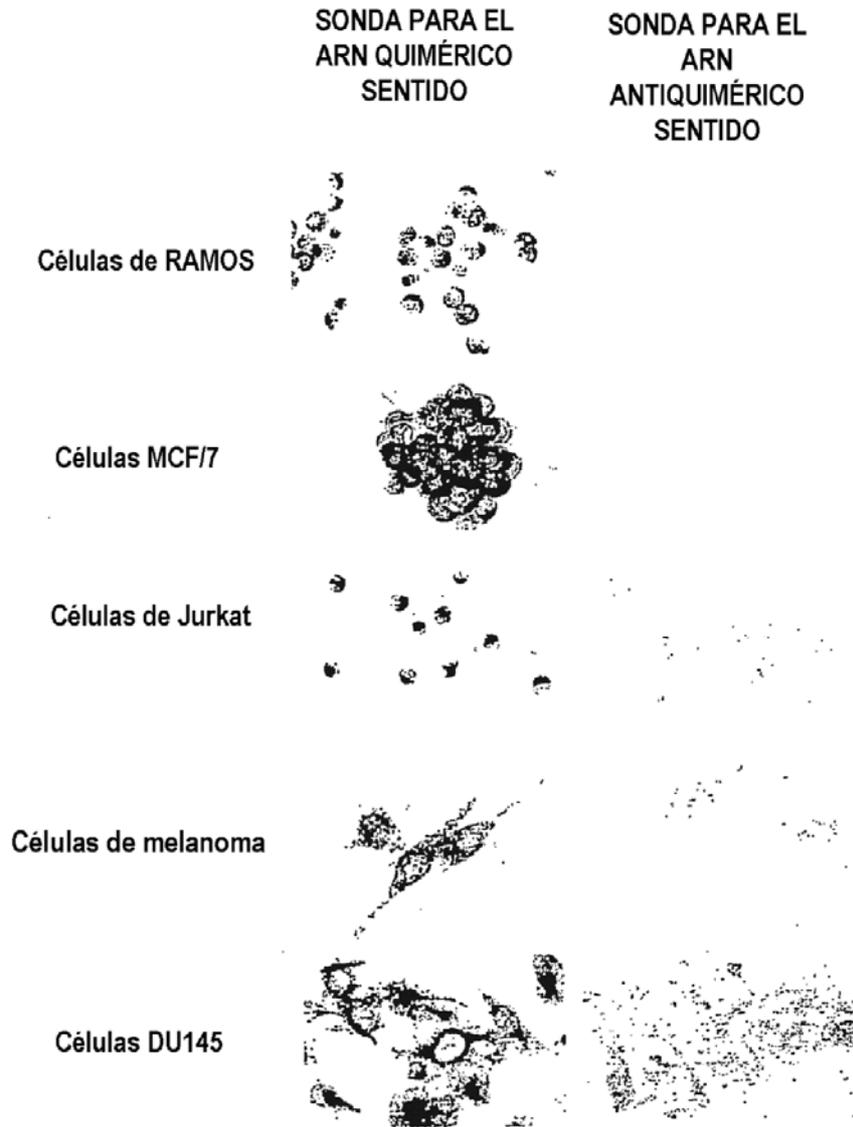


Fig. 4B

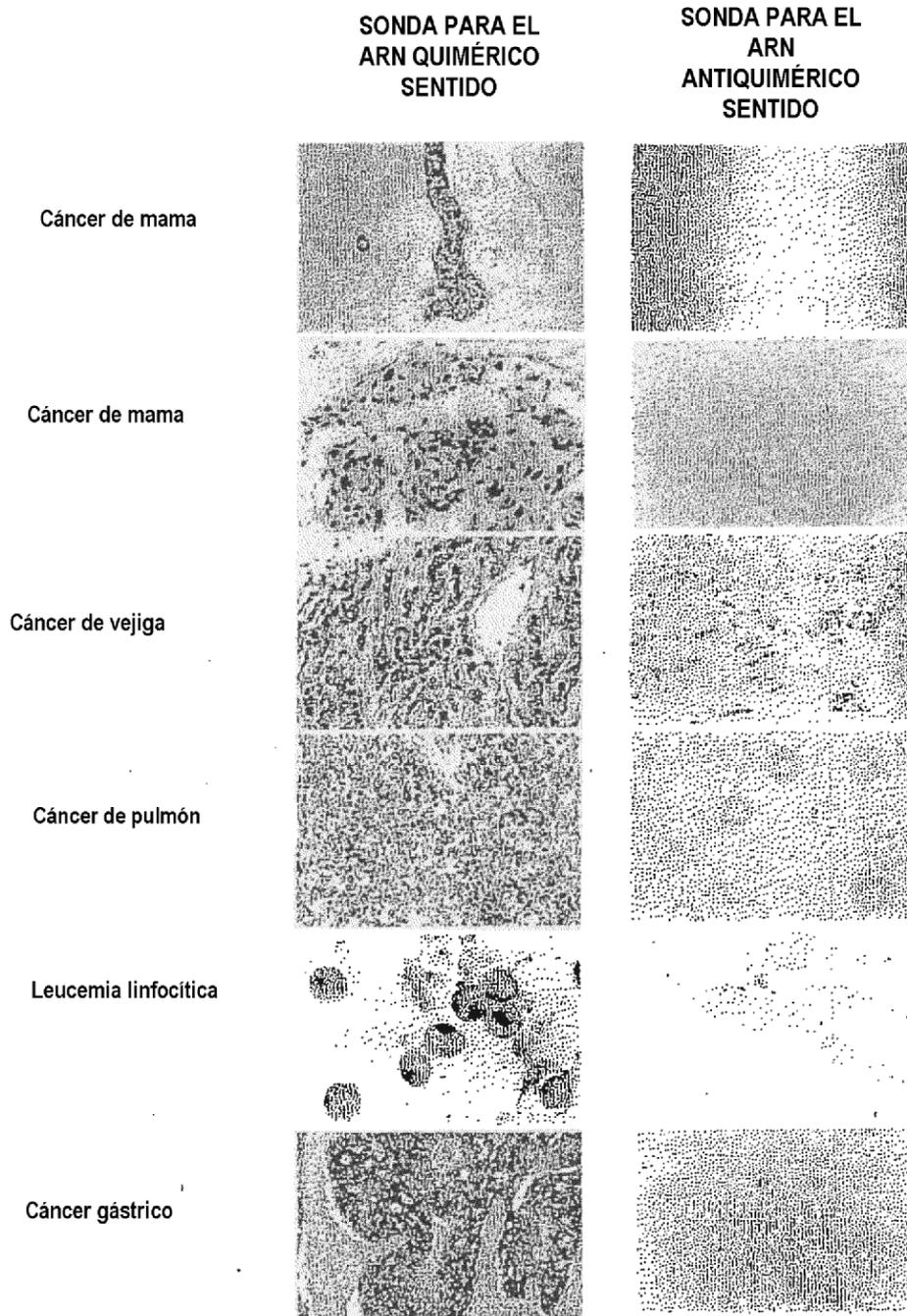


Fig. 5A

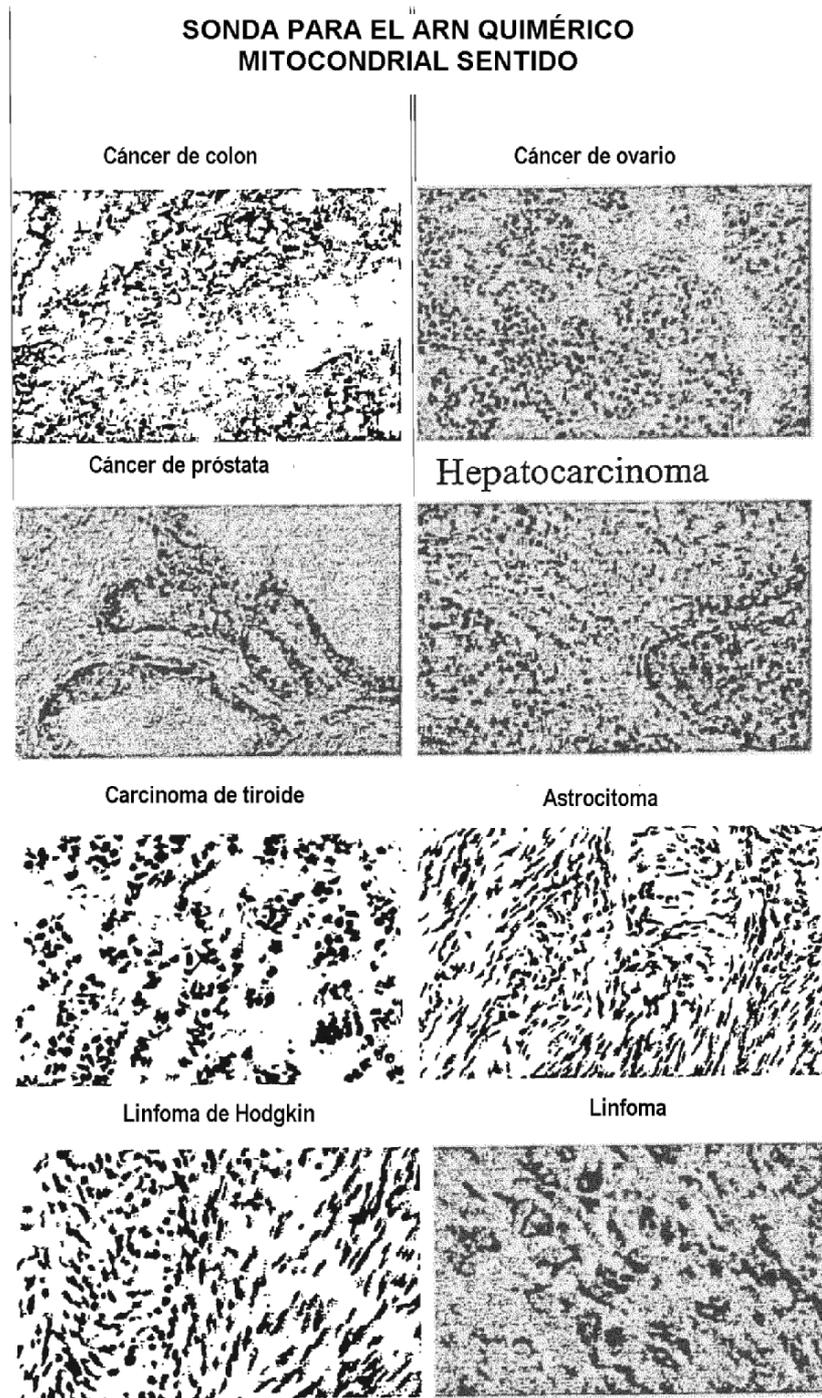


FIG. 5B

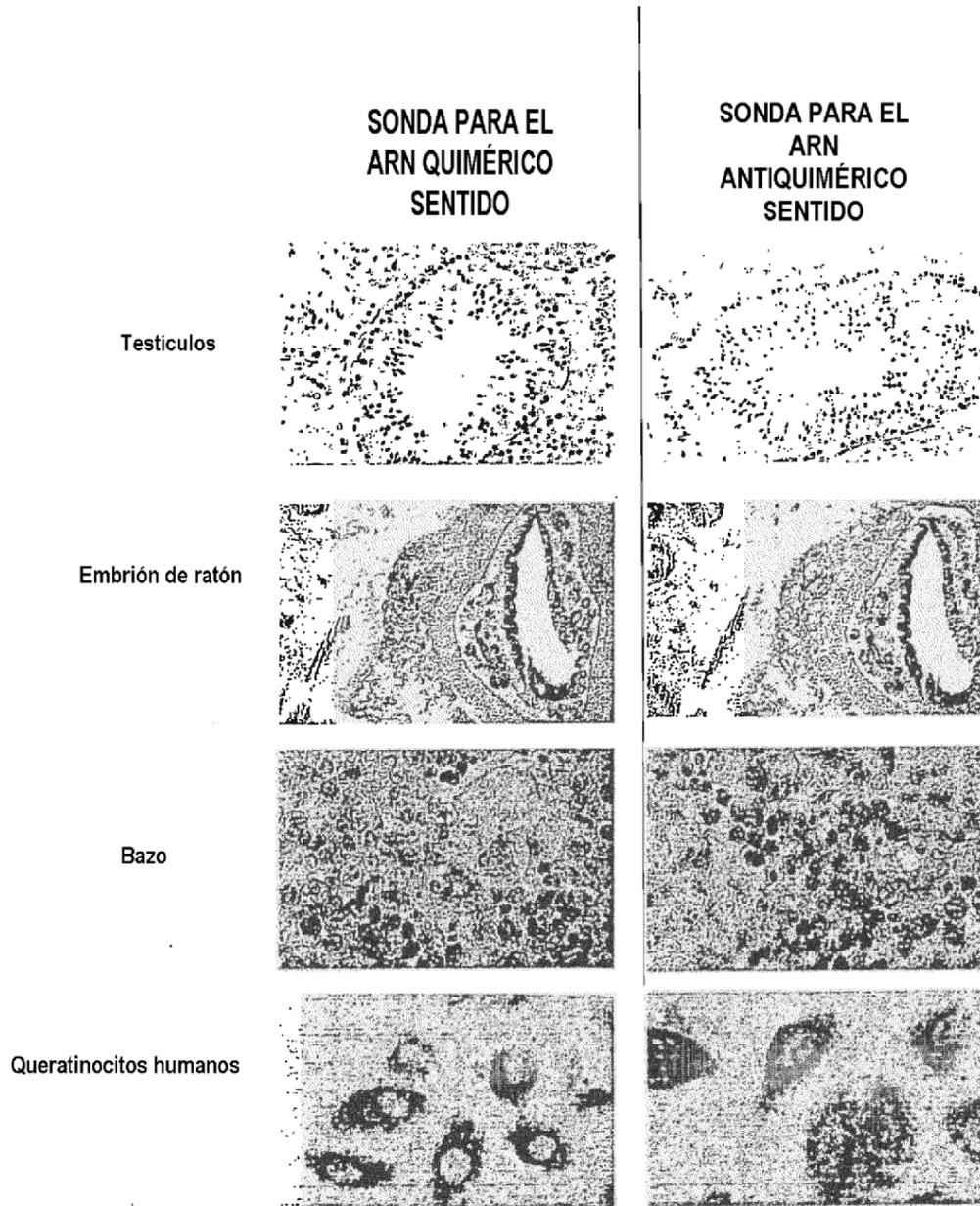


Fig. 6

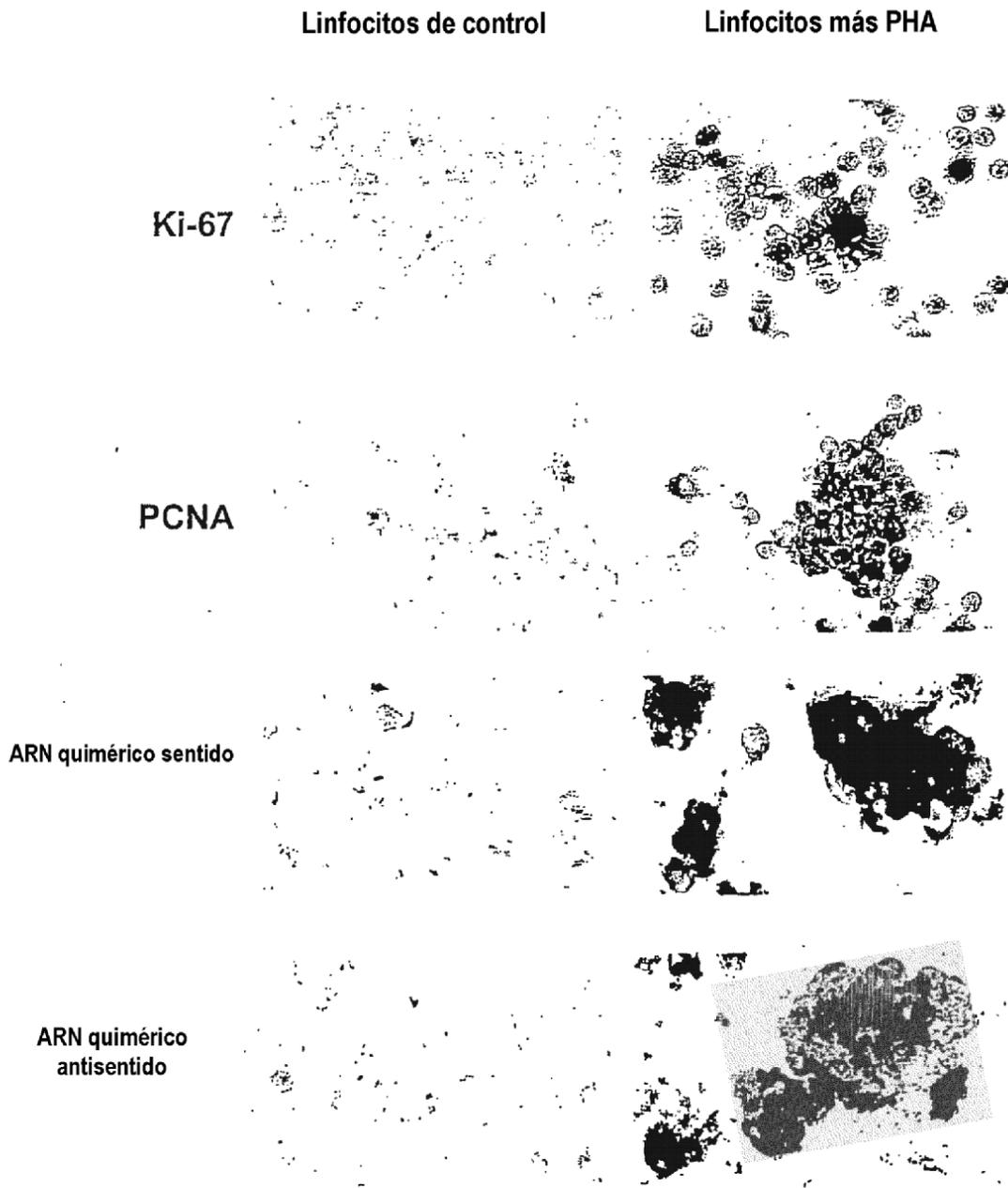


Fig. 7

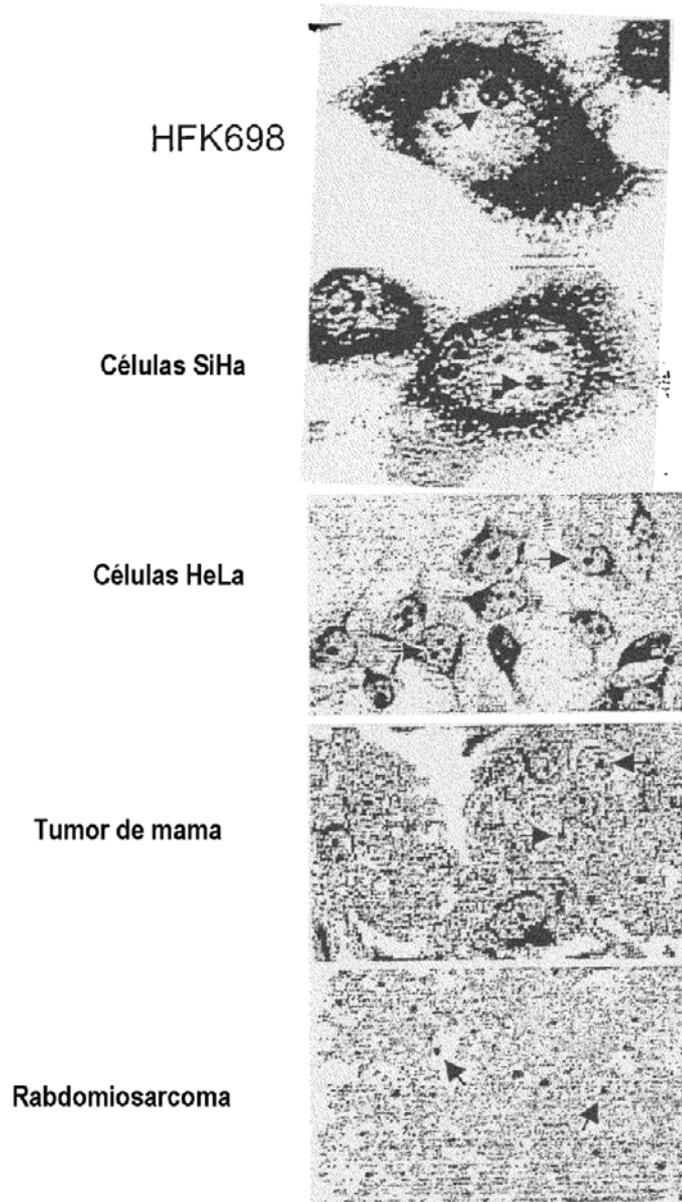


FIG. 8.

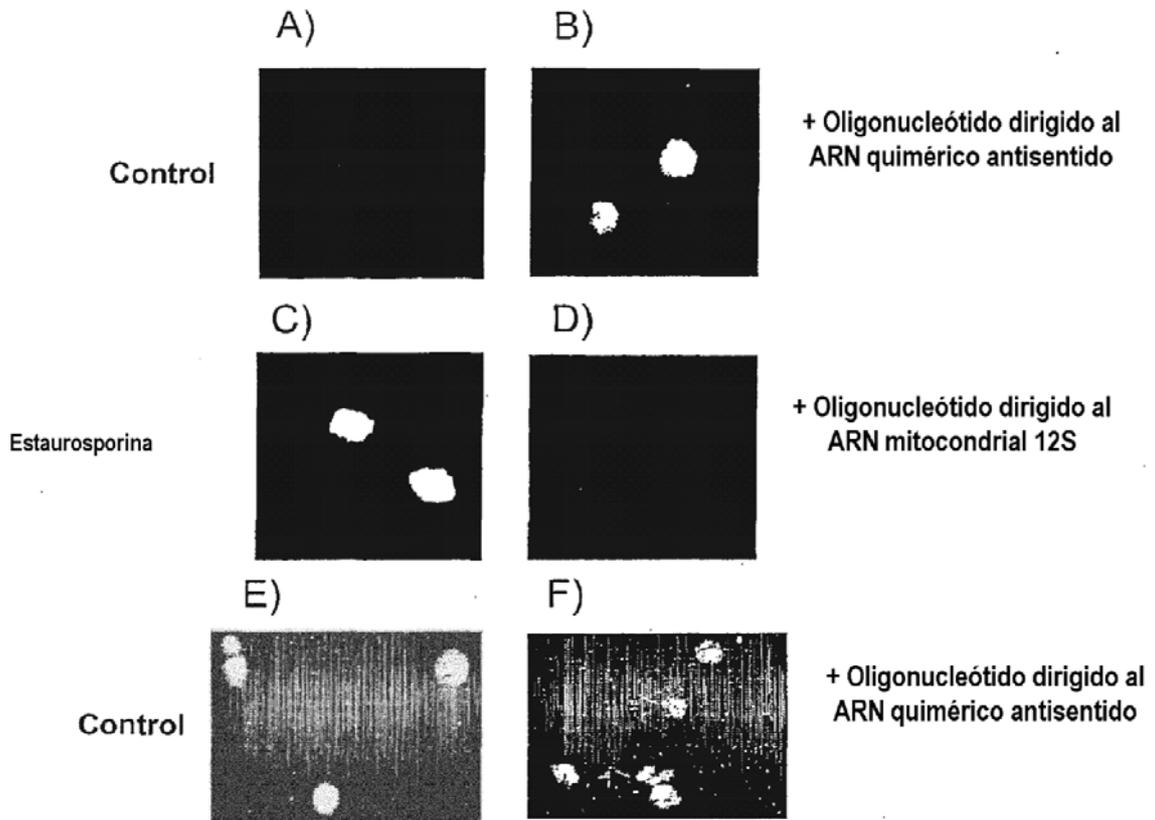


Fig. 9

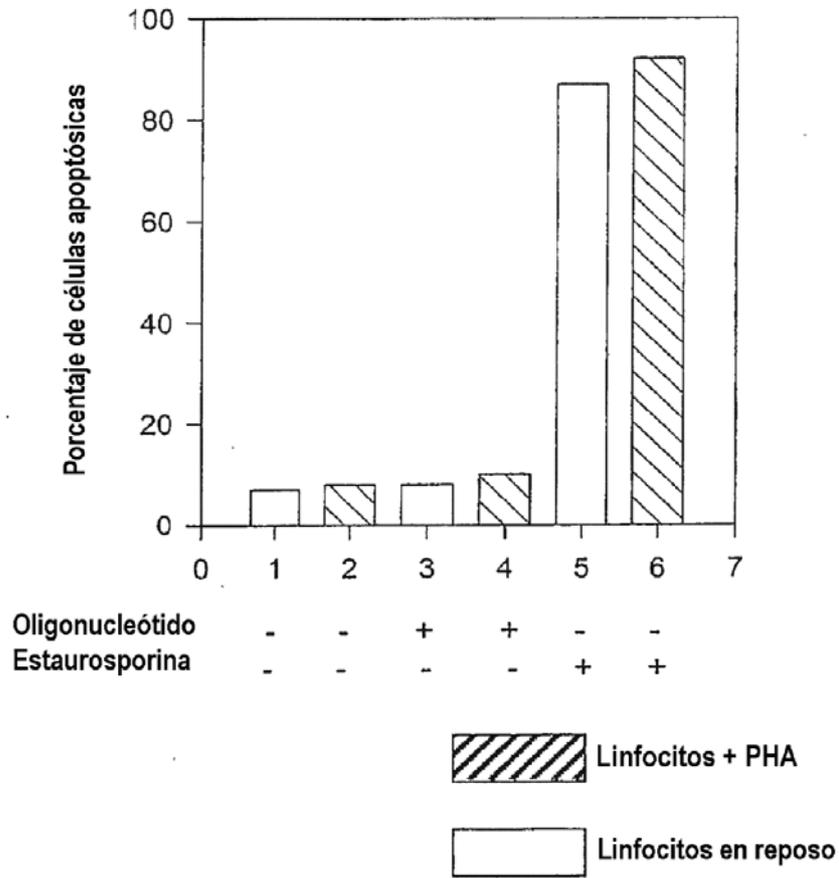


Fig. 10.