



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 280 098**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C07H 21/02 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

A61K 31/505 (2006.01)

C07D 239/95 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **98942944 .4**

(86) Fecha de presentación : **17.09.1998**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1017800**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **12.07.2000**

(54) Título: **Oligonucleótidos antisentido contra timidilato sintasa.**

(30) Prioridad: **23.09.1997 GB 9720107**
17.10.1997 GB 9722012
06.06.1998 GB 9812140

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.09.2007

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.09.2007

(73) Titular/es: **Sarissa, Inc.**
790 Commissioners Road East
London, Ontario N6A 4L6, CA
ISIS PHARMACEUTICALS, Inc.

(72) Inventor/es: **Koropatnick, Donald James;**
Vincent, Mark, David y
Dean, Nicholas, Mark

(74) Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

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

Oligonucleótidos antisentido contra timidilato sintasa.

Esta invención se relaciona a los oligodeoxinucleótidos antisentido dirigidos a las secuencias del mRNA del timidilato sintasa (TS). En particular, la invención se relaciona a oligodeoxinucleótidos antisentido dirigidos a secuencias en el extremo de 3' del mRNA 5 del TS, que son oligodeoxinucleótidos antisentido tanto cistostáticos en sí mismos cuando se administran a las líneas de células de tumores humanos, como también incrementan la toxicidad de las drogas anticancerígenas, tales como TomudexTM administrada a dichas células. En contraste, los oligodeoxinucleótidos antisentido dirigidos a secuencias en o cerca del sitio de inicio de la translación en el extremo de 5' del mRNA de TS puede ser que no tenga efecto, o incrementa el crecimiento de las células, cuando se administra en sí mismo. Además, los ácidos nucleicos antisentido dirigidos a estas secuencias de 5' (pero no secuencias de 3') inducen la transcripción del gen del TS. La invención también se relaciona a un producto de combinación que consta en un oligodeoxinucleótido antisentido en combinación con un agente anticancerígeno como TomudexTM (N-(5-[N-(3,4-deshidro-2-metileno-4-oxoquinazolina-6-ilmetilo)-N-metilamino]-2-tenoilo)-L-ácido glutámico) o el compuesto de desarrollo de ZenecaTM ZD 9331 ((S)-2-(2-fluoro-4-[N-(4-hidroxi-2,7-dimetilquinazolin-6-ilmetilo)-N-(prop-2-ynil)amino]benzamido)-4-(1H-1,2,3,4-tetrazol-5-yl)ácido butírico), y para el uso de dicho producto de combinación en el tratamiento del cáncer.

El timidilato sintasa (TS) (EC 2.1.1.45) cataliza la conversión de deoxiuridilato a timidilato, y es una enzima de cuidado doméstico esencial para la síntesis intracelular de novo del timidilato (Danenbergh, 1977). La expresión del gen del TS es estrechamente regulada con respecto al estado de proliferación de las células (Maley y Maley, 1960; Locksin *et al.*, 1979). Como tal, el gen de TS es parte de un grupo de genes cuya expresión es elevada al límite del ciclo de las células G/S, y se ha sugerido que la transcripción de varios genes de la fase S (incluso la reductasa de dihidrofolato y timidina quinasa) se controle en parte por la familia E2F de los factores de transcripción (Farnham *et al.*, 1993; Mudrak *et al.*, 1994). De hecho, la transfección de los genes E2F1 activos dentro de las células del ratón induce la expresión del TS y otros genes regulados en ciclos de la fase S y las células (De Gregori *et al.*, 1995). A medida que las células progresan a través del ciclo de la célula desde G₀ a través de la fase S, los niveles del mRNA del TS se incrementan aproximadamente en 20-pliegues y la actividad de la enzima TS aumenta aproximadamente en 10-pliegues (Navalgund *et al.*, 1980). Sin embargo, el índice de transcripción del gen del TS se regula sólo de 2 a 4 veces, lo que sugiere que los eventos post-transcripcionales juegan un rol mayor en la regulación del TS (Ayusawa *et al.*, 1986; Jenh *et al.*, 1985; Johnson, 1994). Las diferencias en la estabilidad de mRNA del TS no deben aparentemente ser críticas en la regulación, cuando la mitad de la vida del mRNA del TS es de aproximadamente 8 horas tanto en las células de los roedores adormecidos como en crecimiento (Jenh *et al.*, 1985). Por otra parte, la traducción del mRNA del TS parece regularse mediante la misma proteína del TS, que interactúa específicamente en dos sitios dentro de su propio mRNA para inhibir la producción de proteínas (Cbu *et al.*, 1991, 1993b, 1994; Voeller *et al.*, 1995). La traducción de otros mRNA (incluso el mRNA del c-myc) también puede regularse a través de las interacciones con la proteína del TS (Chu *et al.*, 1995).

Debido a este rol en la síntesis precursora del ADN, el TS ha sido identificado como un objetivo potencial para los agentes quimioterapéuticos del cáncer (Hardy *et al.*, 1987). Los altos niveles del TS se han correlacionado con los pronósticos pobres en pacientes con cáncer ovárico (Suzuki *et al.*, 1994), cáncer del recto (Johnson, 1994) leucemia infantil aguda no linfoblástica (Volm *et al.*, 1994), y carcinoma del pulmón no pequeño (Volm and Mattern, 1992). Sin embargo, su valor pronosticado no es alto en todos los tipos de tumores (Peters *et al.*, 1986, 1994). Se han desarrollado dos tipos de inhibidores del TS: (a) analogías de nucleótidos (incluso 5-FU, su ribosida, y derivados del deoxirribosida) que deben activarse con 5-fluorodeoxiuridilato (FdUMP) dentro de las células para ser efectivos (Heidelberger *et al.*, 1983) y (b) analogías 5,10-CH₂FH₄ (antifolato), incluso N-10-propargil-5,8-dideazafolato (CB3717) (Calvert *et al.*, 1986) y TomudexTM (ZD 1694; N-[5-(N-[3,4-dihidro-2-metil-4-oxoguanilino-6-ilmetilo]-N-metilamino)-2-tenoilo]-L-ácido glutámico) (Jackman *et al.*, 1991 a, 1991 b). Aunque, TomudexTM y 5-FU inhiben el TS y tienen actividad citotóxica y antitumores potentes (Heidelberger *et al.*, 1983; Keyomarsi *et al.*, 1993), hacen un efecto bioquímico inusual. Cuando las líneas de células cancerígenas humanas se tratan con 5-FU o TomudexTM, los niveles de TS aumentan rápidamente, quizás como resultado de la liberación de la inhibición de la traducción por la proteína del TS (Keyomarsi *et al.*, 1993; Chu *et al.*, 1990; Chu *et al.*, 1993a).

Se ha especulado que la liberación de la inhibición de traducción que acompaña el enlace y la inactivación del TS por agentes quimioterapéuticos (incluso TomudexTM y 5-FU) puede prevenirse mediante el tratamiento de las células con agentes que podrían reemplazar la interacción específica entre el mRNA del TS y la proteína del TS, e inhiben la traducción (Keyomarsi *et al.*, 1993), pero ninguno de tales agentes se describieron. En otro artículo, se tiene la hipótesis que los ácidos nucleicos antisentido diseñados tanto para reducir la habilidad del mRNA del TS para dirigir la producción de proteínas, como para interactuar con el sitio de enlace de la proteína del TS, puede ser útil para complementar la efectividad de las drogas dirigidas en contra del TS (Rapaport *et al.*, 1992).

In Ju, J. (Ju, J.: "Sensibilidad Incrementada a las Drogas de las Células de Tumores mediante la Manipulación de los Genes de Control del Ciclo de las Células", 1996, Tesis de la Universidad de California del Sur, páginas 100-130), los oligonucleótidos antisentido dirigidos al sitio de inicio de la translación del mRNA del timidilato sintasa (TS) ha sido usado para inhibir la traducción en un sistema de traducción *in vitro*, sin embargo, el tratamiento de las células del cáncer de colon humano HT-29 con oligodeoxinucleótidos antisentido resultaron en un aumento en la cantidad del TS en las células y disminuyeron su sensibilidad al 5-fluoro-2'-deoxiuridina (FdUrd). Por

contraste, una construcción de plásmido que contiene un fragmento del gen antisentido del TS (+1 a +422) usado para producir un producto antisentido tomado de la misma región como los oligonucleótidos antisentido probados se mostró que reducen la expresión de la proteína del TS e incrementan la sensibilidad de estas células al FdUrd.

En las aplicaciones de las patentes previstas, GB 9720107.3 y GB 9722012.3, revelamos cómo específicamente se regula la expresión del TS en las células del cáncer de mamas humano (MCF-7) en dos formas. Primero, nosotros transfectamos tanto temporalmente como establemente las células con vectores que expresen las moléculas del ARN antisentido dirigidos para hibridizar las tres diferentes regiones del mRNA del TS.

Las secuencias dirigidas fueron: (1) secuencias que participaron en la formación de una estructura con un tallo y bucle putativo que rodea el sitio del inicio de la traducción e inmediatamente adyacente y 3' para ese sitio (estas secuencias también participan en la proteína del TS aglutinante para modular la traducción), (2) el límite del exon1/exon2 y (3) el extremo de 3' del mRNA citoplásmico maduro. El ARN del TS antisentido se expresó desde estos vectores (según lo evaluado por el análisis de la mancha norte y una modificación nueva de la prueba de la transcripción seguida para medir la transcripción antisentido en contra de la expresión del gen del TS constitutivo) (Koropatnick *et al*, 1997). Segundo, transfectamos temporalmente las células con oligodeoxinucleótidos con una hebra dirigidos para hibridizar: (a) el sitio de inicio de la traducción y las secuencias que la rodean, (b) una secuencia próxima al sitio del inicio de la traducción y que participa en la estructura de tallo y bucle putativo, y (c) el sitio de parada de la translación cerca del extremo de 3' del ARN citoplasmático maduro.

La presente invención se basa en nuestro descubrimiento de un oligonucleótido antisentido, oligo 83, complementario a la secuencia en la región no traducida del mRNA del TS, regulado al nivel del mRNA del TS y de la proteína, que inhibió la proliferación de las células e incrementó la citotoxicidad de las drogas para la quimioterapia dirigida con el TS.

En un primer aspecto de la invención, proporcionamos un oligodeoxinucleótido antisentido que hibridiza una secuencia del ácido nucleico objetivo en el timidilato sintasa y que inhibe selectivamente la producción del timidilato sintasa en las células mamarias y es resistente a la enzima nucleasa. El oligonucleótido consta de 8 a 50 nucleótidos e incluye una secuencia de nucleótidos complementaria para la secuencia en o cerca del sitio de parada de la translación en el extremo de 3' del gen del TS, cuyas secuencias se sitúan en la región entre las bases 800 y 1536, mediante el uso de la numeración en la secuencia descrita para el mRNA (cADN) del timidilato sintasa realizada por Takeishi *et al.*, 1985. Más preferiblemente, las secuencias se sitúan en la región entre las bases 1000 y 1530. Más preferiblemente, las secuencias se sitúan en la región entre las bases 1030 y 1460.

Un oligodeoxinucleótido antisentido es un oligonucleótido que está diseñado para hibridizar una región específica de una secuencia del ácido nucleico específico y objetivo. El ácido nucleico objetivo es el gen del TS o del mRNA transcrito desde el gen del TS. Preferiblemente, el ácido nucleico objetivo es el mRNA que codifica el timidilato sintasa.

Los efectos del oligonucleótido antisentido en la expresión del timidilato sintasa puede medirse al usar procedimientos que son bien conocidos por personas expertas en el arte. En la presente aplicación, los efectos en los niveles del mRNA han sido medidos por el análisis de las manchas del norte y los ensayos de las transcripciones seguidas nucleares, y los efectos en el crecimiento de las células de tumores humanos han sido medidos por el número de las células enumeradas al usar un contador CoulterTM.

Los oligonucleótidos antisentido del timidilato sintasa pueden inhibir, estimular o no tener efecto en la expresión del timidilato sintasa. De estos, los oligonucleótidos antisentido preferidos son aquellos que inhiben la expresión del timidilato sintasa.

Mediante la inhibición del timidilato sintasa, queremos decir que la inhibición de al menos el 10% relativa al control no tratado, medido en el día 4 al usar el ensayo descrito en el Ejemplo 1.2.

Preferentemente, la inhibición de la expresión del timidilato sintasa es al menos el 20% y más preferiblemente la inhibición es al menos el 40%.

Preferentemente los oligonucleótidos antisentido son de aproximadamente 8 a 50 nucleótidos en el tramo; más preferentemente de aproximadamente 12 a 40 nucleótidos en el tramo y aún más preferentemente de aproximadamente 16 a 30 nucleótidos en el tramo.

Los ejemplos específicos de las secuencias de oligonucleótidos antisentido que regulan la actividad del timidilato sintasa se muestran en la Tabla 1. Las secuencias de los oligonucleótidos antisentido que inhiben la actividad del timidilato sintasa de acuerdo con la invención mostrada en la Tabla 1 son SEQ ID NOS. 83 y 86. Las regiones del mRNA del TS dirigidas por los oligonucleótidos se muestran en la Figura 7.

TABLA 1

OLIGONUCLEÓTIDO ANTISENTIDO	SECUENCIA
OLIGO 83	GCCAGTGGCAACATCCTTAA
OLIGO 86	AAGCACCCCTAAACAGCCATT
OLIGO 90	GCAGCTCCGAGCCGGCCACA
OLIGO 91	GCCGGCCACAGGCATGGCGC
OLIGO 92	GCCGGCCACAGGCATGGCGC
OLIGO 93	GGCATGGCGCGGCGGGCGGG
ODN 32	ATGCGCCAACGGTTCCTAAA
PAS/TSS	UGUGGCCGGCUCGGAGCUGCCGCGCCGGCC
PAS/EXON1,2	GCUACAGCCUGAGAGAUGAAUCCCUCUGC

Se apreciará que la invención no se restrinja meramente a aquellos oligonucleótidos antisentido específicos 83 y 86 que inhiben la producción del timidilato sintasa que se revelan en la Tabla 1 anterior, pero abarca los oligonucleótidos de aproximadamente 8 a 50 nucleótidos en los tramos que selectivamente inhiben la producción del timidilato sintasa y que se seleccionan desde aquellas regiones del gen del TS que se describen más arriba.

La hibridización de un oligonucleótido antisentido para su secuencia del ácido nucleico objetivo se mide por la formación de los vínculos de hidrógeno entre las bases complementarias en cada hebra del ácido nucleico. La hibridización puede ocurrir entre la hebra del ácido nucleico que tiene variables grados de complementariedad, que depende de las condiciones de hibridización empleadas. El término "específicamente hibridizable" se usa para describir un oligonucleótido que tiene un grado suficiente de complementariedad para asegurar el enlace estable y específico para su secuencia objetivo, mientras se evita el enlace no específico para secuencias sin objetivos.

Los oligonucleótidos antisentido pueden diseñarse para hibridizar cualquier región dentro de la molécula del mRNA del timidilato sintasa, incluso la región de codificación, la región no traducida 5', la región no traducida 3', la región de la cubierta 5', los empalmes de intrones e intrones/exones.

La hibridización del oligonucleótido al mRNA del timidilato sintasa puede afectar cualquier aspecto de la función del mRNA, por ejemplo el desplazamiento del mRNA, el empalme del mRNA, la traducción del mRNA, o el mecanismo de inhibición de la retroalimentación por el aglutinamiento de la proteína del timidilato sintasa a los sitios de enlace dentro de la molécula del mRNA del timidilato sintasa.

Un oligonucleótido es una molécula polimérica que se forma de los monómeros nucleótidos o de la nucleosidad. Los monómeros pueden constar de bases que ocurren naturalmente, azúcares y vinculaciones de inter-azúcar o también pueden contener derivados que no ocurren naturalmente y que modifican las propiedades de los oligonucleótidos, por ejemplo, se han usado oligonucleótidos con fósforotiorato en la presente aplicación para aumentar la resistencia a la degradación de la nucleasa.

Los oligonucleótidos preferidos pueden contener fósforotioratos, fosfotriésteres, fosfonatos de metilo o alquilo de cadena corta, ciclo-alquilo o vinculaciones de inter-azúcar heteroatómicas. Otros oligonucleótidos preferidos pueden ser metoxi-etoxi con alas o pueden contener la infraestructura del ácido nucleico del péptido. Particularmente los oligonucleótidos preferidos son aquellos que contienen fósforotioratos (Summerton, J.E. y Welter, D.D. U.S. Patente No. 5,034,506).

Los oligonucleótidos pueden fabricarse al usar cualquier método conveniente de síntesis. Ejemplos de dichos 30 métodos pueden encontrarse en libros del texto estándar, por ejemplo "Protocolos para los Oligonucleótidos y Analogías; Síntesis y Propiedades." Métodos en la Serie de Biología Molecular; Volumen 20: Ed. Sudhir Agrawal, Humana ISBN: 0-89603-247-7; 1993; 1ª Edición.

En un aspecto adicional de la invención, se ha proporcionado un compuesto farmacéutico que incluye un oligonucleótido antisentido dirigido al timidilato sintasa según se define más arriba en un diluyente o transportador farmacéuticamente aceptable.

Se ha proporcionado un método para el tratamiento del cáncer (o un método para proporcionar un efecto antiproliferativo) que incluye la administración para animales de sangre caliente de una cantidad efectiva de un oligonucleótido dirigido al timidilato sintasa según se define más arriba que no forma parte de la invención, según se reivindica. La invención también proporciona el uso de un oligonucleótido en la producción de un nuevo medicamento para el tratamiento del cáncer (o para el tratamiento de las enfermedades proliferativas).

En un aspecto adicional de la presente invención, se ha proporcionado un producto de combinación que incluye un oligonucleótido antisentido dirigido al timidilato sintasa en combinación con un agente anticancerígeno. El oligonucleótido antisentido y el agente anticancerígeno pueden administrarse por separado, secuencialmente, simultáneamente o en una mezcla.

El agente anticancerígeno puede cubrir tres principales categorías del agente terapéutico:

- (i) Inhibidores del timidilato sintasa tales como TomudexTM (N-(5-[N-(3,4-dihidro-2-metil-4-oxoquinazolin-6-ilmetil)-N-metilamino]-2-tenoil)-L-ácido glutámico) (Aplicación de la Patente Europea No. 0239362, Ejemplo 7, compuesto No. 8 aquí mismo); componente del desarrollo ZenecaTM ZD9331 ((S)-2-(2-fluoro-4-[N-(4-hidroxi-2,7-dimetilquinazolin-6-ilmetil)-N-(prop-2-ynil)amino]benzamido)-4-(1 H-1,2,3,4-tetrazol-5-yl)ácido butírico) (Aplicación de la Patente Europea No. 0562734, Ejemplo 3 de lo mismo); LY 231514 (Eli Lilly Research Labs, Indianapolis, IN): 1843U89 (Glaxo-Wellcome, Research Triangle Park, NC); AG337 y AG331 (ambos por Agouron, La Jolla, CA) (Touroutoglou y Pazdur, Clin. Cancer Res., 2:227-243, 1996).
- (ii) Agentes citostáticos tales como antiestrógenos (por ejemplo tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno, iodoxifeno), progestágenos (por ejemplo, acetato de megestrol), inhibidores de aromatasa (por ejemplo anastrozola, letrozola, vorazola, exemestano), antiprogéstágenos, antiandrógenos (por ejemplo flutamida, nilutamida, bicalutamida, acetato de ciproterona). Los agonistas y antagonistas del LHRH (por ejemplo acetato de goserelina, luprolida), inhibidores de la testosterona 5 α -dihidroreductasa (por ejemplo finasterida), agentes anti-invasión (por ejemplo inhibidores de metaloproteína como marimastata e inhibidores de la función del activador plasminogénico de uroquinasa) e inhibidores de la función del factor de crecimiento, (tales factores de crecimiento incluyen por ejemplo plaquetas de EGF, FGFs, derivaron el factor de crecimiento y el factor de crecimiento de hepatocitos, dichos inhibidores incluyen anticuerpos para el factor de crecimiento, anticuerpos para el receptor del factor de crecimiento, inhibidores de la quinasa tirosina e inhibidores de la quinasa de serina/treonina).
- (iii) Las drogas antiproliferativas/antineoplásicas y las combinaciones de las mismas, como las usadas en la oncología médica, tales como antimetabolitos (por ejemplo antifolatos como metotrexato, fluoropirimidinas como 5-fluorouracil, FdUR, ftorafur, FdUR, análogos de purino y adenosina, citosina arabinosida); antibióticos antitumorales (por ejemplo antraciclinas como doxorubicina, daunomicina, epirubicina y idarubicina); mitomicina-C, dactinomicina, mitramicina; derivados del platino (por ejemplo cisplatina, carboplatina, oxaliplatina); agentes de la alquilación (por ejemplo mostaza de nitrógeno, melfalano, clorambucil, busulfan, ciclofosfamida, ifosfamida, nitrosureas, tiotepa); agentes antimitoicos (por ejemplo alcaloides vinca como vincristina y taxoides como taxol, taxotere); inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo epipodofilotoxinas como etoposida y teniposida, amsacrina, topotecán).

El tratamiento anticancerígeno también puede ser la radioterapia.

Los agentes anticancerígenos particularmente preferidos son los inhibidores del timidilato sintasa tales como TomudexTM (N-(5-[N-(3,4-dihidro-2-metil-4-oxoquinazolin-6-ilmetil)-N-metilamino]-2-tenoil)-L-ácido glutámico) (Aplicación de la Patente Europea No. 0239362, Ejemplo 7, compuesto No. 8 aquí mismo) y el componente de desarrollo ZenecaTM ZD9331 ((S)-2-(2-fluoro-4-[N-(4-hidroxi-2,7-dimetilquinazolin-6-ilmetil)-N-(prop-2-ynil)amino]benzamido)-4-(1 H-1,2,3,4-tetrazol-5-yl)ácido butírico) (Aplicación de la Patente Europea No. 0562734, Ejemplo 3 del mismo).

En un aspecto adicional de la presente invención, se ha proporcionado una composición farmacéutica que incluye un producto de combinación según se define más arriba y un diluyente y transportador farmacéuticamente aceptable.

Cualquier composición farmacéutica según lo definido más arriba puede encontrarse en una forma apropiada para el uso oral, por ejemplo una tableta, cápsula, solución acuosa o aceitosa, suspensión o emulsión; para el uso tópico, por ejemplo una crema, ungüento, gel o solución o suspensión acuosa o aceitosa; para uso nasal, por ejemplo un inhalador, aerosol nasal o gotas nasales; para uso vaginal o rectal, por ejemplo un supositorio, para administración por inhalación, por ejemplo como un polvo finamente dividido como un polvo seco, una forma microcristalina o un aerosol líquido; para uso debajo de la lengua o bucal, por ejemplo una tableta o cápsula; o particularmente para el uso parenteral (incluso intravenoso, subcutáneo, intramuscular, intravascular o infusión), por ejemplo una solución o suspensión acuosa o aceitosa estéril. En general, las composiciones anteriores pueden prepararse de manera convencional al usar excipientes convencionales.

El TomudexTM se administra convenientemente a humanos por inyección intravenosa de una solución acuosa en una dosis en la gama, por ejemplo, de 1 a 4 mg/m² del área de la superficie del cuerpo una vez cada tres semanas, preferiblemente en una dosis de 3 mg/m² una vez cada 3 semanas.

El ZD 9331 se dosifica convenientemente a humanos por administración oral en forma de una dosis sólida o por inyección intravenosa de una solución acuosa estéril. La forma de dosis oral se administra convenientemente a humanos en una dosis total en la gama, por ejemplo, de aproximadamente 1 a 100 mg/kg (por ejemplo, aproximadamente 35 mg/m² a 3.5 g/m²) cada tres semanas determinado por un programa de dosificación continuo o intermitente, por ejemplo un programa de dosificación de un ciclo de tres semanas que incluyen dosis diarias de 1 a 5 días sólo seguidas por ninguna otra dosis hasta el próximo ciclo de dosificación o un programa de dosificación de un ciclo de cuatro semanas que incluye dosis diarias de 1 a 14 días sólo seguidas por ninguna otra dosis hasta el próximo ciclo de dosificación. Preferiblemente, la forma de dosificación oral se administra a humanos en una dosis total en la gama, por ejemplo, de aproximadamente 1 a 30 mg/kg cada ciclo de dosificación de tres o cuatro semanas. La solución acuosa estéril se

administra convenientemente a humanos en una dosis total hasta de 100 mg/m² cada tres semanas determinada por un programa de dosificación continuo o intermitente, por ejemplo, un programa de dosificación de una dosis por ciclo de dosificación de tres semanas, un programa de dosificación de un ciclo de tres semanas que incluye dosis diarias de 1 a 5 días sólo seguidas por ninguna otra dosis hasta el próximo ciclo de dosificación, un programa de dosificación de un ciclo de dosificación de tres semanas que incluyen dosis de 1 a 8 días sólo seguidas por ninguna otra dosis hasta el próximo ciclo de dosificación o un programa de dosificación de un ciclo de tres semanas que incluyen la infusión continua de 1 a 5 días seguida por ninguna otra dosificación hasta el próximo ciclo. Preferiblemente, la solución acuosa estéril se administra de manera intravenosa a humanos en una dosis total en la gama, por ejemplo, de aproximadamente 20 a 50 mg/m² cada tres semanas determinadas por un programa de dosificación continua o intermitente según se ilustra más arriba.

El oligonucleótido antisentido se administra convenientemente a humanos por inyección intravenosa de una solución acuosa estéril en una dosis por ciclo de dosificación en un rango, por ejemplo, de 0.1 µg a 1 g, preferiblemente en una dosis de 1 mg a 100 mg.

La cantidad de ingredientes activos que se combina con uno o más excipientes para producir las formas de dosificación apropiadas variará necesariamente dependiendo del componente particular del producto de combinación, el receptor tratado y la ruta particular de administración. Por ejemplo, una formulación destinada para la administración oral a humanos contendrá generalmente, por ejemplo, de 0.5 µg a 2 g del agente activo compuesto con cantidades apropiadas y convenientes de excipientes que pueden variar de aproximadamente el 5 al 98 por ciento por el peso de la composición total. Una formulación destinada para la administración parenteral a humanos generalmente contendrá de 0.1 µg a 50 mg. Las formas de la unidad de dosificación generalmente contendrán aproximadamente 1 µg a 500 mg de un ingrediente activo.

Se ha proporcionado un método para el tratamiento del cáncer (o un método para proporcionar un efecto antiproliferativo) que incluye administrar a un animal de sangre caliente una cantidad efectiva de un producto de combinación según se define anteriormente, que no forme parte de la invención, según se reivindica. La invención también proporciona el uso de dicho producto de combinación en la producción de un nuevo medicamento para el tratamiento del cáncer (o para el tratamiento de enfermedades proliferativas).

Abajo, se establecen las abreviaciones usadas en la aplicación.

TS	timidilato sintasa
CMV	citomegalovirus
5-FU	5-fluorouracil
LFA	lipofectamina
PBS	solución salina tratada con fosfato
GAPDH	gliceraldehído-3-fosfato-dehidrogenasa
FBS	suero bovino fetal
MT	metalotioneina
ODN	oligodeoxinucleótido
bp	pares base
DMEM	medio Eagle modificado de Dulbecco
oligo	oligodeoxinucleótido

La invención ahora se ilustrará, pero no estará limitada por la referencia a los siguientes Ejemplos y Figuras:

La Figura 1 muestra que el crecimiento de las células MCF-7 se inhibe por la transfección con el oligo 86 del TS antisentido (dirigido al sitio de parada de la traducción), pero se incrementa por la transfección con los oligos 90 o 92 del TS antisentido (dirigidos a las secuencias en o cerca del sitio de inicio de la translación).

Las células fueron transfectadas temporalmente con 0.5 o 1.0 µM de oligonucleótidos del TS antisentido en el LipofectinTM según se describe. El número de células fue medido por el contador CoulterTM en frascos triplicados después de 4 días de crecimiento. Las células de control se trataron con Lipofectina sin oligonucleótidos. El crecimiento de las células se expresa como un porcentaje del crecimiento de las células de control.

*: Significativamente más alto que el control ($p < 0.05$, análisis de 1 dirección de las variantes).

**: Significativamente más bajo que el control ($p < 0.05$, análisis de 1 dirección de las variantes).

5 La Figura 2 muestra que el crecimiento de las células HeLa se inhibe por la transfección con oligo 86 del TS antisentido (dirigido al sitio de parada de la translación), pero se incrementa después de la transfección con el oligo 91 del TS antisentido (dirigido al sitio de inicio de la translación).

10 Las células HeLa fueron transfectadas con 0.05 o 0.10 μM de los oligonucleótidos del TS antisentido en el LipofectinTM (10 $\mu\text{g/ml}$) durante 4 horas, según se describe. Se debe observar que las concentraciones de oligo son considerablemente bajas a aquellas utilizadas por las células MCF-7. La eficiencia del ADN intervenido con LipofectinTM de las células HeLa es mayor que para las células MCF-7. El LipofectinTM se removió, las células fueron tripsinizadas, y 25,000 células viables por frasco se colocaron en frascos de cultivos de tejidos. Los números de célula fueron medidos por el contador CoulterTM en frascos triplicados después de 4, 7 y 8 días de crecimiento. Las células de control se trataron con LipofectinTM sin oligonucleótidos. El crecimiento de las células se expresa como un porcentaje del crecimiento de las células de control.

*: Significativamente más alto que el control ($p < 0.05$, prueba t de Student).

20 **: Significativamente más bajo que el control (prueba t de Student).

La Figura 3 muestra que el crecimiento de las células HeLa se inhibe por la transfección con oligo 83 del TS antisentido (dirigido a la secuencia no trasladada 3' corriente abajo del sitio de parada de la translación), pero no se afecta por la transfección con el oligo 81 del TS antisentido (dirigido a una secuencia en la región no trasladada 3' del mRNA del TS). El protocolo experimental fue según se describe en la leyenda para la Figura 2.

La Figura 4 muestra que la transfección transitoria de las células HeLa con oligo 86 (dirigido al sitio de parada de la translación del TS) incrementa la sensibilidad del TomudexTM y que el oligo 91 (dirigido al sitio de inicio de la translación de TS) reduce la sensibilidad del TomudexTM.

30 Las células HeLa fueron transfectadas con 0.05 y 0.10 μM de oligonucleótidos del TS antisentido y colocados en placas en frascos a baja densidad, según lo descrito en la Figura 2. El Tomudex (0-8 nM) se agregó (frascos triplicados para cada concentración de TomudexTM) y las células se dejaron proliferar durante 7 días. Los números de células fueron medidos por la cuenta del CoulterTM en ese momento. La supervivencia se traza como un porcentaje del crecimiento de las células transfectadas con oligonucleótidos, pero sin ser tratado con TomudexTM. Por ende, estos datos revelan la inhibición o incremento del exterminio del TomudexTM independientemente de la inhibición o incremento del crecimiento inducido por los oligonucleótidos en ausencia del Tomudex. Se traza el medio de los tres valores. Las barras de error eran más pequeñas que el tamaño del símbolo en cada caso.

40 *: Significativamente diferente del control ($p < 0.05$, prueba t de Student).

La Figura 5 muestra que la transfección transitoria de las células HeLa con oligo 83 (dirigida a una secuencia en la región no trasladada 3' del mRNA del TS) incrementa la sensibilidad del Tomudex, mientras que el oligo 81 (dirigido a una secuencia 3' corriente abajo de aquel dirigido por el oligo 83) no tiene efecto en la sensibilidad del TomudexTM.

50 Las células HeLa fueron transfectadas con 0.10 μM de oligonucleótidos del TS antisentido y se colocaron en placas en frasco a baja densidad, según se describe para la Figura 2. El Tomudex (0-10 nM) se agregó (frascos triplicados para cada concentración de TomudexTM) y las células se dejaron proliferar durante 4 días. Los números de células fueron medidas por la cuenta del CoulterTM en ese momento. La supervivencia se traza como un porcentaje del crecimiento en las células transfectadas con el oligonucleótido, pero no tratadas con TomudexTM. Por ende, estos datos revelan el incremento del exterminio del TomudexTM independientemente de la inhibición del crecimiento inducida por los oligonucleótidos en ausencia del TomudexTM. Se traza el medio de los tres valores. Las barras de error fueron más pequeñas que el tamaño del símbolo en cada caso.

55 *: Significativamente diferente del control ($p < 0.05$, prueba t de Student).

La Figura 6 muestra que el oligo 91 del TS antisentido, pero no el oligo 86, estimula la transcripción del gen TS en las células HeLa humanas.

60 Las mismas células HeLa para las cuales se presentan datos en la Figura 2 se evaluaron para la transcripción seguida del TS, gliceraldehído fosfato dehidrogenasa (GAPDH), y los genes 18S rRNA. Brevemente, las células fueron transfectadas con 0.05 y 0.10 μM de oligonucleótidos del TS antisentido en Lipofectina (10 $\mu\text{g/ml}$), o con LipofectinTM solamente (control del LFA) durante 4 horas, según se describe. El LipofectinTM fue removido y las células fueron tripsinizadas y puestas nuevamente en placas en frascos de cultivo de tejidos. Cuatro días después de la transfección, los núcleos fueron aislados de aproximadamente 5×10^6 células para cada tratamiento y las transcripciones del TS, GAPDH, y el 18S rRNA iniciadas permitieron incorporar el [³²P]-CTP durante 30 minutos. El ARN precipitable con alcohol y etiquetada con radio se hibridizan durante 48 horas para TS. GAPDH sin etiquetar y el 18S rRNA cDNA

inmovilizado en puntos triplicados en membranas de nylon según se describe. El índice de transcripción relativo se presenta como:

$$\text{Índice de transcripción relativa} = \frac{(\text{señal de hibridización desde el gen de interés})}{(\text{señal de hibridización para los genes GAPDH o 18S rARN})}$$

La Figura 7 muestra las porciones de la secuencia del mRNA (cADN) humano para el timidilato sintasa (EC 2.1.1.45), bases 1 a 1536.

La Figura 7a muestra la secuencia del mRNA (cADN) humano para el timidilato sintasa (EC 2.1.1.45) bases 1 a 1536

La Figura 8 muestra que el TS ODN 83 antisentido inhibe la proliferación de las células HeLa. Las células HeLa transfectadas con 50 nM del TS ODN 83 (*) antisentido o 50 nM de ODN 32 (o) de control mezclado fueron evaluadas para la proliferación de las células en 1, 2, 5, y 6 días después de la transfección. Los puntos de datos indican el promedio de las dos mediciones, y son representativos de los resultados cualitativamente similares obtenidos en 16 experimentos independientes.

La Figura 9 muestra que el TS ODN 83 antisentido suprime el crecimiento de las células HeLa después de la transfección seguida por la recuperación para el índice de proliferación de control después de 48 horas. Las células HeLa fueron transfectadas con 50 nM del TS ODN 83 antisentido o 50 nM de ODN 32 de control mezclado según se describe en la leyenda para la Figura 1. Los valores derivados de las células transfectadas con ODN 32 se normalizaron al 100%, y cada barra indica el porcentaje de ese valor medido siguiendo el tratamiento con ODN 83 (medio $\pm$ SE de 4 experimentos independientes). Los asteriscos (*) indican las diferencias significativas ($p < 0.02$, prueba t de Student).

Las Figuras 10 y 11 muestran que el tratamiento de las células HeLa con ODN 83 resulta en niveles disminuidos de mRNA del TS.

(Figura 10) Las células HeLa fueron transfectadas con ODN 83 u ODN 32 de control mixto, o tratadas sólo con Lipofectamina. Las células se cosecharon en 1, 2, y 4 días después de la transfección y el ARN celular total se aisló, se transcribió en el dorso, y el TS y GAPDH cDNA se amplificaron por 24 ciclos del PCA en el mismo recipiente de reacción, los productos del TS (208 bp) y GAPDH (752 bp) RT/PCR fueron confirmados por la mancha sureña y la hibridización para las sondas rotuladas radioactivamente específicas.

(Figura 11) El radio del TS:GAPDH de los productos RT/PCR a partir del ARN aislado de las células HeLa 1 día después de la transfección con ODN 83 o ODN 32. Se realizaron ciclos de veinticuatro, 25, 26, ó 27 de amplificación del PCR, que revelaron la misma reducción en el radio del TS:GAPOH después de la transfección con ODN 83.

La Figura 12 muestra que los niveles de proteína del TS (inferidas por las medidas de enlace 5-FduMP) se disminuyen por el ODN 83 del TS antisentido, pero no el ODN 32 del control mezclado. El enlace 5-FdUMP se midió en células transfectadas con ODN 83 (barras con tramas) u ODN 32 (barras abiertas) en diferentes momentos después de la transfección.

(A): Los resultados se traman como un porcentaje del enlace 5-FdUMP en células transfectadas con ODN 32 $\pm$ SE (n=5) de control. Los valores para el ODN 32 (n=5) se normalizaron al 100% y se muestran sin barras de error.

(B): Los resultados se presentan como pmol 5-FdUMP enlazado por mg de proteína total ($\times 10^{-3}$) para revelar que la transfección con ODN 32 de control no tiene efectos significativos en los niveles de proteína del TS. Las barras de error indican errores calculados de acuerdo a la prueba t de Student, e indican el error debido a las diferencias en condiciones experimentales en 5 medidas tomadas en diferentes días, y las diferencias debido a la transfección con diferentes ODN. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas ($p < 0.02$) determinadas al usar una prueba t de Student en pares.

La Figura 13 muestra que el TS ODN 83 antisentido sensibiliza las células HeLa para los efectos tóxicos de 5-FU, 5-FUdR, TomudexTM, y MTX, pero sin cisplatina o clorambucil. Las células HeLa se transfectaron con ODN 83 (●) u ODN 32 (o) de control y tratados con diferentes concentraciones de 5-FU (A), 5-FUdR (B), TomudexTM (C), MTX (D), cisplatina (E) o clorambucil (F) durante 4 días, comenzando 24 horas después de la transfección. Los puntos de los datos se traman como el medio $\pm$ SE de 4 medidas. Donde las barras de error no son aparentes, se oscurecen por el símbolo. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas < 0.02 , prueba t de Student).

Ejemplo 1

Ejemplo 1.1

5 *Métodos Experimentales**Cultivo de Células*

10 Las células MCF-7 (adenocarcinoma mamario humano) se cultivaron en DMEM complementadas con 10% de suero bovino fetal (FBS), 2 mM de glutamina, 10 mM de Hepes (pH 7.4) y 0.1% de Gentamicina.

Construcción del Vector

15 Los vectores de expresión pAS/TSS y pAS/exon1.2 fueron diseñados para producir, sobre la transfección dentro de células MCF-7. Las moléculas de ARN antisentido con una sola hebra que contienen oligonucleótidos 30 bp con dos hebras complementarios al mRNA del TS en uno de los dos sitios. Se sintetizaron los oligodeoxinucleótidos que corresponden a cada hilera del cADN del TS humano en las posiciones 111 a 140 (pAS/TSS; que se dirige a una región 30 bp adyacente, y 2 bp fuera del sitio de inicio de la traducción) ó 296 a 325 (pAS/exon 1,2; que se dirigen a una región de 30 bp que abarca el límite del exon 1/exon 2). La numeración de las bases fue de acuerdo a GenBank™

20 Accession No. X02308 (Takeishi *et al.*, 1985). Para facilitar la clonación, se incorporaron seis nucleótidos adicionales (5 al extremo 5', 1 en el extremo 3') de cada oligodeoxinucleótido para producir extremos pegajosos de Hind III o Xba I cuando las hileras complementarias se templaron. Los oligonucleótidos de una sola hebra (de 4 mg cada uno) se templaron en 3X SET (450 mM de Nad, 60 mM de Tris-HCl, 3 mM de EDTA, pH 7.8) al tratar la mezcla durante 5 minutos a 90°C, 5 horas a 50°C, y por último, 16 horas a 25°C. Los productos de dos hebras se identificaron por

25 la electroforesis del gel, y direccionalmente fueron insertos dentro de los sitios de Hind III y Xba I de pRC/CMV (Invitrogen Corp., San Oiego; CA). La orientación de la clonación fue confirmada por la secuencia directa.

Oligodeoxinucleótidos

30 Los oligonucleótidos completamente con fosfotioratos 2'-deoxi (ODN) fueron sintetizados por Isis Pharmaceuticals (Carlsbad, CA). Los 6 nucleótidos terminales en los extremos 5' y 3' de cada ODN fueron modificados con 2'-metoxi-etoxi para hacerlos resistentes a las nucleasas intracelulares e incrementar su estabilidad dentro de las células (M'Kay *et al.*, 1996), pero los 8 nucleótidos internos sin grupos de metoxi-etoxi fueron susceptibles a la división de RNase H. El oligo 86 fue complementario al mRNA del TS desde las posiciones base 1035 a 1054 (GenBank™ Accession No. X02308; Takeishi *et al.*, 1985), que rodean el sitio de parada de la translación del mRNA del TS (UAG en las bases 1045 a 1047). El oligo 90 fue complementario a las posiciones base 111 a 130, que son 3' y están próximas al sitio de inicio de la translación (AUG en las bases 106 a 109). El oligo 92 fue complementario a las posiciones base 101 a 120, incluso y rodeando el sitio de inicio de la translación.

40 *Transfección*

Los vectores de la expresión del ARN se transfectaron dentro de las células MCF-7 mediante el uso de Lipofectamina (GIBCO BRL, Burlington ON, Canadá), una formulación liposómica policationica. Las células 1.5 X 10⁶ fueron dispensadas dentro de placas de 5 cultivos de 100 X 15 mm y se dejaron adherir durante la noche. Las células se

45 lavaron una vez con 3 ml de OptiMEM (GIBCO BRL, Burlington, ON, Canadá), seguido por la exposición a 6 ml de una mezcla de ADN del vector de expresión con dos hebras (0.83 µg/ml) más Lipofectamina (1.67 µg/ml) en opti-MEM durante 6 horas a 37°C en un incubador con 5% de CO₂. La mezcla de Lipofectamina de ADN/Lipofectamina se removió y reemplazó con 10 ml de DMEM con suplementos. Las células de control se transfectaron con el vector pRC/CMV sin inserto. Las células transitoriamente transfectadas se usaron dentro de 1 a 6 días. Las células estable-

50 mente transfectadas se dejaron recuperar en un medio no selectivo completo sin Geneticina durante 48 horas, después se dejaron crecer en presencia de Geneticina (400 µg por ml, forma activa [GibcoBRL]) para permitir la selección de colonias que albergan vectores de control pRC/CMV, o vectores pRC/CMV que expresan el ARN complementario a las secuencias que rodean el sitio de inicio de la translación (pAS/TSS).

55 Los oligodeoxinucleótidos de una sola hebra (0.5 p.M o 1.0 RM) fueron transitoriamente transfectados dentro de las células 1.5 X 10⁶ MCF-7 que se adhieren a las placas de cultivos de tejidos de 100 X 15 mm, en un volumen total de 5 ml en presencia de Lipofectamina (2 µg/ml) TS en Opti-MEM. Las células de control se trataron con Lipofectamina/Opti-MEM sin ADN agregado. Las células se lavaron después de 6 horas, se agregaron al medio más los suplementos, según se describe anteriormente, y después crecieron durante 48 horas antes del aislamiento de los

60 núcleos durante la medición de la transcripción seguida.

Análisis southern blot

65 El ADN total se aisló de las células pAS/TSS transfectadas según lo siguiente. Las células se encubaron en el amortiguador lysis (50 mM Tris-HCl [pH8.0], 100 mM de EDTA, 100 mM de NaCl, 1% de sulfato de dodecil de sodio, 0.5 mg/ml de proteinasa K) durante 6 horas a 55°C. Un tercio del volumen de 6 M NaCl se añadió a ácidos no nucleicos precipitados por centrifugación a 10,000 X g durante 15 minutos. El ADN flotante se precipitó en isopropanol y se lavó con 70% de etanol. El ADN se dividió con Hind III durante 16 horas y fue analizado por southern blot (Sambrook

et al., 1989). Las manchas fueron hibridizadas con una sonda pAS/TSS etiquetadas con el primer aleatorio [α - 32 P] dCTP (Church y Gilbert, 1984), y se expusieron a una pantalla de fósforo y se cuantificaron mediante el uso de un PhosphorImagerTM y el programa ImageQuantTM (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Las membranas de nylon se removieron e hibridizaron nuevamente con una sonda de Alu (300 bp de fragmento de restricción *Alu* humano, inserto dentro de pBR322 [Jelinek *et al.*, 1980]) para cuantificar la cantidad del ADN humano cargado en cada vía (Koropatnick *et al.*, 1988).

Análisis northern blot

El ARN se aisló usando columnas de RNeasyTM (Qiagen Inc., Chatsworth, CA) de las células transfectadas con el vector de expresión pAS/TSS. Se separaron diez o 15 μ g de ARN por vía en un 1.4% de gel de formaldehído (Sambrook *et al.*, 1989) y se transfirió a una membrana de nylon de HybondTM-N. Las membranas se hibridizaron (Church y Gilbert, 1984) ya sea con un ribosonda generada por pAS/TSS (Promega Corp., Madison, WI) diseñada para enlazarse al ARN antisentido, o uno etiquetado con primer aleatorio, fragmento de 1.9 kb *Xho* I a partir del pCHTS-1 (un vector de expresión eucariótica que contiene el cADN del TS humano: un generoso regalo de parte del Dr. K. Takeishi, Universidad de Shizuoka, Shizuoka, Japan)(Takeishi *et al.*, 1985). Las manchas se removieron y se rehibridizaron nuevamente con sondas de cADN para detectar el 18S ARN ribosomal o gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH). Las imágenes fueron cuantificadas mediante el uso de un PhosphorImagerTM (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Aislamiento de los núcleos

Los índices de transcripción relativa fueron determinados por un ensayo seguido nuclear (Koropatnick *et al.*, 1997), una modificación de los métodos de Kikuchi *et al.* (1992) y Almendral *et al.* (1988). Se extendieron transcripciones nacientes *in vitro* (Marzluff y Huang, 1984) en reacciones paralelas mediante el uso de núcleos de células MCF-7 aislados 48 horas que siguen la transfección transitoria con vectores de expresión del ARN del TS antisentido, u oligodeoxinucleótidos del TS de una sola hebra antisentido (o Lipofectamina sola), y a partir de las células establemente transfectadas con vectores de expresión del ARN antisentido. La células adherentes se enjuagaron dos veces con PBS helado, se rasparon con un caucho con gránulos en PBS (5 min, 500 X g) y se disolvieron en lysis al incubar 5 min a 4°C en 4 ml de amortiguador lysis (10 mM Tris-01, pH 7.4, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.5% NP40). Todos los pasos subsiguientes se realizaron a 4°C. La completa lysis de la célula e integridad de los núcleos liberados se revisó mediante un microscopio con luz, y los núcleos fueron granulados por centrifugación a 500Xg durante 5 minutos. Después los núcleos se suspendieron nuevamente en 4 ml del amortiguador lysis por uso de un vórtice con gránulos por centrifugación, se suspendieron nuevamente en 200 μ l del amortiguador de almacenamiento del núcleo (40% de glicerol, 5 mM de MgCl₂, 50 mM de Tris-HCl [pH 8.0], 0.1 mM de EDTA) en un tubo centrífugo de polipropileno cónico, e inmediatamente congelado en nitrógeno líquido y almacenado a 55 -120°C hasta su uso un mes más tarde.

Transcripción seguida

Las reacciones de elongación del ARN se realizaron para 30 min a 30°C mediante el uso de 2 X 10⁷ núcleos/400 μ l de reacción. Las mezclas de reacción fueron compuestas de 200 μ l del amortiguador de almacenamiento del núcleo más 200 μ l de amortiguador de reacción estéril de 2X (10 mM de Tris-HCl [pH 8.0], 5 mM de MgCl₂, 0.3 M de KCl, 1 mM de ATP, 1 mM de CTP, mM de GTP, 5 mM de ditiotreitol, y 2 μ l de [α - 32 P]UTP o [α - 32 P]CTP 1=3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml). Los nucleótidos, radionucleótidos, y ditiotreitol se agregaron inmediatamente antes del uso. Las transcripciones de ARN naciente se dejaron elongar durante 30 minutos a 30°C en una plataforma que se sacudía, seguida por la adición de 600 μ l de RNasa sin DNasa 1 (0.04 unidades RQ1 DNasa 1 [Sin RNasa; Promega Corp.], 0.5 M de NaCl, 50 mM de MgCl₂, 2 mM de CaCl₂, 10 mM de Tris-HCl [pH 7.4]). El ARN con la etiqueta 32 P fue aislado mediante el uso de TrizolTM (Gibco/BRL), y el ARN precipitado final se disolvió en un amortiguador para hibridización de Church (1 mM EDTA, 0.5 M NaHPO₄, [pH 7.2], 7% de sulfato lauril de sodio [SLS]), hasta una concentración final de 4 x 10⁶ cpm por ml.

Hibridización de ARN radioetiquetado para sondas sin etiquetar inmovilizadas

Para distinguir entre las moléculas de ARN del TS sentido y antisentido producidas en los núcleos aislados de las células transfectadas, el ADN objetivo (inmovilizado en filtros de nitrocelulosa en puntos triplicados, 2 μ g por punto) consiste en oligonucleótidos sintéticos con una sola hebra en lugar del cADN del TS. Las sondas de oligonucleótidos específicos con hileras también se usaron para evaluar los niveles de mRNA metalotioneina-2 (MT-2) humano y ARN antisentido como controles positivos y negativos, respectivamente. Los oligonucleótidos se inmovilizaron en filtros de nitrocelulosa al disolverse en 6XSSC (16 μ g por ml) y al aplicar 125 μ l por punto, usando un aparato para manchas BioRad. Las sondas del cADN complementarias sin etiquetar para el mRNA GAPDH (Denhardt *et al.*, 1988) y el ARN ribosomal 18S (Behrend *et al.*, 1994) fueron desnaturalizadas e inmovilizadas en los mismos filtros de nitrocelulosa (5 μ g por punto, puntos triplicados) usando un protocolo descrito anteriormente (Koropatnick, 1988). La hibridización del ARN radioetiquetado para estos puntos evaluó la transcripción de los genes GAPDH y rARN 18S, y actuó como estándares internos contra los cuales se midieron los cambios en la transcripción del gen del TS. Para las células transfectadas con oligonucleótidos con una sola hebra, la transcripción del gen del TS fue evaluada por la hibridización de las transcripciones del ARN del TS radioetiquetado para inmovilizar el ADN objetivo que consta de un fragmento de 1.9 kb *Xho* I aislado de pCHTS-1.

ES 2 280 098 T3

Los filtros de nitrocelulosa que contienen puntos triplicados de las sondas de los oligonucleótidos y el cADN para evaluar la transcripción seguida de los vectores de expresión del ARN del TS antisentido, y genes del TS, MT-2, GAPDH y rARN de 18 S endógenos, fueron hibridizados previamente en el amortiguador Church durante 20 minutos a 65°C en una cámara de hibridización Hybaid. Después, se removió el amortiguador de hibridización previa, se agregaron 2 mis del ARN radioetiquetado que resulta de 30 min de la transcripción seguida en los núcleos aislados (en el amortiguador de hibridización Church, 4 X 106 cpm por ml), y los filtros fueron hibridizados durante 48 horas a 65°C. Después los filtros se lavaron dos veces a 65°C en el amortiguador de posthibridización (40 mM Na2HPO4. 1% SD5; 20 mm por lavado). El amortiguador de posthibridización se removió y 8 ml de RNasa A (1 µg por ml in 6XSSC) fue agregada y encubada durante 30 minutos a 37°C para reducir la señal del ARN radioetiquetado sin hibridizar. Después que un lavado final en los filtros del amortiguador de posthibridización (10 min 37°C) fueron secados por las manchas y la radioactividad enlazada haya sido visualizada y cuantificada mediante el uso de un PhosphorImager™ y el programa ImageQuant™ (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). La transcripción relativa de los vectores de expresión del TS antisentido, genes T5 endógenos, y genes MT-2 se definió según:

$$\text{Índice de transcripción relativa} = \frac{(\text{señal de hibridización a partir del gen de interés})}{(\text{señal de hibridización para genes GAPDH o 1 Ss rARN})}$$

Sondas de los oligonucleótidos del RS

Las bases en negrillas (abajo) forman parte de los sitios de endonucleasa de restricción, y no son secuencias del TS sentido o antisentido. La numeración indica la distancia desde el principio del sitio de inicio de la transcripción.

Nucleótidos del cADN de TS 111 a 140

TS(JK-5) *sentido*: CTAGATGTGGCCGGCTCGGAGCTGCCGCGCCGGCCA (SEC ID NO: 11)
TS (JK-2) *antisentido*: AGCTTGGCCGGCGCE3GCAGCTCCGAGCCGGCCACAT (SEC ID NO: 12)

Nucleótidos de cADN de TS 296 a 325

TS (JK-3) *sentido*: GTAGAGCTACAGCCTGAOAGATGAATTCCTCTGCA (SEC ID NO:13)
TS (JK-4) *antisentido*: AGCTTGCGAGAGGAATTCATCTCTCAGGCTGTAGGT (SEQ ID NO:14)

Sondas de oligonucleótidos MT-2 (Karin y Richards, 1982):

Las secuencias de oligonucleótidos sentido y antisentido no tienen secuencias no complementas agregadas a los extremos 5' y 3'. La numeración indica la distancia desde el sitio de inicio de la translación.

Nucleótidos del cADN de MT -14 a 6

MT sentido: CTCTTCAGCACGCCATGGAT (SEO ID NO: 15)

Nucleótidos del cADN de MT 204 a 223

MT antisentido: AGGGTCTACCMCTTGCGC (SEO ID NO: 16)

Ejemplo 1.2

Las regiones objetivo del oligodeoxinucleótido antisentido en o cerca del sitio de parada de la traducción en el extremo 3' del gen del TS como método para inhibir el crecimiento de las células de tumores humanos

a) Un oligodeoxinucleótido antisentido 20-mer (oligo 86) dirigido al sitio de parada de la traducción en el extremo 3' del mRNA del timidilato sintasa es un crecimiento inhibidor (citoestático) en una línea de células de cáncer mamario humano (células MCF-7). Los oligonucleótidos antisentido del mismo tramo (oligos 90 y 92), dirigidos a las regiones en o cerca del sitio de inicio de la traducción en el extremo 5' del mRNA de TS, no son citoestáticos (Figura 1).

b) Los oligodeoxinucleótidos antisentido 20-mer dirigidos al sitio de inicio de la traducción del mRNA del TS (oligos 91 y 93) no inhibieron el crecimiento de una línea de células de carcinoma cervical humano (HeLa). De hecho, el crecimiento se incrementó significativamente. Los oligodeoxinucleótidos antisentido dirigidos al extremo 3' del mRNA del TS, incluso el sitio de parada de la translación (oligo 86) o una secuencia en la región no trasladada 3' (oligo 83) inhibió significativamente el crecimiento de las células HeLa. Un oligonucleótido del TS antisentido dirigido a otra secuencia en la región no trasladada 3' del mRNA del TS (oligo 81) no tiene efecto en el crecimiento de las células HeLa (Figuras 2 y 3).

Por lo tanto, los oligodeoxinucleótidos del TS antisentido dirigidos al sitio de inicio de la translación tuvieron éxito al inhibir el crecimiento de dos diferentes líneas de células de tumores humanos (células MCF-7 del carcinoma de

mamas humano MCF-7 o células HeLa del carcinoma cervical humano). Dos oligodeoxinucleótidos del TS antisentido dirigidos al extremo 3' del gen del TS fueron inhibidores potentes del crecimiento de las células de tumores humanos.

Ejemplo 1.3

(a) El oligodeoxinucleótido antisentido que apunta al sitio de parada de la translación del timidilato sintasa como método para incrementar la sensibilidad de las células de tumores humanos a los efectos tóxicos del Tomudex™ (ZD 1694).

Los oligonucleótidos del TS antisentido (oligos 86 y 83) que apuntan a las secuencias en la región no traducida 3' del mRNA del TS incrementaron la sensibilidad de las células del carcinoma cervical humano para el Tomudex. El incremento en la sensibilidad fue en adición a los efectos directamente citostáticos de los oligos 86 y 83 (Figuras 4 y 5).

(b) El oligodeoxinucleótido antisentido que apunta al sitio de inicio de la traducción del timidilato sintasa como método para incrementar la resistencia de las células humanas a los efectos tóxicos del Tomudex™ (ZD 1694).

Un oligodeoxinucleótido del TS antisentido (oligo 91) que apunta al sitio de inicio de la translación del mRNA del TS incrementa la resistencia de las células del carcinoma cervical humano a los efectos tóxicos del Tomudex™ (Figura 4).

Ejemplo 1.4

La inducción de la transcripción de los genes dirigidos con los ácidos nucleicos antisentido como un método de filtro para identificar las secuencias objetivo apropiadas para los ácidos nucleicos antisentido

Las células de tumores humanos parecen compensar la inactivación antisentido del mRNA específico al incrementar la transcripción de los genes que producen las secuencias objetivo, un proceso que puede llamarse "transcripción compensatoria", que resulta en la resistencia a la efectividad de los ácidos nucleicos antisentido. Se ha observado que la transcripción del gen del TS se induce en células de carcinoma de mamas MCF-7 humanas por el tratamiento con ARN del TS antisentido y oligodeoxinucleótidos dirigidos a las regiones en o cerca del sitio de inicio de la translación del mRNA del TS. El mismo fenómeno se ha observado en células HeLa humanas transfectadas transitoriamente con oligo 91 del TS antisentido (dirigido al sitio de inicio de la traducción), pero no en respuesta al oligo 86 (dirigido al sitio de parada de la translación) (Figura 6). La transcripción de genes específicos en respuesta a los ácidos nucleicos antisentido transfectados indicaría la secuencia objetivo apropiada para lograr la expresión de los genes regulados. Por otro parte, puede ser una secuencia apropiada apuntar para lograr la expresión de genes regulados (para aumentar la resistencia a las drogas quimioterapéuticas), por ejemplo, en tejidos normales.

En resumen, la presente invención ha demostrado que los oligonucleótidos antisentido, dirigidos en contra de las regiones seleccionadas del mRNA del timidilato sintasa, puede inhibir efectivamente el crecimiento cuando se administra sola. También pueden incrementar el exterminio de células mediante el Tomudex™. Por el contrario, los oligonucleótidos antisentido dirigidos a ciertas regiones del mRNA (por ejemplo, el sitio de inicio de la traducción) puede ser ya sea inefectivo, o incrementar el crecimiento y supervivencia durante la exposición al Tomudex™. La inefectividad puede deberse a la transcripción del gen del TS inducido con oligonucleótidos. Es esencial identificar las regiones del mRNA del TS a las que se puede apuntar efectivamente con las secuencias antisentido para inhibir el crecimiento de las células de tumores e incrementar la toxicidad de las drogas anticancerígenas. Además, el mecanismo por el cual las secuencias antisentido dirigidas a las regiones del mRNA del TS de 5' induce la transcripción del gen del TS tiene importantes implicaciones para elegir objetivos antisentido para el mRNA del TS en particular, y para optimizar las estrategias antisentido en general.

Ejemplo 2

Ejemplo 2.1

Métodos Experimentales

Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos de 20 bases completamente con fósforotiorato fueron sintetizados por ISIS Pharmaceuticals (Carisbad, California, EE.UU.). Los 6 nucleótidos en cada extremo del oligómero fueron tratados con metoxi-etoxi en la posición de 2', incrementando la hibridización así como también la resistencia a la exonucleación. Los 8 nucleótidos intermedios no fueron tratados con metoxi-etoxi para permitir la endonucleación y degradación RNasa H del mRNA hibridizado para el oligómero. El ODN 83 es complementario para el mRNA del TS que se inicia en una posición de 136 bases corriente abajo del sitio de parada de la translación (5'-GCCAGTGE3CAACATCCTTAA-3'). El ODN 32 es una secuencia al azar del ODN 83 (5'-ATGCGCCAACGGTTCCTAAA-3'), con los mismos constituyentes base en orden aleatorio. Una búsqueda de secuencias del mRNA disponible mediante el uso de la herramienta de búsqueda NCBI BLAST reveló que el ODN 83 tenía secuencias de 10 o más bases complementarias para sólo el mRNA del TS humano, mientras que el ODN 32 tenía secuencias de 10 o más bases complementarias para los mRNA desconocidos.

Radioisótopo

El [6-³H]5-FUdR (actividad específica 18.6 Ci/mmol) se compró de Moravek Siochemicais (Brea, California, EE.UU.). Este isótopo era 99.98% puro sobre la producción inicial, con un índice de degradación de 0.5-1% por mes a -20°C, y se usaba dentro de los 3 meses de fabricación.

Otros suministros

Los químicos y nutrientes para cultivos celulares se obtuvieron de Canadian Life Technologies (GIBCO) (Burlington, Ontario, Canadá). Todos los otros químicos se obtuvieron de fuentes comerciales. El Plasticware se compró de VWR Caniab (Mississauga, Ontario, Canadá) y Fisher Scientific Uniondale, Ontario, Canadá).

Cultivo Celular

Las células HeLa del carcinoma cervical humano se mantuvieron en D-MEM más 10% de suero bovino fetal y penicilina (50 unidades/ml)/estreptomina (50 µg/ml). Los cultivos se encubaron en una atmósfera humectada de 5% de CO₂, a 37°C. Las células que proliferaron rápidamente se utilizaron para establecer los cultivos de las células experimentales, que se dejaron en placas durante la noche antes de su manipulación.

Las transfección se realizó mediante el uso de Lipofectamina (LFA, GIBCO-BRL), una formulación de liposomas policatiónicos. Las células a usar para los experimentos de proliferación se colocaron en placas en un número de células de inicio de entre 0.6 y 1 x 10⁵ células por frasco de cultivos de tejidos de 25-cms, y el LFA se usó en 3 µg/ml. Para las células en frascos de 75-cms, que debían ser cosechadas y extraídas para el ensayo del contenido del mRNA o TS, el número de células de inicio era aproximadamente 8 - 10 x 10⁵, y la concentración de LFA era 4 µg/ml. Antes de la transfección, las células HeLa adherente se lavó una vez con PBS y después se trató con ODN de control antisentido o mezclado (50 nM) en la concentración apropiada de LFA en D-MEM libre de suero, a 37°C durante 6 horas. Después las células se lavaron una vez con PBS y se cultivaron en presencia de D-MEM más 10% de FBS. En las células tratadas con 10 agentes citotóxicos, la exposición se inició 24 horas después de la remoción del LFA/ODN, mediante la adición de 0.2- de volumen del medio de crecimiento que contiene el agente a 6 veces la concentración final. Al momento de la adición de la droga, y después de 4 días de incubación, el número de células fue determinado de los frascos replegados al enumerar con un contador de partículas (Coulter Electronics, Hialeah, Florida, USA). La proliferación de las células tratadas con drogas (pliegue-incremento en el número de células) se calculó como un porcentaje de aquel de las células de control. Los valores IC₅₀ e IC₉₀ fueron determinados por la interpolación de la fecha tramada.

RT-PCR para medir el mRNA de TS

El ARN se aisló de las células transfectadas mediante el uso de TrizolTM (GIBCO BRL). El ADN complementario fue sintetizado de 1 µg del ARN total mediante el uso de 200 U de transcriptasa inversa del Moloney Murine Leukemia Virus (GIBCO BRL) en 50 mM de Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂, 1 mM mezclado de dNTPs, 100 pmol de iniciadores aleatorios y 10 mM de ditiotretiol a 37°C durante 1 hora. La enzima estuvo inactivada a 95°C durante 5 minutos. Los cADN resultantes (en un volumen de 2.5 µl) se amplificaron en una reacción en cadena de polimerasa (PCA) mediante el uso de 1.25 U de polimerasa de ADN Taq en 50 µl de 20 mM de Tris-HCl pH 8.4), 50 mM de KCl, 0.2 mM mezclado de dNTPs, 2 mM de MgCl₂, y 50 pmol de iniciadores específicos para los cADN del TS y GAPDH. Los cADN del TS y GAPDH fueron amplificados conjuntamente en el mismo tubo de reacción para permitir el nivel del cADN de cuidado doméstico que se usará para determinar el nivel relativo del mRNA del TS. Veinticuatro a 27 ciclos de amplificación de PCR (94°C 45 s, 55°C 30 s, 72°C 90 s) produjeron fragmentos de 208 bp y 752 bp mediante el uso de grupos de primer para el TS (adelante 5' CACACTTTGGGA GATGCACA3' (SEC ID NO: 17); inverso 5' CTTTGAAAGCACCCTAAACAGCCAT3' (SEC ID NO: 18)) y GAPDH (adelante 5' TATTGGGCGCCTGGTCACCA3' (SEC ID NO: 19); inverso 5' CCACCTTCTTGATGTCATCA3') (SEC ID NO: 20), respectivamente. Los productos PCR fueron separados en 1.2% de gel de azarosa, y se transfirieron a la membrana de nylon Hybond (Amersham, Canadá, Ltd., Oakville, Ontario, Canadá) mediante analisis souterhnh blot. Las manchas fueron hibridizadas a las sondas etiquetadas [α -³²P]dCTP del iniciador aleatorio (pCHTS-1, un generoso regalo de parte del Dr. K. Takeishi, Universidad de Shizuoka, Shizuoka, Japón; o un inserto del cADN que reconoce la dehidrogenasa de fosfato 3 de gliceraldehído [GAPDH]). Las señales de hibridización fueron cuantificadas mediante el uso del PhosphorimagerTM e ImageQuantTM (Molecular Dynamics. Sunnyvale, California, USA).

Ensayo del enlace del TS

El contenido celular del TS se ensayó mediante el enlace del [6-³H]5-FdUMP. Este método fue demostrado para etiquetar el TS total a menos que las células fueran tratadas previamente con 5-FU o 5-FUdR. El ensayo se realizó mediante el uso de células que fueron tratadas con ODN 83 antisentido u ODN 32 de control mezclado. En breve, las células fueron cultivadas al raspar dentro del PBS y al suspender nuevamente el gránulo subsiguiente en 100 mM KH₂PO₄ (pH 7.4); Las células fueron desestabilizadas al congelar y descongelar, seguido por la sonicación. La concentración total de proteínas se determinó al usar la mancha de Coomassie (reagente de BioRad) (MI) para expresar los resultados como pmol 5-FdUMP enlazado por mg de proteína total. El enlace de 5-FdUMP fue evaluado en lisatos pareados a partir de las células transfectadas con ODN 83 u ODN 32, en reacciones de incubación separadas que se llevaron a cabo en diferentes días; sin embargo, los pares siempre fueron evaluados conjuntamente bajo las

5 mismas condiciones de reacción. En cada ocasión, los recipientes de incubación contenían 50 µg de proteína total, 75 M de metileno-FH4, 100 mM de mercaptoetanol, 50 mM de KH₂PO₄ (pH 7.4), y 15 nM de [6-³H]5- FdUMP en un volumen final de 200 µl. Después de 30 minutos a 37°C, se detuvo la incubación al agregar 5 volúmenes de carbón vegetal activado y recubierto con albúmina. Después de 10 minutos (a temperatura ambiente), esta pasta acuosa se centrifugó (3000 x g, 30 minutos, 22°C), y el supernatante fue recentrifugado para remover completamente la materia de partículas. Dos alícuotas de 300 µl cada uno se removieron del supernatante final purificado para la cuenta del centelleo.

10 *Análisis estadístico*

Los datos correspondientes al crecimiento de las células después del tratamiento con los ODN solos, o en combinación con drogas citotóxicas, se presentan como el error estándar +/- del medio o desviación estándar según determinado por la prueba t de Student. Para las determinaciones del enlace del FdUMP, las diferencias entre las muestras pareadas de las células transfectadas con los diferentes ODN fueron evaluadas mediante el uso de la prueba t en pares. Esto controlado para las diferencias en condiciones experimentales en cada una de las 5 ocasiones que se evaluó el aglutinamiento de FdUMP. En todos los casos, el significado fue elegido *a priori* para ser indicado por las diferencias en un nivel de confianza de p<0.02.

Referencias

- 20 **Almendral, J.M., et al. *Mol. Cell. Biol.* 8:2140-2148, 1988.**
- Ayusawa, D., et al. *J. Mol. Biol.* 190:559-567, 1996.**
- 25 **Behrend, El., et al. *Cancer Res.* 54:832-837, 1994.**
- Calvert, A.H., et al. *J. Clin. Oncol.* 4:1245-1252, 1986.**
- Chu, E., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8977-8981, 1991.**
- 30 **Chu, E., et al. *Mol. Pharm.* 43:527-533, 1993a.**
- Chu, E., et al. *Mol. Cell. Biol.* 15:179-185, 1995.**
- 35 **Chu, E., et al. *Mol. Cell. Biol.* 14:207-21 3, 1994.**
- Chu, E., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:517-521, 1993b.**
- Chu, E., et al. *Cancer Res.* 50:5834-5840, 1990.**
- 40 **Church y Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:191-1995, 1984.**
- Danenbergh, P.V., *Biochim. Biophys. Acta* 473:73-92, 1977.**
- 45 **DeGregori, J., et al. *Mol. Cell. Biol.* 15:4215-4224, 1995.**
- Denhardt, D.T., et al. *Oncogene* 2:55-59, 1988.**
- Farnham, P.J., et al. *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer* 1155:125-131, 1993.**
- 50 **Hardy, L.W., et al. *Science* 235:448-455, 1987.**
- Heidelberger, C., et al. *Adv. Enzymol.* 54:58-119, 1983.**
- 55 **Jackman, AL., et al. *Adv. Enzyme Regul.* 31:13-27, 1991a**
- Jackman. AL., et al. *Cancer Res.* 51:5579-5536, 1991b.**
- Jelinek, W.R., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:1398-1402, 1980.**
- 60 **Jenh, C.-H., et al. *Mol. Cell. Biol.* 5:527-2532, 1985.**
- Johnson, L.F., *J. Cell. Biochem.* 54:387-392, 1994.**
- 65 **Karin, M., et al. *NucleicAcids Res.* 10:3165-3173, 1982.**
- Keyomarsi, K., et al. *J Biol. Chem.* 268:15142-15149, 1993.**

Kikuchi, K., et al. *J. Biol. Chem.* 267:21505-21511, 1992.

Koropatnick, J. et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 188:287-300, 1988.

5 **Koropatnick, J., et al. *BioTechniques* 22:64-66, 1997.**

Koropatnick, J., et al. *Mol. Biol. Med.* 5:69-83, 1988.

10 **Locksin, A., et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:750-754. 1979.**

Maley y Maley, *J. Biol. Chem.* 235:2968-2970, 1960

Marzluff y Huang, IRL Press, Oxford, 89-129. 1984.

15 **M Kay, R.A., et al. *Nucleic Acids. Res.* 24:411-417, 1996.**

Mudrak, I., et al. *Mol. Cell. Biol.* 14:1886-1892, 1994.

20 **Navalgund, L.G. et al. *J. Biol. Chem.* 255:7386-7390, 1980.**

Peters, G.J., et al. *Cancer Res.* 46:20-28, 1986.

Peters, G.J., et al. *Eur. J. Cancer* 30A:1408-1411, 1994.

25 **Rapaport, E., et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 89:8577-3580, 1992.**

Sambrook, J., et al. *T. Molecular Cloning: A Laboratory Mannal*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

30 **Suzuki. M., et al. *Oncology* 51:334-338, 1994.**

Takeishi, K., et al. *Nucleic Acids Res.* 13:2035-2043, 1985.

35 **Voeller, DM., et al. *Nucleic Acids Res.* 23:869-875, 1995.**

Volm et al. *Anticancer Research* 14(3B):1271-1275, 1994.

Volm y Mattern, *Anticancer Res.* 12:2293-2296, 1992.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un deoxioligonucleótido antisentido que consta de 8 a 50 nucleótidos y abarca una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia en o cerca del sitio de parada de la translación en el extremo 3' de un gen de timidilato sintasa humano, en donde dicho deoxioligonucleótido inhibe la producción del timidilato sintasa en una célula mamífera y es resistente a la enzima nucleasa.
2. El deoxioligonucleótido antisentido de acuerdo a la reivindicación 1 que incluye de 12 a 40 nucleótidos.
3. El deoxioligonucleótido antisentido de acuerdo a la reivindicación 1 que incluye de 16 a 30 nucleótidos.
4. El deoxioligonucleótido antisentido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que incluye una de las siguientes secuencias de nucleótidos GCCAGTGGCAACATCCTTAA o AAGCACCCCTAAACAGCCATT.
5. El deoxioligonucleótido antisentido de acuerdo a la reivindicación 4 que incluye la siguiente secuencia de nucleótidos: GCCAGTGGCAACATCCTTAA.
6. El deoxioligonucleótido antisentido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho deoxioligonucleótido es tratada con fósforotiorato.
7. El deoxioligonucleótido antisentido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde los 6 nucleótidos terminales en los extremos 5' y 3' de dicho deoxioligonucleótido son de 2'-metoxietoxilados.
8. El deoxioligonucleótido antisentido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde dicha secuencia de nucleótidos es complementaria a una región del gen del timidilato sintasa entre las bases de nucleótidos 800 y 1536 de la secuencia de la Figura 7a.
9. El deoxioligonucleótido antisentido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde dicha secuencia de nucleótidos es complementaria a una región del gen del timidilato sintasa entre las bases de nucleótidos 1000 y 1530 de la secuencia de la Figura 7a.
10. El deoxioligonucleótido antisentido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicha secuencia de nucleótidos es complementaria a una región del gen del timidilato sintasa entre las bases de nucleótidos 1030 y 1460 de la secuencia de la Figura 7a.
11. El deoxioligonucleótido antisentido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicha célula mamífera es una célula de cáncer cervical.
12. El deoxioligonucleótido antisentido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde dicha célula mamífera es una célula de cáncer mamario.
13. El deoxioligonucleótido antisentido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde dicha célula mamífera es una célula humana.
14. Una composición farmacéutica que incluye el deoxioligonucleótido antisentido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, y un diluyente o transportador farmacéuticamente aceptable.
15. Un producto de combinación que incluye el deoxioligonucleótido antisentido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en combinación con un agente anticancerígeno.
16. El producto de combinación de acuerdo a la reivindicación 15, en donde el agente anticancerígeno es un inhibidor del timidilato sintasa, un agente citoestático o una droga antiproliferativa.
17. El producto de combinación de acuerdo a la reivindicación 15 o 16, en donde el agente anticancerígeno es un inhibidor del timidilato sintasa.
18. El producto de combinación de acuerdo a la reivindicación 15 o 16, en donde el agente anticancerígeno es un agente citoestático.
19. El producto de combinación de acuerdo a la reivindicación 15 o 16, en donde el agente anticancerígeno es una droga antiproliferativa.
20. El producto de combinación de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en donde el agente anticancerígeno es N-(5-[N-(3,4-dihidro-2-metil-4-oxoquinazolin-6-ilmetil)-N-metilamino]-2-tenoil)-L-ácido glutámico).

ES 2 280 098 T3

21. El producto de combinación de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en donde el agente anticancerígeno es (S)-2-(2-fluoro-4-[N-(4-hidroxi-2,7-dimetilquiazolin-6-ilmetil)-N-(prop-2-ynil)amino]benzamido)-4-(1 H-1,2,3,4-tetrazol-5-il)-ácido butírico).

22. El producto de combinación de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 15, 16 o 19, en donde el agente anticancerígeno es metotrexato.

23. El producto de combinación de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 15, 16 o 19, en donde el agente anticancerígeno es una fluoropirimidina.

24. El producto de combinación de acuerdo a la reivindicación 23, en donde dicha fluoropirimidina se selecciona a partir de 5-fluorouracil, FdUR, florafur y FdUR.

25. El producto de combinación de acuerdo a la reivindicación 24, en donde dicha fluoropirimidina es 5-fluorouracil.

26. El producto de combinación de acuerdo a la reivindicación 24, en donde dicha fluoropirimidina es 5-FdUR.

27. Una composición farmacéutica que incluye el producto de combinación de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 15 a 26, y un diluyente o transportador farmacéuticamente aceptable.

28. El deoxiligonucleótido antisentido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para el uso en el tratamiento del cáncer en un mamífero.

29. El deoxiligonucleótido antisentido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para el uso para inhibir la proliferación de células en un mamífero.

30. El deoxiligonucleótido antisentido de acuerdo a la reivindicación 29, en donde dicha proliferación de células es la proliferación de células de tumor.

31. El deoxiligonucleótido antisentido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 para el uso para incrementar la sensibilidad de una célula mamífera a un agente anticancerígeno.

32. El deoxiligonucleótido antisentido de acuerdo a la reivindicación 31, en donde dicha célula mamífera es una célula de tumor.

33. El deoxiligonucleótido antisentido de acuerdo a la reivindicación 31 ó 32, en donde dicho agente anticancerígeno es una fluoropirimidina.

34. El deoxiligonucleótido antisentido de acuerdo a la reivindicación 33, en donde dicha fluoropirimidina se selecciona a partir de 5-fluorouracil, FdUR, florafur y FdUR.

35. El deoxiligonucleótido antisentido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 28 a 34, en donde dicho mamífero es un humano.

36. El producto de combinación de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 15 a 26, para el uso en el tratamiento del cáncer en un mamífero.

37. El producto de combinación de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 15 a 26, para el uso para inhibir la proliferación de células en un mamífero.

38. El producto de combinación de acuerdo a la reivindicación 37, en donde dicha proliferación de células es la proliferación de células de tumor.

39. El producto de combinación de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 15 a 26, para el uso para incrementar la sensibilidad de una célula mamífera al agente anticancerígeno de dicho producto de combinación.

40. El producto de combinación de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 15, 16 o 19 para el uso para incrementar la sensibilidad de una célula mamífera a dicho agente anticancerígeno, en donde el mismo es una fluoropirimidina.

41. El producto de combinación de acuerdo a la reivindicación 40, en donde dicha fluoropirimidina se selecciona a partir de 5-fluorouracil, FdUR, florafur y FdUR.

42. El producto de combinación de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 39 a 41, en donde dicha célula mamífera es una célula de tumor.

ES 2 280 098 T3

43. El producto de combinación de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 36 a 42, en donde el mamífero es un humano.

5 44. El uso del deoxioligonucleótido antisentido de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para la preparación de un medicamento.

45. El uso de acuerdo a la reivindicación 44, en donde el medicamento es para el tratamiento del cáncer en un mamífero.

10 46. El uso de acuerdo a la reivindicación 44, en donde el medicamento es para la inhibición de la proliferación de células en un mamífero.

15 47. El uso de acuerdo a la reivindicación 46, en donde dicha proliferación de células es la proliferación de células de tumor.

48. El uso de acuerdo a la reivindicación 44, en donde dicho medicamento es para incrementar la sensibilidad de una célula mamífera a un agente anticancerígeno.

20 49. El uso de acuerdo a la reivindicación 48, en donde dicha célula mamífera es una célula de tumor.

50. El uso de acuerdo a la reivindicación 48 o 49, en donde dicho agente anticancerígeno es fluoropirimidina.

25 51. El uso de acuerdo a la reivindicación 50, en donde dicha fluoropirimidina se selecciona desde 5-fluorouracil, FudR, florafur y FdUR.

52. El uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 45 a 51, en donde el mamífero es un humano.

30 53. El uso del producto de combinación de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 15 a 26, en la preparación de un medicamento.

54. El uso de acuerdo a la reivindicación 53, en donde el medicamento es para el tratamiento del cáncer en un mamífero.

35 55. El uso de acuerdo a la reivindicación 53, en donde el medicamento es para la inhibición de la proliferación de células en un mamífero.

56. El uso de acuerdo a la reivindicación 55, en donde dicha proliferación de células es la proliferación de células de tumor.

40 57. El uso de acuerdo a la reivindicación 53, en donde dicho medicamento es para incrementar la sensibilidad de una célula mamífera a dicho agente anticancerígeno del producto de combinación.

45 58. El uso de un producto de combinación de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 15, 16, o 19 para preparar un medicamento para incrementar la sensibilidad de una célula mamífera al agente anticancerígeno del producto de combinación, en donde dicho agente anticancerígeno es una fluoropirimidina.

59. El uso de acuerdo a la reivindicación 58, en donde dicha fluoropirimidina es seleccionada a partir de 5-fluorouracil, FudR, florafur y FdUR.

50 60. El uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 57 a 59, en donde dicha célula mamífera es una célula de tumor.

61. El uso de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 54 a 60, en donde el mamífero es un humano.

55

60

65

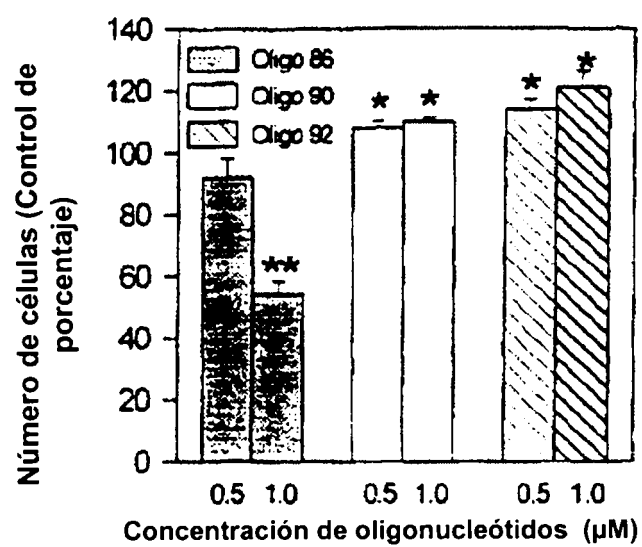


Figura 1

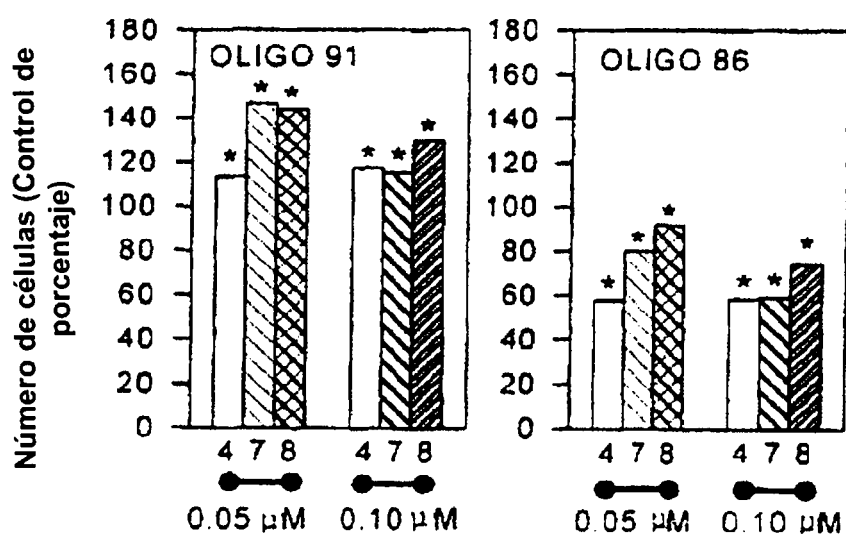


Figura 2

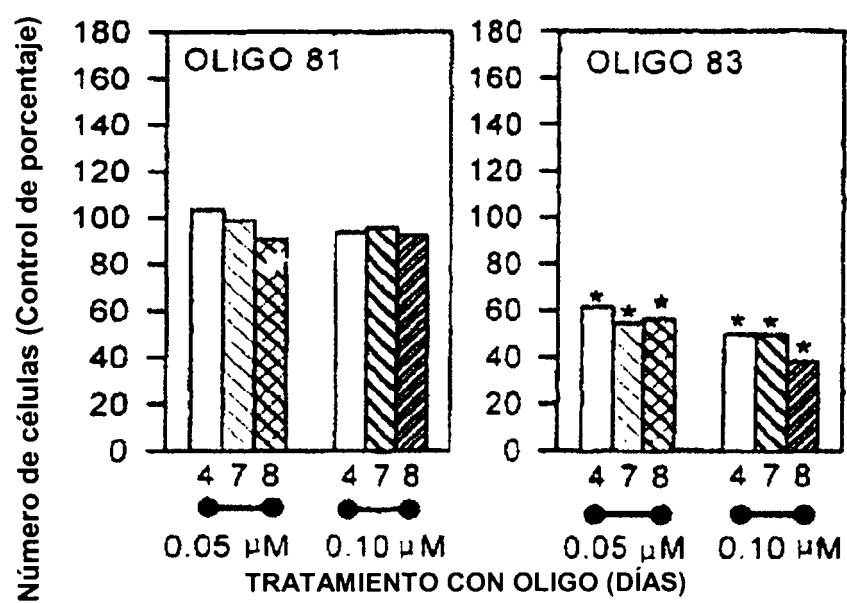


Figura 3

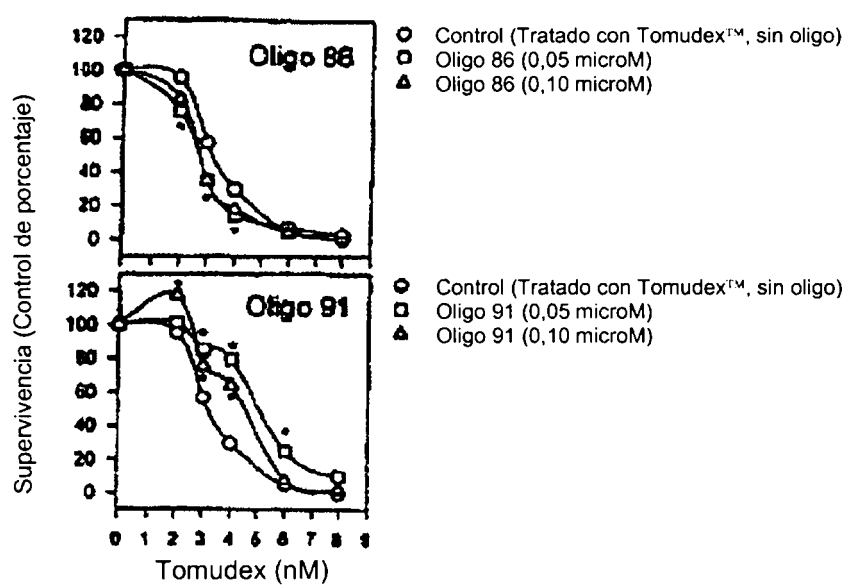


Figura 4

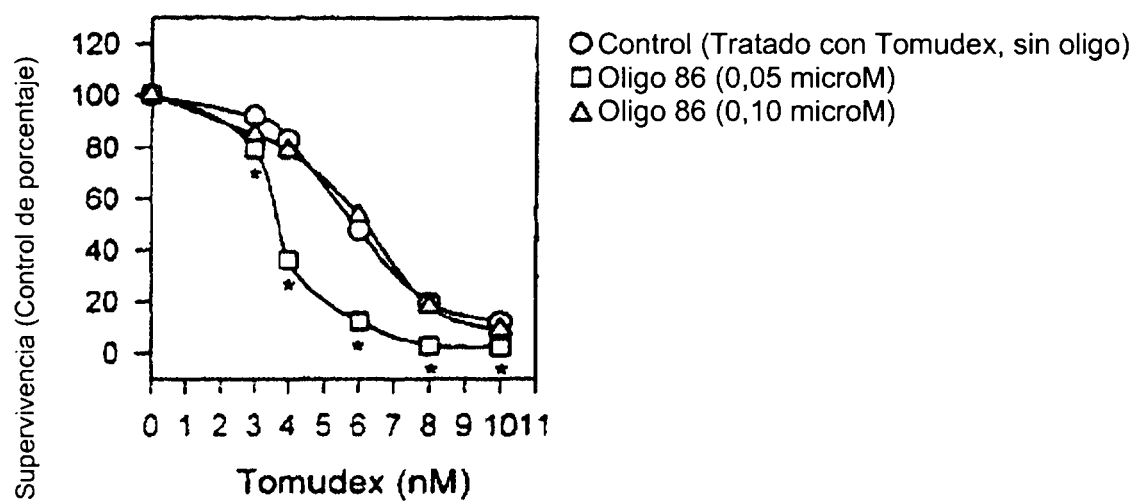


Figura 5

	Control de LFA (sin DNA)	Oligo 86 (0.05 µM)	Oligo 86 (0.10 µM)	Oligo 91 (0.05 µM)	Oligo 91 (0.10 µM)
Timidilato sintasa	+	+	+	+	+
Gliceraldehído fosfato dehidrogenasa	+	+	+	+	+
18S rRNA	+	+	+	+	+

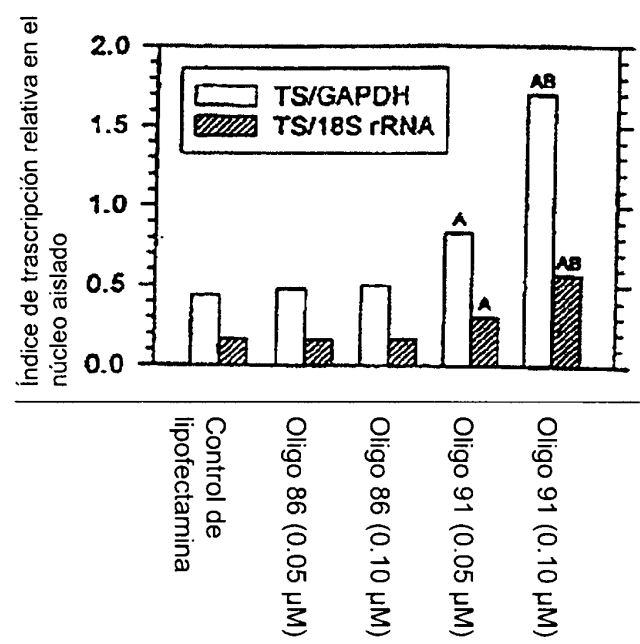


Figura 6

No se muestran las primeras 80 bases en cDNA/mRNA

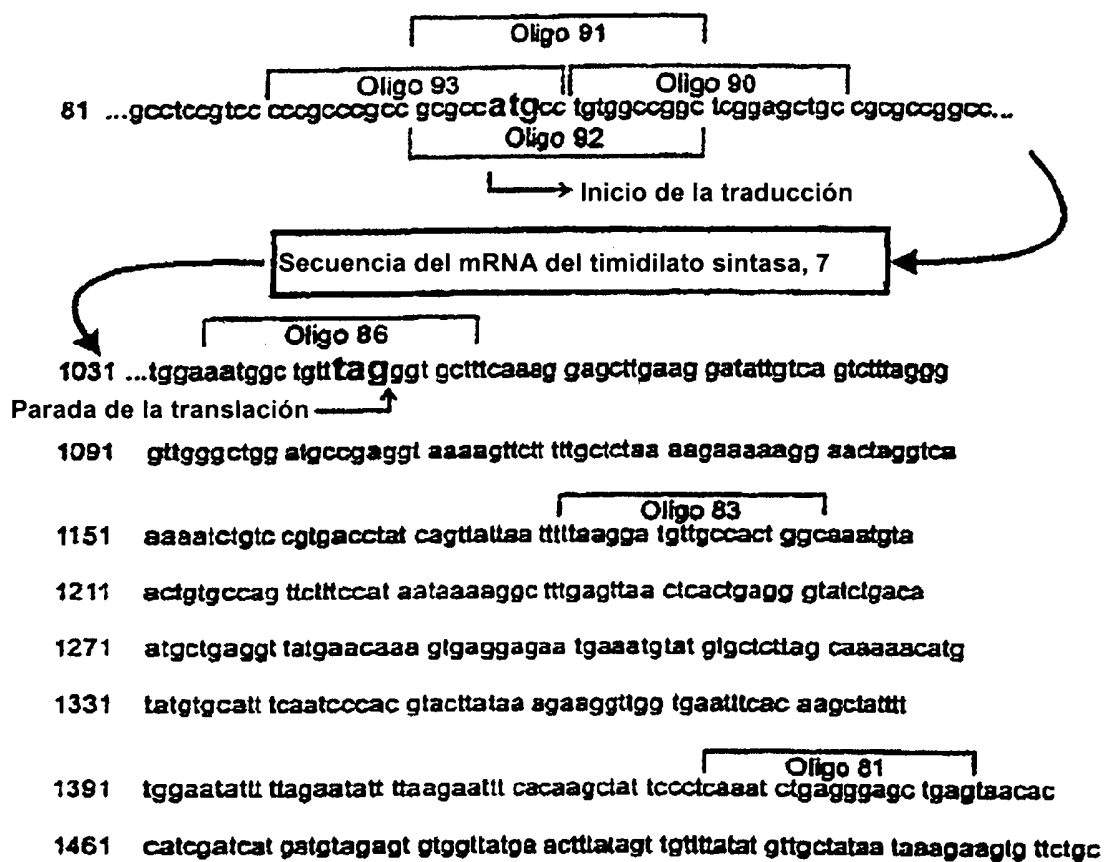


Figura 7

**Secuencia completa del mRNA (cDNA) humano para las bases 1 hasta
1536 del timidilato sintasa (EC 2.1.1.45)**

```

gggggggggg ggaccacttg gcctgcctcc gtcccgccgc gccacttggc ctgcctccgt 60
cccgcgcgc cacttcgcct gcctccgtcc cccgcgcgc gcgccatgcc tgtggcgcgc 120
tcggagctgc cgcgcgcgc cttgcccccc gccgcacagg agcgggacgc cgagccgcgt 180
ccgcgcacgc gggagctgca gtacctgggg cagatccaac acatcctccg ctgcggcgctc 240
aggaaggacg accgcacggg caccggcacc ctgtcggtat tcggcatgca ggcgcgctac 300
agcctgagag atgaattccc tctgctgaca accaaacgtg tgttctggaa ggggtgttttg 360
gaggagtgtc tgtgggtttat caagggatcc acaaattgcta aagagctgtc ttccaagggg 420
gtgaaaatct gggatgccaa tggatcccca gacttttttg acagcctggg attctccacc 480
agagaagaag gggacttggg ccaggtttat ggcttccagt ggaggcattt tggggcagaa 540
tacagagata tggaatcaga ttattcagga caggaggttg accaactgca aagagtgtat 600
gacaccatca aaaccaaccc tgacgacaga agaatcatca tgtgcgcttg gaatccaaga 660
gatcttcctc tgatggcgct gcctccatgc catgcctct gccagttcta tgtggtgaac 720
agtgcgtgt cctgccagct gtaccagaga tcgggagaca tgggcctcgg tgtgcctttc 780
aacatcgcca gctacgccct gctcacgtac atgattgcgc acatcacggg cctgaagcca 840
ggtgacttta tacacacttt gggagatgca catatttacc tgaatcacat cgagccactg 900
aaaattcagc ttcagcgaga acccagacct ttcccaaagc tcaggattct tcgaaaagtt 960
gagaaaattg atgacttcaa agctgaagac tttcagattg aagggtacaa tccgcattcca 1020
actattaata tggaaatggc tgtttagggt gctttcaaag gagcttgaag gatattgtca 1080
gtctttaggg gttgggctgg atgccagggt aaaagtctct tttgctctaa aagaaaaagg 1140
aactaggta aaaatctgtc cgtgacctat cagttattaa tttttaagga tgttgccact 1200
ggcaaatgta actgtgccag ttctttccat aataaaaggc tttgagttaa ctactgagg 1260
gtatctgaca atgctgaggt tatgaacaaa gtgaggagaa tgaatgtat gtgctcttag 1320
caaaaacatg targtgcatt tcaatcccac gtacttataa agaaggtttg tgaatttcac 1380
aagctatttt tggaaatatt ttagnaattt ttaagaattt cacaagctat tccctcaaat 1440
ctgagggagc tgagtaaacac catcgatcat gatgtagagt gtggttatga actttatagt 1500
tgttttatat gttgctataa taaagaagtg ttctgc
1536

```

Figura 7a

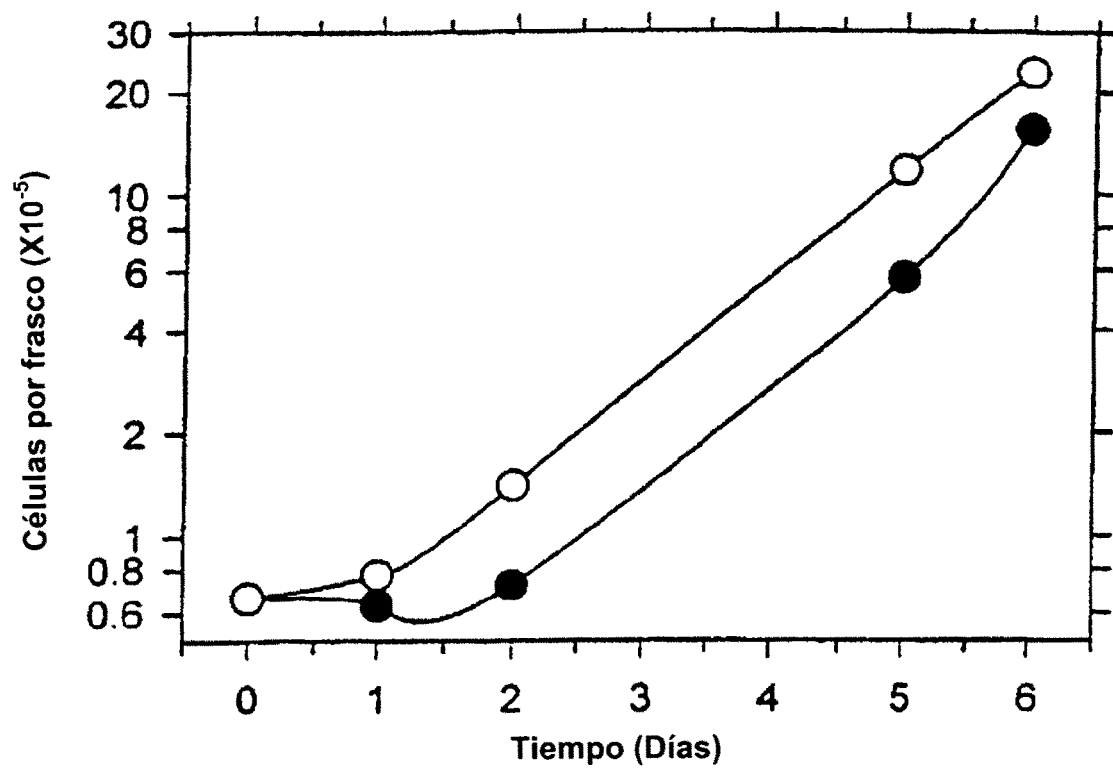


Figura 8

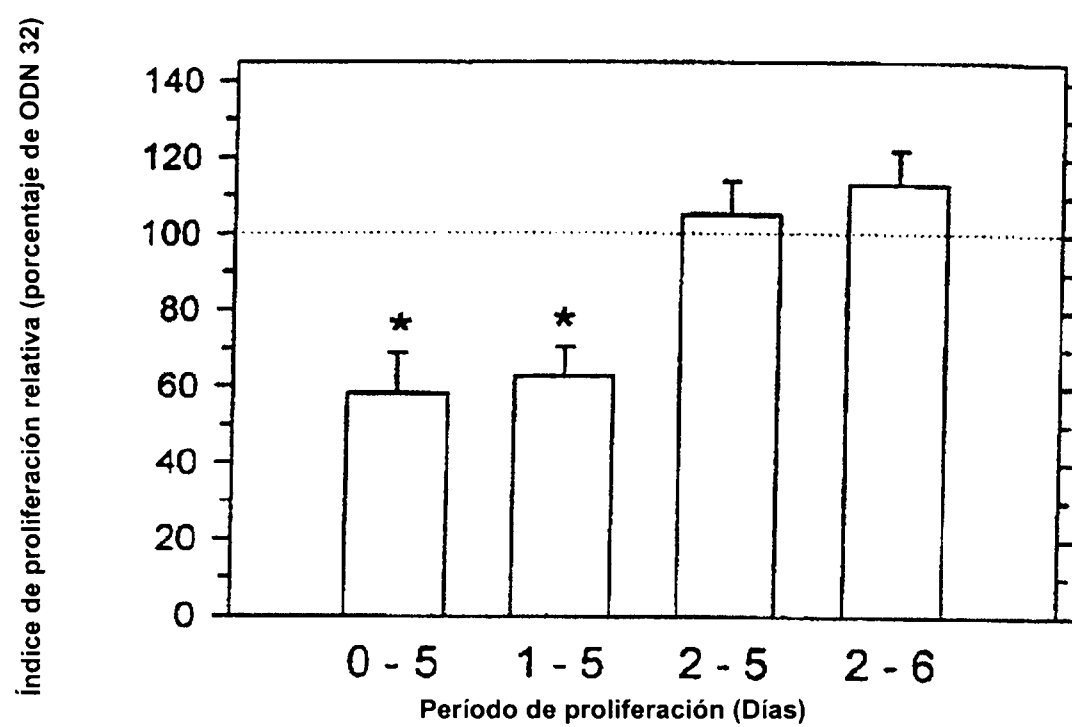


Figura 9

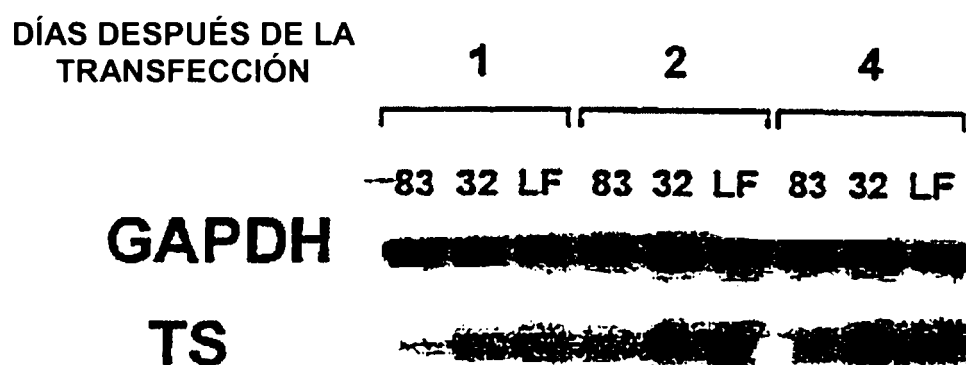


Figura 10

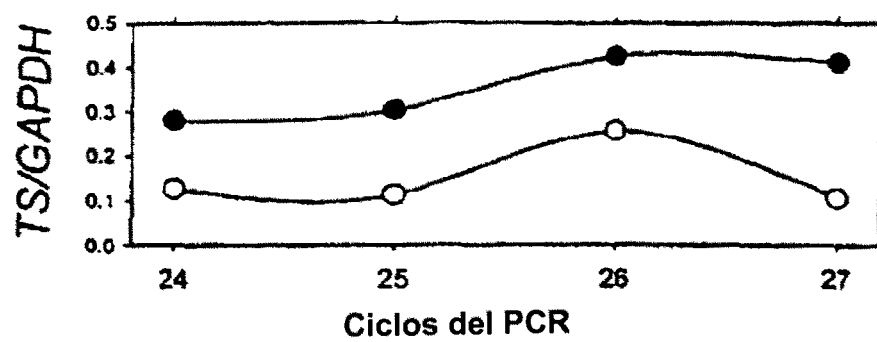


Figura 11

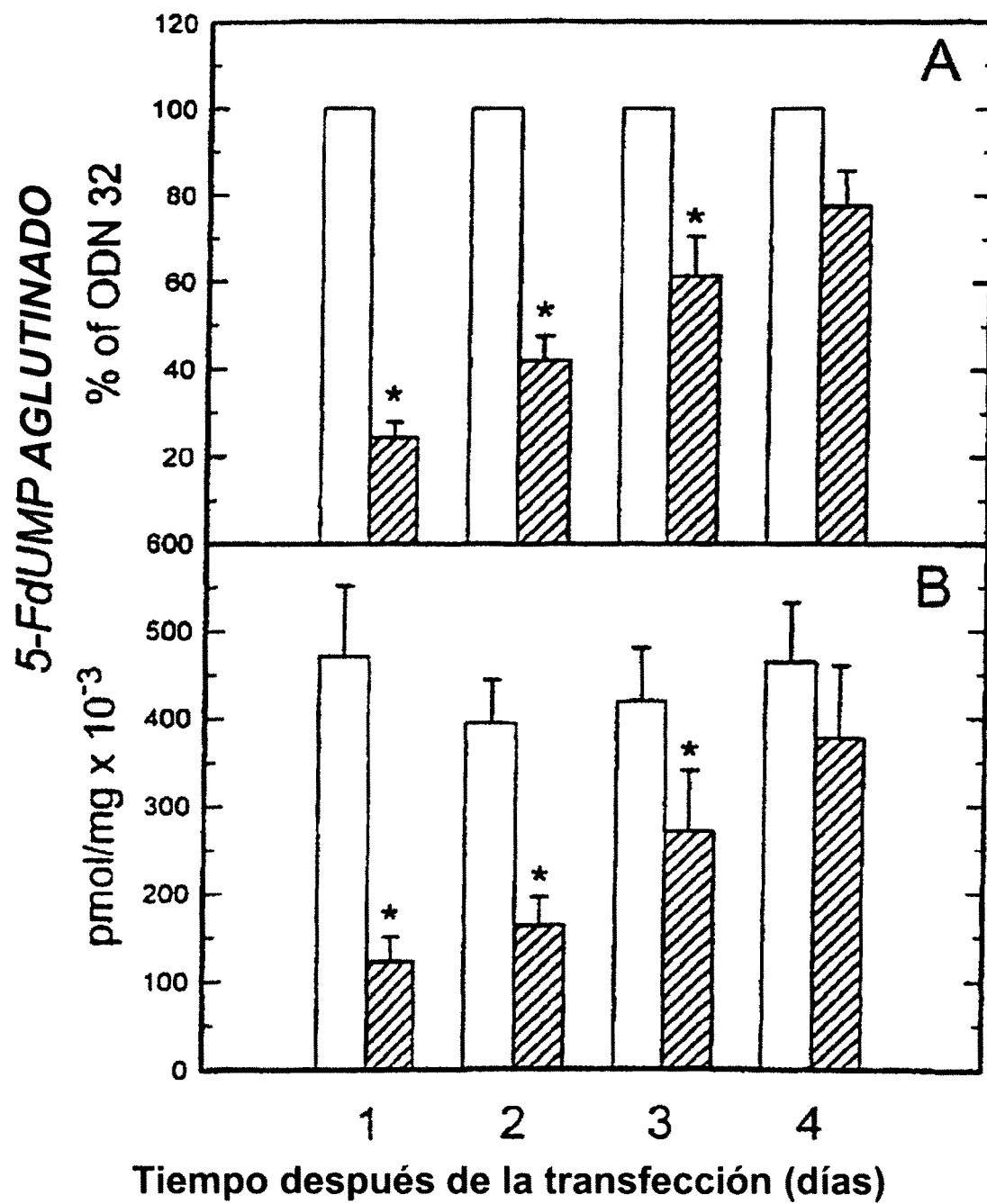


Figura 12

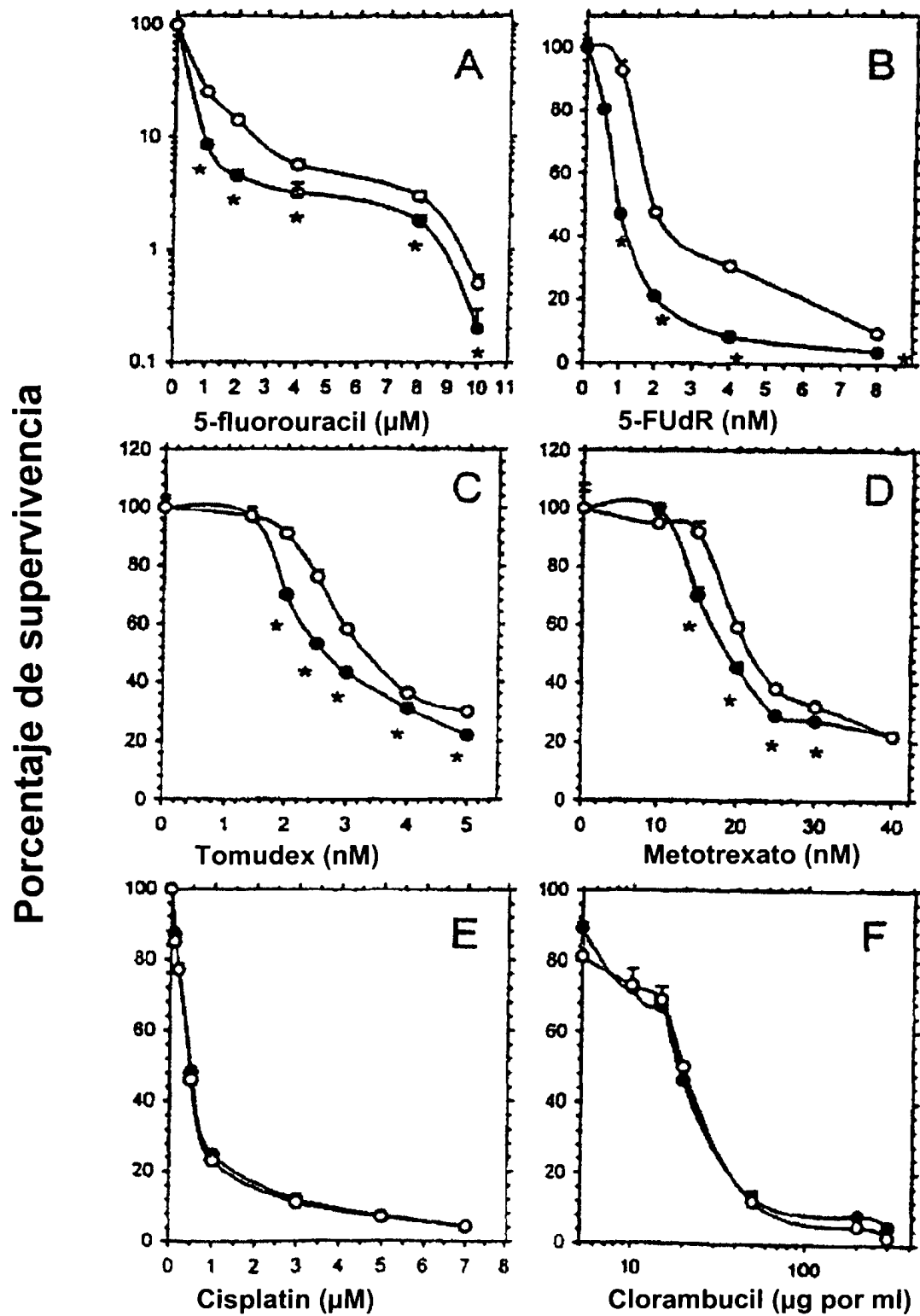


Figura 13

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) POSTULANTE:

- (A) NOMBRE: Zeneca Ltd
- (B) CALLE: 15 Stanhope Gate
- (C) CIUDAD: Londres
- (D) ESTADO: Greater London
- (E) PAÍS: Inglaterra
- (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): W1Y GLN
- (G) TELÉFONO: 0171 304 5000
- (H) TELEFAX: 0171 304 5151
- (I) TÉLEX: 0171 834 2042

(ii) TÍTULO DE LA INVENCION: COMPUESTOS

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 9

(iv) FORMA LEGIBLE DE LA COMPUTADORA:

- (A) TIPO DE MEDIO: Disco flexible
- (B) COMPUTADORA: IBM PC compatible
- (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Edición #10, Versión #1.30 (EPO)

(vi) DATOS DE LA APLICACIÓN ANTERIOR:

- (A) NÚMERO DE LA APLICACIÓN: GB 9720107.3
- (B) FECHA DE ARCHIVO: 23-SEP-1997

(vi) DATOS DE LA APLICACIÓN ANTERIOR:

- (A) NÚMERO DE LA APLICACIÓN: GB 9722012.3
- (B) FECHA DE ARCHIVO: 17-OCT-1997

(vi) DATOS DE LA APLICACIÓN ANTERIOR:

- (A) NÚMERO DE LA APLICACIÓN: GB 9812140.3
- (B) FECHA DE ARCHIVO: 06-JUN-1998

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO: 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) TRAMO: 20 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) SIN HILERAS: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 1:

TTAAGGATGT TGCCACTGGC

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO: 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) TRAMO: 20 pares base
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) SIN HILERAS: simple

ES 2 280 098 T3

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 2:

AATGGCTGTT TAGGGTGCTT

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) TRAMO: 20 pares base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) SIN HILERAS: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

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

TGTGGCCGGC TCGGAGCTGC

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) TRAMO: 20 pares base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) SIN HILERAS: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

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

GCGCCATGCCTGTGGCCGGC

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) TRAMO: 20 pares base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) SIN HILERAS: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

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

GCGCCATGCC TGTGGCCGGC

20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) TRAMO: 20 pares base

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) SIN HILERAS: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

ES 2 280 098 T3

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 6:

5 CCCC GCCG GCGCCATGCC 20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO: 7:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

 (A) TRAMO: 20 pares base

 (B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) SIN HILERAS: simple

 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEC ID NO: 7:

 ATGCGCCAAC GGTTCTAAA 20

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO: 8:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

 (A) TRAMO: 30 pares base

 (B) TIPO: ácido nucleico

30 (C) SIN HILERAS: simple

 (D) TOPOLOGÍA: lineal

35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

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

40 UGUGGCCGGC UCGGAGCUGC CGCGCCGGCC 30

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID NO: 9:

45 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

 (A) TRAMO: 30 pares base

 (B) TIPO: ácido nucleico

50 (C) SIN HILERAS: simple

 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: otro ácido nucleico

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

55 GCUACAGCCU GAGAGAUGAA UUCCCUCUGC 30

LISTADO DE SECUENCIAS

60 <110> ISIS Pharmaceuticals Sarissa Inc.

<120> Oligonucleótido Antisentido contra el Timidilato Sintasa

65 <130> 753-109EP

ES 2 280 098 T3

	<140> 98942944.4	
	<141> 1998-09-17	
5	<160> 21	
	<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0	
10	<210> 1	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
20	<400> 1	
	gccagtggca acatccttaa	20
25	<210> 2	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
35	<400> 2	
	aagcacccta aacagccatt	20
40	<210> 3	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
45	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
50	<400> 3	
	gcagctccga gccggccaca	20
55	<210> 4	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
65	<400> 4	
	gccggccaca ggcatggcgc	20

ES 2 280 098 T3

	<210> 5	
	<400> 5	
5	000	
	<210> 6	
	<211> 20	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
15	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
	<400> 6	
20	ggcatggcgc gccgggcggg	20
	<210> 7	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
30	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
	<400> 7	
35	atgcgccaac ggttcctaaa	20
	<210> 8	
	<211> 30	
40	<212> RNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
	<400> 8	
50	uguggccggc ucggagcugc cgcgccggcc	30
	<210> 9	
	<211> 30	
55	<212> RNA	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
60	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
	<400> 9	
65	gcuacagccu gagaugaa uucccucugc	30

ES 2 280 098 T3

	<210> 10	
	<211> 19	
	<212> DNA	
5	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético	
10	<400> 10	
	ctcagctccc tcagatttg	19
15	<210> 11	
	<211> 36	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Sonda	
25	<400> 11	
	ctagatgtgg ccggctcgga gctgccgcgc cggcca	36
30	<210> 12	
	<211> 36	
	<212> DNA	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Sonda	
40	<400> 12	
	agcttgcccg gcgcggcagc tccgagccgg ccact	36
45	<210> 13	
	<211> 36	
	<212> DNA	
50	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Sonda	
55	<400> 13	
	ctagagctac agcctgagag atgaattccc tctgca	36
60	<210> 14	
	<211> 36	
	<212> DNA	
65	<213> Secuencia Artificial	

ES 2 280 098 T3

	<220>		
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Sonda		
5	<400> 14		
	agcttgacga gggaattcat ctctcaggct gtagct		36
10	<210> 15		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia Artificial		
15	<220>		
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Sonda		
20	<400> 15		
	ctcttcagca cgccatggat		20
25	<210> 16		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
30	<220>		
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido Sintético		
35	<400> 16		
	agggtctacc ttcttgccg		20
40	<210> 17		
	<211> 20		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
45	<220>		
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Primer PCR		
50	<400> 17		
	cacactttgg gagatgcaca		20
55	<210> 18		
	<211> 25		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia Artificial		
60	<220>		
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Primer PCR		
65	<400> 18		
	ctttgaaagc accctaaaca gccat		25

ES 2 280 098 T3

	<210> 19					
	<211> 20					
	<212> ADN					
5	<213> Secuencia Artificial					
	<220>					
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Primer PCR					
10	<400> 19					
	tattgggcgc ctggcacca					20
15	<210> 20					
	<211> 20					
	<212> ADN					
20	<213> Secuencia Artificial					
	<220>					
	<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Primer PCR					
25	<400> 20					
	ccaccttctt gatgtcatca					20
30	<210> 21					
	<211> 1536					
	<212> ADN					
35	<213> <i>Homo sapien</i>					
	<400> 21					
40	ggggggggggg	ggaccacttg	gcctgcctcc	gtcccgccgc	gccactggc	ctgcctccgt 60
	cccgcgcgc	cacttcgcct	gcctccgtcc	cccgcgcgc	gcgccatgcc	tgtagccggc 120
	tcgagctgc	cgccggcc	ctgcccccc	gccgcacagg	agcgggacgc	cgagccgcgt 180
	ccgcgcacg	gggagctgca	qtacctgggg	cagatccaac	acatcctccg	ctgcggcgctc 240
45	aggaaggacg	accgcacggg	caccggcacc	ctgtcggtat	tcggcatgca	ggcgcgctac 300
	agcctgagag	atgaattccc	tctgtgaca	accaaactgt	tgttctggaa	gggtgtttg 360
	gaggagtgc	tgtggtttat	caagggatcc	acaaatgcta	aagagctgtc	ttccaagqga 420
	gtgaaaatct	gqgatgccaa	tgatcccga	qactttttg	acagcctggg	atttccacc 480
	agagaagaag	gqgactggg	cccagttat	ggcttccagt	ggaggcattt	tggggcagaa 540
	tacagagata	tggaatcaga	ttattcagga	cagagttg	accaactgca	aagagtgatt 600
50	gacaccatca	aaaccaaccc	tgacgacaga	agaatcatca	tgtgcgcttg	gaatccaaga 660
	gatcttctc	tgatggcgct	gcctccatgc	catgccctct	gccagttcta	tgtggtgaac 720
	agttagctgt	cctgccagct	gtaccagaga	tcgggagaca	tgggcctcgg	tgtgcctttc 780
	aacatcgcca	gctacgacct	gctcacgtac	atgattgcgc	acatcacggg	cctgaagcca 840
	ggtgacttta	tacacacttt	gggagatgca	catatttacc	tgaatcacat	cgagccactg 900
55	aaeattcagc	ttcagcgaga	accagacct	ttccaaagc	tcaggattct	tcgaaaagtt 960
	gagaaaattg	atgactcaa	agctgaagac	ttcagattg	aagggtacaa	tccatcca 1020
	actatataaa	tggaattggc	tgtttaggg	gcttcaaa	gagctgaag	gatattgca 1080
	gtcttaggg	gttgggtgg	atgccgaggt	aaaagtctt	tttgctctaa	aagaaaaagg 1140
	aactaggtca	aaaatctgtc	cgtagcctat	cagttattaa	ttttaagga	tggtgccact 1200
60	ggcaaatgta	actgtgccag	ttcttctc	aataaaaggc	tttagtta	ctcactgagg 1260
	gtatctgaca	atgctgaggt	tatgaacaaa	gtgaggagaa	tgaaatgtat	gtgtccttag 1320
	caaaaacatg	tatgtgcatt	tcaatcccac	gtactataa	agaaggttg	tgaatttcac 1380
	aagctatatt	tggaatattt	ttagaatatt	ttaagaattt	cacaagctat	tccttcaaat 1440
	ctgaggggagc	tgagtaacac	catcgatcat	gatgtagagt	gtggtatga	actttatagt 1500
65	tgttttatat	gttgctataa	taaagaaqtg	ttctgc		1536