

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 441**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.1999** **E 05003839 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015** **EP 1566453**

54 Título: **Detección sistemática diferencial cualitativa**

30 Prioridad:

11.03.1998 FR 9802997

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

19.11.2015

73 Titular/es:

**DIAXONHIT (100.0%)
63-65 boulevard Masséna
75013 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**SCHWEIGHOFFER, FABIEN;
BRACCO, LAURENT y
TOCQUE, BRUNO**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 551 441 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

Detección sistemática diferencial cualitativa

Esta invención se refiere a los campos técnicos de la biotecnología, de la medicina, de la biología y de la bioquímica. Sus aplicaciones se refieren a los campos de la salud humana, animal y vegetal. Más particularmente, la invención permite identificar secuencias de ácidos nucleicos que permiten concebir nuevas detecciones sistemáticas para moléculas de interés terapéutico, nuevas herramientas de terapia genética, así como aportar indicaciones sobre el potencial tóxico y el seguimiento de la eficacia de moléculas y de las informaciones de farmacogenómica.

La presente invención describe especialmente una serie de técnicas originales de identificación de secuencias de ácidos nucleicos basada en la puesta en evidencia de las diferencias cualitativas entre los ARN que provienen de dos contextos distintos que se desean comparar, en particular que provienen de un tejido o de un órgano enfermo y su equivalente sano. Más precisamente, estas técnicas están destinadas a clonar específicamente los intrones y los exones alternativos cortados y empalmados diferencialmente entre una situación patológica y un estado sano, o entre dos situaciones fisiológicas que se desean comparar. Estas diferencias cualitativas en los ARN pueden provenir igualmente de una alteración o alteraciones del genoma, de tipo inserciones o supresiones en regiones que se transcribirán en ARN. Esta serie de técnicas se identifica mediante el acrónimo DATAS: Análisis diferencial de transcritos con corte y empalme alternativo (Differential Analysis of Transcripts with Alternative Splicing, en inglés).

La caracterización de las alteraciones de la expresión genética que presiden o que están asociadas con una patología dada suscita una esperanza importante de descubrir nuevas dianas terapéuticas y nuevas herramientas de diagnóstico. Sin embargo, la identificación de una secuencia de ADN genómico o complementario, hecha mediante clonación posicional o mediante técnicas de detección sistemática diferencial cuantitativa, aporta poca o ninguna información sobre la función y, menos aún, sobre los dominios funcionales empleados en las desregulaciones relacionadas con la patología estudiada. La presente invención describe una serie de técnicas originales que tienen como objetivo identificar las diferencias de cortes y empalmes de los ARN que existen entre dos situaciones fisiopatológicas distintas. La identificación de estas diferencias aporta informaciones sobre las diferencias cualitativas y no sobre las diferencias cuantitativas, como es el caso para las técnicas descritas hasta ahora. El conjunto de las técnicas presentadas en la presente invención se reagrupa, por lo tanto, bajo la denominación "detección sistemática diferencial cualitativa" o DATAS. Los métodos de la invención son utilizables para la identificación de nuevas dianas o productos terapéuticos, para la preparación de herramientas de búsqueda genética y/o herramientas para el diagnóstico, para la construcción de bancos de ácidos nucleicos, y en métodos de determinación del perfil toxicológico o de la eficacia de un compuesto, por ejemplo.

A este respecto, la invención se refiere a composiciones o bancos de ácidos nucleicos perfilados, representativos de las diferencias cualitativas que existen entre dos muestras biológicas.

La invención se refiere más particularmente a una composición tal como se define en las reivindicaciones.

Más generalmente, la invención describe composiciones de ácidos nucleicos que comprenden esencialmente ácidos nucleicos que corresponden a cortes y empalmes alternativos que distinguen dos situaciones fisiológicas. Más particularmente, estos ácidos nucleicos corresponden a cortes y empalmes alternativos identificados en una muestra biológica de ensayo y no presentes en la misma muestra biológica en una situación de referencia. La invención describe igualmente la utilización de estas composiciones de ácidos nucleicos como producto de diagnóstico, o como herramienta de detección sistemática de moléculas activas, como se indica más adelante.

Generación de bancos cualitativos

A este respecto, la invención describe un procedimiento de preparación de un banco de ácidos nucleicos representativos de un estado fisiológico dado de una muestra biológica.

La presente invención se puede aplicar a cualquier tipo de muestras biológicas. En particular, la muestra biológica puede ser cualquier célula, órgano, tejido, muestra, biopsia, etc., que contenga ácidos nucleicos. Con respecto a un órgano, tejido o biopsia, se ponen eventualmente en cultivo, a fin de permitir el acceso a las células que las componen. Se puede tratar de muestras que provienen de mamíferos (en particular, del ser humano), de vegetales, de bacterias o de células eucariotas inferiores (levaduras, células fúngicas etc.). Ejemplos de materiales son, en particular, una biopsia de tumor, una biopsia de placas neurodegenerativas o de áreas cerebrales que presentan lesiones neurodegenerativas, una muestra de piel, una muestra de células sanguíneas obtenidas después de una toma de sangre, una biopsia colorrectal, biopsias que provienen de lavados pulmonares, etc. Ejemplos de células son especialmente las células musculares, hepáticas, fibroblastos, nerviosas epidérmicas, dérmicas, las células sanguíneas como los linfocitos B, T, los mastocitos, los monocitos, los granulocitos, los macrófagos.

A título ilustrativo, las situaciones fisiológicas estudiadas pueden ser las siguientes:

SITUACIÓN A	SITUACIÓN B
muestra sana	muestra patológica
muestra sana	muestra apoptótica
muestra sana	muestra después de infección viral
muestra sensible a X	muestra resistente a X
muestra no tratada	muestra tratada (por ejemplo, mediante compuesto tóxico)
muestra no diferenciada	muestra que ha sufrido una diferenciación celular o tisular

Este procedimiento comprende ventajosamente la clonación de ácidos nucleicos representativos de marcadores cualitativos de expresión genética (por ejemplo de cortes y empalmes alternativos) de dicho estado fisiológico y no presentes en un estado de referencia, en bancos específicos de diferencias cualitativas que existen entre los 2 estados estudiados.

Estos bancos están constituidos por ADNc insertados en vectores plasmídicos o fágicos. Estos bancos pueden ser presentados en filtros de nitrocelulosa o cualquier otro soporte conocido por el experto en la técnica, tales como chips o biochips.

Una de las características y al mismo tiempo una de las originalidades de la detección sistemática diferencial cualitativa es que esta técnica da lugar a no tan sólo uno pero ventajosamente dos bancos diferenciales que representan el conjunto de las diferencias cualitativas que existen entre dos situaciones dadas: Par de banco (véase la figura 1D).

Así, la invención propone cualquier composición o banco de ácidos nucleicos, susceptible de ser obtenida por hibridación entre una población de ARN que proviene de una primera muestra biológica y una población de ADNc que proviene de una segunda muestra biológica. Más preferiblemente, estos bancos o composiciones comprenden ácidos nucleicos representativos de diferencias cualitativas de expresión entre dos muestras biológicas, y se producen por un procedimiento que comprende (i) una etapa al menos de hibridación entre una población de ARN que proviene de una primera muestra biológica y una población de ADNc que proviene de una segunda muestra biológica, (ii) la selección de los ácidos nucleicos representativos de diferencias cualitativas de expresión y, eventualmente (ii) la clonación de dichos ácidos nucleicos.

Además, después de la constitución de dichos bancos, es posible efectuar una etapa de selección de los clones para mejorar la especificidad de los bancos obtenidos. En efecto, es posible que determinados emparejamientos erróneos observados no se deban únicamente a diferencias cualitativas (por ejemplo, a cortes y empalmes alternativos diferenciales), sino que pueden resultar de defecto(s) de la transcripción inversa, por ejemplo, Aunque estos eventos no sean generalmente significativos, es preferible eliminarlos o reducirlos previamente a la clonación de los ácidos nucleicos. Para hacer esto, los clones del banco pueden hibridarse con las poblaciones de ADNc de las dos situaciones fisiológicas estudiadas (véase la etapa (c) anterior). Los clones que hibridan de forma no diferencial con las dos poblaciones pueden considerarse como no específicos y eventualmente eliminarse o tratarse en segunda prioridad (en efecto, la aparición de una nueva isoforma en la muestra de ensayo no significa siempre que la isoforma inicial presente en la muestra de referencia ha desaparecido de esta muestra de ensayo). Los clones que no hibridan más que con una sola de las dos poblaciones o hibridan de forma preferencial con una de las poblaciones se consideran como específicos y se pueden seleccionar en primera prioridad para constituir los bancos enriquecidos o afinados.

Un afinado se puede realizar igualmente por hibridación y validación de clones con sondas que provienen de un número estadísticamente relevante de muestras patológicas.

La presente solicitud describe igualmente bancos constituidos por ADNc de doble hebra, correspondientes a regiones de ARN específicas de un corte y empalme alternativo. Estos bancos pueden estar constituidos por ácidos nucleicos, generalmente en un vector de clonación o cultivos celulares que contienen dichos ácidos nucleicos.

La elección de los ARN de partida determina en parte las características de los bancos obtenidos:

- los ARN de las dos situaciones A y B son ARNm o ARN totales maduros aislados según las técnicas conocidas por el experto en la técnica. Los bancos son bancos de detección sistemática diferencial cualitativa denominados restringidos, porque están restringidos a las diferencias cualitativas que caracterizan a los ARN maduros de las dos situaciones fisiopatológicas.

- Los ARN de una de las situaciones son ARNm o totales maduros mientras los ARN de la otra situación son ARN premensajeros, no madurados por corte y empalme, aislados según las técnicas conocidas por el experto en la técnica, a partir de núcleos celulares. En este caso, los bancos obtenidos son bancos de detección sistemática diferencial denominados complejos, ya que no están restringidos a las diferencias entre ARN maduros sino que comprenden todo el repertorio de los cortes y empalmes transcritos en una situación y eliminados en la otra, con todos los intrones.

- finalmente, los ARN pueden provenir de una sola situación fisiopatológica y, en este caso, la detección sistemática diferencial implica los ARN maduros y los premensajeros de una misma muestra. En este caso, los bancos obtenidos son bancos de detección sistemática diferencial cualitativa autólogos. El interés de dichos bancos es que reúnen exclusivamente el repertorio de los intrones transcritos en una situación dada. Su hibridación con una sonda que proviene de ARN maduros de otra situación determina rápidamente si esta situación está caracterizada por una retención de intrones a la vez que permite fácilmente su identificación.

Generalmente, los bancos se generan por exposición, en medio sólido (especialmente en medio gelificado), de un cultivo celular transformado con los ácidos nucleicos clonados. La transformación se realiza por cualquier técnica conocida por el experto en la técnica (transfección, fosfato de calcio, electroporación, infección con bacteriófagos, etc). El cultivo celular es generalmente un cultivo de bacterias, tales como por ejemplo las bacterias *E. coli*. Se puede tratar igualmente de cultivos de células eucariotas, especialmente de células eucariotas inferiores (levaduras, por ejemplo). Esta exposición se puede realizar en una placa o sobre cualquier otro soporte adaptado, en condiciones estériles. Además, estos cultivos expuestos en medio gelificado se pueden almacenar en forma congelada por ejemplo (en glicerol u otro agente adaptado). Estos bancos se pueden utilizar naturalmente para la producción de "réplicas", es decir, de copias según las técnicas habituales detalladas más adelante. Además, estos bancos sirven generalmente para preparar un banco amplificado, es decir, un banco que comprende cada clon en forma amplificada. Un banco amplificado se prepara como sigue: a partir del cultivo expuesto, todos los clones celulares se recuperan y se acondicionan para ser conservados en forma congelada o en frío, en cualquier medio adaptado. Este banco amplificado se realiza ventajosamente a partir de cultivos de bacterias *E. coli*, y se conserva a 4°C, en condiciones estériles. Este banco amplificado permite la preparación y la reproducción ilimitada de cualquier banco posterior que contiene estos clones, sobre diferentes soportes, para diferentes aplicaciones. Un banco como éste permite además el aislamiento y la caracterización de cualquier clon de interés. Cada uno de los clones que constituyen los bancos de la invención es en efecto un elemento característico de una situación fisiológica, y constituye por lo tanto una diana particularmente interesante para diferentes estudios tales como la búsqueda de marcadores, la preparación de anticuerpos, el diagnóstico, el tratamiento para la transferencia de genes, etc. Estas diferentes aplicaciones se discuten con más detalle más adelante. El banco se prepara generalmente como se ha descrito anteriormente por exposición de los cultivos en un medio gelificado, sobre un soporte adaptado (placa de petri, por ejemplo). El interés de utilizar un medio gelificado es que cada colonia se puede separar e individualizar. A partir de este cultivo, se pueden preparar réplicas idénticas en cantidades importantes por simple "réplica" sobre cualquier soporte apropiado según las técnicas del experto en la técnica. Así, la réplica se puede realizar mediante filtros, membranas (nailon, nitrocelulosa, etc) permitiendo la fijación de los cultivos. Después, los filtros se pueden almacenar tal cual, a 4°C por ejemplo, en forma desecada, en cualquier tipo de acondicionamiento que no altere los ácidos nucleicos. Igualmente, los filtros se pueden tratar de manera que se eliminan las células, proteínas, etc, y sólo se conservan los componentes tales como los ácidos nucleicos. Estos tratamientos pueden comprender especialmente proteasas, detergentes, etc. Los filtros tratados se pueden conservar igualmente en cualquier dispositivo o cualquier condición adaptada a los ácidos nucleicos.

Igualmente, los bancos de ácidos nucleicos se pueden preparar directamente a partir de los ácidos nucleicos, por deposición sobre biochips o cualquier otro dispositivo apropiado.

La invención se refiere igualmente a cualquier composición o banco que comprende oligonucleótidos específicos de cortes y empalmes alternativos que distinguen dos situaciones fisiológicas. Se trata ventajosamente de oligonucleótidos de hebra simple, que comprenden de 5 a 50-mer, por ejemplo, alrededor de aproximadamente 25-mer.

Estos oligonucleótidos son específicos de cortes y empalmes alternativos representativos de una situación o de un tipo de situación fisiológica. Así, dichos oligonucleótidos pueden ser, por ejemplo, oligonucleótidos representativos de eventos de cortes y empalmes alternativos característicos de situaciones de apoptosis. En efecto, se ha descrito en la bibliografía que determinados cortes y empalmes alternativos se observaban en el marco de situaciones apoptóticas. Se trata, por ejemplo, de cortes y empalmes en los genes *Bclx*, *Bax*, *Fas* o *Grb2* especialmente. A partir de los datos publicados y de las secuencias accesibles en la bibliografía y/o en bases de datos, es posible crear oligonucleótidos específicos de formas cortadas y empalmadas y no cortadas y empalmadas. Estos oligonucleótidos se pueden crear, por ejemplo, según la estrategia siguiente:

(a) identificación de una proteína o de un evento de corte y empalme característico de una situación de apoptosis y de la secuencia del dominio cortado y empalmado. Esta identificación puede estar basada en los datos publicados o por compilación de secuencias accesibles en bases de datos;

(b) síntesis artificial de uno o varios oligonucleótidos correspondientes a una o varias regiones de este dominio, que permiten, por lo tanto, por hibridación, la puesta en evidencia de la forma no cortada y empalmada en los ARN de una muestra de ensayo;

5 (c) síntesis artificial de uno o varios oligonucleótidos correspondientes a la región de unión entre los dos dominios separados por el dominio cortado y empalmado; permitiendo así, por hibridación, poner en evidencia la forma cortada y empalmada en los ARN de una muestra de ensayo;

(d) reproducción de las etapas (a) a (c) anteriores con otras proteínas o eventos de cortes y empalmes característicos de una situación de apoptosis;

10 (e) transferencia sobre un primer soporte apropiado del o de los oligonucleótidos específicos de las formas apoptóticas de los mensajeros identificados anteriormente, y, sobre otro soporte apropiado, del o de los oligonucleótidos específicos de las formas no apoptóticas.

Los dos soportes así obtenidos se pueden utilizar para ensayar el estado fisiológico de células o muestras de ensayo, y especialmente su estado apoptótico, por hibridación de una preparación de ácidos nucleicos de estas células o muestras.

15 Otros bancos similares se pueden generar con oligonucleótidos específicos de estados fisiopatológicos diferentes (neurodegeneración, toxicidad, proliferación, etc.) y así permitir una ampliación de los campos de aplicaciones.

20 Los bancos de intrones o de exones alternativos pueden ser también bancos de datos informáticos constituidos por análisis sistemático de los bancos de datos que reagrupan las informaciones relativas al genoma de tal o cual organismo, tejido o cultivo celular. En este caso, los datos obtenidos por constitución de dichos bancos virtuales se pueden utilizar para generar cebadores oligonucleotídicos que se utilizarán para ensayar en paralelo dos situaciones fisiopatológicas.

25 Los datos de los bancos informáticos se pueden utilizar igualmente para derivar sondas nucleotídicas generales, representativas de una clase de proteínas o aún específicas de una secuencia definida. Estas sondas se pueden aplicar sobre bancos de clones procedentes de diferentes técnicas de clonación de los intrones y exones alternativos con el fin de obtener una imagen de la complejidad de estos bancos moleculares y determinar rápidamente si tal o cual clase de proteínas o tal o cual secuencia determinada está cortada y empalmada diferencialmente entre dos estados fisiopatológicos distintos.

Chips con ADN

30 La invención se refiere igualmente a cualquier soporte (membrana, filtro, biochip, chip, etc) que comprende un banco o una composición de ácidos nucleicos tal como se define aquí arriba. La invención describe igualmente cualquier kit o soporte que comprende varios bancos, especialmente un banco representativo de las cualidades de un estado fisiológico de ensayo con relación a un estado fisiológico de referencia y, como control, un banco representativo de las cualidades del estado fisiológico de referencia con relación al estado fisiológico de ensayo ("par de bancos"). Un kit ventajoso según la invención comprende por lo tanto dos bancos cualitativos diferenciales de dos situaciones fisiológicas (un "par de bancos"). Según un modo de realización particular, los kits de la invención comprenden 35 varios pares de bancos tales como se definen aquí arriba, que corresponden a diferentes estados fisiológicos o a diferentes muestras biológicas, por ejemplo. Los kits pueden comprender por ejemplo estos distintos pares de bancos depositados en serie sobre un mismo soporte.

Aplicaciones

40 Las composiciones según la invención se pueden utilizar para la identificación de moléculas de interés terapéutico o de diagnóstico, o de proteínas o de dominios proteicos afectados en una patología.

45 Uno de los éxitos de estas técnicas es, en efecto, el de identificar, en el interior de un mensajero, y por consiguiente de la proteína correspondiente, los dominios funcionales que están afectados en una patología dada. Esto permite asignar a un dominio dado una importancia en el desarrollo o el mantenimiento de un estado patológico. La ventaja inmediata de restringir a un dominio preciso de una proteína el impacto de una desregulación patológica es proponer éste como una diana relevante para una detección sistemática de pequeñas moléculas con objetivo terapéutico. Estas informaciones constituyen igualmente llaves que permiten concebir polipéptidos con actividad terapéutica suministrables mediante terapia génica; Estos polipéptidos pueden ser especialmente anticuerpos de cadena simple derivados de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra los dominios identificados mediante las técnicas descritas 50 aquí antes.

55 Los cortes y empalmes alternativos de exones que diferencian dos estados fisiopatológicos traducen un nivel de regulación de la expresión genética que permite modular (más precisamente abolir o instaurar) una o varias funciones de una proteína dada. Así, siendo codificados la mayoría de los dominios estructurales y funcionales (SH2, SH3, PTB, PDZ y los dominios catalíticos de distintas enzimas...) por varios exones contiguos, se pueden presentar dos configuraciones:

i) Los dominios están truncados en la situación patológica (Zhu, Q. et al, 1994, J. Exp. Med., vol 180, nº 2, p 461-470); esto indica que los caminos de señalización que implican estos dominios deben ser restaurados en un objetivo terapéutico.

- 5 ii) Los dominios se mantienen durante una patología mientras que están ausentes en una situación sana; estos dominios se pueden considerar como dianas de detección sistemática de pequeñas moléculas químicas destinadas a antagonizar las señales transducidas por medio de estos dominios.

Las secuencias cortadas y empalmadas diferencialmente pueden corresponder a regiones no codificantes situadas en 5' o en 3' de la secuencia codificante, o a intrones que intervienen entre dos exones codificantes. En las regiones no codificantes, estos cortes y empalmes diferenciales pueden traducir una modificación de la estabilidad o de la traducibilidad del mensajero (Bloom, T.J., y Beavo, J.A., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol 93, nº 24, p 14188-14192; Ambartsumian, N. et al., 1995, Gene, vol 159, nº 1, p 125-130). Por lo tanto, estos fenómenos se deben de buscar en base a estas informaciones y pueden poner en evidencia que la acumulación o la desaparición de la proteína correspondiente la designa así como diana de interés. Cuando la retención de un intrón se produce en una secuencia codificante, frecuentemente, sigue un truncamiento de la proteína natural mediante introducción de codón de parada en la fase de lectura (Varesco, L., et al, 1994, Hum. Genet., vol 93, nº 3, p 281-286; Canton, H., et al., 1996, Mol. Pharmacol., vol 50, nº 4, p 799-807; Ion, A., et al, 1996, Am. J. Hum. Genet., vol 58, nº 6, p 1185-1191). Antes de encontrar este codón de parada, se produce generalmente una lectura de varios codones suplementarios, lo que lleva a adjuntar a la parte ya traducida una secuencia específica, testigo proteico del corte y empalme alternativo. Estos aminoácidos suplementarios se pueden utilizar para generar anticuerpos específicos de la forma alternativa característica de la situación patológica. Después, estos anticuerpos se pueden utilizar como herramientas de diagnóstico. La proteína truncada ve sus propiedades modificadas, incluso alteradas. Así, se pueden amputar enzimas de su dominio catalítico o de su dominio regulador, volviéndose inactivas o constitutivamente activadas. Los adaptadores pueden perder su capacidad para conectar a diferentes parejas de una cascada de señalización (Watanabe, K. et al, 1995, J. Biol. Chem., vol 270, nº 23, p 13733-13739). Los resultados de corte y empalme de los receptores pueden dar lugar a receptores que han perdido su capacidad de unir su ligando (Nakajima, T. et al, 1996, Life Sci., vol 58, nº 9, p 761-768), y pueden igualmente generar formas de receptores solubles mediante liberación de su dominio extracelular (Cheng J., 1994, Science, vol 263, nº 5154, p 1759-1762). En este caso, se pueden prever ensayos diagnósticos, basados en la circulación en los distintos fluidos fisiológicos de forma soluble de receptor a un ligando dado.

- 30 Las composiciones de la invención se pueden utilizar para la identificación de dominios antigénicos específicos de proteínas implicadas en una patología o para el diagnóstico de patologías.

A título de ejemplo más específico, la invención permite ventajosamente poner en evidencia genes supresores de tumores. En efecto, numerosos ejemplos indican que uno de los modos de desactivación de los genes supresores durante la progresión tumoral, es una desactivación mediante modulación del corte y empalme de formas alternativas.

Así, en los carcinomas pulmonares con células pequeñas, el gen de la proteína p130 que pertenece a la familia RB (proteína del retinoblastoma) está mutado en un sitio de consenso de corte y empalme. La secuencia de esta mutación es la eliminación del exón 2 y una no síntesis de proteína debido a la presencia de un codón de parada precoz. Esta observación ha sido la primera en subrayar la importancia de los miembros de la familia RB en la tumorigénesis. Igualmente, en algunos cánceres del pulmón de células no pequeñas, el gen de la proteína p16INK4A, proteína que es un inhibidor de las quinasas cdk4 y cdk6 dependientes de ciclina, está mutado en un sitio donante de corte y empalme. El resultado de esta mutación es la producción de una proteína tronqueada con semivida corta, lo que tiene por consecuencia la acumulación de las formas fosforiladas, inactivas, de RB. Por otra parte, WT1, el gen supresor de tumor de Wilms, se transcribe en varios ARN mensajeros generados mediante cortes y empalmes alternativos. En los cánceres de mama, las proporciones relativas de las diferentes variantes están modificadas con relación al tejido sano, suministrando herramientas de diagnóstico y pistas para comprender la importancia de los diferentes dominios funcionales de WT1 en la progresión tumoral. Este mismo fenómeno de modificación de las relaciones entre diferentes formas de ARN mensajeros y de isoformas proteicas durante la transformación celular se vuelve a encontrar para la neurofibrina NF1. Además, esta noción de modulación de los fenómenos de corte y empalme que firma la progresión tumoral se sostiene igualmente por el ejemplo de HDM2, cuyos 5 cortes y empalmes alternativos se detectan en los carcinomas ováricos y pancreáticos, y cuyas expresiones aumentan según el estadio de avance tumoral. Por otra parte, en los cánceres de la cabeza y del cuello, uno de los mecanismos de desactivación de p53 implica una mutación en un sitio de consenso de corte y empalme.

- 55 Las composiciones de la invención se pueden utilizar igualmente para anticipar (predecir) el potencial tóxico de compuestos de ensayo.

Los programas genéticos introducidos durante el tratamiento de células o de tejidos mediante agentes tóxicos se correlacionan, en gran parte, con los fenómenos de apoptosis o muerte celular programada. La importancia de los fenómenos de corte y empalme alternativo en la regulación de estas vías apoptóticas se ilustra bien en la bibliografía. Sin embargo, ninguna tecnología genómica descrita hasta ahora permitía buscar sistemáticamente y

aislar de manera exhaustiva las variaciones de secuencias debidas a cortes y empalmes alternativos, y que distinga dos situaciones fisiopatológicas dadas.

Las composiciones de la invención se pueden utilizar igualmente, por lo tanto, para la detección o el seguimiento del potencial tóxico y/o terapéutico de un compuesto basado en la detección de formas y/o de perfiles de corte y empalme inducidos por este compuesto sobre una muestra biológica.

Ejemplos de aplicación de tales bancos se pueden suministrar mediante modelos de cultivo de hepatocitos, tal como la línea HepG2, de células epiteliales renales, tal como la línea HK-2, o de células endoteliales, tal como la línea ECV304, tratadas mediante agentes tóxicos tal como etanol, camptotecina o PMA.

Se puede igualmente suministrar un buen ejemplo mediante el uso en cosmetología de modelos de cultivo de pieles tratadas o no mediante agentes tóxicos o irritantes.

Las composiciones de la invención se pueden utilizar igualmente para evaluar (predecir) o mejorar el potencial terapéutico de compuestos de ensayo (genofarmacología).

En esta utilización, el principio utilizado es muy cercano al descrito anteriormente. Se establecen bancos diferenciales de referencia entre los ADNc y los ARN de un cultivo celular o de un órgano en una situación de control y de su equivalente mimético de un modelo de patología. Entonces, la eficacia terapéutica de un producto se puede evaluar siguiendo su capacidad de antagonizar las variaciones cualitativas de la expresión génica que son específicas del modelo patológico. Esto se pone en evidencia mediante la modificación del perfil de hibridación de una sonda que proviene del modelo patológico sobre los bancos de referencias: sin tratamiento, la sonda hibrida solamente con el banco que contiene las firmas específicas de la enfermedad. Tras tratamiento con un producto eficaz, la sonda aunque proviene del modelo patológico hibrida preferentemente con el otro banco, que lleva las firmas del modelo equivalente sano.

Un ejemplo de tal aplicación se puede suministrar mediante un modelo de apoptosis mimético de algunos aspectos de la neurodegeneración que son antagonizados por factores tróficos de referencia. Así, las células derivadas de feocromocitomas PC12 diferenciadas en cuerpos neuronales en presencia de NGF entran en apoptosis mediante eliminación de este factor de crecimiento. Esta apoptosis se acompaña por la expresión de numerosos marcadores de muerte celular programada de los cuales varios se regulan mediante corte y empalme alternativo y cuya aparición se inhibe mediante acción de IGF1. Dos bancos que provienen de detección sistemática diferencial cualitativa se establecen a partir de ARNm extraídos de células PC12 diferenciadas entradas en apoptosis mediante eliminación de NGF por una parte, y a partir de PC12 diferenciadas salvaguardadas de la apoptosis mediante la adición de IGF1 por otra parte. En estos bancos se pueden hibridar sondas realizadas a partir de ARNm extraídos de PC12 diferenciadas entradas en apoptosis y cuya supervivencia se mejora mediante tratamiento con un producto neuroprotector a ensayar. La eficacia de la inversión de las características cualitativas inducidas por el compuesto de ensayo se puede por lo tanto apreciar mediante la capacidad de la sonda para hibridar específicamente con los clones específicos del banco representativo de las células cuya supervivencia está mejorada. Después, este ensayo se puede utilizar para probar la eficacia de derivados del compuesto o de cualquier otra nueva familia de compuestos neuroprotectores, y para mejorar el perfil farmacológico.

Las composiciones de la invención permiten igualmente evaluar la eficacia de un compuesto de ensayo neuroprotector mediante hibridación con un banco diferencial según la invención, entre una célula nerviosa sana, y presentando esta célula un modelo de neurodegeneración.

Como se indica anteriormente, la invención puede además ser utilizada para mejorar las propiedades de un compuesto, ensayando diferentes derivados para su capacidad de inducir un perfil de hibridación cercano del banco representativo de la muestra sana.

La invención se puede utilizar también en farmacogenómica, es decir, para evaluar (predecir) la respuesta de un paciente a un compuesto o tratamiento de ensayo.

La farmacogenómica tiene como ambición establecer perfiles genéticos de pacientes a fin de determinar qué tratamiento es susceptible de tener más éxito para una patología dada. Las técnicas descritas en la presente invención permiten a este respecto establecer bancos de ADNc representativos de las diferencias cualitativas que existen entre una situación patológica que responde a un tratamiento dado y otra que responde poco o mal, susceptible de ser el objeto de otra estrategia terapéutica. Estos bancos de referencias establecidos se pueden hibridar con sondas realizadas a partir de ARN mensajeros de pacientes. Los resultados de hibridación permiten saber qué paciente tiene un perfil de hibridación que corresponde a la situación de respondedor o de no respondedor y así afinar la elección del tratamiento.

En esta aplicación, el objetivo es, por una parte, proponer en función del paciente el tratamiento más apropiado, más susceptible de ser exitoso y, por otra parte, enrolar en un tratamiento a los pacientes más susceptibles de responder con éxito. Como en las demás aplicaciones, dos bancos de detección sistemática diferencial cualitativa se realizan: uno a partir de un modelo o de una muestra patológica conocida por responder a un tratamiento, el otro a partir de otro modelo o muestra patológica que responde poco o mal a la acción terapéutica. Después, estos dos bancos se

hibridan con sondas que provienen de ARNm extraídos de biopsias de distintos pacientes. Según que estas sondas hibriden preferentemente con los cortes y empalmes alternativos específicos de una u otra situación, los pacientes se pueden repartir en respondedores o en no respondedores al tratamiento de referencia que ha definido los modelos de partida.

- 5 Después, el uso de filtros o cualquier otro soporte que presente los ADNc de estos bancos permite realizar hibridaciones con sondas derivadas de ARNm de biopsias de tumores de las cuales se quiere anticipar la respuesta a dicho tratamiento. Estos resultados permiten así proponer una inserción optimizada de los pacientes en un protocolo clínico.

- 10 Un ejemplo particular de este procedimiento consiste en determinar la respuesta de tumores a un tratamiento mediante el gen supresor de tumor p53. En efecto, se ha descrito que algunos pacientes y algunos tumores responden más o menos bien a este tipo de tratamiento (Roth et al., Nature Medicine, 2 (1995) 958). Por lo tanto, es importante poder determinar qué tipos de tumores y/o qué pacientes son sensibles a un tratamiento mediante terapia génica por p53 salvaje, con el fin de optimizar el tratamiento y favorecer el enrolamiento de los pacientes en los ensayos clínicos en curso. El procedimiento de la invención permite ventajosamente facilitar estas etapas proponiendo bancos específicos de las cualidades de células respondedoras y de células no respondedoras a p53. Ejemplos de modelos celulares sensibles o resistentes a p53 se describen por ejemplo por Sabbatini et al. (Genes Dev. 9 (1995) 2184) o por Roemer et al. (Oncogene 12 (1996) 2069). La hibridación de estos bancos con sondas derivadas de biopsias de pacientes permite fácilmente evaluar su potencial de respuesta. Además, los bancos específicos permiten igualmente identificar ácidos nucleicos implicados en la respuesta a p53.

- 20 Por lo tanto, la presente solicitud se refiere igualmente al establecimiento de composiciones a partir de muestras patológicas, o de modelos de patología, que responden diferentemente al menos a un agente farmacológico. Se refiere también a la exposición de estos bancos sobre filtros o sobre soportes conocidos por el experto en la técnica (nitrocelulosa, nailon...). Ventajosamente, estos soportes pueden ser chips o chips que definen así chips de farmacogenómica.

- 25 Aquí esta invención describe así que variaciones en las formas y/o perfiles de cortes y empalmes constituyen fuentes de marcadores de farmacogenómica, es decir fuentes de marcadores que permiten la puesta en evidencia de la capacidad y de la manera de un paciente a responder a tratamientos. Para ello, la invención describe igualmente el uso de la intervariabilidad, entre individuos, de isoformas generadas mediante corte y empalme alternativo (análisis del espliceoma) como fuente de marcadores de farmacogenómica. Aquí esta invención describe también el uso de modificaciones de corte y empalme inducidas por tratamientos como fuente de marcadores de farmacogenómica.

- 30 Estos distintos ejemplos generales ilustran el interés de las composiciones de la invención en estudios de genotoxicidad, genofarmacología, farmacogenomía así como en búsquedas de dianas de interés diagnóstico o terapéutico. Otras ventajas y aplicaciones de la presente invención aparecerán con la lectura de los ejemplos siguientes, que se deben considerar como ilustrativos y no limitativos. Los campos de aplicación de la invención se representan en la figura 7.

LEYENDA DE LAS FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de las detecciones sistemáticas diferenciales según la invención (figura 1A) utilizando una (figura 1B) o dos (figura 1C) hibridaciones, y uso de los ácidos nucleicos (figura 1D).

- 40 Figura 2. Representación esquemática que describe la obtención de híbridos ARN/ADN que permiten caracterizar las secuencias de ARN de hebra simple, firmas específicas del estado patológico o del estado sano.

Figura 3. Representación esquemática que describe un medio que permite aislar y caracterizar mediante secuenciación las secuencias de ARN de hebra simple específicas de una situación patológica o de una situación sana.

- 45 Figura 4. Representación esquemática que describe otro medio que permite caracterizar mediante secuenciación todo o parte de los ARN de hebra simple específicos de una situación patológica o de una situación sana.

Figura 5. Representación esquemática que permite aislar los productos de cortes y empalmes alternativos gracias a estructuras de bucle R.

- 50 Figura 6. Representación esquemática de la detección sistemática diferencial cualitativa mediante restricción de bucles (formación de homodúplex ADNc/ADNc y extracciones de las informaciones, Figura 6A), y descripción de las informaciones obtenidas (Figura 6B).

Figura 7. Aportaciones de la detección sistemática diferencial cualitativa en las distintas etapas de la búsqueda y del desarrollo farmacéutico.

- 55 Figura 8. Aislamiento de un dominio diferencialmente cortado y empalmado en el modelo grb2/grb33. A) Producción de los ARN sintéticos de grb2 y de grb33. B) Seguimiento de las primeras etapas DATAS que conducen a la

caracterización de un fragmento ARN que corresponde al dominio diferencialmente cortado y empalmado; 1: ARN de grb2, 2: Hibridación entre el ARN de grb2 y el ADNc de grb33, 3: Hibridación entre el ARN de grb2 y el ADNc de grb2, 4: Hibridación entre el ARN de grb2 y agua, 5: Sobrenadante tras paso sobre perlas de estreptavidina de (2), 6: Sobrenadante tras paso sobre perlas de estreptavidina de (3), 7: Sobrenadante tras paso sobre perlas de estreptavidina de (4), 8: Digestión del dúplex ARN grb2 / ADNc grb33 con la ARNasa H, 9: Digestión del dúplex ARN grb2 / ADNc grb2 con la ARNasa H, 10: Digestión del ARN grb2 con la ARNasa H, 11: igual que (8) tras paso sobre columna de exclusión, 12: igual que (9) tras paso sobre columna de exclusión, 13: igual que (10) tras paso sobre columna de exclusión.

Figura 9. Representación de las poblaciones de ARN no emparejados que provienen de la digestión mediante la ARNasa H a partir de dúplex ARN / ADNc de hebra simple que provienen de células HepG2 tratadas o no con etanol.

Figura 10. Representación de las poblaciones de ADN doble hebra generadas mediante una de las variantes de DATAS. 1 a 12: PCR a partir de poblaciones de bucles de ARN que provienen de la digestión con la ARNasa H, 13: PCR a partir de ADNc total.

Figura 11. Aplicación de la variante de DATAS haciendo intervenir los ADNc doble hebra sobre el modelo grb2/grb33. A) Análisis sobre gel de agarosa de los complejos tras hibridación: 1: ADNc de doble hebra grb2 / ARN grb33, 2: ADNc doble hebra grb2 / ARN grb2, 3: ADNc de doble hebra grb2 / agua. B) Digestión de las muestras 1, 2 y 3 de A) mediante la nucleasa S1 y la nucleasa "Mung Bean": 1 a 3: complejos 1 a 3 antes del tratamiento con glioxal; 4 a 6: complejos 1 a 3 después del tratamiento con glioxal; 7 a 9: Digestiones de 1 a 3 mediante nucleasa S1; 10 a 12: Digestiones de 1 a 3 mediante nucleasa Mung Bean.

Figura 12. Aplicación de la variante de DATAS haciendo intervenir los ADNc doble hebra y la ARNasa H sobre un sistema de células HepG2 tratadas o no con etanol 0,1M durante 18 horas. Los insertos clonados se han transferido sobre membrana tras electroforesis sobre gel de agarosa, y se han sometido a la hibridación con la ayuda de sondas que corresponden a las situaciones tratadas (Tr) o no (NT).

Figura 13. Modo operatorio para evaluar el potencial tóxico de un producto.

Figura 14. Modo operatorio para seguir la eficacia de un producto.

Figura 15. Modo operatorio para estudiar la susceptibilidad de una situación patológica a un tratamiento.

Figura 16. Análisis de hibridación diferencial de clones que provienen de DATAS a partir de ARN extraídos de células inducidas y de ADNc extraídos de células no inducidas. A) Uso de colonias bacterianas depositadas y lisadas sobre membrana. B) Transferencia Southern efectuada a partir de una selección de clones de A.

Figura 17. Secuencias nucleotídica y peptídica de ΔSHC (SEQ ID NO: 9 y 10).

Figura 18. Ensayos de citotoxicidad y de apoptosis sobre células HepG2 tratadas A) con etanol; B) con camptotecina; C) con PMA.

Figura 19. Reacciones de RT-PCR efectuadas a partir de ARN extraídos de células HepG2 tratadas o no (N.T) mediante etanol (Eth.), camptotecina (Camp.) y PMA (PMA) permitiendo la amplificación de fragmentos que corresponden a dominios de MACH-a, BCL-X, FASR y beta-actina como control de normalización.

En los ejemplos y la descripción de la invención, se hace referencia a las secuencias de la Lista de Secuencias, que contiene el texto libre siguiente:

<223> OLIGO

<223> OLIGO

<223> OLIGO

<223> OLIGO

<223> OLIGO

<223> OLIGO

<223> OLIGO

<223> OLIGO

<223> OLIGO

<223> OLIGO

<223> OLIGO

<223> OLIGO

EJEMPLOS

5 1. CLONACIÓN DIFERENCIAL DE LOS CORTES Y EMPALMES ALTERNATIVOS Y OTRAS MODIFICACIONES CUALITATIVAS DE LOS ARN UTILIZANDO ADNc DE HEBRA SIMPLE

Los ARN mensajeros que corresponden a dos situaciones, una normal (mN) y la otra patológica (mP), se aíslan a partir de biopsias o de células en cultivo. Estos ARN mensajeros se convierten en ADN complementarios (cN) y (cP) con la ayuda de la transcriptasa inversa (RT). Después, se realizan híbridos mN/cP y cN/mP en fase líquida (véase el esquema de la figura 2 que ilustra uno de los dos casos que dan lugar a la formación de cN/mP).

10 Estos híbridos se realizan ventajosamente en emulsión fenólica (técnica PERT o Phenol Emulsion DNA Reassociation Technique) mantenida por termociclos (Miller, R., D. y Riblet, R., 1995, Nucleic Acids Research, vol 23, nº 12, p 2339-2340). Típicamente, esta etapa de hibridación se realiza entre 0,1 a 1 µg de ARN poliA+ y 0,1 a 2 µg de ADN complementario en una emulsión formada de una fase acuosa (tampón fosfato de sodio 120 mM, NaCl 2,5M, EDTA 10 mM) y de una fase orgánica que representa 8% de la fase acuosa y constituida de fenol bidestilado.

15 Igualmente, se usa ventajosamente otra técnica a fin de obtener heterodúplex: al final de la transcripción inversa, el ADNc neosintetizado se separa del cebador oligodT biotinilado sobre columna de exclusión. Se coprecipita 0,1 a 2 µg de este ADNc con 0,1 a 1 µg de ARN poliA+ en presencia de 0,3M de acetato de sodio y de dos volúmenes de etanol. Estos ácidos nucleicos coprecipitados se recogen en 30 µl de un tampón de hibridación que contiene 80% de formamida, 40 mM de PIPES (ácido piperazinabis(2-etanosulfónico)) pH 6,4, 0,4 M de NaCl y 1 mM de EDTA.

20 Los ácidos nucleicos en disolución se desnaturalizan mediante calentamiento 10 min. a 85°C, después se realiza su hibridación durante al menos 16h y hasta 48h a 40°C.

El interés de la técnica de hibridación en formamida es permitir condiciones de selectividad más grande durante el emparejamiento de las hebras de ADNc y de ARN.

25 Al final de cada una de estas dos técnicas de hibridación, se dispone de heterodúplex ARN/ADN cuya perfección de emparejamiento depende de la eficacia de la RT para sintetizar la longitud total de los ADNc. Las regiones de ARN (y de ADN) que corresponden a los cortes y empalmes alternativos que diferencian los dos estados fisiopatológicos estudiados permanecen igualmente en forma de hebras simples.

Después, el objetivo del método es de caracterizar la información genética llevada por estos bucles de corte y empalme.

30 Para ello, los heterodúplex se purifican mediante captura de los ADNc (cebadores con oligodT biotinilados) gracias a perlas que llevan grupos estreptavidinas. Ventajosamente, estas perlas son perlas que tienen propiedades magnéticas, lo que permite separarlas de los ARN no introducidos en los heterodúplex mediante acción de un separador magnético. Tales perlas y tales separadores están disponibles comercialmente.

35 Los heterodúplex se aíslan en este momento del procedimiento así como los ADNc no introducidos en hibridaciones con ARN. Después, este material se somete a la acción de la ARNasaH que va a hidrolizar específicamente las regiones de ARN hibridadas con los ADNc. Los productos resultantes de esta hidrólisis son por una parte los ADNc y por otra parte los fragmentos de ARN que corresponden a los bucles de corte y empalme o a las regiones no hibridadas por el hecho del rendimiento parcial de la transcriptasa inversa. Los fragmentos de ARN se separan del ADN mediante separación magnética según el mismo modo de realización que el mencionado más arriba y mediante digestión con la ADNasa libre de cualquier contaminación por una actividad ARNasa.

40 1.1. Validación de la técnica DATAS sobre las variantes de corte y empalme del gen Grb2

Se realizó una puesta en evidencia de la factibilidad de este enfoque sobre un sistema in vitro utilizando un ARN que corresponde a la región que codifica Grb2 por una parte y, un ADNc de hebra simple complementario a la región que codifica Grb3.3. Grb2 es un gen que posee una fase que codifica 651 pares de bases. Grb33 es una isoforma de grb2 generada mediante corte y empalme alternativo y que comprende una supresión de 121 pares de bases en el dominio funcional SH2 de grb2 (Fath et al., Science (1994), 264, 971-4). Los ARN de Grb2 y de Grb33 se sintetizan según las técnicas conocidas por el experto en la técnica a partir de un plásmido que contiene la secuencia que codifica Grb2 o Grb33, bajo control del promotor T7 con la ayuda del kit RiboMax (Promega). El análisis de los productos demuestra una síntesis homogénea (figura 8A). Con un objetivo de visualización, el ARN de Grb2 ha sido igualmente hecho radioactivo mediante incorporación de una base marcada durante la transcripción in vitro con la ayuda del kit RiboProbe (Promega). Los ADNc de Grb2 y Grb3.3 han sido sintetizados mediante transcripción inv4ersa a partir de los ARN sintéticos producidos aquí arriba, del kit Superscript II (Life Technologies) y mediante un cebador oligonucleotídico biotinilado común a Grb2 y a Grb33 que corresponde al complementario de la secuencia (618-639) de Grb2. Los ARN y ADNc han sido tratados según las indicaciones de los proveedores (Promega, Life

Technologies), purificados sobre columna de exclusión (sephadex sin ARNasa G25 o G50, 5 Prime, 3 Prime) y cuantificados mediante espectrofotometría.

Las primeras etapas de DATAS se han aplicado asociando, en suspensión 10 ng de ARN marcado de Grb2 con:

1. 100 ng de ADNc de grb33 biotinilado,
2. 100 ng de ADNc de grb2 biotinilado,
3. agua

en 30 µl de tampón de hibridación que contiene 80% de formamida, 40 mM PIPES (pH 6,4), 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA. Los ácidos nucleicos se desnaturalizan mediante calentamiento 10 min. a 85°C, después, la hibridación se realiza durante 16 horas a 40°C. Tras la captura con la ayuda de perlas de estreptavidina, las muestras se tratan con la ARNasa H como se ha descrito anteriormente.

El análisis de estas etapas se realiza mediante electroforesis sobre gel de acrilamida al 6% seguido por un tratamiento de los geles con la ayuda de un Instant imager (Packard Instruments) permitiendo la cualificación y la cuantificación de las especies que provienen del ARN de grb2 marcado (figura 8B). Así, los pocillos 2, 3 y 4 indican que los dúplex grb2/grb33 y grb2/grb2 se han formado de manera cuantitativa. La migración del complejo grb2/grb33 se retrasa con relación a la del ARN de grb2 (pocillo 2) mientras que la del complejo grb2/grb2 se aumenta (pocillo 3). Los pocillos 5, 6 y 7 corresponden a las muestras no retenidas por las perlas de estreptavidina demostrando que 80% de los complejos grb2/grb33 y grb2/grb2 han sido retenidos sobre las perlas mientras que el ARN de grb2 solo, no biotinilado, se encuentra exclusivamente en el sobrenadante de las perlas. El tratamiento con la ARNasa H libera, además de los nucleótidos libres que inmigran más rápidamente que el azul de Bromofenol (BPB) una especie que migra debajo del azul de xileno Cianol (XC) (marcado mediante una flecha en la figura) y eso, específicamente en el pocillo 8 que corresponde al complejo grb2/grb33 con relación a los pocillos 9 y 10 que corresponden al complejo grb2/grb2 y al ARN de grb2. Los pocillos 11, 12 y 13 corresponden a los pocillos 8, 9 y 10 tras paso de las muestras sobre columna de exclusión para eliminar los nucleótidos libres. La migración observada en los pocillos 8 y 11 es la esperada para una molécula de ARN que corresponde a la supresión de 121 nucleótidos que diferencian grb2 de grb33.

Este resultado muestra bien la posibilidad de obtener los bucles de ARN generados mediante la formación de heterodúplex entre dos secuencias derivadas de dos isoformas de corte y empalme.

1.2. Aplicación de la técnica DATAS para la generación de bancos cualitativos de células hepáticas en un estado sano y tóxico

Se estudió una situación más compleja. En el ámbito de la aplicación de la tecnología DATAS como herramienta de predicción de toxicidad de moléculas, se trataron células humanas de tipo hepatocitario, HepG2, mediante etanol 0,1M durante 18 horas. Los ARN han sido extraídos a partir de células tratadas o no. La variante de DATAS descrita aquí arriba (preparación de ADNc sb biotinilados, hibridaciones cruzadas en fase líquida, aplicación de un campo magnético para separar las especies, tratamiento con ARNasaH) se ha aplicado con las células no tratadas en situación de referencia (o situación A), y las células tratadas en situación de ensayo (situación B) (figura 9). No estando los ARN extraídos marcados radiativamente, la visualización de las poblaciones de ARN generadas mediante digestión con la ARNasaH se realiza efectuando una reacción de intercambio del fosfato en 5' de los ARN por un fosfato marcado, con la ayuda de polinucleótido quinasa de T4 y de gamma-P³²ATP. Después, estos marcajes se depositan sobre un gel de acrilamida/urea, y se analizan mediante exposición con la ayuda de un Instant Imager (Packard Instruments). Entonces, se pueden visualizar firmas complejas que provienen de las hibridaciones A/B y B/A con un primer grupo de señales que migran débilmente en el gel y que corresponden a secuencias de ácidos nucleicos de tamaño importante, y un segundo grupo de señales que migran entre 25 y 500 nucleótidos. Estas firmas son de intensidad mucho más débil a partir de la situación A/A lo que sugiere que el etanol puede inducir una reprogramación del corte y empalme de los ARN, traducida por la existencia de señales en A/B y B/A.

1.3. Clonación y preparación de bancos a partir de los ácidos nucleicos identificados.

Después, varias variantes experimentales se pueden prever para clonar estos fragmentos de ARN resistente a la acción de la ARNasa H:

A. Un primer enfoque consiste en aislar estos bucles y en clonarlos (Figura 3).

Según este enfoque, se procede a una ligación de oligonucleótidos en cada uno de los extremos mediante la acción de la ARN ligasa según las condiciones conocidas por el experto en la técnica. Después, estos oligonucleótidos se utilizan como cebadores para efectuar una RT PCR. Los productos de PCR se clonan y se detectan sistemáticamente con sondas de ADN complementarias totales que corresponden a las dos situaciones fisiopatológicas de interés. Solamente los clones que hibridan preferentemente con una sola de las dos sondas contienen los bucles de corte y empalme que a continuación se secuencian y/o se utilizan para generar bancos.

B. El segundo enfoque (Figura 4) consiste en efectuar una transcripción inversa sobre el ARN de hebra simple liberado de los heterodúplex tras acción de la ARNasaH, iniciada con la ayuda de cebadores al menos en parte aleatorios. Así, puede tratarse de cebadores aleatorios en 3' y en 5', de cebadores aleatorios en 3' y determinados en 5', o también de oligonucleótidos semi-aleatorios, es decir que comprenden una zona de degeneración y una zona definida.

Según esta estrategia, los cebadores son por lo tanto susceptibles de hibridarse bien en cualquier sitio en el ARN de hebra simple, o bien en cada sucesión de bases fijada por la elección del cebador semi-aleatorio. Una PCR con cebadores que corresponden a los oligonucleótidos descritos aquí arriba, permite obtener a continuación secuencias derivadas de los bucles de corte y empalme.

La figura 10 (pocillos 1 a 12) muestra el análisis sobre gel de acrilamida de los fragmentos de PCR obtenidos a partir de varios ensayos DATAS y acoplados al uso de los oligonucleótidos semi-aleatorios siguientes:

GAGAAGCGTTATNNNNNNNAGGT (SEQ ID NO: 1, X=T)

GAGAAGCGTTATNNNNNNNAGGA (SEQ ID NO: 1, X=A)

GAGAAGCGTTATNNNNNNNAGGC (SEQ ID NO: 1, X=C)

GAGAAGCGTTATNNNNNNNAGGG (SEQ ID NO: 1, X=G)

La comparación con la complejidad de las señales obtenidas utilizando los mismos oligonucleótidos, pero ADNc total como matriz (pocillo 13) demuestra que DATAS ha permitido filtrar ("perfilar") informaciones que corresponden a diferencias cualitativas.

Esta variante se utilizó con el fin de clonar un evento que corresponde al dominio ARN de grb2 generado por acción de la ARNasa H a partir del dúplex ARN grb2 / ADNc de hebra simple de grb33 según el protocolo descrito anteriormente (ejemplo 1.1.). Con este fin, se utilizó un oligonucleótido de secuencia: GAGAAGCGTTATNNNNNNNTCCC (SEQ ID NO: 2), elegido sobre el modelo GAGAAGCGTTATNNNNNNNWXYZ (en el que N se define como anteriormente, W, X e Y representan cada uno una base fija determinada, y Z representa bien una base determinada o bien un grupo 3'-OH, SEQ ID NO: 3) y seleccionado para amplificar un fragmento en la supresión de grb2, permitiendo generar un fragmento PCR cuya clonación y secuenciación ha demostrado que provenía efectivamente del dominio suprimido de grb2 (194-281 en grb2).

Estos dos enfoques permiten por lo tanto la producción de composiciones de ácidos nucleico representativos de los cortes y empalmes diferenciales en las dos situaciones ensayadas que se pueden utilizar como sondas o para construir bancos de ADNc de diferencias cualitativas. La capacidad de la tecnología DATAS para generar bancos perfilados de ADNc representativos de diferencias cualitativas se ilustra igualmente por el ejemplo 1.4. siguiente.

1.4. Producción de bancos perfilados representativos de células endoteliales humanas

Este ejemplo se realizó a partir de una línea de células endoteliales humanas (ECV304). El análisis cualitativo de la expresión genética se realizó a partir de ARN citosólicos extraídos de células en proliferación, por una parte, y de células en anóikis (apoptosis mediante privación de soporte de unión), por otra parte.

Las células ECV se cultivaron en medio 199 con un suplemento de sales de Earle (Life Sciences). Su puesta en anóikis se realizó mediante paso durante 4 horas sobre placas de cultivo tratadas con polyHEMA. Durante la preparación de los ARN, las células se lisaron en un tampón que contiene Nonidet P-40. Después, se apartan los núcleos mediante centrifugación. Después, la disolución de extracto citoplásmico se ajustó a fin de fijar de manera específica el ARN a la matriz de sílice Rneasy según las instrucciones de la empresa Qiagen. Tras lavar, los ARN totales se eluyen en agua tratada con DEPC. Los ARN mensajeros se preparan a partir de los ARN totales mediante separación sobre perlas magnéticas Dynabeads oligo (dT)₂₅ (Dyna). Tras haber puesto en suspensión las perlas en un tampón de fijación, el ARN total se incubó durante 5 min. a temperatura ambiente. Después de la separación magnética y el lavado, las perlas se recogen en un tampón de elución para una incubación a 65°C que libera los ARN mensajeros.

Las síntesis de ADN de primer hebra se efectúan a partir de los ARN mensajeros utilizando la Transcriptasa Inversa SuperScript II o ThermoScript (Life Technologies) con la ayuda de cebadores olido (dT). Después de ARNasaH, los nucleótidos libres se eliminan mediante paso sobre columna Sephadex G50 (5 Prime- 3 Prime). Tras extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol, las muestras se cuantifican mediante absorbancia UV.

Las cantidades requeridas de ARN y de ADNc (en este caso, 200 ng de cada uno) se combinan y se precipitan con etanol. Las muestras se recogen en un volumen de 30 µl en un tampón de hibridación (Hepes (pH 7,2) 40 mM, NaCl 400 mM, EDTA 1mM) con un suplemento de formamida desionizada (80% (v/v), salvo indicación contraria). Tras desnaturalización 5 min. a 70°C, las muestras se incuban una noche a 40°C.

Las perlas de Streptavidina (Dyna) se lavan y después se reacondicionan en un tampón de fijación (2X = Tris-HCl (pH 7,5) 10 mM, NaCl 2M, EDTA 1mM). Las muestras de hibridación se llevan a un volumen de 200 µl con agua, después se ajustan a 200 µl de perlas para una incubación de 60 min. a 30°C. Tras captura sobre imán y lavados de las perlas, éstas se recogen en 150 µl de tampón ARNasaH y después se incuban durante 20 min. a 37°C. Tras

- 5 captura sobre imán, las regiones no hibridadas se han liberado en el sobrenadante que se trata con la ADNasa, después se extrae con fenol ácido /cloroformo, y después se precipita con etanol. Las precipitaciones con etanol de bajas cantidades de ácidos nucleicos se efectúan con la ayuda de un polímero comercial SeedNA (Amersham Pharmacia Biotech) permitiendo recuperar de manera cuantitativa ácidos nucleicos a partir de disoluciones muy diluidas (del orden de ng/ml).
- 10 La síntesis de ADNc a partir de las muestras de ARN que provienen de la acción de la ARNasaH se efectúa a partir de hexanucleótidos aleatorios con la ayuda de Transcriptasa Inversa Superscript II. Después, el ARN se degrada con la ayuda de una mezcla de ARNasaH y de ARNasa T1. El cebador, los nucleótidos no incorporados y las enzimas se separan del ADNc con la ayuda de un cartucho "GlassMAX Spin". Después, el ADNc que corresponde a los bucles de corte y empalme se somete a una reacción de PCR utilizando oligonucleótidos de tipo semi-aleatorio
- 15 ya descritos más arriba en la invención. En este caso, los oligonucleótidos elegidos son:

GAGAAGCGTTATNNNNNCCA (SEQ ID NO: 4)

La reacción de PCR se realiza con la ayuda de Taq Polimerasa sobre 30 ciclos:

- Desnaturalización inicial: 94°C durante 1 min.
- 94°C durante 30 s
- 20 • 55°C durante 30 s
- 72°C durante 30 s
- Extensión final: 72°C durante 5 min.

Los productos de PCR se clonaron en el vector pGEM-T (Promega) que posee un T flotante en los extremos 3' a fin de facilitar la clonación de fragmentos que provienen de la actividad de la Taq Polimerasa. Tras transformación en las bacterias JM109 competentes (Promega), las colonias obtenidas se repican sobre filtro de nitrocelulosa, y se

- 25 hibridan con sondas derivadas de productos de PCR efectuadas sobre ADNc totales de las células en proliferación por una parte, y en anoikis por otra parte. Para estas PCR se utilizan los mismos oligonucleótidos GAGAAGCGTTATNNNNNCCA. En una primera realización experimental, se aislaron 34 clones que hibridan preferentemente con la sonda de las células en apoptosis y 13 clones que hibridan preferentemente con la sonda de las células en proliferación.

Entre estos 13 clones, 3 clones contienen el mismo fragmento de ADNc que deriva del dominio SH2 de la proteína SHC.

La secuencia de este fragmento es la siguiente:

CCACACCTGGCCAGTATGTGCTCACTGGCTTGCAGAGTGGGCAG

CCAGCCTAAGCATTGCACTGG (SEQ ID NO: 5)

- 35 El uso de cebadores de PCR que encuadran el dominio SH2 de SHC (oligo5': GGGACCTGTTTGACATGAAGCCC (SEQ ID NO: 6); oligo3': CAGTTTCCGCTCCACAGGTTGC (SEQ ID NO: 7)) ha permitido caracterizar la supresión del dominio SH2 de SHC que se observa específicamente en las células ECV en anoikis. Con esta pareja de cebador, un solo producto de amplificación que corresponde a un fragmento de ADNc de 382 pares de bases que contiene el dominio SH2 íntegro se obtiene a partir de ARN de células ECV en fase exponencial. Un fragmento
- 40 adicional de 287 pares de bases se observa cuando la PCR se realiza a partir de ARN de células en anoikis. Este fragmento suplementario deriva de un ARN mensajero derivado del mensajero de SHC pero que presenta una supresión.

La secuencia de esta supresión es la siguiente:

GTACGGGAGAGCACGACCACACCTGGCCAGTATGTGCTCACTGG

CTTGCAGAGTGGGCAGCCTAAGCATTGCTACTGGTGGACCCTGAGGG

TGTG (SEQ ID NO: 8).

Esta supresión corresponde a las bases 1198 a 1293 de la fase abierta del mensajero que codifica las formas de 52kDa y 46kDa de la proteína SHC (Pelicci, G. et al., 1992, Cell, 70, p 93-104).

Los datos estructurales de los dominios SH2 así como la bibliografía indican que tal supresión lleva a la pérdida de la afinidad para las fosfotirosinas puesto que engloba los aminoácidos implicados en las interacciones con las tirosinas fosforiladas (Waksman, G. et al, 1992, Nature, vol 358, p 646-653). Siendo las proteínas SHC adaptadores que conectan distintas parejas mediante sus dominios SH2 y PTB (dominio de unión fosfo tirosina), esta supresión genera por lo tanto un dominante negativo natural de SHC que denominamos Δ SHC. Estando los dominios SH2 de las proteínas cuyos genes se secuencian portados por dos exones, es posible que la supresión identificada mediante el método DATAS corresponda a un exón alternativo del gen SHC.

Las secuencias proteicas y nucleicas de Δ SHC son las representadas en la Figura 17 (SEQ ID NO: 9 y 10).

Estando el dominio SH2 de SHC implicado en la transducción de numerosas señales implicadas en la proliferación y la viabilidad celulares, el examen de la secuencia de Δ SHC permite anticipar sus propiedades de dominante negativo sobre la proteína SHC y su capacidad de interferir con distintas señales celulares.

Aquí, se describe igualmente esta nueva forma cortada y empalmada de SHC, el dominio proteico que corresponde al corte y empalme, cualquier anticuerpo o sonda nucleica que permita su detección en una muestra biológica, y sus usos diagnóstico o terapéutico, por ejemplo.

Aquí, se describe particularmente cualquier variante de SHC que comprende al menos una supresión que corresponde a las bases 1198 a 1293, más particularmente una supresión de la secuencia SEQ ID NO: 8. La invención se refiere más específicamente a la variante Δ SHC que tiene la secuencia SEQ ID NO: 9, codificada por la secuencia SEQ ID NO: 10.

Aquí, se describe también cualquier sonda nucleica, oligonucleótido o anticuerpo que permita identificar la variante Δ SHC aquí arriba, y/o cualquier alteración de la relación SHC/ Δ SHC en una muestra biológica. Puede tratarse especialmente de una sonda u oligonucleótido complementario de todo o parte de la secuencia SEQ ID NO: 8, o de un anticuerpo dirigido contra el dominio proteico codificado por esta secuencia. Tales sondas, oligonucleótidos o anticuerpos permiten detectar la presencia de la forma no cortada y empalmada (por ejemplo, SHC) en una muestra biológica.

Los materiales pueden además ser utilizados en paralelo con sondas, oligonucleótidos y/o anticuerpos específicos de la forma cortada y empalmada (por ejemplo, Δ SHC), es decir que corresponde por ejemplo a la región de unión resultante del corte y empalme (localizado alrededor del nucleótido 1198 de la secuencia SEQ ID NO: 10).

Tales materiales se pueden utilizar para el diagnóstico de patologías relacionadas con una inmunodepresión (cáncer, tratamiento inmunosupresor, SIDA, etc.).

Aquí, se describe también cualquier procedimiento de detección sistemática de moléculas basado sobre el bloqueo (i) del dominio cortado y empalmado en la proteína SHC (especialmente para inducir un estado de tolerancia inmunitaria por ejemplo en las enfermedades auto-inmunes o los rechazos de injertos, y los cánceres) o (ii) de las ganancias de función adquiridas mediante la proteína Δ SHC.

Aquí, se describe además el uso terapéutico de Δ SHC, y especialmente para el tratamiento de células cancerosas o de cánceres (ex vivo o in vivo) en los que una hiperfosforilación de la proteína SHC se puede poner en evidencia, por ejemplo. Para ello, aquí se describe también cualquier vector, especialmente viral, que comprende una secuencia que codifica Δ SHC. Se trata preferentemente de un vector capaz de transfectar células cancerosas o en proliferación, tales como células musculares lisas, células endoteliales (restenosis), fibroblastos (fibrosis), preferentemente de origen mamífero, especialmente humano. Como vector viral, se pueden citar especialmente vectores adenovirales, retrovirales, AAV, herpes, etc.

2. CLONACIÓN DIFERENCIAL DE LOS CORTES Y EMPALMES ALTERNATIVOS Y OTRAS MODIFICACIONES CUALITATIVAS DE LOS ARN UTILIZANDO ADN DOBLE HEBRA (FIGURA 5).

Se producen los ARN mensajeros que corresponden a las situaciones normales (mN) y patológicas (mP), así como los ADN complementarios doble hebra correspondientes (dsN y dsP) mediante protocolos clásicos de biología molecular. Entonces, se obtienen estructuras de tipo "bucle R" hibridando mN con dsP y mP con dsN en una disolución que contiene 70% de formamida. Los dominios nucleicos diferencialmente cortados y empalmados entre la situación N y P quedarán en forma de ADN doble hebra. Entonces, las simples hebras de ADN desplazadas se tratan con glioxal con el fin de evitar el redesplazamiento de la hebra de ARN durante la retirada de la formamida. Tras la retirada de la formamida y del glioxal y tras tratamiento con ARNasaH, nos encontramos con estructuras de tipo abeja, los ADN de hebra simple no emparejados representan las alas de la abeja y el dominio de doble hebra equipado de interés representa el cuerpo de la abeja. El uso de enzimas que degradan específicamente el ADN de hebra simple como la nucleasa S1 o la nucleasa Mung Bean permite el aislamiento del ADN que quedó en forma doble hebra que a continuación se clona y después se secuencia. Esta segunda técnica permite la obtención directa

de una huella de ADN doble hebra del dominio de interés en comparación con el primer protocolo que produce una huella de ARN de este dominio.

Este enfoque se realizó sobre el modelo grb2/grb33 descrito anteriormente. El ADN doble hebra se produjo mediante amplificación PCR a partir del ADNc de hebra simple de grb2 y de dos cebadores nucleotídicos que corresponden a la secuencia (1-22) de grb2 y a la secuencia complementaria de (618-639) grb2. Este fragmento PCR se purificó sobre gel de agarosa, se limpió sobre columna de afinidad (JetQuick, Genomed) y se cuantificó mediante espectrofotometría. Al mismo tiempo, dos ARN sintéticos que corresponden a las fases de lectura de grb2 y de grb33 se produjeron a partir de vectores plasmídicos que comportan los ADNc de grb2 o de grb33 bajo control del promotor T7, con la ayuda del kit RiboMax (Promega). Los ARN se purificaron según las instrucciones del proveedor y se limpiaron sobre columna de exclusión (Sephadex G50, 5 prime- 3 prime). Se asociaron 600 ng del ADN doble hebra de grb2 (1-639) con:

1. 3 µg de ARN de grb33

2. 3 µg de ARN de grb2

3. agua

en tres reacciones distintas, en el tampón siguiente:

100 mM PIPES (pH 7,2), 35 mM NaCl, 10 mM EDTA, 70% formamida desionizada (Sigma).

Las muestras se llevaron a 56°C y después se enfriaron a 44°C mediante incremento de -0,2°C cada 10 minutos. Después, se conservaron a 4°C. El análisis sobre gel de agarosa revela modificaciones de migraciones en los pocillos 1 y 2 con relación al pocillo 3 de control (Figura 11A) indicando la formación de nuevos complejos. Después, las muestras se tratan con glioxal desionizado (Sigma) (5% v/v ó 1M) durante 2h a 12°C. Después, los complejos se precipitan con etanol (0,1M NaCl, 2 volúmenes de etanol), se lavan con etanol 70%, se secan y después se recogen en agua. Finalmente, se tratan mediante la ARNasaH (Life Technologies), y después mediante una enzima capaz de degradar específicamente el ADN de hebra simple. La nucleasa S1 y la nucleasa "Mung Bean" presentan esta propiedad y están disponibles comercialmente (Life Technologies, Amersham). Tales digestiones (incubaciones de 5 minutos en los tampones suministrados con las enzimas) se analizaron sobre gel de agarosa (figura 11B). Se obtienen digestiones significativas únicamente a partir de los complejos que provienen de la reacción 1 (grb2/grb33) (figura 11B, pocillos 7 y 10). Estas digestiones parecen más completas con la nucleasa S1 (pocillo 7) que con la nucleasa "Mung Bean" (pocillo 10). Así, la banda que corresponde a un tamaño ligeramente superior a 100 pares de bases (indicada mediante una flecha en el pocillo 7) se purificó, se clonó en el vector pMos-Blue (Amersham), y después se secuenció. Este fragmento corresponde al dominio de 120 pares de bases de grb2, suprimido en grb33.

Este enfoque se puede efectuar ahora a partir de una población total de ARN mensajero y de una población total de ADNc doble hebra producida según las técnicas conocidas por el experto en la técnica. La población de ARN de la situación de referencia se hibrida a la población de ADNc doble hebra de la situación de ensayo y recíprocamente. Tras aplicación del protocolo descrito aquí arriba, las digestiones se depositan sobre gel de agarosa con el fin de aislar y purificar las bandas que corresponden a tamaños que varían entre 50 y 300 pares de bases. Después, estas bandas se clonan en un vector (pMos-Blue, Amersham) para dar lugar a un banco de insertados enriquecidos en eventos de diferencias cualitativas.

3. CONSTRUCCIÓN DE BANCOS QUE PROVIENEN DE DETECCIONES SISTEMÁTICAS DIFERENCIALES CUALITATIVAS.

Los dos ejemplos descritos aquí arriba llevan a la clonación de ADNc representativos de todo o parte de las secuencias cortadas y empalmadas diferencialmente entre dos situaciones fisiopatológicas dadas. Estos ADNc permiten la constitución de bancos mediante inserción de estos ADNc en vectores plasmídicos o fágicos. Estos bancos pueden ser presentados sobre filtros de nitrocelulosa o cualquier otro soporte conocido por el experto en la técnica, tales como chips o biochips o membranas. Estos bancos se pueden conservar en frío, protegidos de la luz. Estos bancos, una vez depositados y fijados sobre soportes mediante técnicas clásicas, se pueden tratar mediante compuestos para eliminar las bacterias huésped que permiten la producción de los plásmidos o de los fagos. Igualmente, estos bancos pueden estar constituidos ventajosamente de fragmentos de ADNc que corresponden a los ADNc clonados pero preparados mediante PCR con el fin de depositar sobre el filtro sólo las secuencias derivadas de los eventos de cortes y empalmes alternativos.

Una de las características y al mismo tiempo una de las originalidades de la detección sistemática diferencial cualitativa es que esta técnica lleva de manera ventajosa no a uno sino a dos bancos diferenciales ("par de banco") que representan el conjunto de las diferencias cualitativas que existen entre dos situaciones dadas. Particularmente, uno de los bancos de corte y empalme diferencial de la invención representa la firma de las cualidades de la situación fisiológica de ensayo con relación a la situación fisiológica de referencia, y el otro banco representa la firma de las cualidades de la situación fisiológica de referencia con relación a la situación fisiológica de ensayo. Esta pareja de bancos es igualmente denominada par de bancos o "banco diferencial de corte y empalme".

Siendo uno de los aportes del corte y empalme diferencial cualitativo permitir la evaluación del potencial tóxico de un compuesto, tal como se indica en el capítulo siguiente, un buen ejemplo de realización de la tecnología es la obtención mediante DATAS de clones de ADNc que corresponden a secuencias específicas de células HepG2 sin tratamiento, por una parte, y tratadas con etanol, por otra parte. Estas células presentan firmas de citotoxicidad y una degradación de su ADN mediante fragmentación internucleosomal a partir de 18h en presencia de 1M de etanol. Con el fin de obtener marcadores precoces de la toxicidad etanólica, los ARN mensajeros se prepararon a partir de células sin tratamiento y de células tratadas durante 18h con etanol con una concentración de 0,1M. Tras realizar la variante de DATAS que utiliza el ADNc de hebra simple y la ARNasa H, los ADNc clonados obtenidos se amplificaron mediante PCR, se sometieron a una electroforesis sobre gel de agarosa y después se transfirieron sobre un filtro de nailon según las técnicas conocidas por el experto en la técnica. Para cada conjunto de clones específicos por una parte de las diferencias cualitativas específicas del estado sin tratamiento y, por otra parte de las secuencias específicas de las células tratadas con etanol, se efectuaron dos réplicas idénticas de filtros. Así, las huellas de cada conjunto de clones se hibridan por una parte con una sonda específica de las células no tratadas y, por otra parte, con una sonda específica de las células tratadas con 0,1M de etanol durante 18h.

El perfil de hibridación diferencial obtenido y presentado en la figura 12, permite apreciar la cualidad de la sustracción efectuada durante la realización de la técnica DATAS. Así, los clones que provienen de la hibridación del ARNm de células no tratadas (NT) con el ADNc de células tratadas (Tr) y que deben corresponder a diferencias cualitativas específicas de la situación sin tratamiento hibridan preferentemente con una sonda que representa la población total de los ARN mensajeros de las células no tratadas. Recíprocamente, los clones que provienen de los productos resistentes a la ARNasa H habiendo actuado sobre los heterodúplex ARN(Tr)/ADNc(NT) hibridan preferentemente con una sonda derivada de la población total de los ARN mensajeros de las células tratadas.

Los dos conjuntos de clones específicos por una parte de la situación tratada y por otra parte de la situación no tratada representan un ejemplo de bancos de diferencias cualitativas característicos de dos estados celulares distintos.

4. USOS Y APORTACIONES DE LOS BANCOS DIFERENCIALES CUALITATIVOS.

Las posibilidades de uso de los bancos diferenciales de corte y empalme de la invención se ilustran especialmente en las Figuras 13 a 15. Así, estos bancos son utilizables para:

4.1. La evaluación del potencial tóxico de un compuesto (figura 13):

En este ejemplo, la situación de referencia se designa por A y la situación tóxica se designa por B. Se obtienen ábacos de toxicidad mediante tratamiento de la situación A en presencia de distintas concentraciones de un compuesto tóxico de referencia, durante periodos variables. En distintos puntos de los ábacos de toxicidad, se construyen bancos diferenciales cualitativos (pares de bancos), en este ejemplo, bancos restringidos rA/cB y rB/cA. Los pares de bancos se depositan ventajosamente sobre un soporte. Después, el soporte se hibrida con sondas que provienen de la muestra biológica inicial tratada mediante distintas dosis de compuestos de ensayo: Productos X, Y y Z. La hibridación se revela y hace aparecer el potencial tóxico de los productos de ensayo: en este ejemplo, el producto Z presenta una toxicidad fuerte y el producto Y ofrece un perfil intermedio. La factibilidad de esta constitución de ábacos de toxicidad se ilustra bien por el ejemplo de constitución de bancos de detección sistemática diferencial cualitativa descrito aquí anteriormente y que utiliza el etanol y células HepG2.

4.2. La evaluación de la eficacia de una composición farmacéutica (figura 14):

En este ejemplo, se realiza un par de bancos restringidos según la invención a partir de un modelo patológico B y de un modelo sano A (o del modelo patológico tratado con un producto activo de referencia). Los bancos diferenciales rA/cB y rB/cA se depositan, llegado el caso, sobre un soporte. Este par de bancos agrupa las diferencias de corte y empalme entre las dos situaciones. Este par de bancos permite evaluar la eficacia de un compuesto de ensayo, es decir determinar su capacidad de generar un perfil de tipo "sano" (rA/cB) a partir del perfil de tipo patológico (rB/cA). En este ejemplo, el par de bancos se hibrida con sondas preparadas a partir de las situaciones A y B con o sin tratamiento mediante el compuesto de ensayo. El perfil de hibridación que se puede obtener se presenta en la figura 14. La factibilidad de esta aplicación es la misma que la de la constitución de bancos de diferencias cualitativas características de situaciones sanas y tóxicas presentada más arriba. La situación tóxica se sustituye por el estado patológico y es posible apreciar la capacidad de un compuesto de ensayo para producir una sonda que hibrida con más o menos preferencia con las situaciones de referencia o patológica.

4.3. La anticipación de la respuesta de una muestra patológica a un tratamiento (figura 15):

En este ejemplo, se realiza un par de bancos restringido según la invención a partir de dos modelos patológicos, de los cuales uno responde a un tratamiento mediante un producto dado (el gen p53 salvaje por ejemplo): situación A; y el otro es refractario: situación B. Este par de bancos (rA/cB; rB/cA) se deposita sobre un soporte.

Después, este par de bancos se utiliza para determinar la sensibilidad de una muestra patológica de ensayo a este mismo producto. Para ello, este par de bancos se hibrida con sondas que provienen de biopsias de pacientes de los

cuales se quiere anticipar la respuesta al tratamiento de referencia. El perfil de hibridación de una biopsia de respondedor y de una biopsia de no respondedor se presenta en la figura 15.

4.4. La identificación de ligandos para receptores huérfanos

5 La activación de receptores membranaarios o nucleares mediante sus ligandos podría inducir específicamente desregulaciones en el corte y empalme de algunos ARN. La identificación de estos eventos mediante los métodos DATAS de la invención permite disponer de una herramienta (marcadores, bancos, kits, etc.) de seguimiento de la activación de receptores, utilizables para la búsqueda de ligandos naturales o sintéticos de receptores, en particular huérfanos. Según esta aplicación, se identifican marcadores asociados a las desregulaciones y se depositan sobre soportes. El ARN total de células, que (sobre)expresan el receptor estudiado, tratadas o no mediante distintas composiciones y/o compuestos de ensayo, se extrae y se utiliza como sonda en una hibridación con los soportes. La
10 puesta en evidencia de una hibridación con algunos, incluso con la totalidad de los marcadores depositados sobre el soporte, indica que el receptor estudiado ha sido activado, y por lo tanto la composición/compuesto correspondiente constituye o comprende un ligando de dicho receptor.

4.5. La identificación de dianas de interés terapéutico:

15 Ésta se realiza mediante identificación de genes cuyo corte y empalme se modifica en una patología o en un modelo de patología, y más precisamente la identificación de exones o intrones modificados. Este enfoque debe permitir dar acceso a las secuencias que codifican los dominios funcionales alterados durante patologías o cualquier fenómeno fisiopatológico que dirigen los fenómenos de proliferación, diferenciación o apoptosis, por ejemplo.

20 Un ejemplo de la aportación de la detección sistemática diferencial cualitativa para la identificación de genes diferencialmente cortados y empalmados se suministra mediante la aplicación de DATAS a un modelo de inducción de apoptosis mediante inducción de la expresión de la forma salvaje de p53. Este modelo celular se estableció mediante transfección de un sistema de expresión inducible para el gen supresor de tumor p53. Con el fin de identificar las diferencias cualitativas asociadas específicamente a la apoptosis inducida por p53, DATAS se realizó a partir de los ARN mensajeros extraídos de células inducidas y no inducidas. Para estos experimentos, se utilizaron
25 200 ng de ARN poliA+ y 200 ng de ADNc durante la formación de los heterodúplex. Se obtuvieron una centena de clones a partir de cada una de las hibridaciones cruzadas. La hibridación de estos clones bacterianos y después de los fragmentos de ADNc que contienen con sondas representativas de los ARN mensajeros totales de las situaciones de partida ha permitido la identificación de secuencias específicamente expresadas durante la fuerte inducción de p53 que lleva a la muerte celular (figura 16).

30 Estos fragmentos derivan de secuencias exónicas o intrónicas que modulan la cualidad del mensaje presente y permiten proponer los dominios funcionales en los cuales participan o que interrumpen como dianas de intervención para inducir o inhibir la muerte celular.

35 Tal enfoque lleva igualmente a la constitución de un par de bancos que reúnen eventos diferencialmente cortados y empalmados entre una situación no apoptótica y una situación apoptótica. Este par de bancos se puede utilizar para ensayar el poder de hibridación de una sonda derivada de otra situación fisiopatológica o de un tratamiento particular. El resultado de tal hibridación dará indicaciones sobre el compromiso eventual del programa de expresión genética de la situación ensayada hacia el apoptosis.

Como destaca de la descripción aquí anteriormente, aquí se describe igualmente:

40 - cualquier sonda nucleica, cualquier oligonucleótido, cualquier anticuerpo dirigido contra una secuencia identificada mediante la técnica descrita en la presente solicitud, y caracterizados por que permiten caracterizar una situación patológica,

45 - el uso de las informaciones que provienen del uso de las técnicas descritas para la búsqueda de moléculas orgánicas con objetivo terapéutico mediante la realización de detecciones sistemáticas, caracterizadas por que cogen como diana dominios cortados y empalmados diferencialmente entre una situación sana y una situación patológica, o bien caracterizados por que se basan en la inhibición de las ganancias de funciones adquiridas mediante la proteína que resulta de un corte y empalme diferencial,

- el uso de las informaciones que provienen de las técnicas descritas en la presente solicitud para aplicaciones de terapia génica,

50 - el uso de ADNc transferidos mediante terapia génica, caracterizados por que tienen propiedades antagonistas o agonistas sobre vías de señalización celulares definidas,

- cualquier constitución y cualquier utilización de bancos moleculares de exones o de intrones alternativos con fines:

- de diagnóstico o de reactivos comerciales para la búsqueda,
- de crear o de buscar moléculas, polipéptidos, ácidos nucleicos para aplicación terapéutica.

- cualquier constitución y cualquier utilización de bancos virtuales informáticos que reúnen exones o intrones alternativos, caracterizados por que estos bancos permiten concebir sondas nucleicas o cebadores oligonucleotídicos con el objetivo de caracterizar los cortes y empalmes alternativos que diferencian dos estados fisiopatológicos distintos.

5 - cualquier composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende polipéptidos, ácidos nucleicos con sentido o antisentido, o moléculas químicas capaces de interferir con los productos de corte y empalme alternativos puestos en evidencia y clonados mediante las técnicas de la invención,

10 - cualquier composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende polipéptidos, ácidos nucleicos con sentido o antisentido, o moléculas químicas capaces de restaurar un corte y empalme representativo de una situación normal mediante oposición al evento alternativo característico de una situación patológica.

5. DESREGULACIONES DE LOS MECANISMOS DE CORTE Y EMPALME DE LOS ARN MEDIANTE AGENTES TÓXICOS.

Este ejemplo muestra que las diferencias de formas y/o de perfiles de cortes y empalmes se pueden utilizar como marcadores para el seguimiento y/o la supresión de toxicidad y/o de eficacia de compuestos.

15 Los efectos de agentes tóxicos sobre las desregulaciones de cortes y empalmes de los ARN se ensayaron de la manera siguiente. Células hepatocitarias, HepG2, se trataron mediante distintas dosis de tres compuestos tóxicos (etanol, camptotecina, PMA (forbol 12-miristato 13-acetato)). Dos ensayos de citotoxicidad (Azul de Tripán, MTT) se realizaron en distintos momentos: 4h y 18h para el etanol; 4h y 18h para la camptotecina; 18h y 40h para el PMA.

20 El Azul de Tripán es un colorante que se puede incorporar por las células vivas. Un sencillo recuento de las células "azules" y "blancas" con microscopio permite determinar el porcentaje de células vivas tras tratamiento o porcentaje de supervivencia. Los puntos se efectúan por triplicado.

25 El ensayo MTT es un ensayo colorimétrico que mide la capacidad de las células vivas de convertir las sales solubles de tetrazolio (MTT) en un precipitado insoluble de formazán. Estos cristales de formazán, azul oscuro, se pueden disolver y su concentración se puede determinar mediante medida de absorbancia a 550 nm. Así, tras sembrar placas de 24 pocillos mediante 150.000 células en la noche, y tras tratamiento de las células mediante los compuestos tóxicos, se añaden 50 µl de MTT (Sigma) (a 5 mg/ml en PBS). La reacción de formación de los cristales de formazán se efectúa en 5 h en incubador con CO₂ (37°C, 5% CO₂, 95% humedad). Tras adición de 500 µl de disolución de solubilización (HCl 0,1N en isopropanol-Triton X-100 (10%)), los cristales se disuelven bajo agitación y se miden las absorbancias a 550 a 660 nm. Los puntos se efectúan por triplicado con controles (viabilidad, muerte celular, blancos) apropiados.

30 Se realizó igualmente un ensayo de apoptosis o muerte celular programada mediante medida de la fragmentación de ADN mediante el uso de anticuerpos anti-histona y medidas de ELISA. El ensayo utilizado es el Cell Death ELISA Plus de Roche.

Los resultados de estos tres ensayos (Figuras 18 A, B, C) han permitido determinar que las dosis siguientes:

- 35
- etanol: 0,1M
 - camptotecina: 1 µg/ml
 - PMA: 50 ng/ml

eran mucho menores que las CI₅₀ medidas.

40 Así, las células HepG2 se trataron mediante estos tres compuestos con estas tres dosis durante 4h para el etanol y la camptotecina y 18h para PMA. Los ARN mensajeros se purificaron mediante perlas Dynal-Oligo-(dT) a partir de ARN totales purificados según el kit Rneasy (Quiagen). Las síntesis de ADNc se efectuaron a partir de estos ARN mensajeros y de la Transcriptasa Inversa Superscript (Life Technologies) utilizando hexámeros aleatorios como cebadores.

45 Estas primeras hebras han servido de matrices para reacciones de amplificación mediante PCR (94°C 1 mn, 55°C 1 mn, 72°C 1 mn, 30 ciclos) con la ayuda de los cebadores oligonucleotídicos siguientes:

MACH- α :

5'-TGCCCAAATCAACAAGAGC-3' (SEQ ID NO: 11)

5'-CCCCTGACAAGCCTGAATA-3' (SEQ ID NO: 12)

Estos cebadores corresponden a regiones comunes a las distintas isoformas descritas de MACH- α (1, 2 y 3, amplificando 595, 550 y 343 pares de bases respectivamente). MACH- α (Caspasa-8) es una proteasa implicada en la muerte celular programada (Boldin et. al., Cell (1996), 85, 803-815).

BCL-X:

5' ATGTCTCAGAGCAACCGGGAGCTG 3' (SEQ ID NO: 13)

5' GTGGCTCCATTCACCGCGGGGCTG 3' (SEQ ID NO: 14)

Estos cebadores corresponden a regiones comunes a las distintas isoformas descritas de bcl-X (bcl-XI, bcl-Xs, BCL-X β) (Boise et al., Cell (1993) 74, 597-608; U72398 (Genbank)), y deben amplificar un fragmento único para estas tres isoformas de 204 pares de bases.

FASR:

5'-TGCCAAGAAGGGAAGGAGT-3' (SEQ ID NO: 15)

5'-TGTCATGACTCCAGCAATAG-3' (SEQ ID NO: 16)

Estos cebadores corresponden a regiones comunes a algunas isoformas de FASR y deben amplificar un fragmento de 478 pares de bases para la forma salvaje de FasR, 452 para la isoforma $\Delta 8$ y 415 para la isoforma ΔTM .

Los resultados reportados en la figura 19 indican que:

- la camptotecina induce una disminución de la expresión de la isoforma MACH- $\alpha 1$ y un aumento de la isoforma MACH- $\alpha 3$.
- La camptotecina induce la aparición de una nueva isoforma de bcl-X (banda superior del doblete que migra hacia 200 pares de bases).
- La camptotecina induce una disminución de la forma salvaje del receptor de fas, sustituido por una expresión de una isoforma más corta que puede corresponder a Fas ΔTM .
- El etanol induce la desaparición de bcl-x, sustituido por una isoforma más corta.
- El etanol induce una aumento de la forma larga, salvaje, del receptor de fas, esto a costa de la isoforma más corta.

Estos resultados demuestran que los tratamientos mediante agentes tóxicos con dosis bajas pueden inducir desregulaciones de cortes y empalmes alternativos de algunos ARN, esto de manera específica. La identificación de estas desregulaciones al nivel post-transcripcional, especialmente mediante la aplicación de la tecnología DATAS permite así definir una herramienta de predicción de la toxicidad de moléculas.

Listado de secuencias

<110> EXONHIT THERAPEUTICS SA

<120> DETECCION SISTEMATICA DIFERENCIAL CUALITATIVA

5 <130> B3898B - PB/KM

<140>

<141>

10 <150> 9802997

<151> 11-03-1998

<160> 16

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 23

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: OLIGO

25 <400> 1

gagaagcgtt atnnnnnnna ggn 23

<210> 2

30 <211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: OLIGO

<400> 2

gagaagcgtt atnnnnnnnn tccc 24

40 <210> 3

<211> 23

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

45 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: OLIGO

<400> 3

50 gagaagcgtt atnnnnnnnn nnn 23

<210> 4

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

55 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: OLIGO

<400> 4

60 gagaagcgtt atnnnnncca 20

<210> 5

<211> 66

<212> ADN

ES 2 551 441 T3

<213> Homo sapiens

<400> 5
ccacacctgg ccagtatgtg ctcaactggct tgcagagtgg gcagccagcc taagcatttg 60
cactgg 66

5

<210> 6
<211> 23
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: OLIGO

<400> 6
15 gggacctgtt tgacatgaag ccc 23

<210> 7
<211> 22
<212> ADN
20 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: OLIGO

25 <400> 7
cagttccgc tccacaggtt gc 22

<210> 8
<211> 96
30 <212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 8
gtacgggaga gcacgaccac acctggccag tatgtgctca ctggcttgca gagtgggcag 60
cctaagcatt tgctactggt ggaccctgag ggtgtg 96

35

<210> 9
<211> 441
<212> PRT
<213> Homo sapiens
40 <400> 9

ES 2 551 441 T3

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

ES 2 551 441 T3

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

<210> 10
<211> 1326
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 10						
atgaacaagc	tgagtggagg	cggcgggcgc	aggactcggg	tggaaggggg	ccagcttggg	60
ggcgaggagt	ggacccgcca	cgggagcttt	gtcaataagc	ccacgcgggg	ctggctgcac	120
cccaacgaca	aagtcattgg	acccggggtt	tcctacttgg	ttcggtacac	gggttgtgtg	180
gaggtcctcc	agtcaatgcg	tgccctggac	ttcaacaccc	ggactcaggt	caccagggag	240
gccatcagtc	tgggtgtgtga	ggctgtgccg	ggtgctaagg	gggcgacaag	gaggagaaag	300
ccctgtagcc	gcccgcctcag	ctctatcctg	gggaggagta	acctgaaatt	tgctggaatg	360
ccaatcctc	tcaccgtctc	caccagcagc	ctcaacctca	tggccgcaga	ctgcaaacag	420
atcatcgcca	accaccacat	gcaatctatc	tcatttgcat	ccggcgggga	tccggacaca	480
gccgagtatg	tcgcctatgt	tgccaaagac	cctgtgaatc	agagagcctg	ccacattctg	540
gagtgctccg	aagggtctgc	ccaggatgtc	atcagcacca	ttggccaggc	cttcgagttg	600

```
cgcttcaaac aatacctcag gaaccacccc aaactgggtca cccctcatga caggatggct 660
ggctttgatg gctcagcatg ggatgaggag gaggaagagc cacctgacca tcagtactat 720
aatgacttcc cggggaagga accccccttg gggggggtgg tagacatgag gcttcgggaa 780
ggagccgctc caggggctgc tcgaccact gcaccaatg cccagacccc cagccacttg 840
ggagctacat tgcctgtagg acagcctgtt gggggagatc cagaagtccg caaacagatg 900
ccacctccac caccctgtcc aggcagagag ctttttgatg atccctccta tgtcaacgtc 960
cagaacctag acaaggcccg gcaagcagtg ggtggtgctg ggcccccaa tcctgctatc 1020
aatggcagtg caccocggga cctgtttgac atgaagccct tcgaagatgc tcttcgggtg 1080
cctccacctc cccagtcggt gtccatggct gacagctcc gaggggagcc ctggttccat 1140
gggaagctga gccggcggga ggctgaggca ctgctgcagc tcaatgggga cttcttggtt 1200
cggactaagg atcacgctt tgaaagtgtc agtcacctta tcagctacca catggacaat 1260
cacttgccca tcatctctgc gggcagcgaa ctgtgtctac agcaacctgt ggagcggaaa 1320
ctgtga 1326
```

<210> 11

<211> 19

5 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

b

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: OLIGO

<400> 11

tgcccaaata aacaagagc 19

15 <210> 12

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: OLIGO

<400> 12

cccctgaaa gctgaata 19

25 <210> 13

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: OLIGO

<400> 13

35 atgtctcaga gcaaccggga gctg 24

<210> 14

<211> 24

<212> ADN

40 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: OLIGO

<400> 14

45 gtggctccat tcaccgagg gctg 24

<210> 15

<211> 19

50 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: OLIGO

5 <400> 15
 tgccaagaag ggaaggagt 19

<210> 16

<211> 20

10 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: OLIGO

15 <400> 16
 tgtcatgact ccagcaatag 20

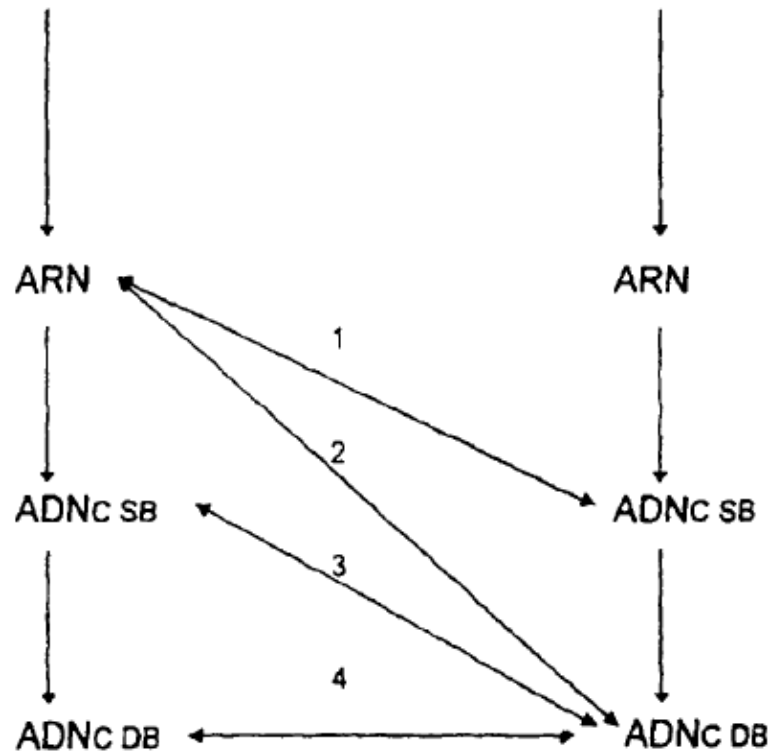
20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición que comprende un soporte y oligonucleótidos, caracterizada por que dichos oligonucleótidos son de hebra simple, con una longitud comprendida entre 5 y 50 nucleótidos, y son específicos de variaciones en las formas y/o perfiles de corte y empalme de varios genes distintos, y por que dichos oligonucleótidos son susceptibles de ser obtenidos por un procedimiento que comprende:
- (a) la identificación de un evento de corte y empalme característico de una situación fisiopatológica, y de la secuencia del dominio cortado y empalmado;
- 10 (b) la síntesis artificial de uno o varios oligonucleótidos que corresponden a una o varias regiones de este dominio y que permiten, por hibridación, poner en evidencia la forma no cortada y empalmada en los ARN de una muestra de ensayo;
- (c) la síntesis artificial de uno o varios oligonucleótidos que corresponden a la región de unión entre los dos dominios separados mediante el dominio cortado y empalmado, y que permite, por hibridación, poner en evidencia la forma cortada y empalmada en los ARN de una muestra de ensayo;
- 15 (d) la reproducción de las etapas (a) a (c) anteriores con otros eventos de corte y empalme característicos de dicha situación fisiopatológica; y
- (e) la transferencia de los oligonucleótidos sobre un soporte apropiado.
2. Composición según la reivindicación 1, caracterizada por que dichos oligonucleótidos tienen una longitud de 25 nucleótidos aproximadamente.
- 20 3. Composición según la reivindicación 1 ó 2, caracterizada por que el soporte está compuesto por un filtro, por una membrana o por un chip.

MUESTRA 1

MUESTRA 2



1. -> HETERODÚPLEX ARN/ADNc SB

2. -> HETEROTRÍPLEX ARN/ADNc DB

3,4. -> HOMODÚPLEX ADN/ADN

FIGURA 1A

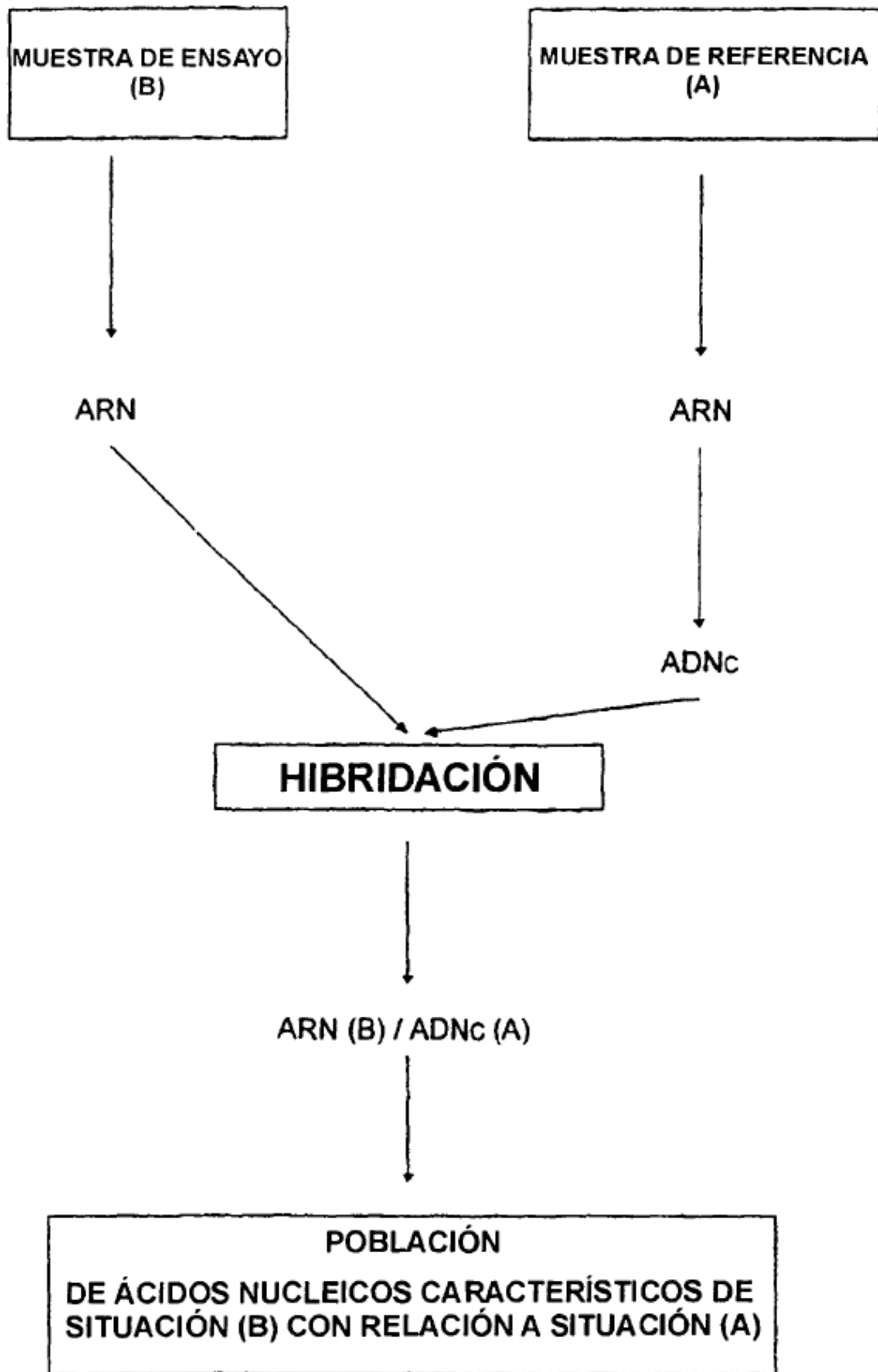


FIGURA 1B

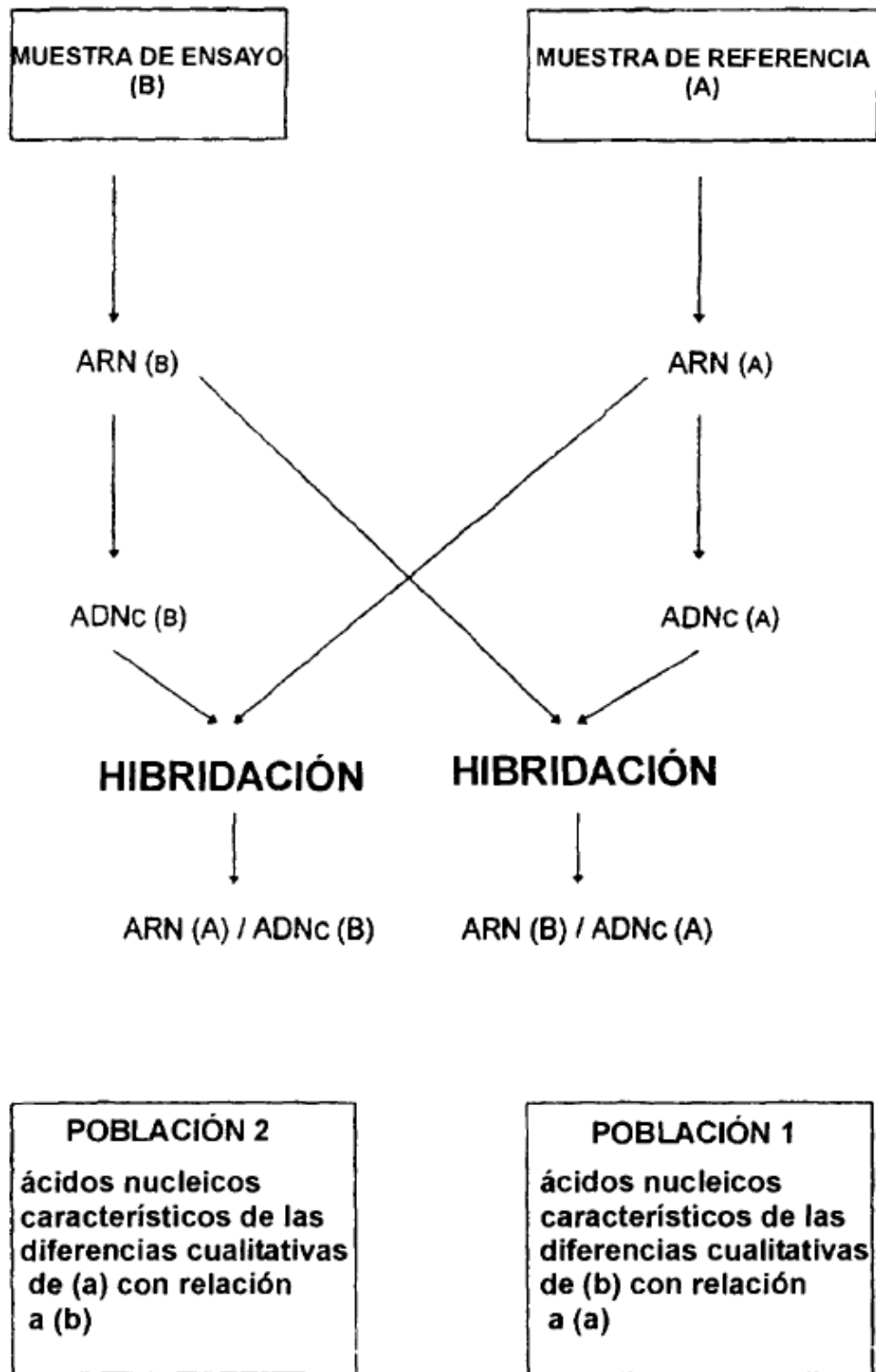


FIGURA 1C

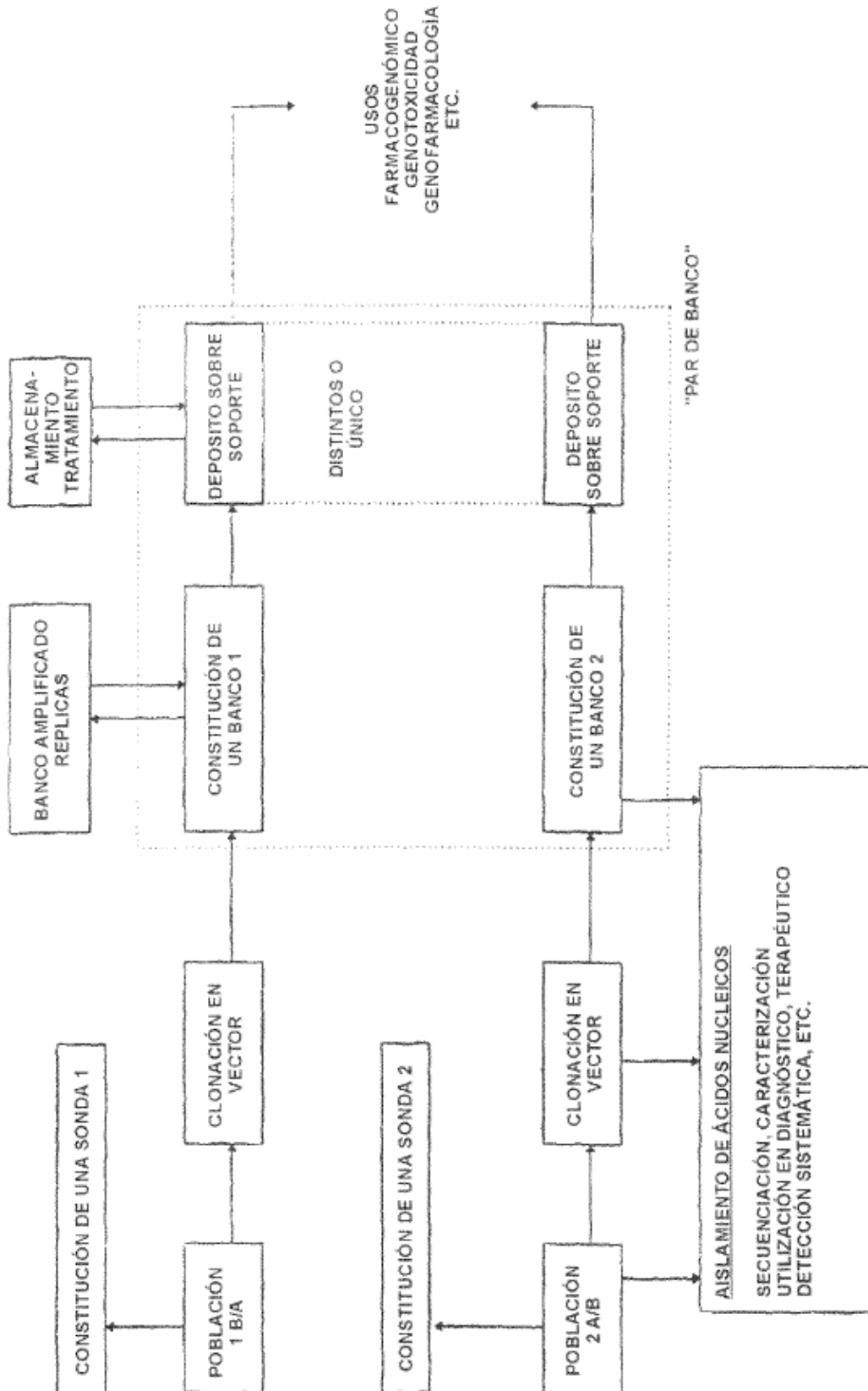


FIGURA 1D

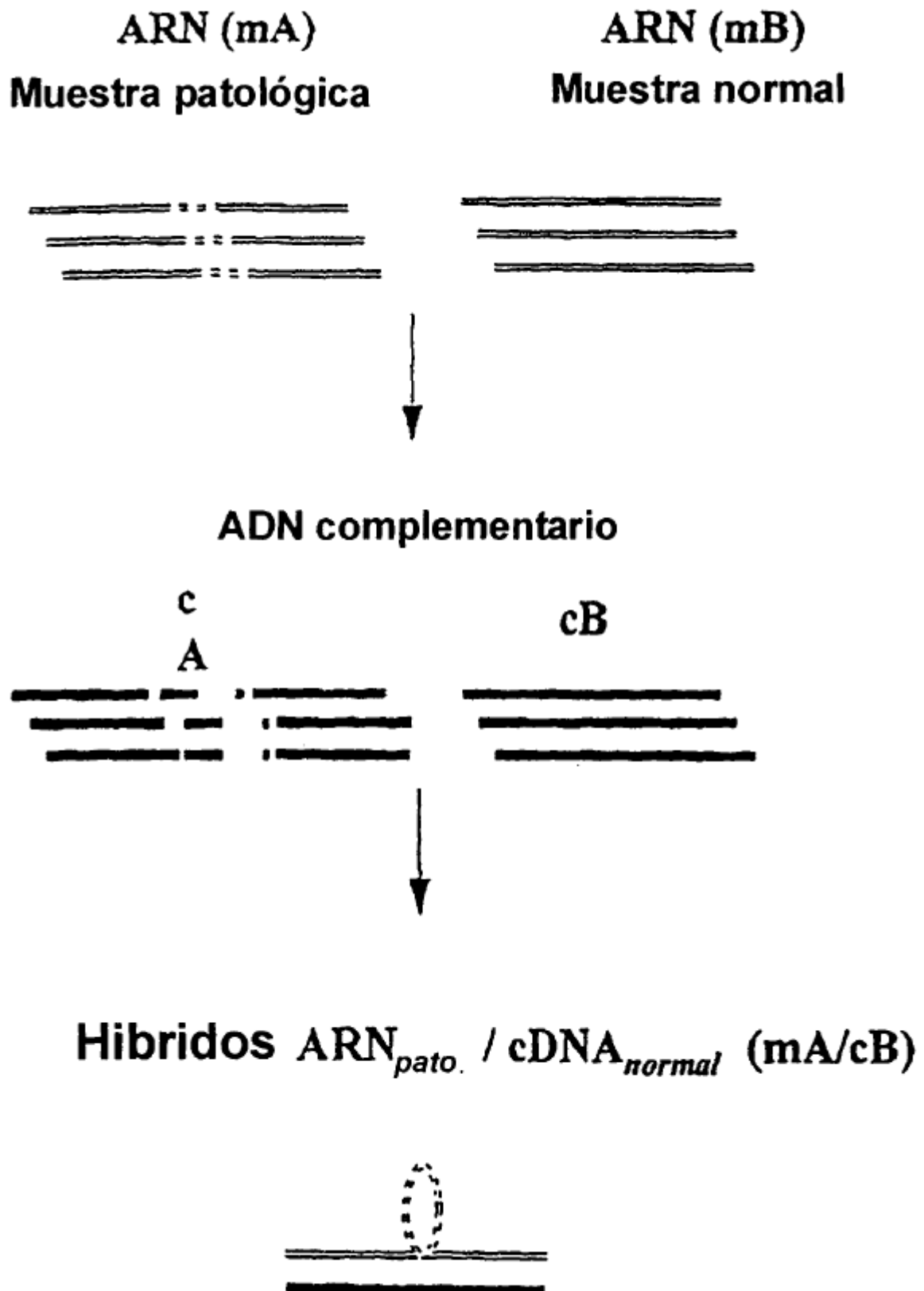
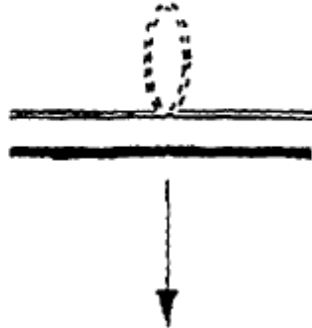


FIGURA 2

Híbridos $ARN_{pato.} / cDNA_{normal}$



Secuencia no cortada y empalmada tras digestión con RNaseH

=====



**Secuencia buscada, marcada en 5' y 3'
con la ayuda de dos oligonucleótidos**

|||||=====



Fragmento amplificado mediante PCR

|||||— — — — —



Clonación y secuenciación

FIGURA 3

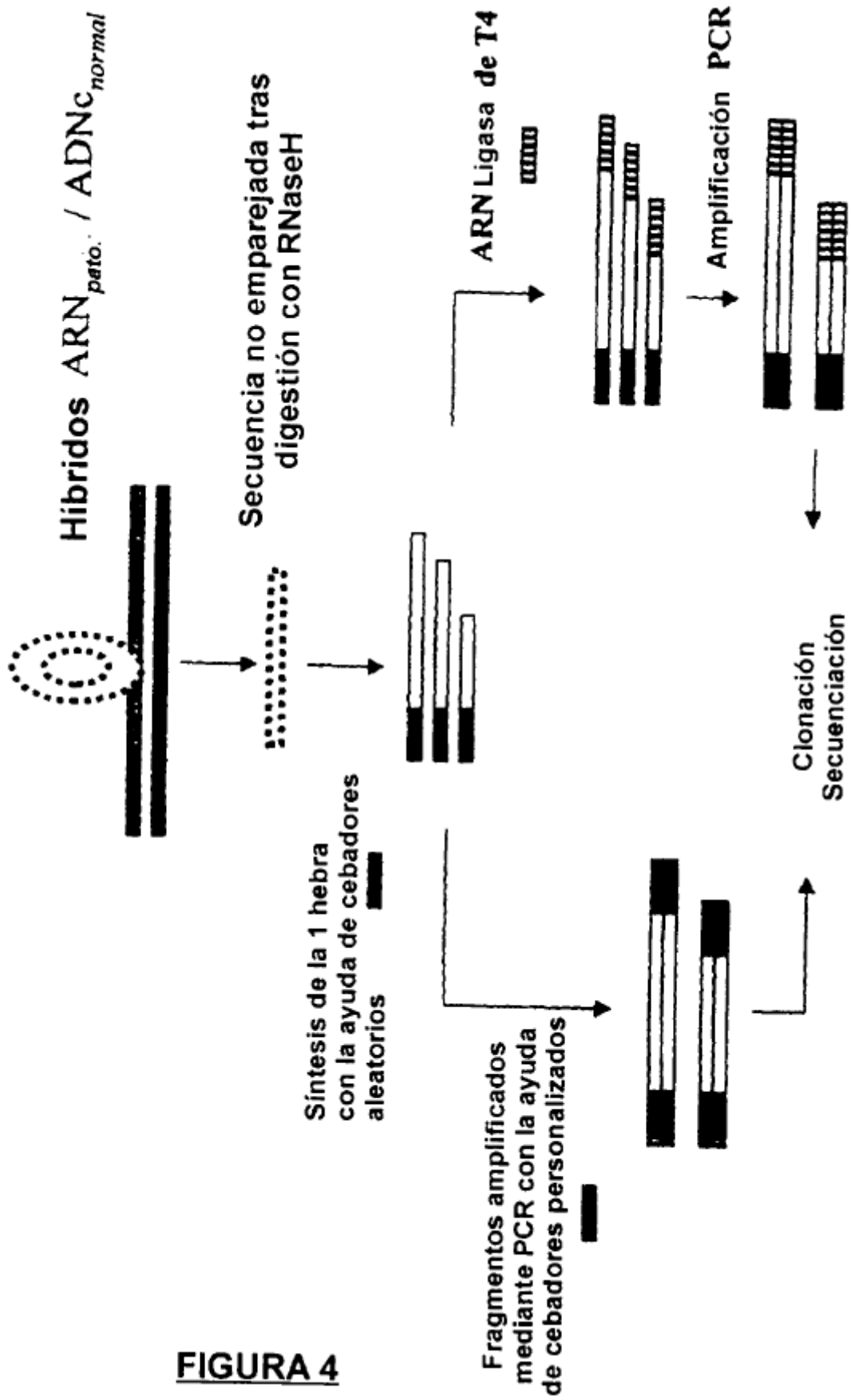


FIGURA 4

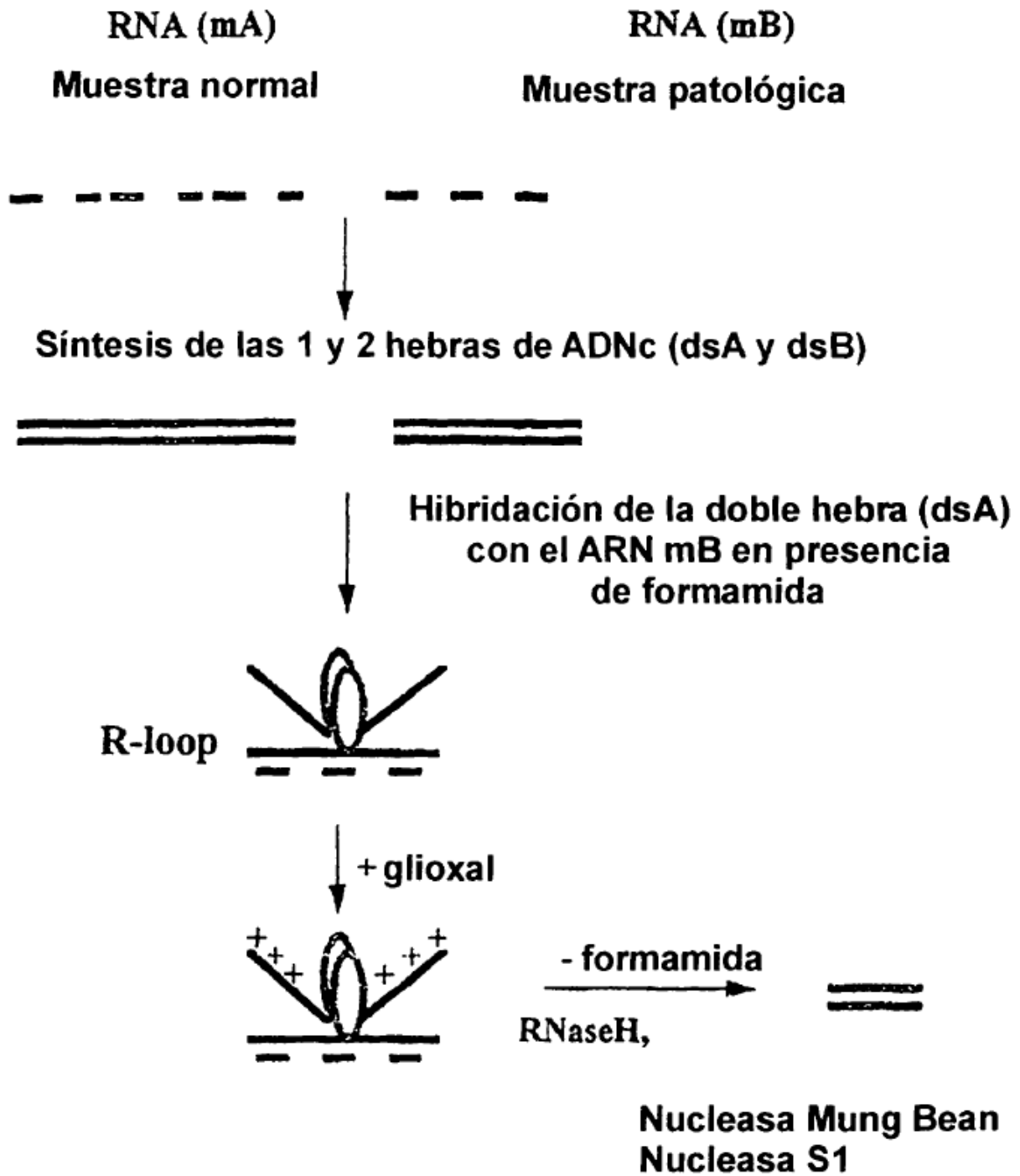


FIGURA 5

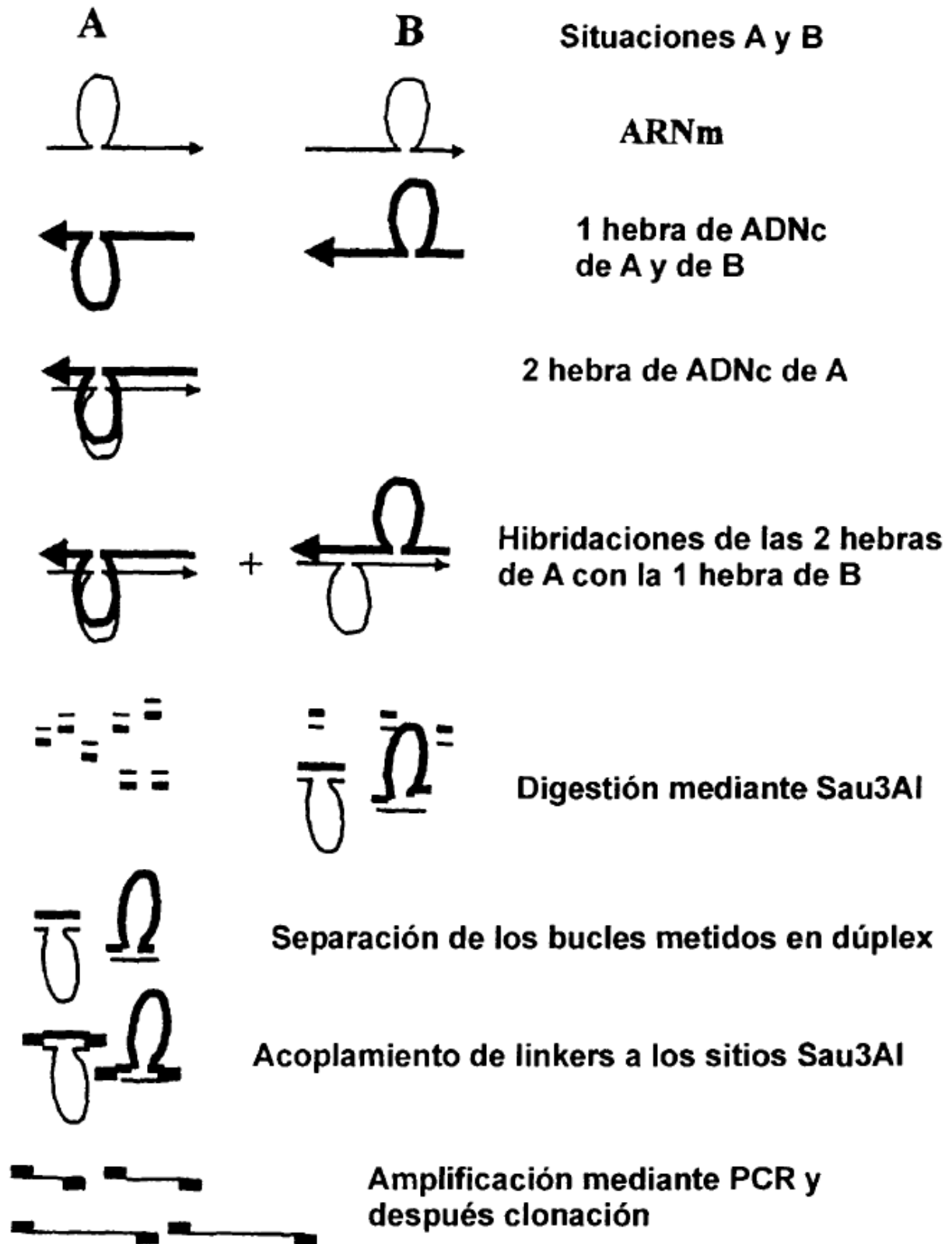


FIGURA 6A

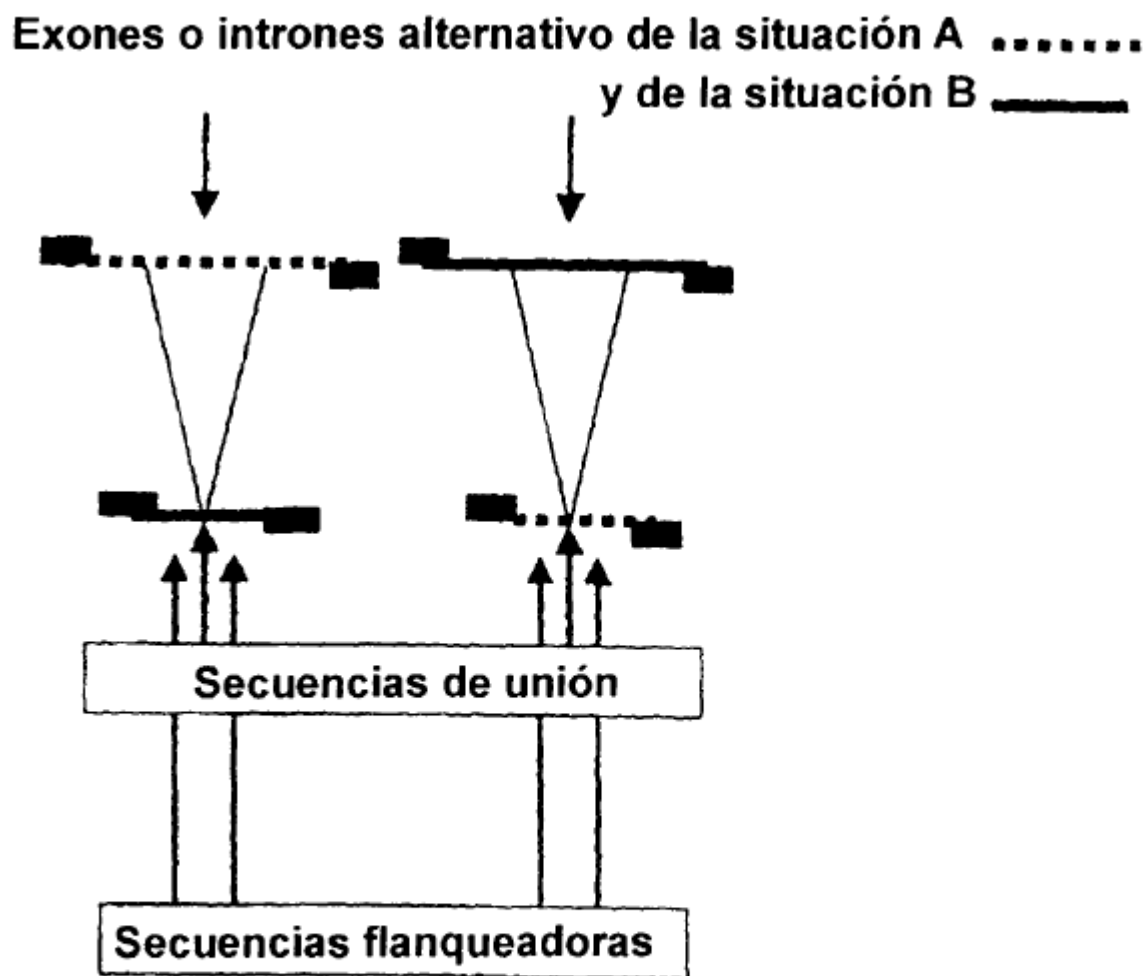


FIGURA 6B

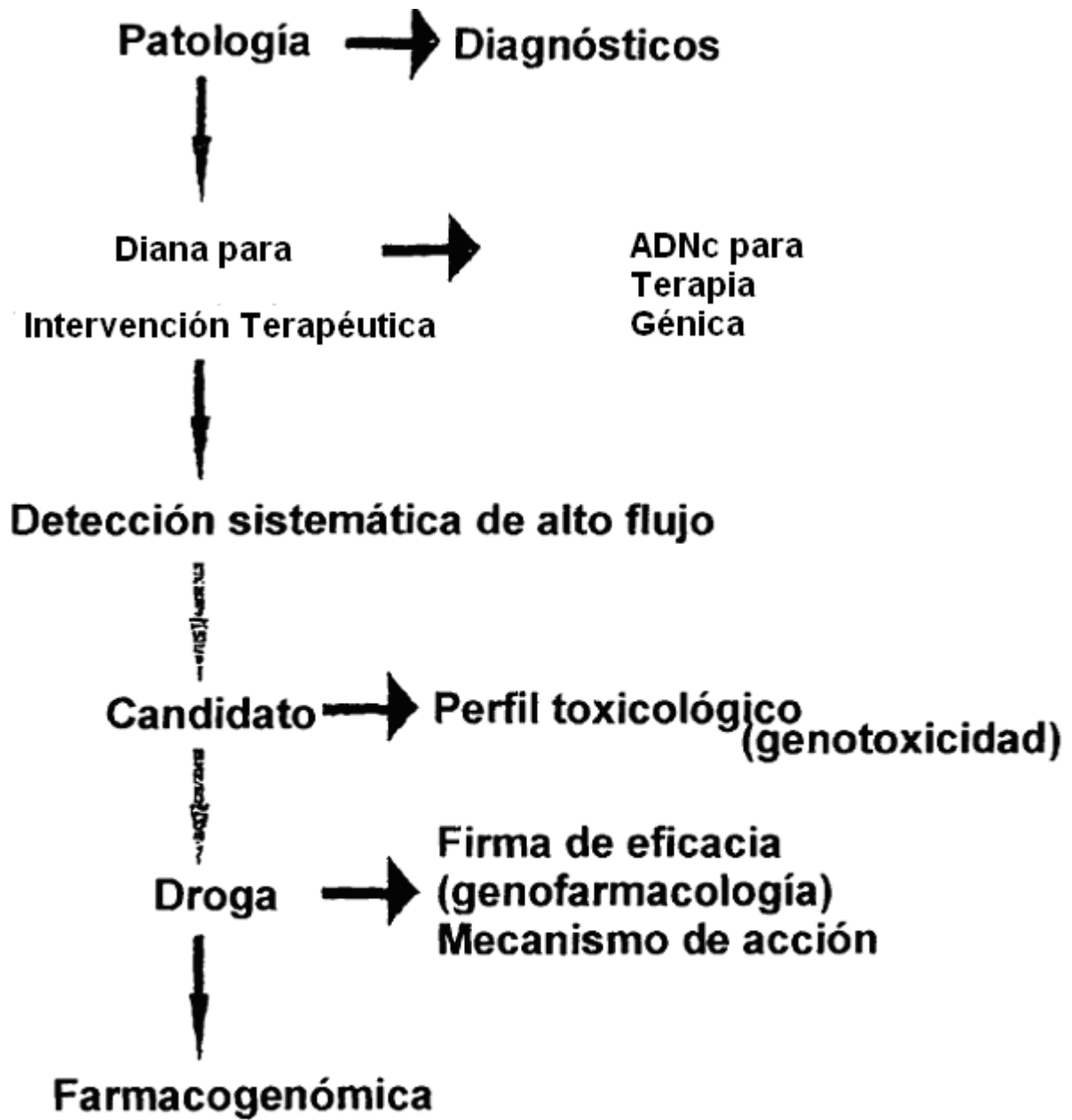
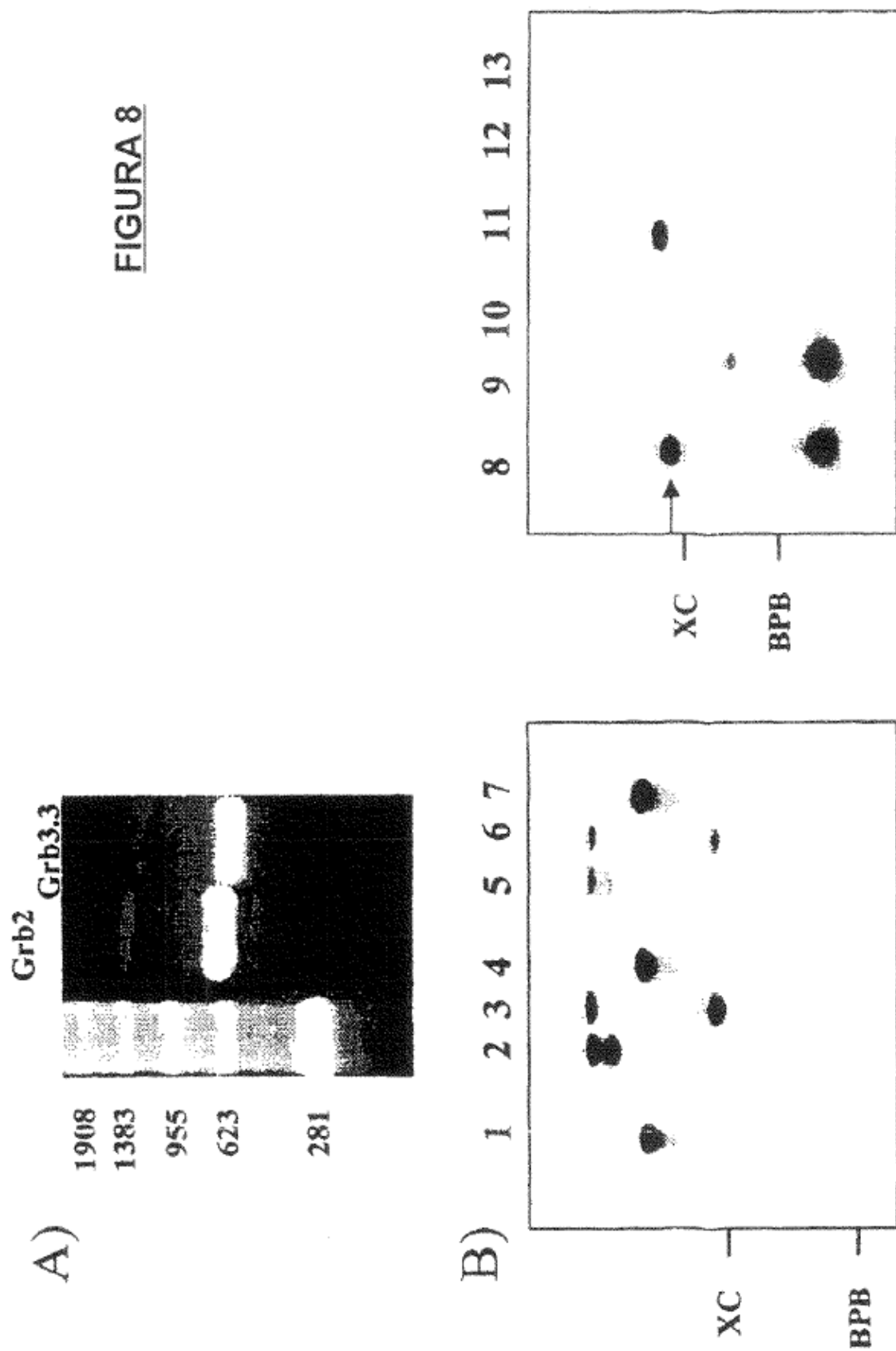


FIGURA 7



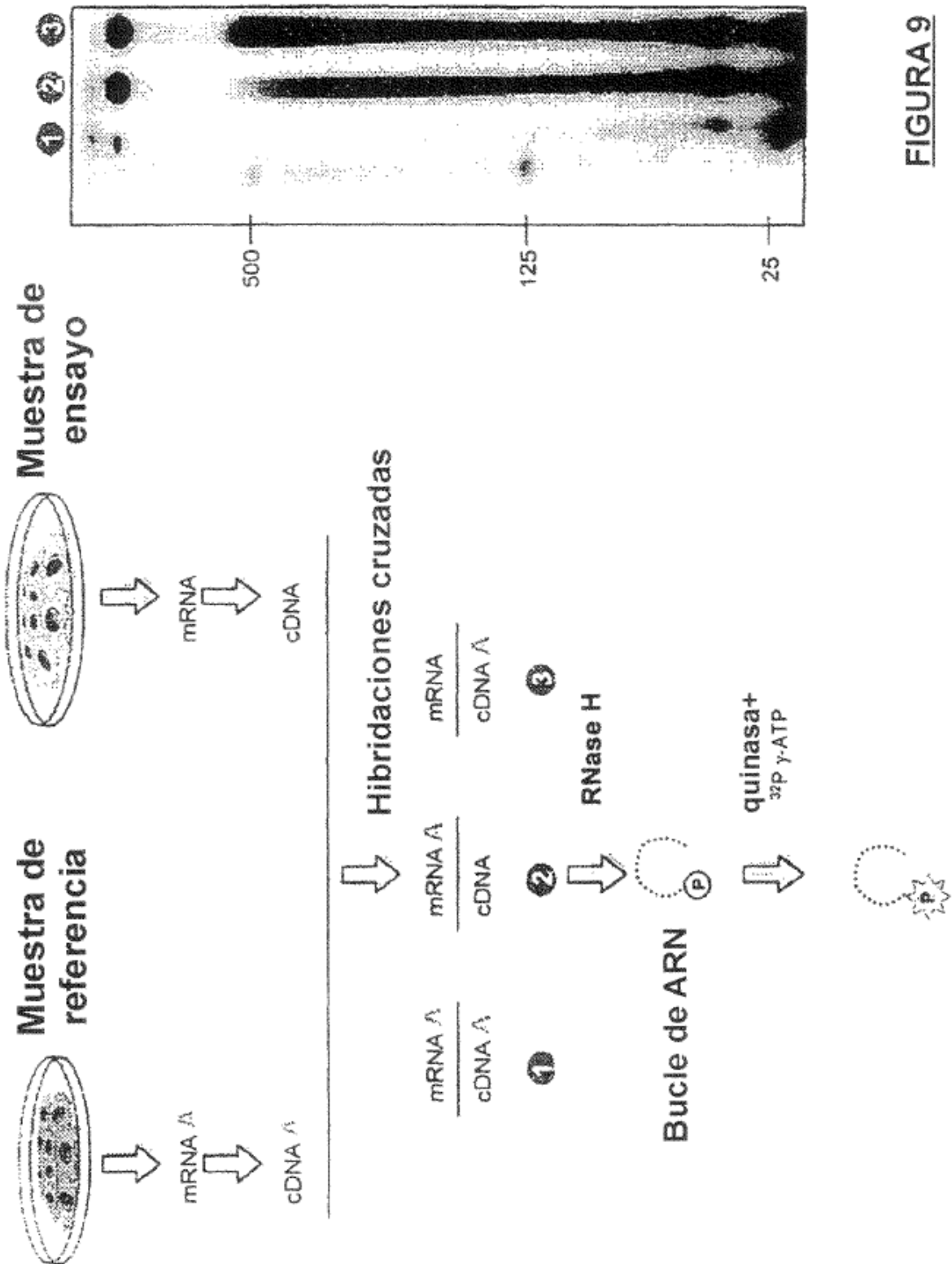
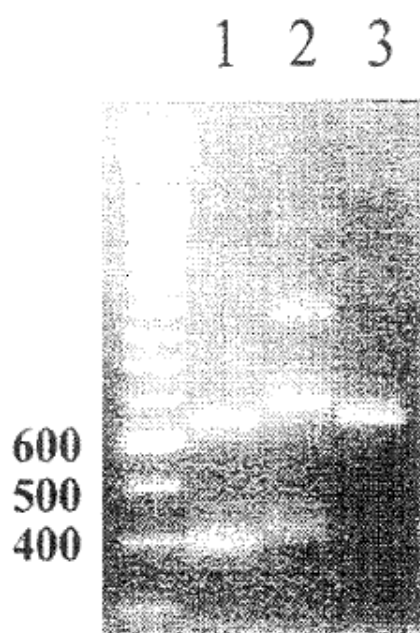


FIGURA 9



FIGURA 10

A)



B)

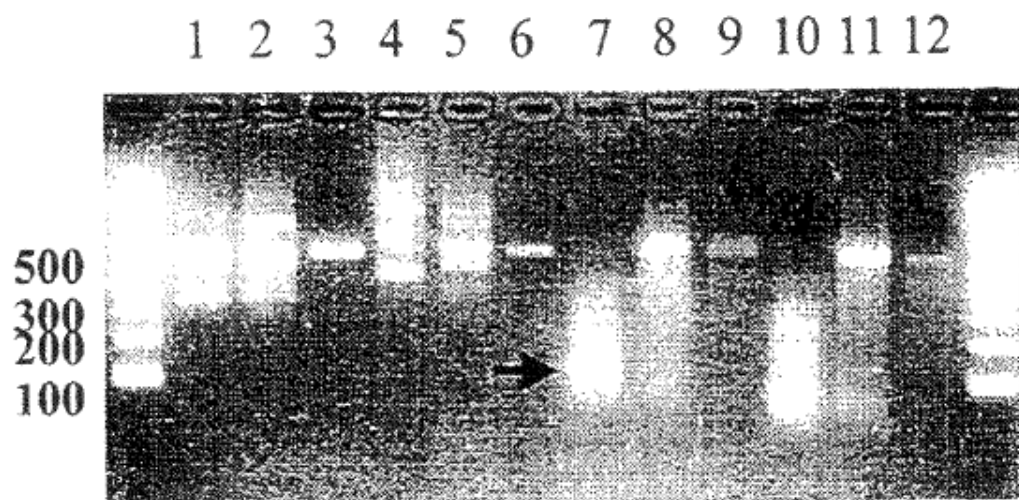


FIGURA 11

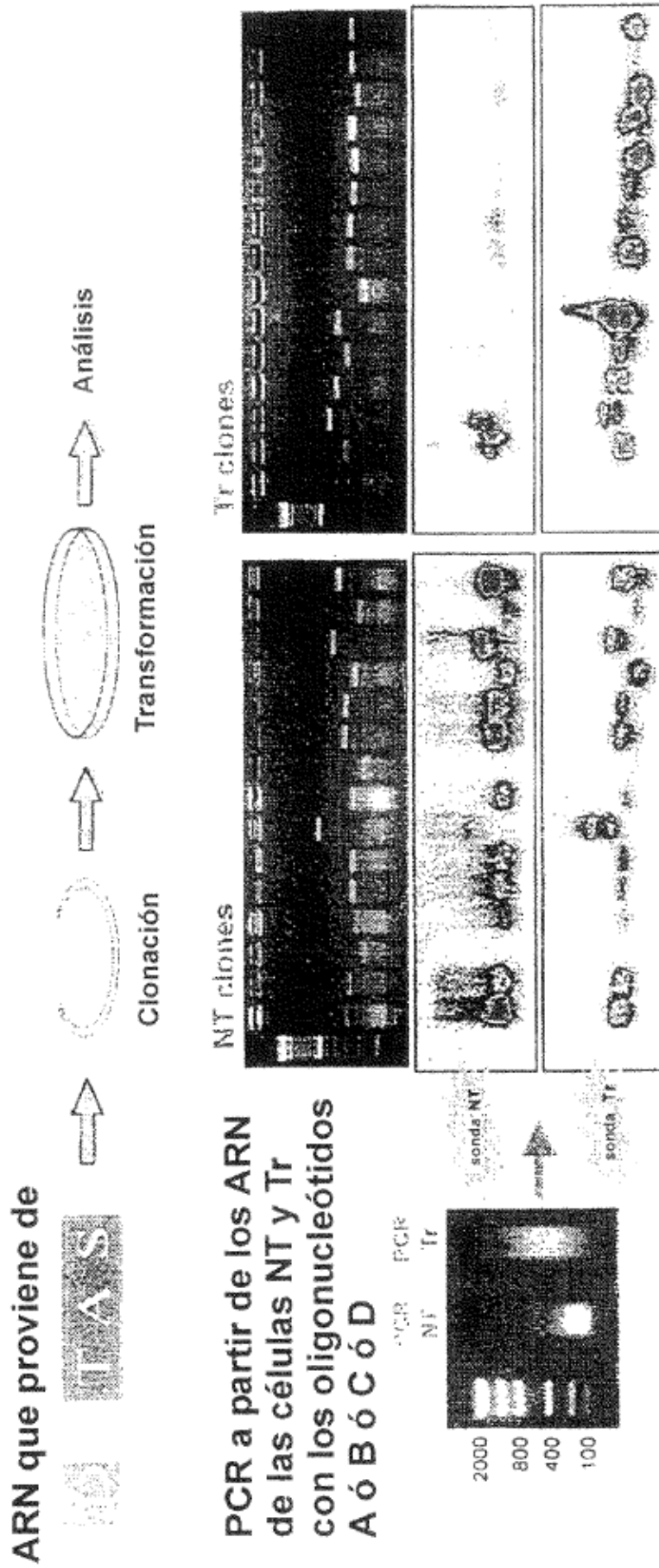


FIGURA 12

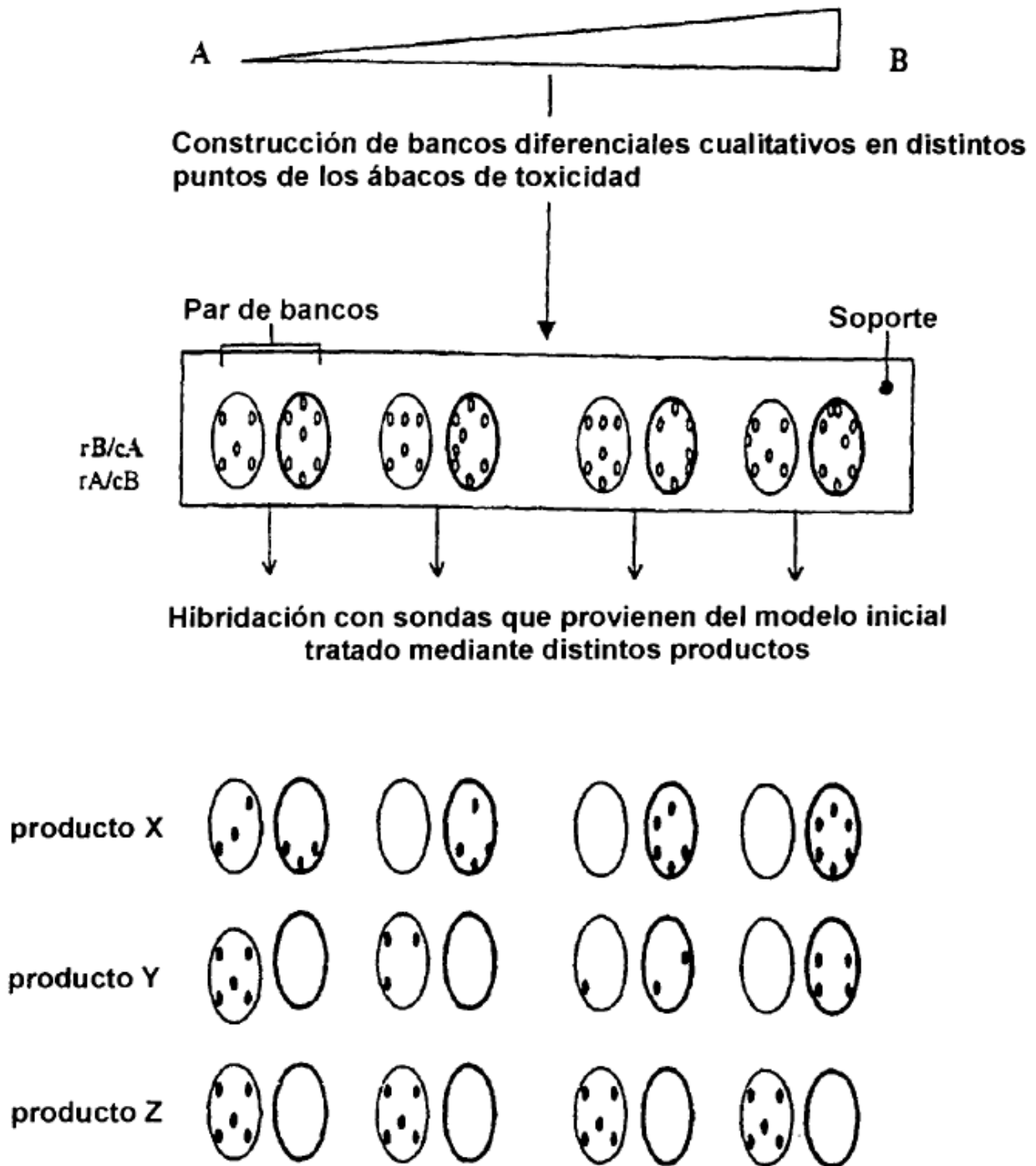


FIGURA 13

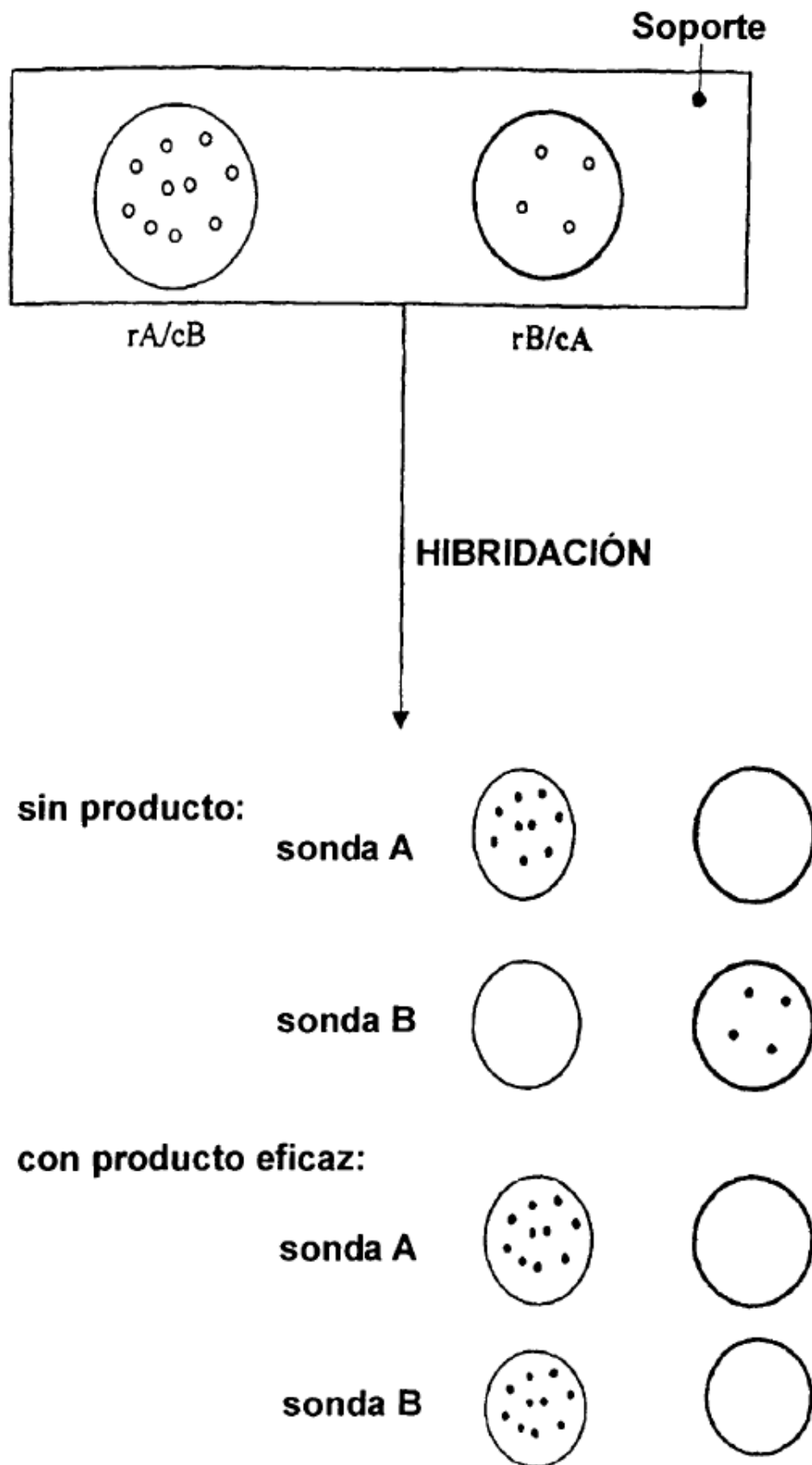
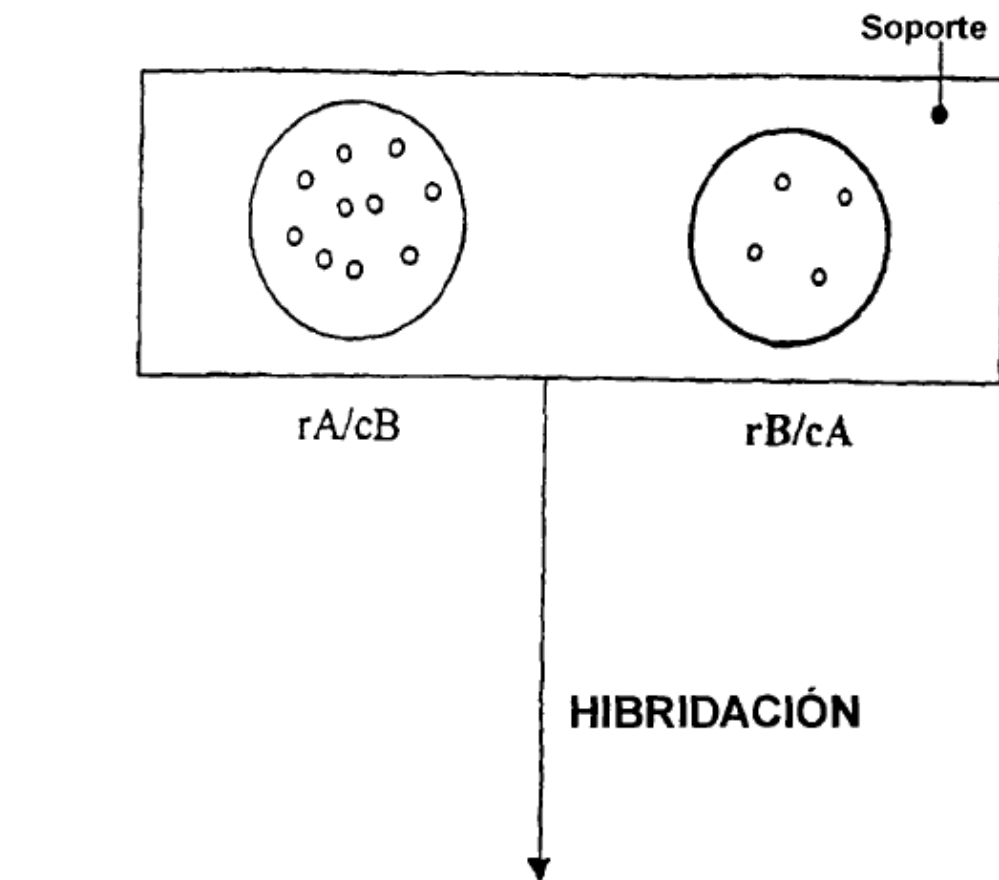


FIGURA 14



biopsia de respondedores:



biopsias de no respondedores:



FIGURA 15

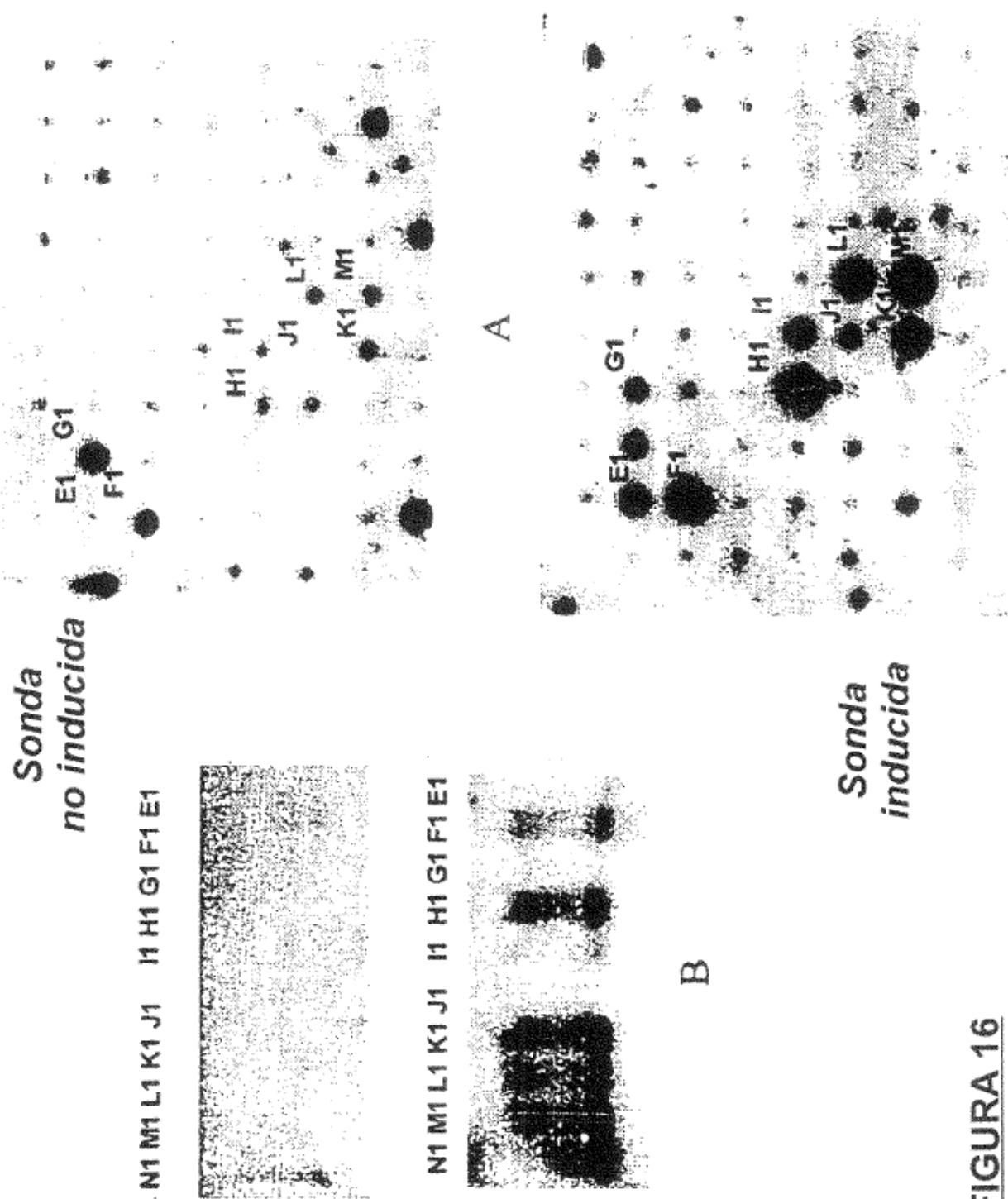


FIGURA 16

SECUENCIA PEPTÍDICA DE ΔSHC (SEQ ID NO: 9)

1

MNKLSGGGGR RTRVEGGQLG GEEWTRHGSF VNKPTRGWLH PNDKVMGPGV
 SYLVRYMGCV EVLQSMRALD FNTRTQVTRE AISLVCEAVP GAKGATRRRK
 PCSRPLSSIL GRSNLKFAGM PITLTVSTSS LNLMAADCKQ IIANHHMQSI
 SFASGGDPDT AEYVAYVAKD PVNQRACHIL ECPEGLAQDV ISTIGQAFEL
 RFKQYLRNPP KLVTPHDRMA GFDGSAWDEE EEEPPDHQYY NDFPGKEPPL
 GGVVDMRLRE GAAPGAARPT APNAQTPSHL GATLPVGQPV GGDPEVRKQM
 PPPPPCPGRE LFDDPSYVNV QNLDKARQAV GGAGPPNPAI NGSAPRDLFD
 MKPFEDALRV PPPQSVSMA EQLRGEPWFH GKLSRREAEA LLQLNGDFLV
 RTKDHRFESV SHLISYHMDN HLPISAGSE LCLQQPVERKL

441

SECUENCIA NUCLEICA DE ΔSHC (SEQ ID NO: 10)

atgaacaagc	tgagtggagg	cggcgggccc	aggactcggg	tggaaggggg	50
ccagcttggg	ggcgaggagt	ggacccgcca	cgggagcttt	gtcaataagc	100
ccacgcgggg	ctggctgcat	cccaacgaca	aagtcattgg	acccgggggt	150
tcctacttgg	ttcggtacat	gggttgtgtg	gaggtcctcc	agtcaatgcg	200
tgccctggac	ttcaacaccc	ggactcaggt	caccagggag	gccatcagtc	250
tggtgtgtga	ggctgtgccg	ggtgctaagg	gggcgacaag	gaggagaaag	300
ccctgtagcc	gcccgcctcag	ctctatcctg	gggaggagta	acctgaaatt	350
tgctggaatg	ccaatcactc	tcaccgtctc	caccagcagc	ctcaacctca	400
tgcccgacga	ctgcaaacag	atcatcgcca	accaccacat	gcaatctatc	450
tcatttgcat	ccggcgggga	tcgggacaca	gccgagtatg	tcgcctatgt	500
tgccaaagac	cctgtgaatc	agagagcctg	ccacattctg	gagtgtcccg	550
aagggtctgc	ccaggatgtc	atcagcacca	ttggccaggc	cttcgagttg	600
cgcttcaaac	aatacctcag	gaacccaccc	aaactgggtc	cccctcatga	650
caggatggct	ggctttgatg	gctcagcatg	ggatgaggag	gaggaagagc	700
cacctgacca	tcagtactat	aatgacttcc	cggggaagga	accccccttg	750
gggggggtgg	tagacatgag	gcttcgggaa	ggagccgctc	caggggctgc	800
tcgacccaact	gcacccaatg	cccagacccc	cagccacttg	ggagctacat	850
tgccctgagg	acagcctctt	gggggagatc	cagaaqtccg	caaacagatg	900

FIGURA 17A

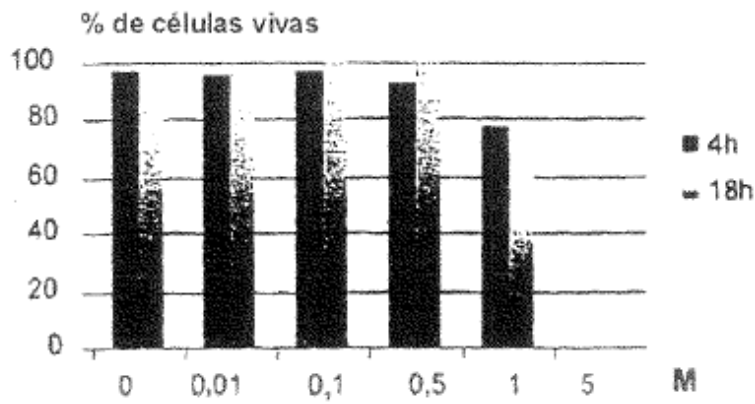
```

ccacctccac caccctgtcc aggcagagag ctttttgatg atccctccta 950
tgtcaacgtc cagaacctag acaaggcccg gcaagcagtg ggtggtgctg 1000
ggccccccaa tcttgctatc aatggcagtg caccctggga cctgtttgac 1050
atgaagccct tcgaagatgc tcttcgggtg cctccacctc cccagtcggt 1100
gtccatggct gagcagctcc gaggggagcc ctggttccat gggaagctga 1150
gccggcggga ggctgaggca ctgctgcagc tcaatgggga cttcttggtt 1200
cggactaagg atcacgctt tgaaagtgtc agtcacctta tcagctacca 1250
catggacaat cacttgcccc tcattctctgc gggcagcgaa ctgtgtctac 1300
agcaacctgt ggagcggaaa ctgtga 1326

```

FIGURA 17B

Azul Tripán **HepG2 / Etanol**



Ensayo MTT

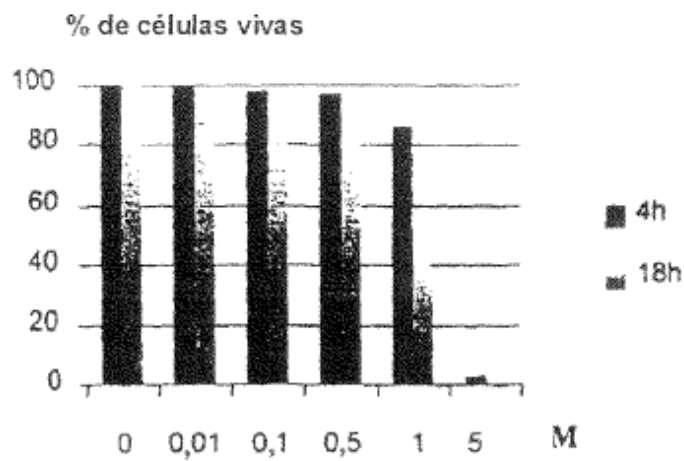
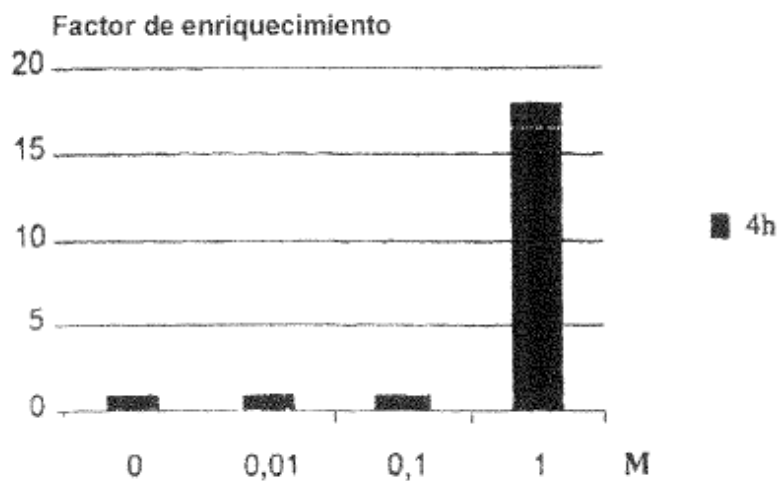
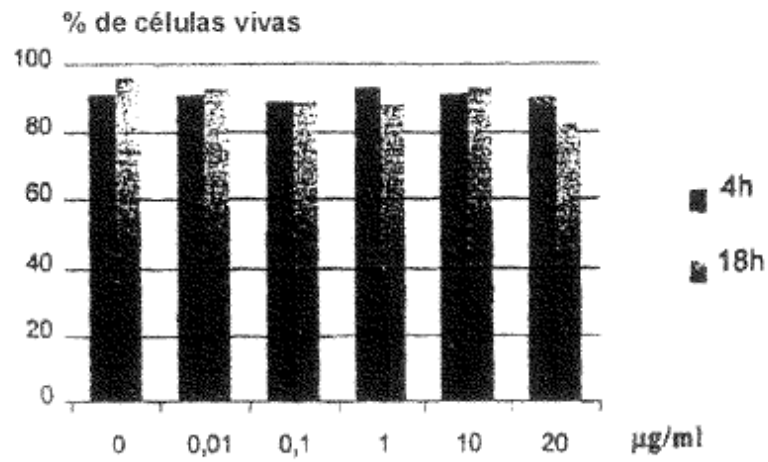


FIGURA 18A

Ensayo ELISA de fragmentación del ADN



Azul Tripán **HepG2 / Camptotecina**



Ensayo MTT

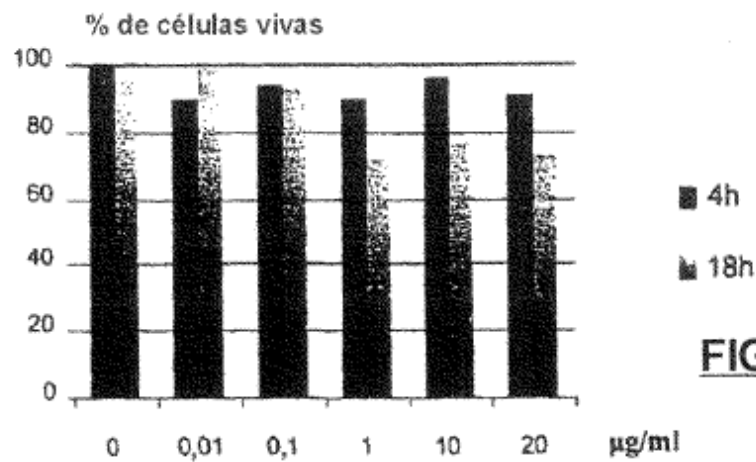
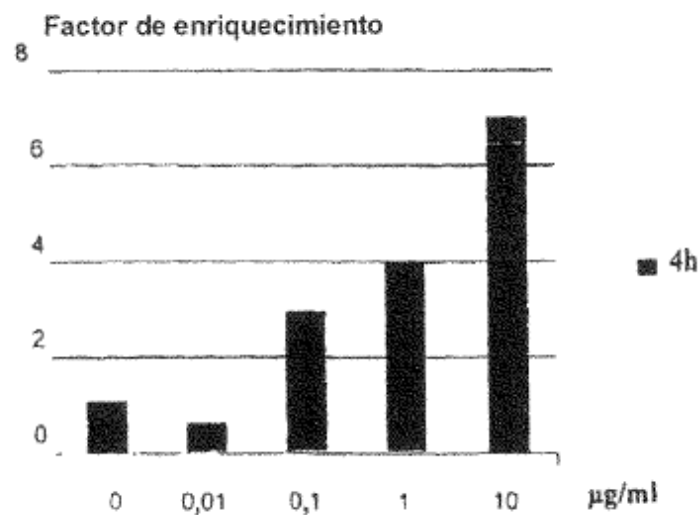


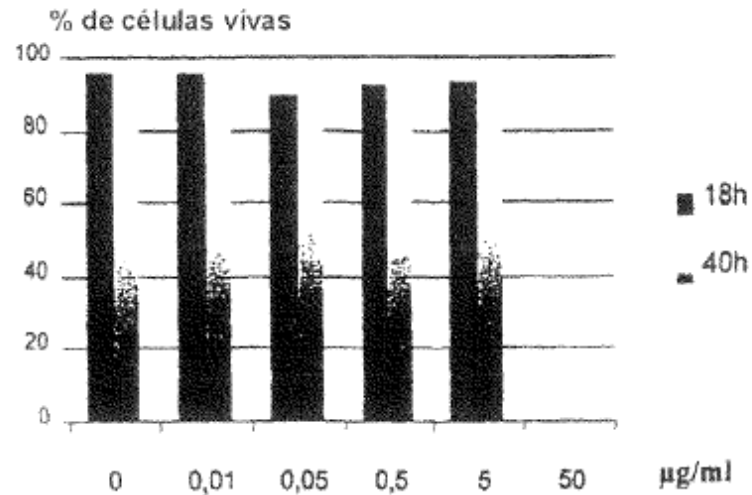
FIGURA 18B

Ensayo ELISA de fragmentación del ADN

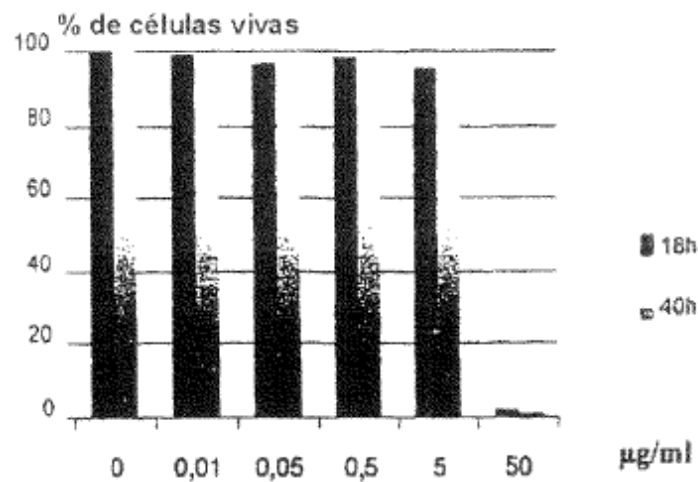


HepG2 / PMA

Azul Tripán



Ensayo MTT



Ensayo ELISA de fragmentación del ADN

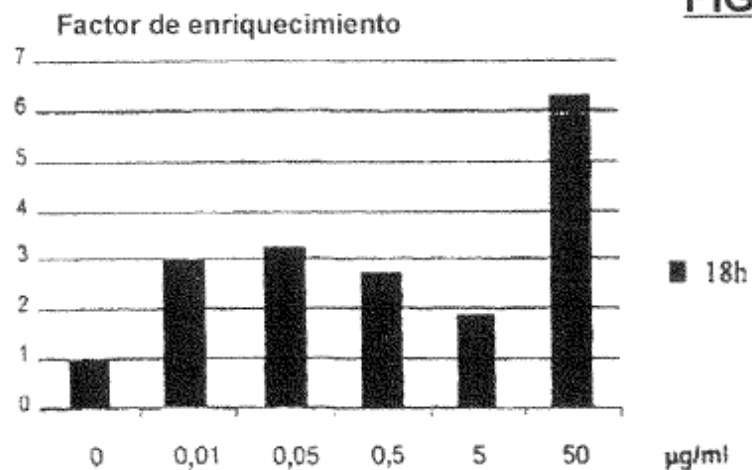


FIGURA 18C

