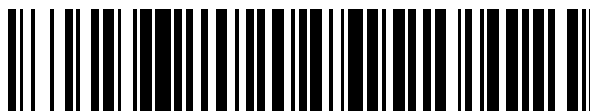


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 210**

51 Int. Cl.:

C07F 9/6561 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 5/09 (2010.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2004** **E 10171933 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.02.2017** **EP 2264170**

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

30 Prioridad:

21.05.2003 US 472106 P

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

21.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 618 210 T3

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

DESCRIPCIÓN

Marcadores para células precancerosas y cancerosas y el método para interferir con la proliferación celular de estas

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a terapia del cáncer, al diagnóstico del cáncer y a reactivos para la investigación en relación con una nueva familia de ARN mitocondriales humanos, referidos como ARN quiméricos mitocondriales humanos. Particularmente la presente invención se refiere a oligonucleótidos dirigidos a los ARN quiméricos mitocondriales humanos. Los oligonucleótidos de la invención se hibridan con los ARN quiméricos induciendo la muerte de las células cancerosas. Las composiciones y los métodos provistos en la invención son útiles como una nueva terapia del cáncer. Además, los oligonucleótidos pueden usarse en el diagnóstico de células cancerosas y precancerosas basado en la expresión diferencial de los ARN quiméricos mitocondriales en células normales, en reposo y en proliferación, en células precancerosas y cancerosas.

15 **Antecedentes de la invención**

Las mitocondrias son orgánulos subcelulares que sintetizan la adenosina trifosfato (ATP), molécula esencial para el metabolismo, mediante la fosforilación oxidativa. El ADN mitocondrial (ADNmt) humano de 16.654 pares de bases (pb) codifica dos ARN ribosomales (ARNr), 22 ARN de transferencia (ARNt) y 13 fases de lectura abierta (ORF) que codifican un número similar de polipéptidos. (Clayton, Hum Reprod., Suppl. 2:11-17, 2000; Taanman, Biochim. Biophys. Acta, 1410:103-123, 1999). En base a la composición de bases G+T, las dos hebras del ADNmt difieren en su densidad de flotación y pueden ser separadas en gradientes desnaturizantes de cloruro de cesio. La hebra pesada (hebra H) codifica los dos ARN ribosomales (12S y 16S), 14 ARNt y 12 polipéptidos que corresponden a ND 1, ND 2, ND 3, ND4L, ND4, ND 5, COX I COX II, COX III, ATP6, ATP8 y Cyt b. La hebra ligera o hebra L codifica 8 ARNt y la subunidad ND6 del complejo NAD deshidrogenasa (Clayton, Hum Reprod., Suppl. 2:11-17, 2000; Taanman, Biochim. Biophys. Acta, 1410:103-123, 1999).

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

Ambas hebras se transcriben como ARN policistrónicos que son luego procesados para liberar los ARNm, ARNt y ARNr individuales (Taanman, Biochim. Biophys. Acta, 1410:103-123, 1999). En seres humanos la ARN polimerasa mitocondrial es una proteína de 1.230 aminoácidos con una homología significativa con la secuencia de la ARN polimerasa mitocondrial de levaduras y las ARN polimerasas de varios bacteriófagos (Tiranti et al., Hum Mol Genet., 6:615-625, 1997). Además, se ha caracterizado una familia de factores de transcripción tales como el factor A o TFAM, que es esencial para la transcripción del ADNmt de mamíferos y es un miembro de la familia de proteínas de alta movilidad (HMG)-box que se unen al ADN (Paris and Clayton, Science, 252:965-969, 1991). Recientemente, dos informes independientes han descrito las características de nuevos factores de transcripción, TBF1M y TBF2M en seres humanos y ratones (McCulloch et al., Mol. Cell Biol., 22:1116-1125, 2002; Falkenberg et al., Nat. Genet., 31:289-294, 2002; Rantanen et al., Mamm. Genome, 14:1-6, 2003). A pesar del considerable progreso alcanzado en los elementos involucrados en la transcripción del ADNmt, que actúan en *cis* y *trans*, los detalles funcionales no se conocen completamente.

Villegas et al., DNA and Cell Biology, 2000, Vol 19, No 9, pp579-588 describe un ARN mitocondrial quimérico localizado en el núcleo del espermatozoide de ratón. El ARN mitocondrial quimérico comprende una secuencia repetitiva invertida unida al extremo 5' del ARN mitocondrial 16S. Villegas et al., Nucleic Acids Research, 2002, Vol 30, No 9, pp1895-1901 caracteriza además este ARN quimérico y describe una supuesta edición de ARN de U a C en un transcrito mitocondrial de ratón. Villegas et al., Molecular Human Reproduction, 2002, Vol 8, No 11, pp977-983 describe la localización del ARNr mitocondrial 16S en el núcleo de células espermatogénicas de mamíferos.

60 **Mitocondria y apoptosis**

Las mitocondrias desempeñan un papel central en la apoptosis, un proceso biológico fundamental por el cual las células mueren en un proceso controlado o programado. Este programa de suicidio celular es esencial durante el desarrollo y para la homeostasis en adultos de todos los animales metazoos. La apoptosis es activada para eliminar células superfluas, dañadas, mutadas y envejecidas (Meier et al., Nature, 407:796-801, 2000). La disregulación de

la apoptosis está implicada en la aparición de diversas patologías. Así la inhibición anormal de la apoptosis es la característica de las neoplasias, mientras que la apoptosis masiva se ha relacionado con enfermedades agudas tales como el ictus, el choque séptico y las enfermedades neurodegenerativas. Actualmente la apoptosis se describe basada en dos vías principales denominadas la vía extrínseca y la vía intrínseca (Zornig et al., Biochim. Biophys. Acta, 1551:F1-F37, 2001). La vía extrínseca es un proceso iniciado en la membrana celular por la unión de ligandos diferentes a los receptores de muerte celular (Krammer, Mature, 407:789-795, 2000; Zornig et al., Biochim. Biophys. Acta, 1551:F1-f37, 2001).

Las caspasas son enzimas responsables de la cascada proteolítica en la apoptosis. Las caspasas son sintetizadas como proteínas precursoras inactivas que experimentan una maduración o proceso proteolítico durante la inducción de la apoptosis (Zornig et al., Biochim. Biophys. Acta, 1551:F1 - F37, 2001). Sin embargo, hay diversas evidencias experimentales nuevas que indican que las proteasas lisosomales constituyen una ruta alternativa de proteólisis después de daños apoptóticos (Guicciardi et al., Oncogene, 23:2881-2890, 2004). Por otra parte se han descrito proteínas antiapoptosis, homologas a la oncoproteína humana Bcl-2. Esta proteína pertenece a una familia de proteínas que son anti apoptosis (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w) o pro-apoptosis (Bax, Bak, Bim, Bid, etc.) (Zornig et al., Biochim. Biophys. Acta, 1551:F1-F37, 2001).

Las mitocondrias se ven especialmente afectadas en forma temprana durante el proceso de apoptosis y actualmente son reconocidas como las coordinadoras centrales de la muerte celular (Boya et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 304:575-581, 2003; Ferri and Kroemer, Nature Cell Biol., 3:E255-E263, 2001; Zornig et al., Biochim. Biophys. Acta, 1551:F1-F37, 2001). Varias rutas de señales pro-apoptóticas y de daño convergen en las mitocondrias induciendo la permeabilización de la membrana mitocondrial, fenómeno que está bajo el control de las proteínas Bcl-2 (Boya et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 304:575-581, 2003; Zornig et al., Biochim. Biophys. Acta, 1551:F1-F37, 2001). Después que las células reciban daños apoptóticos, el potencial transmembrana ($\Delta\psi_m$) se disipa resultando en una completa permeabilización de la membrana mitocondrial externa y la consiguiente salida de proteínas mitocondriales tóxicas. El primer ejemplo de la filtración de una proteína mitocondrial fue la liberación de citocromo c (Liu et al., Apoptosis, 6:453-462, 2001). Al estar presente el citocromo c en el citosol, se induce el ensamblaje del complejo de activación de caspasas denominado apoptosoma. El citocromo c se une al Apaf-1 (Factor-1 de activación de proteasas apoptóticas) facilitando la unión de dATP/ATP al complejo y la oligomerización de Apaf-1 (Adrain et al., J. Biol. Chem., 274:20855-20860, 1999; Benedict et al., J. Biol. Chem., 275:8461-8468, 2000). La oligomerización de Apaf-1 permite el reclutamiento de la pro-caspasa-9, la cual cataliza la activación proteolítica del precursor y la producción de caspasa-9 activa (Adrain et al., J. Biol. Chem., 274:20855-20860, 1999; Benedict et al., J. Biol. Chem., 275:8461-8468, 2000).

Se ha descrito una familia de inhibidores citosólicos de las proteínas de la apoptosis que se conoce como XIAP, c-IAP1 y C-IAP2. Estas proteínas se unen, e inhiben la caspasa-3 y la caspasa-9 deteniendo consiguientemente la cascada de degradación. Sin embargo las células también contienen mecanismos para eludir esta ruta antiapoptótica. En células que sufren apoptosis, las caspasas se liberan de este efecto inhibitorio uniéndose a las IAP de una proteína conocida como Smac (Segundo activador mitocondrial de caspasas) o DIABLO (Proteína de unión directa a IAP con bajo p1) (Verhagen et al., Apoptosis, 7:163-166, 2002). Al unirse a las IAP, Smac/DIABLO desplazan las caspasas activas de las IAP, promoviendo así la muerte celular. Otra proteína, conocida como HtrA2, se libera de la mitocondria al citosol después de un daño apoptótico, lugar donde se une a las IAP en forma similar a Smac/DIABLO facilitando así la activación de las caspasas (Verhagen et al., Apoptosis, 7:163-166, 2002; Martins et al., 2001; Suzuki et al., Mol. Cell, 8:613- 621, 2001; Hedge et al., Apoptosis, 7:123-132, 2002).

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

Cáncer y precáncer

El cáncer es una enfermedad maligna celular cuya particularidad única es la pérdida del control normal del ciclo celular, resultando en un crecimiento descontrolado, falta de diferenciación y capacidad para invadir otros tejidos y metastatizar. La carcinogénesis es el proceso por el cual una célula normal se transforma en una célula maligna. La carcinogénesis es un proceso de múltiples etapas que comienza con un acontecimiento genético de iniciación, seguido durante la etapa de promoción, por la expansión selectiva de las células alteradas para formar adenomas tempranos. En ausencia de una continua promoción, el adenoma revierte y desaparece. Con un segundo acontecimiento genético, un pequeño grupo de adenomas promovidos progresan de forma continua hasta formar adenomas tardíos, algunos de los cuales pueden sufrir la conversión maligna (late adenomas some of which may

then undergo malignant conversion (McKinnell et al., "The Biology Basis of Cancer", Ch. 3, 1998).

La etiología del cáncer es compleja e incluye alteraciones de la regulación del ciclo celular, aberraciones cromosómicas y ruptura de cromosomas. Se piensa que agentes infecciosos como varios tipos de oncovirus, sustancias químicas, radiaciones (ultravioleta o ionizantes) y trastornos inmunológicos son las principales causas de la carcinogénesis (McKinnell et al., "The Biological Basis of Cancer", Ch. 3, 1998).

Desde hace tiempo se ha propuesto que el cáncer está también relacionado con la disfunción mitocondrial. Una de estas teorías sugiere que la mutación mitocondrial puede ser la causa primaria de la transformación celular y del cáncer (Warburg, 1956; Carew and Huang, Mol. Cancer, 1:1-12, 2002). Se han descrito alteraciones en el ADN mitocondrial (ADNmt) en cánceres hematológicos (Clayton and Vinograd, Mature, 216:652-657, 1967) y en el cáncer de mama (Tan et al., 2002; Parrella et al., 2001). También se han descrito mutaciones en varias regiones del ADNmt y deleciones en pacientes de cáncer colorrectal, cáncer de próstata, cáncer ovárico, cáncer gástrico, cáncer pancreático, carcinoma hepatocelular, cáncer de esófago, cáncer renal, cáncer tiroideo y tumores cerebrales (revisado por Carew and Huang, Mol. Cancer, 1:1- 12, 2002). En general, parece haber dos alteraciones características en el ADNmt independientemente del tipo de tumor. La mayoría de las mutaciones consisten en transiciones de bases de T a C y de G a A. En segundo lugar, aun cuando hay diversidad en los genes particulares en los que ocurren las mutaciones, en la mayoría de los tipos tumorales, el lazo D parece ser la región del ADNmt somático más frecuentemente mutada en la mayoría de los tumores.

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

La presente invención se relaciona con una nueva familia de ARN mitocondriales y el uso en la presente memoria de estos ARN como dianas para el diagnóstico y la terapia del cáncer. La presente divulgación proporciona composiciones que son útiles para diferenciar células normales de células tumorales o de células precancerosas o células transformadas por virus oncogénicos. En particular, como se detalla más adelante, la presente divulgación proporciona composiciones para ensayos diagnósticos destinados a diferenciar células normales de células cancerosas y precancerosas. En otra realización de la divulgación, se proporcionan composiciones para inducir la muerte selectiva y masiva de las células tumorales. Por consiguiente la presente divulgación proporciona composiciones que se pueden usar en la terapia del cáncer y pre-cáncer y también en investigación.

Sumario de la invención

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica, en la que la composición farmacéutica comprende uno o más oligonucleótidos antisentido de 10-50 nucleobases de longitud que son complementarios con una molécula de ARN quimérico mitocondrial humano que comprende un ARN mitocondrial 16S sentido o antisentido covalentemente unido en su extremo 5' al extremo 3' de un polinucleótido con una secuencia repetida invertida, que es capaz de hibridar con la de la molécula de ARN quimérico mitocondrial humano para formar un dúplex estable, en la que además uno o más de los oligonucleótidos comprende al menos una unión internucleosídica alternativa.

ARN quiméricos mitocondriales sentido

En un aspecto de esta divulgación las composiciones se proporcionan para detectar un ARN quimérico mitocondrial sentido comprendido por una secuencia repetitiva invertida de 815 nucleótidos unidos covalentemente al extremo 5' del ARN ribosomal mitocondrial 16S (SEQ ID NO 1). La secuencia repetitiva invertida corresponde a un fragmento de 815 nucleótidos del ARN transcrito desde la hebra L del gen de 16S del ADNmt. Por tanto, la síntesis de este nuevo ARN requiere la transcripción de la hebra L y la hebra H del gen de 16S del ADNmt. Como la transcripción de ambas hebras del ADNmt está regulada por diferentes promotores, en la presente invención nos referimos a este nuevo ARN como el ARN quimérico mitocondrial (SEQ ID NO 1). Además, como la secuencia repetitiva invertida de 815 nucleótidos se une al ARN 16S "sentido" (transcrito desde la hebra H) nos referimos a este nuevo ARN como el "ARN quimérico mitocondrial sentido". Esta divulgación proporciona composiciones para detectar la expresión del ARN quimérico mitocondrial sentido en células cultivadas, muestras celulares y cortes de tejidos. La detección puede ser efectuada por hibridación *in situ*, síntesis del correspondiente ADNc, amplificación por PCR, amplificación mediada por transcripción (TMA) (Comanor et al., J. Clin Virol., 28:14-26, 2003), transferencia Northern u otros métodos obvios para un experto en la técnica.

Los ensayos de hibridación *in situ* revelaron que el ARN quimérico mitocondrial sentido se expresa en células normales en proliferación, en células tumorales en cultivo y en células tumorales presentes en biopsias de diferentes tipos tumorales humanos. El ARN quimérico mitocondrial sentido no se expresa en células normales en reposo proliferativo. En otra realización de la divulgación, se proporcionan composiciones para detectar un nuevo segundo ARN quimérico mitocondrial sentido en células transformadas por el virus del papiloma 16 o 18 (Heusen, Biochim. Biophys. Acta, 1288:F55-F78, 1996). En estas células transformadas se expresa un nuevo ARN quimérico mitocondrial sentido comprendido por una secuencia repetitiva invertida de 754 nucleótidos unidos covalentemente al extremo 5' del ARN mitocondrial 16S (SEQ ID NO2). Este ARN no está presente en células normales en

proliferación ni en células tumorales. Las composiciones también demostraron que un tercer ARN quimérico mitocondrial sentido, que comprende una secuencia repetitiva invertida de 694 nucleótidos unidos covalentemente al extremo 5' del ARN mitocondrial 16S (SEQ ID NO 3), está presente en células transformadas por HTLV-1.

5 ARN quimérico mitocondrial antisentido

Esta divulgación también proporciona composiciones que revelaron que las células normales en proliferación sobreexpresan ARN quiméricos mitocondriales antisentido que corresponden a las SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6. Estos transcritos contienen repeticiones invertidas de longitud variable (transcritos de la hebra H) unidos al extremo 5' del ARN 16S mitocondrial ribosomal antisentido (transcrito de la hebra L), de ahí el nombre de ARN quimérico mitocondrial antisentido. La expresión del ARN quimérico mitocondrial antisentido está regulada a la baja en cultivos de líneas celulares tumorales, así como en células tumorales presentes en biopsias humanas de tipos de tumores diferentes y también en células transformadas o precancerosas. Por tanto, la presente divulgación proporciona composiciones para detectar la expresión de los ARN quiméricos mitocondriales sentido y antisentido, distinguiendo las células normales en proliferación de las células cancerosas y precancerosas, y por lo tanto, proporciona un nuevo marcador para células precancerosas y cancerosas.

Terapia del cáncer

En otro aspecto de esta invención, se proporcionan composiciones que interfieren con los ARN quiméricos mitocondriales sentido y antisentido. Una realización preferida consiste en interferir con el ARN quimérico mitocondrial antisentido en células tumorales que contengan un bajo número de copias de este transcrito. La interferencia se lleva a cabo con oligonucleótidos o análogos de oligonucleótidos cuyas secuencias son complementarias a las secuencias del ARN quimérico mitocondrial antisentido (SEQ ID NO 4 y/o SEQ ID NO 5 y/o SEQ ID NO 6). El tratamiento de las células tumorales de diferentes tipos con uno o más de estos oligonucleótidos complementarios induce la muerte celular o la apoptosis. El tratamiento del pre-cáncer o del cáncer se lleva a cabo con compuestos u oligonucleótidos de 15 a 50 nucleótidos de longitud que son suficientemente complementarios con una molécula de ARN quimérico mitocondrial humano que comprende un ARN ribosomal mitocondrial 16S sentido unido en su extremo 5' al extremo 3' de un polinucleótido con una secuencia repetida invertida, que es capaz de hibridar con la de la molécula de ARN quimérico mitocondrial humano para formar un dúplex estable. Los oligonucleótidos son preferiblemente compuestos de 15 a 50 nucleótidos, donde al menos 15 nucleobases son complementarias con la SEQ ID NO 4 y/o SEQ ID NO 5 y/o SEQ ID NO 6. En las SEQ ID NOS 98 a 196 se muestran ejemplos de dichos oligonucleótidos complementarios. La inducción de la apoptosis es selectiva puesto que el tratamiento de linfocitos humanos (célula normal en reposo) o linfocitos humanos estimulados con fitohemaglutinina (células normales en proliferación) no sufren apoptosis después del tratamiento con oligonucleótidos complementarios con las secuencias de ARN quimérico mitocondrial antisentido en las mismas condiciones. Si las células tumorales son tratadas con oligonucleótidos dirigidos o complementarios con el ARN quimérico mitocondrial sentido (SEQ ID NO 1 y/o SEQ ID NO 2 y/o SEQ ID NO 3) se obtiene una baja inducción de muerte celular o apoptosis.

Breve descripción de las figuras

FIGURAS 1A-1C. Esquemas que muestran la estructura de los ARN quiméricos mitocondriales correspondientes a las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3. Las flechas indican la posición relativa de los cebadores utilizados para amplificar segmentos de ARN. Las flechas debajo de las líneas son cebadores inversos y las flechas sobre las líneas son cebadores directos. El cebador 1 está ubicado cerca del extremo 5' del ARN mitocondrial 16S. Las líneas negras continuas corresponden al ARN mitocondrial 16S sentido, mientras que las líneas discontinuas corresponden al ARN mitocondrial 16S antisentido.

FIGURA 2. Electroforesis en gel de agarosa que muestra el producto de amplificación obtenido entre el cebador 1 y el cebador 3 indicados en la FIG. 1A. La amplificación se realizó por RT-PCR usando como molde células tumorales (SiHa), queratinocitos humanos transformados por HPV 16 (HFK698) o linfocitos B transformados por HTLV-1. Con el ARN de células SiHa se obtuvo un solo amplicón de 210 pb que corresponde a un segmento de la SEQ ID NO 1. En el ARN total de los queratinocitos transformados con HPV 16, además del amplicón de 210 pb se obtuvo un segundo amplicón de 150 pb que corresponde a un segmento de SEQ ID NO 2. 10 Con el ARN de las células transformadas con HTLV-1, además de los amplicones de 210 pb y de 150 pb se obtuvo un tercer amplicón que corresponde a un segmento de SEQ ID NO 3.

FIGURA 3. Esquemas que muestran la estructura de los ARN quiméricos mitocondriales antisentido correspondientes a las SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6. Las flechas representan el cebador utilizado para la amplificación y el cebador 1 está situado cerca del extremo 5' del ARN mitocondrial 16S antisentido. La estrategia para obtener la secuencia de estos transcritos es similar a la descrita en la Fig. 1.

FIGURAS 4A y 4B. Ensayos de hibridación *in situ* realizados con varias líneas de células tumorales en cultivo. Las células fueron hibridadas con sondas oligonucleotídicas complementarias del ARN quimérico mitocondrial sentido y marcadas con digoxigenina (columna izquierda). Adicionalmente, las células también se hibridaron en

paralelo con sondas oligonucleotídicas complementarias del ARN quimérico mitocondrial antisentido marcado con digoxigenina (columna derecha). Las líneas celulares se identifican a la izquierda.

FIGURA 5A. Hibridación *in situ* de varios cortes de biopsias humanas correspondientes a diferentes tipos tumorales. Los cortes tumorales se hibridaron con sondas oligonucleotídicas complementarias del ARN quimérico mitocondrial sentido y marcadas con digoxigenina (columna izquierda). Adicionalmente, se hibridaron cortes de tumor en paralelo con sondas oligonucleotídicas complementarias del ARN quimérico mitocondrial antisentido marcadas con digoxigenina (columna derecha).

FIGURA 5B. Muestra la hibridación *in situ* de diferentes tumores humanos llevada a cabo con sondas oligonucleotídicas complementarias del ARN quimérico mitocondrial sentido marcadas con digoxigenina.

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

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

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

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

FIGURA 10. Porcentaje de células apoptóticas después de diferentes tratamientos de linfocitos en reposo y en proliferación. La apoptosis fue medida en linfocitos en reposo o estimulados con PHA mediante tinción con DAPI. Las barras 1 y 2 corresponden a células no tratadas. Se observa un bajo nivel de apoptosis espontánea de células control (1) o linfocitos estimulados con PHA (2). Se observó un nivel similar de apoptosis se observa en linfocitos en reposo (3) o en linfocitos estimulados con PHA (4) tratados con sondas de oligonucleótidos 15 μ M dirigidas al ARN quimérico mitocondrial antisentido durante 15 h, mostrando que la apoptosis no es inducida en células normales. Como control, se trataron con estaurosporina linfocitos en reposo proliferativo y linfocitos estimulados con PHA. En estas condiciones aproximadamente el 90 % de los linfocitos en reposo proliferativo (5) o de los linfocitos estimulados con PHA (6) sufren apoptosis.

Descripción detallada de la invención

La familia de los ARN quiméricos mitocondriales humanos

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

Uno de estos transcritos contiene una larga secuencia repetitiva invertida de 815 nucleótidos unido covalentemente al extremo 5' del ARN ribosomal 16S mitocondrial y denominado ARN quimérico mitocondrial sentido. Esta larga secuencia repetitiva invertida es totalmente complementaria al ARN ribosomal 16S desde la posición 51 hasta la 866, formando un largo tallo de doble hebra y un lazo de 50 nucleótidos. Como se ve en la Figura 1A el tallo formado por 815 pares de bases representa un grave problema para que una transcriptasa reversa pueda sintetizar el ADNc correspondiente. Por lo tanto se usó una nueva estrategia para amplificar este ARN por RT-PCR que es la que está ilustrada en la Figura 1A. Después de obtener la secuencia de cada fragmento solapado, éstas se ensamblaron como secuencias contiguas para obtener la secuencia completa del ARN quimérico mitocondrial sentido mostrado en SEQ ID NO 1 (Fig. 1A).

Otro aspecto de esta divulgación es el descubrimiento de otros nuevos ARN quiméricos mitocondriales sentido que se expresan en células transformadas por el virus oncogénico del papiloma humano 16 o 18 (HPV16- HPV18). Se infectaron queratinocitos de prepucio humano (HFK) con el virus del papiloma humano 16 o 18 (Heusen, Biochim. Biophys. Acta, 1 288:F55-F78, 1996). La infección induce la transformación o inmortalización de las células HFK. Sin embargo, estas células no son tumorigénicas como las células SiHa relacionadas (infectadas con HPV16) o las células HeLa (infectadas con HPV 18). Estas células expresan el ARN quimérico mitocondrial sentido (SEQ ID NO 1) de modo similar al de las células SiHa y HeLa. Sin embargo, las células transformadas también expresan otro segundo ARN quimérico mitocondrial sentido que contiene una secuencia repetitiva invertida de 754 nucleótidos unidos al ARN ribosomal 16S (Fig 1B) (SEQ ID NO 2). Este nuevo ARN quimérico mitocondrial sentido está regulado a la baja o no se expresa en células normales humanas (HFK) o en células tumorigénicas (SiHa o HeLa).

En otra realización de esta invención determinamos la expresión de un tercer ARN quimérico mitocondrial sentido en células transformadas con HTLV-1 (Kobayashi et al., EMBO J., 3:1339-1343, 1984). Células MT-2 infectadas con el HTLV-1 expresan el ARN quimérico mitocondrial sentido (SEQ ID NO 1) y el ARN quimérico mitocondrial sentido expresado en las células transformadas con HPV 16 o 18 (SEQ ID NO 2). Además de estos transcritos, la célula infectada con HTLV-1 expresa un tercer ARN quimérico mitocondrial sentido que contiene una secuencia repetitiva invertida de 694 nucleótidos unida al extremo 5' del ARN ribosomal 16S. Este nuevo ARN (Fig. 1C) (SEQ ID NO 3) no se expresa en células normales en proliferación, ni en células tumorales ni en células transformadas por HPV 16 o 18.

Las células normales en proliferación, tales como los queratinocitos de prepucio humano (HFK) descritos en la sección anterior, también sobreexpresan el ARN quimérico mitocondrial sentido (Figura 6) (SEQ ID NO 1). Los linfocitos humanos estimulados con mitógenos como la fitohemaglutinina (PHA) entran en fase S del ciclo celular y comienzan la síntesis de ADN (Yu et al., J. Biol. Chem., 266:7588-7595, 1991). Como células en proliferación, los linfocitos también expresan antígenos relacionados con la proliferación tal como Ki-67 y antígenos nucleares de proliferación celular o PCNA (Bantis et al., Cytopathology, 15:25- 31, 2004). Los linfocitos estimulados también sobreexpresan el ARN quimérico mitocondrial sentido (SEQ ID NO 1). Otras células en proliferación, como los linfocitos en el centro germinal del bazo, espermatogonias y células embrionarias, también sobreexpresan el ARN quimérico mitocondrial sentido (SEQ ID NO 1) (Fig. 4). Por el contrario, las células que no están proliferando tales como linfocitos no estimulados o células musculares no expresan el ARN quimérico mitocondrial sentido (Figura 7).

En otra realización de la divulgación, se proporcionan composiciones útiles en métodos para diferenciar células en proliferación normales de células tumorales. Como se ha descrito anteriormente, las células tumorales y las células normales en proliferación sobreexpresan el ARN quimérico mitocondrial sentido descrito en la SEQ ID NO 1. Además, en situaciones específicas de infección con HPV y HTLV-1, se encuentran otros ARN quiméricos adicionales (SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3). Sin embargo, la presente invención se basa también en el sorprendente descubrimiento de que las células normales en proliferación también sobreexpresan un ARN quimérico mitocondrial antisentido. La expresión del ARN quimérico mitocondrial antisentido se confirmó en linfocitos humanos estimulados con PHA (Fig. 7), en células HFK normales y en otras células normales en proliferación (Fig. 6). Otro descubrimiento importante de la presente invención es que, a diferencia de las células normales en proliferación las células tumorales no expresan el ARN quimérico mitocondrial antisentido o regulan a la baja significativamente su producción (comparar las Figuras 4A- 4B con las Figuras 6 y 7).

Usando la misma estrategia descrita anteriormente para amplificar el ARN quimérico por RT-PCR, basada en fragmentos solapantes, se pudo determinar la estructura del ARN quimérico mitocondrial antisentido (Fig. 3). La secuenciación y ensamblaje en secuencias contiguas revela una compleja familia de ARN quiméricos mitocondriales antisentido que contienen secuencias invertidas de diferentes longitudes unidas al extremo 5' del ARN ribosomal mitocondrial 16S antisentido (Figs. 3A, 3B y 3C) (SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6). La secuencia revela también la formación de estructuras de dos hebras o tallos en estos ARN y la formación de lazos de 17, 96 y 451 nucleótidos respectivamente (Fig. 3A, 3B y 3C, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6). En otra realización de la divulgación, se proporcionan composiciones para seguir la transformación oncogénica de células por un virus oncogénico. Células HeLa (infectadas con HPV 18) o células SiHa (infectadas con HPV 16) sobreexpresan el ARN quimérico mitocondrial sentido pero regulan a la baja la expresión de los ARN quiméricos mitocondriales antisentido. Por otra parte, las células HFK como células en proliferación normal sobreexpresan tanto el ARN quimérico mitocondrial sentido como antisentido. Después de transformar las células HFK con HPV 16 o HPV 18, estas adquieren el fenotipo tumoral: sobreexpresan el ARN quimérico mitocondrial sentido y regulan a la baja la expresión del ARN quimérico mitocondrial antisentido. La sobreexpresión del ARN quimérico mitocondrial sentido y la regulación a la baja del ARN quimérico mitocondrial antisentido pueden ser determinadas por hibridación *in situ*, amplificación del ARN por RT-PCR o usando otros métodos para determinar un ARN mediante técnicas bien conocidas por el experto en la materia. Estas composiciones pueden ser usadas para determinar el cambio en la expresión de la familia de ARN quiméricos en células transformadas con otros virus oncogénicos o por compuestos que inducen la transformación o la carcinogénesis (McKinnell et al., "The biological basis of Cancer", Cambridge University Press 1998).

Diagnóstico de cáncer y precáncer

De acuerdo con la presente divulgación se proporcionan composiciones para detectar la presencia en una muestra biológica la presencia de ARN quiméricos mitocondriales sentido y de ARN quiméricos mitocondriales antisentido. En una realización preferida, la detección se lleva a cabo por hibridación *in situ*. La detección del ARN quimérico mitocondrial sentido y del ARN quimérico mitocondrial antisentido en las células de una muestra biológica indica que las células son células normales en proliferación. En otra realización, el resultado de la hibridación *in situ* con células tumorales mostrará la expresión del ARN quimérico mitocondrial sentido y la regulación a la baja o ausencia del ARN quimérico mitocondrial antisentido. Si la muestra biológica contiene células normales sin proliferar, la hibridación *in situ* mostrará que ni el ARN quimérico mitocondrial sentido ni el ARN quimérico mitocondrial antisentido se expresan.

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

Las muestras biológicas de acuerdo con la divulgación incluyen el uso de tejidos congelados rápidamente o muestras de células para análisis histopatológico, técnica muy conocida por el experto en la materia. En otra alternativa, las muestras biológicas pueden ser biopsias de cortes fijados mediante un tratamiento químico que puede llevarse a cabo por una amplia gama de protocolos de fijación conocidos en la técnica (Frederick et al., Current Protocols In Molecular Biology, Volumen 2, Unidad 14, Frederick M. Ausubul et al. edS., 1995; Celis, Cell Biology, A Laboratory Handbook, Julio E. Celis, ea., 1994). Las muestras biológicas pueden ser también materiales biológicos sin fijar que no han sido modificados químicamente ni tratados con formalina u otro fijador conocido en la técnica.

Como alternativa, se puede efectuar la hibridación *in situ* usando muestras biológicas incluidas en materiales como parafina sólida u otros polímeros de inclusión. Los bloques obtenidos después de la inclusión pueden ser seccionados en cortes de 4 a aproximadamente 10 µm de espesor mediante un micrótopo. El corte se adhiere a continuación a portas de vidrio o plástico mediante una sustancia adhesiva conocida como polilisisina o proteína adhesiva del mejillón (Burzio et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8:309-312, 1997).

La hibridación *in situ* de la presente divulgación puede ser realizada de diversas maneras conocidas por el experto en la materia. Por ejemplo se pone en contacto con la célula en condiciones de hibridación una solución que contenga una o más sondas marcadas, dirigidas a una o más de las secuencias del ARN quimérico mitocondrial sentido (SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3) o al ARN quimérico mitocondrial antisentido (SEQ ID NO 5 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6) de las células. A continuación, se compara la señal de hibridación con un patrón de hibridación predeterminado de células normales o controles de células cancerosas y precancerosas.

Como se usa en la presente memoria, las sondas marcadas utilizadas en la hibridación *in situ* son ARN, ADN o ácidos nucleicos sintéticos que pueden ser preparados por cualquier método conocido en la técnica. Los ácidos nucleicos sintéticos incluyen ribosondas transcritas *in vitro* o fragmentos de PCR. En un aspecto preferido de esta divulgación se pueden usar oligonucleótidos complementarios sintéticos. Las sondas de oligonucleótidos complementarios son de al menos aproximadamente 10 nucleótidos de longitud, preferiblemente de al menos aproximadamente 14 y lo más preferiblemente de al menos 18 nucleótidos de longitud. El experto en la materia comprende que la longitud puede extenderse desde 10 o más nucleótidos hasta cualquier longitud que siga permitiendo la hibridación con los ARN quiméricos mitocondriales sentido y los ARN quiméricos mitocondriales antisentido. En una realización preferida de la presente memoria, la longitud es de aproximadamente 30 nucleótidos, más preferiblemente de aproximadamente 25 nucleótidos y lo más preferiblemente entre 10 y 50 nucleótidos de longitud. También se pueden usar como sondas ácidos nucleicos más largos. Las secuencias de la sonda son al menos noventa y cinco por ciento homólogas a las secuencias listadas en SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6.

Las sondas de oligonucleótidos complementarios de la presente divulgación generalmente contendrán enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos se incluyen sondas de oligonucleótidos análogos que pueden tener uniones internucleótidos alternativas que comprenden pero no se limitan, a uniones fosforotioato (Mag et al., Nucleic Acids Res. 19:1437-1441, 1991 y patente US-5.644.048), péptido de ácido nucleico o PNA (Egholm, Nature, 365:566568, 1993 y patente US-6.656.687), fosforamida (Beaucage, Methods Mol. Biol. 20:33-61, 1993), fosforoditioato (Capaldi et al., Nucleic Acids Res., 28:E40, 2000). Otros análogos de oligonucleótidos complementarios incluyen pero no se limitan a morfolino (Summerton, Biochim. Biophys. Acta, 1489:141-158, 1999), oligonucleótidos bloqueados (Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. US, 97:5633-5638, 2000), ácidos nucleicos peptídicos o PNA (Nielsen et al., 1993; Hyrup and Nielsen, 1996) u oligonucleótidos modificados por 2- o (2-metoxi)etil en los extremos 5' y 3' (McKay

et al., J. Biol. Chem., 274:1715-1722, 1999). El ácido nucleico puede contener cualquier combinación de desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos y cualquier combinación de bases incluyendo uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina, hipoxantina, isocitosina, isoguanina, etc.

En otra realización de la divulgación, las sondas de ácido nucleico o de oligonucleótidos deben ser marcadas para detectar la hibridación con ARN quiméricos mitocondriales sentido o ARN quiméricos mitocondriales antisentido. Las sondas pueden ser marcadas con un marcador detectable por cualquier método conocido en la técnica. Los métodos de marcaje incluyen la utilización de cebadores al azar, el marcaje terminal, la PCR y el marcaje por desplazamiento de mella. El marcaje enzimático se realiza en presencia de polimerasa de ácido nucleico, de tres nucleótidos no marcados y de un cuarto nucleótido que está directamente marcado o que contiene un brazo enlazador para la unión de un marcador o que está unido a un hapteno u a otra molécula a la cual se pueda unir una molécula marcada. Los marcadores directos adecuados incluyen marcadores radioactivos como ^{32}P , ^3H y ^{35}S y marcadores no radiactivos tales como marcadores fluorescentes. Los fluorocromos (fluoróforos) preferidos incluyen 5(6)-carboxilfluoresceína, ácido 6-((7-amino-4-metilcumarina-3- acetil)amino)hexanoico, 5(y 6)-carboxi-X-rodamina, colorante de cianina 2 (Cy2), colorante de cianina 3 (Cy3), colorante de cianina 3.5 (Cy3.5), colorante de cianina 5 (Cy5), colorante de cianina 5.5 (Cy5.5), colorante de cianina 7 (Cy7), colorante de cianina 9 (Cy9) (los colorantes de cianina 2, 3, 3.5, 5 y 5.5 están disponibles como ésteres NHS en Amersham, Arlington Heights, Illinois) o los colorantes Alexa que comprenden Alexa 488, Alexa 532, Alexa 556, Alexa 590, etc. (Molecular Probes, Eugene, Oreg.).

Las sondas pueden ser marcadas indirectamente incorporando un nucleótido unido covalentemente a un hapteno u otra molécula. Los haptenos preferidos, sin estar limitados a, incluyen la 5(6)- carboxifluoresceína, 2,4-dinitrofenilo, digoxigenina y biotina y efectuando la detección de la sonda con un anticuerpo marcado, dirigido a dicho hapteno o a otra molécula. En el caso de la biotina, la detección puede ser llevada a cabo con avidina o estreptavidina conjugada con un marcador detectable. Los anticuerpos, la estreptavidina y la avidina pueden ser conjugados con un marcador fluorescente o con un marcador enzimático como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa de rábano picante para hacerlos detectables. La estreptavidina, la avidina y los anticuerpos anti-digoxigenina conjugados están disponibles comercialmente en compañías tales como Vector Laboratories (Burlingame, California) y Boehringer Mannheim (Indianápolis, Indiana). En otra realización, los anticuerpos o la estreptavidina se pueden conjugar con puntos cuánticos que permiten emisiones de fluorescencia mejores y más estables (Wu et al., Nature Biotechnol., 21:41-46, 2003).

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

Se describen las condiciones para llevar a cabo la hibridación *in situ* y lograr resultados precisos y repetibles. Los expertos en la materia reconocerán que los factores comúnmente utilizados para controlar la rigurosidad de la hibridación incluyen la concentración de formamida u otro agente desnaturizante, la concentración de sales o la fuerza iónica variable, la temperatura de hibridación, la concentración de detergente, el pH y la presencia o ausencia de agentes caotrópicos. Estos factores de la rigurosidad pueden ser modulados para así controlar la rigurosidad de la hibridación de los oligonucleótidos sonda para el ARN quimérico. El grado óptimo de rigurosidad para un ensayo puede ser determinado experimentalmente examinando cada factor de rigurosidad hasta que se alcanza el grado deseado de discriminación.

Otras condiciones que deben ser controladas para una hibridación *in situ* óptima son, por ejemplo, el uso de reactivos químicos para bloquear la unión inespecífica de la sonda a los componentes presentes en las muestras biológicas, además de los ARN quiméricos diana. Los agentes bloqueadores pueden incluir, pero sin limitarse a, ARN, ADN y oligonucleótidos sin marcaje. El agente bloqueador incorporado en la solución de hibridación suprimirá la unión inespecífica de la sonda marcada y, por lo tanto, aumentará la razón señal ruido del ensayo. En otro aspecto de la divulgación, la sonda tiene una secuencia complementaria a la secuencia de ARN quimérico mitocondrial sentido o antisentido (ver SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6).

La fijación de la muestra biológica es también un aspecto importante de la hibridación *in situ* que debe ser determinado experimentalmente. Los fijadores que producen gran cantidad de entrecruzamientos, como el glutaraldehído, no se recomiendan porque pueden bloquear el acceso de la sonda al ARN quimérico mitocondrial sentido o al ARN quimérico mitocondrial antisentido. El método preferido de esta divulgación es la fijación de la muestra biológica con formalina, aunque también se prefieren las muestras congeladas. Para exponer los ARN quiméricos mitocondriales sentido o el ARN quimérico mitocondrial antisentido a la sonda marcada, pueden usarse procedimientos adicionales. Por ejemplo, la muestra biológica puede ser digerida con proteinasa K para eliminar las proteínas que pueden bloquear el acceso de la sonda a los ARN quiméricos diana. El tratamiento de las muestras

biológicas con proteinasa K u otras proteasas antes de la hibridación *in situ* es bien conocido por los expertos en la materia.

Como se describió previamente, la presencia de secuencias repetidas invertidas largas en el ARN quimérico y en los ARN quiméricos antisentido, induce la formación de estructuras de dos hebras altamente estables. Estas estructuras junto con las estructuras secundarias de la región de hebra única de los ARN quiméricos pueden constituir barreras al acceso de la sonda a los ARN quiméricos. Por tanto, en otro aspecto de la divulgación, la muestra biológica es tratada con HCl 0,2 M durante 10 min a temperatura ambiente para desnaturalizar el ARN quimérico. Después, la muestra es rápidamente neutralizada mediante varios lavados con una solución tampón a pH 7,4 antes de aplicar el protocolo de hibridación *in situ* descrito en la presente memoria. Sin más ayuda que la experimentación de rutina y la divulgación proporcionada en la presente memoria, los expertos en la materia pueden fácilmente determinar las condiciones de hibridación adecuadas para efectuar ensayos que utilicen los métodos y composiciones descritas en la presente memoria. Las condiciones de hibridación *in situ* adecuadas son las condiciones adecuadas para efectuar un procedimiento de hibridación *in situ*. Por tanto las condiciones de hibridación *in situ* adecuadas serán evidentes usando la divulgación y referencias de la presente memoria, con o sin experimentación adicional de rutina.

La localización de los ARN quiméricos mitocondriales sentido, tal como se determina mediante hibridación *in situ* puede tener información importante para el pronóstico y manejo del paciente con cáncer. En las células tumorales, el ARN quimérico mitocondrial sentido se encuentra principalmente en el citoplasma en estrecha asociación con endosomas tardíos y lisosomas. Sin embargo, en ciertas células está localizado en el nucléolo. En células tumorales presentes en biopsias humanas la señal de hibridación revela que el ARN quimérico mitocondrial sentido está solo en el citoplasma o en citoplasma y el nucléolo o en el citoplasma y el núcleo. Por lo tanto las diferentes localizaciones pueden tener un valor pronóstico importante. En una realización preferida, un panel de biopsias humanas, por ejemplo, de tumores de mama, colorrectales o de la próstata pueden ser estudiados por hibridación *in situ* para detectar el ARN quimérico. Junto con la señal positiva de hibridación (independiente del marcaje de la sonda), la localización intracelular (solo citoplasma, citoplasma y núcleo o citoplasma y nucléolo) debe ser establecida en cada tumor y los resultados compararse con la supervivencia de cada paciente.

Una mezcla de células individuales que contenga células normales y/o células tumorales puede ser sometida a hibridación en suspensión con sondas oligonucleotídicas marcadas con fluorocromos y complementarias del ARN quimérico mitocondrial sentido o del ARN quimérico mitocondrial antisentido. Por ejemplo, la sonda o sondas dirigidas al ARN quimérico mitocondrial sentido pueden ser marcadas con rodamina y la sonda o sondas dirigidas al ARN quimérico mitocondrial antisentido pueden ser marcadas con Alexa 488. Después de la hibridación y lavado en las condiciones anteriormente descritas, las células pueden ser analizadas por citometría de flujo con marcaje intracelular.

Se prefiere usar la hibridación *in situ* puesto que la información obtenida acerca de la localización específica del ARN quimérico en la célula tumoral aporta información importante adicional al pronóstico.

Se pueden usar métodos moleculares alternativos para detectar la expresión del ARN quimérico y la expresión diferencial del ARN quimérico sentido y antisentido en células normales, precancerosas y cancerosas. Estos métodos alternativos incluyen, pero no se limitan a, transferencia Northern, transferencia puntiforme, matrices de oligonucleótidos para ARN quimérico y ARN quiméricos sentido y antisentido, amplificación del ARN por RT-PCR, amplificación del ARN mediada por transcripción *in vitro* o TEA, S 1 o ensayos de protección de ribonucleasa, etc.

En una realización de la presente divulgación, el ARN quimérico mitocondrial sentido puede ser detectado con fines diagnósticos con una sonda obtenida por amplificación de una región que contiene parte del extremo 5' del ARN ribosomal 16S y una región parcial o total de la secuencia invertida. Como se muestra en la Fig. 1, el cebador inverso puede ser por ejemplo el cebador 1 (SEQ ID NO 139) y los cebadores directos pueden ser los cebadores 3, 4, 5, 6 o 7 (SEQ ID NOS 129, 116, 106, 102, 63). También se pueden usar cebadores localizados en otras posiciones y que pueden ser fácilmente diseñados por expertos en la materia. En otro aspecto de esta divulgación, el ADNc también se puede sintetizar con una enzima con actividad de transcripción inversa y cebadores al azar tales como hexámeros o más largos, tal como es familiar para el experto en la materia.

Los amplicones de 210, 350, 500 u 800 pb obtenidos, o de otros tamaños resultantes de la utilización de cebadores localizados en otras posiciones pueden ser detectados por electroforesis en gel de agarosa o gel de poliacrilamida (Sambrook et al., 1989) y teñidos con bromuro de etidio u otro colorante intercalante. Los amplicones pueden ser purificados de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La detección del ARN quimérico mitocondrial puede ser realizada por análisis de transferencia Northern (Sambrook et al., 1989). Después de separar los ARN en un gel de agarosa, los fragmentos son transferidos a una membrana (de nitrocelulosa o de Nylon) por procedimientos conocidos por los expertos en la materia (Sambrook et al., 1989). Para analizar las membranas, se puede amplificar un fragmento de 250 pb correspondiente a las posiciones 1000 a 125 del ARN quimérico mitocondrial sentido. El amplicón es purificado (Wizard, Promega) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se utilizan 10 ng como molde para una segunda amplificación. Esta amplificación se efectúa con la mezcla patrón de PCR (Invitrogen) mas 5 micro Curie de ³²P dCTP (Amersham). El fragmento de

amplificación radiactivo es desnaturalizado por incubación a 95 °C durante 10 minutos y la sonda desnaturalizada se añadió a la mezcla de hibridación. Las membranas son hibridadas durante 16 horas a 65 °C y después lavadas dos veces con tampón SSC, dos veces con SSC 0,5 a 60° y SSC 0,2 a 45 °C (Sambrook *et al.*, 1989). La membrana lavada se expuso a una película para rayos-X durante la noche a -70 °C (Sambrook *et al.*, 1989). La señal de hibridación en la membrana corresponde al componente mayor de aproximadamente 2.400 nucleótidos que es el tamaño correspondiente al ARN ribosomal 16S (1.559 nucleótidos) más la secuencia invertida de 815 nucleótidos.

En otra realización de la divulgación, parte del ARN quimérico mitocondrial sentido puede ser detectado después de digestión por ribonucleasa del ARN total extraído de células o tejidos. La estructura de dos hebras o el tallo del ARN quimérico mitocondrial sentido es resistente a la digestión con ribonucleasa A. El ARN total de células o tejidos extraído por TriZol(Invitrogen) se disuelve en un pequeño volumen de 2 veces SSC. La solución se incuba con ribonucleasa A (Sigma) a una concentración final de 50 microgramos por ml. Después de 30 min a 25 °C, el ARN resistente a la nucleasa es extraído con TriZol y precipitado con isopropanol a -20° C por la noche. El ARN resistente a la nucleasa se disuelve en agua destilada tratada con DEPC y usado como molde para la amplificación por RT-PCR. Esta amplificación, realizada con cebadores dirigidos a las posiciones 55 y 790 del ARN ribosomal 16S produce un fragmento de aproximadamente 730 pares de bases con una secuencia que exhibe un 100 % de identidad con la secuencia del tallo del ARN quimérico mitocondrial sentido (SEQ ID NO 1). Por el contrario, la hebra sencilla del ARN quimérico correspondiente a la mitad 3', o el ARN ribosomal mitocondrial 12S o el ARN ribosomal 18S o el ARNm para GAPDH son totalmente digeridos por el tratamiento con ribonucleasa A por lo que no se obtienen productos de amplificación cuando se usan cebadores dirigidos a estos ARN.

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

Cada conjunto de dos o más sondas de oligonucleótidos son preferentemente marcadas con restos detectables independientemente de modo que en una célula individual de la muestra biológica se pueda detectar los ARN quiméricos mitocondriales sentido y los ARN quiméricos mitocondriales antisentido. En una realización preferida, las sondas de oligonucleótidos que se usan para detectar los ARN quiméricos mitocondriales sentido o los ARN quiméricos mitocondriales antisentido están marcados cada uno con un hapteno diferente. El hapteno puede ser biotina, digoxenina o fluorosceína, que pueden ser reconocidos por el método de hibridación *in situ* con anticuerpos o con estreptavidina marcada con diversas enzimas (p. ej. fosfatasa alcalina o peroxidasa). En otra alternativa, cada sonda de oligonucleótido de cada conjunto de sondas puede ser marcada con colorantes fluorescentes detectables independientemente. Por ejemplo el conjunto de sondas de oligonucleótidos para detectar ARN quimérico mitocondrial sentido puede ser marcado con rodamina mientras que el conjunto de sondas de oligonucleótidos para detectar los ARN quiméricos mitocondriales antisentido pueden ser marcadas con Alexa 488. Además, las composiciones pueden usarse para determinar la localización del ARN quimérico o de los ARN quiméricos antisentido en células de la muestra biológica. Además, las composiciones de la divulgación pueden usarse para determinar la colocalización de los ARN quiméricos o de los ARN quiméricos antisentido con marcadores específicos de los diferentes orgánulos celulares usando el análisis por microscopía confocal.

Las composiciones proporcionadas en la presente memoria se consideran particularmente útiles para la detección y diagnóstico del pre-cáncer y cáncer. El término cáncer como se utiliza en la presente memoria incluye células afectadas por una cualquiera de las siguientes afecciones anómalas identificadas. Estas incluyen leucemia mieloide aguda o crónica, leucemia linfoblástica aguda o crónica, mieloma múltiple, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin o linfoma maligno; carcinoma gástrico, carcinoma esofágico o adenocarcinoma, adenocarcinoma del conducto pancreático, insulinoma, glucagonoma, gastrinoma, adenocarcinoma del intestino delgado, carcinomas colorrectales; carcinoma hepatocelular; adenoma hepatocelular; carcinoides del tracto urogenital como adenocarcinoma renal, tumor de Wilm, carcinoma de vejiga y uretra y adenocarcinoma prostático, cánceres testiculares como seminoma, teratoma, teratocarcinoma, carcinoma de células intersticiales, carcinoma endometrial, carcinoma cervical, carcinoma ovárico, carcinoma de vulva y vagina, tumores de células de Sertoli y Leydig, melanoma y carcinoma de trompas de Falopio; carcinomas de pulmón, alveolar y bronquiolar; tumores cerebrales; melanoma maligno de la piel, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y sarcoma de Kaposi. Además fibrosarcoma, angiosarcoma y rabdomiosarcoma cardíacos, y otras enfermedades tumorales familiares para los expertos en la materia.

Terapia del cáncer y precáncer

Los fármacos quimioterapéuticos pueden inducir una serie de respuestas celulares que impactan en la proliferación y supervivencia de las células tumorales. La más estudiada de estas respuestas celulares es la apoptosis y es evidente actualmente que los fármacos antineoplásicos pueden destruir a las células tumorales activando rutas apoptóticas comunes. Desgraciadamente, estos fármacos también afectan a las células normales en división rápida tales como las de la médula ósea, células hematopoyéticas normales y células intestinales y queratinocitos de la matriz del cabello (McKinnell *et al.*, The biological Basis of cancer, 1998; Komarov *et al.*, Science, 285:1733-1737,

1999; Johnstone et al., Cell, 108:153-164, 2002).

Por otra parte, muchas células tumorales tienen mutados los factores de iniciación de la apoptosis, los factores de regulación y ejecución de la apoptosis lo que explica por qué células tumorales de diferentes tipos de cáncer se hacen resistentes a una variedad de fármacos quimioterapéuticos y a las radiaciones. Se han descrito mutaciones de factores de la vía intrínseca, de acontecimientos postmitocondriales y de la vía extrínseca de la apoptosis (Ramping et al., Science, 275:967-969, 1997; Vogelstein et al., Nature, 408: 307-310, 2000; Teitz et al., Nature Med., 6:529-535, 2000; Reed, J. Clin. Oncol., 17:2941- 2953, 1999; Johnston et al., Cell, 108:153-164, 2002). Por lo tanto, un paradigma para la terapia del cáncer es un procedimiento que puede desencadenar selectivamente la apoptosis de las células tumorales, sin alterar las células normales en proliferación, evitando los factores alterados o mutados de las diferentes vías apoptóticas.

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

Las estructuras de dichos transcritos se muestran en la Fig. 1 y Fig. 3 y las secuencias correspondientes en la SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6.

Por el contrario y constituyendo otro descubrimiento sorprendente, las células pretumorales y tumorales sobreexpresan el ARN quimérico mitocondrial sentido y regulan a la baja la expresión del ARN quimérico mitocondrial antisentido. La supresión o inhibición de la síntesis del ARN quimérico mitocondrial antisentido en las células pretumorales y tumorales constituye una nueva diferencia de fenotipo entre una célula cancerosa y una célula normal en proliferación, lo que se considera como una de las principales realizaciones de la presente invención. Además las células tumorales de biopsias humanas de diferentes tipos cancerosos exhiben también el mismo fenotipo que las células cancerosas en cultivo (Fig. 5A y 5B).

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

El hallazgo anterior, que es una parte fundamental de la presente invención, muestra que aunque las células normales en proliferación expresan los ARN quiméricos mitocondriales sentido y antisentido, las células tumorales expresan el ARN quimérico mitocondrial sentido y regulan a la baja la expresión del ARN quimérico mitocondrial antisentido. Para entender la función de estos ARN en la proliferación celular, se trataron células cancerosas en cultivo con oligonucleótidos antisentido dirigidos a los ARN quiméricos mitocondriales sentido (SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3) o al ARN quimérico mitocondrial antisentido (SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6). Los resultados, que constituyen otro descubrimiento sorprendente, muestran que en estas condiciones las células entran en el proceso de muerte celular programada o apoptosis. Después del tratamiento con los oligonucleótidos complementarios a los ARN quiméricos mitocondriales sentido o antisentido durante 6 a 15 horas, entre el 75 y el 96 % de las células sufren apoptosis (Tabla 2). Los cambios observados en las células tratadas fueron la condensación de la cromatina, la fragmentación nuclear, la fragmentación del ADN, la activación de caspasas y la alteración de los procesos de la membrana celular. Los oligonucleótidos control con 4 o más nucleótidos con apareamiento incorrecto o con orden alterado no indujeron apoptosis. Además, las células no se vieron afectadas por el tratamiento con oligonucleótidos dirigidos al ARN mitocondrial 12S sentido o antisentido o al ARNm o al transcrito antisentido de la subunidad ND 1 mitocondrial. En general, los oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido fueron mucho más efectivos a la misma concentración que los oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial sentido. Este fue un resultado esperado puesto que las células tumorales sobreexpresan el ARN quimérico mitocondrial sentido y por lo tanto es difícil alcanzar una concentración de oligonucleótidos dentro de la célula que interfiera con todas las copias de este transcrito. Por otra parte, como las células tumorales regulan a la baja el ARN quimérico mitocondrial antisentido, debería ser más fácil interferir con este ARN ya que existe un menor número de copias por célula.

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

oligonucleótidos complementarios.

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

Más abajo se describen composiciones para tratar el cáncer usando los ARN quiméricos sentido y los ARN quiméricos antisentido como agentes terapéuticos.

Las realizaciones preferidas son, aunque sin limitarse a estas, son composiciones para el tratamiento del cáncer usando oligonucleótidos complementarios a los ARN quiméricos antisentido. El resultado de este tratamiento es por lo menos producir en un sujeto tratado un beneficio en su salud, lo que en el caso del cáncer incluye pero no se limita a la remisión del cáncer, la alivio de los síntomas del cáncer y el control de la diseminación metastásica del cáncer. Todos dichos métodos implican la inducción de la apoptosis en células tumorales con efectos menores en células normales. Se han usado oligonucleótidos complementarios dirigidos a ARN específicos para disminuir o suprimir la expresión de una gran diversidad de ARNm o la síntesis de las proteínas correspondientes (p. ej. Vickers et al., J. Biol. Chem., 278:7108-7118, 2003). Actualmente se están estudiando aproximadamente 42 oligonucleótidos antisentido de diferente composición como fármacos potenciales (Stephens and Rivers, Burr. Opin. Mol. Therapeut., 5:118-122, 2003) (ver también como ejemplos las patentes US-5.801.154; US-6.576.759; US-6.720.413; US-6.573.050 y US-6.673.917).

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

Los oligonucleótidos de la invención pueden ser complementarios al ARN quimérico mitocondrial antisentido o al ARN quimérico mitocondrial sentido. Los oligonucleótidos complementarios se unirán los ARN quiméricos mitocondriales antisentido o a los ARN quiméricos mitocondriales sentido interfiriendo con sus funciones. La complementariedad absoluta, aunque preferida, no es requerida. Una secuencia de oligonucleótido "complementaria" a una porción de un ARN, como se refiere en la presente memoria, significa que tiene suficiente complementariedad como para hibridar con el ARN. La capacidad de hibridar dependerá tanto del grado de complementariedad como de la longitud del oligonucleótido. Generalmente, cuanto más largo sea el ácido nucleico hibridante, mayor número de apareamientos incorrectos puede contener un ARN y formar un dúplex estable. Los expertos en la técnica pueden determinar un grado aceptable de apareamientos incorrectos usando procedimientos estándar para determinar el punto de fusión del complejo hibridado.

En general, los oligonucleótidos complementarios para hibridar con los ARNm para diferentes proteínas están, en general, dirigidos a la región 5' no traducida del ARNm incluyendo el complemento del codón de iniciación AUG o la región 3' no traducida para ser más efectivos. Los oligonucleótidos complementarios a las regiones codificantes del ARNm son menos efectivos como inhibidores de la traducción (ver referencias previas). El ARN quimérico mitocondrial sentido y el ARN quimérico mitocondrial antisentido son regiones de ARN no codificantes y, por lo tanto, la región diana de los oligonucleótidos puede ser complementaria con cualquier región de estos transcritos. Las regiones más efectivas se ubican alrededor de los segmentos de una hebra del ARN quimérico mitocondrial antisentido determinadas explorando las secuencias del ARN quimérico sentido o antisentido con oligonucleótidos complementarios diseñados cada 30 nucleótidos. Los expertos en la materia entenderán que otras secuencias comprendidas dentro de las secuencias completas de los transcritos de SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6 son dianas para el diseño de oligonucleótidos complementarios alternativos.

Los oligonucleótidos complementarios dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido o al ARN quimérico mitocondrial sentido que inducen la muerte de células tumorales de acuerdo a la presente invención, generalmente contendrán una columna vertebral diferente a los fosfodiésteres naturales. Los oligonucleótidos pueden tener alternativamente uniones internucleósidos que comprenden, pero sin limitarse a fosforotioato (Mag et al., Nucleic Acids Res., 19:1437-1441, 1991 y patente US-5.644.048), ácido nucleico peptídico (PNA) (Egholm, Mature, 365:566-568, 1993 patente US-6.656.687), fosforamida (Beaucage, Methods Mol. Biol., 20:33-61, 1993), fosforoditioato (Capaldi et al., Nucleic Acids Res., 28:E40, 2000). Otros análogos de oligonucleótidos incluyen, pero no se limitan a, morfolino (Summerton, Biochim. Biophys. Acta, 1489:141-158, 1999), oligonucleótidos bloqueados (Wahlestedt et al., Proc. Natl. Acad. Sci., US, 97:5633-5638, 2000), ácidos nucleicos peptídicos o PNA, (Nielsen et al., 1993; Hyrup and Nielsen, 1996) o nucleótidos modificados en los extremos 5' y 3' por 2-o-(2-metoxi)etilo (McKay y colab., 1999).

Los ácidos nucleicos pueden contener cualquier combinación de desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos y cualquier combinación de bases incluyendo uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina, hipoxantina, isocitosina, isoguanina, etc. Los oligonucleótidos complementarios de acuerdo con la invención pueden comprender al menos un resto de base modificada, que se selecciona del grupo que incluye, pero no se limita a, 5-fluorouracil, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroxi)metiluracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N6-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, N6-adenina, 7-metilguanina, 5-metilaminometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxycarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N6-isopenteniladenina, ácido uracil-5 oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouracilo, queosina, 2-tiocitosina, 5 metil-2-tiouracilo, 2-tiouracilo, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico del ácido uracil-5-oxiacético, ácido uracil-5-oxiacético (v), 5-metil-2-tiouracilo, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil) uracilo, (acp3)w y 2,6-diaminopurina.

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

En otra realización de la presente invención, los oligonucleótidos complementarios son diseñados para hibridar con cualquier región del ARN quimérico mitocondrial antisentido o con cualquier región del ARN quimérico mitocondrial sentido. Los oligonucleótidos complementarios deben ser al menos de diez nucleótidos de longitud y son preferiblemente oligonucleótidos complementarios de entre 10 a aproximadamente 50 nucleótidos de longitud. En aspectos específicos el oligonucleótido complementario tiene al menos 12 nucleótidos, al menos 18 nucleótidos, al menos 22 nucleótidos, al menos 50 nucleótidos de longitud.

Es importante considerar que tanto para experimentos *in vitro* como para experimentos *in vivo* deben utilizarse controles que distingan entre la interferencia antisentido con la función del ARN quimérico mitocondrial antisentido o la del ARN quimérico mitocondrial sentido con los efectos biológicos inespecíficos de los oligonucleótidos complementarios. Por lo tanto el diseño de los oligonucleótidos debe evitar la presencia en la secuencia de series CpG, series 5' GGGG y otras secuencias que tienen efectos tóxicos en células animales como se describe en la patente US-6.673.917. También se evitó la presencia de la secuencia 5' CGTTA debido al efecto no antisentido descrito (Tidd et al., Nucleic Acids Res., 28:2242-2250, 2000).

En otra realización de la presente invención, los oligonucleótidos complementarios dirigidos a los ARN quiméricos mitocondriales antisentido o dirigidos a los ARN quiméricos mitocondriales sentido pueden usarse como agentes terapéuticos en animales o en pacientes que tienen cáncer y que pueden inducir sensibilidad a fármacos terapéuticos antineoplásicos o radiaciones. La sensibilidad inducida, conocida también como sensibilización o hipersensibilidad, puede ser medida en células tumorales que muestran tolerancia a los tratamientos antineoplásicos o a la radiación. Los fármacos antineoplásicos comprenden aquellos conocidos en la técnica y usados actualmente y los fármacos aún no descubiertos. Entre los fármacos quimioterapéuticos convencionales están los agentes alquilantes, antimetabolitos, antibióticos y agentes antimicrotúbulos. Algunos ejemplos de estos fármacos son el cisplatino, metotrexato, doxorubicina, dactinomicina, mitomicina, ciclofosfamida, etc.

Junto con o después del tratamiento de un animal o paciente que tiene cáncer con oligonucleótidos complementarios dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido y/o al ARN quimérico mitocondrial sentido, el paciente pueden ser tratados con radioterapia, en la que dicha radioterapia incluye radiación ultravioleta, radiación gama, partículas alfa, partículas beta, haces de rayos X y de electrones.

En otro aspecto de esta divulgación, la interferencia con el ARN quimérico mitocondrial antisentido o con el ARN quimérico mitocondrial sentido para inducir la muerte de las células puede ser lograda mediante la interferencia en el ARN o el silenciamiento del ARN. En los últimos seis años la interferencia en el ARN (ARNi) ha surgido como una nueva aproximación al silenciamiento de genes en células de mamíferos (Elbashir et al., Nature, 411:494-498, 2001; McManus et al., Nature Rev. Genet., 3:737-747, 2002). Las moléculas de doble hebra de ARN sintetizadas de forma sintética de aproximadamente 19 a 21 nucleótidos de longitud se hibridan específicamente con su ARNm diana complementario, produciendo la degradación del ARNm y la subsiguiente degradación de las proteínas. Varios genes diferentes han sido exitosamente silenciados con ARN pequeño de interferencia o ARNsi (Lu et al., Curr. Opin. Mol. Ther., 5:225-234, 2003.; Wacheck et al., Oligonucleotides, 13:393-400, 2003). Por tanto, el ARN sintético de doble hebra de aproximadamente 19 a 21 nucleótidos dirigido al ARN quimérico mitocondrial antisentido o al ARN quimérico mitocondrial sentido puede ser usado para degradar estos transcritos e inducir la muerte de las células tumorales. Las personas familiarizadas en la materia comprenderán que la secuencia del ARNsi debe ser complementaria con cualquier región de los ARN quiméricos mitocondriales antisentido o de los ARN quiméricos mitocondriales sentido (SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3, SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5 y SEQ ID NO 6).

En otra realización de la divulgación, se pueden usar ribozimas para interferir con el ARN quimérico mitocondrial antisentido o con el ARN quimérico mitocondrial sentido para inducir la muerte de células tumorales. La secuencia de la ribozima debe ser diseñada de acuerdo con la secuencia de ARN quimérico mitocondrial antisentido (SEQ ID NO 4, SEQ ID NO 5, SEQ ID NO 6) o la del ARN quimérico mitocondrial sentido (SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3) para escindir regiones específicas del transcrito que son más eficientes para iniciar la muerte de las células

tumorales. Las ribozimas son moléculas enzimáticas de ARN capaces de catalizar la escisión específica del ARN (Rossi, Curr. Biology, 4:469-471, 1994). El mecanismo de acción de la ribozima implica la hibridación específica de la secuencia de la molécula de ribozima con el ARN diana complementario, seguida por una escisión endonucleotídica. La composición de las moléculas de ribozima debe incluir una o más secuencias complementarias del ARNm del gen diana y debe incluir la bien conocida secuencia catalítica responsable de la escisión del ARNm descrita en la patente US-5.093.246. Como tal, dentro del ámbito de la invención, las moléculas de ribozima de cabeza de martillo están diseñadas para catalizar específica y eficientemente la escisión endonucleotídica de los ARN quiméricos mitocondriales antisentido o de los ARN quiméricos mitocondriales sentido. La construcción y producción de ribozimas de cabeza de martillo es bien conocida en la técnica y ha sido descrita (Haseloff et al., Gene, 82:43-52, 1989). Las ribozimas de la invención presente también incluyen endorribonucleasas de ARN (Zang et al., Science, 224:574-578, 1984).

La terapia génica se refiere al tratamiento o prevención del cáncer mediante la administración de un ácido nucleico a un paciente que tiene cáncer o en el cual es deseable la prevención o inhibición del cáncer. En esta realización de la presente divulgación, el ácido nucleico terapéutico producido en forma intracelular es un ARN complementario dirigido al ARN quimérico mitocondrial antisentido o al ARN quimérico mitocondrial sentido que intermedia en el efecto terapéutico interfiriendo o inhibiendo la función de estos transcritos mitocondriales induciendo la muerte de las células tumorales. Por lo tanto, un procedimiento preferido es utilizar una construcción de ADN recombinante artificial en la cual la transcripción del ARN antisentido está bajo el control de promotores fuertes de la ARN polimerasa II o III. La expresión de la secuencia que codifica el ARN complementario puede lograrse por cualquier promotor conocido en la técnica que actúa sobre células de mamíferos, preferiblemente humanas. Tales promotores incluyen, aunque no se limitan a, la región promotora temprana del virus SV40 (Benoist and Chambon, Mature, 290:304-310, 1981), el promotor de la timidina quinasa del virus herpes (Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 78:1441- 1445, 1981), las secuencias reguladoras del gen de la metalotionina (Brinster et al., Mature, 296:39-42, 1982) el promotor del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto y colab., 1980), etc. La construcción de ADN recombinante para producir el ARN complementario puede ser un vector viral que incluye, aunque no se limita al vector de adenovirus, vector de virus adeno-asociado, vector de virus del herpes simple, vector del virus Vaccinia y vectores de retrovirus. El vector es introducido en las células tumorales diana, en una composición farmacéutica, usando métodos familiares para los expertos en la materia.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación comprenden una cantidad efectiva de un ácido nucleico complementario (oligonucleótidos complementarios, ARNs, ribozimas o vectores virales) en un vehículo farmacéuticamente aceptable, que puede ser administrado a un paciente que tiene cáncer para interferir con la función del ARN quimérico mitocondrial antisentido o del ARN quimérico mitocondrial sentido e inducir la apoptosis de las células tumorales. Los ácidos nucleicos complementarios pueden ser formulados en una composición farmacéutica, que puede incluir vehículos, diluyentes, tampones, conservantes, agentes tensioactivos, polietilenimida (PEI), liposomas u otra formulación lipídica conocida en la técnica. La composición farmacéutica puede ser administrada por administración tópica, oral, parenteral o rectal. La administración parenteral incluye inyección intravenosa, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular o administración pulmonar por inhalación o insuflación.

Las composiciones de la presente divulgación pueden ser utilizadas para el tratamiento terapéutico, diagnóstico, profilaxis y como reactivos y kits para investigación.

Las composiciones proporcionadas en la presente memoria son consideradas particularmente útiles para el tratamiento del cáncer. El término cáncer como se usa en la presente memoria, incluye células afectadas por cualquiera de las siguientes afecciones anómalas identificadas. Estas incluyen leucemia mieloide aguda o crónica, leucemia linfoblástica aguda o crónica, mieloma múltiple, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin o linfoma maligno; carcinoma gástrico, carcinoma esofágico o adenocarcinoma, adenocarcinoma del conducto pancreático, insulinooma, glucagonoma, gastrinoma, adenocarcinoma del intestino delgado, carcinomas colorrectales; carcinoma hepatocelular; adenoma hepatocelular; carcinoides del tracto urogenital tales como adenocarcinoma renal, tumor de Wilm, carcinoma de vejiga y uretra y adenocarcinoma prostático, cánceres testiculares como seminoma, teratoma, teratocarcinoma, carcinoma de células intersticiales, carcinoma endometrial, carcinoma cervical, carcinoma ovárico, carcinoma de vulva y vagina, tumores de células de Sertoli y Leydig, melanoma y carcinoma de trompas de Falopio; carcinomas de pulmón, alveolar y bronquiolar; tumores encefálicos; melanoma maligno de la piel, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y sarcoma de Kaposi. Además fibrosarcoma, angiosarcoma y rabdomiosarcoma cardíacos y otras enfermedades tumorales familiares para los expertos en la materia. Por lo tanto, la expresión "célula cancerosa" como se usa en la presente memoria, incluye una célula afectada por una cualquiera de las afecciones anteriormente identificadas.

Los siguientes ejemplos sirven para describir la manera de usar la invención descrita anteriormente, así como para establecer la mejor manera de llevar a cabo varios aspectos de la invención. Se entiende que de ninguna manera estos ejemplos están destinados a limitar el ámbito de la invención sino que solo se presentan para efectos ilustrativos.

EJEMPLO 1**Aislamiento y secuenciación del ARN quimérico mitocondrial humano sentido, (Fig. 1A, SEQ ID NO 1)**

Los experimentos iniciales indicaron que el supuesto ARN quimérico mitocondrial humano sentido contenía una estructura secundaria más compleja y estable que el ARN quimérico de ratón (Villegas et al., DNA & Cell Biol., 19:579-588, 2000; Villegas et al., Nucleic Acids Res., 30:1895-1901, 2002). Por lo tanto y basándose en la estructura secundaria del ARN quimérico mitocondrial de ratón, se dedujo una estructura secundaria teórica del ARN quimérico mitocondrial humano (Figura 1A). El transcrito teórico humano contenía la secuencia completa del ARN 16S sentido unida en el extremo 5' a un fragmento del ARN mitocondrial 16S antisentido formando un lazo de longitud desconocida (Fig. 1A). El segmento del ARN mitocondrial 16S antisentido era completamente complementario al ARN mitocondrial 16S sentido y por lo tanto corresponde a una secuencia repetida invertida unida al extremo 5' del transcrito 16S sentido. Basándose en esta estructura se diseñaron cebadores para amplificar este supuesto transcrito por RT-PCR. Un cebador inverso estaba situado en las posiciones 11 a 31 desde extremo 5' del ARN mitocondrial 16S sentido humano o al comienzo del lazo teórico (Cebador 1, Fig. 1A) (SEQ ID NO 139). La secuencia del cebador directo usado corresponde a las posiciones 213-234 del ARN mitocondrial 16S sentido y corresponde al cebador 3 de la Fig. 1A. La amplificación del ARN por RT-PCR de varios tejidos humanos y células incluyendo células HeLa, HL-60, Du145, MCF7 y linfocitos humanos estimulados con PHA (Ver ejemplo 7) usando los cebadores 1 y 3 (Fig. 1A) produjo un amplicón único de aproximadamente 210 pb (Figura 2). La RT-PCR se efectuó como se ha descrito anteriormente (Villegas et al., DNA & Cell Biol., 19:579-588, 2000; Villegas et al., Nucleic Acids Res., 30:1895-1901, 2002). Los amplicones de cada tejido o célula humana se clonaron y ambas hebras se secuenciaron. Se obtuvo en todos los casos una secuencia idéntica de 216 pb, que contenía una secuencia repetida invertida de 184 nucleótidos unida a los primeros 31 nucleótidos del extremo 5' terminal del ARN mitocondrial 16S sentido. A continuación, se determinó si la secuencia repetida invertida tenía una longitud superior a 184 nucleótidos y se extendía más hacia el extremo 5' del ARN mitocondrial 16S antisentido (Fig. 1A). El ADNc de las células HeLa o de otras células descritas más arriba se amplificó entre el cebador inverso 1, situado en el lazo descrito anteriormente, y los cebadores 4 a 7, para avanzar en dirección del extremo 5' de la supuesta secuencia repetida invertida (Fig. 1A). Usando este enfoque, se obtuvieron fragmentos de amplificación de aproximadamente 500, 700 y 800 pb al combinar el cebador 1 con los cebadores 4, 5 y 6, respectivamente. Por otra parte, cuando el ADNc se amplificaba entre el cebador 1 y el cebador 7 no se obtenía ningún producto de amplificación, lo que sugiere que el extremo 5' de la secuencia repetida inversa estaba entre los cebadores 7 y 8 (ver más adelante). La secuencia completa del amplicón de 800 pb revela una secuencia repetida invertida de 769 nucleótidos unida a los primeros 31 nucleótidos del ARN mitocondrial 16S sentido (SEQ ID NO 1) (Fig. 1A). La secuencia del extremo terminal 3' de la secuencia repetida invertida unida al ARN mitocondrial 16S sentido era idéntica a la encontrada en la misma región del amplicón de 216 pb. Esto es importante porque indica que en ambos casos estábamos amplificando el mismo ARN. Además, la secuencia mostraba que faltaban 50 nucleótidos del extremo 3' del ARN mitocondrial 16S antisentido en la secuencia repetida invertida del ARN quimérico mitocondrial sentido. En conjunto, estos resultados sugieren que la estructura de dos hebras formada entre la secuencia repetida invertida y el ARN mitocondrial 16S sentido comienza en la posición 51 de este último y forma un posible lazo de nucleótidos.

Para confirmar el tamaño del lazo, el ADNc humano se amplificó por PCR entre el cebador directo 2 situado en el extremo 3' de la secuencia repetida invertida y el cebador 3 que es también inverso en las posiciones 213-234 del ARN mitocondrial 16S sentido (Fig. 1A). Se obtuvo un amplicón de aproximadamente 240 pb y la secuencia mostró que los primeros 234 nucleótidos del ARN mitocondrial 16S sentido estaban unidos a los últimos 25 nucleótidos del extremo 3' de la secuencia repetida invertida. La secuencia de los 25 nucleótidos de la secuencia repetida invertida era totalmente complementaria al ARN mitocondrial 16S sentido desde las posiciones 51 hasta 75 (Fig. 1A).

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

Ya que el ARN de dos hebras no es digerido por ARNasa A, el tallo del ARN quimérico mitocondrial humano sentido debería ser resistente a esta enzima. Por otra parte, el lazo de la región 3' del ARN quimérico mitocondrial 16S sentido que se extiende más allá de la estructura de dos hebras debería ser digerido por la enzima. El ARN de HeLa y de otras células fue digerido con ARNasa A (50 µg por ml), seguido por extracción con fenol y el material resistente a la nucleasa se recuperó por precipitación en etanol. El ADNc del ARN digerido fue amplificado a continuación por PCR usando los cebadores mostrados en la Fig. 1A. El amplicón de aproximadamente 800 pb obtenido con los cebadores 1 y 6 no fue amplificado después de la digestión con ARNasa A, lo que indica que el lazo fue digerido por la enzima. Lo mismo sucedió con el amplicón de 360 pb obtenido con los cebadores 10 y 11 como se indica en la Figura 1A. En conjunto, estos resultados indicaron que tanto el lazo como la región 3' del ARN quimérico mitocondrial sentido que se extiende más allá del tallo fueron digeridos por la enzima. Por otra parte la amplificación del amplicón de 750 pb, correspondiente a la estructura de doble hebra del ARN quimérico mitocondrial sentido y obtenido con los 8 y 6, no se vio afectado por la digestión con ARNasa A. La secuencia del fragmento de doble hebra resistente a la digestión por ribonucleasa era idéntica con la secuencia esperada del tallo. Los mismos resultados se obtuvieron después de digestión del ARN total de las células HL-60 u otras células humanas.

Para determinar el extremo 5' de la secuencia repetida invertida del ARN quimérico mitocondrial sentido, el tallo del transcrito obtenido por digestión con ARNasa A se usó para el análisis por RACE de 5'. La determinación del extremo 5' de la secuencia repetida invertida se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Los resultados indicaron que la secuencia repetida invertida se extiende en 46 nucleótidos adicionales desde el extremo 5' del amplicón obtenido tras la amplificación del ARN quimérico mitocondrial sentido con los cebadores 1 y 6. En resumen, la secuencia repetida invertida de 815 nucleótidos se une al extremo 5' de los primeros 865 nucleótidos del ARN mitocondrial 16S. La secuencia de este transcrito mostró un 99,8 % de identidad con el gen mitocondrial humano 16S (hebras H y L) (SEQ ID NO 1). Los extremos 5' de ambos extremos del tallo de doble hebra fueron confirmados por RACE 5'.

Los resultados anteriores indicaban que el ARN quimérico mitocondrial sentido contenía un tallo o estructura de doble hebra de 815 pares de bases y un lazo de 50 nucleótidos. Sin embargo, estos resultados no prueban que la secuencia repetida invertida esté completamente unida al ARN mitocondrial sentido 16S. El uso de métodos convencionales tales como la síntesis del ADNc completo desde el extremo 3' es infructuoso ya que la estructura de doble hebra del transcrito representa un problema insoluble para las transcriptasas reversas, incluyendo Tth (Myers and Gelfand, Biochemistry, 30:7661- 7666, 1991). Si la secuencia repetida invertida de 815 nucleótidos se une a los 1559 nucleótidos del ARN mitocondrial 16S, se esperaría un transcrito de 2,3 Kb. El análisis por transferencia Northern del ARN total de células HeLa, HL-60 y MCF/7 se llevó a cabo con una sonda marcada con ³²P dirigida a la estructura de dos hebras del ARN quimérico mitocondrial sentido. Los resultados revelaron una banda de aproximadamente 2,4 Kb además de una banda de 1,6 Kb correspondientes al ARN quimérico mitocondrial sentido y al ARN mitocondrial 16S sentido, respectivamente. Si se digiere el ARN con ARNasa A antes de la transferencia Northern, se obtiene una banda única de hibridación de aproximadamente 0,8 Kb que corresponde al tamaño del tallo del ARN quimérico mitocondrial sentido. En conjunto, estos resultados demuestran poderosamente que el ARN quimérico mitocondrial sentido contiene una secuencia repetida invertida de 815 nucleótidos unida al extremo 5' del ARN mitocondrial 16S sentido completo correspondiente a la SEQ ID NO 1.

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

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

EJEMPLO 2

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

Queratinocitos de prepucio humano (HFK) fueron transformados por incubación con un lisado de células previamente infectadas con el virus del papiloma humano 16 (HPV 16). Las células se cultivaron con 3 partes de K-SFM, una parte de medio DMEM (Invitrogen) 5 ng/ml de EGF, 50 µg/ml de extracto de hipófisis y 10 % de suero bovino fetal. Las condiciones del cultivo fueron 37 °C y CO₂ 5 %. Después de 24 horas de infección, las células HFK transformadas se transfirieron a un nuevo matraz y fueron cultivadas en las mismas condiciones. Después, las células (HFK698) fueron sucesivamente transferidas a nuevos matraces de cultivo cada 3 días usando una razón de división de 1:3 a 1:4. Después del pase 19, las células (HFK698 transformadas con HPV 16) fueron cosechadas como se describió (Heusen, Biochim. Biophys. Acta, 1288:F55-F78, 1996), recogidas por centrifugación a 300 x g durante 10 min y lavadas dos veces con tampón fosfato salino (PBS). El ARN total de las células se extrajo con Trizol (Invitrogen). Se usaron aproximadamente 200 nanogramos de ARN para sintetizar el ADNc con hexámeros al azar como se describió en el Ejemplo 1. El ADNc se amplificó por PCR usando el cebador inverso 1 y el cebador directo 3 como se describe en la Fig. 1A. Este protocolo de amplificación produjo el amplicón esperado de 210 pb, en el que los primeros 31 nucleótidos del ARN mitocondrial 16S sentido están unidos a la secuencia repetida invertida de 184 nucleótidos, según se ha descrito previamente en el Ejemplo 1. El análisis electroforético de los productos de amplificación reveló la presencia de un amplicón de 210 pb correspondiente al ARN quimérico mitocondrial sentido además de otro fragmento de amplificación de aproximadamente 150 pares de bases como se muestra en la Fig. 2. La secuencia completa de este nuevo fragmento (SEQ ID NO 2) mostró que los 31 nucleótidos iniciales desde el extremo 5' del ARN mitocondrial 16S sentido están unidos a una secuencia repetida invertida de 121 nucleótidos, que es 63 nucleótidos más corta si se compara con la secuencia repetida invertida del ARN quimérico mitocondrial sentido de la SEQ ID NO 1. Esta secuencia repetida invertida genera un lazo más largo de 96 nucleótidos (Fig. 1B) en la estructura del ARN quimérico mitocondrial. El resto de la secuencia es idéntica a la SEQ ID NO 1. Este nuevo ARN quimérico mitocondrial sentido no está presente en células SiHa (Fig. 4A) que son células tumorigénicas transformadas con HPV 16 ni en células humanas normales en proliferación, tales como linfocitos

humanos estimulados con PHA. Resultados similares se obtuvieron con células HFK transformadas por HPV 18 o en células 18Nco. Las células transformadas o inmortalizadas (pero no tumorigénicas) por HPV 16 o HPV 18 se consideran células precancerosas y por lo tanto el nuevo ARN quimérico mitocondrial sentido es un nuevo marcador potencial de células precancerosas.

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

EJEMPLO 3:

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

Se cultivaron células MT-2 humanas transformadas con HTLV-1 como se ha descrito previamente (Kobayashi et al., EMBO J., 3:1339-1343, 1984). Las células fueron cosechadas, centrifugadas a 300 x g durante 10 min y lavadas dos veces con PBS. El sedimento final fue extraído con Trizol como se describe en el Ejemplo 1. El ADNc fue sintetizado con hexámeros al azar usando el ARN como molde y el ADNc fue amplificado por PCR usando el cebador inverso 1 y el cebador directo 3, como se describe en la Fig. 1A. Como se ha descrito anteriormente, este protocolo de amplificación produce un amplicón de 210 pb que contiene los 31 primeros nucleótidos del ARN mitocondrial 16S sentido unidos a una secuencia repetida invertida de 184 nucleótidos que corresponde al ARN quimérico mitocondrial sentido como se describe en el Ejemplo 1. El análisis electroforético de los productos de amplificación reveló, además de la presencia del amplicón de 210 pares de bases ya descrito, una banda de aproximadamente 150 pb (ver Fig. 2). La secuencia del amplicón de 150 pb es idéntica a la secuencia del amplicón descrito en el Ejemplo 2, que corresponde a un segundo ARN quimérico mitocondrial sentido expresado en células transformadas por HPV 16 o HPV 10 18 (SEQ ID NO 2). Adicionalmente se encontró un nuevo producto de amplificación de aproximadamente 100 pb (Fig. 2). La secuencia de este tercer amplicón reveló una secuencia repetida invertida de 61 nucleótidos unida al extremo 5' del ARN mitocondrial 16S sentido que genera un lazo de 167 nucleótidos (Fig. 1C; SEQ ID NO 3). Este nuevo amplicón no estaba presente en células normales, ni en células tumorales ni en células transformadas con HPV 16 o 18. Por lo tanto este nuevo ARN quimérico mitocondrial sentido es un marcador potencial de células transformadas con el retrovirus oncogénico HTLV-1.

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

EJEMPLO 4

Estructura del ARN quimérico mitocondrial antisentido humano

Nuestros experimentos iniciales indicaron que en algunas de las células estudiadas existía una segunda familia de ARN quiméricos que corresponden al ARN quimérico mitocondrial antisentido. Para establecer la estructura del ARN quimérico mitocondrial antisentido humano se utilizó la misma estrategia usada para el ARN quimérico mitocondrial sentido (Fig. 1). El ARN quimérico mitocondrial antisentido teórico contenía un fragmento del ARN mitocondrial 16S sentido como una secuencia repetida invertida unida al extremo 5' del ARN mitocondrial 16S antisentido. Este último ARN es transcrito de la hebra L del ADN mitocondrial y corresponde al gen mitocondrial 16S (Fig. 3). Para amplificar este ARN se hibridó un cebador inverso cerca del extremo 5' del ARN mitocondrial 16S antisentido y los cebadores directos se hibridaron en diferentes posiciones del supuesto fragmento de la secuencia repetida invertida (Fig. 3). Se usó ARN total de linfocitos humanos estimulados con PHA durante 48 horas como molde. El ADNc fue sintetizado con hexámeros al azar como se describe en el Ejemplo 1. La amplificación del ADNc por PCR se llevó a cabo con el cebador inverso situado cerca del comienzo del extremo 5' del ARN mitocondrial 16S antisentido (cebador 1, Fig. 3A-3C) y diferentes cebadores directos situados en la secuencia repetida invertida (Fig. 3). Se obtuvieron solo tres amplicones principales que diferían en el tamaño de la secuencia repetida invertida y en el tamaño del lazo. Estos amplicones fueron purificados y secuenciados. Uno de estos ARN quiméricos mitocondriales antisentido contiene una secuencia repetida invertida de 365 nucleótidos y un lazo de 17 nucleótidos (SEQ ID NO 4). Otro ARN contiene un lazo de 96 nucleótidos y una secuencia repetida invertida de 189 nucleótidos (SEQ ID NO 5). Una tercera especie de ARN quimérico mitocondrial antisentido contiene una secuencia repetida invertida de 296 nucleótidos y un lazo de 451 nucleótidos (SEQ ID NO 6). Las secuencias de los tres ARN quiméricos mitocondriales antisentido eran 99,8

por ciento homologas con la secuencia del gen del ADN mitocondrial (hebras H y L).

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

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

Tabla 1.

ARN quiméricos	Expresión de los ARN quiméricos en células de diferentes tipos				Cáncer
	Normal en reposo	Normal en proliferación	Transformadas con HPV	Transformadas con HTLV-1	
SEQ ID NO 1	--	+++++	+++++	+++++	+++++
SEQ ID NO 2	--	--	++++	++++	--
SEQ ID NO 3	--	--	--	++++	--
SEQ ID NO 4	--	+++++	+/-	+/-	+/-
SEQ ID NO 5	--	+++++ +/-	+/-	+/-	+/-
SEQ ID NO 6	--	+++++	+/-	+/-	+/-
SEQ ID NO 1	--	+++++	+++++	+++++	+++++

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

EJEMPLO 5

Las líneas celulares tumorales sobreexpresan el ARN quimérico mitocondrial sentido (SEQ ID NO1) e inhiben a la baja la expresión del ARN quimérico mitocondrial antisentido (SEQ ID NOS 4, 5 y 6).

Se usó la hibridación *in situ* para determinar la expresión del ARN quimérico mitocondrial sentido en líneas celulares tumorales en cultivo. Para la hibridación *in situ* se cultivaron células tumorales adherentes en portaobjetos de 8 cámaras (Lab-Tek, NUNC) durante 24 a 48 h a 37 °C usando los medios y condiciones apropiadas recomendadas por la American Tissue Culture Collection o ATCC. Las células no adherentes (por ejemplo HL-60, Jurkat y Ramos) se cultivaron en matraces pequeños durante 48 h a 37 °C. Las células fueron recuperadas por centrifugación a 300 x g durante 10 min, se resuspendieron en un pequeño volumen de PBS y se aplicaron alícuotas de 10 a 20 µl se colocaron en portaobjetos de vidrio previamente cubiertos con polilisina o la proteína adhesiva del mejillón purificada (Burzio et al, Curr. Opin. Biotechnol., 8:309-312,1997). Las células se dejaron secar a temperatura ambiente durante 30 min. Las células fueron lavadas tres veces con PBS y fijadas con paraformaldehído al 4 % durante 10 min a temperatura ambiente. Los portaobjetos fueron lavados tres veces con PBS durante 5 min e incubados en HCl 0,2 N durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las células fueron lavadas otras tres veces, primero con PBS y después con SSC 2X durante 10 minutos (SSC 2X: NaCl 0,3 M, citrato de sodio 30 mM, pH 7,0) (Sambrook et al., 1989) a temperatura ambiente. La prehibridación se llevó a cabo durante 30 min a 37 °C en una solución que contenía SSC 4X, sulfato de dextrano 10 %, 150 g/ml de ARNt de levadura y ADN de espermatozoides de arenque, formamida 50 % y solución de Denhardt 1X (Ficol tipo 400 0,2 mg/ml, polivinilpirrolidona 0,2 mg/ml y BSA 0,2 mg/ml). La hibridación se llevó a cabo durante 15 horas a 37 °C en la misma mezcla de prehibridación que contiene 3,5 pmoles de las sondas dirigidas a los ARN quiméricos mitocondriales sentido y antisentido. Las sondas contenían 20 o más deoxinucleótidos dirigidos a diferentes regiones de la secuencia del ARN quimérico mitocondrial sentido y antisentido (ver SEQ ID NOS 98 a 196 y SEQ ID NOS 9 a 97 respectivamente). Las sondas se habían marcado previamente en el extremo 3' con digoxigenina- 11-dUTP (Roche) y transferasa terminal (Promega) como ha sido previamente descrito (Villegas et al., DNA & Cell Biol., 19:579-588, 2000). Los portaobjetos fueron lavados para eliminar el exceso de sondas, primero con 2X SSC durante 10 minutos y con 1X SSC durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después las mezclas se lavaron con 0,2X SSC durante 30 minutos a 45 °C y finalmente con 0,2X SSC a temperatura ambiente.

Después de la hibridación, las células fueron incubadas durante 30 min en tampón de bloqueo (BSA 1 %, Triton X-1000 0,3 % en PBS) y luego incubadas durante 2 h a temperatura ambiente con anticuerpo monoclonal anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (Roche) previamente diluido 1:500 en tampón de bloqueo. Finalmente los portaobjetos se lavaron dos veces con PBS y la reacción colorimétrica se efectuó con una mezcla de substrato BCIP/NBT (DAKO) como ha sido previamente descrito (Villegas et al., DNA & Cell Biol., 19:579- 588, 2000). El mismo procedimiento fue empleado para FISH, usando anticuerpos antidigoxigenina conjugados con fluorosceína o rodamina.

Como se muestra en las Figuras 4A y 4B, la hibridación *in situ* con una sonda que corresponde a la SEQ ID NO 63 marcada con digoxigenina revela que las células tumorales humanas sobreexpresan el ARN quimérico mitocondrial sentido. La hibridación *in situ* con la sonda sentido marcada con digoxigenina y correspondiente a la SEQ ID NO 64 fue negativa (Fig. 4A y 4B), lo que indica la regulación a la baja de la expresión del ARN quimérico mitocondrial antisentido. Los mismos resultados se obtuvieron con sondas de oligonucleótidos dirigidas a otras regiones del ARN quimérico mitocondrial sentido y antisentido.

EJEMPLO 6

Las células tumorales de biopsias humanas sobreexpresan el ARN quimérico mitocondrial sentido (SEQ ID NO 1) y regulan a la baja la el ARN quimérico mitocondrial antisentido (SEQ ID NOS 4, 5 y 6)

Se obtuvieron biopsias humanas de patólogos o muestras de tejidos de DAKO. La mayor parte de las muestras estaban incluidas en parafina y fijadas en formalina. Otras muestras de tejido se fijaron con fijador de Boiun y otras muestras eran cortes de tejido fresco congelado. Se dispusieron cortes de tejidos de aproximadamente 4 a 8 µm en portaobjetos previamente cubiertos con polilisina o con la proteína polifenólica adhesiva purificada del mejillón *Aulacomya ater* (Burzio et al., Curr. Opin. Biotechnol., 8:309-312, 1997). Los cortes de tejido incluidos en parafina se incubaron durante 1 hora a 60 °C y la parafina se eliminó con tres lavados con xilol de 15 min cada uno. Los cortes se secaron al aire y se lavaron cuatro veces con PBS. A continuación, los cortes se incubaron con HCl 0,2 N durante 10 minutos a temperatura ambiente y después se lavaron cuidadosamente con PBS. Después, las muestras fueron sometidas a hibridación *in situ* con las sondas antisentido marcadas con digoxigenina de acuerdo con el protocolo descrito en el Ejemplo 4. Un corte paralelo fue hibridado con una sonda sentido correspondiente a la misma región del ARN quimérico mitocondrial sentido.

Como se muestra en la Figura 5A, las células presentes en tumores de mama, carcinomas cervicouterinos, de vejiga y de pulmón revelaron una fuerte tinción con las sondas antisentido dirigidas al ARN quimérico mitocondrial sentido, lo que indica la fuerte presencia de este transcrito. Por otra parte, la hibridación *in situ* con la sonda dirigida al ARN quimérico mitocondrial antisentido fue negativa, lo que indica la regulación a la baja de este transcrito (Fig. 5A). Otros tumores también sobreexpresan el ARN quimérico mitocondrial sentido y regulan a la baja la expresión del ARN quimérico mitocondrial antisentido (Fig. 5B).

EJEMPLO 7

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

Usando el mismo protocolo de hibridación *in situ* descrito en los Ejemplos 5 y 6, se determinó en células en proliferación la expresión del ARN quimérico mitocondrial sentido. Como se ve en la Fig. 6, las células HFK, espermatogonias, células del bazo y células en proliferación de embrión de ratón, mostraron un fuerte señal de hibridación que indica la sobreexpresión del ARN quimérico mitocondrial sentido. Por el contrario, las células que no proliferan, como las células cerebro, músculo e hígado, no mostraron señal, lo que indica que el ARN quimérico mitocondrial sentido no se expresa o se regula a la baja en estas células.

Sin embargo, se observó sorprendentemente que cuando la hibridación *in situ* se llevaba a cabo con sondas dirigidas al ARN quimérico mitocondrial antisentido, también se observaba una fuerte señal (Fig. 6). Varios controles analizados paralelamente indicaron que la señal de hibridación con estas sondas no era debido a un artefacto. La señal de hibridación desaparecía si la hibridación *in situ* se realizaba con la sonda marcada junto con un exceso (50 a 100 veces) de la misma sonda no marcada con digoxigenina. Si antes de la hibridación las muestras eran incubadas con ribonucleasa A por la noche, la señal de hibridación desaparecía. Además, no se observaba señal de hibridación si la hibridación se llevaba a cabo con una sonda marcada dirigida al ARN quimérico mitocondrial antisentido que contenga 4 nucleótidos no complementarios.

EJEMPLO 8

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

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

Los linfocitos humanos fueron cultivados en placas de microtitulación de 96 pocillos en medio RPMI 1640 suplementado como se ha descrito, más suero bovino fetal 10 % a 37° C y con CO₂ 5 %. Se cultivaron aproximadamente 30.000 linfocitos por pocillo con o sin 10 µg/ml del mitógeno PHA, el cual induce la proliferación (Yu et al., J. Biol. Chem., 266:7588-7595, 1991). Después de 48 a 72 h de tratamiento con PHA, las células están dedicadas activamente a la síntesis de ADN como se demostró por la incorporación de H3-timidina o BrdU (Yu et al., J. Biol. Chem., 266:7588-7595, 1991). Además, 48 horas después de la estimulación con PHA los linfocitos sobreexpresan otros marcadores de proliferación celular tal como el antígeno nuclear de células en proliferación o PCNA y Ki-67 (Bantis et al., Cytopathology, 15:25-31, 2004) (Figura 7). Los linfocitos en reposo o controles no expresaron estos antígenos (Fig. 7).

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

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

EJEMPLO 9

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

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

Un hallazgo sorprendente fue la localización del ARN quimérico mitocondrial sentido en el nucléolo. La hibridación *in situ* realizada como se informa en el Ejemplo 5, reveló una señal de hibridación positiva en el nucléolo de células HeLa y SiHa (Fig. 8). La señal de hibridación era más fuerte en el nucléolo de las células HFK transformadas con HPV 16 (Fig. 8). La localización nucleolar también se ha observado en células tumorales en tumores de mama y rabdomiosarcoma (Fig. 8).

Los estudios de colocalización indicaban que el ARN quimérico mitocondrial sentido localizado en el citoplasma está situado fuera de las mitocondrias y asociado a endosomas tardíos/lisosomas. Si los estudios de colocalización se llevan a cabo con marcadores de mitocondrias, tales como Mitotrack (Molecular Probes) o anticuerpos anti-citocromo c (Promega) o anti-endonucleasa G (Chemicon), la hibridación *in situ* mostraba una colocalización deficiente. Sin embargo, se encontró una colocalización perfecta entre la señal de hibridación y los marcadores inmunológicos de endosomas tardíos/lisosomas tales como Lysotrack (Molecular Probes) o anticuerpos anti-Lamp-2 (BD Pharmingen) o anticatapsina D (Zymed).

Se sometieron a hibridación *in situ* células HeLa con sondas de oligonucleótidos marcadas con digoxigenina como se describe en el Ejemplo 5. Después de los procedimientos de post-hibridación y lavado, las células fueron incubadas con un anticuerpo anti-digoxigenina marcado con rodamina y un anticuerpo anti-Lamp-2 marcado con fluorosceína (BD Pharmingen). Después de la incubación a temperatura ambiente durante 3 h en la oscuridad, los portaobjetos fueron lavados, montados y analizados en un microscopio confocal Zeiss. Se obtuvo una clara colocalización de la señal de hibridación con la localización de Lamp-2. Se obtuvieron resultados de colocalización similares de la señal de hibridación con Lysotrack o anticuerpos anti-catepsina D usados como marcadores de la fracción lisosomal. Hasta donde sabemos, esta es la primera descripción de que un ARN (en especial un transcrito mitocondrial) se asocia a los lisosomas de la célula. La determinación de la localización del ARN quimérico mitocondrial sentido en células tumorales puede tener un valor pronóstico importante para pacientes de cáncer. En general, en células normales en proliferación, los ARN quiméricos mitocondriales sentido y antisentido se localizan principalmente en el núcleo.

EJEMPLO 10**El tratamiento in vitro de células tumorales con oligonucleótidos antisentido dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido induce la muerte celular**

Se cultivaron células HL-60 en las condiciones óptimas recomendadas por la ATCC. Se cultivaron aproximadamente 30.000 células en placas de 96 pocillos. Se añadieron oligonucleótidos (2 μ M) dirigidos al ARN quimérico mitocondrial sentido o antisentido. Para aumentar la permeabilidad de las células, los oligonucleótidos se añadieron mezclados con lipofectamina u oligofectamina (Invitrogen) o con polietilenimida (PEI) (Exgen TM 500, Fermentas). Se prefirió PEI porque es prácticamente no tóxica para las células. Las células fueron incubadas con los oligonucleótidos durante 6 horas y el porcentaje de supervivencia celular fue determinado por la permeabilidad al azul tripán. Después de 6 horas de incubación con los oligonucleótidos murieron un porcentaje importante de las células. Sin embargo, los oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido fueron más efectivos en inducir la muerte celular (aproximadamente 90 % frente al 15 % de mortalidad celular). Por otra parte, no se indujo apoptosis cuando las células fueron tratadas con oligonucleótidos dirigidos al ARN mitocondrial 12S sentido o antisentido o al ARNm de la unidad ND1 o con oligonucleótidos con secuencias con orden alterado o con oligonucleótidos que contienen 4 nucleótidos no complementarios, todos los cuales fueron usados como controles. Los oligonucleótidos usados en estos estudios contienen uniones fosforotioato en los primeros 5 nucleótidos del extremo 5' y en los últimos cinco nucleótidos del extremo 3'. Como promedio, los 10 nucleótidos centrales contienen enlaces fosfodiéster.

Para establecer si el tratamiento de las células con estos oligonucleótidos induce la fragmentación del ADN, las células HL-60 fueron incubadas con oligonucleótidos durante 6 horas en las mismas condiciones descritas antes. Se cultivaron aproximadamente 30.000 células HL-60 en 200 μ l de IDMEM más suero bovino fetal 10 % en placas de microtitulación de 96 pocillos junto con 1 μ M de oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial sentido o dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido. La composición de la mezcla de oligonucleótidos con PEI añadida fue la misma que la descrita en la sección anterior. Después de una incubación de 6 h con los oligonucleótidos, se analizó la fragmentación del ADN de las células usando el ensayo TUNEL (DeadEnd Colorimetric TUNEL System, Promega). Como se ve en la Tabla 2, aproximadamente el 96 % de las células mostró fragmentación del ADN después del tratamiento con los oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido. Con el fármaco estaurosporina se obtuvo una tasa similar de fragmentación del ADN. Los oligonucleótidos con secuencias con orden alterado u oligonucleótidos que contienen bases no complementarias, no mostraron efectos. Por el contrario, solo aproximadamente el 20 % de las células murió cuando fueron tratadas con un oligonucleótido dirigido al ARN quimérico mitocondrial sentido (Tabla 2). Como se mostró previamente, las células tumorales regulan a la baja la expresión del ARN quimérico mitocondrial antisentido y en consecuencia estas células poseen un bajo número de copias de este transcrito. Por lo tanto, la muerte celular es inducida más eficientemente por los oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido. Estos resultados sugieren poderosamente que el bajo número de copias del ARN quimérico mitocondrial antisentido en células tumorales constituye una diana para la terapia del cáncer.

Tabla 2.

Los oligonucleótidos complementarios al ARN quimérico mitocondrial antisentido inducen apoptosis en células HL-60

Tratamiento	Porcentaje de células apoptóticas determinado por TUNEL
Control	3,0 %
Oligonucleótidos complementarios al ARN quimérico antisentido	96,7 %
Oligonucleótidos que contienen nucleótidos no complementarios	4,0 %
Oligonucleótidos con secuencia con orden alterado	3,5 %
Oligonucleótidos complementarios al ARN quimérico sentido	26,7 %
Estaurosporina	98,4 %
Oligonucleótidos complementarios al ARN mitocondrial 12S sentido	3,7 %
Oligonucleótidos complementarios al ARN mitocondrial 12S antisentido	4,1 %

En otro estudio, determinamos si el tratamiento de células con oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido induce la activación de las caspasas. Las caspasas son enzimas proteolíticas involucradas activamente en la muerte celular programada o apoptosis. Se incubaron células HL-60 con oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido o con estaurosporina durante 6 horas en las condiciones de cultivo descritas anteriormente. A continuación, se añadió VAD-fmk (Caspase FITC-VAD-FMK, Promega) conjugado con fluoresceína al cultivo y se incubó durante 30 minutos a 37 °C. VAD-fmk es un fuerte inhibidor de las caspasas y se une a las proteasas con afinidad muy elevada (Gracia-Calvo et al., J. Biol. Chem., 273:32608-32613, 1998). Las células fueron lavadas por centrifugación, montadas en portaobjetos y observadas en un microscopio de fluorescencia. Como se muestra en la Fig. 9, el tratamiento de las células HL-60 con el oligonucleótido dirigido al

ARN quimérico mitocondrial antisentido indujo la activación de las caspasas, hasta un nivel similar al alcanzado con estaurosporina. No se obtuvo activación de las caspasas con oligonucleótidos antisentido dirigidos al ARN mitocondrial 12S usado como control.

Las células tratadas con oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido muestran otros cambios compatibles con la apoptosis. La observación al microscopio electrónico mostró fragmentación nuclear y condensación de la cromatina. La fragmentación nuclear se demostró también tiñendo los núcleos con DAPI. Después del tratamiento con estos oligonucleótidos dirigidos al ARN quimérico mitocondrial antisentido, las células sufren fragmentación nuclear como revela la tinción con DAPI (Fig. 9E y 9F).

EJEMPLO 11

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

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

Tabla 3.

Inducción de apoptosis en líneas celulares tumorales por tratamiento con oligonucleótidos complementarios al ARN quimérico mitocondrial antisentido

Células	Porcentaje de células apoptóticas* (tinción DAPI)
MCF/7	89 % $\pm$ 9
Melanoma 4285	86 % $\pm$ 7
Hep G2	93 % $\pm$ 3
Hela	91 % $\pm$ 5
DU145	89 % $\pm$ 6
Células de linfoma Devemelle	87 % $\pm$ 5
Caco-2	64 % $\pm$ 7

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

Para determinar si hay regiones en el transcrito que sean dianas más eficientes en inducir apoptosis por los oligonucleótidos se realizaron los siguientes experimentos. La inducción de la apoptosis se estudió en células HeLa, HL-60 y MCF/7 con oligonucleótidos antisentido de aproximadamente 20 nucleótidos, dirigidos cada aproximadamente 30 nucleótidos, partiendo del extremo 5' del ARN quimérico mitocondrial antisentido. En el tiempo cero se añadieron oligonucleótidos 1 μ M junto con PEI y este tratamiento fue repetido 6 horas más tarde. Quince horas después del comienzo del tratamiento, el porcentaje de células que sufren apoptosis se determinó por tinción con DAPI y haciendo el recuento de las células con núcleos fragmentados. Aun cuando la mayoría de los oligonucleótidos indujeron un grado variable de apoptosis, la región de una hebra del ARN quimérico mitocondrial antisentido resultó una diana mejor para inducir la muerte celular. Los oligonucleótidos dirigidos a la posible región de doble hebra o a la estructura de lazo de los ARN quiméricos mitocondriales antisentido fueron menos efectivos.

La apoptosis puede ser determinada por tinción con azul tripán, tinción con yoduro de propidio e inmunquímica de anexina. En estas técnicas, las células pueden ser analizadas por microscopía fluorescente o citometría de flujo. La fragmentación del ADN puede ser medida por TUNEL o por electroforesis para revelar el tamaño de los trozos de ADN. El análisis por transferencia Western también se puede usar para determinar el procesamiento de proteínas tales como las caspasas, poli(ADP-Rib) sintetasa, etc.

EJEMPLO 12

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

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

Se estimularon linfocitos humanos con 10 µg por ml de PHA durante 48 horas como se describe en el Ejemplo 8. Paralelamente, se incubaron también linfocitos control durante 48 horas pero sin PHA. A las 48 h de cultivo, se añadió 15 µM de oligonucleótidos mezclados con PEI (ver Ejemplo 10) a los linfocitos estimulados y control y se incubaron durante otras 15 horas. La concentración del oligonucleótido fue 10 veces mayor que la concentración usada en experimentos anteriores (1-2 µM). Otras muestras de linfocitos estimulados o control se trataron con 0,4 µM de estaurosporina durante el mismo período de tiempo. Al final del experimento se midió la muerte celular por tinción con azul tripán o DAPI. Como se ve en la Fig. 10, los linfocitos control o los linfocitos estimulados con PHA incubados durante 15 horas sin oligonucleótido mostraron un nivel similar de apoptosis espontánea que variaba entre 7 y 10 % en diferentes experimentos. Un resultado similar se obtuvo con una concentración menor (1-2 µM) de oligonucleótido. También los linfocitos controles y estimulados incubados con 15 µM de oligonucleótidos antisentido mostraron un bajo nivel de apoptosis similar (aproximadamente 10 %) (Fig. 10). Por el contrario, los linfocitos control o los linfocitos estimulados con PHA e incubados también con estaurosporina durante 15 horas mostraron que más del 80 % de las células sufren apoptosis (Fig. 10). Este es un resultado muy importante porque demuestra que las células normales en reposo proliferativo o las células normales en proliferación, como los linfocitos humanos son resistentes a la inducción de apoptosis por los oligonucleótidos complementarios al ARN quimérico mitocondrial antisentido. En otras palabras, la inducción de la apoptosis en células tumorales interfiriendo con el ARN quimérico mitocondrial antisentido es un enfoque terapéutico selectivo para el cáncer.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Andes Biotechnologies S.A.

<120> Marcadores para células precancerosas y cancerosas y el método para interferir con la proliferación celular de estas

<130> P68863WO1

<140> PCT/US2004/015929

<141> 21-5-2004

<150> US 60/472.106

<151> 21-05-2003

<160> 196

<210> 1

<211> 2374

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 618 210 T3

tctaatactg	gtgatgctag	aggatgatgtt	tttggttaaac	aggcggggta	agatttgccg	60
agtttcctttt	actttttttta	accttttcctt	atgagcatgc	ctgtgttggg	ttgacagtga	120
gggtaataat	gacttggttg	ttgattgtag	atatgtgggt	gttaattgtc	agttcagtgt	180
tttaattctga	cgcaggctta	tgcggaggag	aattgttttca	tgttacttat	actaacatta	240
gttcttctat	aggggtgatag	attgggtccaa	ttgggtgtga	ggagttcagt	tatatgtttg	300
ggattttttta	ggtagtgggt	gttgagcttg	aacgctttct	taattgggtg	ctgcttttag	360
gcctactatg	gggtgttaaat	tttttactct	ctctacaagg	ttttttccta	gtgtccaaag	420
agctgttcct	ctttggacta	acagttaaat	ttacaagggg	atttagaggg	ttctgtgggc	480
aaattttaag	ttgaactaag	attctatctt	ggacaaccag	ctatcaccag	gctcggtagg	540
tttgtcgcct	ctacctataa	atcttcccac	tattttgcta	catagacggg	tgtgctcttt	600
tagctgttct	taggtagctc	gtctggtttc	gggggtctta	gctttggctc	tccttgcaaa	660
gttattttcta	gttaattcat	tatgcagaag	gtataggggt	tagtccttgc	tatatattgc	720
ttggttataa	tttttcatct	ttcccttgcg	gtactatatc	tattgcgcca	ggtttcaatt	780
tctatcgcct	atactttatt	tgggtaaatg	gtttggctaa	acctagcccc	aaaccctgc	840
caccttacta	ccagacaacc	ttagccaaac	cattttacca	aataaagtat	aggcgataga	900
aattgaaacc	tggcgcgaata	gatatagtac	cgaaggggaa	agatgaaaaa	ttataacca	960
gcataatata	gcaaggacta	acccctatac	cttctgcata	atgaattaac	tagaaataac	1020
gagccaagc	gagccaaagc	taagaccccc	gaaaccagac	gagctacct	agaacagcta	1080
aaagagcaca	cccgtctatg	tagcaaaata	gtgggaagat	ttataggtag	aggcgacaaa	1140
cctaccgagc	ctgggtgatag	ctgggtgtcc	aagatagaat	cttagttcaa	ctttaaattt	1200
gcccacagaa	ccctctaaat	ccccttgtaa	atttaactgt	tagtccaaag	aggaacagct	1260
ctttgacac	taggaaaaaa	ccttgtagag	agagtaaaaa	atttaacacc	catagtaggc	1320
ctaaaagcag	ccaccaatta	agaaagcggt	caagctcaac	accactacc	taaaaaatcc	1380
caaacatata	actgaactcc	tcacacccaa	ttggaccaat	ctatcacct	atagaagaac	1440
taatgttagt	ataagtaaca	tgaaaacatt	ctcctccgca	taagcctgcg	tcagattaaa	1500
acactgaact	gacaattaac	agcccaatat	ctacaatcaa	ccaacaagtc	attattaccc	1560
tcactgtcaa	cccaacacag	gcatgctcat	aaggaaagg	taaaaaaagt	aaaaggaact	1620
cggcaaatct	taccccgct	gtttaccaa	aacatcacct	ctagcatcac	cagtattaga	1680
ggcaccgcct	gcccagtgac	acatgtttaa	cggccgcggt	accctaaccg	tgcaaaggta	1740
gcataatcac	ttgttcctta	aatagggacc	tgtatgaatg	gctccacgag	ggttcagctg	1800
tctcttactt	tttaaccagt	aaattgacct	gcccgtgaag	aggcgggcat	aacacagcaa	1860
gacgagaaga	ccctatggag	ctttaattta	ttaatgcaaa	cagtacctaa	caaaccacaa	1920
ggtcctaaac	taccaaacc	gcattaaaaa	tttcggttgg	ggcgacctcg	gagcagaacc	1980
caacctccga	gcagtacatg	ctaagacttc	accagtcaaa	gcgaactact	atactcaatt	2040
gatccaataa	cttgaccaac	ggaacaagtt	accctaggg	taacagcgca	atcctattct	2100
agagtccata	tcaacaatag	ggttttacgac	ctcgtatgtg	gatcaggaca	tcccgatggg	2160
gcagccgcta	ttaaagggttc	gtttgttcaa	cgattaaagt	cctacgtgat	ctgagttcag	2220
accggagtaa	tccaggtcgg	tttctatcta	ccttcaaat	cctccctgta	cgaaaggaca	2280
agagaaataa	ggcctacttc	acaaagcgcc	ttccccgta	aatgatata	tctcaactta	2340
gtattatacc	cacaccacc	caagaacagg	gttt			2374

<210> 2
 <211> 1679
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2

ES 2 618 210 T3

ggggtcttag	ctttggctct	ccttgcaaag	ttatttctag	ttaattcatt	atgcagaagg	60
tataggggtt	agtccttgct	atattatgct	tggttataat	ttttcatctt	tcccttgcg	120
tgctaaacct	agccccaac	ccactccacc	ttactaccag	acaaccttag	ccaaaccatt	180
tacccaaata	aagtatagc	gatagaaatt	gaaacctggc	gcaatagata	tagtaccgca	240
agggaaagat	gaaaaattat	aaccaagcat	aatatagcaa	ggactaacc	ctataccttc	300
tgcataatga	attaactaga	aataactttg	caaggagagc	caaagctaag	acccccgaaa	360
ccagacgagc	tacctaagaa	cagctaaaag	agcacaccgc	tctatgtagc	aaaatagtgg	420
gaagatttat	aggtagaggc	gacaaaccta	ccgagcctgg	tgatagctgg	ttgtccaaga	480
tagaatctta	gttcaacttt	aaatttgccc	acagaaccct	ctaaatcccc	ttgtaaattt	540
aactgttagt	ccaaagagga	acagctcttt	ggacactagg	aaaaaacctt	gtagagagag	600
taaaaaattt	aacaccata	gtaggcctaa	aagcagccac	caattaagaa	agcgttcaag	660
ctcaacacc	actacataa	aaatcccaaa	catataactg	aactcctcac	acccaattgg	720
accaatctat	caccctatag	aagaactaat	gttagtataa	gtaacatgaa	aacattctcc	780
tccgcataag	cctgcgtcag	attaaaacac	tgaactgaca	attaacagcc	caatatctac	840
aatcaaccaa	caagtcatta	ttaccctcac	tgtaaccca	acacaggcat	gctcataagg	900
aaagggttaa	aaaagtaaaa	ggaactcggc	aaatcttacc	ccgcctgttt	acaaaaaaca	960
tcacctctag	catcaccagt	attagaggca	ccgcctgccc	agtgcacacat	gtttaacggc	1020
cgcggtaccc	taaccgtgca	aaggtagcat	aatcacttgt	tccttaataa	gggacctgta	1080
tgaatggctc	cacgaggggt	cagctgtctc	ttacttttaa	ccagtgaagt	tgacctgccc	1140
gtgaagaggc	gggcataaca	cagcaagacg	agaagaccct	atggagcttt	aattttattaa	1200
tgcaaacagt	acctaacaaa	cccacaggct	ctaaactacc	aaacctgcac	taaaaatttc	1260
ggttggggcg	acctcggagc	agaacccaac	ctccgagcag	tacatgctaa	gacttcacca	1320
gtcaaagcga	actactatac	tcaattgatc	caataacttg	accaacggaa	caagttaccc	1380
tagggataac	agcgcaatcc	tattctagag	tccatatcaa	caataggggt	tacgacctcg	1440
atggttgatc	aggacatccc	aatggtgcag	ccgctattaa	aggttcggtt	gttcaacgat	1500
taaagtccta	cgtgatctga	gttcagaccg	gagtaatcca	ggctcggttt	tatctacttc	1560
aaattcctcc	ctgtacgaaa	ggacaagaga	aataaggcct	acttcacaaa	gcgccttccc	1620
ccgtaaatga	tatcatctca	acttagtatt	ataccacac	ccaccaaga	acaggggttt	1679

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

<400> 3

ggggtcttag	ctttggctct	ccttgcaaag	ttatttctag	ttaattcatt	atgcagaagg	60
tataggggtt	agtccttgct	aaacctagcc	ccaaaccac	tccaccttac	taccagacaa	120
ccttagccaa	accatttacc	caaataaagt	atagggcgata	gaaattgaaa	cctggcgcaa	180
tagatatagt	accgcaaggg	aaagatgaaa	aattataacc	aagcataata	tagcaaggac	240
taacccctat	accttctgca	taatgaatta	actagaaata	actttgcaag	gagagccaaa	300
gctaagaccc	ccgaaaccag	acgagctacc	taagaacagc	taaaagagca	caccctgcta	360
tgtagcaaaa	tagtgggaag	atcttataggt	agagggcgaca	aacctaccga	gacctggtgat	420
agctgggtgt	ccaagataga	atcttagttc	aaactttaaat	ttgcccacag	aacctcttaa	480
atccccctgt	aaattttaact	gttagtccaa	agaggaacag	ctctttggac	actaggaaaa	540
aaccttgtag	agagagtaaa	aaattttaaca	cccatagtag	gcctaaaagc	agccaccaat	600
taagaaacgc	ttcaagctca	acaccacta	cctaaaaaat	cccaaacata	taactgaact	660
cctcacaccc	aattggacca	atctatcacc	ctatagaaga	actaatgtta	gtataagtaa	720
catgaaaaca	ttctcctccg	cataagcctg	cgtagagatta	aaacactgaa	ctgacaatta	780
acagcccaat	atctacaatc	aaccaacaag	tcattattac	cctcactgtc	aacccaacac	840
aggcatgctc	ataaggaaa	gttaaaaaaa	gtaaaaggaa	ctcggcaaat	cttaccctcg	900
ctgtttacca	aaaacatcac	cttagcatc	accagattta	gaggcaccgc	ctgcccagtg	960
acacatgttt	aacggccg	gtaccctaac	cgtgcaaagg	tagcataatc	acttggtcct	1020
taaataggga	cctgtatgaa	tggtccacg	aggggttcagc	tgtctcttac	ttttaaccag	1080
tgaatttgac	ctgcccgtga	agaggcgggc	ataacacagc	aagacgagaa	gaccctatgg	1140
agcttttaatt	tattaatgca	aacagtacct	aacaaaccca	caggtcctaa	actaccaaac	1200
ctgctaataa	aatctcggtt	ggggcgacct	cggagcagaa	cccaacctcc	gagcagtaca	1260
tgctaagact	tcaccagtca	aagcgaacta	ctataactcaa	ttgatccaat	aacctgacca	1320
acggaacaag	ttaccctagg	gataacagcg	caatcctatt	ctagagtcca	tatcaacaat	1380
aggggtttacg	acctcgatgt	tggatcagga	catcccaatg	gtgcagccgc	tattaaaggt	1440
tcgtttgttc	aacgattaaa	gtcctacgtg	atctgagttc	agaccggagt	aatccagggtc	1500
ggtttctatc	tacttcaaat	tcctccctgt	acgaaaggac	aagagaaata	aggcctactt	1560
cacaaagcgc	cttcccccg	aaatgatata	atctcaactt	agtattatac	ccacaccac	1620
ccaagaacag	ggttt					1635

<210> 4
 <211> 1921
 <212> ADN

ES 2 618 210 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

aacctccgag	cagtacatgc	taagacttca	ccagtcaaag	cgaactacta	tactcaattg	60
atccaataac	ttgaccaacg	gaacaagtta	ccctagggat	aacagcgcaa	tcctattcta	120
gagtcctatat	caacaatagg	gtttacgacc	tcgatgttgg	atcaggacat	cccaatggtg	180
cagccgctat	taaaggttcg	tttgttcaac	gattaaagtc	ctacgtgatc	tgagttcaga	240
ccggagtaat	ccaggtcggt	ttctatctac	ttcaaattcc	tccctgtacg	aaaggacaag	300
agaaataagg	cctacttcac	aaagcgccct	cccccgtaaa	tgatatcatc	tcaacttagt	360
attataaccct	gttcttgggt	gggtgtgggt	ataatactaa	gttgagatga	tatcatttac	420
gggggaaggc	gctttgtgaa	gtaggcccta	tttctcttgt	cctttcgtac	agggaggaat	480
ttgaagtaga	tagaaaccga	cctggattac	tccgggtctga	actcagatca	cgtaggactt	540
taatcgttga	acaaacgaac	ctttaatagc	ggctgcacca	tcgggatgtc	ctgatccaac	600
atcgaggtcg	taaaccctat	tgttgatatg	gactctagaa	taggattgcy	ctgttatccc	660
tagggtaact	tgttccgttg	gtcaagttat	ggatcaatt	gagtatagta	gttcgcctttg	720
actgggtgaag	tcttagcatg	tactgctcgg	aggttgggtt	ctgctccgag	gtcgccccaa	780
ccgaaatttt	taatgcaggt	ttggtagttt	aggacctgtg	ggtttggttag	gtactgtttg	840
cattaataaaa	ttaaagctcc	atagggtcct	ctcgtcttgc	tgtgttatgc	ccgcctcttc	900
acgggcaggt	caatttctact	ggttaaaagt	aagagacagc	tgaaccctcg	tggagccatt	960
catacaggtc	cctattttaag	gaacaagtga	ttatgctacc	tttgcacggt	tagggtagccg	1020
cggccgttaa	acatgtgtca	ctgggcaggc	gggtgcctcta	atactgggtga	tgctagaggt	1080
gatgtttttg	gtaaacaggc	ggggtaagat	ttgccgagtt	ccttttactt	tttttaacct	1140
ttccttatga	gcatgcctgt	gttgggttga	cagtgagggg	aataatgact	tgttggttga	1200
ttgtagatat	tgggctgtta	attgtcagtt	cagtgtttta	atctgacgca	ggcttatgcy	1260
gaggagaatg	ttttcatggt	acttatacta	acattagttc	ttctataggg	tgatagattg	1320
gtccaattgg	gtgtgaggag	ttcagttata	tgtttgggat	tttttaggta	gtgggtgttg	1380
agcttgaacg	ctttcttaat	tggtggctgc	ttttaggcct	actatgggtg	ttaaattttt	1440
tactctctct	acaagggttt	ttcctagtgt	ccaaagagct	gttcctcttt	ggactaacag	1500
ttaaattttac	aaggggattt	agagggttct	gtgggcaaat	ttaaagttga	actaagattc	1560
tatctttggac	aaccagctat	caccaggctc	ggtaggtttg	tcgcctctac	ctataaatct	1620
tcccactatt	ttgctacata	gacgggtgtg	ctcttttagc	tgttcttagg	tagctcgtct	1680
ggtttcgggg	gtcttagctt	tggctctcct	tgcaaagtta	tttctagtta	attcattatg	1740
cagaagggtat	aggggttagt	ccttgctata	ttatgcttgg	ttataatttt	tcattctttcc	1800
cttgcggtac	tatatctatt	gcgccaggtt	tcaattttcta	tcgcctatac	tttatttggg	1860
taaatggttt	ggctaagggt	gtctggtagt	aaggtggagt	gggtttgggg	ctaggttttag	1920
c						1921

5

<210> 5

<211> 1744

<212> ADN

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

ES 2 618 210 T3

tagggataac	agcgcaatcc	tattctagag	tccatatcaa	caatagggtt	tacgacctcg	60
atgttggatc	aggacatccc	gatggtgcag	ccgctattaa	aggttcgttt	gttcaacgat	120
taaagtccta	cgtgatctga	gttcagaccg	gagtaatcca	ggtcgggttc	tatctacctt	180
caaattcctc	cctgttcttg	ggtgggtgtg	ggtataatac	taagttgaga	tgatatcatt	240
tacgggggaa	ggcgctttgt	gaagtaggcc	ttatttctct	tgtcctttcg	tacaggagg	300
aatttgaagt	agatagaaac	cgacctggat	tactccggtc	tgaactcaga	tcacgtagga	360
ctttaatcgt	tgaacaaacg	aacctttaat	agcggctgca	ccatcgggat	gtcctgatcc	420
aacatcgagg	tcgtaaaccc	tattgttgat	atggactcta	gaataggatt	gcgctgttat	480
ccctagggtg	acttggtccg	ttggtcaagt	tattggatca	attgagtata	gtagttcgct	540
ttgactggtg	aagtcttagc	atgtactgct	cggagggttg	gttctgctcc	gaggctgccc	600
caaccgaaat	ttttaatgca	ggtttggtag	tttaggacct	gtgggtttgt	taggtactgt	660
ttgcattaat	aaattaaagc	tccatagggt	cttctcgtct	tgctgtgtta	tgcccgcttc	720
ttcacgggca	ggtcaatttc	actggttaaa	agtaagagac	agctgaaccc	tcgtggagcc	780
attcatacag	gtccctatct	aaggaacaag	tgattatgct	acctttgcac	ggttagggta	840
ccgcggccgt	taaacatgtg	tcactgggca	ggcgggtgcct	ctaatactgg	tgatgctaga	900
ggtgatgttt	ttggtaaaca	ggcggggtaa	gatttgccga	gttcctttta	ctttttttaa	960
cctttcctta	tgagcatgcc	tgtgttgggt	tgacagttag	ggtaataatg	acttgttggg	1020
tgattgtaga	tattgggctg	ttaattgtca	gttcagtgtt	ttaatctgac	gcaggcttat	1080
gcggaggaga	atgttttcat	gttacttata	ctaacattag	ttcttctata	gggtgataga	1140
ttgggtccaat	tgggtgtgag	gagttcagtt	atatgttttg	gatttttttag	gtagtgggtg	1200

ttgagcttga	acgcttttct	aattgggtggc	tgcttttagg	cctactatgg	gtgttaaatt	1260
ttttactctc	tctacaaggt	tttttcctag	tgtccaaaga	gctgttcctc	tttgactaa	1320
cagttaaatt	tacaagggga	tttagagggg	tctgtgggca	aatttaaagt	tgaactaaga	1380
ttctatcttg	gacaaccagc	tatcaccagg	ctcggtagg	ttgtcgcttc	tacctataaa	1440
tcttccact	attttgctac	atagacgggt	gtgctctttt	agctgttctt	aggtagctcg	1500
tctgggttcg	ggggctcttag	ctttgggtct	ccttgcaaag	ttatttctag	ttaattcatt	1560
atgcagaagg	tataggggtt	agtccttgct	atattatgct	tggttataat	ttttcatctt	1620
tcccttgccg	tactatatct	attgcgccag	gtttcaattt	ctatcgccct	tactttatct	1680
gggtaaatgg	tttggtctaag	gttgtctggt	agtaagggtg	agtgggtttg	gggctaggtt	1740
tagc						1744

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

<400> 6

ES 2 618 210 T3

```

gaactcggca aatcttacc cgcctgttta ccaaaaacat cacctctagc atcaccagta 60
ttagaggcac cgccctgccc gtgacacatg ttaacggcc gcggtaccct aaccgtgcaa 120
aggtagcata atcacttggt ccttaaatag ggacctgtat gaatggctcc acgagggttc 180
agctgtctct tacttttaac cagtgaatgt gacctgccc tgaagaggcg ggcatagcac 240
agcaagacga gaagacccta tggagcttta atttattaat gcaaacagta cctaacaac 300
cctgttcttg ggtgggtgtg ggtataatac taagtggaga tgatatcatt tacgggggaa 360
ggcgctttgt gaagtaggcc ttatttctct tgcctttcg tacaggagg aatttgaggt 420
agatagaac cgacctggat tactccggtc tgaactcaga tcacgtagga ctttaacgt 480
tgaacaaacg aacctttaat agcggctgca ccacgggat gtcctgatcc aacatcgagg 540
tcgtaaaccc tattgttgat atggactcta gaataggatt gcgctgttat ccctagggtg 600
acttgttccg ttggtcaagt tattggatca attgagtata gtagttcgct ttgactgggt 660
aagtcttagc atgtactgct cggagggttg gttctgctcc gaggtcgccc caaccgaaat 720
ttttaatgca ggtttggtag tttaggacct gtgggtttgt taggtactgt ttgcattaat 780
aaattaaagc tccatagggt cttctcgctc tgctgtgtta tgccgcctc ttcacgggca 840
ggtcaatttc actggttaaa agtaagagac agctgaacc tcgtggagcc attcatacag 900
gtccctattt aagggaacag tgattatgct acctttgcac ggtagggta ccgcgccgt 960
taaacatgtg tcaactggga ggcggtgcct ctaatactgg tgatgctaga ggtgatgttt 1020
ttggtaaaca ggcggggtaa gatttgccga gttcctttta ctttttttaa ctttccctta 1080
tgagcatgcc tgtgttgggt tgacagttag ggttaataat acttgttggg tgattgtaga 1140
tattgggctg ttaattgtca gttcagtgtt ttaactgac gcaggcttat gcggaggaga 1200
atgttttcat gttacttata ctaacattag ttcttctata gggatgata ttggtccaat 1260
tgggtgtgag gagttcagtt atatgtttgg gattttttag gtagtgggtg ttgagcttga 1320
acgctttctt aattgggtggc tgcttttagg cctactatgg gtgttaaat ttttactctc 1380
tctacaaggt tttttcctag tgtccaaaga gctgttcctc ttgggactaa cagttaaatt 1440
tacaagggga ttttagagggt tctgtgggca aatttaaagt tgaactaaga ttctatcttg 1500
gacaaccagc tatcaccagg ctcggtagggt ttgtgcctc tacctataaa tcttcccact 1560
attttgctac atagacgggt gtgctctttt agctgttctt aggtagctcg tctggtttcg 1620
ggggtcttag ctttggtctc ctttgcaaag ttatttctag ttaattcatt atgcagaagg 1680
tatagggttt agtccttgct atattatgct tgggtataat ttttcatctt tccctgcgg 1740
tactatatct attgcgcag gtttcaattt ctatcgccca tactttattt gggtaaatgg 1800
tttggctaag gttgtctggt agtaagggtg agtgggtttg gggctaggtt tagc 1854

```

- 5
<210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 10
<220>
<223> Oligonucleótido antisentido
- 15
<400> 7
taggttagc accgcaaggg 20
- 20
<210> 8
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 25
<220>
<223> Oligonucleótido antisentido
- 30
<400> 8
taggttagc aaggactaac 20
- 35
<210> 9
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
- 40
<220>
<223> Oligonucleótido antisentido
- 45
<400> 9
ggggaagat ttgccgag 18
- 50
<210> 10
<211> 22
<212> ADN

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 10	
	atgctagagg tgatgtttt gg	22
10	<210> 11	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 11	
	cggtgcctct aatactgg	18
20	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 12	
30	gttaaactg tgctactggg	20
	<210> 13	
	<211> 18	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 13	
40	tgcacggtt aggtacc	18
	<210> 14	
	<211> 21	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
50	<400> 14	
	ggaacaagtg attatgctac c	21
	<210> 15	
	<211> 21	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
60	<400> 15	
	ggagccattc atacaggtcc c	21
	<210> 16	
65	<211> 20	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 16	
	agtaagagac agctgaaccc	20
10	<210> 17	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 17	
	ggcaggtaa ttcactgg	19
20	<210> 18	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 18	
30	gctgtgttat gccgcctc	19
	<210> 19	
	<211> 19	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 19	
40	agctccatag ggtctctc	19
	<210> 20	
	<211> 20	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
50	<400> 20	
	gttaggtact gttgcatta	20
	<210> 21	
	<211> 18	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
60	<400> 21	
	aagtcttagc atgtactg	18
	<210> 22	
65	<211> 19	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 22	
	tagtagttcg ctttgactg	19
10	<210> 23	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 23	
	caagttattg gatcaattg	19
20	<210> 24	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 24	
30	gggtaacttg ttccgttg	18
	<210> 25	
	<211> 18	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 25	
40	aataggattg cgctgtta	18
	<210> 26	
	<211> 18	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
50	<400> 26	
	cctattgttg atatggac	18
	<210> 27	
55	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 27	
	ctgatccaac atcgagg	17
65	<210> 28	
	<211> 18	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 28	
	tagcggctgc accattgg	18
10	<210> 29	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 29	
	gttgaacaaa cgaacctt	19
20	<210> 30	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 30	
30	aactcagatc acgtaggac	19
	<210> 31	
	<211> 18	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 31	
40	cgacctggat tactccgg	18
	<210> 32	
	<211> 18	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
50	<400> 32	
	ggaatttgaa gtagatag	18
	<210> 33	
	<211> 19	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
60	<400> 33	
	ctctgtcct ttcgtacag	19
	<210> 34	
65	<211> 18	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 34	
	ggcgcttgt gaagtagg	18
10	<210> 35	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 35	
	gttgagatga tatcattac gg	22
20	<210> 36	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 36	
30	cacccacca agaacagg	18
	<210> 37	
	<211> 25	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 37	
40	caacttagta ttataccac accca	25
	<210> 38	
	<211> 22	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
50	<400> 38	
	tccccgtaa atgattacat ct	22
	<210> 39	
55	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 39	
	gagaaataag gcctactca caaag	25
65	<210> 40	
	<211> 22	
	<212> ADN	

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

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 46	
	atcctattct agagtccata tcaac	25
10	<210> 47	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 47	
	aataggattg cgctgttatc ccta	24
20	<210> 48	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 48	
30	tagggataac agcgcatacc tatt	24
	<210> 49	
	<211> 23	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 49	
40	ggaacaagtt accctaggga taa	23
	<210> 50	
	<211> 23	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
50	<400> 50	
	ttgatccaat aactgacca acg	23
	<210> 51	
	<211> 21	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
60	<400> 51	
	acttcaccag tcaaagcgaa c	21
	<210> 52	
65	<211> 18	
	<212> ADN	

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

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 58	
	tgacctgccc gtgaagag	18
10	<210> 59	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 59	
	cagctgtctc ttactttaa ccagtg	26
20	<210> 60	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 60	
30	ctgtatgaat ggctccacga	20
	<210> 61	
	<211> 26	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 61	
40	agcataatca ctgttcctt aaatag	26
	<210> 62	
	<211> 23	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
50	<400> 62	
	accgtgcaaa ggtagcataa tca	23
	<210> 63	
55	<211> 23	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 63	
	tgattatgct acctttgcac ggt	23
65	<210> 64	
	<211> 19	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 64	
	gtaccctaac cgtgcaaag	19
10	<210> 65	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 65	
	cctgccagtgacacatgtt t	21
20	<210> 66	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 66	
30	caccttagc atcaccagta ttaga	25
	<210> 67	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 67	
40	cttaccgccg cgtgttacca	20
	<210> 68	
	<211> 26	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
50	<400> 68	
	agggtaaaaa aagtaaaagg aactcg	26
	<210> 69	
55	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 69	
	cccaacacag gcatgctca	19
65	<210> 70	
	<211> 24	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 70	
	accaacaagt cattattacc ctca	24
10	<210> 71	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 71	
	tgacaattaa cagccaata tcta	24
20	<210> 72	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 72	
30	gcctgctca gattaaaca c	21
	<210> 73	
	<211> 24	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 73	
40	gtaacatgaa aacattctcc tccg	24
	<210> 74	
	<211> 28	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
50	<400> 74	
	tatcaccta tagaagaact aatgttag	28
	<210> 75	
55	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 75	
	ctgaactcct cacaccaat t	21
65	<210> 76	
	<211> 23	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 76	
	cactacctaa aaaatcccaa aca	23
10	<210> 77	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 77	
	ttaagaaagc gttcaagctc a	21
20	<210> 78	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 78	
30	catagtaggc ctaaaagcag c	21
	<210> 79	
	<211> 26	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
40	<400> 79	
	aaaccttgta gagagagtaa aaaatt	26
	<210> 80	
	<211> 24	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
50	<400> 80	
	aaagaggaac agctcttgg acac	24
	<210> 81	
55	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 81	
	aatccccttg taaatttaac tggt	24
65	<210> 82	
	<211> 21	
	<212> ADN	

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

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 88	
	taagaccccc gaaaccagac	20
10	<210> 89	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 89	
	ataactttgc aaggagagcc	20
20	<210> 90	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 90	
30	cttctgcata atgaattaac	20
	<210> 91	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 91	
40	atatagcaag gactaacccc	20
	<210> 92	
	<211> 20	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
50	<400> 92	
	agatgaaaaa ttataaccaa	20
	<210> 93	
55	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 93	
	caatagatat agtaccgcaa	20
65	<210> 94	
	<211> 20	
	<212> ADN	

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

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

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 106	
	attaacagcc caatatctac	20
10	<210> 107	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 107	
	tgcgtagat taaaacactg	20
20	<210> 108	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 108	
30	aaaacattct cctccgcata	20
	<210> 109	
	<211> 18	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
40	<400> 109	
	gttagtataa gtaacatg	18
	<210> 110	
	<211> 19	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
50	<400> 110	
	tggaccaatc taccacct	19
	<210> 111	
55	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 111	
	acataatact gaactcctca	20
65	<210> 112	
	<211> 20	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 112	
	caccactac ctaaaaaatc	20
10	<210> 113	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 113	
	caccaattaa gaaagcgtg	20
20	<210> 114	
	<211> 22	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 114	
30	taggcctaaa agcagccacc aa	22
	<210> 115	
	<211> 22	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sentido	
	<400> 115	
40	ttggtggctg ctttaggcc ta	22
	<210> 116	
	<211> 19	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
50	<400> 116	
	taacacccat agtaggcct	19
	<210> 117	
55	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 117	
	aacctttag agagagtaaa	20
65	<210> 118	
	<211> 20	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 118	
	aacagctctt tggacactag	20
10	<210> 119	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 119	
	aactgttagt ccaaagag	18
20	<210> 120	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 120	
30	ctctaaatcc ccttgtaaa	19
	<210> 121	
	<211> 19	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 121	
40	actttaatt tgccacag	19
	<210> 122	
	<211> 19	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
50	<400> 122	
	ggttgccaa gatagaatc	19
	<210> 123	
55	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 123	
	acaaacctac cgagcctcc	19
65	<210> 124	
	<211> 18	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 124	
	atttataggt tagaggcg	18
10	<210> 125	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 125	
	atgtagcaaa atagtgggaa	20
20	<210> 126	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 126	
30	taagaacagc taaaagagca c	21
	<210> 127	
	<211> 18	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
40	<400> 127	
	cgaaaccaga cgagctac	18
	<210> 128	
	<211> 22	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido sentido	
50	<400> 128	
	ggggtcttag cttggctct cc	22
	<210> 129	
55	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 129	
	taactttgca aggagagcca	20
65	<210> 130	
	<211> 18	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 130	
	accttctgca taatgaat	18
10	<210> 131	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 131	
	atatagcaag gactaacc	19
20	<210> 132	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 132	
30	gatgaaaaat tataaccaag	20
	<210> 133	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 133	
40	aatagatata gtaccgcaag	20
	<210> 134	
	<211> 17	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
50	<400> 134	
	cgatagaaat tgaacc	17
	<210> 135	
55	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido sentido	
	<400> 135	
	tactttattt gggtaaattg	20
65	<210> 136	
	<211> 20	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 136	
	ccatttacc aaataaagta	20
10	<210> 137	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 137	
	ttagccaaac catttacc	20
20	<210> 138	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 138	
30	aaggtggagt gggttgggg c	21
	<210> 139	
	<211> 17	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
40	<400> 139	
	gctaaggtg tctgga	17
	<210> 140	
	<211> 20	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
50	<400> 140	
	atcgctata ctttattgg	20
	<210> 141	
55	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 141	
	atctattgcg ccaggttca	20
65	<210> 142	
	<211> 19	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 142	
	tttcatctt tcccttgcg	19
10	<210> 143	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 143	
	tccttgctat attatgcttg	20
20	<210> 144	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 144	
30	cattatgcag aaggtatagg	20
	<210> 145	
	<211> 18	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
40	<400> 145	
	ttccttgca aagttatt	18
	<210> 146	
	<211> 20	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
50	<400> 146	
	tttcgggggt ctagctttg	20
	<210> 147	
55	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 147	
	ctgttcttag gtagctcg	18
65	<210> 148	
	<211> 19	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 148	
	tgctacatag acgggtgtg	19
10	<210> 149	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 149	
	cctctaccta taaatcttc	20
20	<210> 150	
	<211> 17	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 150	
30	gctatcacca ggctcgg	17
	<210> 151	
	<211> 17	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
40	<400> 151	
	aagttgaact aagattc	17
	<210> 152	
	<211> 20	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
50	<400> 152	
	gagggttctg tgggcaaatt	20
	<210> 153	
55	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 153	
	acagttaaatt ttacaaggg	19
65	<210> 154	
	<211> 19	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 154	
	gtgtccaaag agctgttcc	19
10	<210> 155	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 155	
	tactctctct acaaggtttt	20
20	<210> 156	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 156	
30	taggcctact atgggtgtta	20
	<210> 157	
	<211> 21	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 157	
40	aacgctttct taattggtgg c	21
	<210> 158	
	<211> 20	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
50	<400> 158	
	tttaggttag tgggtgtga	20
	<210> 159	
55	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 159	
	ggagttcagt tatatgtttg	20
65	<210> 160	
	<211> 20	
	<212> ADN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 160	
	tgatagattg gtccaattgg	20
10	<210> 161	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 161	
	ctaacattag ttctctata g	21
20	<210> 162	
	<211> 18	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
	<400> 162	
30	atgcggagga gaatgttt	18
	<210> 163	
	<211> 19	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
40	<400> 163	
	tcagtgtttt aatctgacg	19
	<210> 164	
	<211> 21	
45	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido antisentido	
50	<400> 164	
	gtagatattg ggctgttaatt	21
	<210> 165	
55	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido	
	<400> 165	
	gtgagggtaa taatgacttg	20
65	<210> 166	
	<211> 20	
	<212> ADN	

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

ES 2 618 210 T3

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

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido	
	<400> 178	
	gtttgttagg tactgttgc a	21
10	<210> 179	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 179	
	aggttgga gttaggac	19
20	<210> 180	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 180	
30	gccccaacg aaattttaa	20
	<210> 181	
	<211> 20	
	<212> ADN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 181	
40	ctcggagggt gggctctgct	20
	<210> 182	
	<211> 20	
	<212> ADN	
45	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
	<400> 182	
50	ctgggaagt ctagcatgt	20
	<210> 183	
	<211> 20	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido	
60	<400> 183	
	caattgagta tagtagtcg	20
	<210> 184	
65	<211> 19	
	<212> ADN	

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

ES 2 618 210 T3

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

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligonucleótido

5

<400> 196

cctgttcttg ggtgggt

17

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica, en la que la composición farmacéutica comprende uno o más oligonucleótidos antisentido de 10-50 nucleobases de longitud que son complementarios con una molécula de ARN quimérico mitocondrial humano que comprende un ARN mitocondrial 16S sentido o antisentido unido covalentemente en su extremo 5' al extremo 3' de un polinucleótido con una secuencia repetida invertida, que es capaz de hibridar con la de la molécula de ARN quimérico mitocondrial humano para formar un dúplex estable, en la que además uno o más de los oligonucleótidos comprende al menos una unión internucleosídica alternativa.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicho uno o más oligonucleótidos se seleccionan del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 9-196.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que molécula quimérica mitocondrial humana comprende un ARN mitocondrial 16S antisentido unido covalentemente en su extremo 5' al extremo 3' de un polinucleótido con una secuencia repetida invertida.
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, en la que molécula quimérica mitocondrial humana comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 4, 5 y 6.
5. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que molécula quimérica mitocondrial humana comprende un ARN mitocondrial 16S sentido unido covalentemente en su extremo 5' al extremo 3' de un polinucleótido con una secuencia repetida invertida.
6. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, en la que molécula quimérica mitocondrial humana comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2 y 3.
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que la unión internucleosídica alternativa es una unión internucleosídica fosforotioato.
8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que dicho uno o más oligonucleótidos comprende además uno o más oligonucleótidos modificados en el extremo 5' por 2-o-(2-metoxi)etilo y uno o más oligonucleótidos modificados en el extremo 3' por 2-o-(2-metoxi)etilo.
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicho uno o más oligonucleótidos comprende uno o más oligonucleótidos bloqueados.
10. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que dicho uno o más oligonucleótidos comprende uno o más ácidos nucleicos peptídicos.
11. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que la composición se formula para administración tópica, oral, parenteral o rectal.
12. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para su uso en el tratamiento de un cáncer o precáncer.

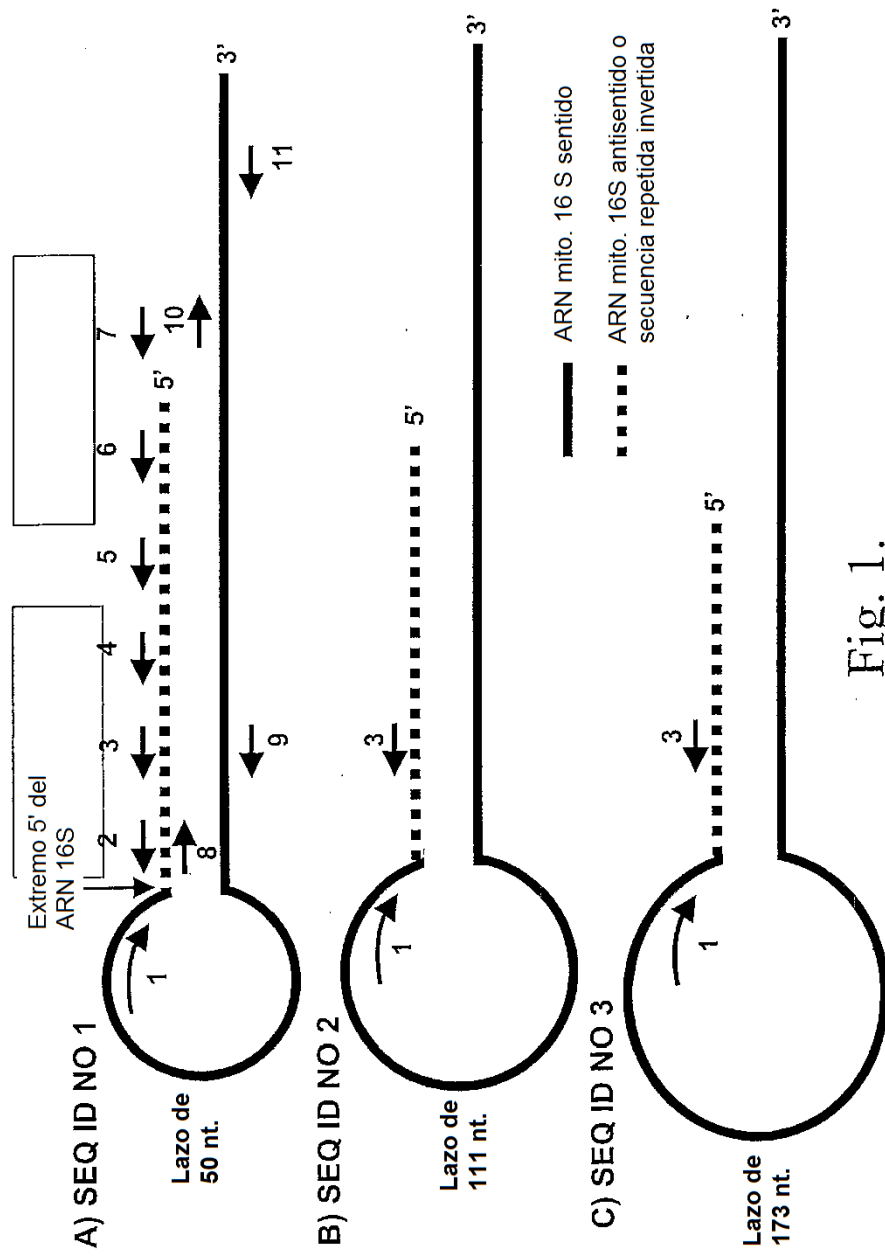


Fig. 1.

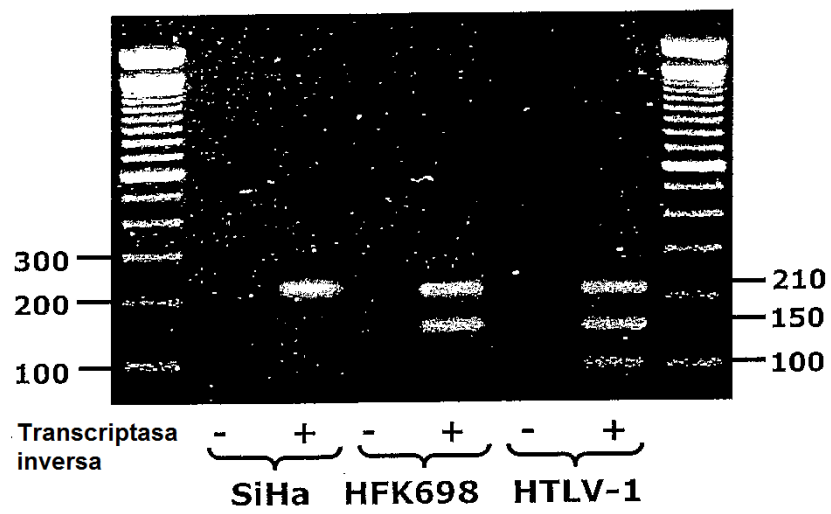


FIG. 2.

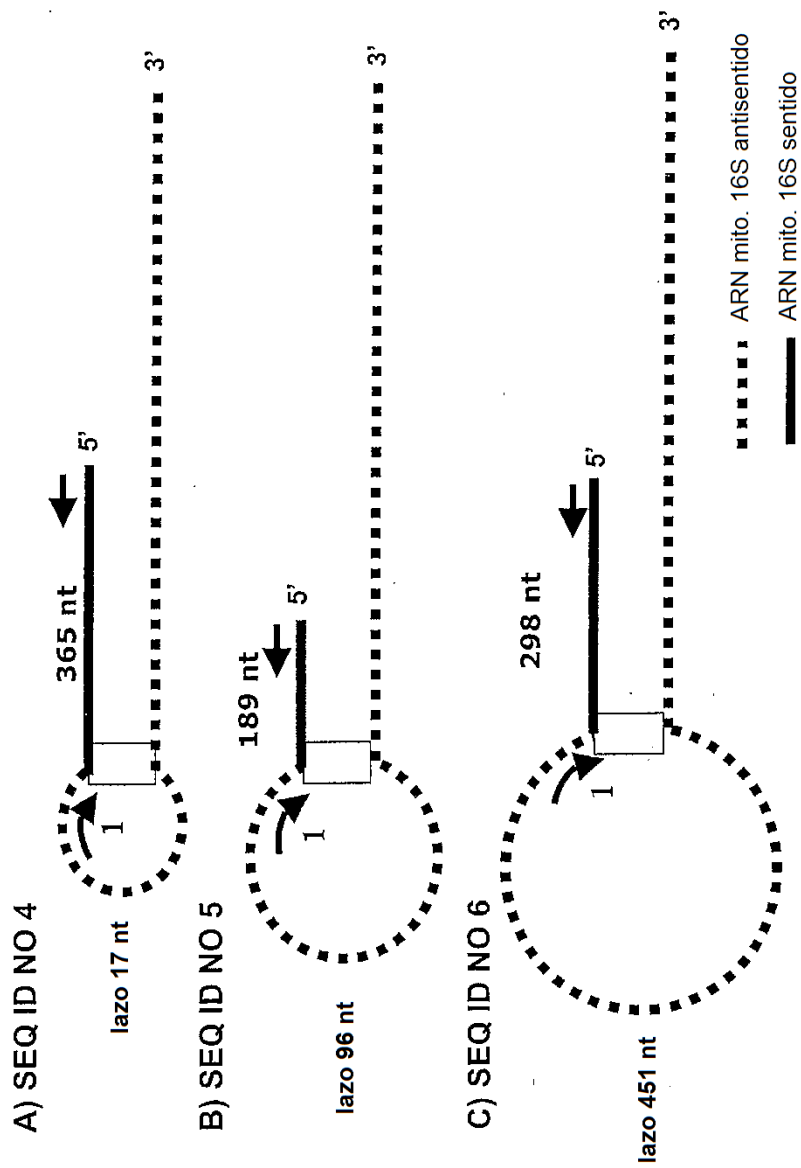


Fig. 3

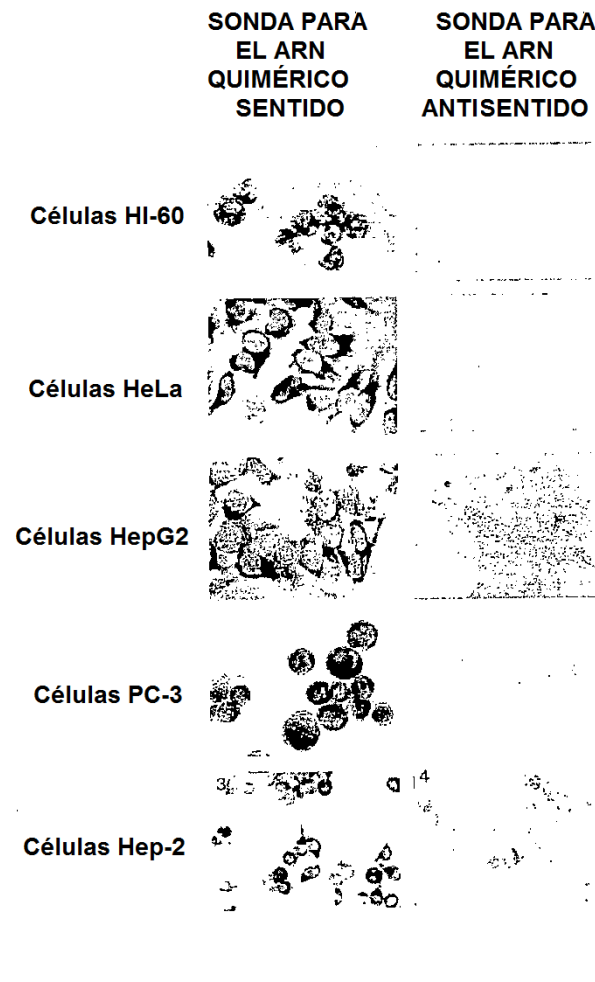


Fig. 4A

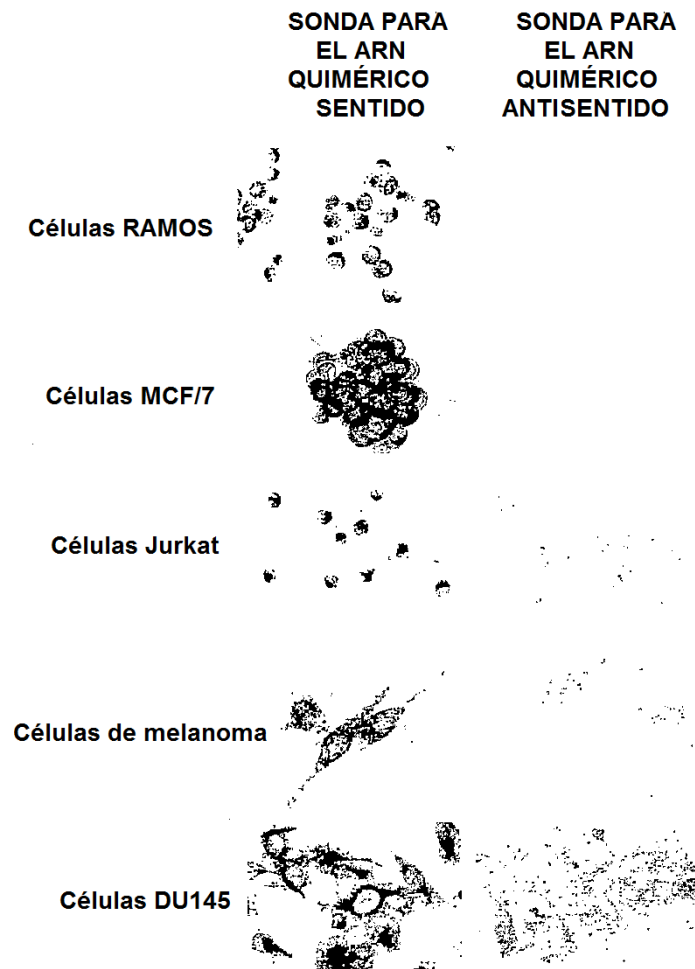


Fig. 4B

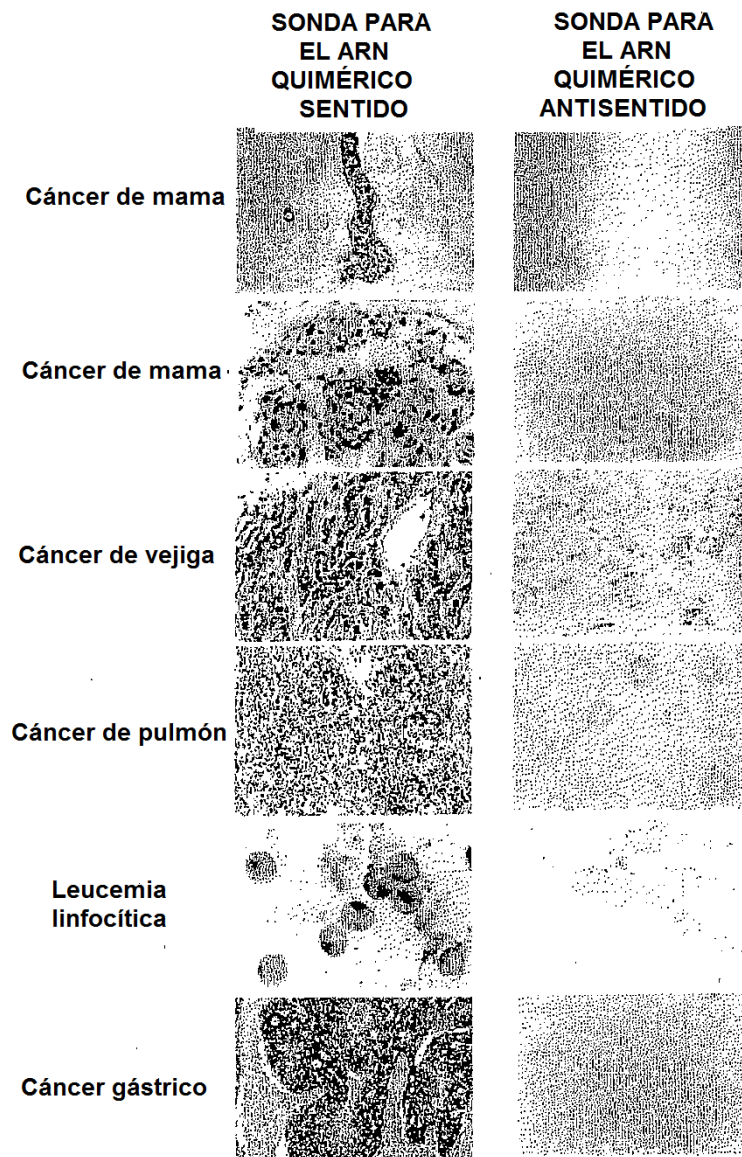


Fig. 5A

SONDA PARA EL ARN QUIMÉRICO
MITOCONDRIAL SENTIDO

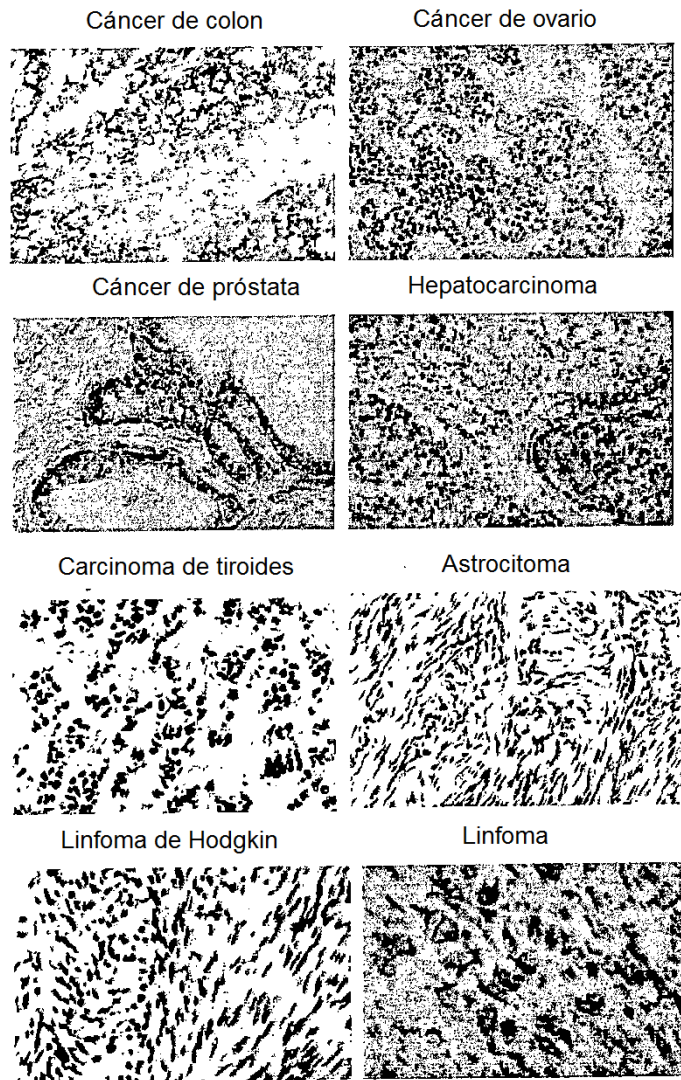


FIG. 5B

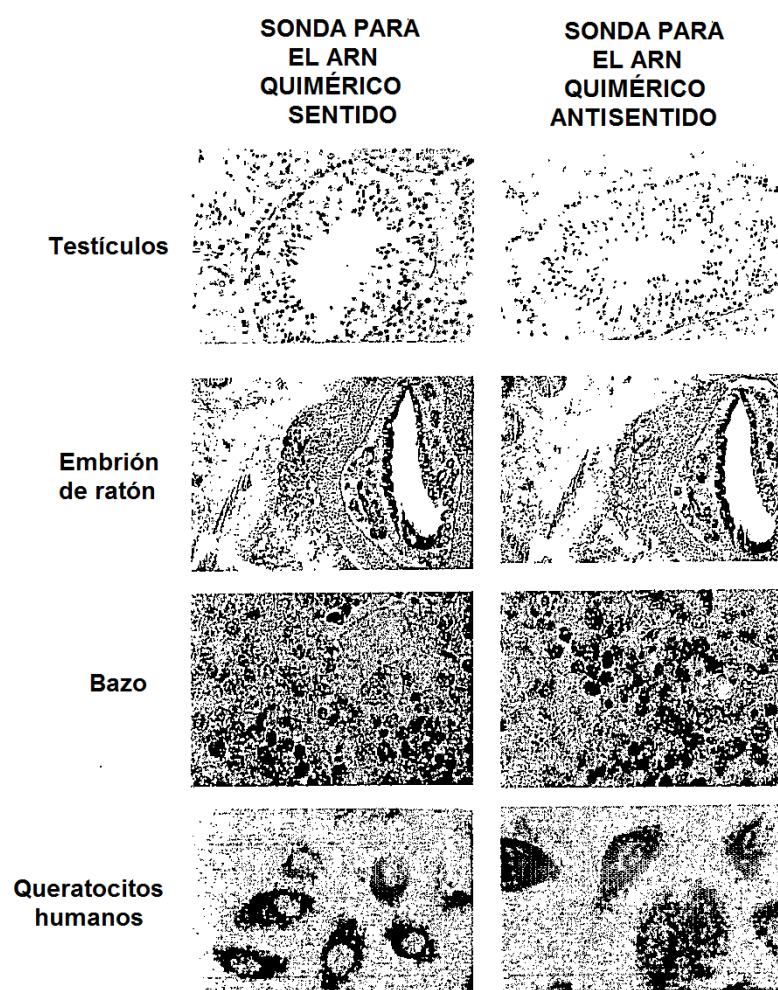


Fig. 6

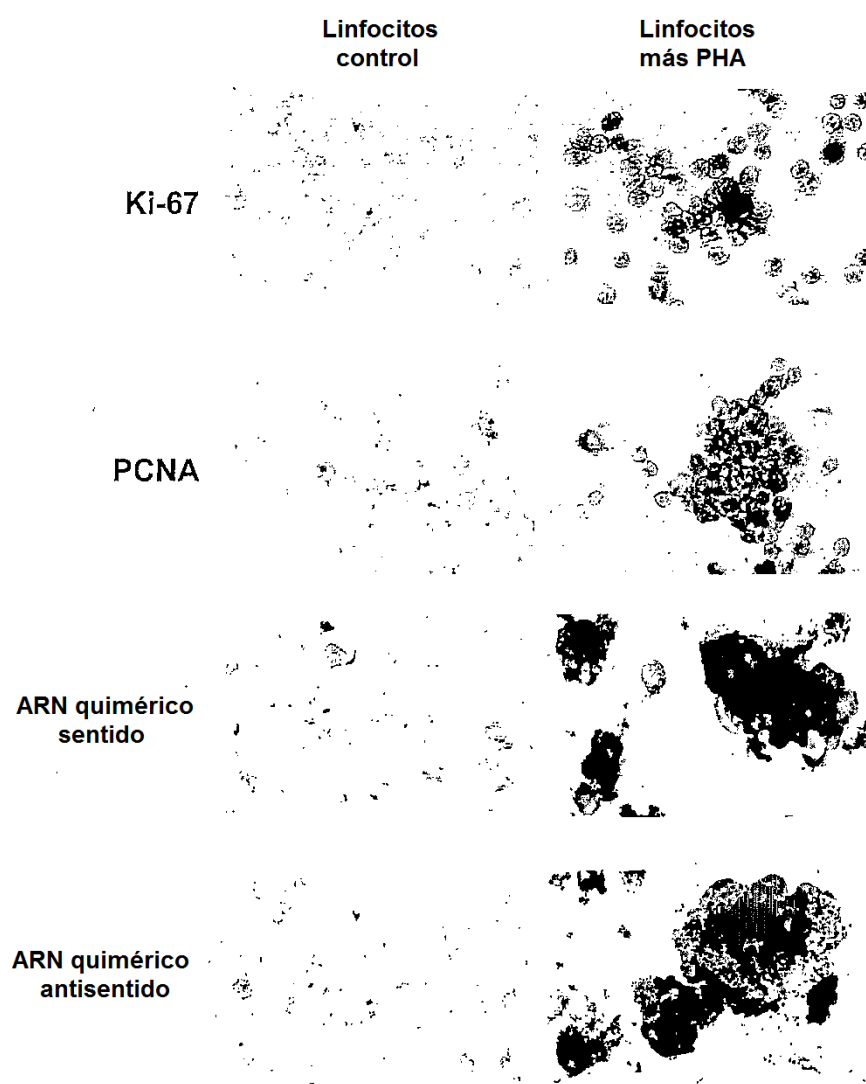


Fig. 7

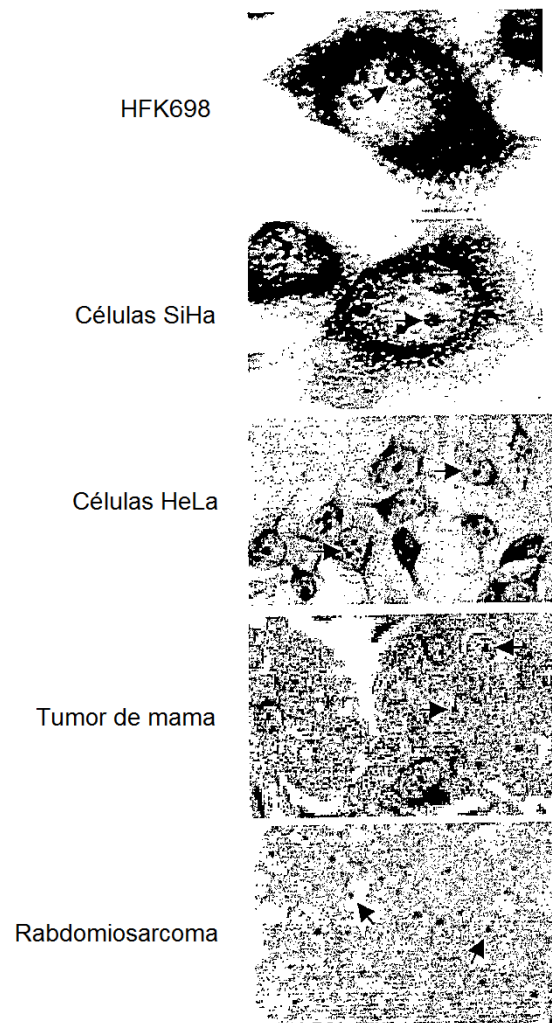


FIG. 8.

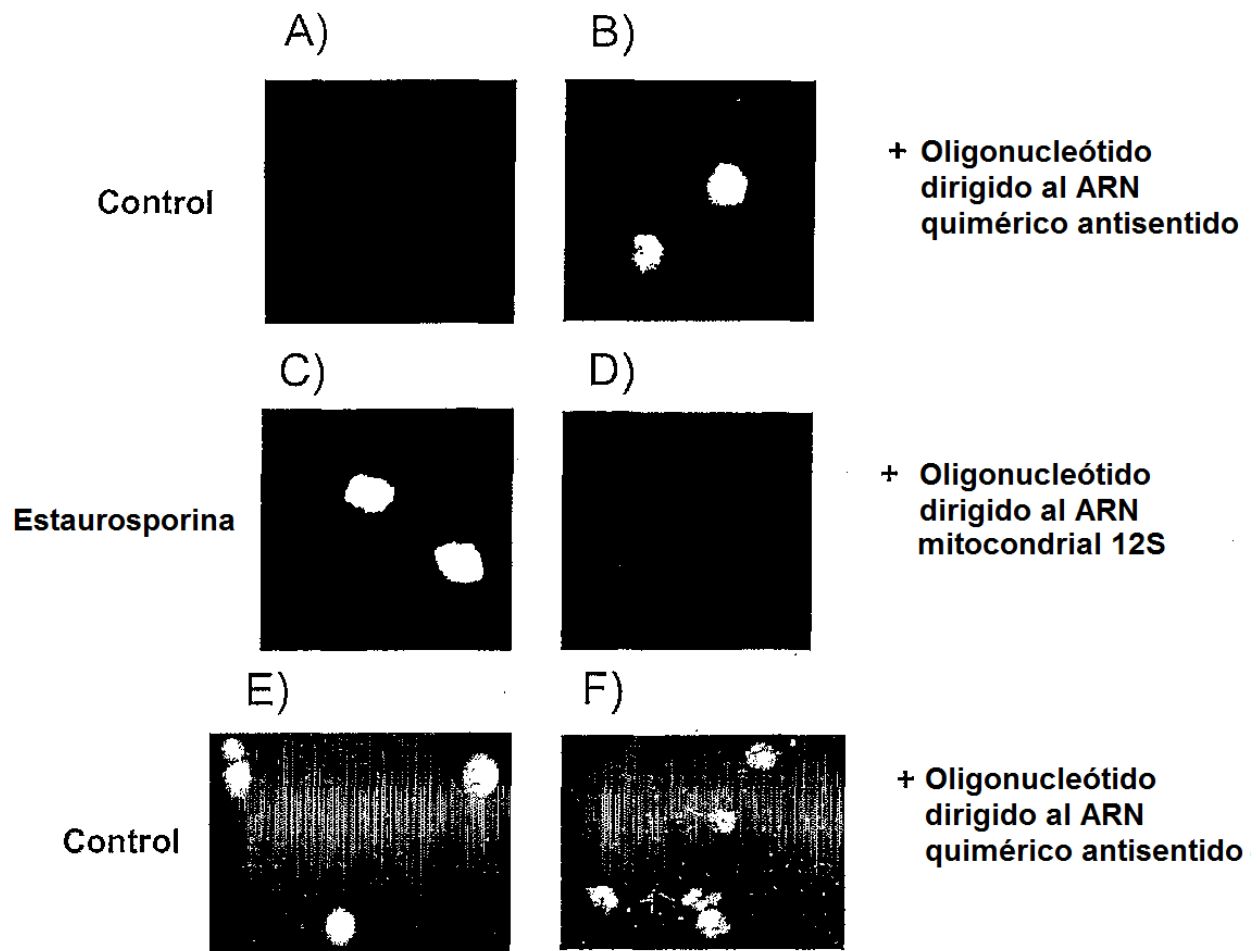


Fig. 9

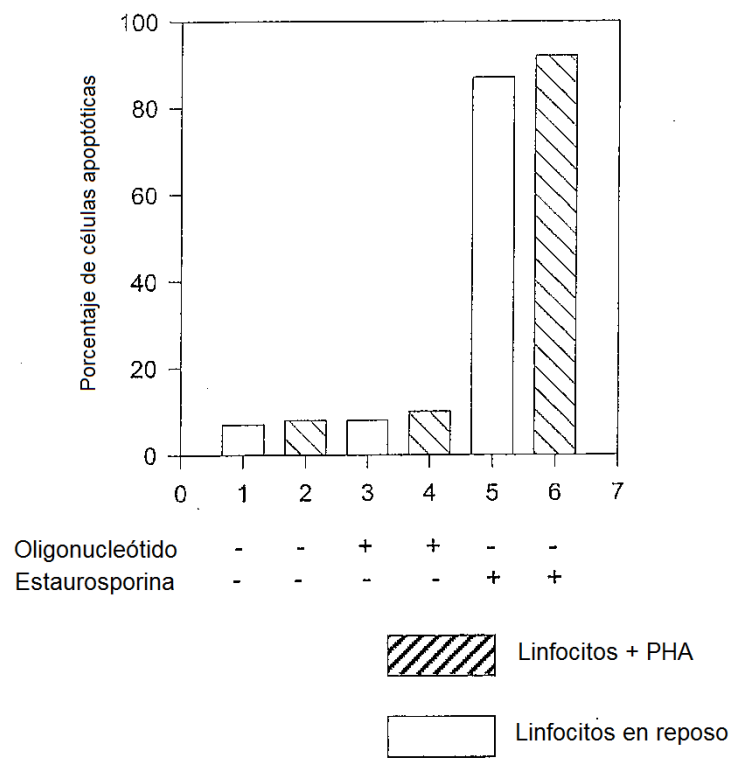


Fig. 10.