



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 326 118**

51 Int. Cl.:
C12N 15/11 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04025522 .6**
96 Fecha de presentación : **20.09.1994**
97 Número de publicación de la solicitud: **1584682**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **12.10.2005**

54 Título: **Regulación de la expresión del gen *bcl-2*.**

30 Prioridad: **20.09.1993 US 124256**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.10.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.10.2009

73 Titular/es:
**The Trustees of The University of Pennsylvania
Center for Technology Transfer
3700 Market Street, Suite 300
Philadelphia, Pennsylvania 19104-3147, US**

72 Inventor/es: **Reed, John, C.**

74 Agente: **Durán Moya, Carlos**

ES 2 326 118 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

Regulación de la expresión del gen *bcl-2*.

5 **En referencia a las subvenciones**

La investigación de esta solicitud de patente fue financiada en parte por los Institutos Nacionales de Salud, subvención CA 26380. El gobierno de los Estados Unidos posee ciertos derechos en la invención.

10 **Sector de la invención**

La presente invención se relaciona con el sector de los tratamientos del cáncer y más en particular al sector de los tratamientos del cáncer con oligómeros anticódigo.

15 **Datos de solicitudes relacionadas**

Esta solicitud es una continuación en parte del documento No. de Serie 07/840.716 presentado el 21 de febrero, 1992, que era una continuación en parte del documento No. de Serie 07/288.692 presentado el 22 de diciembre, 1988, que fue abandonado.

20 **Antecedentes de la invención**

Los enfoques actuales del tratamiento del cáncer sufren de ausencia de especificidad. La mayoría de los fármacos que se han desarrollado son productos naturales o derivados que, o bloquean las rutas enzimáticas o interactúan de manera aleatoria con el ADN. Debido a los bajos índices terapéuticos, la mayoría de los fármacos para el tratamiento de cáncer van acompañados de graves toxicidades que limitan la dosis. La administración de fármacos para tratar el cáncer destruye no sólo las células cancerosas sino también las células normales no cancerosas. Debido a estos efectos perjudiciales, se necesitan tratamientos que sean más específicos para las células cancerosas.

30 Se ha descubierto que una clase de genes, los oncogenes, juegan un papel importante en la transformación y mantenimiento del estado canceroso y que apagando estos genes, o inhibiendo sus efectos de alguna manera, se puede hacer retornar una célula a su fenotipo normal. El papel de los oncogenes en la etiología de muchos cánceres humanos ha sido reseñado en Bishop, "Oncogenes Celulares y Retrovirus" ("Cellular Oncogenes and Retroviruses") *Science*, 235:305-311 (1987). En muchos tipos de tumores humanos, incluyendo linfomas y leucemias, el gen humano *bcl-2* está sobreexpresado y puede estar asociado con tumorigenicidad (Tsujimoto y otros. Participación del gen *bcl-2* en el linfoma folicular humano (Involvement of the *bcl-2* gene in human follicular lymphoma) *Science* 228:1440-1443 (1985).

40 Los oligodesoxinucleótidos antisentido son un ejemplo de una herramienta terapéutica específica con el potencial para la ablación de la función de los oncogenes. Estos ADNs cortos (usualmente de aproximadamente 30 bases) sintéticos de cadena simple tienen una secuencia de bases complementaria al ARNm diana y forman un dúplex híbrido mediante el apareamiento de bases mediante enlace de hidrógeno. Esta hibridación se supone que evite la expresión del código del ARNm diana en su producto proteico y, de esta manera, impedir los efectos posteriores del producto proteico. Debido a que la secuencia de ARNm expresada por el gen se denomina secuencia en sentido, la secuencia complementaria se denomina secuencia antisentido. Bajo algunas circunstancias, la inhibición de ARNm podría ser más eficiente que la inhibición de sitio activo de un enzima, ya que una molécula de ARNm da lugar a múltiples copias de proteínas.

50 Los oligodesoxinucleótidos sintéticos complementarios al ARNm (antisentido) del oncogén *c-myc* se han utilizado para inhibir de manera específica la producción de la proteína *c-myc*, deteniendo, de esta manera, el crecimiento *in vitro* de células leucémicas humanas, Holt y otros, *Mol. Cell Biol.* 8:963-973 (1988) y Wickstrom y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:1028-1-32 (1988). Los oligodesoxinucleótidos también ha sido empleados como inhibidores específicos de retrovirus, incluyendo el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-I), Zamecnik y Stephenson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:280-284 (1978) y Zamecnik y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:4143-4146 (1986).

55 **Breve descripción de la invención**

La presente invención da a conocer oligómeros anticódigo y procedimientos de inhibición del crecimiento de células cancerosas. El crecimiento de células de linfoma o leucemia, que son tipos de linfocitos, se inhibe mediante los oligómeros anticódigo y procedimientos de la presente invención. Se da a conocer un oligómero anticódigo complementario, como mínimo, a una parte efectiva de la cadena en sentido de ARNm al gen *bcl-2* humano y las células se ponen en contacto, a continuación, con el oligómero anticódigo en una concentración suficiente para inhibir el crecimiento de células. Los métodos de la presente invención son adecuados para inhibir el crecimiento de células de linfoma/leucemia, que expresan el gen *bcl-2* humano y tienen translocación cromosomal t (14; 18), así como aquellas que expresan el gen *bcl-2* y no tienen translocación cromosomal t (14; 18).

Según realizaciones preferentes, el oligómero anticódigo es complementario sustancialmente a un sitio estratégico en la cadena en sentido del pre-ARNm. Un sitio estratégico preferente es el sitio de iniciación de la traducción de la

cadena codificadora de pre-ARNm. Sitios estratégicos alternativos incluyen sitios de codificación para empalme, transporte o degradación. El oligómero anticódigo en cuestión, ya sea en su forma “nativa” no modificada -oligonucleótido- o como un derivado, se pone en contacto con las células de linfoma o leucemia dianas. Para su uso terapéutico *in vivo*, es preferible un derivado del oligonucleótido “nativo”, tal como la forma fósforotioada, ya que se cree que estas formas son más resistentes a la degradación, a pesar del hecho de que se ha encontrado que los tiempos de respuesta a algunos análogos, tales como análogos fósforotioatos, son algo más lentos que los de la forma “nativa” del oligonucleótido.

Un oligómero anticódigo preferente, denominado en este documento TI-AS (oligómero anticódigo de iniciación de la traducción), es un oligodesoxinucleótido que se acopla al sitio de iniciación de la traducción de la cadena del ARNm codificadora del gen *bcl-2 humano* y es complementaria a esa región. Más preferentemente, este nucleótido comprende una porción TAC que es complementaria a la secuencia de iniciación ATG de la cadena codificadora del gen *bcl-2* y preferentemente comprende, además, porciones de flanco de dos hasta aproximadamente cien bases, más preferentemente de aproximadamente cinco hasta aproximadamente veinte bases, que son complementarias a las porciones de la cadena codificadora del gen *bcl-2* que flanquean dicha secuencia de iniciación. Se ha encontrado que el nucleótido TI-AS es efectivo en la inhibición del crecimiento de células diana tanto en presencia como en ausencia de suero.

Por consiguiente, un objetivo primario de la presente invención es proporcionar nuevos oligómeros anticódigo, que sean útiles en la inhibición del crecimiento de células cancerosas. La presente invención también incluye composiciones para la inhibición del crecimiento de células tumorales, cuya composición comprende el oligómero anticódigo de la presente invención junto con un portador farmacéuticamente aceptable.

Este y otros objetivos de la presente invención serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra gráficas de los efectos de la variación de las concentraciones de oligodesoxinucleótidos antisentido sobre la inhibición de la proliferación celular.

La figura 2 muestra gráficas de la dependencia de la concentración de inhibición de la proliferación celular por oligodesoxinucleótidos antisentido normales y fósforotioatos. Adiciones de oligodesoxinucleótidos a cultivos incluido TI-AS fósforotioato (○ y ○; dos experimentos por separado), TI-S fósforotioato (Δ) TI-AS normal (□) y TI-S normal (Δ).

La figura 3 muestra los resultados de la electroforesis en gel de seis oligonucleótidos antisentido que tienen como diana el sitio de iniciación de la traducción del ARNm de *bcl-2*.

La figura 4 muestra el grado de fragmentación del ADN que resulta del tratamiento con oligonucleótidos de las células RS11846. La figura 4(a) muestra el efecto de oligonucleótidos que tienen como diana el sitio de iniciación de la traducción. La figura 4(b) muestra el efecto de oligonucleótidos dirigidos contra la región 5'-cap del ARNm de *bcl-2*.

La figura 5 es una gráfica que muestra la dependencia de la concentración de la inhibición mediante un oligonucleótido antisentido que tiene como diana el sitio de iniciación de la traducción del ARNm de *bcl-2*.

Las figuras 6 (a) y (b) son gráficas que muestran los resultados del análisis de inmunofluorescencia de los niveles de proteína *bcl-2* en células tratadas con oligonucleótidos.

Las figuras 7 (a)-(d) son perfiles de FACS para células 697 antes y después del tratamiento con oligonucleótidos antisentido de *bcl-2*.

Las figuras 8 (a)-(c) muestran oligodesoxinucleótidos antisentido de *bcl-2* que producen reducciones específicas de secuencias en el ARNm de *bcl-2* y en la proteína *bcl-2* y que producen una sensibilidad aumentada de las células SU-DHL-4 a los fármacos quimioterapéuticos contra el cáncer.

La figura 9 demuestra los efectos diferenciales de los oligómeros antisentido de *bcl-2* sobre la quimiosensibilidad de las células 32D-*bcl-2* y 32D-BHRF-1.

La figura 10 (a-b) muestra la reducción de la quimiorresistencia de las células RS11846 a partir de la expresión antisentido de *bcl-2* inducible a partir de un plásmido de expresión.

La figura 11 muestra oligómeros metilfosfonato/fosfodiéster antisentido de *bcl-2* que inducen la muerte de las células de linfoma DOHH2.

La figura 12 muestra oligómeros quiméricos metilfosfonato (MP)/Fosfodiéster (PO) que inhiben el crecimiento de las células MCF-7 de cáncer de mama humano.

La figura 13 muestra la optimización de secuencias del oligómero antisentido de *bcl-2*.

Descripción detallada de la invención

Según la presente invención, los oligómeros anticódigo se dan a conocer para inhibir del crecimiento de células cancerosas, para aumentar la sensibilidad de las células cancerosas a los agentes quimioterapéuticos contra el cáncer, o para inducir la muerte de la célula cancerosa solos o en combinación con cualquiera, uno o más, de los agentes quimioterapéuticos contra el cáncer.

Definiciones

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “oligómeros anticódigo” significa oligonucleótidos anticódigo y análogos de los mismos y se refiere a la gama de especies químicas que reconocen secuencias de polinucleótidos diana mediante interacciones de enlaces de hidrógeno con las bases nucleotídicas de las secuencias dianas. Las secuencias diana pueden ser de ARN de simple y de doble cadena o ADN de simple o de doble cadena.

Los oligonucleótidos anticódigo y análogos de los mismos pueden ser ARN o ADN, o análogos de ARN o ADN, a los que se les hace referencia comúnmente como oligómeros antisentido u oligonucleótidos antisentido. Dichos análogos de ARN o ADN comprenden, sin constituir limitación, modificaciones 2'-O-alkilo azúcares, modificaciones en las cadenas principales metilfosfonadas, fósforotioadas, fósforoditioadas, formacetal, 3'-tioformacetal, sulfona, sulfamato y nitróxido, y análogos en los que las fracciones de las bases se han modificado. Además, los análogos de los oligómeros pueden ser polímeros en los que la fracción de azúcares ha sido modificada o reemplazada por otra fracción adecuada, dando como resultado polímeros que incluyen, sin constituir limitación, análogos de morfolino y análogos de ácidos nucleicos peptídicos (PNA)(Egholm y otros. Ácidos nucleicos peptídicos (PNA). Análogos de oligonucleótidos con una cadena principal peptídica aquiral, (1992).

Los análogos anticódigo pueden ser también mezclas de cualquiera de los tipos de oligonucleótidos análogos juntos o en combinación con ADN o ARN nativos. Al mismo tiempo, los oligonucleótidos y los análogos de los mismos pueden utilizarse solos o en combinación con uno o más oligonucleótidos adicionales o análogos de los mismos. Los oligonucleótidos pueden ser de una longitud desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 1.000 nucleótidos. Aunque los oligonucleótidos de 10 a 100 nucleótidos son útiles en la presente invención, el intervalo preferente de longitud de los oligonucleótidos es de alrededor de 15 hasta alrededor de 24 bases.

Los oligonucleótidos anticódigo y los análogos de los mismos también comprenden conjugados de los oligonucleótidos y de los análogos de los mismos. (John Goodchild, Conjugados de Oligonucleótidos y Oligonucleótidos Modificados: Una Revisión de su Síntesis y Propiedades, *Bioconjugate Chemistry*, Volumen 1 No. 3 Mayo/Junio (1990)). Dichos conjugados presentan propiedades para mejorar la absorción, farmacocinéticas y resistencia a las nucleasas del oligonucleótido, o la capacidad de mejorar la reticulación o la fragmentación de la secuencia diana mediante el oligonucleótido.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término “proliferación celular” se refiere al ciclo celular de velocidad de división celular. El término “crecimiento” tal como se utiliza en el presente documento, abarca tanto el número de células aumentado debido a una división celular más rápida y debido a velocidades más lentas de muerte celular.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión del gen bcl-2 se refiere a la producción de proteína bcl-2 a partir del gen bcl-2 humano; por ejemplo, la expresión reducida de la expresión del gen bcl-2 significa niveles reducidos de proteína bcl-2.

Tal como se utiliza en el presente documento, “sitios estratégicos” se definen como cualquier sitio en el que cuando se le unen las moléculas anticódigo reivindicadas o análogos de las mismas resulta en una inhibición de la expresión del gen bcl-2.

Tal como se utiliza en el presente documento, “porción de secuencia” es una porción de la secuencia de nucleótidos de un oligonucleótido de ARN. En contextos apropiados, “porción de secuencia” se puede referir a una porción de la secuencia de nucleótidos de un segmento de ADN u oligonucleótido de ADN.

La proliferación no controlada de células es un marcador para los tipos de células cancerosas o anormales. Las células normales no cancerosas se dividen de manera regular, a una frecuencia característica para el tipo de célula en particular. Cuando una célula ha sido transformada a un estado canceroso, la célula se divide y prolifera de manera descontrolada. La inhibición de la proliferación modula la división no controlada de la célula. La contención de la división celular a menudo correlaciona con un retorno al estado no canceroso.

Un gen humano denominado bcl-2 (linfoma de células B/leucemia-2) está implicado en la etiología de algunos tumores linfoides comunes, Croce y otros, “Bases Moleculares de la Neoplasia de células B y T humanas” en: *Avances en Oncología Viral*, 7:35-51, G. Klein (ed.), Nueva York: Raven Press, 1987. Se han encontrado altos niveles de expresión del gen bcl-2 humano en todos los linfomas con translocaciones cromosomales t (14;18) incluyendo la mayoría de linfomas de células B foliculares y muchos linfomas de células grandes no Hodgkin. También se han encontrado altos niveles de expresión del gen bcl-2 en ciertas leucemias que no tienen translocación cromosomal t (14;18), incluyendo la mayoría de los casos agudos de leucemia linfocítica crónica, muchas leucemias linfocíticas

del tipo de célula pre-B, neuroblastomas, carcinomas nasofaríngeos y muchos adenocarcinomas de la próstata, de mama y de colon. (Reed y otros, Expresión diferencial del protooncogén en neuroblastomas y otras líneas celulares tumorales humanas de origen neural. *Cancer Res.* 51:6529 (1991); Yunis y otros, Bcl-2 y otras alteraciones genómicas en el pronóstico de linfomas de células grandes. *New England J. Med.* 320:1047; Campos y otros, Alta expresión de la proteína bcl-2 en la leucemia mieloide aguda está asociada con una pobre respuesta a la quimioterapia. *Blood* 81: 3091-3096 (1993); McDonnell y otros, Expresión del protooncogén bcl-2 y su asociación con la aparición de cáncer de próstata independiente de andrógeno. *Cancer Res.* 52: 6940-6944 (1992); Lu Q-L y otros, Expresión del protooncogén bcl-2 en el carcinoma nasofaríngeo asociado al virus de Epstein Barr, *Int. J. Cancer* 53: 29-35 (1993); Bonner y otros, Protooncogén bcl-2 y el modelo de progresión del tumor epitelial de la mucosa gastrointestinal relacionado con secuencias morfológicas y moleculares propuestas, *Lab Invest.* 68:43A (1993)).

Aunque no se limita a la explicación siguiente, la presente invención explota mecanismos celulares que tienen que ver con la muerte de células normales. Debido a que la mayoría de los tipos de células tienen un tiempo de vida finito y están programadas para morir, la acumulación descontrolada de células puede también ser debida a un defecto en los mecanismos de muerte celular y más que a un aumento de la velocidad de división celular. El gen bcl-2 contribuye a la patogénesis del cáncer principalmente mediante la prolongación de la supervivencia celular en lugar de la aceleración de la división celular.

Oligómeros antisentido adecuados para utilizar en la presente invención incluyen oligómeros nucleotídicos que tienen de dos a doscientas bases nucleotídicas de longitud; más preferentemente de diez a cuarenta bases de longitud; lo más preferente veinte bases de longitud. Los oligonucleótidos se seleccionan preferentemente entre aquellos oligonucleótidos complementarios a sitios estratégicos a lo largo del pre-ARNm de bcl-2, tales como el sitio de iniciación de la traducción, sitios donadores y de empalme, o sitios para la transportación o degradación.

Bloqueando la traducción en dichos sitios estratégicos se evita la formación de un producto del gen bcl-2 funcional. Sin embargo, debe ser apreciado que cualquier combinación o subcombinación de oligómeros anticódigo, incluyendo oligonucleótidos complementarios o sustancialmente complementarios al pre-ARNm o ARNm de bcl-2 que inhiba la proliferación celular es adecuado para utilizar en la presente invención. Por ejemplo, oligodesoxinucleótidos complementarios a porciones de secuencia de tramos contiguos o no contiguos del ARN de bcl-2 pueden inhibir la proliferación celular y podrían, de esta manera, ser adecuados para utilizar en la presente invención.

También se puede apreciar que los oligómeros anticódigo adecuados para utilizar en la presente invención pueden también incluir oligonucleótidos que flanquean aquellos complementarios o sustancialmente complementarios a dichas porciones de secuencia como las estratégicas u otros sitios a lo largo del ARNm de bcl-2. Las porciones de secuencia flanqueadoras son preferentemente de dos hasta aproximadamente cien bases, más preferentemente de aproximadamente 5 hasta aproximadamente veinte bases de longitud. También es preferente que los oligómeros anticódigo sean complementarios a una porción de secuencia del pre-ARNm o ARNm que no se encuentre comúnmente en el pre-ARNm o ARNm de otros genes para minimizar la homología de los oligómeros anticódigo con las cadenas codificadoras del pre-ARNm o ARNm de otros genes.

Los oligodesoxinucleótidos antisentido, o complementarios, preferentes se enumeran en la tabla 1.

TABLA 1

Oligodesoxinucleótidos de bcl-2	
iniciación de la traducción	
antisentido (TI-AS)	3'...CCCTTCCTACCGCGTGCGAC...5'
bcl-2	5'...CTTTTCCTCTGGGAAGGATGGCGCACGCTGGGAGA...3'
donador de empalme	
antisentido (SD-AS)	3'...CCTCCGACCCATCCACGTAG...5'
bcl-2	5'...ACGGGGTAC...GGAGGCTGGGTAGGTGCATCTGGT...3'
aceptador de empalme	
antisentido (SA-AS)	3'...GTTGACGTCCTACGGAAACA...5'
bcl-2	5'...CCCCCAACTGCAGGATGCCTTTGTGGAAGTGTACGG...3'

Será apreciado por los expertos en el sector al que pertenece la presente invención, que los oligómeros anticódigo que tienen un número mayor o menor de nucleótidos sustituyentes o que se extiendan más a lo largo del ARNm de *bcl-2* en la dirección 3' o 5' que en las realizaciones preferentes, pero que también inhiban la proliferación celular, están también dentro del alcance de la presente invención.

Es preferente utilizar derivados modificados químicamente o análogos de los oligómeros anticódigo en la realización de la presente invención en lugar de oligodesoxinucleótidos “nativos” o no modificados. Los oligodesoxinucleótidos “nativos” pueden ser sintetizados convenientemente con un sintetizador de ADN utilizando química de fosforamida estándar. Derivados adecuados, y procedimientos para la preparación de los derivados, incluyen fósforotioato, Stein y otros, Nucl Acids Res., 16:3209-3221 (1998); metilfosfonato, Blake y otros, Biochemistry 24:6132-6138 (1985) y alfa-desoxinucleótidos, Morvan y otros, Nucl Acids Res., 14:5019-5032 (1986), 2'-O-metilribonucleósidos (Monia y otros, Evaluación de ribonucleótidos modificados en 2' que contienen desajustes en 2'-desoxi gaps como inhibidores antisentido de la expresión génica. J. Biol. Chem. 268:14514-14522(1993)) y derivados unidos de manera covalente tales como acridina, Asseline y otros, Proc Natl Acad Sci USA 81:3297-3201 (1984); alquilados (por ejemplo, N-2-clorocetilamina), Knorre y otros, Biochemie 67:783-789 (1985) y Vlassov y otros, Nucl. Acids Res 14:4065-4076 (1986); fenazina, Knorre y otros, arriba, y Vlassov y otros, arriba; 5-metil-N⁴-N⁴-etanocitosina, Webb y otros, Nucl. Acids Res. 14:7661-7674 (1986); ácido etilendiamina tetraacético-Fe (EDTA) y análogos, Boutorin y otros, FEBS Letter's 172:43-46 (1984); 5-glicilamido-1, 10-o-fenantroline, Chi-Hong y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. 83:7147-7151 (1986); y derivados del ácido dietiléntriamina pentaacético (DPTA), Chu y otros, Proc Natl. Acad. Sci. 82:963-967 (1985).

El oligómero anticódigo de la presente invención puede también estar combinado con un portador farmacéuticamente aceptable para la administración a un individuo o para administración *ex vivo*. Ejemplos de portadores farmacéuticamente adecuados son una variedad de lípidos catiónicos, que incluyen, sin constituir limitación, cloruro de N-(1-2-3-diililoxi)propil)-n,n,n-trimetilamonio (DOTMA) y diolilfosfotidiletanolamina (DOPE)]. Los liposomas son también portadores adecuados para los oligómeros anticódigo de la presente invención.

Los oligómeros anticódigo pueden ser administrados a pacientes a través de cualquier ruta efectiva, incluyendo la administración intravenosa, intramuscular, intratecal, intranasal, intraperitoneal, inyección subcutánea, inyección *in situ* y oral. La administración oral requiere recubrimientos entéricos para proteger las moléculas anticódigo reivindicadas y análogos de las mismas de la degradación a lo largo del tracto gastrointestinal. Los oligómeros anticódigo pueden estar mezclados con una cantidad de un portador o diluyente fisiológicamente aceptable, tales como una solución salina u otro líquido adecuado. Los oligómeros anticódigo adecuados pueden también estar combinados con liposomas u otros portadores destinados a proteger las moléculas anticódigo o análogos de las mismas de la degradación hasta que alcancen sus dianas y/o faciliten el movimiento de las moléculas anticódigo o análogos de las mismas a través de las barreras del tejido.

Los oligómeros anticódigo pueden también ser útiles para la extracción de la médula ósea *ex vivo*. Normalmente, las cantidades de agentes quimioterapéuticos convencionales contra el cáncer o fármacos y la irradiación que un paciente puede recibir están limitados por la toxicidad a la médula, es decir, anemia (fatiga, insuficiencia cardíaca), trombocitopenia (sangramiento), neutropenia (infección). Por lo tanto, para administrar concentraciones de fármaco suficientes e irradiación para eliminar totalmente el tumor, los médicos podrían destruir simultáneamente las células normales de la médula ósea del paciente que conduce a la muerte del paciente. Alternativamente, pueden extraerse grandes cantidades de médula ósea quirúrgicamente del paciente y almacenarlas *in Vitro*, mientras el paciente recibe el tratamiento agresivo convencional. A continuación, el paciente puede ser rescatado mediante reinfusión de sus propias células de médula ósea, pero sólo si a esta médula se le han “extraído” las células malignas residuales. Los oligómeros anticódigo reivindicados pueden ser utilizados para eliminar las células malignas residuales de la médula ósea.

Los oligómeros anticódigo son administrados en cantidades efectivas para inhibir el crecimiento de células cancerosas o neoplásicas. La cantidad real de cualquier oligómero anticódigo administrado dependerá de factores tales como el tipo de cáncer, la toxicidad del oligómero anticódigo para otras células del cuerpo, su velocidad de absorción por las células cancerosas y el peso y edad del individuo al que le será administrado el oligómero anticódigo. Debido a los inhibidores presentes en el suero humano que pueden interferir con la acción del oligómero anticódigo puede variar la cantidad efectiva del oligómero anticódigo para cada individuo.

Una dosis efectiva para el paciente puede ser determinada mediante métodos convencionales tales como aumentar de manera incrementada la dosis del oligómero anticódigo a partir de una cantidad inefectiva para inhibir la proliferación celular hasta una cantidad efectiva. Se espera que concentraciones expuestas a las células cancerosas en el intervalo de aproximadamente 0,001 micromolar hasta aproximadamente 100 micromolar serán efectivas para inhibir la proliferación celular.

Los oligómeros anticódigo son administrados al paciente, como mínimo, durante un tiempo suficiente para inhibir la proliferación de las células cancerosas. Los oligómeros anticódigo son administrados preferentemente a los pacientes a una frecuencia suficiente para mantener el nivel de oligómeros anticódigo en un nivel efectivo en las células cancerosas o alrededor de éstas. Para mantener el nivel efectivo, puede ser necesario administrar los oligómeros anticódigo varias veces al día, diariamente o, como mínimo, en intervalos frecuentes. Los oligómeros anticódigo son administrados hasta que las células cancerosas no puedan detectarse, o se hayan reducido a un número de manera que tratamientos adicionales no proporcionen una reducción significativa en el número, o las células se hayan redu-

cido hasta un número manejable mediante cirugía u otros tratamientos. El período de tiempo en que se administran los oligómeros anticódigo dependerá de factores tales como la velocidad de absorción del oligodesoxinucleótido en particular por las células cancerosas y el tiempo necesario para que las células respondan al oligodesoxinucleótido. *In vitro*, la inhibición máxima del crecimiento de células neoplásicas mediante oligómeros anticódigo “nativos” no modificados tiene lugar dos días después del inicio de los cultivos, mientras que los oligodesoxinucleótidos fósforotioatos requirieron de 4 a 7 días para lograr la inhibición máxima. *In vivo*, el tiempo necesario para la inhibición máxima de la proliferación celular puede ser más corto o más largo.

Los oligómeros anticódigo de la presente invención pueden ser administrados a pacientes como una combinación de dos o más secuencias de oligodesoxinucleótidos oligoméricos anticódigo diferentes o como un tipo individual de secuencia. Por ejemplo, TI-AS y SD-AS podrían ser administrados a un paciente o TI-AS solo.

También se cree que los oligómeros anticódigo de la presente invención pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades autoinmunes. Las enfermedades autoinmunes son aquellas enfermedades en el que el sistema inmune del cuerpo ha funcionado mal de alguna manera. La administración de oligómeros anticódigos de la presente invención a una persona que tiene una enfermedad autoinmune debe inhibir la proliferación de linfocitos que sobreexpresan *bcl-2*, que a su vez podría reducir los síntomas de la enfermedad autoinmune. Para utilizar en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, los oligómeros anticódigos pudieran ser administrados tal como se describe en este documento.

Ejemplos

Métodos generales

Los Ejemplos a continuación utilizan los siguientes protocolos:

A. Células y cultivos celulares. Las líneas celulares leucémicas humanas utilizadas para estos estudios fueron células de linfoma folicular RS11846, células de leucemia linfocítica aguda de células pre -B 697, células de leucemia linfocítica aguda de células T JURAT, tal como se describe en Tsujimoto y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:5214-5218 (1986) y Weiss y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 138:2169-2174 (1987). Se aislaron linfocitos de sangre periférica humana (PBL) a partir de sangre entera fresca, tal como se describe en Reed y otros, *J Immunol*, 134:314-319 (1985). Todas las células linfoides se cultivaron a 5×10^5 células/ml en medio RPMI suplementado con glutamina 1 mM, antibióticos, y tanto con suero fetal bovino (FSB) 5-10% (v:v), suero de ternero 5-10% (v:v) (ambos de Hyclone Laboratories), o suplemento concentrado HLI 1% (v:v) (Ventrex Laboratories) para los cultivos libres de suero. Las líneas celulares de fibroblastos murinos se añadieron a 10^3 células/cm² en medio DMEM conteniendo glutamina, antibióticos y FCS 5-10% (v:v). Las líneas celulares de fibroblastos fueron células NIH 3T3, células 3T3-B-alfa-S y células 3T3-B-alfa-AS. Estas dos últimas líneas celulares son células NIH 3T3 que expresan altos niveles de ADNc de *bcl-2*-alfa humano tanto en la orientación en sentido como antisentido, respectivamente, en virtud de la transfección estable con construcciones de vectores de expresión.

B. Medición del crecimiento celular. El crecimiento de las líneas celulares cultivadas en presencia o ausencia de oligómeros anticódigo se midió mediante dos métodos: conteo celular utilizando un hemocitómetro; y síntesis de ADN ensayando la incorporación de [³H]-timidina, esencialmente como se describe en Reed y otros, *J Immunol*, 134:314-319 (1985). Brevemente, las células se cultivaron en placas de microtitulación de fondo plano de 96 celdas (Falcon) a 0,2 ml/celda. En tiempos adecuados, las células se resuspendieron, se extrajeron 25 μ l de los cultivos para el conteo celular y este volumen fue reemplazado con 25 μ l de [³H]-timidina 20 UCi/ML (actividad específica 6,7 Ci/mmol) (New England Nuclear). A continuación, los cultivos de microtitulación fueron retornados a 37°C y 95% de aire: CO₂ atmosférico 5% durante 8 horas antes de romper las células en filtros de vidrio y determinar los niveles relativos de incorporación de [³H]-timidina en el ADN mediante conteo de centelleo. Los conteos celulares se realizaron en presencia de tinte azul tripán para determinar la concentración de células viables en los microcultivos por duplicado.

Los ensayos de reducción del tinte MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio]] se realizaron mediante el método de Tada y otros, *J Immunol. Methods* 93, 157 (1986) y se confirmó que estaban dentro del intervalo lineal del ensayo bajo las condiciones descritas en el presente documento. El número de células viables por celda fue extrapolado a partir de curvas estándar que fueron incluidas en cada ensayo y que consistieron en una serie de diluciones dobles seriadas de células SU-DHL-4 con crecimiento exponencial en medio HL-1, comenzando con 10^6 células/ml (0,2 ml/celda). Las muestras se ensayaron por triplicado y la DO600_{nm} para un blanco medio/reactivo se sustrajo de todos los valores antes de los cálculos.

C. Análisis de transferencia de ARN. El ARN total celular se aisló mediante un procedimiento de isotiocianato de guanidina/fenol, tal como se describe en Chomczynski y otros, *Analyt. Biochem.*, 162:156-159 (1987). La fracción poliadenilada se purificó mediante cromatografía de oligodesoxitimidina-celulosa, tal como se describe en Aviv y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69:1408-1412 (1972). Se fraccionaron por tamaño alícuotas de aproximadamente 5 μ g de ARNm en geles de agarosa 0,8%/formaldehído 6% y se transfirieron a membranas de nailon. Las transferencias fueron prehibridadas, hibridadas y lavadas exactamente como se describe en Reed y otros, *Mol. Cell. Biol.*, 5:3361-3366 (1985), utilizando tanto un ³²p-ADNc para el *bcl-2* humano, tal como se describe en Tsujimoto y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:5214-5218 (1986), o una sonda murina de *bcl-2* pMBCL5.4, tal como se describe en Negrini y otros, *Cell*, 49:455-463 (1987). Las transferencias se expusieron a películas Kodak XAR con pantallas intensificadoras

a -70°C durante 1-10 días. La elusión de las sondas ³²p-*bcl-2* de las membranas y la rehibridación con una sonda ³²p para beta-2-microglobulina de ratón constató cantidades casi equivalentes de ARNm para todas las muestras en las transferencias.

5 Ejemplo 1

Preparación de oligómeros anticódigo

10 Los oligodesoxinucleótidos normales y fósforotioatos se sintetizaron utilizando un sintetizador de ADN Applied Biosystems 308B y se purificaron mediante cromatografía de fase reversa HPLC (columna RPR-1), tal como se describe en Stein y otros, Nucl. Acids Res., 16:3209-3221 (1988). En algunos casos fue necesaria una purificación adicional de los oligodesoxinucleótidos mediante cromatografía C18-Sep-Pak (Waters Associates, Millipore, Inc.), tal como se describió anteriormente en Kern y otros, J. Clin. Invest., 81:237-244 (1988), para eliminar la actividad citotóxica no
15 específica. Los oligodesoxinucleótidos eluidos en acetonitrilo 30% se evaporaron hasta secar, se resuspendieron en tampón fosfato salino de Dulbecco o tampón solución salina de Hanks 1-2 mM (ambos de Gibco) y se almacenaron a -80°C en alícuotas pequeñas.

La tabla 1 muestra los oligodesoxinucleótidos sintetizados y su relación con la cadena en sentido del gen *bcl-2* humano. Se muestran las porciones de la secuencia de la cadena codificadora del gen *bcl-2* humano, que incluye el sitio de iniciación de la traducción (zona superior), el sitio donador de empalme (zona media), el sitio aceptador de empalme (zona inferior) y sitios seleccionados de manera empírica en la porción 5' no traducida del pre-ARN de *bcl-2*. Las secuencias consenso del codón de iniciación ATG, del donador de empalme GT y del aceptador de empalme AG están en recuadros.

25 Se presentan las secuencias de los oligodesoxinucleótidos sintetizados para estas investigaciones y se indica sus relaciones con los ARNm de *bcl-2*. El oligodesoxinucleótido TI-AS es antisentido en el sitio de iniciación de la traducción y TI-S es su versión en sentido complementario. SD-AS y SD-S son oligodesoxinucleótidos que tienen orientaciones antisentido y en sentido, respectivamente, en relación a la región donadora de empalme.

30 El oligodesoxinucleótido TI-AS se superpone al sitio de iniciación de la traducción predicho de los ARNm de *bcl-2* y es complementario (antisentido) a esta región. Como control, se sintetizó también la versión en sentido de este oligodesoxinucleótido de 20 bp, TI-S.

35 En un esfuerzo para bloquear el empalme de los ARNm de *bcl-2*, se sintetizó un oligodesoxinucleótido antisentido de 20 bp, SD-AS, que se superpone al sitio donador de empalme en los transcritos primarios de *bcl-2*. Además, se preparó un oligodesoxinucleótido en sentido complementario, SD-S, como se representa en la tabla 1. El gen humano *bcl-2* da lugar a varios transcritos mediante selecciones de sitios de empalme alternativos, ver Tsujimoto y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:5214-5218 (1986). La preponderancia de estos transcritos depende del empalme y
40 codifica una proteína de 26 kDa, *bcl-2*-alfa. Un transcripto menor, sin embargo, no se empalma y como consecuencia codifica una proteína de 22 kDa, *bcl-2*-beta. El oligodesoxinucleótido SD-AS puede, de esta manera, bloquear de manera potencial la maduración de la mayoría, pero no todos, los transcritos de *bcl-2*.

45 Ejemplo 2

Tratamiento del suero para las investigaciones in vitro de los oligodesoxinucleótidos antisentido normales

Debido a que los oligodesoxinucleótidos son sensibles a la degradación por nucleasas presentes en el suero, se
50 contrastó la eficacia del oligodesoxinucleótido TI-AS en suero fetal bovino (FBS) calentado durante 30 minutos a 56°C (el procedimiento habitual para inactivar el complemento de suero) con la eficacia de TI-AS en FBS calentado durante una hora a 68°C, una temperatura suficiente para la inactivación irreversible de muchas nucleasas. Se utilizó la línea celular de linfoma folicular RS11846. Las células RS11846 contienen una translocación cromosomal t(14;18) que no regula la expresión de *bcl-2*, dando como resultado la acumulación de altos niveles de ARNm de *bcl-2*, Tsujimoto y
55 otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:5214-5218 (1986).

Las células de linfoma folicular RS11846 se cultivaron en un medio que contiene suero fetal bovino (FBS) 5% (vol:vol) que había sido calentado a 56°C durante 0,5 horas o a 68°C durante una hora. El oligodesoxinucleótido normal TI-AS se añadió al inicio del cultivo, y se determinó la densidad de las células viables dos días después.

60 El oligodesoxinucleótido normal TI-AS fue más efectivo en el suero tratado a 68°C suprimiendo el crecimiento en el cultivo de estas células de linfoma. En todos los experimentos posteriores se utilizaron en los cultivos sueros calentados a 68°C durante una hora antes de utilizarlos. Este tratamiento no perjudicó la capacidad de apoyo al crecimiento de los sueros.

65

Ejemplo 3

Inhibición específica del crecimiento de células linfoides mediante oligodesoxinucleótidos normales antisentido

5 Oligodesoxinucleótidos normales antisentido dirigidos contra el sitio de iniciación de la traducción (TI-AS) y el sitio donador de empalme (SD-AS) de los transcritos de bcl-2 se ensayaron para determinar su capacidad para suprimir la proliferación de células linfoides normales y neoplásicas.

10 Se cultivaron células de linfoma folicular RS11846, células de leucemia de células T JUKRAT y linfocitos de sangre periférica recién aislados en medio que contiene FBS 10% (vol:vol) que había sido calentado a 68°C durante una hora. Se añadieron varias concentraciones de oligodesoxinucleótidos normales al inicio del cultivo, incluyendo: TI-AS, TI-S, SD-AS y SD-S. La síntesis de ADN relativa se midió en los cultivos después de 2-3 días mediante la incorporación de [³H] timidina. Los datos se calcularon como el porcentaje de los cultivos de control que contenían volúmenes de PBS o HBSS equivalentes a los cultivos tratados con oligodesoxinucleótidos y representan el promedio
15 ($\pm$ desviación estándar) de cultivos por duplicado.

Se obtuvieron datos similares mediante conteo de células que excluyeron la inhibición de timidina fría como una explicación para la supresión de la síntesis de ADN observada en los cultivos tratados con oligodesoxinucleótidos antisentido.

20 Como se muestra en la figura 1, tanto los oligodesoxinucleótidos TI-AS y SD-AS inhibieron el crecimiento de las células RS11846 de una manera dependiente de la concentración. El oligonucleótido SD-AS fue menos efectivo en la inhibición del crecimiento celular que el oligodesoxinucleótido TI-AS. Al contrario que estos oligodesoxinucleótidos antisentido, los oligodesoxinucleótidos en sentido (TI-S y SD-S) no fueron inhibitorios incluso a concentraciones de hasta 250 μ G/ml. Además, oligodesoxinucleótidos sin sentido (es decir, aquellos que tiene la misma composición de bases que los oligodesoxinucleótidos antisentido pero con secuencias mezcladas) también fallaron en suprimir la proliferación de las células RS11846. Por lo tanto, los datos indican que los oligodesoxinucleótidos antisentido pueden bloquear de manera específica la proliferación de estas células tumorales. Otras líneas celulares de leucemia que expresan el gen bcl-2 fueron también ensayadas para determinar la inhibición de su proliferación mediante los oligonucleótidos TI-AS y SD-AS. Como con las células de leucemia aguda linfocítica de células T JURKAT, se observó una disminución específica y dependiente de la concentración en el crecimiento de estas células leucémicas humanas en cultivos que contienen oligodesoxinucleótidos antisentido en todos los casos.

35 Se ha demostrado que la expresión de bcl-2 es inducida de manera transiente en linfocitos normales de sangre periférica humana (PBL) cuando estas células son estimuladas para proliferar, sugiriendo que este gen puede jugar un papel en la regulación del crecimiento de linfocitos normales, Reed y otros, Science 236:1295-1297 (1987). Por lo tanto, fue ensayada la capacidad de los oligodesoxinucleótidos antisentido para impedir el crecimiento de PBL cultivado con un anticuerpo monoclonal, OKT3 (Van den Elsen y otros, Nature 312:413-418 (1984)), que estimula su proliferación. PBL fue estimulado con 50 μ l de anticuerpo monoclonal purificado OKT3. Como se muestra en la figura 40 1, el oligodesoxinucleótido TI-AS suprimió de manera específica la proliferación de PBL de una manera dependiente de la concentración. Estos oligodesoxinucleótidos normales antisentido suprimieron de esta manera el crecimiento en cultivo de células leucémicas que expresan de manera constitutiva el gen bcl-2 Y de linfocitos normales donde la expresión de bcl-2 es inducible.

45 Ejemplo 4

Curso temporal de la inhibición mediante oligodesoxinucleótidos antisentido normales

50 Las cinéticas de inhibición mediante los oligodesoxinucleótidos antisentido fueron examinadas en cultivos de células de linfoma folicular RS11846 y de células de leucemia linfocítica aguda de células pre-B 697. Ambas líneas celulares neoplásicas B transcriben y acumulan ARNm de bcl-2 a altos niveles, Tsujimoto y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83: 5214-5218 (1986).

55 Las células de linfoma folicular RS11846 y de leucemia de células pre-B 697 se cultivaron en medio que contiene FBS 10% (vol:vol) tratado a 68°C y oligodesoxinucleótidos normales. Las células se cultivaron con 50 μ g/ml de TI-AS, 100 μ g/ml de SD-AS, 50 μ g/ml de TI-S (células RS11846) o 100 μ g/ml de SD-S (células 697), o PBS como control. La síntesis de ADN (kcpm/10⁵ células viables) y las densidades celulares (10⁵ células viables/ml) se midieron en varios momentos después del inicio de los cultivos.

60 Los oligodesoxinucleótidos antisentido normales inhibieron de una manera notable la síntesis de ADN medidos en los cultivos de estas células dentro de 24 horas. Las densidades celulares disminuidas fueron aparentes en estos cultivos a los dos días. Por lo tanto, los oligodesoxinucleótidos normales antisentido inhibieron rápidamente el crecimiento *in vitro* de las células leucémicas. La acción de estos oligodesoxinucleótidos antisentido fue específica, ya que los oligodesoxinucleótidos en sentido no impidieron la proliferación de estos cultivos. Aunque las viabilidades celulares a menudo disminuyeron durante los últimos días de cultivo no se observó un aumento en la muerte celular durante los primeros 1-2 días de cultivo con los oligodesoxinucleótidos antisentido, sugiriendo un mecanismo no citotóxico.

Ejemplo 5

Comparación de las diferentes preparaciones de suero

- 5 La inhibición de la proliferación de células leucémicas con oligodesoxinucleótidos antisentido puede variar mucho en dependencia del lote de suero utilizado en los cultivos.

10 Para determinar los efectos del suero en la inhibición de la proliferación, se midieron los niveles relativos de síntesis de ADN en cultivos de células de leucemia de células pre-B 697 dos días después de la adición de 200 μM del oligodesoxinucleótido normal TI-AS. Las células se cultivaron en medio suplementado con concentrado HL1 1% (vol:vol) (condición libre de medio), 5% (vol:vol) de dos lotes diferentes de suero de ternero (CS1 y CS2) o 5% (vol:vol) de los lotes de suero fetal bovino (FBS1 y FBS2). Todos los sueros fueron calentados a 68°C durante 1 hora antes de utilizarlos en los cultivos.

15 El oligodesoxinucleótido normal TI-AS inhibió notablemente la síntesis de ADN (92%) y la proliferación celular en cultivos libres de suero (HL1) de las células 697. Este oligodesoxinucleótido antisentido fue igualmente efectivo (94%) en cultivos que contienen 5% (v:v) de uno de los lotes de suero fetal bovino (FBS2). Por el contrario, la inhibición fue significativamente reducida en cultivos que contienen otras preparaciones de suero (CS1, CS2, FBS1). Se ha observado de manera general que los oligodesoxinucleótidos antisentido normales son menos efectivos en cultivos
20 suplementados con suero de ternero (CS que en aquellos que contienen suero fetal bovino (FBS).

Ejemplo 6

- 25 *Dependencia de la concentración de la inhibición mediante oligodesoxinucleótidos antisentido normales en cultivos libres de suero*

30 Se cultivaron células de leucemia de células pre-B 697 en medio tanto con HL1 concentrado 1% (vol:vol) (condiciones libres de suero o FBS2 5% (vol:vol) tratado a 68°C). Se midieron los niveles relativos de síntesis de ADN y densidades celulares después de dos días en los cultivos que contienen varias concentraciones de oligodesoxinucleótido normal TI-AS.

35 El oligodesoxinucleótido normal TI-AS fue inhibitorio a bajas concentraciones cuando se utilizaron cultivos libres de suero. A 100 μM , por ejemplo, no se observó inhibición de la proliferación celular en cultivos que contienen FBS2, mientras que los conteos celulares se redujeron en aproximadamente 75% en los cultivos libres de suero. Sin, embargo, a concentraciones mayores de oligodesoxinucleótidos antisentido (200-250 μM), la inhibición de la proliferación celular de 697 fue comparable en ambos tipos de cultivo. La eficacia incrementada de los oligodesoxinucleótidos normales en cultivos libres de suero fue específica, ya que el oligonucleótido en sentido (TI-S) no fue inhibitorio a las mismas concentraciones.
40

Ejemplo 7

- 45 *Oligodesoxinucleótidos antisentido fósforotioatos: curso temporal de la inhibición*

Para comparar la eficacia de oligodesoxinucleótidos fósforotioatos con los oligodesoxinucleótidos normales en relación a la inhibición del crecimiento de células leucémicas humanas, se cultivaron oligodesoxinucleótidos fósforotioatos con células de leucemia de células pre-B 697 y se midieron los efectos sobre la inhibición. Se cultivaron las células de leucemia de células pre-B 697 en medio libre de suero durante varios tiempos antes de medir la síntesis
50 de ADN (kcpm) y las densidades celulares (10^6 células/ml). Las células se sembraron a una concentración inicial tanto de $0,2 \times 10^5$ células/ml ó $0,5 \times 10^5$ células/ml. Las condiciones del cultivo fueron TI-AS fósforotioato 25 μM , TI-S fósforotioato 25 μM y cultivos de control tratados con HBSS.

55 Para evitar la variación experimental debido a las diferencias entre los lotes de suero, las células leucémicas 697 se cultivaron en condiciones libres de suero. Cuando se cultivaron a una concentración inicial de siembra de $0,5 \times 10^6$ células/ml, las células 697 alcanzaron una síntesis de ADN y densidades celulares máximas a los 4-5 días. La adición del oligodesoxinucleótido fósforotioato en sentido (TI-S) al inicio de estos cultivos tuvo poco efecto sobre el crecimiento de las células 697. Sin embargo, en cultivos de réplica que contienen antisentido fósforotioato (TI-AS) fue evidente alguna disminución en la síntesis de ADN a los dos días y fue máxima a los 4-5 días. La inhibición máxima
60 del crecimiento de células 697, como se determinó mediante conteos celulares, se observó a los 6 días después del inicio de los cultivos.

65 Cuando las células 697 se sembraron inicialmente a $0,2 \times 10^6$ células/ml, el oligodesoxinucleótido antisentido fósforotioato, TI-AS, dio lugar a sólo una ligera inhibición a los dos días, alcanzando una supresión máxima de la síntesis de ADN en estos cultivos en el día 7. Como con los oligodesoxinucleótidos normales, esta inhibición mediante los oligodesoxinucleótidos fósforotioatos parece estar mediada a través de mecanismos no citotóxicos, ya que las viabilidades celulares no disminuyeron hasta tarde en el curso del cultivo. Por lo tanto, comparado con los oligodesoxinucleótidos antisentido normales, los oligodesoxinucleótidos fósforotioatos tienen un inicio de acción más lento.

Ejemplo 8

Dependencia de la concentración de la inhibición mediante oligodesoxinucleótidos antisentido fósforotioatos de bcl-2

Se comparó la dependencia de la concentración de la inhibición mediante oligodesoxinucleótidos TI-AS normales y fósforotioatos en cultivos de células 697 en medio libre de suero como sigue.

Se cultivaron células 697 en medio libre de suero durante 3 días (oligodesoxinucleótidos normales) o 4 días (oligodesoxinucleótido fósforotioatos) antes de medir las densidades celulares y los niveles de síntesis de ADN. Las adiciones de oligodesoxinucleótidos a los cultivos incluyeron TI-AS fósforotioato, TI-S fósforotioato, TI-AS normal y TI-S normal.

Tal como se muestra en la figura 2, los oligodesoxinucleótidos fósforotioatos TI-AS inhibieron notablemente la proliferación de las células 697 a 25-50 μ M. Por el contrario, los oligodesoxinucleótidos normales TI-AS requirieron concentraciones de 5 a 10 veces más altas (aproximadamente 250 μ M) para provocar una supresión comparable de la proliferación celular de 697. La supresión mediante el oligodesoxinucleótido antisentido fósforotioato TI-AS fue específica en este intervalo de concentración, ya que su oligodesoxinucleótido en sentido complementario (TI-S) produjo una pequeña inhibición del crecimiento de 697 en réplicas de cultivos (ver figura 2).

Ejemplo 9

Influencia de la preparación de suero sobre la inhibición mediante oligodesoxinucleótidos antisentido fósforotioatos

Para definir con mayor precisión los efectos de la preparación de suero en la actividad inhibitoria de los oligodesoxinucleótido fósforotioatos, se añadió FBS a los cultivos de células de linfoma RS11846, que había sido calentado a 56°C durante 30 minutos, a 68°C durante 1 hora o que no se había calentado antes de la adición a los cultivos.

Las células RS11846 se cultivaron en medio que contiene concentrado HL1 1% (vol:vol) o FBS 5% (vol:vol) que había sido calentado a 56°C durante 0,5 horas, a 68°C durante 1 hora o que no se había calentado. Los conteos celulares se calcularon como el porcentaje relativo a los cultivos de control tratados con concentraciones equivalentes de oligodesoxinucleótido TI-S fósforotioato y representa el porcentaje promedio (la desviación estándar fue inferior al 10% para todos los valores) de cultivos por duplicado contados los días 4 y 5.

El oligodesoxinucleótido fósforotioato TI-AS inhibió completamente el crecimiento de las células RS11846 a 25 μ M, con una concentración inhibitoria máxima 50 estimada de aproximadamente 11 μ M. Por el contrario, este oligodesoxinucleótido fósforotioato fue considerablemente menos efectivo en cultivos que contienen FBS 5% (v:v). Además, el calentamiento de FBS antes de adicionarlo a los cultivos no mejoró de manera significativa la capacidad del oligodesoxinucleótido fósforotioato TI-AS para suprimir el crecimiento de las células de linfoma RS11846. A una concentración de oligodesoxinucleótido de 50 μ M, la inhibición de la proliferación de las células RS11846 no superó en ningún momento el 48% en los cultivos que contienen suero, a pesar del procedimiento de calentamiento utilizado.

Ejemplo 10

Influencia de la diálisis del suero sobre la inhibición mediante oligodesoxinucleótidos antisentido normales y fósforotioatos

Para caracterizar adicionalmente la naturaleza de las sustancias que interfieren en el suero, se realizaron experimentos en los que el suero calentado a 68°C se dializó de manera extensiva (peso molecular de corte = 3.500) antes de ser añadido a los cultivos de células de leucemia 697. Los experimentos se realizaron con oligodesoxinucleótido fósforotioato TI-AS 12,5 μ M Y 200 μ M del oligodesoxinucleótido normal TI-AS basado en oxígeno.

Las células 697 se cultivaron en medio que contiene concentrado HL1 1% (vol:vol)(A) o 5% (vol:vol) de tres lotes diferentes de FBS calentado a 68°C (B, C, D). Cada preparación de suero se contrastó antes (ND) y después (D) de diálisis extensiva. Se añadieron los oligodesoxinucleótidos TI-AS (+) y TI-S (-) a réplicas de cultivos a 200 μ M para los oligodesoxinucleótidos normales basados en oxígeno (OXY) y a 12,5 μ M para los oligodesoxinucleótidos fósforotioatos (PT). Se midieron los niveles relativos de síntesis de ADN (kcpm) después de 2 ó 4 días de cultivo para los oligodesoxinucleótidos normales y fósforotioatos, respectivamente.

Para los tres lotes diferentes de FBS ensayados, dos mostraron un pequeño cambio después de la diálisis en los cultivos que contienen tanto oligodesoxinucleótidos normales o fósforotioatos. Sin embargo, un lote de FBS pareció interferir menos con las actividades inhibitorias de estos oligodesoxinucleótidos antisentido después de la diálisis.

Ejemplo 11

Experimentos con células NIH 3T3 transfectadas de manera estable

Aunque los oligodesoxinucleótidos antisentido descritos en el presente documento estaban diseñados para bloquear la traducción del ARNm de *bcl-2* (TI-AS) y el empalme (SD-AS), los mecanismos moleculares de sus acciones no son aún conocidos. Para determinar el efecto de la formación de híbridos ARN-oligodesoxinucleótido en las células sobre la inhibición del crecimiento celular, independientemente de la secuencia de nucleótidos, se cultivaron células transformadas para expresar transcritos de ADNc de *bcl-2* humano con oligodesoxinucleótidos normales.

Se añadieron 200 μ M de oligodesoxinucleótidos TI-AS y TI-S a cultivos de células NIH 3T3 típicas y a cultivos de estas células que habían sido transfectados de manera estable con construcciones de expresión que producen altos niveles de transcritos de ADNc de *bcl-2* humano, ya sea por la cadena en sentido habitual (células 3T3-alfa-S) o antisentido (células 3T3-alfa-AS).

Para los ensayos de transferencia de ARN, se purificó ARNm poliadenilado de células NIH 3T3 y de células transfectadas de manera estable con construcciones de expresión que producen tanto ARNm recombinantes de *bcl-2*-alfa en sentido (3T3-alfa-S) o antisentido (3T3-alfa-AS), según el método de 13. Se sometieron aproximadamente 5 μ g de ARNm a análisis de transferencia de ARN, esencialmente tal como se describe en (16), utilizando tanto sondas de hibridación marcadas 3_2P derivadas de humanos o secuencias de *bcl-2* murinas.

Un autoradiograma resultante de un día de exposición de una transferencia que contiene ARNs de células 3T3 normales, de células 3T3-alfa-AS y de células 3T3-alfa-S mostró altos niveles relativos de transcritos recombinantes de *bcl-2* de 2,4 y 1,4 kbp producidos a partir de construcciones de expresión de *bcl-2* que fueron transfectadas en células 3T-alfa-AS y 3T3-alfa-S.

Una exposición de 10 días de una transferencia que contiene ARN de células 3T3 normales que fueron proliferadas o quiescentes en el momento de la colecta de ARN mostró niveles bajos pero detectables de transcritos de *bcl-2* murinos normales de 7,5 y 2,4 kbp presentes en las células 3T3 proliferantes.

El oligodesoxinucleótido TI-AS suprimió de manera específica la síntesis de ADN y la replicación celular en cultivos de células NIH 3T3 normales, lo que fue consistente con lo encontrado por otros que los fibroblastos no contienen transcritos de *bcl-2*, aunque a bajos niveles. El oligonucleótido TI-AS que se da a conocer en el presente documento es complementario a la secuencia de *bcl-2* de ratón en 18 de sus 20 bases (17), explicando su capacidad para suprimir el crecimiento de células NIH 3T3 murinas.

Las células NIH 3T3, las células 3T3-alfa-AS y las células 3T3-alfa-S se cultivaron en un medio que contiene suero tratado a 68°C 5% (vol:vol) y con HBSS, oligodesoxinucleótido normal TI-S 200 μ M, u oligodesoxinucleótido normal TI-AS 200 μ M. Los niveles relativos de síntesis de ADN(kcpm) se midieron en cultivos después de 3 días y reflejaron una incubación de 16 horas con 0,5 μ ci/celda de [3H]-timidina. Las densidades celulares, estimadas mediante microscopía de fases, fueron consistentes con la síntesis de ADN medida en los cultivos. El porcentaje de inhibición de la síntesis de ADN en los cultivos que contenían oligodesoxinucleótidos TI-AS se calculó con relación a los cultivos de control que contenían HBSS.

Como con las células NIH 3T3, el cultivo de las células 3T3-alfa-S (que producen transcritos en sentido de *bcl-2*-alfa humano) con oligodesoxinucleótidos TI-AS y TI-S demostró una supresión específica, ya que el oligodesoxinucleótidos TI-S en sentido no fue inhibitorio. Sin embargo, el nivel de inhibición de la proliferación celular del oligodesoxinucleótidos antisentido no fue tan grande en las células 3T3-alfa-S, tal como se esperaba, ya que estas células contienen más ARNm de *bcl-2*.

Añadiendo el oligodesoxinucleótido TI-S a los cultivos de las células 3T3-alfa-AS (producen transcritos antisentido de *bcl-2*) se ha descartado la inhibición del crecimiento celular a través de un mecanismo no específico que implica la formación del híbrido oligodesoxinucleótido-ARN. El oligodesoxinucleótido TI-S provocó una pequeña supresión de la proliferación de las células 3T3-alfa-AS, mientras que el oligodesoxinucleótido TI-AS fue notablemente inhibitorio en estas células. Datos similares se obtuvieron con oligodesoxinucleótidos fósforotioatos TI-AS y TI-S.

Ejemplo 12

Mediciones de la fragmentación de ADN como indicador de muerte celular programada mediada por oligodesoxinucleótidos antisentido de bcl-2 en células de linfoma humano

Se ensayaron los oligonucleótidos que tienen las secuencias mostradas en la tabla 2 para determinar su capacidad para inducir muerte celular programada (fragmentación de ADN) en la línea celular RS11846 de linfoma humano que contiene t(14:18). Los oligonucleótidos fueron todos fosfodiésteres y estaban dirigidos contra el sitio de iniciación de la traducción o la región 5'-cap de los pre-ARNm de *bcl-2*. Los oligodesoxinucleótidos de control incluyen a una versión en sentido de *bcl-2* (TI-S) de TI-AS (que tiene la SEQ ID NO: 7) y una versión codificada de TI-AS que tiene la misma composición de bases, pero con un orden de nucleótidos mezclado.

ES 2 326 118 T3

TABLA 2

	SECUENCIA	SEQ ID NO:
5	CGCGTGCGAC CCTCTTG	8
	TACCGCGTGC GACCCTC	9
	CCTTCCTACC GCGTGCG	11
10	GACCCTTCCT ACCGCGT	12
	GGAGACCCTT CCTACCG	13
	GCGGCGGCAG CGCGG	14
15	CGGCGGGGCG ACGGA	15
	CGGGAGCGCG GCGGGC	16

Las células RS11846 se adaptaron a crecer en el medio HL1 con 1% de FCS sus ADN marcados metabólicamente mediante la adición a los cultivos de I¹²⁵-desoxiuridina durante tres horas. A continuación, las células marcadas se lavaron vigorosamente y se cultivaron durante dos días en presencia de varios oligonucleótidos a 50 AM. A continuación, las células fueron recuperadas a partir de cultivos de 200 µL mediante centrifugación y se rompieron en un tampón hipotónico conteniendo EDTA 10 mM y 14 Triton X100. Después de centrifugar a 16.000 xg para precipitar el ADN genómico no fragmentado, la fracción de sobrenadante conteniendo el ADN fragmentado fue extraída con fenol/cloroformo y precipitada con etanol. A continuación, este ADN fue sometido a electroforesis en un gel de agarosa al 1,5% y se transfirió a membranas de nailon para autoradiografía.

Los resultados de dos experimentos se muestran en las figuras 3 y 4. Fueron ensayados los seis oligonucleótidos antisentido de *bcl-2* dirigidos a la vecindad del sitio ATG de iniciación de la traducción en los ARNm de *bcl-2*. "C-Oligo-2" se refiere a un oligonucleótido con 4 errores de apareamiento propuestos. "U" indica células de control no tratadas. La figura 4 muestra los resultados para los oligonucleótidos mostrados en la figura 3. "Sc20" se refiere a un 20 mer con la misma composición de bases que TI-AS, pero con la secuencia mezclada. La figura 4 (b) muestra los resultados para tres oligonucleótidos dirigidos contra los 5'-cap del ARNm del *bcl-2*. Los números hacen referencia a la distancia de estos oligómeros desde el sitio ATG de iniciación de la traducción.

La presencia de una escalera de fragmentos de ADN (tamaño de la unidad de aproximadamente 200 bp) es indicativa de muerte celular programada. A 50 µM, TI-AS provocó una pequeña fragmentación de ADN, mientras que los oligonucleótidos que tienen la secuencia SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 y uno de los oligonucleótidos 5'-cap (SEQ ID NO: 14) dieron lugar a una pronunciada fragmentación de ADN.

Ejemplo 13

Inhibición dependiente de la concentración mediante oligodesoxinucleótidos fosfodiester antisentido en cultivos libres de suero

Cultivos

Células 697 de leucemia de células pre-B se cultivaron en medio concentrado HL-1 al 1% (vol:vol) (condiciones libre de suero [o] o con suero tratado a 68°C al 3% (vol:vol)(FBS2)[___], ver figura 5. Se muestran las densidades celulares medidas después de dos días en cultivos que contienen varias concentraciones de oligodesoxinucleótido fosfodiester TI-AS. Los datos se muestran como porcentajes relativos a cultivos de control tratados con un oligonucleótido en sentido y reflejan el promedio ± desviación estándar de muestras por duplicado.

Ejemplo 14

Análisis de inmunofluorescencia de los niveles de proteína bcl-2 en células 697 tratadas con oligodesoxinucleótidos

Para los estudios con oligodesoxinucleótidos, las células 697 0,25x10⁴ (para fósforotioato) ó 0,5x10⁵ (para oligodesoxinucleótidos normales), se cultivaron en 1 ml de medio libre de suero HL-1 en placas de cultivo de 24 celdas (Linbro. Flow Lab, Inc.). Después de dos días (para los normales) o 4 días (para los fósforotioatos), se recuperaron las células de los cultivos, se lavaron una vez en [PBS, pH 7,4 (Gibco) - 0,1% de albúmina de suero bovino - azida sódica 0,1%] y se fijaron durante 5-10 minutos en hielo en una solución de paraformaldehído/PBS. A continuación, las células se lavaron una vez en PBS y se incubaron en 1 ml de metanol absoluto a 20°C durante 10 minutos. Después de lavar una vez en PBS-A, las células se resuspendieron in PBC conteniendo Triton X-100 al 0,05% durante 3 minutos en hielo, se lavaron en PBS-A y se prebloquearon durante 30 minutos a 4°C en PBS con suero de cabra inactivado por calor al 10% (v/v).

Para la adición del primer anticuerpo, las células prebloqueadas se resuspendieron en 100 μ l de PBS-G (PBS - suero de cabra 1% - azida sódica 0,1%) antes de hacer alícuotas de 50 μ l en tubos por separado que contenían 1 μ l de anticuerpo BCL2 (Halder y otros, Nature (Londres), 342:195-197 (1989)) o IgG normal de conejo purificada por afinidad de control (Cappel 6012-0080) y se incubaron durante 1 hora en hielo. El anticuerpo BCL2 utilizado para estos estudios se preparó en conejos utilizando un péptido sintético que se corresponde con los aminoácidos (98-114) de la proteína BCL2 y fue purificado por afinidad mediante cromatografía de proteína-A Sepharose y utilizado a aproximadamente 1 mg/ml. A continuación, las células fueron lavadas en PBS-A e incubadas en 0,5-1,0 ml de PBS-A durante 15-20 minutos en hielo para permitir la difusión del anticuerpo no específico asociado a células antes de resuspender las células en 100 μ l de PBS-G conteniendo 5 μ g de IgG anti-conejo biotinilado SCAT (BAIOOO; Vector Labs) durante 30 minutos. Después de lavar una vez e incubar durante 15 minutos en PBS-A, las células fueron resuspendidas finalmente en PBS-A conteniendo 2 μ g de avidina conjugada con FITC (Vector Labs A2011) durante 20 minutos y lavadas tres veces en PBS-A antes de analizar con un Orto citofluorógrafo 50-H conectado a un sistema Orto 2150 de manejo de datos. La especificidad del método para detectar la proteína BCL2 se confirmó mediante microscopía de inmunofluorescencia (que muestra competición de péptidos citosólicos teñidos y estudios de líneas celulares que expresan varios niveles de ARNm de BCL2 y proteínas a través de manipulaciones de transferencia genética).

Para las mediciones de la expresión del antígeno de superficie HLA-DR se utilizó un método indirecto de ensayo inmunofluorescente (Reed y otros, J. Immunol. 134:1631-1639 (1985)) que implica la incubación de células viables con un anticuerpo monoclonal murino anti-HLA-DR (IgG2a)(Becton-Dickinson 7360) o un anticuerpo de control negativo, R3-367 (IgG2a), seguido de IgG anti-ratón SCAT conjugado con FITC (Cappel 1711-0081). Las células se fijaron en paraformaldehído/PBS al 1% antes del análisis de FACS.

Las células 697 fueron cultivadas durante 2 días (PO) ó 4 días (PS) con varios oligonucleótidos. En la figura 6, las columnas en negro muestran los resultados con un oligonucleótido en sentido y las columnas rayadas con un oligonucleótido antisentido TI-AS. Las células fueron marcadas con antisuero anti-*bcl-2* y analizadas mediante FACS. Los datos se expresan como porcentajes relativos al promedio de fluorescencia obtenido con células 697 no tratadas.

La figura 7 muestra los resultados de FACS típicos obtenidos para 697 células antes y después del tratamiento con 100 μ M de oligonucleótidos PO *bcl-2* antisentido. A: células 697 no tratadas marcadas con antisuero anti- *bcl-2* (área rayada) o control de suero normal de conejo (área blanca); B: células 697 no tratadas marcadas con anticuerpo anti-HLA-DR (área rayada) o un anticuerpo de control negativo (área blanca); C: células 697 cultivadas durante 2 días con oligodesoxinucleótidos TI-AS de *bcl-2* normal (área blanca) o TI-AS (área rayada) y marcados con anticuerpo anti-*bcl-2*; D: células 697 cultivadas con oligodesoxinucleótidos TI-AS y TI-S (como en C), pero marcados con anticuerpo anti-HLA-DR.

Como se muestra en las figuras 6 (a) y (b), los oligonucleótidos antisentido de *bcl-2* PO y PS produjeron reducciones específicas dependientes de la concentración en los niveles de proteínas de *bcl-2*, sin alterar los niveles de expresión HLA-DR (figura 7) y otros antígenos de control. Por ejemplo, a 150 μ M, el oligodesoxinucleótido antisentido PO provocó una reducción de aproximadamente 75-95% en la fluorescencia de *bcl-2*, mientras que el oligodesoxinucleótido en sentido de control disminuyó los niveles de proteína *bcl-2* sólo en 10-20% (figura 6 (a)). De manera similar, el cultivo de células 697 durante 4 días con el oligodesoxinucleótido antisentido a 25 μ M provocó una reducción en un 70% de la fluorescencia de *bcl-2*. En comparación, el oligodesoxinucleótido en sentido PS TI-AS inhibió los niveles de proteína *bcl-2* sólo en aproximadamente 15%, tal como fue medido mediante este ensayo (figura 6 (b)).

Significado

En los oligodesoxinucleótidos fósforotioatos, uno de los átomos de oxígeno no enlazado en cada enlace de fosfato internucleótido es reemplazado con un átomo de azufre. Esta modificación hace a los oligodesoxinucleótidos fósforotioatos extremadamente resistentes a la escisión por nucleasas, Stein y otros, Nucl. Acids Res., 16:3209-3221 (1988). A pesar de la sustitución de un átomo de azufre por un oxígeno, los oligodesoxinucleótidos fósforotioatos mantienen una buena solubilidad en soluciones acuosas; hibridan bien, aunque con alguna disminución en la temperatura de fusión de los oligodesoxinucleótidos ARN dobles; y son convenientemente sintetizados mediante el método ampliamente utilizado de síntesis automática de oligodesoxinucleótidos con fósfordiamiditas.

Se ha descubierto que los oligodesoxinucleótidos *bcl-2* antisentido fósforotioatos son inhibidores más potentes del crecimiento de células leucémicas que sus contrapartes normales basadas en oxígeno. Cuando se ensayó bajo condiciones libres de suero, estos oligodesoxinucleótidos redujeron la proliferación celular a la mitad a concentraciones de aproximadamente 15-23 μ M, mientras que el oligodesoxinucleótido normal logró un 50% de inhibición a 125-250 μ M. Este descubrimiento puede ser explicado por la reducida sensibilidad de los oligodesoxinucleótidos fósforotioatos a las nucleasas celulares, o se le puede atribuir a otros mecanismos. Por ejemplo, los ARNm hibridados con oligodesoxinucleótidos fósforotioatos pueden experimentar una degradación intensificada a través de un mecanismo que implica una actividad ARNasa similar a H.

A pesar de su actividad inhibitoria incrementada, los oligodesoxinucleótidos antisentido fósforotioatos mantienen su especificidad a una secuencia. En las concentraciones ensayadas (menos de 25 μ M), las versiones en sentido de estos oligodesoxinucleótidos tuvieron un pequeño efecto sobre el crecimiento de células leucémicas. Tanto los oligo-

desoxinucleótidos antisentido normales como los fósforotioatos mostraron suprimir inicialmente la proliferación de células leucémicas a través de mecanismos no citotóxicos. Durante los primeros días de cultivo, la replicación celular fue inhibida sin un aumento concomitante de la muerte celular. Sin embargo, más tarde en estos cultivos (días 4-5 para oligodesoxinucleótidos normales, días 6-8 para los fósforotioatos) disminuyeron las viabilidades celulares.

La comparación de las cinéticas de inhibición de los oligodesoxinucleótidos normales y fósforotioatos demostró que los últimos compuestos tienen un inicio de acción más lento. La máxima inhibición de la proliferación de células leucémicas mediante oligodesoxinucleótidos antisentido normales tuvo lugar dos días después de la iniciación de los cultivos, mientras que los oligodesoxinucleótidos fósforotioatos requirieron de 4 a 7 días para lograr la inhibición máxima.

La utilidad de los oligómeros antisentido en la inhibición de células humanas de linfoma/leucemia y otros tipos de células cancerosas que expresan el gen *bcl-2* se ha mostrado en los ejemplos de este documento. Oligodesoxinucleótidos antisentido complementarios, como mínimo, a una porción efectiva de ARNm del gen *bcl-2* humano se ha encontrado que inhiben el crecimiento de células RS11846 de linfoma folicular humano con translocación cromosomal t(14; 18) y alta expresión de *bcl-2*, células 697 de leucemia humana pre células B, (alta expresión de *bcl-2*), células JURKAT de leucemia linfocítica humana aguda (expresión de *bcl-2* media), linfocitos humanos normales (expresión de *bcl-2* media) y fibroblastos murinos (baja expresión de *bcl-2*). Aunque los reactivos antisentido de *bcl-2* pueden suprimir el crecimiento de muchos tipos de células, las células de linfoma t(14; 18) y de leucemia parecen ser las sensibles, permitiendo la inhibición específica de células malignas.

Como se demuestra en los siguientes Ejemplos, una variedad de ADNs análogos pueden ser empleados en la presente invención. Por ejemplo, fósforotioatos, metilfosfonados y mezclas de oligómeros que contienen combinaciones de fosfodiésteres y nucleósidos fósforotioatos o metilfosfonados. Debe entenderse que los ARN análogos pueden ser también empleados en la presente invención.

Ejemplo 15

Oligómeros antisentido Metilfosfonato (MP)/Fosfodiéster (PO) de bcl-2 inducen la muerte de las células de linfoma DoHH2

El propósito de este estudio fue determinar la eficacia de varios análogos de los oligómeros anticódigo para inhibir la supervivencia de células de linfoma.

DoHH2 es una línea celular de linfoma humano que contiene una translocación t(14;18) que activa el gen *bcl-2*. Las células DoHH2 se cultivaron durante 3 días sin oligómeros o en presencia de varias concentraciones de oligómeros Metilfosfonato (MP)/Fosfodiéster (PO) antisentido (AS) y mezclados (SC) durante 3 días. La viabilidad celular se evaluó mediante exclusiones con tinte azul de tripano y los datos expresados como porcentaje relativo a las células DoHH2 cultivadas sin oligómeros. Los oligómeros MP/PO fueron 18-mero dirigidos contra los primeros 6 codones del marco de lectura abierto de *bcl-2*, en el que 5 uniones internas fueron fosfodiéster y los nucleósidos que flanquean fueron metilfosfonatos.

Los resultados indican que estos oligómeros anticódigo análogos son inhibidores potentes y específicos de la supervivencia de las células de linfoma.

Ejemplo 16

Oligómeros quiméricos Metilfosfonato (MP)/Fosfodiéster (PO) inhiben el crecimiento de células de cáncer de mama humanas MCF-7

El propósito de este estudio fue determinar la eficacia de los análogos del oligómero anticódigo reivindicado para inhibir la supervivencia de células tumorales sólidas que expresan altos niveles de *bcl-2*.

MCF-7 es una línea celular de adenocarcinoma de mama humano que contiene niveles relativamente altos de proteína *bcl-2*. Las células se cultivaron a 4.000 células por pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos en presencia o ausencia de oligómeros MP/MO. A continuación, el número relativo de células por pocillo fue estimado mediante ensayo de MTT, basado en una curva estándar preparada utilizando células MCF-7 no tratadas recién sembradas. Los oligómeros MP/PO antisentido (AS) y mezclados (SC) fueron los mismos que los descritos en el ejemplo 15. Los datos representan el promedio $\pm$ desviación estándar para las determinaciones.

Los resultados demuestran una inhibición específica de secuencia del crecimiento de las células tumorales sólidas por los análogos del oligómero anticódigo reivindicado.

Ejemplo 17

Optimización de las secuencias de los oligómeros anticódigo de bcl-2

5 El propósito de este estudio fue determinar los sitios diana óptimos o porciones de secuencias en el ARNm para la inhibición de la supervivencia celular mediante el contacto de las células con diversas moléculas anticódigo reivindicadas, cuyas secuencias fueron generadas mediante ordenador.

10 Se trataron células de linfoma DoHH2 con varias concentraciones de oligómeros dirigidos a diferentes sitios del ARNm de bcl-2. El oligómero ATG se dirige al sitio de iniciación de la traducción y es complementario a los primeros 6 codones del marco de lectura abierto. Los oligómeros Dscore 23 y Dscore 72 se dirigen a sitios en la región no traducida 5' del ARNm. Los oligómeros Sc representan controles negativos que tienen la misma longitud y composición de bases, pero un orden mezclado. Todos los oligómeros fueron preparados como quimeras de fosfodiéster (PO)/fósforotioato (PS), donde solamente los dos últimos enlaces internucleósidos (3') fueron fósforotioatos. Se añadieron oligómeros directamente a los cultivos y se estimaron mediante un ensayo MTT los números relativos de células viables tres días después. Los datos representan el promedio $\pm$ la desviación estándar.

15 Los resultados indican que el oligómero Dscore 23 que estaba dirigido a la región no traducida 5', comparado con otros oligómeros anticódigo ensayados en este ejemplo, tiene actividad superior para inhibir la supervivencia de células.

Ejemplo 18

25 *Reversión de la quimiorresistencia de las células tumorales mediante reducción mediada por antisentido de la expresión del gen bcl-2*

30 El siguiente trabajo se llevó a cabo para determinar si los oligómeros anticódigo dirigidos contra la expresión del gen bcl-2 podrían revertir la quimiorresistencia, es decir, incrementar la sensibilidad a los agentes quimioterapéuticos contra el cáncer en células tumorales cancerosas que expresan el gen bcl-2.

35 Altos niveles de proteína bcl-2 parecen incrementar la resistencia relativa de las células linfoides a la muerte inducida mediante una amplia variedad de agentes quimioterapéuticos contra el cáncer incluyendo, sin constituir limitación, Ara-c, MTX, vincristina, taxol, cisplatina, adriamicina, etopósido, mitozantrón, 2-clorodesoxiadenosina, dexametasona (DEX) y agentes alquilantes. (Miyashita, T. y Reed, J.C., Cancer Res. 52:5407, octubre 1, 1992). Aunque estos fármacos tienen diversos mecanismos bioquímicos de acción, se cree que todos tienen en común la capacidad de, en última instancia, provocar la muerte de la célula cancerosa activando un mecanismo celular endógeno que conduce a la apoptosis (Eastman, A. Cancer Cells. 2:275 1990)). Se entiende que las moléculas anticódigo reivindicadas y los análogos de las mismas, tal como se utilizan en el presente documento son efectivas para sus propósitos destinados de aumentar la sensibilidad a los medicamentos quimioterapéuticos contra el cáncer incluyendo, sin constituir limitación, antimetabolitos, agentes alquilantes, alcaloides de plantas y antibióticos.

40 Los antimetabolitos incluyen, sin constituir limitación, metotrexato, 5-fluoracil, 6-mercaptopurina, citosina arabinosida, hidroxiurea, 2-clorodesoxiadenosina.

45 Los agentes alquilantes incluyen sin constituir limitación, ciclofosfamida, melfalán, busulfán, sisplatino, paraplatin, cloroambucilo y mostazas nitrogenadas.

50 Los alcaloides de plantas incluyen, sin constituir limitación, vincristina, vinblastina, VP-16.

Los antibióticos incluyen, sin constituir limitación, doxorubicina (adriamicina), daunorubicina, mitomicina c, bleomicina.

55 Otros agentes quimioterapéuticos contra el cáncer incluyen DTIC (decarbacia), mAMSA, hexametil melamina, mitroxantrona, taxol, etopósido, dexametasona.

60 En el presente trabajo se emplearon tanto fósforotioatos resistentes a nucleasas (PS) y fosfodiésteres en los que solamente el enlace internucleósido mas 3' fue un enlace tioato (PO/PS). Los oligómeros PO/PS son resistentes a exonucleasas 3' (la principal actividad nucleasa del suero) y generalmente forma heteroduplex con ARN dianas más estables.

65 Se utilizaron lípidos catiónicos para mejorar la absorción y la liberación posterior de los oligómeros en compartimientos intracelulares efectivos y son ejemplos de portadores farmacéuticos para los oligómeros anticódigo reivindicados.

Los métodos para la preparación y purificación de oligonucleótidos 18-mero antisentido (AS) y mezclados (SC) utilizados para el presente trabajo fueron descritos anteriormente en Métodos Generales y en Kitada y otros. (Antisense R & D, 3:157 (1993)). Se sintetizaron oligonucleótidos fosfodiéster en una escala de 10-15 micromoles utilizando

química de fosforoamidato con oxidación mediante yodo y, a continuación, se purificó utilizando una columna de fase reversa C₁₈. En la mayoría de los casos, los oligómeros fueron adicionalmente precipitados cinco veces con etanol para eliminar cualquier actividad citotóxica no específica y, a continuación, se secaron y resuspendieron en un medio HL-1 estéril (Ventrex Labs, Inc; Burlingame, CA) a 1-10 mM. El pH de esta solución se ajustó utilizando NaOH 1-10 M de NaOH hasta que el indicador rojo de fenol en el medio retornó a su color original.

Los principales oligómeros utilizados fueron 18-meros, que tienen tanto la secuencia:

I. TCTCCCAGCGTGCGCCAT (ID DE SEQ N°. 17), que es antisentido a los primeros 6 codones del marco de lectura abierto de bcl-2 humano (ID DE SEQ N°. 19); o

II. TGCACTCACGCTCGGCCT (ID DE SEQ N°. 18), que es una versión mezclada utilizada como control.

Se utilizaron métodos de transfección estándar para producir células tumorales que expresan ya sea el gen bcl-2 o un oligodesoxinucleótido antisentido que también se une al ARNm de bcl-2. Se entiende que el vector podría también codificar un oligodesoxinucleótido antisentido que se une al pre-ARNm de bcl-2. La secuencia de nucleótidos particular que codifica los oligonucleótidos antisentido de la presente invención no es crítica, excepto porque las secuencias son preferentemente seleccionadas de tal manera que expresen oligonucleótidos antisentido suficientes para reducir la expresión del gen bcl-2 en células tumorales e incrementen la sensibilidad de las células tumorales a los agentes quimioterapéuticos contra el cáncer o suficientes para destruir las células tumorales cuando son tratadas con agentes quimioterapéuticos contra el cáncer. Sólo es necesario que el oligonucleótido antisentido codificado en el vector se exprese bajo condiciones suficientes para reducir la expresión del gen bcl-2 en las células tumorales. Los métodos utilizados para la preparación de los vectores y, en particular, plásmidos de expresión, para la transferencia de genes a las células de mamíferos recaen en técnicas rutinarias en el campo de la biología molecular. Un texto básico que da a conocer los métodos generales de preparación de plásmidos de expresión utilizados en la presente invención es *Clonaje Molecular, Un Manual de Laboratorio*, 2^{da} edición, eds. Sambrook y otros., Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989), particularmente el Capítulo 16 sobre Expresión de Genes Clonados en Cultivos de Células de Mamíferos. Los ejemplos 15 C-D siguientes desarrollan métodos particulares para la preparación de los plásmidos de expresión utilizados en la presente invención. El vector particular utilizado para transferir los oligonucleótidos antisentido de la presente invención no es crítico y dichos vectores pueden incluir vectores derivados de fagos lambda y relacionados o de fagos filamentosos. Sólo es necesario que la secuencia de nucleótidos transferida, que codifica los oligonucleótidos antisentido de la presente invención, se exprese en la célula tumoral transfectada bajo condiciones suficientes para reducir la expresión del gen bcl-2 en las células tumorales. La presente invención incluye la expresión de oligonucleótidos antisentido, ya sea a partir de una posición extracromosomal (por ejemplo a partir de un plásmido de expresión) o a partir de una posición integrada dentro del propio genoma huésped, como los mediados por otros vectores, tales como vectores retrovirales recombinantes (Reed y otros. Tumorigenicidad mediada por bcl-2 en una línea celular linfóide de células T: sinergia con C-MYC e inhibición mediante antisentido bcl-2. *PNAS USA* 87:3660 (1990)).

A. Tratamiento de células de linfoma con oligodesoxinucleótidos 18-mero antisentido sintéticos de bcl-2

La línea celular de linfoma SU-DHL-4, obtenida a partir del uso de linfoma no Hodgkins histiocítico difuso (Epstein y otros. Dos nuevos anticuerpos monoclonales (LN-1, LN-2) reactivos en tejidos B5 fijado con formalina sumergidos en parafina con linfocitos B humanos con centro folicular y zona del manto y tumores derivados. *J. Immunol.* 133:1028 (1984)) y que contiene una translocación t(14;18) se trató con oligodesoxinucleótidos bcl-2-AS sintéticos 18-mero dirigidos a la unión con los primeros seis codones del ARNm de bcl-2. Como control, se trataron las células SU-DHL-4 con varios oligómeros de control, incluyendo 18-mero que tienen la misma composición nucleosídica que el oligómero AS, pero en el que las bases estaban en orden mezclado (SC).

Se combinaron alícuotas de 1,5 ml de medio HL-1 libre de suero (Ventrex Labs, Inc.) suplementado con L-glutamina 1 mM, penicilina 50 unidades/ml y estreptomycin 100 µg/ml y tanto 5 µg de oligonucleótidos purificados ó 30 µg de Lipofectin[®] [mezcla 1:1 peso/peso de cloruro de N-(1-2,3-diiloxi) propil)-n,n,n-trimetilamonio (DOTMA) y dioleoilfosfotidiletanolamina (DOPE)] y se añadieron a 0,75 x 10⁶ células SU-DHL-4 en 3 ml de medio HL-1. A continuación, las células se cultivaron a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂/95% de aire en placas de 24 pocillos (2 ml/pocillo) para inmunotransferencia y ensayos RT-PCR, o en placas de microtitulación de fondo plano de 96 pocillos (0,1 ml/pocillo) para ensayos MTT. Para las células en los cultivos de microtitulación típicamente se añadieron 0,1 ml de medio HL-1 adicional con o sin varios fármacos quimioterapéuticos después de un día, y las células se cultivaron por un período adicional de dos días antes de realizar los ensayos MTT.

Las células se lavaron una vez en PBS, se les realizó una lisis en un tampón que contiene Tritón X100 1% y las muestras se normalizaron por contenido de proteínas (25 µg) antes del fraccionamiento por tamaño de las proteínas mediante SDS-PAGE (geles al 12%) y se transfirieron a filtros de nitrocelulosa para los ensayos de inmunotransferencia, tal como se describe en Reed y otros. *Cancer Res.* 51:6529 (1991). Experimentos preliminares determinaron que alícuotas de los lisados que contienen 25 µg de proteína total produjeron resultados en el rango lineal del ensayo. Las transferencias se incubaron primeramente con antisuero de conejo 0,1% (v/v) dirigido contra un péptido sintético que se corresponde con los aminoácidos (aa) 41-54 de la proteína Bcl-2 humana, tal como se muestra en el identificador de secuencia N°. 21 (ID SEQ) seguido por 2,8 µg/ml de IgG anti-conejo de cabra biotinilado (Vector Labs, Inc). A conti-

nuación, las bandas correspondientes a p26-Bcl-2 se visualizaron mediante desarrollo de color utilizando un reactivo complejo avidin-biotina-peroxidasa de rábano picante (HRP) (Vector Labs Inc) y 3,3'-diaminobencidina (DAB). A continuación, las transferencias teñidas se incubaron con un segundo anticuerpo anti-Bcl-2 dirigido contra aa 61-67 de la proteína Bcl-2 (ID SEQ NO. 21) seguido de 0,25 μ Ci/ml de 125 I-proteína A. Las bandas de Bcl-2 se escindieron de las transferencias y se sometieron a conteo gamma.

A pesar de la ubicación mitocondrial de la proteína Bcl-2, no se notaron diferencias en la velocidad de reducción del tinte MTT por las enzimas mitocondriales en las células, que fueron idénticas excepto por sus niveles de p26-Bcl-2. Estas comparaciones se hicieron utilizando pares de líneas celulares linfoides en crecimiento exponencial que se diferencian sólo en que una línea ha sido infectada de manera estable con retrovirus *bcl-2* recombinante y la otra con el vector retroviral parental que le falta el inserto de ADNc de *bcl-2* (Miyashita y otros. *Cancer Res.* 52:5407 (1992); Blood 81:151 (1993)).

Se detectaron reducciones específicas de anticódigos en los niveles relativos de ARNm de *bcl-2* en 1 día mediante un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa de transcriptasa inversa semi-cuantitativo (RT-PCR). Ver figura 8A.

Las células SU-DHL-4 se cultivaron con 0,83 μ g/ml de oligómeros complejados con 5 μ g de lípidos catiónicos (Lipofectin; BRL/Gibco, Inc.) por ml de medio libre de suero y (13,19). En la figura 8A, el ARN total fue aislado de las células después de 1 día y los niveles relativos de *bcl-2* y ARNm de glyceraldehído 3' fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se evaluaron mediante el ensayo de RT-PCR tal como se describe en Kitata y otros. *Antisense R & D* 3:157 (1993).

En la figura 8B, las células SU-DHL-4 se cultivaron con pares de oligómeros Sc y As, ya sean PS (cuadrados) o PO/PS (círculos) durante 3 días. A continuación, se midieron los niveles relativos de proteína Bcl-2 utilizando un ensayo de inmunotransferencia cuantitativo, tal como se describió anteriormente, y los datos se expresaron como porcentaje relativo a células tratadas con oligómeros Sc de control. El recuadro muestra los resultados de la inmunotransferencia para p26-Bcl-2 y una banda de reacción cruzada (CR) de p75 en un caso donde el oligómero As-PO/PS produjo una disminución relativa del 41% en los niveles de proteína Bcl-2. En la figura 8C, se añadió Ara-C, MTX o DEX 10^{-4} M 1 día después de la adición de los oligómeros PS (cuadrados) o PO/PS (círculos) a los cultivos de células SU-DHL-4 y se realizaron ensayos MTT en el tercer día. Los datos se presentaron como % del control en relación a las células cultivadas con fármacos en ausencia de cualquier oligómero y representan los resultados de 9 de 10 experimentos consecutivos [en un experimento, el ensayo MTT falló]. Se obtuvieron resultados similares cuando se utilizaron ensayos de exclusión de tinte en lugar de ensayos MTT para evaluar la supervivencia celular [no mostrados].

Los valores promedios para los datos se indican mediante líneas horizontales. El análisis estadístico de los datos se realizó mediante la prueba t pareada (As contra Sc). Las concentraciones de los oligómeros As y Sc (≈ 150 nM) se ajustaron para maximizar los efectos de As mientras se mantenía la especificidad a la secuencia.

Las variaciones en la cantidad de ARN inicial se controlaron mediante análisis RT-PCR utilizando iniciadores específicos para ARNm GAPDH.

La larga vida media de la proteína *bcl-2* (aproximadamente 14 horas) puede explicar que las reducciones mediadas por As en proteínas de *bcl-2* no sean tan dramáticas como para las reducciones en ARNm de *bcl-2*, que toma mayor tiempo para lograrlo (cerca de 3 días) y parece más variable.

La figura 8B muestra los resultados compuestos para 10 experimentos, donde los niveles relativos de proteína *bcl-2* se compararon en células SU-DHL-4 tratadas con oligómeros AS o SC. Las reducciones mediadas por AS en los niveles de proteínas *bcl-2* se encontraban en el intervalo de tanto como 66% hasta tan sólo 10%, con una reducción relativa promedio de aproximadamente 30%, comparada con las células SU-DHL-4 que fueron tratadas de una manera idéntica con los oligómeros de control. Los niveles de una variedad de proteínas mitocondriales de control tales como F₁-beta-ATPasa y citocromo C, que como *bcl-2* son codificadas por genes nucleares, no fueron afectados de manera adversa por los oligómeros AS (no mostrado), indicando que las reducciones mediadas por AS en los niveles de proteína *bcl-2* fueron específicas. El inserto en la figura 8B, por ejemplo, muestra una comparación de p26-Bcl-2 con una proteína de 78 kDa que reacciona de manera cruzada con uno de los antisueros de conejo empleados para el ensayo de inmunotransferencia, demostrando una disminución en los niveles de p26-*bcl-2*, pero no de p78, en las células tratadas con AS en relación con células que recibieron los oligómeros SC de control.

B. Efecto del tratamiento de células SU-DHL-4 con oligómeros AS de *bcl-2* sobre la sensibilidad celular a los agentes quimioterapéuticos contra el cáncer

Este estudio se realizó para determinar si el tratamiento de las células SU-DHL-4 con oligómeros AS de *bcl-2* podría incrementar su sensibilidad a la destrucción por los agentes quimioterapéuticos contra el cáncer Ara-C, MTX y DEX, que son fármacos anticáncer.

Los estudios de control anteriores demostraron que los oligómeros AS de *bcl-2* tenían poco o ningún efecto sobre el crecimiento y supervivencia de las células SU-DHL-4, como mínimo, durante los primeros tres días de cultivo (Kitata y otros. *Antisense R & D* 3:157 (1993)). Las reducciones mediadas por AS en los niveles de proteína *bcl-2* en estas células de linfoma, así como en otras células, no acelera típicamente la velocidad de muerte celular en los cultivos, a

menos que las células sean privadas de los factores de crecimiento del suero (Reed y otros. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:3660 (1990)).

En el presente trabajo, estudios preliminares demostraron que más del 90% de las células SU-DHL-4 sobrevivieron al tratamiento durante 4 días con una dosis alta (10^{-4}) de Ara-CX, MTX o DEX, presumiblemente debido a sus altos niveles de proteína bcl-2 (No mostrado). A estas concentraciones, sin embargo, todos los fármacos indujeron esencialmente la inhibición completa de la proliferación de las células SU-DHL-4, consistente con fármacos de bcl-2 convertidos de citotóxicos a citostáticos. Las comparaciones de los oligómeros AS y SC demostraron que el tratamiento en AS de bcl-2 aumentó notablemente la sensibilidad de estas células de linfoma a MTX y Ara-C y en un menor grado a DEX. (Figura 8C).

A pesar de alguna variabilidad en los resultados, como promedio, la adición de oligómeros AS de bcl-2 a los cultivos de células SU-DHL-4 tratadas con MTX o Ara-C resultaron en una mayor inhibición 79-84% (reducción en el número de células viables) que con el uso de cualquier fármaco solo ($P < 0,002$ para AS contra SC) en ausencia de la introducción de los oligómeros AS de bcl-2 de la presente invención. Se obtuvieron resultados estadísticamente significativos para las células SU-DHL-4 tratadas con DEX ($P=0,01$). La reducción en un 20-30% del número de células viables observadas para las células tratadas con el oligómero de control podría reflejar un grado sin especificidad de secuencia, pero se relaciona probablemente al uso de lípidos catiónicos para facilitar la liberación del oligómero dentro de las células.

C. Efecto de las células transfectadas con plásmidos de expresión que codifican la proteína bcl-2 humana sobre la sensibilidad a los agentes quimioterapéuticos

Para confirmar aún más la especificidad de secuencia de los oligómeros AS de bcl-2 para aumentar la sensibilidad a los fármacos quimioterapéuticos anticáncer, se llevó a cabo un estudio utilizando una línea celular hemopoyética murina 32D.C13 dependiente de interleucina-3 (IL-3), que había sido transfectada de manera estable con el plásmido de expresión que codifica tanto la proteína bcl-2 humana o un homólogo viral de bcl-2, BHRF-1, que tiene sólo un 22% de homología con bcl-2. Las células 32D.C13 se obtuvieron del Dr. Giovanni Rovera del Wistar Institute, Philadelphia, PA.

El tratamiento de las células 32D con complejos oligómero/lípido catiónico fue tal como se describió anteriormente excepto en que se incluyeron 50 Unidades/ml de IL-3 murina recombinante (rIL-3) en el medio HL-1, la densidad celular inicial fue de 10^5 por ml y se añadió adenovirus de replicación defectuosa dl3l2 (MOI=200) 30 minutos después de la exposición de las células a los oligómeros para facilitar la salida del ADN de los endosomas [Yoshimura K, y otros. *J Biol Chem.* 268, 2300, (1993)].

Las células 32D que habían sido transfectadas de manera estable con plásmidos de expresión que codifican tanto p26-Bcl-2 o EBV p19-BHRF-1 humanos (Takayama, S. y otros enviado) se cultivaron en medio (10^5 /ml) que contiene IL-3 y oligómeros PO/PS durante 3 días para lograr reducciones en los niveles de proteína Bcl-2 humana. A continuación, las células se trataron nuevamente con oligómeros solos (C) o en combinación con varias concentraciones de MTX y se evaluó el número relativo de células viables 2 días después mediante el ensayo MTT. Los datos representan el promedio $\pm$ desviación estándar para determinaciones por triplicado y se expresaron como % relativo a las células que no recibieron MTX. El análisis estadístico de los datos para MTX 10^{-6} a 10^{-4} M se realizó mediante un método de Análisis de Variables de dos factores. (Finney, D.J. En *Métodos Estadísticos en Ensayos Biológicos*, p. 72, 1978 (3^{ra} edición, Charles Griffin & Co., London). Se obtuvieron resultados comparables con los ensayos de exclusión de tinte [no mostrados].

Los ARN derivados de la construcción de bcl-2 humano en las células 32D-BCL-2 fueron una diana para los oligómeros AS de bcl-2, mientras que los ARN de los plásmidos de expresión BHRF-1 no lo fueron. En consecuencia, la quimiosensibilidad a los fármacos citotóxicos de las células 32D.C13 que expresan BHRF-1 podría no haber sido afectada por el tratamiento con AS.

Los experimentos preliminares demostraron que con la retirada de IL-3 de las células 32D.C13, los niveles proteína bcl-2 de ratón endógena disminuyeron y las células sufrieron apoptosis. Bcl-2 y BHRF-1 soportaron de manera comparable la supervivencia de las células 32D.C13 en ausencia de IL-3, y las velocidades de proliferación de las células 32D.C13 que contienen altos niveles de estas proteínas fueron similares en presencia de IL-3, excluyendo así estas variables como explicación de cualquier diferencia en la quimiosensibilidad.

La figura 9 compara la sensibilidad de las células 32D-BCL-2 y 32D-BHRF-1 a varias concentraciones de MTX. El tratamiento con oligómeros AS de bcl-2 dio lugar a aumentos específicos de secuencia en la sensibilidad de las células 32D-BCL-2 a la inhibición por MTX a concentraciones de 10^{-6} a 10^{-4} M ($P \leq 0,001$ para AS contra SC). Por el contrario, el tratamiento con oligómeros AS de bcl-2 no produjo diferencias significativas en la sensibilidad de las células 32D-BHRF-1 a MTX, en relación con los oligómeros SC de control (figura 9). Estos datos indican que el efecto de los oligómeros AS de bcl-2 en la quimiosensibilidad a fármacos agentes citotóxicos son específicos de secuencia. Además, varios oligómeros de control, que incluyen bcl-2 en sentido, otras secuencias mezcladas con la misma composición nucleosídica que AS y oligómeros con secuencias totalmente sin relación, todos tuvieron un efecto comparativamente pequeño en la quimiosensibilidad de las células (no mostrado).

Los descubrimientos anteriores demostraron que los oligómeros AS de bcl-2 produjeron reducciones específicas de secuencia en los niveles de ARNm de bcl-2 y de proteína bcl-2 y que estos eventos estaban asociados con un incremento de la sensibilidad a los agentes quimioterapéuticos, tales como fármacos anticáncer. La parte de las células tumorales destruidas por los agentes quimioterapéuticos fue mayor que la parte destruida por la misma cantidad de agentes quimioterapéuticos en ausencia de la introducción de los oligómeros AS de bcl-2 de la presente invención.

D. Efecto de las células transfectadas con plásmidos de expresión que codifican la proteína bcl-2 humana sobre la sensibilidad de las células de linfoma a los agentes quimioterapéuticos

Se empleó una estrategia diferente para determinar si las reducciones mediadas por AS en la expresión del gen bcl-2 podrían lograrse con un plásmido de expresión AS de bcl-2 inducible, que utilizaba un promotor de metal pesado sensible a metalotioneína-IIa humana en otra línea de linfoma, que contiene la translocación t(14;18) RS11846. Se obtuvieron las RS11846 del Dr Carlo Croce (Wistar Institute, Philadelphia, PA (Tsujimoto y Croce, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5214 (1986)).

Para preparar el plásmido de expresión, se subclonó un ADNc de bcl-2 (*ibid*) de 0,91 kbp tanto en orientación antisentido (AS) o en sentido (S) en un sitio HindIII aguas abajo de un promotor de metalotioneína-IIa humana en el plásmido pMEP-4 (Invitrogen, Inc.), que contiene un gen de higromicina fosfotransferasa y el gen EBNA-1 y se origina de la replicación del ADN a partir del virus de Epstein Varr para mantenimiento episomal de copia alta.

Fueron electroporadas las células RS11846 (5×10^6) en un tampón salino de fosfato de Dulbecco que contiene 30 μg de ADN plasmídico (1500 μF , 270 V/cm) utilizando un sistema de electroporación Cellject Electrooration System de EquiBio, Inc. Las células se retornaron a su medio de cultivo habitual (RPMI-L 1640 suplementado con suero fetal bovino 10%, L-glutamina 1 mM, penicilina 50 unidades/ml y estreptomycin 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a 2×10^5 células por ml y se cultivaron durante 2 días antes de sembrar las células a 2×10^5 por ml en un medio que contiene 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de higromicina. Después de tres semanas de cultivo, se pasó la masa celular resultante a concentraciones de higromicina sucesivamente mayores en incrementos de 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hasta que la concentración alcanzó 1 mg/ml (alrededor de las 4 semanas).

Las células resistentes a la higromicina RS11846 se cultivaron en medio RPMI/10% de suero que contiene CdCl_2 0,5 μM y 3 días después se realizaron ensayos de inmunotransferencia utilizando 25 μg de proteína/carril, esencialmente como se describe en Tanka S y otros. *J. Biol. Chem.* 268, 10920 (1993) y en Reed y otros. *Cancer Res* 51:6529 (1991)).

Como se resume en la figura 10, los plásmidos de control ("C") y bcl-2-AS ("AS") se introdujeron en las células RS11846 y la expresión se indujo con CdCl_2 0,5 μM o ZnCl_2 50 μM varias veces. Como control adicional, también se analizaron células RS11846 que contienen plásmidos inducibles con ADNc de bcl-2 en orientación en sentido ("S"). Las células RS11846 se indujeron durante 3 días y se evaluaron los niveles relativos de las proteínas Bcl-2 y $\text{F}_1\text{-}\beta\text{-ATPasa}$ mediante el ensayo de inmunotransferencia de Tanka y otros. *J Biol Chem* 268:10920 (1993). En la figura 10A, las células RS11846 se cultivaron a 10^5 células/ml en un medio que contiene CdCl_2 0,5 μM y un día después se añadió Ara-C 10^{-7} M o un volumen equivalente de diluyente de control. Se estimaron los números relativos de células viables a partir del ensayo MTT en diversos tiempos y se calculó el promedio $\pm$ desviación estándar para muestras por triplicado. En la figura 10B, las células RS11846 se cultivaron como en la figura 10A, excepto en que se añadieron varias concentraciones de Ara-C, MTX o DEX. Los datos representan el promedio $\pm$ desviación estándar para muestras por triplicado. Los cálculos estadísticos se realizaron mediante Análisis de Variables de dos factores. DEX sirvió aquí como control negativo, ya que las células RS11846 habían perdido los receptores de glucocorticoides.

Los experimentos preliminares demostraron que las células RS11846 toleraron la adición de hasta 0,5 microM de CdCl_2 o microM de ZnCl_2 a los cultivos durante una semana, experimentando una ligera disminución en la velocidad de crecimiento, pero esencialmente no disminuye el porcentaje de viabilidad celular (no mostrado).

En ausencia de inducción por metales pesados, los niveles relativos de la proteína bcl-2 en las células RS11846 que contienen el control o el plásmido AS de bcl-2 fueron comparables, tal como se determinó mediante ensayo de inmunotransferencia (no mostrado). Cuando se añadió CdCl_2 0,5 μM o ZnCl_2 μM , las reducciones en la proteína bcl-2 se hace evidente en las células que expresan AS a los 2 días y se obtuvo una inhibición máxima de 30-40% del tercer al cuarto día, en relación con las células RS11846 de control.

La figura 10A muestra un ejemplo de los datos de la inmunotransferencia derivados las células RS11846 después de tres días de exposición a CdCl_2 0,5 mM, demostrando niveles reducidos de proteína bcl-2 en las células que contienen el plásmido AS, comparado con las células RS11846 que albergaron el plásmido de control. Los niveles relativos de una proteína mitocondrial de control $\text{F}_1\text{-}\beta\text{-ATPasa}$ fueron comparables en todas las líneas celulares, consistente con las alteraciones específicas de secuencia en los niveles de proteína bcl-2.

Cuando las células RS11846, que contienen tanto los plásmidos de control o bcl-2-AS, se cultivaron varias veces en CdCl_2 0,5 μM o ZnCl_2 50 μM , no se observaron diferencias significativas en las velocidades de crecimiento de estas dos líneas celulares (figura 8B). Por lo tanto, las reducciones mediadas por AS en los niveles de proteína Bcl-2 por sí mismas no perjudicaron la proliferación o supervivencia celular de RS11846.

La inclusión de bajas dosis de Ara-C (10^{-7} M) en los cultivos de control de células RS11846 sólo dio lugar a una ligera disminución del número de células viables, presumiblemente debido a los altos niveles de proteína Bcl-2 encontrados en estas células de linfoma que contienen t(14;18). Por el contrario, la adición de Ara-C 10^{-7} M a cultivos de células RS11846 que expresan bcl-2-AS fue notablemente inhibitoria (figura 8B). Ara-C, sin embargo, no tuvo ningún efecto sobre las células RS11846 que expresan AS de bcl-2 en ausencia de inducción por metales pesados del promotor MT, cuando se compara directamente con las células RS11846 que contienen el plásmido de control bajo las mismas condiciones [no mostrado]. La figura 8C muestra que el aumento de la sensibilidad a Ara-C observado para las células RS11846 que expresan bcl-2-AS, ocurre sobre un amplio intervalo de concentraciones de fármacos. ($P < 0,001$). La inducción por metales pesados del plásmido de expresión bcl-2-AS también aumentó la sensibilidad relativa de las células de linfoma a MTX ($P < 0,01$), pero no a DEX. Los ensayos de unión de receptores glucocorticoides demuestran que las células RS11846 han perdido receptores para esas hormonas esteroideas [no mostrado], proporcionando así un control específico que muestra que la reducción mediada por AS en los niveles de proteína bcl-2 son insuficientes por sí mismos para perjudicar el crecimiento o la supervivencia de estas células de linfoma.

Utilizando una diversidad de enfoques de anticódigos, la presente invención demostró que reducciones de 30-40% como promedio en los niveles relativos de proteína bcl-2 aumenta notablemente la sensibilidad de las células de linfoma, en particular, líneas celulares de linfoma que contienen t(14;18) a los agentes quimioterapéuticos tales como los fármacos anticáncer convencionales. Estos ejemplos demostraron que con la introducción del oligómero anticódigo reivindicado dentro de las células tumorales se logra una reducción de la expresión de bcl-2 y aumenta la quimiosensibilidad de las células neoplásicas a los agentes quimioterapéuticos o a los fármacos anticáncer.

Por consiguiente, la presente invención logra un método para la destrucción de células tumorales introduciendo oligómeros anticódigo en las células tumorales, que reducen la expresión del gen bcl-2 o perjudica la función de la proteína Bcl-2 antes de poner en contacto las células con agentes quimioterapéuticos, incluyendo los fármacos anticáncer. Los fármacos anticáncer convencionales redujeron el número de células malignas viables y la parte de células tumorales eliminadas fue mayor que en la parte que se hubiera eliminado por la misma cantidad de fármaco en ausencia de la introducción de los oligómeros anticódigos en las células.

Por lo tanto, habiendo dado a conocer las realizaciones a modo de ejemplos de la presente invención, debe observarse por los expertos en la materia que esta divulgación es solamente a manera de ejemplo y que otras diversas alternativas, adaptaciones y modificaciones se pueden hacer dentro del alcance de la presente invención. Por consiguiente, no está limitada a las realizaciones específicas que se ilustran en el presente documento, sino que está solamente limitada por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Oligómero anticódigo de hasta 24 nucleótidos, **caracterizado** porque comprende la secuencia TCTCCCAGCG TGCGCCAT (ID DE SEQ NO: 17), porque, como mínimo, un enlace internucleósido en dicha secuencia es un enlace fósforotioato y porque es útil para inhibir el crecimiento *in vivo* de células que expresan el gen bcl-2 humano.
2. Oligómero anticódigo de la reivindicación 1, **caracterizado** porque todos los enlaces internucleósidos son enlaces fósforotioatos.
3. Oligómero anticódigo de la reivindicación 1, **caracterizado** porque es un oligonucleótido antisentido.
4. Composición farmacéutica útil para inhibir el crecimiento de células que expresan el gen bcl-2 humano, **caracterizada** porque comprende un oligómero anticódigo, según la reivindicación 1, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.
5. Composición farmacéutica útil para aumentar la sensibilidad de células cancerosas humanas a agentes quimioterapéuticos, en la que dichas células expresan el gen bcl-2 humano, **caracterizada** porque comprende un oligómero anticódigo, según la reivindicación 1, junto con un portador farmacéuticamente aceptable.
6. Composición farmacéutica, según la reivindicación 4 ó 5, **caracterizada** porque dicho portador farmacéuticamente aceptable es un lípido catiónico.
7. Composición farmacéutica, según la reivindicación 4 ó 5, **caracterizada** porque dicho oligómero anticódigo está encapsulado en liposomas.
8. Composición farmacéutica útil para destruir células cancerosas humanas que expresan el gen bcl-2, **caracterizada** porque comprende un oligómero anticódigo, según la reivindicación 1, y un agente quimioterapéutico tóxico para dichas células cancerosas humanas.
9. Utilización de un oligómero según la reivindicación 1, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de cáncer humano.
10. Utilización, según la reivindicación 9, en la que dicho cáncer es un linfoma o leucemia.
11. Utilización, según la reivindicación 10, en la que dicho cáncer es un linfoma no Hodgkin.
12. Utilización, según la reivindicación 9, en la que dicho cáncer es un cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer gastrointestinal o cáncer de colon.
13. Utilización, según la reivindicación 9, en la que dicho medicamento se destina para ser utilizado en combinación con uno o más agentes quimioterapéuticos contra el cáncer.
14. Utilización, según la reivindicación 13, en la que dicho agente quimioterapéutico se selecciona entre dacarbazina, paclitaxel, etoposida, 2-clordesoxiadenosina, desametasona, AMSAm, hexametilo, melamina y mitroxantrona.
15. Utilización, según la reivindicación 13, en la que dicho agente quimioterapéutico se selecciona entre antimetabolitos, agentes alquilantes, alcaloides de plantas y antibióticos.
16. Utilización, según la reivindicación 15, en la que dichos antimetabolitos se seleccionan entre metotrexato, 5-fluorouracilo, 6,-mercaptopurina, citosina arabinósida, hidroxiurea y 2-clordesoxiadenosina.
17. Utilización, según la reivindicación 15, en la que dichos agentes alquilantes se seleccionan entre ciclofosfamida, melfalano, busulfán, cisplatino, paraplato, clorambucilo y mostazas nitrogenadas.
18. Utilización, según la reivindicación 15, en la que dichos alcaloides de plantas se seleccionan entre vincristina, vinblastina y VP6.
19. Utilización, según la reivindicación 15, en la que dichos antibióticos se seleccionan entre doxorubicina, daunorubicina, mitomicina C y bleomicina.
20. Un kit de partes para utilización simultánea o secuencial para destruir células cancerosas humanas que expresan el gen bcl-2, **caracterizado** porque comprende: un oligómero anticódigo, según la reivindicación 1, y un agente quimioterapéutico tóxico para dichas células cancerosas humanas.

FIGURA 1 (a)

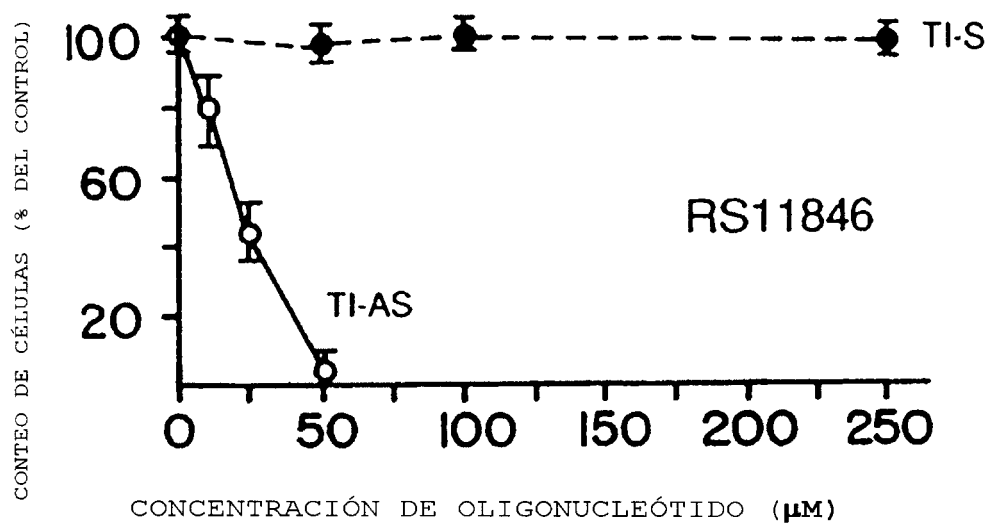


FIGURA 1 (b)

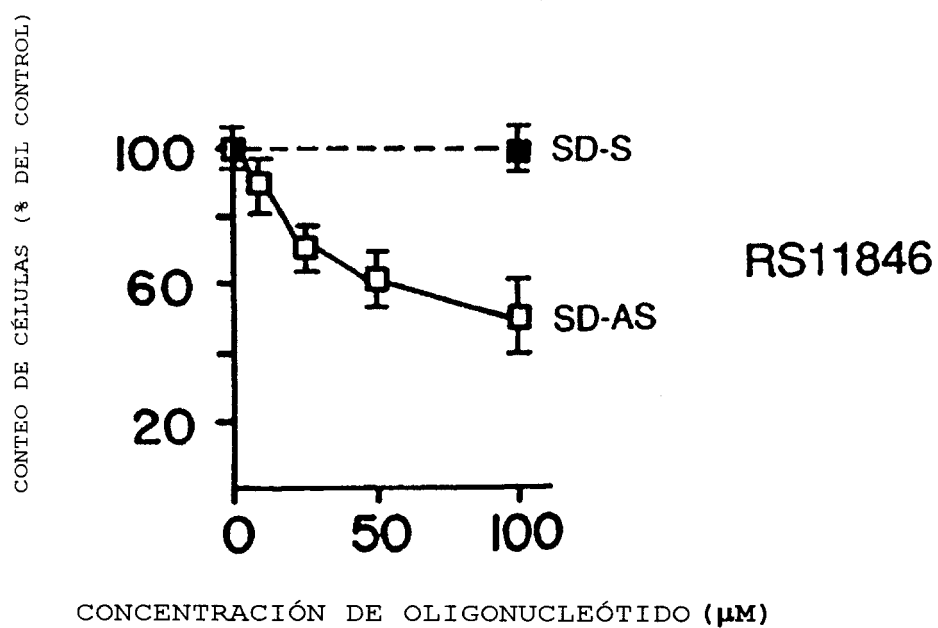


FIGURA 1 (c)

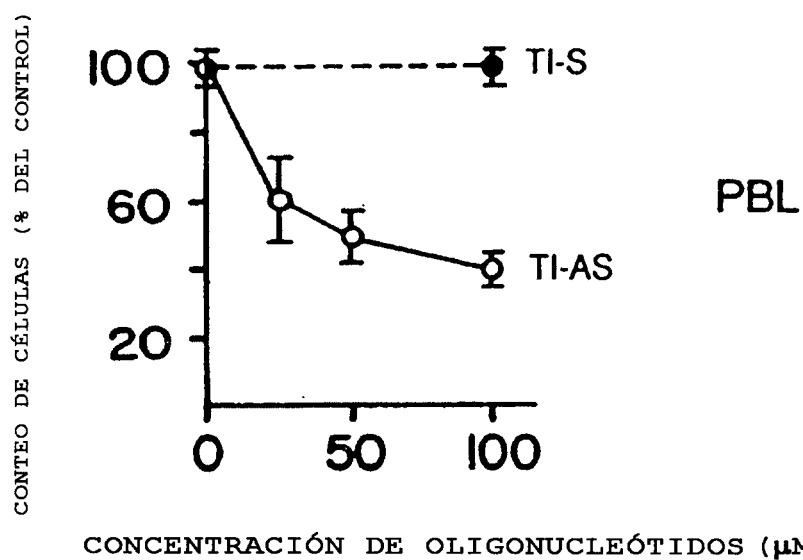


FIGURA 1 (d)

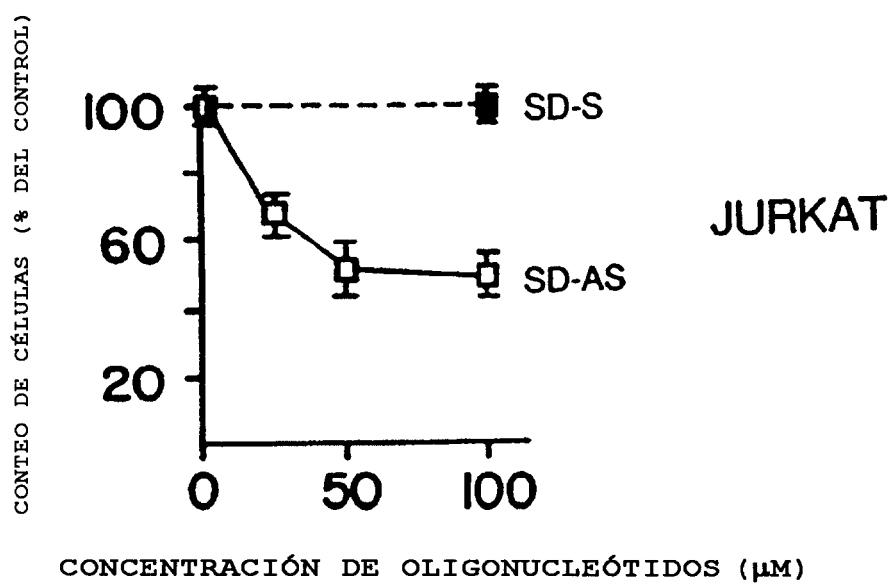


FIGURA 2 (a)

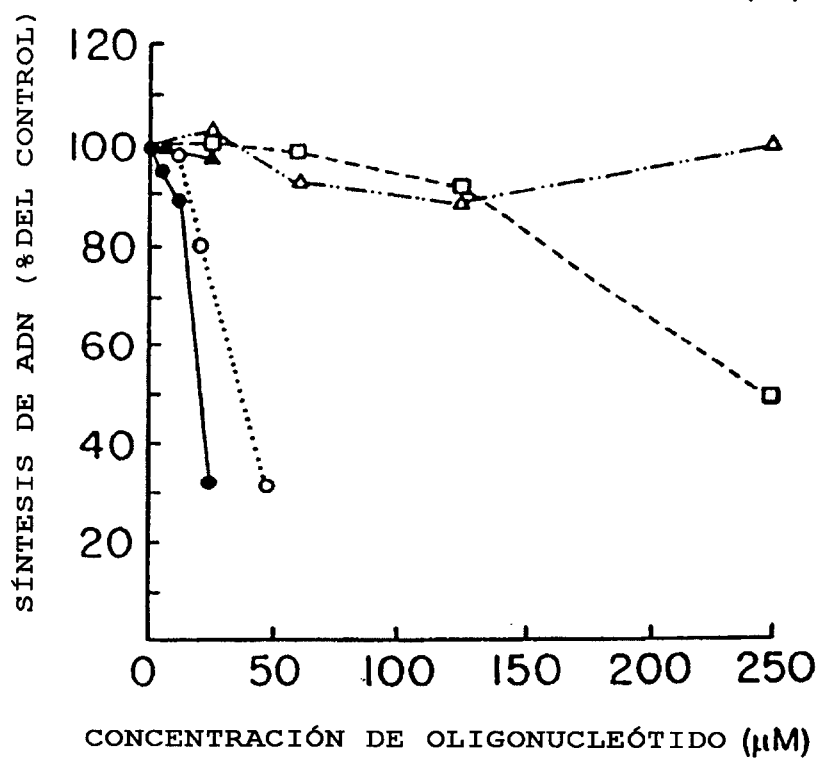
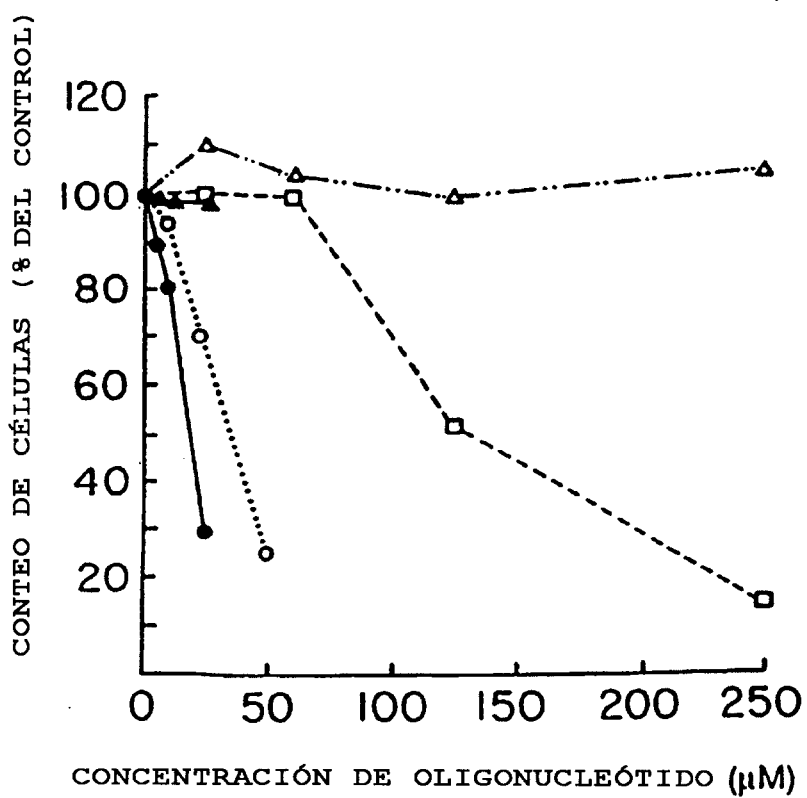


FIGURA 2 (b)



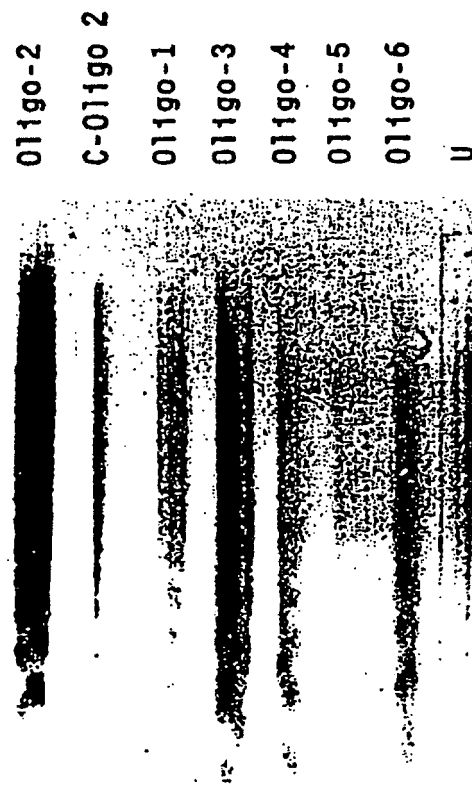


FIGURA 3



FIGURA 4 (a)



FIGURA 4 (b)

FIGURA 5

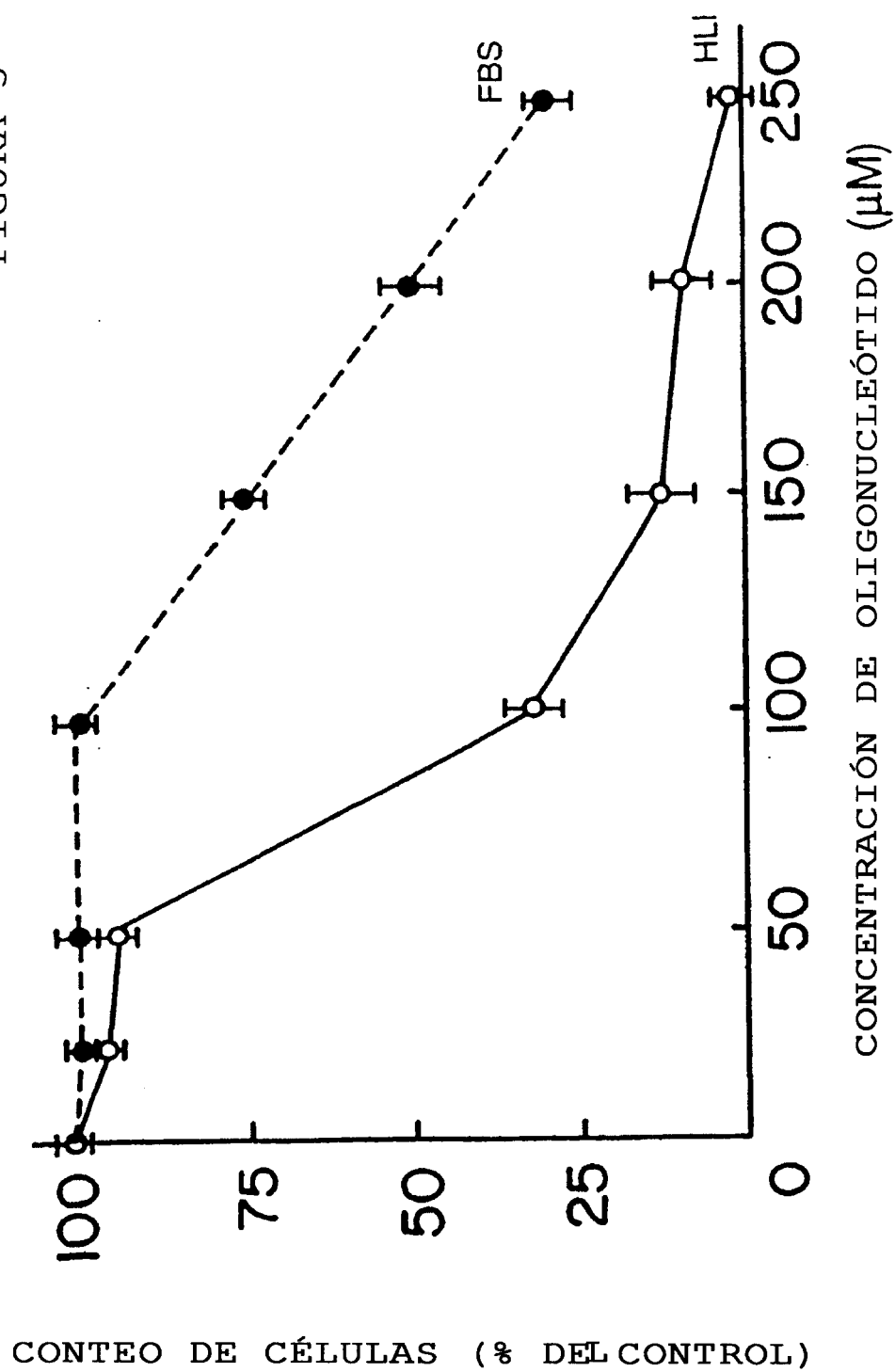


FIGURA 6 (a)

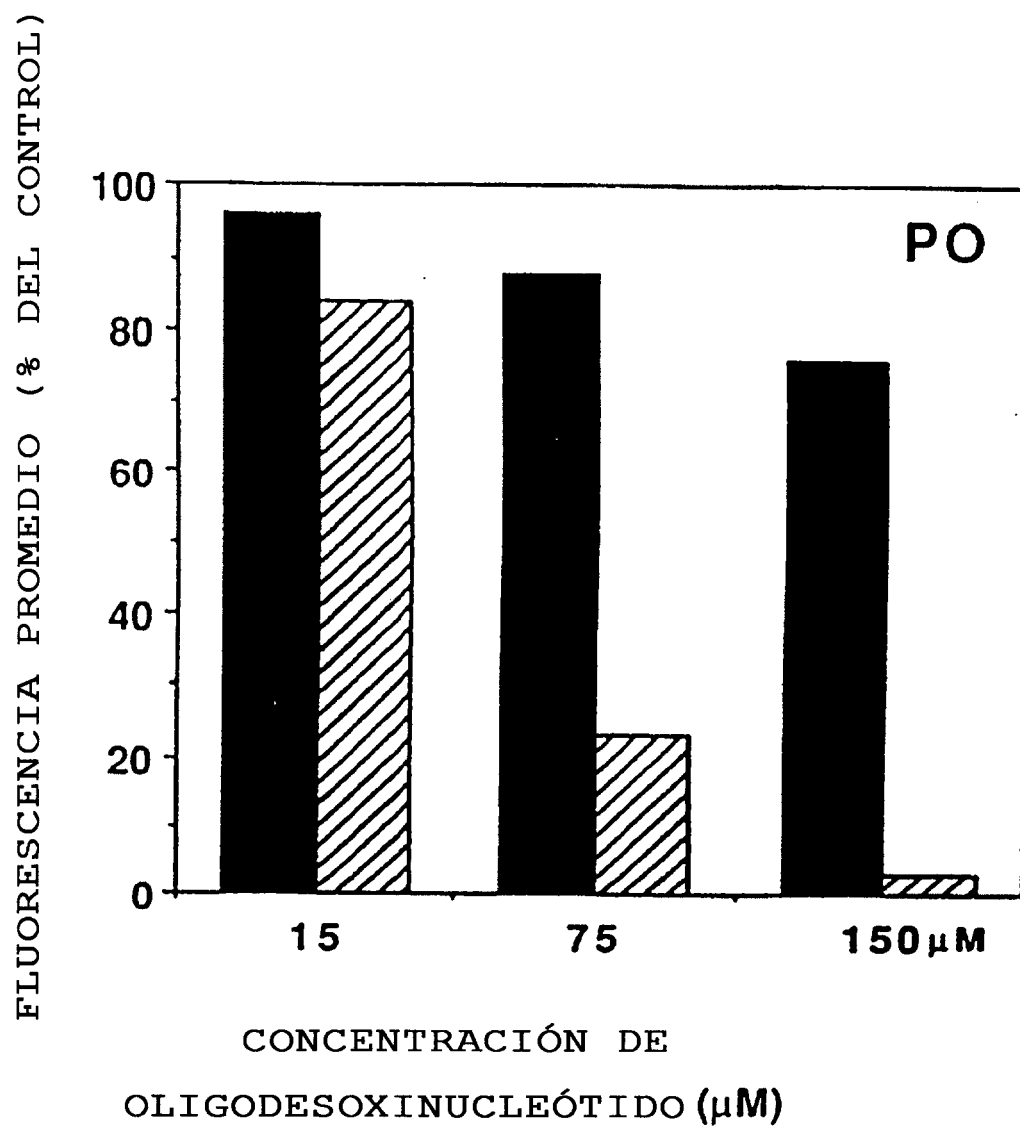
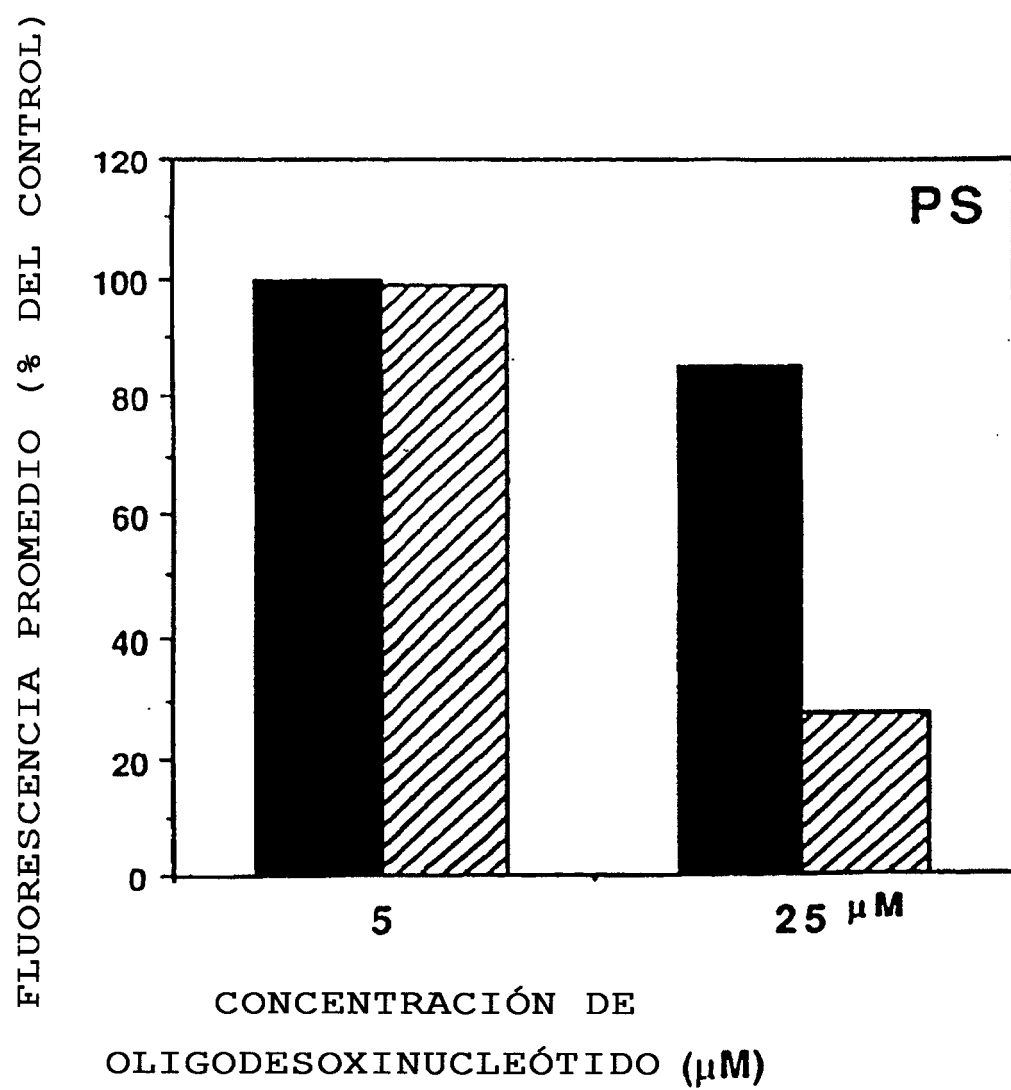


FIGURA 6 (b)



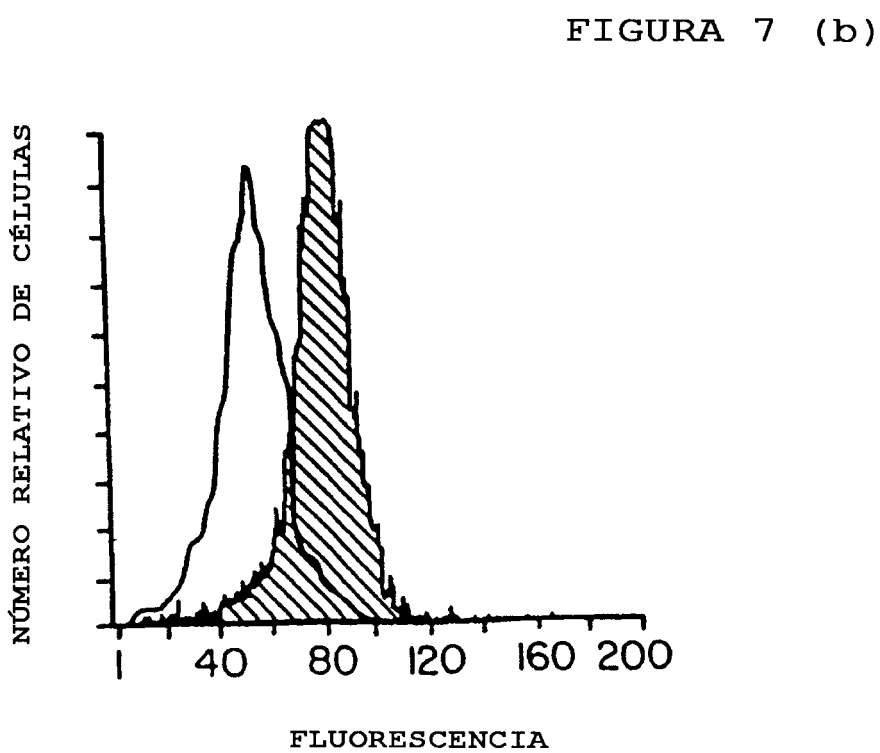
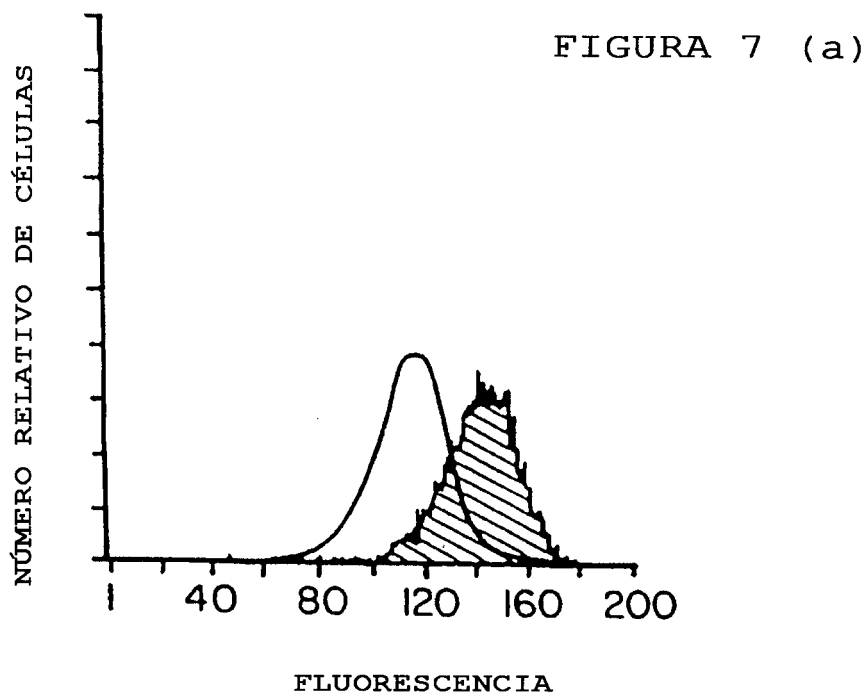


FIGURA 7 (c)

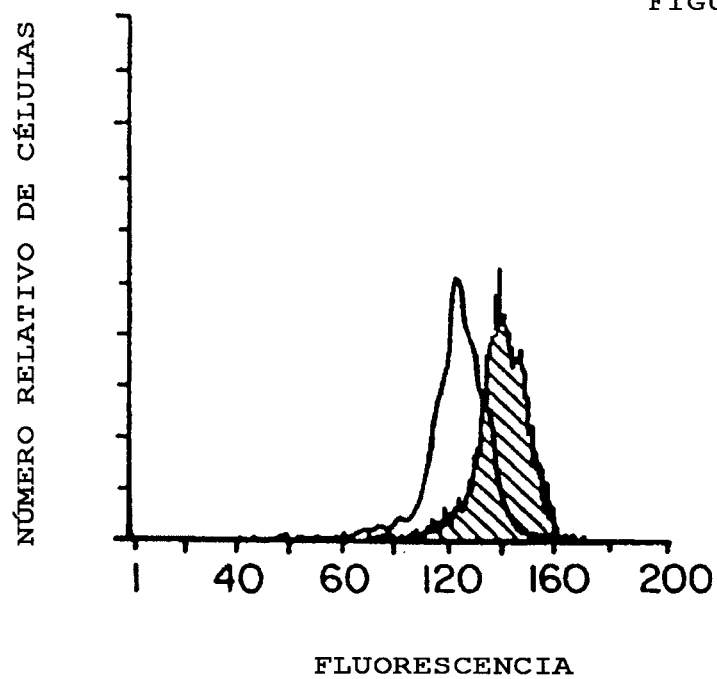


FIGURA 7 (d)

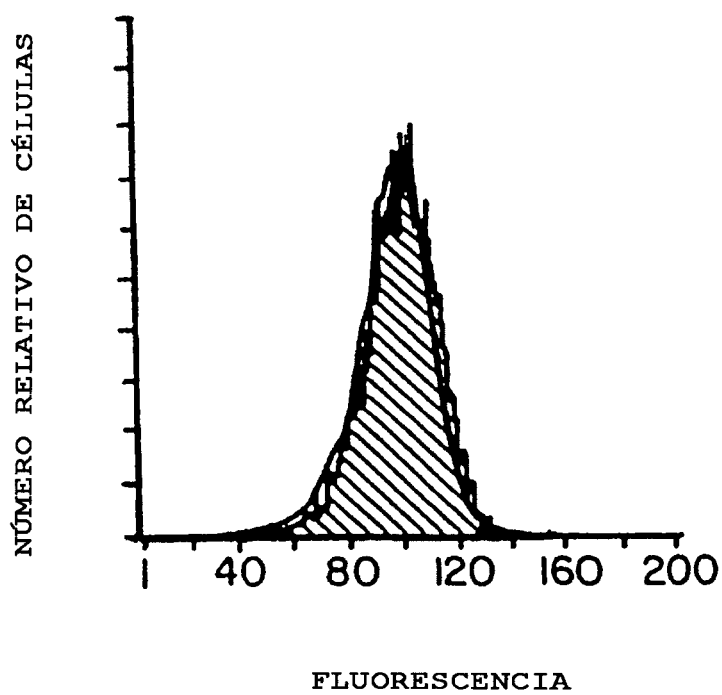


FIGURA 8A

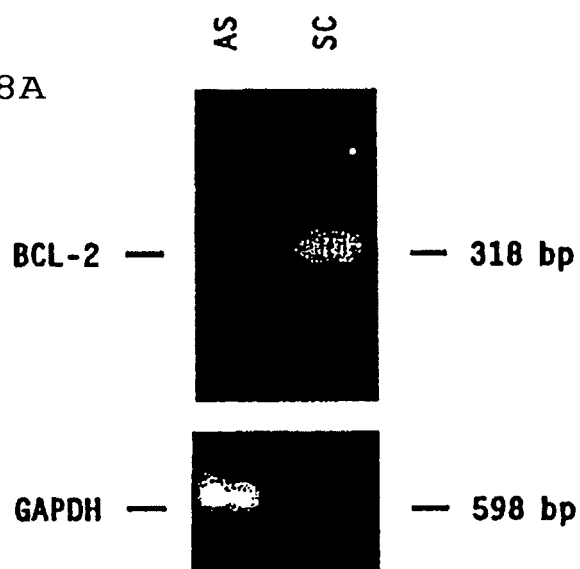


FIGURA 8B

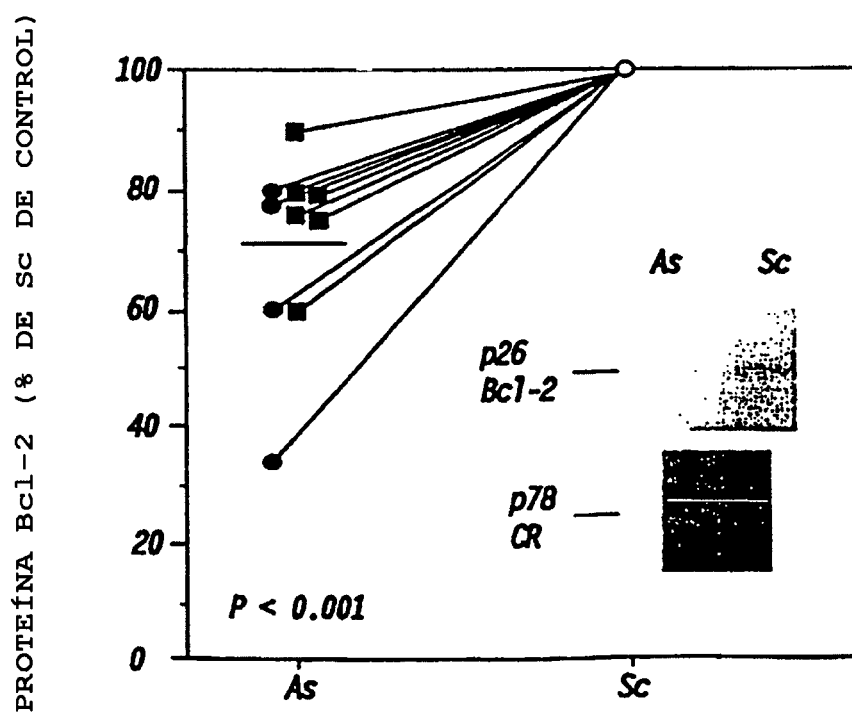


FIGURA 8C

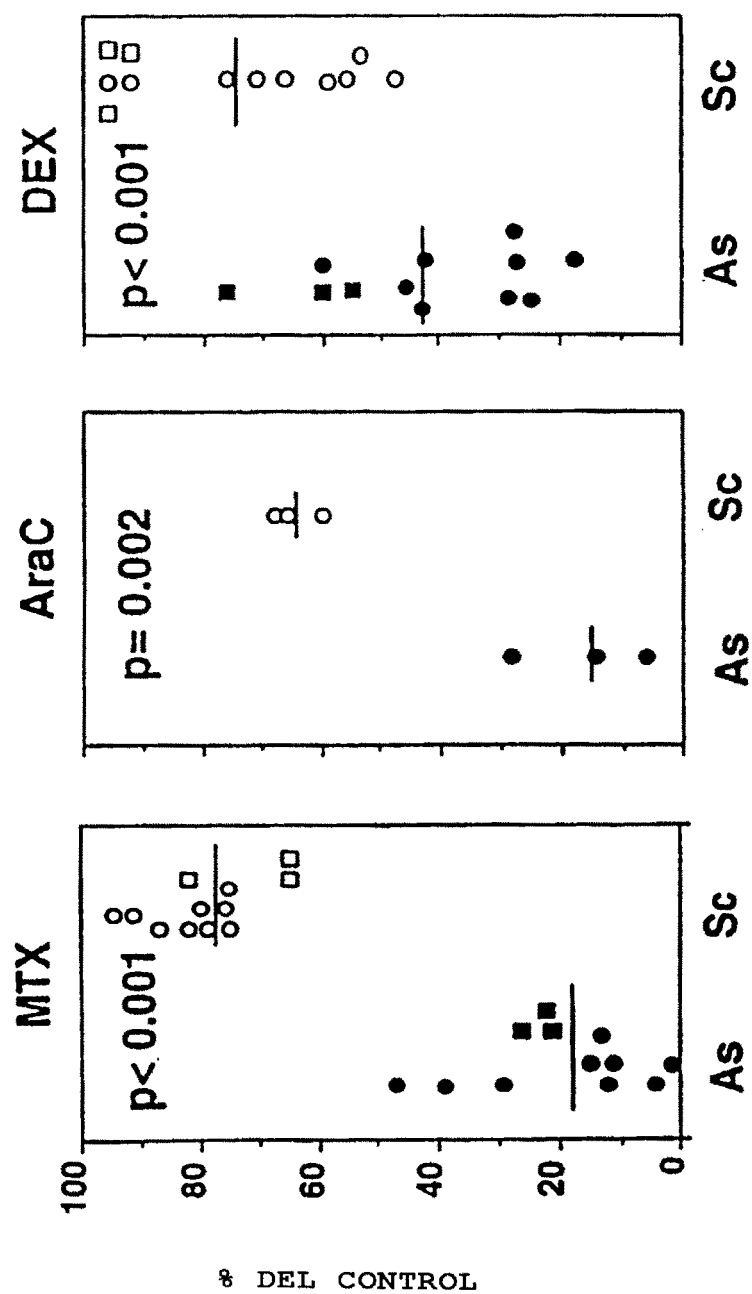


FIGURA 9 (a)

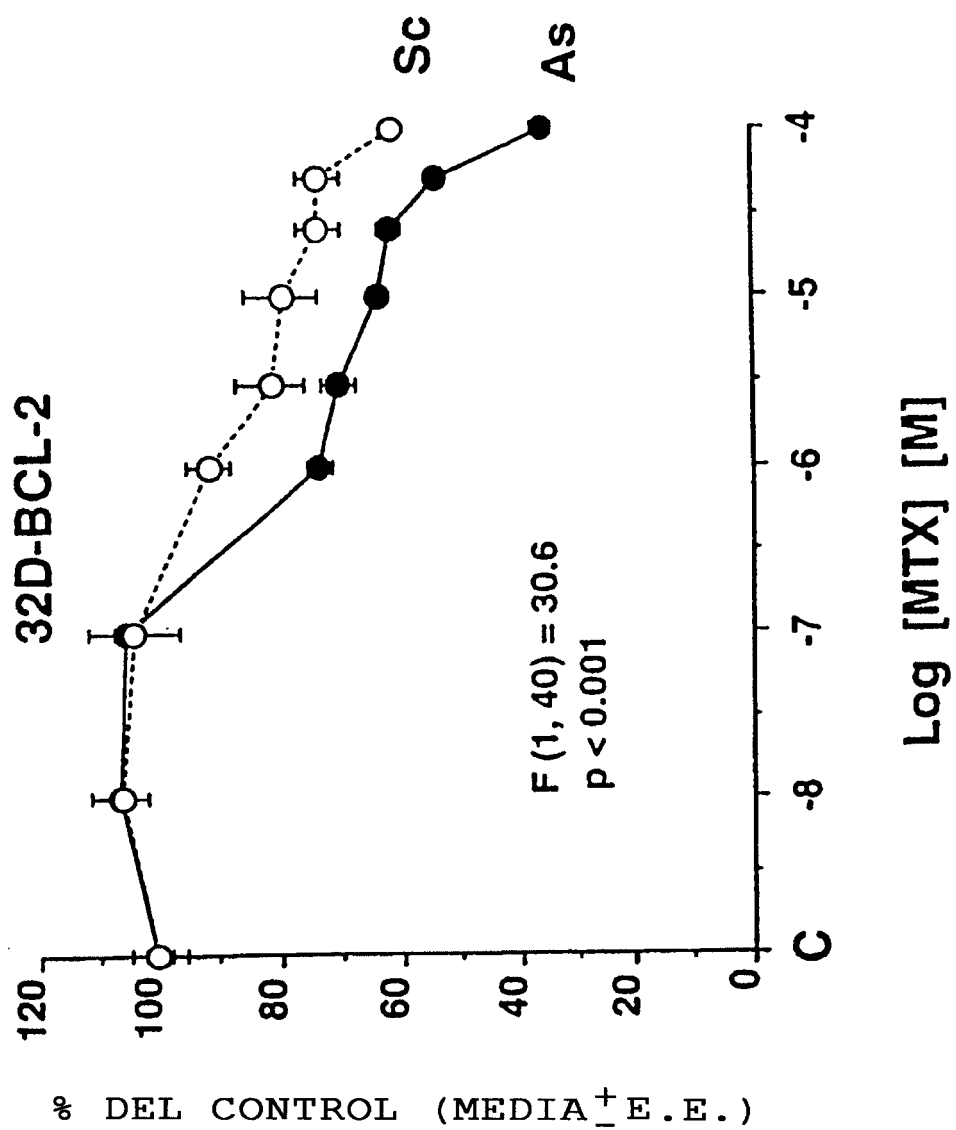


FIGURA 9 (b)

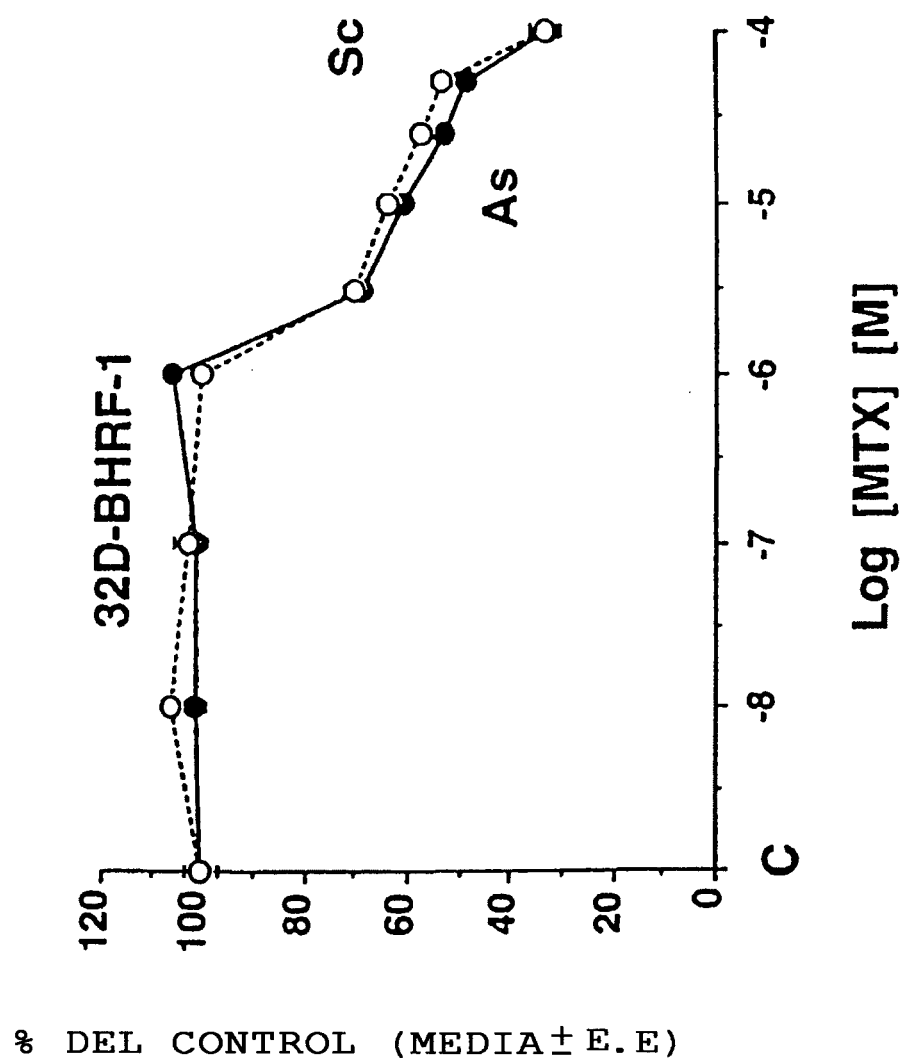


FIGURA 10A

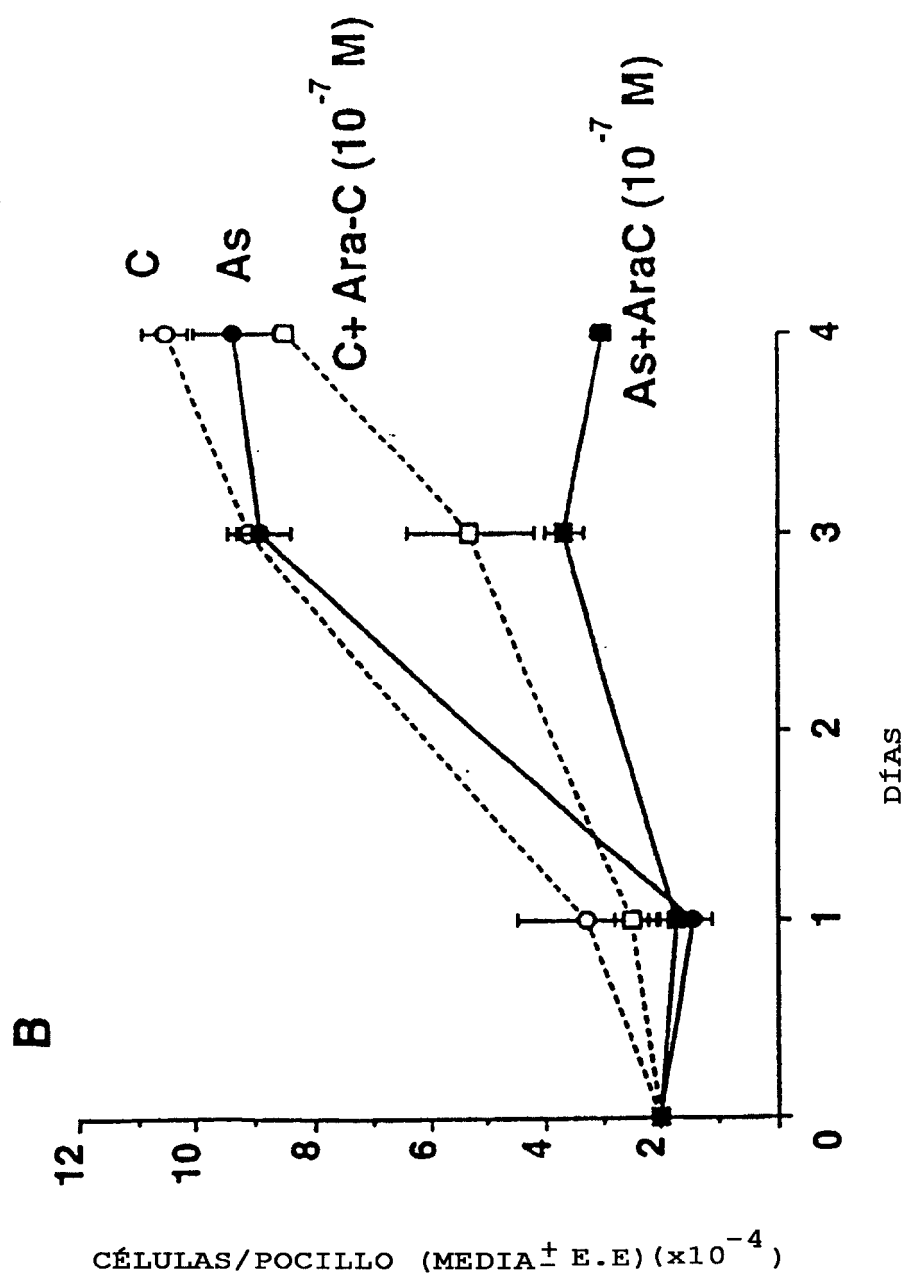
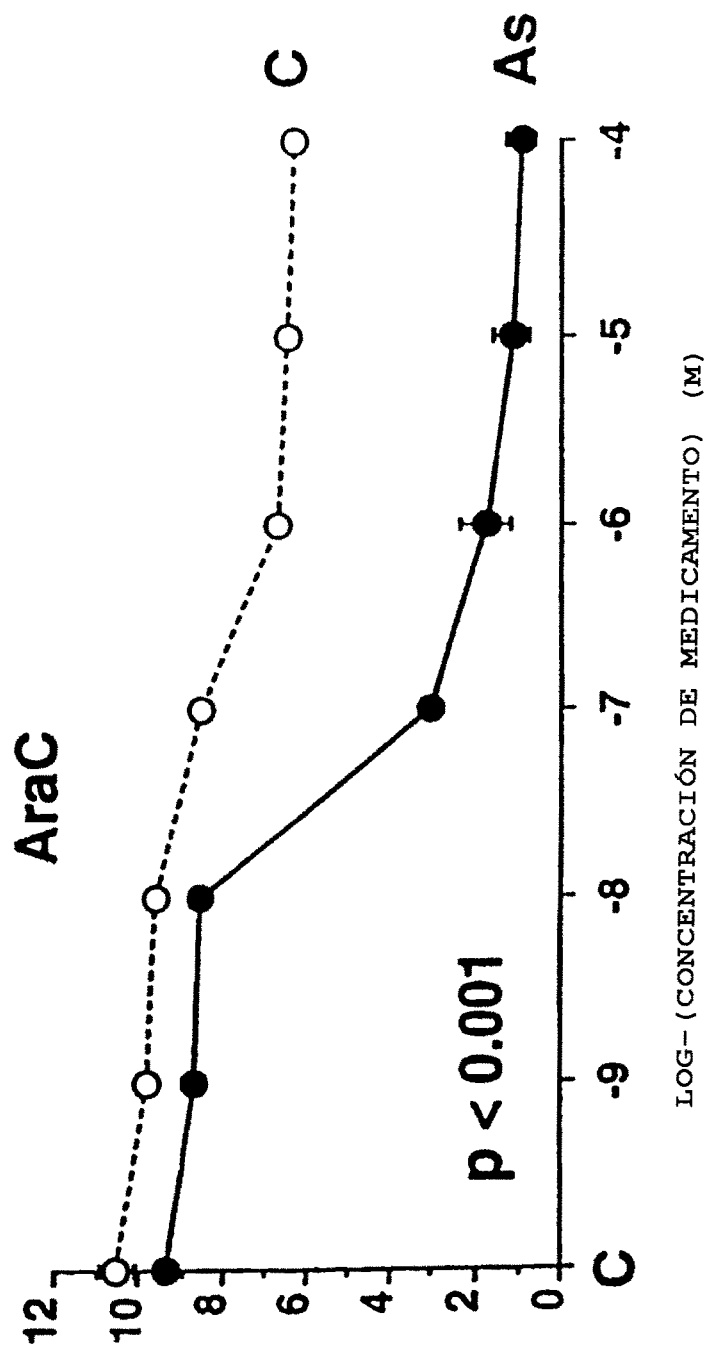


FIGURA 10B(1)



CÉULAS POCILLO (MEDIA $\pm$ E.E.) ($\times 10^{-4}$)

FIGURA 10B (2)

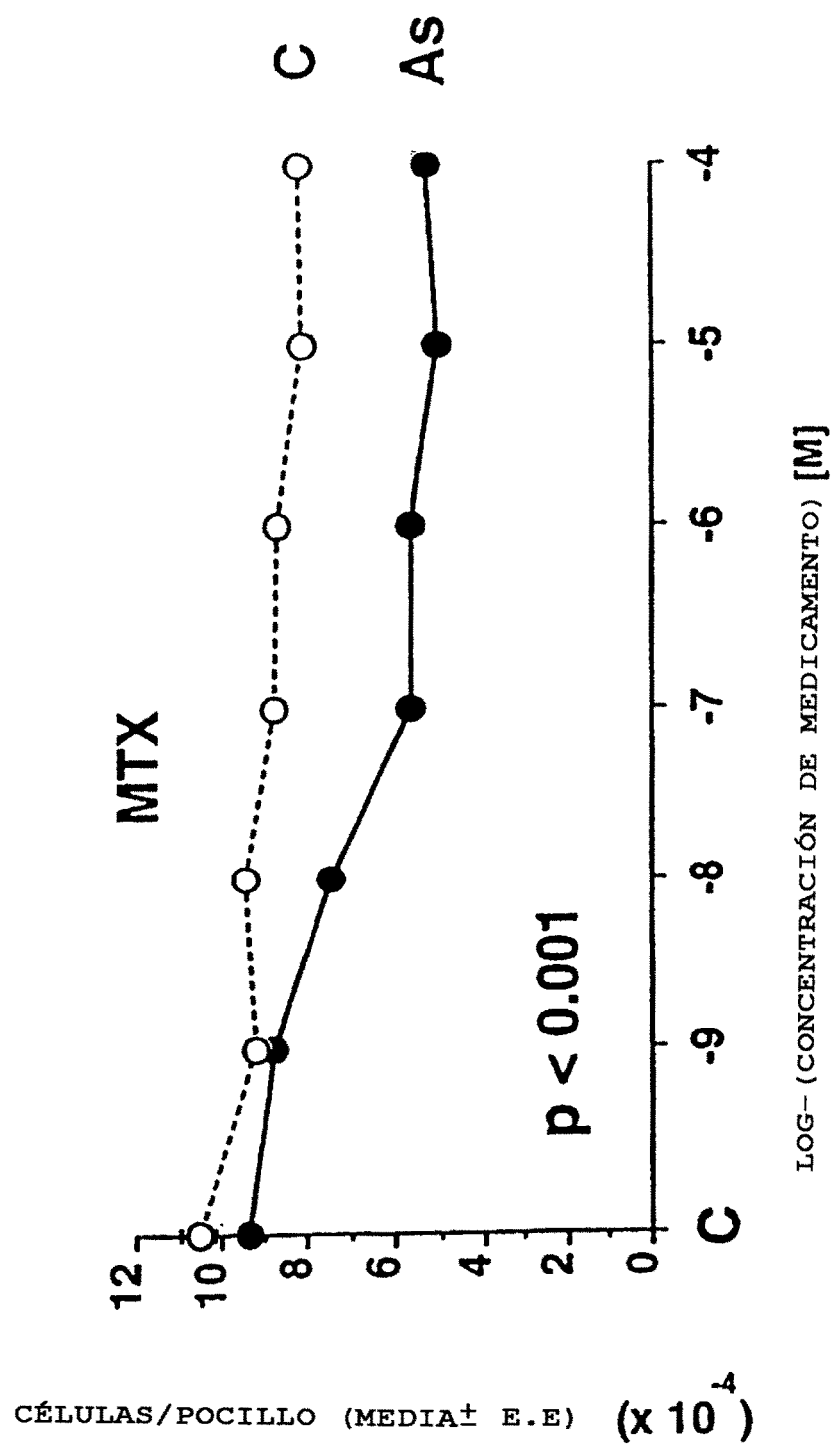
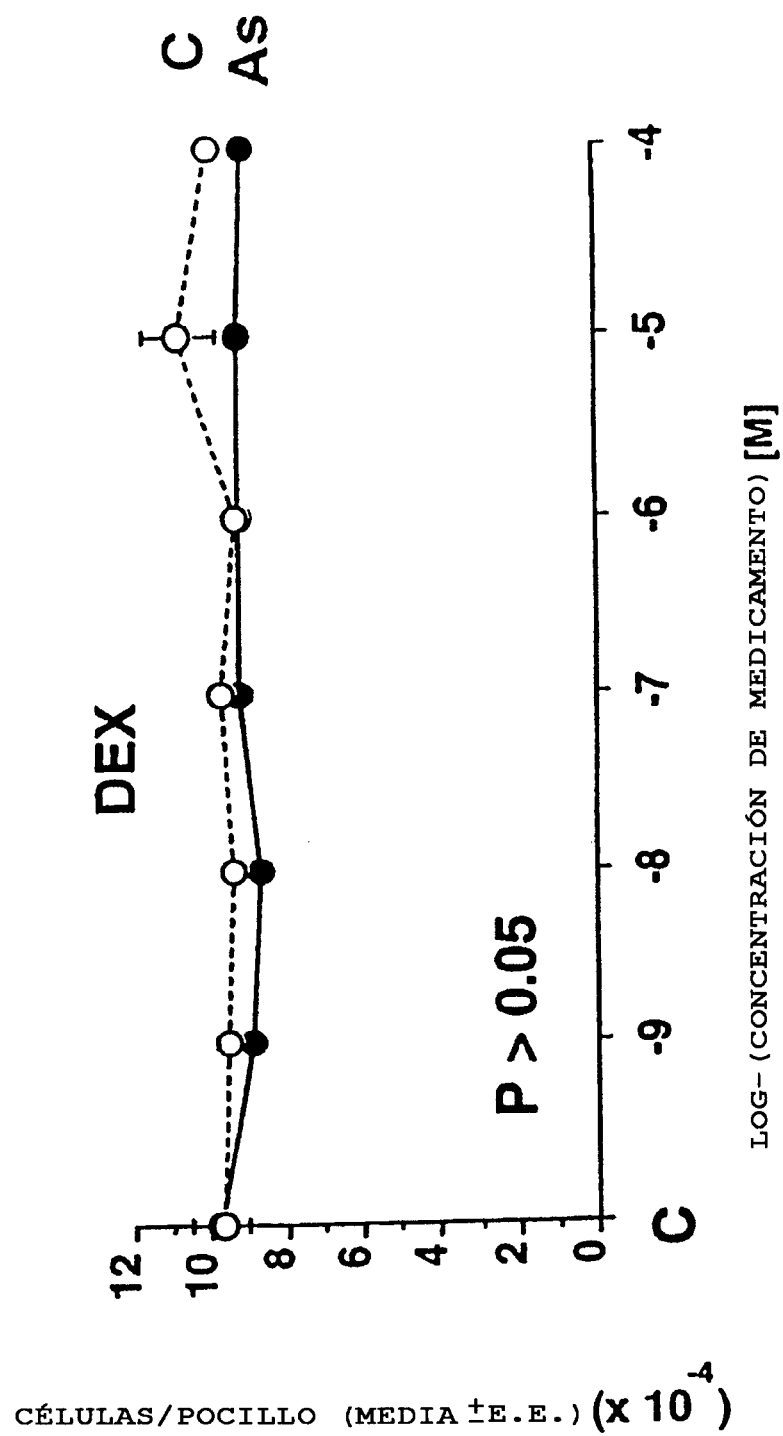


FIGURA 10B(3)



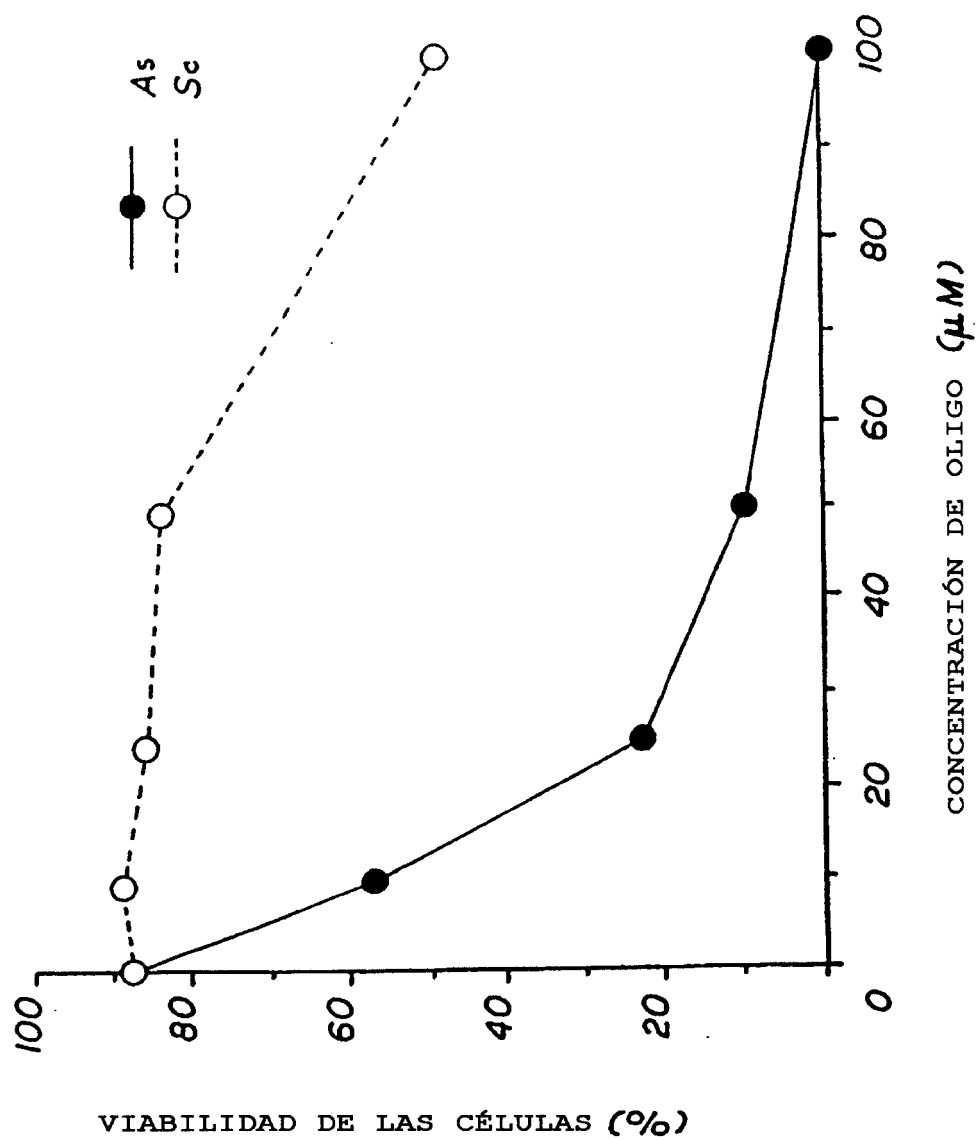


FIGURA 11

FIGURA 12

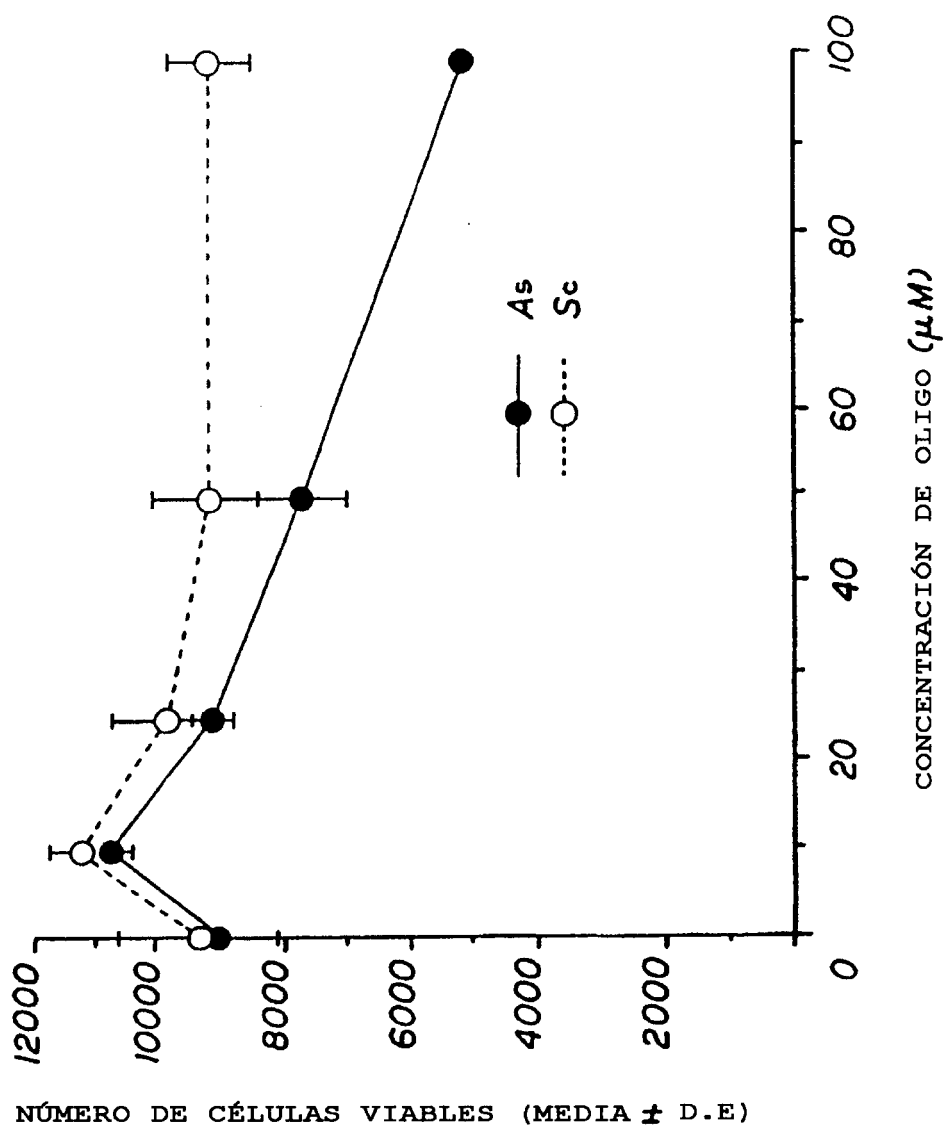
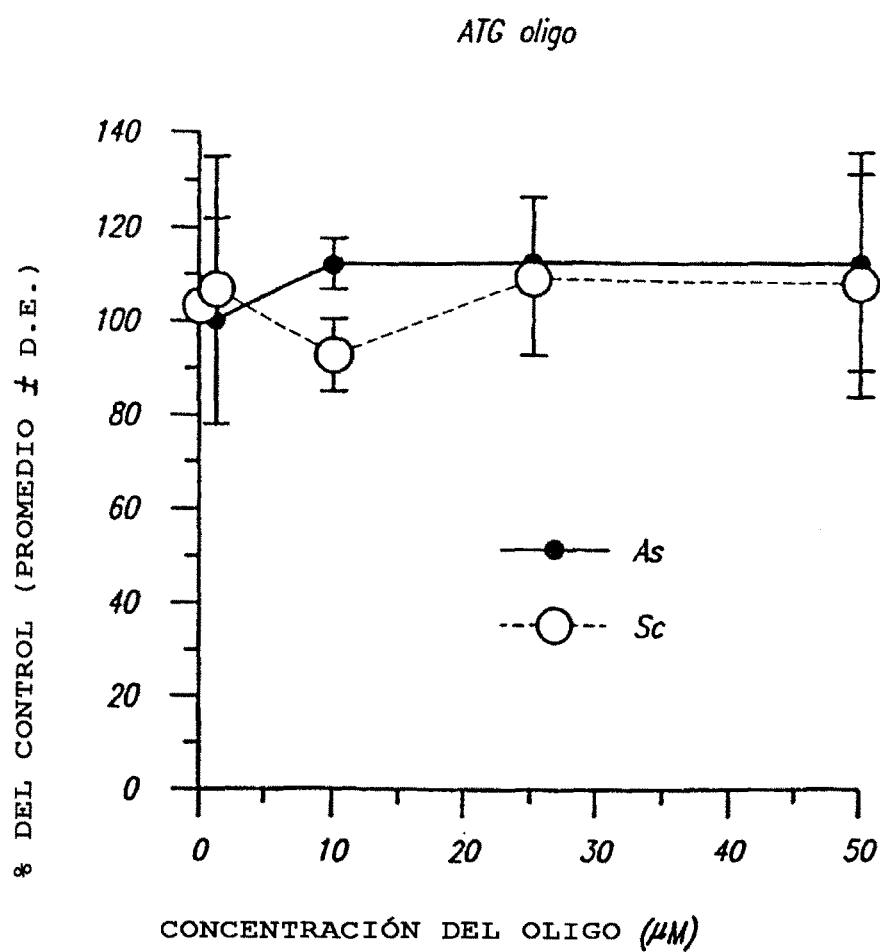
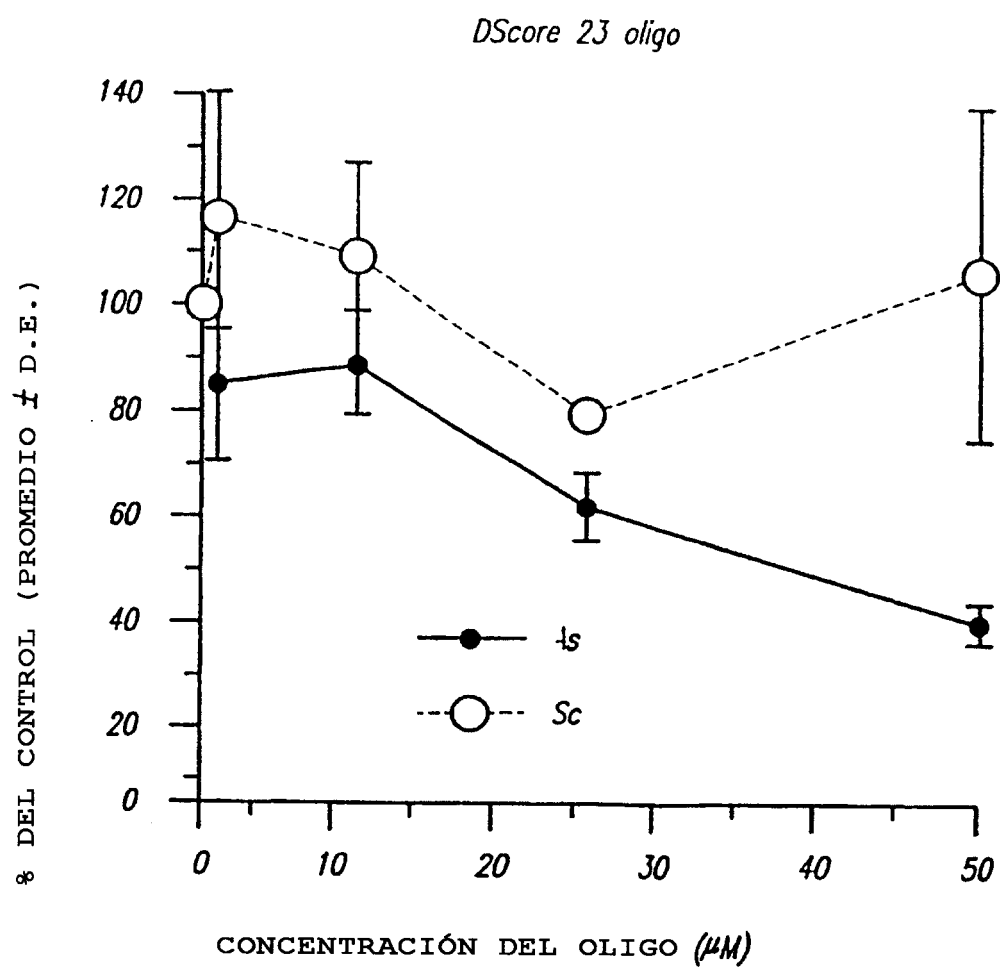


FIGURA 13 (a)



As-18' mer
 5'-TCTCCAGCGTGGCCAT-3'
Sc-18' mer
 5'-TGCACTCACGCTCGGCCT-3'

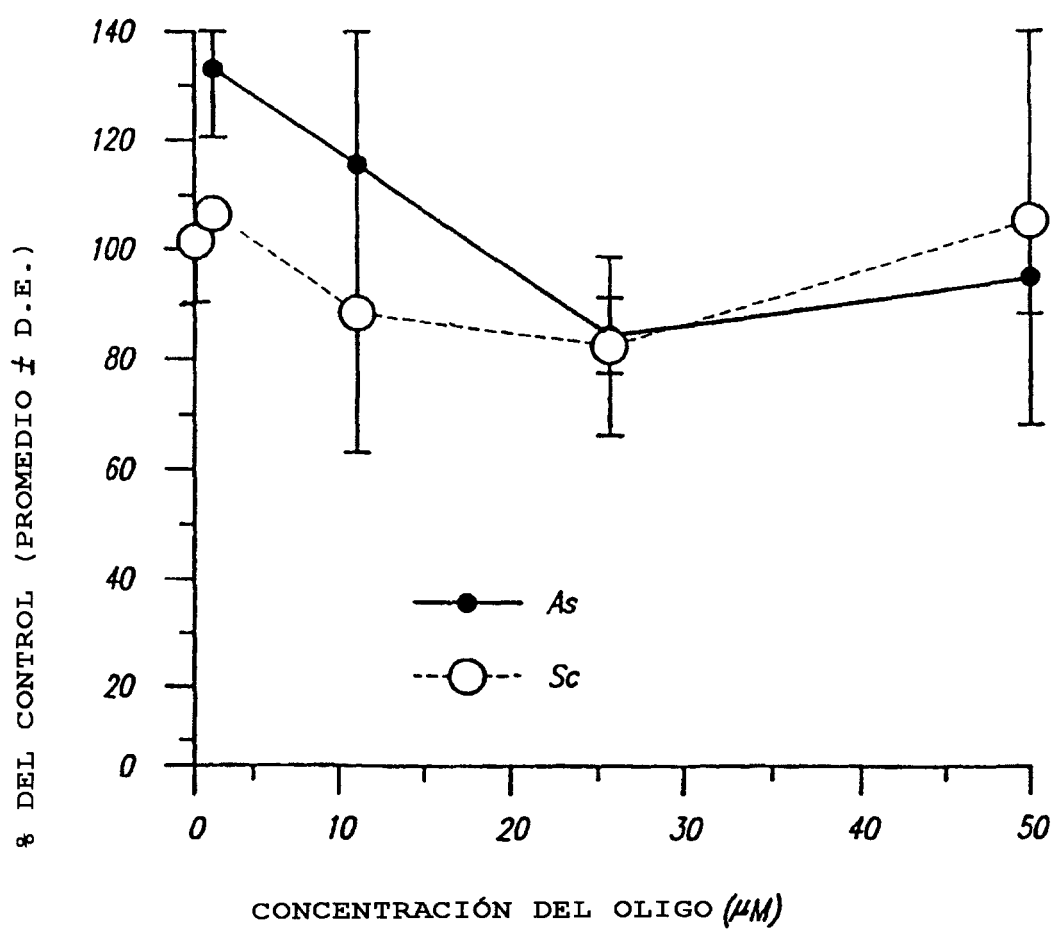
FIGURA 13 (b)



As23
 5'-GCGCGGCGGGCGGGCGGGCA-3'
 Sc23
 5'-GGGCGGAGGCCGGCCGGCCGG-3'

FIGURA 13 (c)

DScore 72



As72
 5'-AGCGGCGGCGGCGGCAGCGC-3'
 Sc72
 5'-GGGCCGGAAGGGCGCCCCG-3'

ES 2 326 118 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

- 5 (i) SOLICITANTE: FIDEICOMISIARIOS DE LA UNIVERSIDAD DE PENSILVANIA
(ii) TÍTULO DE LA INVENCION: Regulación de la expresión del gen bcl-2
(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 23
10 (iv) FORMATO DE LECTURA DEL ORDENADOR:
(A) TIPO DE MEDIO: Disco de 3,5 pulgadas, 1,44 Mb de almacenamiento
(B) ORDENADOR: PC COMPATIBLE IBM
15 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
(D) PROGRAMAS: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:1:

- 20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 20 pares de bases
(B) TIPO: Ácido nucleico
25 (C) ENCADENADO: simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal
(i) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
30 (ii) ANTISENTIDO: SI
(iii) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:1:

35 **CCCTTCCTAC CGCGTGCGAC**

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:2:

- 40 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 35 pares de bases
(B) TIPO: Ácido nucleico
45 (C) ENCADENADO: simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)
(iv) ANTISENTIDO: NO
50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:2:

55 **CTTTTCCTCT GGAAGGATG GCGCAGCTG GGAGA**

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:3:

- 60 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
(A) LONGITUD: 20 pares de bases
(B) TIPO: Ácido nucleico
(C) ENCADENADO: simple
65 (D) TOPOLOGÍA: lineal
(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

ES 2 326 118 T3

(iv) ANTISENTIDO: SI

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:3:

5 **CCTCCGACCC ATCCACGTAG**

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:4:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

 (A) LONGITUD: 33 pares de bases

 (B) TIPO: Ácido nucleico

15 (C) ENCADENADO: simple

 (D) TOPOLOGÍA: lineal

 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

20 (iv) ANTISENTIDO: NO

 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:4:

25 **ACGGGGTACG GAGGCTGGGT AGGTGCATCT GGT**

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:5:

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

 (A) LONGITUD: 20 pares de bases

 (B) TIPO: Ácido nucleico

35 (C) ENCADENADO: simple

 (D) TOPOLOGÍA: lineal

 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

40 (iv) ANTISENTIDO: SI

 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:5:

45 **GTTGACGTCC TACGGAACA**

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:6:

50 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

 (A) LONGITUD: 36 pares de bases

 (B) TIPO: Ácido nucleico

55 (C) ENCADENADO: simple

 (D) TOPOLOGÍA: lineal

 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

 (iv) ANTISENTIDO: NO

60 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:6:

CCCCCAACTG CAGGATGCCT TTGTGGAACGT GTACGG

65

ES 2 326 118 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) ENCADENADO: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:7:

GGGAAGGATG GCGCACGCTG

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) ENCADENADO: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iv) ANTISENTIDO: SI

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:8:

CGCGTGCGAC CCTCTTG

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) ENCADENADO: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iv) ANTISENTIDO: SI

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:9:

TACCGCGTGC GACCCTC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) ENCADENADO: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 326 118 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iv) ANTISENTIDO: SI

5 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:10:

TCCTACCGCG TGCAGCC

10 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 pares de bases

15 (B) TIPO: Ácido nucleico

(C) ENCADENADO: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iv) ANTISENTIDO: SI

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:11:

25

CCTTCCTACC GCGTGCG

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:12:

30

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

35 (C) ENCADENADO: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

40

(iv) ANTISENTIDO: SI

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:12:

45

GACCCTTCCT ACCGCGT

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:13:

50

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 17 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

55 (C) ENCADENADO: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

60

(iv) ANTISENTIDO: SI

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:13:

GGAGACCCTT CCTACCG

65

ES 2 326 118 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) ENCADENADO: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iv) ANTISENTIDO: SI

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:14:

GCGGCGGCAG CGCGG

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) ENCADENADO: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iv) ANTISENTIDO: SI

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:15:

CGGCGGGGCG ACGGA

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 16 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) ENCADENADO: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iv) ANTISENTIDO: SI

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:16:

CGGGAGCGCG GCGGGC

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) ENCADENADO: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:17:

TCTCCCAGCG TGCGCCAT

5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 18 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) ENCADENADO: simple

15

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:18:

TGCACTCAGC CTCGGCCT

20

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

25

(A) LONGITUD: 5086 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) ENCADENADO: simple

30

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:19:

35

GCGCCCGCCC CTCCGCGCCG CCTGCCCGCC CGCCCGCCGC GCTCCCGCCC GCCGCTCTCC	60
GTGGCCCCGC CGCGCTGCCG CCGCCGCGGC TGCCAGCGAA GGTGCCGGGG CTCCGGGCCC	120
TCCCTGCCGG CGGCCGTCAG CGCTCGGAGC GAACTGCGCG ACGGGAGGTC CGGGAGGCGA	180
CCGTAGTCGC GCCGCCGCGC AGGACCAGGA GGAGGAGAAA GGGTGCGCAG CCCGGAGGCG	240
GGGTGCGCCG GTGGGGTGCA GCGGAAGAGG GGGTCCAGGG GGGAGAACTT CGTAGCAGTC	300
ATCCTTTTTA GGAAAAGAGG GAAAAAATAA AACCTCTCCC CACCACCTCC TTCTCCCCAC	360
CCCTCGCCGC ACCACACACA GCGCGGGCTT CTAGCGCTCG GCACCGGCGG GCCAGGCGCG	420
TCCTGCCTTC ATTTATCCAG CAGCTTTTCG GAAATGTCAT TTGCTGTTCC GAGTTTAATC	480
AGAAGACGAT TCCTGCCTCC GTCCCGGGCT CCTTCATCGT CCCATCTCCC CTGTCTCTCT	540
CCTGGGGAGG CGTGAAGCGG TCCCGTGGAT AGAGATTCAT GCCTGTGTCC GCGCGTGTGT	600
GCGCGCGTAT AAATTGCCGA GAAGGGGAAA ACATCACAGG ACTTCTGCGA ATACCGGACT	660
GAAAATTGTA ATTCATCTGC CGCCGCCGCT GCCAAAAAAA AACTCGAGCT CTTGAGATCT	720
CCGGTTGGGA TTCCTGCGGA TTGACATTTT TGTGAAGCAG AAGTCTGGGA ATCGATCTGG	780
AAATCCTCCT AATTTTACT CCCTCTCCCC CCGACTCCTG ATTCATTGGG AAGTTTCAAA	840
TCAGCTATAA CTGGAGAGTG CTGAAGATTG ATGGGATCGT TGCCTTATGC ATTTGTTTGT	900
GTTTTACAAA AAGGAACTT GACAGAGGAT CATGCTGTAC TTAATAAATA CAAGTAAGTC	960
TCGCACAGGA AATTGGTTTA ATGTAACCTT CAATGGAAC CTTTGAGATT TTTTACTTAA	1020
AGTGCATTTC AGTAAATTTA ATTTCCAGGC AGCTTAATAC ATTGTTTTTA GCCGTGTTAC	1080
TTGTAGTGTG TATGCCCTGC TTCACTCAG TGTGTACAGG GAAACGCACC TGATTTTTTA	1140
CTTATTAGTT TGTTTTTCT TTAACCTTTC AGCATCACAG AGGAAGTAGA CTGATATTAA	1200
CAATACTTAC TAATAATAAC GTGCCTCATG AAATAAAGAT CCGAAAGGAA TTGGAATAAA	1260
AATTCCTGCT GTCTCATGCC AAGAGGGAAA CACCAGAATC AAGTGTTCCG CGTGATTGAA	1320

65

ES 2 326 118 T3

	GACACCCCTT	CGTCCAAGAA	TGCAAAGCAC	ATCCAATAAA	ATAGCTGGAT	TATAACTCCT	1380
	CTTCTTTCTC	TGGGGGCCGT	GGGGTGGGAG	CTGGGGCGAG	AGGTGCCGTT	GGCCCCCGTT	1440
5	GCTTTTCCTC	TGGGAAGGAT	GGCGCACGCT	GGGAGAACGG	GGTACGACAA	CCGGGAGATA	1500
	GTGATGAAGT	ACATCCATTA	TAAGCTGTCT	CAGAGGGGCT	ACGAGTGGGA	TGCGGGAGAT	1560
	GTGGGCGCCG	CGCCCCCGGG	GGCCGCCCCC	GCACCGGGCA	TCTTCTCCTC	CCAGCCCCGG	1620
10	CACACGCCCC	ATCCAGCCGC	ATCCCGCGAC	CCGGTCGCCA	GGACCTCGCC	GCTGCAGACC	1680
	CCGGCTGCCC	CCGGCGCCGC	CGCGGGGCTT	GCGCTCAGCC	CGGTGCCACC	TGTGGTCCAC	1740
	CTGGCCCTCC	GCCAAGCCGG	CGACCACTTC	TCCCGCCGCT	ACCGCGGCGA	CTTCGCCGAG	1800
15	ATGTCCAGCC	AGCTGCACCT	GACGCCCTTC	ACCGCGCGGG	GACGCTTTGC	CACGGTGGTG	1860
	GAGGAGCTCT	TCAGGGACGG	GGTGAAGTGG	GGGAGGATTG	TGGCCTTCTT	TGAGTTCGGT	1920
	GGGGTCATGT	GTGTGGAGAG	CGTCAACCGG	GAGATGTCTG	CCCTGGTGGA	CAACATCGCC	1980
20	CTGTGGATGA	CTGAGTACCT	GAACCGGCAC	CTGCACACCT	GGATCCAGGA	TAACGGAGGC	2040
	TGGGATGCCT	TTGTGGAAGT	GTACGGCCCC	AGCATGCGGC	CTCTGTTTGA	TTTCTCCTGG	2100
	CTGTCTCTGA	AGACTCTGCT	CAGTTTGGCC	CTGGTGGGAG	CTTGCATCAC	CCTGGGTGCC	2160
25	TATCTGAGCC	ACAAGTGAAG	TCAACATGCC	TGCCCCAAAC	AAATATGCAA	AAGGTTCACT	2220
	AAAGCAGTAG	AAATAATATG	CATTGTCTAGT	GATGTACCAT	GAAACAAAGC	TGCAGGCTGT	2280
	TTAAGAAAAA	ATAACACACA	TATAAACATC	ACACACACAG	ACAGACACAC	ACACACACAA	2340
30	CAATTAACAG	TCTTCAGGCA	AAACGTCGAA	TCAGCTATTT	ACTGCCAAAG	GGAAATATCA	2400
	TTTATTTTTT	ACATTATTAA	GAAAAAAGAT	TTATTTATTT	AAGACAGTCC	CATCAAAACT	2460
35	CCGTCTTTGG	AAATCCGACC	ACTAATTGCC	AAACACCGCT	TCGTGTGGCT	CCACCTGGAT	2520
	GTTCTGTGCC	TGTAAACATA	GATTCGCTTT	CCATGTTGTT	GGCCGGATCA	CCATCTGAAG	2580
	AGCAGACGGA	TGGAAAAAGG	ACCTGATCAT	TGGGGAAGCT	GGCTTTCTGG	CTGCTGGAGG	2640
40	CTGGGGAGAA	GGTGTTTATT	CATTGTCATT	TCTTTGCCCT	GGGGGCGTGA	TATTAACAGA	2700
	GGGAGGGTTC	CCGTGGGGGG	AAGTCCATGC	CTCCCTGGCC	TGAAGAAGAG	ACTCTTTGCA	2760
	TATGACTCAC	ATGATGCATA	CCTGGTGGGA	GGAAAAGAGT	TGGGAAGTTC	AGATGGACCT	2820
45	AGTACCCACT	GAGATTTCCA	CGCCGAAGGA	CAGCGATGGG	AAAAATGCCC	TTAAATCATA	2880
	GGAAAGTATT	TTTTTAAGCT	ACCAATTGTG	CCGAGAAAAG	CATTTTAGCA	ATTTATACAA	2940
	TATCATCCAG	TACCTTAAAC	CCTGATTGTG	TATATTCATA	TATTTTGGAT	ACGCACCCCC	3000

ES 2 326 118 T3

	CAACTCCCAA TACTGGCTCT GTCTGAGTAA GAAACAGAAT CCTCTGGAAC TTGAGGAAGT	3060
	GAACATTTCG GTGACTTCCG ATCAGGAAGG CTAGAGTTAC CCAGAGCATC AGGCCGCCAC	3120
5	AAGTGCCTGC TTTTAGGAGA CCGAAGTCCG CAGAACCTAC CTGTGTCCCA GCTTGAGGGC	3180
	CTGGTCTTGG AACTGAGCCG GGCCTCACT GGCCTCCTCC AGGGATGATC AACAGGCTAG	3240
	TGTGGTCTCC GAATGTCTGG AAGCTGATGG ATGGAGCTCA GAATTCCACT GTCAAGAAAG	3300
10	AGCAGTAGAG GGGTGTGGCT GGGCCTGTCA CCCTGGGGCC CTCCAGGTAG GCCCCTTTTC	3360
	ACGTGGAGCA TAGGAGCCAC GACCCTTCTT AAGACATGTA TCACTGTAGA GGAAGGAAC	3420
	AGAGGCCCTG GGCCTTCCTA TCAGAAGGAC ATGGTGAAGG CTGGGAACGT GAGGAGAGGC	3480
15	AATGGCCACG GCCCATTTTG GCTGTAGCAC ATGGCACGTT GGCTGTGTGG CCTTGGCCAC	3540
	CTGTGAGTTT AAAGCAAGGC TTTAAATGAC TTTGGAGAGG GTCACAAATC CTAAGAAG	3600
	CATTGAAGTG AGGTGTCATG GATTAATTGA CCCCTGTCTA TGGAAATACA TGTAACAT	3660
20	TATCTTGTC A CTGTAGTTTG GTTTTATTTG AAAACCTGAC AAAAAAAG TTCCAGGTGT	3720
	GGAATATGGG GGTATCTGT ACATCCTGGG GCATTAAAAA AAAATCAATG GTGGGGAAC	3780
	ATAAGAAGT AACAAAAGAA GTGACATCTT CAGCAAATAA ACTAGGAAAT TTTTTTTCT	3840
25	TCCAGTTTAG AATCAGCCTT GAAACATTGA TGGAAATACT CTGTGGCATT ATTGCATTAT	3900
	ATACCATTTA TCTGTATTAA CTTTGGAAATG TACTCTGTTT AATGTTTAAT GCTGTGGTTG	3960
30	ATATTTGAA AGCTGCTTTA AAAAAATACA TGCACTCAG CGTTTTTTTG TTTTAATTG	4020
	TATTTAGTTA TGGCCTATAC ACTATTTGTG AGCAAAGGTG ATCGTTTTCT GTTTGAGATT	4080
	TTTATCTCTT GATTCTTCAA AAGCATTCTG AGAAGGTGAG ATAAGCCCTG AGCTCTCAGCT	4140
35	ACCTAAGAAA AACCTGGATG TCACTGGCCA CTGAGGAGCT TTGTTTCAAC CAAGTCATGT	4200
	GCATTTCCAC GTCAACAGAA TTGTTTATTG TGACAGTTAT ATCTGTTGTC CCTTGACCT	4260
	TGTTTCTTGA AGGTTTCCTC GTCCCTGGGC AATTCCGCAT TTAATTCATG GTATTGAGGA	4320
40	TTACATGCAT GTTTGGTTAA ACCCATGAGA TTCATTCACT TAAAAATCCA GATGGCGAAT	4380
	GACCAGCAGA TTCAAATCTA TGGTGGTTTG ACCTTTAGAG AGTTGCTTTA CGTGGCCTGT	4440
	TTCAACACAG ACCCACCAG AGCCCTCCTG CCCTCCTTCC GCGGGGGCTT TCTCATGGCT	4500
45	GTCTTCAGG GTCTTCCTGA AATGCAGTGG TCGTTACGCT CCACCAAGAA AGCAGGAAAC	4560
	CTGTGGTATG AAGCCAGACC TCCCCGGCGG GCCTCAGGGA ACAGAATGAT CAGACCTTTG	4620
	AATGATTCTA ATTTTAAAGC AAAATATTAT TTTATGAAAG GTTTACATTG TCAAAGTGAT	4680
50	GAATATGGAA TATCCAATCC TGTGCTGCTA TCCTGCCAAA ATCATTTTAA TGGAGTCAGT	4740
	TTGCAGTATG CTCCACGTGG TAAGATCCTC CAAGCTGCTT TAGAAGTAAC AATGAAGAAC	4800
55	GTGGACGTTT TTAATATAAA GCCTGTTTTG TCTTTGTTG TTGTTCAAAC GGGATTCAAC	4860
	GAGTATTTGA AAAATGTATA TATATTAAGA GGTACGGGG GCTAATTGCT AGCTGGCTGC	4920
	CTTTTGCTGT GGGGTTTTGT TACCTGGTTT TAATAACAGT AAATGTGCCC AGCCTCTTGG	4980
60	CCCCAGAAGT GTACAGTATT GTGGCTGCAC TTGCTCTAAG AGTAGTTGAT GTTGCAATTT	5040
	CCTTATTGTT AAAACATGT TAGAAGCAAT GAATGTATAT AAAAGC	5086

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 717 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) ENCADENADO: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) UBICACIÓN: 1..717

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:20:

20	ATG GCG CAC GCT GGG AGA ACG GGG TAC GAC AAC CGG GAG ATA GTG ATG	48
	Met Ala His Ala Gly Arg Thr Gly Tyr Asp Asn Arg Glu Ile Val Met	
	1 5 10 15	
	AAG TAC ATC CAT TAT AAG CTG TCG CAG AGG GGC TAC GAG TGG GAT GCG	96
	Lys Tyr Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Gly Tyr Glu Trp Asp Ala	
	20 25 30	
	GGA GAT GTG GGC GCC GCG CCC CCG GGG GCC GCC CCC GCA CCG GGC ATC	144
	Gly Asp Val Gly Ala Ala Pro Pro Gly Ala Ala Pro Ala Pro Gly Ile	
	35 40 45	
	TTC TCC TCC CAG CCC GGG CAC ACG CCC CAT CCA GCC GCA TCC CGC GAC	192
	Phe Ser Ser Gln Pro Gly His Thr Pro His Pro Ala Ala Ser Arg Asp	
	50 55 60	
	CCG GTC GCC AGG ACC TCG CCG CTG CAG ACC CCG GCT GCC CCC GGC GCC	240
	Pro Val Ala Arg Thr Ser Pro Leu Gln Thr Pro Ala Ala Pro Gly Ala	
	65 70 75 80	
	GCC GCG GGG CCT GCG CTC AGC CCG GTG CCA CCT GTG GTC CAC CTG GCC	288
	Ala Ala Gly Pro Ala Leu Ser Pro Val Pro Pro Val Val His Leu Ala	
	85 90 95	
	CTC CGC CAA GCC GGC GAC GAC TTC TCC CGC CGC TAC CGC GGC GAC TTC	336
	Leu Arg Gln Ala Gly Asp Asp Phe Ser Arg Arg Tyr Arg Gly Asp Phe	
	100 105 110	
	GCC GAG ATG TCC AGC CAG CTG CAC CTG ACG CCC TTC ACC GCG CGG GGA	384
	Ala Glu Met Ser Ser Gln Leu His Leu Thr Pro Phe Thr Ala Arg Gly	
	115 120 125	
	CGC TTT GCC ACG GTG GTG GAG GAG CTC TTC AGG GAC GGG GTG AAC TGG	432
	Arg Phe Ala Thr Val Val Glu Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp	
	130 135 140	
	GGG AGG ATT GTG GCC TTC TTT GAG TTC GGT GGG GTC ATG TGT GTG GAG	480
	Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe Glu Phe Gly Gly Val Met Cys Val Glu	
	145 150 155 160	
	AGC GTC AAC CGG GAG ATG TCG CCC CTG GTG GAC AAC ATC GCC CTG TGG	528
	Ser Val Asn Arg Glu Met Ser Pro Leu Val Asp Asn Ile Ala Leu Trp	
	165 170 175	
	ATG ACT GAG TAC CTG AAC CGG CAC CTG CAC ACC TGG ATC CAG GAT AAC	576
	Met Thr Glu Tyr Leu Asn Arg His Leu His Thr Trp Ile Gln Asp Asn	
	180 185 190	
	GGA GGC TGG GAT GCC TTT GTG GAA CTG TAC GGC CCC AGC ATG CGG CCT	624
	Gly Gly Trp Asp Ala Phe Val Glu Leu Tyr Gly Pro Ser Met Arg Pro	
	195 200 205	
	CTG TTT GAT TTC TCC TGG CTG TCT CTG AAG ACT CTG CTC AGT TTG GCC	672
	Leu Phe Asp Phe Ser Trp Leu Ser Leu Lys Thr Leu Leu Ser Leu Ala	
	210 215 220	
	CTG GTG GGA GCT TGC ATC ACC CTG GGT GCC TAT CTG AGC CAC AAG	717
	Leu Val Gly Ala Cys Ile Thr Leu Gly Ala Tyr Leu Ser His Lys	
	225 230 235	

ES 2 326 118 T3

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 239 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:21:

```

Met Ala His Ala Gly Arg Thr Gly Tyr Asp Asn Arg Glu Ile Val Met
 1           5           10           15

Lys Tyr Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Gly Tyr Glu Trp Asp Ala
          20           25           30

Gly Asp Val Gly Ala Ala Pro Pro Gly Ala Ala Pro Ala Pro Gly Ile
          35           40           45

Phe Ser Ser Gln Pro Gly His Thr Pro His Pro Ala Ala Ser Arg Asp
 50           55           60

Pro Val Ala Arg Thr Ser Pro Leu Gln Thr Pro Ala Ala Pro Gly Ala
 65           70           75           80

Ala Ala Gly Pro Ala Leu Ser Pro Val Pro Pro Val Val His Leu Ala
          85           90           95

Leu Arg Gln Ala Gly Asp Asp Phe Ser Arg Arg Tyr Arg Gly Asp Phe
        100           105           110

Ala Glu Met Ser Ser Gln Leu His Leu Thr Pro Phe Thr Ala Arg Gly
        115           120           125

Arg Phe Ala Thr Val Val Glu Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp
        130           135           140

Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe Glu Phe Gly Gly Val Met Cys Val Glu
        145           150           155           160

Ser Val Asn Arg Glu Met Ser Pro Leu Val Asp Asn Ile Ala Leu Trp
        165           170           175

Met Thr Glu Tyr Leu Asn Arg His Leu His Thr Trp Ile Gln Asp Asn
        180           185           190

Gly Gly Trp Asp Ala Phe Val Glu Leu Tyr Gly Pro Ser Met Arg Pro
        195           200           205

Leu Phe Asp Phe Ser Trp Leu Ser Leu Lys Thr Leu Leu Ser Leu Ala
        210           215           220

Leu Val Gly Ala Cys Ile Thr Leu Gly Ala Tyr Leu Ser His Lys
        225           230           235

```

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:22:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 615 pares de bases

(B) TIPO: Ácido nucleico

(C) ENCADENADO: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 326 118 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: CDS

(B) UBICACION: 1..615

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:22:

10	ATG GCG CAC GCT GGG AGA ACG GGG TAC GAC AAC CGG GAG ATA GTG ATG	48
	Met Ala His Ala Gly Arg Thr Gly Tyr Asp Asn Arg Glu Ile Val Met	
	1 5 10 15	
15	AAG TAC ATC CAT TAT AAG CTG TCG CAG AGG GGC TAC GAG TGG GAT GCG	96
	Lys-Tyr Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Gly Tyr Glu Trp Asp Ala	
	20 25 30	
20	GGA GAT GTG GGC GCC GCG CCC CCG GGG GCC GCC CCC GCA CCG GGC ATC	144
	Gly Asp Val Gly Ala Ala Pro Pro Gly Ala Ala Pro Ala Pro Gly Ile	
	35 40 45	
25	TTC TCC TCC CAG CCC GGG CAC ACG CCC CAT CCA GCC GCA TCC CGC GAC	192
	Phe Ser Ser Gln Pro Gly His Thr Pro His Pro Ala Ala Ser Arg Asp	
	50 55 60	
30	CCG GTC GCC AGG ACC TCG CCG CTG CAG ACC CCG GCT GCC CCC GGC GCC	240
	Pro Val Ala Arg Thr Ser Pro Leu Gln Thr Pro Ala Ala Pro Gly Ala	
	65 70 75 80	
35	GCC GCG GGG CCT GCG CTC AGC CCG GTG CCA CCT GTG GTC CAC CTG GCC	288
	Ala Ala Gly Pro Ala Leu Ser Pro Val Pro Pro Val Val His Leu Ala	
	85 90 95	
40	CTC CGC CAA GCC GGC GAC GAC TTC TCC CGC CGC TAC CGC GGC GAC TTC	336
	Leu Arg Gln Ala Gly Asp Asp Phe Ser Arg Arg Tyr Arg Gly Asp Phe	
	100 105 110	
45	GCC GAG ATG TCC AGC CAG CTG CAC CTG ACG CCC TTC ACC GCG CGG GGA	384
	Ala Glu Met Ser Ser Gln Leu His Leu Thr Pro Phe Thr Ala Arg Gly	
	115 120 125	
50	CGC TTT GCC ACG GTG GTG GAG GAG CTC TTC AGG GAC GGG GTG AAC TGG	432
	Arg Phe Ala Thr Val Val Glu Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp	
	130 135 140	
55	GGG AGG ATT GTG GCC TTC TTT GAG TTC GGT GGG GTC ATG TGT GTG GAG	480
	Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe Glu Phe Gly Gly Val Met Cys Val Glu	
	145 150 155 160	
60	AGC GTC AAC CGG GAG ATG TCG CCC CTG GTG GAC AAC ATC GCC CTG TGG	528
	Ser Val Asn Arg Glu Met Ser Pro Leu Val Asp Asn Ile Ala Leu Trp	
	165 170 175	
65	ATG ACT GAG TAC CTG AAC CGG CAC CTG CAC ACC TGG ATC CAG GAT AAC	576
	Met Thr Glu Tyr Leu Asn Arg His Leu His Thr Trp Ile Gln Asp Asn	
	180 185 190	
70	GGA GGC TGG GTA GGT GCA TCT GGT GAT GTG AGT CTG GGC	615
	Gly Gly Trp Val Gly Ala Ser Gly Asp Val Ser Leu Gly	
	195 200 205	

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO:23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 205 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

ES 2 326 118 T3

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:23:

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