



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 344 400**

51 Int. Cl.:
C12N 15/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01902348 .0**
96 Fecha de presentación : **22.01.2001**
97 Número de publicación de la solicitud: **1248839**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.10.2002**

54 Título: **Marcador tumoral y de senescencia.**

30 Prioridad: **21.01.2000 US 177216 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.08.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.08.2010

73 Titular/es: **POLYMUN SCIENTIFIC
IMMUNBIOLOGISCHE FORSCHUNG GmbH
Nussdorfer Lände 11
1190 Wien, AT**

72 Inventor/es: **Katinger, Hermann;
Grillari, Johannes y
Grabherr, Reingard**

74 Agente: **Roeb Díaz-Álvarez, María**

ES 2 344 400 T3

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

DESCRIPCIÓN

Marcador tumoral y de senescencia.

5 La presente invención pertenece a los campos de la biotecnología y la medicina y se refiere a una proteína que se ha encontrado que es un potencial marcador tumoral y/o de la senescencia útil para diagnósticos médicos y que adicionalmente tiene potencial terapéutico así como propiedades antiapoptóticas útiles para mejorar la viabilidad celular en la tecnología de cultivos celulares.

10 Introducción

El paso en serie de células humanas es un modelo ampliamente usado para estudiar los cambios que se producen durante el proceso de envejecimiento a nivel celular. Por tanto, se puede ganar una importante comprensión acerca de la regulación del ciclo celular y del fenotipo de la senescencia celular.

15 Los estudios de fusión celular de la técnica anterior fueron capaces de demostrar que el fenotipo senescente es dominante sobre el fenotipo inmortal transformado. Adicionalmente, la microinyección de ARNm derivada de células senescentes induce el fenotipo senescente en células jóvenes, y la inhibición de la síntesis de ADN está afectada por la preparación de la membrana plasmática de células senescentes y quiescentes. Esta detención del crecimiento se produce en la fase G1 tardía del ciclo celular y las células se bloquean al entrar en la fase S, incluso aunque se estimulen con cualquier combinación conocida de mitógenos, aun los receptores del factor de crecimiento están aún presentes en la superficie celular. Esta detención irreversible del crecimiento es dependiente de la pérdida de actividad de la telomerasa, debido a que los fibroblastos transfectados con la subunidad TERTh catalítica no entran en senescencia replicativa, ni muestran alteraciones tumorogénicas.

25 Los informes acerca de la expresión génica durante la senescencia localizan cambios en los diferentes grupos de genes: los genes reguladores del ciclo celular, los genes inducibles por los factores de transcripción y el factor de crecimiento, las proteínas de la matriz celular y las secretoras, y los genes mitocondriales.

30 Breve descripción de la invención

La presente invención se refiere al aislamiento y a la reproducción mediante técnicas de ingeniería genética re-combinante de secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína humana (denominada a partir de ahora en el presente documento proteína "SNEV") o sus homólogos, cuya proteína se encontró que interfería con los procesos reguladores celulares que determinan o afectan al menos un parámetro seleccionado entre el grupo constituido por crecimiento, viabilidad, alargamiento de la vida, y número de ciclos de replicación, de una célula eucariota, por ejemplo, una de mamífero o de ser humano.

40 La invención se refiere también al uso de las presentes proteínas SNEV, los péptidos, anticuerpos, secuencias de ácido nucleico, ARNm de sentido directo y ARN o APN de sentido contrario en al menos un campo de aplicación seleccionado entre el grupo constituido por diagnósticos, terapia médica y tecnología de cultivos celulares, particularmente para uso en diagnósticos de tumores, cáncer y senescencia, prevención o terapia. En una realización específica, la invención se refiere al uso de las presentes proteínas SNEV o los ácidos nucleicos correspondientes para prolongar el alargamiento de la vida de una célula eucariota en un medio de cultivo adecuado *in vitro*. En otra realización específica adicional, la invención se refiere a lo opuesto, es decir, a la inducción intencionada de la detención de la proliferación (senescencia) de las células eucariotas disminuyendo los niveles intracelulares de proteína SNEV usando ARN de sentido contrario o anticuerpos dirigidos contra SNEV.

Descripción detallada de la invención

50 Basándose en el conocimiento de los estudios anteriormente mencionados, se llevó a cabo un procedimiento de hibridación sustractiva con el fin de aislar nuevos genes reguladores de la senescencia y/o el crecimiento, que pueden estar también relacionados con enfermedades asociadas a la edad y la tumorogénesis. A este objeto, se produjo uno de los genes candidatos para ser tanto recombinantemente expresado en exceso como inhibido en HUVEC, con el fin de clarificar su significación biológica.

60 Mediante un procedimiento de hibridación sustractiva, se identificaron diversos genes expresados diferencialmente a partir de un paso temprano (5 P, es decir, 5 pasos) y de las células HUVEC endoteliales senescentes (35 P) de la vena umbilical humana, y se identificó un gen anteriormente desconocido, que se expresó a niveles mayores en células endoteliales jóvenes y quiescentes que en células endoteliales senescentes. A partir del análisis del marco de lectura abierto del ADNc de longitud completa, se dedujo una secuencia de aminoácidos, y la presunta proteína (denominada a partir de ahora en el presente documento como proteína "SNEV") que representa un nuevo miembro de la familia de las proteínas de repetición WD. La transcripción de este gen (denominado a partir de ahora en el presente documento como gen "SNEV") no se limita a las líneas de células endoteliales, sino que se observó en todos los tejidos humanos que se ensayaron, incluyendo riñón, pulmón, placenta, intestino delgado, hígado, leucocitos de la sangre periférica, bazo, timo, colon, músculo esquelético, corazón, y cerebro. Más aún; no se han identificado hasta el momento productos de corte y empalme alternativos. Adicionalmente, se han identificado transcripciones homologas de la misma longitud

(2,3 kb) mediante transferencia Northern en células CHO, en tejido de la pituitaria de rata y en una línea de células tumorales de ratón, lo que indica que los roedores expresan una versión conservada de este ARNm.

Esta expresión ubicua de SNEV sugiere una importante función celular. Debido a que los inventores encontraron que este ARNm se expresaba más abundantemente en el paso temprano de las HUVEC que en sus contrapartes senescentes, los inventores determinaron los niveles de expresión correspondientes en otras líneas celulares. Los resultados confirmaron que el fenómeno de disminución de los niveles de ARNm de SNEV en células senescentes no se limita a las HUVEC, sino que se puede observar también en fibroblastos diploides humanos y en células de riñón humano. Además, los inventores fueron capaces de demostrar que la disminución del ARNm de SNEV no es una consecuencia de la detención del crecimiento sino de la senescencia, debido a que no se podrían detectar diferentes niveles de SNEV entre HUVEC inhibidas por contacto y células en ciclación.

A diferencia de la disminución de los niveles de la transcripción en células senescentes de, por ejemplo, origen endotelial, fibroblastos, riñón o queratinocitos, se ha encontrado que los niveles de ARNm de SNEV están aumentados drásticamente en cuatro diferentes líneas de leucemia humana en comparación con sus controles normales, es decir, linfocitos activados, así como en una línea celular de queratinocitos transformados, y en células transformadas de SV40 y en células de carcinoma de riñón, en comparación con células primarias de riñón humano. Adicionalmente, dos de las líneas celulares de carcinoma de riñón ensayadas no muestran, sin embargo, niveles extremadamente elevados de expresión de SNEV.

Diversos experimentos han desvelado que la expresión en exceso de SNEV recombinante en HUVEC dio como resultado una expansión en el alargamiento de la vida, mientras que la infrarregulación mediante transfección del ARN de sentido contrario indujo la senescencia celular. Estos resultados destacan la importancia biológica del gen SNEV recientemente identificado para controlar la viabilidad celular, la senescencia y la immortalización de las líneas celulares, y son una indicación adicional de la estrecha relación entre la detención irreversible de la proliferación (por ejemplo, senescencia) y la tumorigénesis. En 1986, O'Brien y col, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 8659-8663 contemplaban ya la idea de que la senescencia replicativa puede ser un mecanismo supresor tumoral, y debido a que incluso se confirmó consistentemente por diversos científicos la evidencia que indicaba que la senescencia y la tumorigénesis son estados celulares "opuestos".

En la práctica médica o biotecnológica, el gen SNEV, la proteína SNEV y sus homólogos permiten interferir de manera decidida con y modular el alargamiento de la vida celular, lo que incluye, por una parte, acelerar artificialmente la senescencia celular, y por la otra, prolongar la vida celular o incluso immortalizar líneas celulares. Según esto, proporcionan una base prometedora para el desarrollo de útiles herramientas de diagnóstico así como para el desarrollo de composiciones farmacéuticas u otras composiciones para aplicaciones antitumorales o antienvjecimiento, particularmente en los campos de la medicina y la biología celular así como en la tecnología de cultivo de tejidos tales como la tecnología de cultivos celulares en mamíferos y plantas.

Determinar los niveles celulares de la proteína SNEV o del ARNm de SNEV proporcionará al médico valiosa información sobre el estado de edad y sobre la probabilidad de desarrollo tumorigénico de una célula o tejido del cuerpo humano o animal. Adicionalmente, suplementar células o tejidos con proteína SNEV, o como alternativa, regular en exceso la expresión de SNEV mediante transfección del ARNm de SNEV de sentido directo en dichas células o tejidos puede interferir con la apoptosis y prolongar el alargamiento de la vida de las células o los tejidos, y quizá incluso, immortalizar dichas células o tejidos. Además, transfectar el ARNm de SNEV de sentido contrario en células diana reducirá los niveles de la transcripción de SNEV ("infrarregulación") en el interior de estas células y forzará de esta manera a estas células, por ejemplo, células con un elevado nivel de expresión de SNEV, tales como células tumorales, a una senescencia temprana.

La búsqueda de homólogas en la base de datos blast no redundante (nr) identificó únicamente una correspondencia, un clon PAC que contenía la secuencia génica cromosómica de SNEV. En contraste, en la base de datos EST, se derivaron aproximadamente 100 clones procedentes de bibliotecas de diferentes tejidos que correspondían con la secuencia de los inventores. Se han secuenciado algunos cientos de pares de bases de estos clones a partir del extremo 3', pero no se dedujo la función biológica a partir de estos datos en la técnica anterior.

Del análisis de la secuencia del marco de lectura abierto, se predijo una secuencia de aminoácidos y una búsqueda de la homología desveló un 50% de identidad con una presunta proteína procedente del nematodo *Caenorhabditis elegans* de 509 aa de longitud, un 41% con una presunta proteína procedente de *Arabidopsis thaliana* de 540 aa, y un 30% con una hipotética β -transducina de *Schizosaccharomyces pombe* y un 24 & con el factor PRP19 de corte y empalme del pre-ARNm procedente de *Saccharomyces cerevisiae*.

La clonación y el análisis de la secuencia de SNEV/SNEVm desveló cinco presuntas regiones (Fig. 6, Fig. 7). Compreendida dentro de los primeros 90 aa, se encontró una región con la secuencia U (un dedo de tipo RING modificado) mediante búsqueda con SMART. Esta región conservada se encuentra en una gran variedad de proteínas y media posiblemente en la interacción de la proteína de la secuencia con las proteínas conjugadas con ubiquitina activando de esta manera su multiubiquitinación adicional. Se encontró que la porción N terminal de SNEV contenía 7 repeticiones WD-40 que eran similares a las proteínas de tipo G β . Las repeticiones WD-40 tienen una longitud típica de aproximadamente 40 restos y forman una estructura β impulsora. Se proponen las repeticiones WD-40 para mediar en las interacciones proteína-proteína (van der Voom y Ploegh, 1992, FEBS Lett 307, 131-4), quizá con regiones ricas en

prolina. Se encuentran únicamente en organismos eucariotas y regulan una gran variedad de funciones celulares, tales como la división celular, la diferenciación celular, la señalización transmembrana de la transcripción génica, la modificación del ARNm y la fusión de vesículas (Neer y col., 1994, Nature 371, 297-300). La presunta región superhélice representa otro segmento con capacidad de interacción proteína-proteína.

Los términos “homología”, “homólogo” u “homólogos” deben entenderse que se usan en el presente documento como a una comparación tanto de dos o más secuencias de ácido nucleico como a una comparación de dos o más secuencias de aminoácidos. Las secuencias de ácido nucleico pueden ser secuencias de ADN o ARN de longitud completa tales como secuencias de genes completos o ARN mensajero (ARNm), o partes de los mismos tales como regiones de codificación o de no codificación, regiones conservativas, particularmente regiones con interés y similares, o cualquier parte de una secuencia de ácido nucleico que se está comparando con otra secuencia de ácido nucleico. Normalmente, se da lugar a una comparación de la homología a partir de una secuencia de nucleótidos producida o aislada según la presente invención, con una secuencia de nucleótidos que se conoce en la técnica, lo más frecuentemente, una secuencia de nucleótidos que se produce naturalmente a partir de una célula viva o un virus. A no ser que se defina de otra manera en el presente documento, las secuencias de nucleótidos “homólogos” u “homologas” debe entenderse adicionalmente que comprenden secuencias idénticas así como secuencias de nucleótidos que codifican la misma secuencia de aminoácidos pero que varían en su composición de nucleótidos debido a la degeneración del código genético. Cuando una secuencia de nucleótidos aislada o presunta según la presente invención comprende partes homologas y no homologas en comparación con una secuencia de nucleótidos que se produce naturalmente o se conoce de otra manera, el grado de homología se expresa tanto en términos cuantitativos, es decir, porcentaje de identidad, como representados gráficamente mediante una comparativa que se muestra en una tabla o en una figura.

Quando se refieren a secuencias de aminoácidos, los términos “homólogo/a” u “homólogos/as” debe entenderse que se refieren a partes, regiones o regiones funcionales idénticas tanto estructural (lo más normal) como funcionalmente, de proteínas completas, de subunidades de proteínas, de partes de proteínas, o de péptidos, en comparación con una secuencia de aminoácidos aislada o fabricada según la presente invención. Cuando no existe identidad sino únicamente similitud, el grado de homología estructural se expresa en términos cuantitativos, es decir, porcentaje de identidad, o representado gráficamente por una comparativa que se muestra en una tabla o en una figura. Se entiende que los homólogos funcionales comprenden las proteínas que llevan a cabo la misma o esencialmente la misma función que una de las proteínas o regiones de la misma presentes que se comparan, aunque puedan diferir entre sí en la estructura en una cierta extensión. Normalmente, las funcionalmente homologas están estrechamente relacionadas estructuralmente entre sí.

El término “interactivo”, según se usa en el presente documento, debe entenderse que se refiere a una relación funcional entre una proteína o parte de una proteína de la presente invención y una molécula efectora o sustrato, por ejemplo, otra proteína o péptido, cuya relación funcional tiene en efecto que experimentar cambios en cualquiera o en ambas moléculas interactivas en su estructura y/o función. Normalmente, la interacción es tal que produce una región funcional de una o ambas de las moléculas interactivas que llega a activarse o a aumentar su actividad, o, viceversa, para conseguir inhibirse o bloquearse.

Breve descripción de las figuras

la fig. 1 se refiere a la expresión de SNEV en HUVEC. Se presentan los niveles de expresión de SNEV como múltiplos de los niveles en células jóvenes;

la fig. 2 se refiere a la expresión de SNEV en fibroblastos diploides humanos. Se presentan los niveles de expresión de SNEV como múltiplos de los niveles en células jóvenes;

la fig. 3 se refiere a la expresión de SNEV en células de riñón. Se presentan los niveles de expresión de SNEV como múltiplos de los niveles en células de riñón normales;

la fig. 4 se refiere a la expresión de SNEV en linfocitos. Se presentan los niveles de SNEV como múltiplos de los niveles en linfocitos activados;

la fig. 5 fotografía a la izquierda: células HUVEC teñidas con β galactosidasa infectadas con una construcción PLXSN/SNEV de sentido directo tras entrar en senescencia celular en el paso 17. Fotografía a la derecha: células HUVEC teñidas con β galactosidasa infectadas con una construcción PLXSN/SNEV de sentido directo en el paso 23. Se observa una tinción azul como marcador de la senescencia celular en las células infectadas únicamente con ARN de SNEV de sentido contrario;

la fig. 6 presuntas regiones funcionales de SNEV;

la fig. 7 presuntas regiones de SNEV: superhélice (CC), región globular 1 (GI 1), región globular 2 (GI 2), segmento rico en serina (Ser-rico), región de baja complejidad (LCR), región globular 3 (GI 3);

la fig. 8 tinción de SNEV en células HaCat (A y B) y HDF (C y D) usando inmunofluorescencia indirecta. Las representaciones gráficas A a D muestran la localización de SNEV en el interior de las dos líneas celulares;

la fig. 9 gel de poliacrilamida teñido con plata (A) y transferencia Western cargadas con un sobrenadante de cultivo celular de insecto transformado con SNEV (banda 1), un lisado de células de insecto (banda 2), y un lisado de células de insecto tras centrifugación (banda 3).

- 5 Con el fin de que la invención descrita en el presente documento puede entenderse de manera más completa, se muestran los siguientes ejemplos. Los ejemplos son con objetivos ilustrativos y no se construyen como limitantes de esta invención en ningún sentido.

10 Ejemplo 1

Preparación e identificación del gen y la proteína SNEV

Cultivo celular

- 15 Se aislaron células endoteliales de la vena umbilical (HUVEC) procedentes de las venas umbilicales y se cultivaron según se ha descrito (Hohenwarter, y col., 1992, Cytotechnology 8, 31-37). Posteriormente, se hicieron crecer las células en botellas Roux recubiertas con gelatina en medio M199 suplementado con suero de ternera fetal al 15% (FCS), 200 µg/ml de suplemento de crecimiento celular endotelial y 90 µg/ml de heparina en una atmósfera humidificada que
20 contenía CO₂ al 7%. Se desunieron los cultivos confluentes mediante solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía tripsina al 0,1% y EDTA 0,01 y se dividieron en una relación 1:4 o 1:2. Se cosecharon las células del paso temprano (jóvenes) después de 5 pasos, las células senescentes después de alcanzar la detención irreversible del crecimiento a los 35 pasos. El medio de cultivo de las células HUVEC que se infectó con construcciones PLXSN/SNEV de sentido directo y PLXSN/SNEV de sentido contrario contenía 25 µg/ml de G418 como presión de selección.

- 25 Se hicieron crecer fibroblastos en medio DMEM/Ham s-F 12 (1:1) suplementado con L-glutamina 4 mM y FCS al 10%. Se cosecharon los fibroblastos jóvenes después de 6 pasos y los senescentes después de 18 pasos. R. Voglauer (IAM, Viena, Austria), proporcionó amablemente células de riñón normales (5 pasos) y células de riñón transformadas con SV40 (51 pasos). Se cosecharon las células de riñón senescentes después de 17 pasos, se hicieron crecer las líneas
30 celulares AA-2 (VEB esplénico humano WIL-2 + línea de células B linfoblastoides, National Institute of Allergy and Infectious Diseases), MT-2 (leucemia de células T humanas, National Institute of Allergy and Infectious Diseases N° de Cat. 237), HL-60 (leucemia promielótica humana, ATCC) y Molt 3 (leucemia Linfoblástica aguda humana, células T, ATCC CRL 1552) en botellas Roux con medio RPMI suplementado con L-glutamina 4 mM y FCS al 10%. Se dividieron las células en una relación de 1:10.

- 35 Se hicieron crecer las líneas celulares A-498 (carcinoma de riñón humano, ATCC MTB 44) y HEK293 (riñón embrionario transformado humano, ATCC CRL 1573) en medio DMEM/Ham suplementado con L-glutamina 4 mM y FCS al 10%, el medio del cual contenía únicamente FCS al 5%. Se desunieron los cultivos confluentes mediante solución de PBS que contenía tripsina al 0,1% y EDTA 0,01 y se dividieron en una relación de 1:10.

Aislamiento del ARN

- 40 Se llevó a cabo la preparación del ARN total usando 1 ml de reactivo TriZol (Life Technologies, EE.UU.)/5 x 10⁶ células. El aislamiento del ARN total de las líneas de células HUVEC dio como resultado un rendimiento promedio de 33,53 µg de ARN total/10⁶ células. Se aisló el ARNm usando perlas de oligodT paramagnéticas (Dynal, Noruega).

Hibridación sustractiva por supresión

- 50 Se llevó a cabo la hibridación sustractiva por supresión según el protocolo del fabricante (Clontech, EE.UU.). comenzando con 2 µg de ARNm aislado de células HUVEC procedentes del paso temprano (5 P) y senescente (35 P), se usó la PCR sustractiva para crear dos combinados de ADNc, uno enriquecido para los genes acumulados en las células jóvenes, enriquecido el otro para los ARNm acumulados en las células viejas.

- 55 Estos combinados de ADNc se unieron en el vector fagémido pBluescript KSII (Stratagene, EE.UU.), y se transformaron en TG 1 de *E. coli* electrocompetente, creando las bibliotecas Joven-Viejo y Viejo-Joven. Se repicaron colonias únicas y se amplificaron las inserciones mediante la PCR usando los cebadores T3 y T7 (Stratagene, EE.UU.). Se llevó a cabo el cribado diferencial mediante inmunotransferencias duplicadas: se mancharon 0,5 µl de cada producto de la PCR sobre dos membranas de nylon cargadas negativamente (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia) y se inmovilizaron mediante horneado a 120°C durante 30 min. Se sintetizaron sondas complejas a partir de los combinados de ADNc
60 sustractivos procedentes de las bibliotecas Joven-Viejo y Viejo-Joven respectivamente mediante el enzima Klenow y cebadores de hexanucleótidos aleatorios usando un kit de marcado aleatorio no radioactivo (Boehringer Mannheim, Alemania). Se llevó a cabo la hibridación con estas sondas marcadas aleatoriamente con DIG a 42°C durante la noche en tampón de hibridación SDS elevado (SDS al 7%, formamida al 50%, e X SSC, reactivo de bloqueo al 2%, fosfato de sodio 50 mM, pH 7,0, N-lauroilsarcosina al 0,1%). Se aislaron los plásmidos que correspondían a las señales que
65 proporcionaban los ADNc únicamente con una sonda compleja mediante el kit micro plasmid prep GFX (Amersham Pharmacia Biotech, Suecia) para examen adicional.

Transferencias Northern

Se marcaron las inserciones candidatas con DIG usando los cebadores T3 y T7 conjuntamente con el kit de marcado no radioactivo (Boehringer Mannheim Alemania) según el protocolo del fabricante y a continuación se usaron como sondas en transferencias Northern (Maniatis y col., 1987) para confirmar la expresión diferencial. Se usaron 10 ng de sonda/ml de tampón de hibridación SDS elevado y se llevó a cabo la hibridación durante la noche a 50°C. Tras condiciones de lavado restrictivas, se detectaron señales quimioluminiscentes mediante autorradiografía. Las transferencias Northern contenían 12 µg de ARN total/banda y se hicieron avanzar en geles de agarosa desnaturizante al 1%. Para confirmar que se cargaron cantidades iguales de ARN sobre el gel, se hibridaron también las transferencias con G3PDH.

Análisis de la secuencia de proteínas

Se ensayaron las secuencias de proteínas para la incidencia de regiones de baja complejidad con el programa SEG (Wootton y Federhen, 1996, Methods Enzymol 266, 554-71), los segmentos de la superhélice (Lupas, 1997, Curr Opin Struct Biol 7, 388-93), las regiones transmembrana (Claros y von Heijne, 1994, Comput Appl Biosci 10, 685-6), las propiedades composicionales de la secuencia (Brendel y col., 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89, 2002-6) y la incidencia de las regiones globulares descritas procedentes de las bases de datos PFAM (Bateman y col., 2000, Nucleic Acids Res 28, 263-6) y SMART (Schultz y col., 2000, Nucleic Acids Res 28, 231-4). Se ensayó también la existencia de repeticiones estructurales cortas típicas con la herramienta REP (Andrade y col., 2000, J Mol Biol 298, 521-37). Los segmentos de proteínas globulares sospechosos restantes se han sometido a bases de datos iterativas con la herramienta BLAST/PS1-BLAST (Altschul y col., 1999, Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402).

Secuencia de SNEVm

Mediante la secuenciación del ADNc de SNEVm, que se transcribió y amplificó de manera inversa comenzando a partir de un ARN total de células 3T3 de ratón, se confirmó la predicción del clon EST. En la Tabla 1 a continuación se muestra la secuencia de SNEVm.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 344 400 T3

TABLA 1

Secuencia de nucleótidos de SNEVm (SEC DE ID N° 1), los codones de inicio y de detención se resaltan en caracteres en negrita, una región de homología rica en 5'-GC en caracteres en cursiva

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

AAGGCTGAGGCGCGCCACCGGCACCTCCCCACGTGAAGCAGTTGTGCGAGCATC
GCACGCTGGGCAGCTGTCTACCCGCGTCCGAGCGCTCCGGAAGCGGCGGGGAC
CGGAAGTGGCCCGCGGAGGAGCAGAGAACCAGGAACCCTCTGTGAGGCGACT
GGCAGCAGCGCTACGACGGCGCCATGTCCTGATCTGCTCGATCTCCAATGAAG
TGCCAGAGCACCCGTGCGTGTCCCTGTCTCTAATCATGTGTATGAGCGGCGACT
CATTGAGAAGTACATTGCAGAGAATGGCAGAGATCCTATCAACAACCAGCCTCT
CTCAGAGGAGCAGCTCATCGACATCAAAGTTGCTCACCCAATCCGACCCAAGCC
TCCCTCCGCCACCAGCATCCAGCCATTCTGAAAGCCTTGCAAGGATGAGTGGGA
TGCAGTCATGCTGCACAGCTTCACTCTTCGCCAGCAACTGCAGACAACCCGCCA
GGAGCTGTCCCATGCTCTGTACCAACACGATGCTGCCTGCCGAGTCATTGCCCG
GCTCACCAAGAGGTCACTGCTGCTCGAGAAGCTCTGGCTACTCTGAAACCACA
GGCTGGGCTTATTGTACCTCAGGCTGTGCCAAGCTCACAGCCAGTGTTGTGGGT
GCAGGAGAGCCCATGGATTTGGGTGAGCTGGTGGGAATGACCCCTGAGATTATC
CAGAAGCTTCAAGACAAGGCTACTGTGCTAACCACGGAGCGTAAGAAGAGAGG
AAAGACTGTCCCCGAGGAGCTGGTGAAACCTGAAGAGCTCAGCAAGTACCGGC
AGGTGGCATCCCATGTGGGTCTACACAGTGCTAGCATTCTGGGATTCTCGCTCT
GGACCTGTGTCCCTCAGACACCAACAAGATTCTCACTGGTGGGGCAGATAAAAA
TGTTGTTGTCTTTGATAAGAGTACTGAGCAAATATTGGCCACTCTCAAAGGCCAT
ACCAAGAAGGTCACCAAGTGTGGTGTTCATCCTTCTCAGGAAGTGGTGTCTCTG
CGTCCCTGTGCTACTATCAGGATTTGGTCAGTCCCGAACACTTCTGCGTACA
GGTTGTTGCGGGCCCATGAGAGTGCAGTGACAGGCCTCAGCCTCCATGCTACTGG

AGACTATCTCCTGAGCTCCTCTGATGATCAGTACTGGGCCTTCTCTGACATCCAG
ACAGGGCGTGTGCTCACTAAGGTGACAGATGAGACCTCCGGCTGCTCTCTTACC
TGTGCACAGTTCACCCTGATGGGCTCATCTTTGGAACAGGAACCATGGACTCCC
AGATCAAGATCTGGGACTTGAAGGAGCGTACCAATGTGGCCAACCTTCCCTGGCC
ATTCTGGCCCCATTACCAGCATCGCCTTCTCTGAGAATGGGTACTACCTGGCCAC
AGCAGCTGATGATTCTCAGTCAAGCTCTGGGACTTACGCAAGTTGAAGAACTT
CAAGACATTGCAGCTGGACAACAACCTTTGAGGTGAAGTCACTAATCTTTGACCA
GAGCGGTACCTACCTGGCGCTTGGGGGTACAGATGTCCAGATCTACATCTGCAA
ACAATGGACAGAGATTCTTCACTTTACAGAGCACAGTGGCCTGACCACTGGAGT
GGCCTTTGGACACCATGCCAAGTTCATCGCTTCAACTGGCATGGACAGGAGCCT
CAAATTCTACAGTCTGTAGGCCCTATGCCTTCTCACAGTTCTGGGCCTCATCTCA
GTAGTGGGTAGAGTTAGAGGGTGGGGGTGGGGGTGGGACTTTAGGAGGAGAGG
GAGGTCTGGTTGGGGGGGGACATTCACATCATTTTCAATTTGGTCTGGATGATGGT
CTGAGCCAGGGCACATAGAACATTGCTATCCATGCAGCC

ES 2 344 400 T3

La presunta secuencia de codificación de SNEVm comienza en el pb 185 y se detiene en el 1699, dando como resultado una proteína de 504 aminoácidos (Tabla 2).

TABLA 2

Secuencia de aminoácidos de SNEVm (SEC DE ID N° 2)

```
MSLICISNEVPEHPCVSPVSNHVEYERRLEKYIAENGTDPINNQPLSEEQLIDIKVAH
PIRPKPPSATSIPAILKALQDEWDVAVMLHSFTLRQQLQTTRQELSHALYQHDAACR
VIARLTKEVTAAREALATLKPAQGLIVPQAVPSSQPSVVGAGEPMDLGELVGMTPE
IIOKLQDKATVLTTERKKRGKTVPEELVKPEELSKYRQVASHVGLHSASIPGILALDL
CPSDTNKILTGGADKNVVVFDKSTEQILATLKGHHTKKVTSVVFHPSQELVFSASPD
ATIRIWSVPNTSCVQVVRHAHSAVTGLSLHATGDOYLLSSDDQYWAFSDIQTGRV
LTKVTDETSGCSLTCAQFHPDGLIFGTGTMDSQIKIWDLKERTNVANFPGHSGPITS
IAFSENGYYLATAADDSSVKLWDLRLKLNFKTLQLDNNFEVKSLIFDQSGTYLALG
GTDVQIYICKQWTEILHFTESGLTTGVAFGHHAKFIASGMDRSLKFYSL
```

La homología de la secuencia de codificación con las secuencias humana (90%) y de rata (96%) es muy elevada. De manera interesante, una segunda región muy homóloga está situada en el pb 94 5-UTR en la dirección 5' del codón de inicio en ratón y ser humano, y en el pb 97 en rata. Esta región es un tramo rico en GC de 39 pb (en cursiva y subrayado en la Tabla 1) únicamente con una diferencia de tres bases entre ratón y ser humano, y únicamente una entre ratón y rata.

Con procedimientos sensibles de análisis de secuencias, se detectaron los siguientes segmentos de secuencias funcionalmente diferentes de SNEV (Fig. 6), una región con la secuencia U procedente de SMART (1-70, valor $E < 10^{-28}$, papel posible en E2 dependiente de los procesos de ubiquitinación), una región de baja complejidad moderadamente polar (91-101), un presunto segmento de superhélice (115-135), una región muy cargada (10 positivos, 6 negativos de 36 aa entre 175-208), y una gran región de tipo G β que contiene 7 repeticiones WD-40 según hallazgos de PFAM, SMART y REP (210-504, valores E entre 10^{-12} y 10^{-1}). Otra adicional, probable región globular (136-174) que permanece funcionalmente sin caracterizar.

Las búsquedas en las bases de datos de secuencias desvelaron homólogos secuenciales de longitud completa cercanos en rata (N° de Acc.: BAA95215), *D. melanogaster* (N° de Acc.: AAD46846), *C. elegans* (N° de Acc.: Q10051), *A. thaliana* (dos hallazgos diferentes: N° de Acc.: AAB80652 y N° de Acc.: AAB70423), *P. falciparum* (N° de Acc.: T18432), *S. pombe* (N° de Acc.: 014011). El factor de corte y empalme del ARN de la levadura PRP19 tenía una similitud con SNEV en ~ 130 restos N terminales.

Transcripciones de longitud completa

Tras el aislamiento de factores génicos digeridos con Rsa I, fue necesario aislar las correspondientes transcripciones de longitud completa. Se ha diseñado el Kit Smart (Clontech, EE.UU. para enriquecer específicamente el ADNc de longitud completa basándose en el hecho de que la transcriptasa inversa añade una cola oligo(dG) únicamente cuando está completa la polimerización de la copia de ADN. Se diseñaron cebadores específicos para la amplificación selectiva del ADNc de longitud completa. Se llevaron a cabo las reacciones según el protocolo del fabricante. De manera breve, se transcribieron de manera inversa 1,0 μ g de ARN total en un volumen de 10 μ l que contenía 10 pM de oligonucleótido Smart, 10 pM de cebador CDS/3', 10 pM de dNTP, 20 pM de DTT, y 200 U de Transcriptasa Inversa Superscript II (Life Technologies, EE. UU.) en un primer tampón de cadena. Se llevó a cabo la transcripción inversa a 42°C durante una hora. Se llevó a cabo la PCR en un Termociclador 9600 de Perkin Elmer (EE.UU.) en un volumen de 100 μ l que contenía 2 μ l de la primera mezcla de reacción de la cadena, 20 pM de dNTP, 20 pM de cebador 5'-PCR, 20 pM de cebador CDS/3' y 1 X mezcla de polimerasa Kien Taq. Se llevó a cabo tras una etapa de desnaturalización a 95°C/1 min, 25 ciclos 95°C/15 s 68°C/5 min.

El análisis de secuenciación y la comparación con la base de datos Blast desvelaron que el fragmento génico contenido en el clon 8/5-35 correspondía a las porciones de una secuencia de ADN cromosómico procedente del cromosoma 11 humano. Estas correspondencias parciales sugieren la presencia de diversos exones. De esta manera, se investigó el ADN cromosómico procedente del clon pDJ606 g β de PAC para los exones e intrones mediante los programas de localización de exones (por ejemplo, <http://www-hgc-lbl.gov/inf/genie.html>, <http://CCR-081.mit.edu/GENSCAN.html>, y <http://grail.genome.ad.jp/Grail-1-3/>) y se predijo la secuencia de ARNm. Se diseñaron cebadores para confirmar la secuencia de codificación predicha.

Transcripción de SNEV de longitud completa

Se aisló la siguiente secuencia de nucleótidos con una pareja de cebadores que queda fuera del marco de lectura abierto del primer y el segundo exón (Tabla 3).

TABLA 3

Secuencia de nucleótidos de SNEV (SEC DE ID N° 3)

CAGCAGCGGGGACCGGAAGTGGCTCGCGGAGGCTCAGAAGCTAGT
 CCCGGAGCCCGGCGTGTGGCGCCTCGGAGCGCGGTGACGGCGCCATG
 TCCCTAATCTGCTCCATCTCTAACGAAGTGCCGGAGCACCCATGTGTA
 TCCCCTGTCTCTAATCATGTTTATGAGCGGCGGCTCATCGAGAAGTAC
 ATTGCGGAGAATGGTACCGACCCCATCAACAACCAGCCTCTCTCCGA
 GGAGCAGCTCATCGACATCAAAGTTGCTCACCCAATCCGGCCCCAAGC
 CTCCTCAGCCACCAGCATCCCGGCCATTCTGAAAGCTTTGCAGGAT.
 GAGTGGGATGCAGTCATGCTGCACAGCTTCACTCTGCGCCAGCAGCT
 GCAGACAACCCGCCAAGAGCTGTCACACGCTCTGTACCAGCACGATG
 CCGCCTGCCGTGTCATTGCCCGTCTCACCAAGGAAGTCACTGCTGCCC
 GAGAAGCTCTGGCTACCCTGAAACCACAGGCTGGCCTCATTGTGCCC
 CAGGCTGTGCCAAGTTCCCAACCAAGTGTTGTGGGTGCGGGTGAGCC
 AATGGATTTGGGTGAGCTGGTGGGAATGACCCCAGAGATTATTCAGA
 AGCTTCAAGACAAAGCCACTGTGCTAACCACGGAGCGCAAGAAGAG
 AGGGAAGACTGTGCCTGAGGAGCTGGTGAAGCCAGAAGAGCTCAGC
 AAATACCGGCAGGTGGCATCCACGTGGGGTTGCACAGTGCCAGCAT
 TCCTGGGATCCTGGCCCTGGACCTCTGCCCGTCCGACACCAACAAGA
 TCCTCACTGGTGGGGCGGATAAAAATGTCGTTGTGTTTGACAAAAGTT
 CTGAACAAATCCTGGCTACCCTCAAAGGCCATACCAAGAAGGTCACC
 AGCGTGGTGTTCACCCCTCCAGGACCTGGTGTGTTTCTGCTTCCCCC
 GATGCCACTATCAGGATTTGGTCGGTCCCCAATGCCTCTTGTGTACAG
 GTGGTTCGGGCCCATGAGAGTGCTGTGACAGGCCTCAGCCTTCATGC
 CACTGGCGACTATCTCCTGAGCTCCTCCGATGATCAGTACTGGGCTTT
 CTCTGACATCCAGACAGGGCGTGTGCTCACCAAGGTGACAGATGAGA
 CCTCCGGCTGCTCTCTCACCTGTGCACAGTTCCACCCTGACGGACTCA
 TCTTTGGAACAGGAACCATGGACTCTCAGATCAAGATCTGGGACTTG
 AAGGAACGTAATAATGTGGCCAACCTCCCTGGCCACTCGGGCCCCAT
 CACTAGCATCGCCTTCTCTGAGAATGGTTACTACCTGGCTACAGCGGC
 TGATGACTCCTCTGTCAAGCTCTGGGATCTGCGCAAGCTTAAGAACTT
 TAAGACTTTGCAGCTGGATAACAACCTTTGAGGTAAAGTCACTGATCTT
 TGACCAGAGTGGTACCTACCTGGCTCTTGGGGGCACGGATGTCCAGA
 TCTACATCTGCAAACAATGGACGGAGATTCTTCACTTTACAGAGCATA
 GCGGCCTGACCACAGGGGTGGCCTTCGGGCATCACGCCAAGTTCATC
 GCTTCAACAGGCATGGACAGAAGCCTCAAGTTCTACAGCCTGTAGGC
 CCTGGCCCTTCTGATGGAAGCTGGGCCTCATCTCAGTAGAGGGGTAG

AATTAGGGTTTGGGGGGGGGGTGGGGGGAATCTATGGGGGGAGGGG
 GCTCTGTGGGGTGGGACATTCACATCATTTCACTCTGGTCTGAGTGGT
 5 GGCCTGAGAACCATGGTGGCATGGACCACCCTCATCCATGCAACTCC
 AGGCCCCATGGGAACGGATGTGGAAGGAAGAACTGTCACCCTCTTAA
 GGCCCAGGGTCGGAGCCCAGGGCCTCTCCCTTCCTGTCGTTCAATGG
 10 ACGTGGTGGTGGCTGTTCCACACCCATTTTGTTCAGTTCCTGTGAGA
 CAGGAGAGGCTGAGCCAAGGGAAGTGTGAAGGGGATGGGCAGGAGG
 GCTTGTGCAGGGTTTTGTAAGCAGTGATCTAGTTTCATTAAAAAAGA
 15 AAACAATAACCATAACCACCTCCCCGTGTCTGTCTGCACCAGGAGCA
 CCTGGGACTGGGAAGGTCAAGGGGAGGGAGCACACACTGGGACACT
 GGCTTCCGGGAAGCCCATCTTCCTTTCTTTTACAGCTCTTACCCTTTT
 20 TTTTTTTTTTTAATTGCACAGCAGAAATAAAACAAATCTGC

Secuencia de aminoácidos de la proteína SNEV

Se tradujo esta secuencia de nucleótidos en la siguiente secuencia de aminoácidos (Tabla 4):

TABLA 4

Secuencia de aminoácidos de SNEV (SEC DE ID N° 4)

MSLICSI SNEVPEHPCVSPVSNH VYERRLIEKYIAENGTD PINNQPLSEEQLIDI
 35 KVAHPIRPKPPSATSIPAILKALQDEWDV MLHSFTLRQQLQTTROELSHAL
 YQHDAACRVIA RLTK EYTAAREALATLKPQAGLIVPQAVPSSQPSVVGAG
 EPMDLGELVGMTPEIIQKLQDKATVLTTERKKRGKTVPEELVKPEELSKYRQ
 40 VASHVGLHSASIPGILALDLCPSDTNKILTGGADKNV VVFDKSSEQILATLK
 GHTKKVTSVVFHPSQDLVFSASPDATIRIWSVPNASC VQVVR AHESA VTG
 LSLHATGDYLLSSDDQYWAFSDIQTGRVLT KVTD ETS GCSLTCAQFHPD
 45 GLIFGTGTMDSQIKIWDLKERTNVANFPGHSGPITSIAFSENGYYLATAADD
 SSVKLWDLRLKLNFKTLQLDNNFEVKS LIFDQSGTYLALGGTDVQIYICKQ
 WTEILHFTEHSGLT TGVAFGHHAKFIAS TGM DRS LK FYSL

En conclusión, el ARNm de los genes identificados recientemente muestra una longitud de 2251 pb, consistente con la transcripción observada en las transferencias Northern. El codón de inicio se localiza en la posición 91, el codón de detención en la posición 1603, y la señal de poliadenilación en 2200 (bases subrayadas en la Tabla 3). El análisis computacional del segmento de ADN cromosómico 11 p12.2 desveló 17 exones comprendidos dentro de 16 kb. La longitud de los exones oscila entre 19 y 171 pb (véase también la correspondencia de SNEV con el ADN cromosómico). La traducción del ARNm dio como resultado una proteína de 504 aminoácidos, cuya presunta localización celular es citoplásmica o nuclear, según sugiere el programa PSORT (<http://psort.nlb.ac.jp:8800/>) disponible vía internet. Se confirmó esto mediante la identificación experimental de la proteína como una proteína de la matriz nuclear (Dr Sauermann y col., Institute of Tumor Biology & Cancer Research, Universidad de Viena, Austria).

Se calculó la hidrofobia era de 0,26 y se predijo un presunto peso molecular de 55,2 kd. Se confirmó el peso molecular mediante el análisis de la transferencia Western (Fig. 9).

Ejemplo 2

Expresión de SNEV en tejidos y líneas celulares

Usando transferencias Northern en múltiples tejidos (MTN) los inventores encontraron que el ARNm de SNEV estaba presente en todos los tejidos humanos representados en la transferencia: riñón, pulmón, placenta, intestino delgado, hígado, leucocitos de sangre periférica, bazo, timo, colon, músculo esquelético, corazón y cerebro. Adicionalmente, existen homólogos de la misma longitud en rata, ratón y células CHO (no se muestran los datos). Se cuantificaron los niveles del ARNm de SNEV en diferentes líneas celulares. En células HUVEC se observaron niveles aumentados en células jóvenes, células quiescentes y células transformadas con SV40 frente a células senescentes (Fig. 1).

De manera similar, en fibroblastos diploides humanos derivados de piel, se detectó que el ARNm de SNEV estaba más abundantemente transcrito en células jóvenes (Fig. 2).

Basándose en los resultados procedentes de células endoteliales y fibroblastos, se supuso que los niveles de ARNm no disminuían únicamente en células senescentes, sino que también aumentaban en las líneas celulares tumorales. Con el fin de ensayar esta hipótesis, los inventores compararon los niveles de ARNm de diferentes líneas celulares inmortalizadas con su correspondiente línea celular primaria. En células de riñón, la diferencia entre células jóvenes y senescentes estuvo de acuerdo con los resultados derivados de los fibroblastos y de las células HUVEC. El aumento (Fig. 3) en células de riñón transformadas con SV40 y en las líneas celulares inmortalizadas no fue tan pronunciado como en linfocitos (Fig. 4) en los que se detectó un aumento de hasta 10 veces. La diferencia de una línea celular de queratinocitos normales (3 pasos) y la línea celular Hacat no se valoraría, debido a que no se detectaría señal en las células primarias (no se muestran los datos).

Ejemplo 3

*Expresión recombinante del ARNm de SNEV de sentido directo y sentido contrario en células HUVEC**Construcción de construcciones de sentido directo y sentido contrario*

Se llevó a cabo la transfección de células HUVEC con SNEV recombinante usando el kit de expresión y transferencia génica retroviral de Clontech según el protocolo del fabricante. De manera breve, se amplificó el ADNc de SNEV usando los cebadores retro SNEV de sentido directo (5'-GAC GGT TAA CAT GTC CCT AAT CTG CTC CAT-3'M SEC DE ID N° 8) y retro SNEV de sentido contrario (5'-GAC CGT TAA CCC TAA TTC TAC CCC TCT AC-3'; SEC DE ID N° 9) y se unieron por los extremos enmascarados en el plásmido retroviral pLXSN, creando las construcciones PLXSN/SNEV de sentido directo y pLXSN/SNEV de sentido contrario. Estas construcciones se transfectaron en la línea celular de empaquetamiento Retropack PT67 (Clontech, EE.UU.) mediante lipofección. Se escogieron líneas celulares transfectadas de manera estable y se usó el sobrenadante de su cultivo para infectar las células HUVEC en el paso 14.

Tras la transfección de las células HUVEC (paso 14) con el virus SNEV de sentido contrario y la selección de los clones positivos por la resistencia a G418, las células que expresaban el ARN de SNEV de sentido contrario bajo el promotor de SV40 constitutivo, entraron en senescencia replicativa en el paso 17. En contraste, las células que expresaban el ARNm de SNEV de sentido directo están en el paso 23 y continúan creciendo. Adicionalmente, se observó un crecimiento más rápido de células normales y transfectadas de sentido directo en comparación con las transfectantes de sentido contrario. Tras la transfección, se cultivaron también las células HUVEC sin G418. Cuando se añadió G418 a las células tras 4 pasos, se obtuvieron clones viables únicamente de las células HUVEC transfectadas con ARNm de SNEV de sentido directo.

Se comparó el fenotipo de las células senescentes transfectadas de sentido contrario con el de las células HUVEC senescentes normales y no se pudieron detectar diferencias morfológicas. Se confirmó también la senescencia celular mediante la tinción de la β -galactosidasa asociada a la senescencia (Fig. 5).

Tinción de la β -galactosidasa asociada a la senescencia

Se llevó a cabo la tinción de la β -galactosidasa asociada a la senescencia según se ha descrito anteriormente (Dimri y col., 1995, Proc Natl Acad Sci USA 92, 9363-9367). Tras la retirada del medio de cultivo, se lavaron las células dos veces con PBS y se fijaron con una disolución de fijado que contenía formaldehído al 2% y glutaraldehído al 0,2% en PBS. Se incubaron las células durante 5 min a temperatura ambiente y se lavaron dos veces con PBS. Se llevó a cabo la tinción durante la noche a temperatura ambiente con una disolución que contenía 1 mg/ml de X-gal, ferrocianuro de potasio 5 mM, ferrocianuro de potasio 5 mM, $MgCl_2$ 2 mM en tampón cítrico/fosfato pH 6,0.

Ejemplo 4

Control del alargamiento de la vida de células de mamífero mediante la aplicación de ARNm de SNEV

5 Con el fin de arrojar más luz sobre el papel biológico de SNEV en las células de mamíferos, se transfectaron células HUVEC con un vector vírico que contenía el ARNm de SNEV de sentido directo dando como resultado una expresión en exceso correspondiente a la proteína SNEV, y en un experimento paralelo, con ARN de SNEV de sentido contrario que da como resultado una infrarregulación correspondiente a la proteína SNEV. Tras la infrarregulación de SNEV, las células HUVEC entraron en el estado de senescencia celular 3 pasos después de la transfección, mientras
10 que la expresión en exceso dio como resultado un crecimiento continuo. Los datos experimentales sugieren un papel directo de SNEV en la regulación de la proliferación celular y en la senescencia replicativa. En vez de ARN de sentido contrario de los APN adecuados (ácidos péptido nucleicos), se puede usar también la estrategia de sentido contrario con el fin de inhibir o evitar la traducción del ARNm de SNEV de sentido directo.

15 Ejemplo 5

Clonación del homólogo de la proteína SNEV de ratón (=SNEVm)

20 Se llevó a cabo la preparación del ARN total de una línea de células 3T3 de ratón usando 1 ml de reactivo TriZol (Life Technologies, EE.UU.)/5 X 10⁶ células. Se transcribieron de manera inversa 1,0 µg de ARN total en un volumen de 10 µl que contenía 10 pM de oligonucleótido Oligo(dT₃₀), 10 PM de DNTP, 20 pM de DTT y 200 U de Transcriptasa Inversa Superscript (Life Technologies, EE.UU.), y tampón 1XRT (Life Technologies, EE.UU.). Se llevó a cabo la transcripción inversa a 42°C durante una hora. Por comparación de la secuencia humana de SNEV con la división
25 EST de ratón de la base de datos del banco de genes (Altschul y col., 1999, Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402), se determinó la secuencia consenso de los diferentes clones EST como la presunta secuencia de SNEVm. Se diseñaron los cebadores (SNEVm de sentido directo: 5'-AAC CCT CTG TGA GGC GAC TG-3'; (SEC DE ID N° 10; y SNEVm de sentido contrario: 5'-CCA CTA CTG AGA TGA GGC CC-3'; SEC DE ID N° 11) con el fin de amplificar la secuencia de codificación y se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un tampón que contenía
30 20 pM de cada cebador, 0,1 µl de la reacción de la RT como plantilla. Los ciclos de la PCR fueron 94°C/20 s, 55°C/30 s y 72°C/2 min. Se clonó el producto de la PCR en pBluescript KS II y se introdujo en TG 1 de *E. coli* mediante electroporación. Tras la amplificación del plásmido en la bacteria, se determinó la secuencia de inserción.

35 Ejemplo 6

Estímulo de anticuerpos frente a SNEV e inmunofluorescencia

Para los análisis adicionales, se estimularon anticuerpos frente a los péptidos sintéticos de SNEV en conejos y se
40 determinó la localización celular de SNEV mediante procedimientos inmunofluorescentes.

Determinación de los presuntos emplazamientos antigénicos

Por medio del software del modelo suizo (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>), se predijo una
45 posible estructura terciaria de SNEV para los aminoácidos 229-421. Usando también el software PCGENE, se seleccionaron también tres posibles emplazamientos antigénicos y se sintetizaron los siguientes péptidos:

- Péptido 86 (NH₃-CSVVFHPSQDLVFSASPDATI-COOH; SEC DE ID N° 5), que contenía una secuencia de SNEV de 20 aminoácidos más una cisteína adicional en el término N, incluyendo el emplazamiento antigénico
50 esperado en los aminoácidos 276-280,
- Péptido 87 (NH₃-CNVVVFDKSSEQILATLKGHTC-COOH; SEC DE ID N° 6), que contenía una secuencia de SNEV de 21 aminoácidos más una cisteína adicional en el término N, incluyendo el emplazamiento antigénico
55 esperado en los aminoácidos 253-258, y
- Péptido 88 (NH₃-CKATVLTTERKKRGKTVPEELC-COOH; SEC DE ID N° 7), que contenía una secuencia de SNEV de 21 aminoácidos más una cisteína adicional en el término N, incluyendo el emplazamiento antigénico
60 esperado en los aminoácidos 186-192.

Se añadió el resto de cisteína N terminal para permitir el acoplamiento específico a la hemocianina específica de la
lapa de california (KLH) usando el reactivo bifuncional éster de m-maleinimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS).

65 Se disolvieron 20 mg de KLH en 2 ml de tampón Na₂PO₄ 0,1 M, pH 7,2 y NaCl 0,9 M y se mezclaron con 240 µl de reactivo de reticulación MBS (10 mg/ml de tampón NaPO₄ 1 M, pH 7,2, NaCl 0,9 M, y DMSO al 20%). Se llevó a cabo la reacción a temperatura ambiente durante 2,5 h con agitación constante. Se purificó la KLH activada mediante cromatografía de exclusión con una columna Sephadex G25 y se eluyó con 3,5 ml de tampón de elución (tampón NaPO₄ 0,1 M, pH 7,2, NaCl 0,9 M, EDTA 0,1 M). Se disolvieron 10 mg de cada uno de los tres péptidos en 1 ml de

ES 2 344 400 T3

tampón Na_2PO_4 0,9 M, pH 7,2, NaCl 0,9 M, EDTA 0,1 M y DMSO al 20% y se mezclaron 600 μl del mismo con 1,15 ml de disolución de KLH. Se llevó a cabo la reacción de acoplamiento durante la noche a temperatura ambiente (RT) con agitación constante.

5 Se filtraron estériles los péptidos conjugados, se mezclaron uno a uno con adyuvante de Freund incompleto y se inyectaron intramuscularmente en conejos New Zealand.

Se llevaron a cabo tres inmunizaciones en intervalos de tres semanas. Se recogió la sangre dos semanas después de la tercera inmunización.

10

Inmunofluorescencia indirecta, usando microscopio de fluorescencia

Se inocularon células HaCat y fibroblastos diploides humanos normales en una concentración aproximada de 5×10^4 células/200 μ l en fundas extraíbles en una placa de 6 pocillos y se incubaron entre 24 y 72 h a 31°C hasta que las células alcanzaron aproximadamente un 60% de confluencia. Se lavaron dos veces las células adheridas con PBS (37°C), se fijaron con metanol (-20°C) durante 20 min, se secaron al aire y se enjuagaron con PBS. Tras el bloqueo con PBS que contenía FCS al 20% (PBS/FCS) durante 15 min/RT, se incubaron las células con uno de los antisueros dirigido contra péptidos (1:100 en PBS) durante 1 h a 37°C y a continuación se lavaron tres veces (5 min) con PBS/FCS. Tras lo anterior, se incubaron las células con un segundo anticuerpo marcado con FITC (protegido de la luz) dirigido contra el primer anticuerpo y se lavaron 4 veces (10 min) con PBS. Se visualizó la señal de la fluorescencia usando microscopio de fluorescencia (microscopio confocal MRC600 de BioRad) con una longitud de onda de excitación de 488 nm y una longitud de onda de emisión mayor de 515 nm.

Las fotografías de la Fig. 8 muestran las dos líneas celulares (HaCat y HDF) analizadas para la localización de SNEV. Se tiñó SNEV mediante el antisuero dirigido contra el péptido 86 y se encontró que estaba localizado sobre la superficie de los núcleos celulares que se diseminan en el citoplasma. Ha de determinarse mediante experimentos adicionales si éste está contenido en el interior de los núcleos, como sugiere la Fig. 8A. Sin embargo, la intensidad de la fluorescencia en células HaCat (A y B) es mayor que en HDF (C y D). Este resultado concuerda con los datos obtenidos a partir de los análisis del ARNm (Ejemplo 1). Adicionalmente, el antisuero dirigido contra el péptido 87 y el antisuero dirigido contra el péptido 88 tiñeron también SNEV (no se muestran los datos), lo que confirma la antigenicidad de los péptidos 87 y 88. Ambos péptidos tardíos fueron capaces de inducir anticuerpos dirigidos contra SNEV, la respuesta inmune estimulada fue menos pronunciada, sin embargo, que con el péptido 86. Los resultados sugieren el uso de anticuerpos, particularmente procedentes del antisuero dirigido contra el péptido 86 como herramientas diagnósticas para la determinación cualitativa y cuantitativa de los niveles intra o extracelulares de la proteína SNEV, particularmente en el curso de diagnósticos de tumor o cáncer. Los anticuerpos dirigidos contra SNEV pueden, sin embargo, aplicarse también terapéuticamente para disminuir los niveles celulares de la proteína SNEV, con el fin de forzar a una población de células diana, por ejemplo, células tumorales, a la senescencia temprana y a la detención de la proliferación. Para aumentar las proteínas SNEV intracelulares, se pueden modificar opcionalmente los anticuerpos dirigidos contra SNEV de una manera conocida en la técnica tal como la de ser capaces de entrar en una célula diana procedentes del exterior o internalizarse mediante cualquier mecanismo conocido, por ejemplo, el mecanismo de endocitosis mediada por receptor.

Ejemplo 7

45

Expresión recombinante de SNEV mediante el sistema del baculovirus

Con el fin de producir cantidades aceptables de proteína SNEV para los estudios bioquímicos los inventores expresaron de manera recombinante ésta por medio del sistema del baculovirus en células de insectos.

50

Construcción de pBacPAK8-SNEV

Se llevó a cabo la PCR (temperatura de hibridación 50°C) usando Dinazyme EXT (Finnzymas) usando los cebadores SNEV de sentido directo-*Xba*I (GATGATTCTAGAAATATGTCCCTAATCTGCTCCAT; SEC DE ID N° 12) y SNEV de sentido contrario-*Eco*Ri etiquetado con Strep (GACGGAÄTTCAACCTAATGATGATGATGATGATGCAGGCTGTAGAACTTGAGGGC; SEC DE ID N° 13). Se purificó mediante gel el producto de la PCR y se digirió secuencialmente con *Eco*Ri y *Xba*I. El fragmento purificado se unió a *Eco*Ri y al plásmido pBacPAK8 escindido por *Xba*I (Clontech) y se transformó en TG1 de *E. coli* electrocompetente. Se llevó a cabo un cribado de la PCR de los diversos transformantes usando los cebadores específicos del vector -44 inverso (TTTACTGTTTTCGTAA CAGTTTTG; SEC DE ID N° 14) y +1660 directo (CAACGCACAGAATCTAGCGC; SEC DE ID N° 15). Se extrajo el ADN plásmido de los tres presuntos candidatos Kit GFX, Pharmacia), verificado mediante el análisis de restricción y se designó pBacPAK8-SNEV.

Cultivo celular y propagación vírica

65

Se hicieron crecer células *Sf9* de insecto (*Spodoptera frugiperda*, ATCC CRL 117) en medio IPL-41 (Sigma) suplementado con suero de ternera fetal al 3% (FCS) y con FCS al 10% cuando se usa para la propagación vírica.

Construcción de partículas AcSNEV de baculovirus recombinante

Se complejaron 50 ng de ADN de pBacPAK8-SNEV usando fectina celular (LTI) y se transfectaron simultáneamente con 250 ng de ADN de BaculoGold (Pharmlingen) en $2,5 \times 10^6$ células Sf9. Después de tres días, se llevó a cabo un ensayo de placas con el sobrenadante de la transfección y se incubaron durante siete días. Se transfirieron doce placas individuales sobre células Sf9 recientes (placas de 24 pocillos) y se amplificaron durante cinco días. Se cosecharon las células infectadas y se extrajo el ADN baculovírico procedente de los aglomerados tras el protocolo normalizado de la lisis alcalina. Tras el cribado mediante la PCR con la pareja de cebadores -44 inverso y +1660 directo, se amplificaron tres clones positivos en matraces T25 (IPL-41, FCS al 10%); se infectaron $2,5 \times 10^6$ células Sf9 con 50 μ l de sobrenadante y se amplificaron durante tres días. Se cosechó el depósito intermedio de AcSNEV mediante centrifugación y se almacenó a 4°C.

Expresión de SNEV con AcSNEV de baculovirus recombinante

Se sembraron 8×10^6 células Sf9 en un matraz T80 y se infectaron con 50 μ l de depósito intermedio de AcSNEV. Se infectó un segundo matraz con Ac Ω , una construcción baculovírica negativa a la polihedrina sin gen recombinante, que sirvió como control negativo. Se cosecharon las células infectadas 48 horas después de la infección y se lisaron con un único tampón detergente TRIS/HCl 50 mM pH 8,0; NaCl 150 mM 100 μ g/ml de PMSF; Tritón X-100 al 1%; Aprotinina).

Electroforesis SDS-PAGE y transferencias Western

Se centrifugó el lisado celular a velocidad máxima durante 10 min/RT y se transfirió el sobrenadante transparente a un tubo de microcentrífuga reciente. Se mezclaron 10 μ l del lisado celular con 10 μ l de tampón de carga en gel 2 X SDS, se mantuvo en ebullición durante 10 min y se separó mediante SDS-PAGE sobre geles de poliacrilamida al 10% con geles de apilado al 5%. Se hicieron avanzar los geles en tampón 1 X Laemmli (Tris/HCl 25 mM pH 8,6; Glicina 192 mM; SDS al 0,1%) durante 1 h a 180 V. Se detectaron las proteínas contenidas en los geles mediante tinción de plata (Fig. 9A) o mediante transferencias Western (Fig. 9B).

Se incubaron la membrana del gen y los papeles del filtro durante 10 min en tampón de transferencia (Tris básico 25 mM; glicina 150 mM; metanol al 10%), a continuación se llevó a cabo la electrotransferencia semiseca de las proteínas a las membranas de nitrocelulosa durante 1 h a 10 V con tampón de transferencia. Se lavaron las membranas dos veces durante 10 min/RT en tampón TBS/Tris/HCl 10 mM pH 7,5; NaCl 150 mM) y se bloquearon usando la disolución de bloqueo de la transferencia Western (Tris/HCl 10 mM pH 7,5; NaCl 150 mM; BSA al 3%) durante 1 h/RT.

Se lavaron las membranas dos veces durante 10 min/RT en tampón TBS y se incubaron con una dilución de anticuerpo dirigido contra el péptido 86 en disolución de bloqueo de transferencia Western (1/100). Tras lavar dos veces con tampón TBS durante 10 min/RT, se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario (anticuerpo de conejo dirigido contra ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante, Sigma) durante 1 h/RT. Tras lavar 4 veces con tampón TBS 10 min/RT, se llevó a cabo la detección usando el kit ECL plus (Amersham Pharmacia Biotech) según las directrices del fabricante.

Según se muestra en la Fig. 9, la proteína SNEV recombinante se expresó como proteína de fusión etiquetada con strep en una forma soluble en células de insecto. Se detectó ésta en el Usado celular tras retirar los restos celulares mediante centrifugación (Fig. 9B, banda 3). De esta manera, se ha establecido un procedimiento para producir elevadas cantidades de SNEV recombinante y se llevó a cabo la purificación por medio de una columna de afinidad de estreptactina.

Abreviaturas

aa	aminoácidos
DIG	digoxigenina
EST	etiqueta de la secuencia expresada
G418	antibiótico frente a células eucariotas
G3PDH	glicerol-3-fosfato deshidrogenasa
TERTh	telomerasa humana
HUVEC	célula endotelial de la vena umbilical humana
KLH	hemocianina de lapa californiana

MBS	éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida
PAC	cromosoma artificial derivado de P1
5 APN	ácido péptido nucleico
SNEV	Nombre artificial de la presente proteína (SEC DE ID N° 2).

10 Referencias citadas en la memoria descriptiva

Esta lista de referencias citadas por el solicitante únicamente es para ayudar al lector y no forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto gran cuidado en su recopilación, no pueden excluirse errores u omisiones, y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

15 Bibliografía no de patentes citada en la memoria descriptiva

- O'Brien y col. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, vol. 83, 8659-8663 [0011]
- 20 • Van der Voom; Ploegh. *FEBS Lett*, 1992, 307, 131-4 [0016]
- Neer y col. *Nature*, 1994, vol. 371, 297-300 [0016]
- Hohenwarter, y col. *Cytotechnology*, 1992, vol. 8, 31-37 [0021]
- 25 • Wootton y Federhen. *Methods Enzymol*, 1996, vol. 266, 554-71) [0028]
- Lupas. *Curr Opin Struct Biol*, 1997, vol. 7, 388-93 [0028]
- 30 • Claros; von Heijne. *Comput Appl Biosci*, 1994, vol. 10, 685-6) [0028]
- Brendel y col. *Proc Natl Acad Sci*, 1992, USA vol. 89, 2002-6 [0028]
- Bateman y col. *Nucleic Acids Res*, 2000, vol. 28, 263-6 [0028]
- 35 • Schultz y col. *Nucleic Acids Res*, 2000, vol. 28, 231-4 [0028]
- Andrade y col. *J Mol Biol*, 2000, vol. 298, 521-37 [0028]
- 40 • Altschul y col. *Nucleic Acids Res.*, 1999, vol. 25, 3389-3402 [0028] [0048]
- Dr Sauermann y col., *Institute of Tumor Biology & Cáncer Research* [0038]
- Dimri y col. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, vol. 92, 9363-9367 [0046].

REIVINDICACIONES

1. Uso de un compuesto aislado o producido de manera sintética seleccionado entre el grupo constituido por

- a) una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o péptido regulador celular que tiene una secuencia de aminoácidos según la SEC DE ID N° 4, un homólogo de la SEC DE ID N° 4, una parte de la SEC DE ID N° 4, el péptido 86 (SEC DE ID N° 5), el péptido 87 (SEC DE ID N° 6), o el péptido 88 (SEC DE ID N° 7);
- b) un ARNm de sentido directo que se traduce en una proteína o péptido regulador celular que tiene una secuencia de aminoácidos según la SEC DE ID N° 4, un homólogo de la SEC DE ID N° 4, una parte de la SEC DE ID N° 4, el péptido 86 (SEC DE ID N° 5), el péptido 87 (SEC DE ID N° 6), o el péptido 88 (SEC DE ID N° 7);
- c) un ARN de sentido contrario que es reactivo con un ARN de sentido directo que se traduce en una proteína o péptido regulador celular que tiene una secuencia de aminoácidos según la SEC DE ID N° 4, un homólogo de la SEC DE ID N° 4, una parte de la SEC DE ID N° 4, el péptido 86 (SEC DE ID N° 5), el péptido 87 (SEC DE ID N° 6), o el péptido 88 (SEC DE ID N° 7), y cuyo ARN de sentido contrario inhibe o bloquea la traducción de dicho ARNm de sentido directo;
- d) una proteína o péptido regulador celular que está codificado por la SEC la SEC DE ID N° 1, por la SEC DE ID N° 3, por un homólogo de la SEC DE ID N° 1, por un homólogo de la SEC DE ID N° 3, por una parte de la SEC DE ID N° 1 que codifica una región funcional de una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos según la SEC DE ID N° 4, o por una parte de la SEC DE ID N° 3 que codifica una región funcional de una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos según la SEC DE ID N° 4;
- e) una proteína o péptido regulador funcional que tiene una secuencia de aminoácidos según la SEC DE ID N° 4, un homólogo de la SEC DE ID N° 4, una parte de la SEC DE ID N° 4, el péptido 86 (SEC DE ID N° 5), el péptido 87 (SEC DE ID N° 6), o el péptido 88 (SEC DE ID N° 7); y
- f) un anticuerpo reactivo con una proteína o péptido regulador que tiene una secuencia de aminoácidos según la SEC DE ID N° 4, un homólogo de la SEC DE ID N° 4, una parte de la SEC DE ID N° 4, el péptido 86 (SEC DE ID N° 5), el péptido 87 (SEC DE ID N° 6), o el péptido 88 (SEC DE ID N° 7);

en el que dicho homólogo de la SEC DE ID N° 4 es una proteína, subunidad de proteína, parte de una proteína o un péptido que contiene una parte, región o región funcional que es estructural y funcionalmente idéntica con la SEC DE ID N° 4, y en el que dicho homólogo de la SEC DE ID N° 1 es una secuencia de nucleótidos que codifica la misma secuencia de aminoácidos pero que varía en la composición de los nucleótidos debido a la degeneración del código genético, y en el que dicho homólogo de la SEC DE ID N° 3 es una secuencia de nucleótidos que codifica la misma secuencia de aminoácidos pero que varía en la composición de los nucleótidos debido a la degeneración del código genético, para la fabricación de una composición para interferir y/o detectar la senescencia celular o el desarrollo tumorigénico de una célula o tejido eucariota.

2. Uso según la reivindicación 1, para la fabricación de una composición para tanto prolongar el alargamiento de la vida de dicha célula o tejido eucariota, como para acelerar la senescencia celular o detener la proliferación de dicha célula o tejido eucariota.

3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, para la fabricación de una composición para el diagnóstico o el tratamiento terapéutico de un tumor o un cáncer.

4. Uso según la reivindicación 1, 2 ó 3, en el que el anticuerpo se puede obtener tras la inmunización de un mamífero con una proteína o péptido regulador celular seleccionado entre el grupo constituido por la SEC DE ID N° 4, un dicho homólogo de la SEC DE ID N° 4, una parte de la SEC DE ID N° 4, el péptido 86 (SEC DE ID N° 5), el péptido 87 (SEC DE ID N° 6), y el péptido 88 (SEC DE ID N° 7).

5. Un procedimiento para detectar el desarrollo tumorigénico o la senescencia de una célula o tejido eucariota que comprende determinar y evaluar, *in vitro*,

- a) un nivel de expresión diferencial de una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína o péptido regulador; o
- b) un nivel diferencial del ARNm que se traduce en dicha proteína o péptido regulador celular,

en el que la proteína o péptido regulador celular tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por la SEC DE ID N° 4, un homólogo de la SEC DE ID N° 4, una parte de la SEC DE ID N° 4, el péptido 86 (SEC DE ID N° 5), el péptido 87 (SEC DE ID N° 6), y el péptido 88 (SEC DE ID N° 7), siendo dicho homólogo

ES 2 344 400 T3

de la SEC DE ID N° 4 una proteína, subunidad de proteína, parte de una proteína o péptido que contiene una parte, región, región funcional que es estructural y funcionalmente idéntica con la SEC DE ID N° 4.

5 6. El procedimiento según la reivindicación 5, en el que el nivel de expresión de dicha secuencia de nucleótidos afecta a al menos un parámetro seleccionado entre el grupo constituido por crecimiento, viabilidad, alargamiento de la vida, y número de ciclos de replicación, de dicha célula.

10 7. El procedimiento según la reivindicación 5 ó 6, en el que la expresión de dicha secuencia de nucleótidos está regulada en exceso en células tumorales en comparación con células normales del mismo tipo.

8. El procedimiento según la reivindicación 5 ó 6, en el que la expresión de la secuencia está infrarregulada en células senescentes en comparación con las células jóvenes del mismo tipo.

15 9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que dicha secuencia de nucleótidos se selecciona entre el grupo constituido por la SEC DE ID N° 1, la SEC DE ID N° 3, un homólogo de la SEC DE ID N° 1, un homólogo de la SEC DE ID N° 3, una parte de la SEC DE ID N° 1 que codifica una región funcional de una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos según la SEC DE ID N° 4, y una parte de la SEC DE ID N° 3 que codifica una región funcional de una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos según la SEC DE ID N° 4,

20 en el que dicho homólogo de la SEC DE ID N° 1 es una secuencia de nucleótidos que codifica la misma secuencia de aminoácidos pero que varía en la composición de la secuencia de nucleótidos debido a la degeneración del código genético, y en el que dicho homólogo de la SEC DE ID N° 3 es una secuencia de nucleótidos que codifica la misma secuencia de aminoácidos pero que varía en la composición de nucleótidos debido a la degeneración del código genético.

25 10. Un procedimiento de prolongar el alargamiento de la vida de una célula eucariota *in vitro*, que comprende

30 a) transfectar el ARNm de sentido directo que se traduce en una proteína o péptido regulador que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por la SEC DE ID N° 4, un homólogo de la SEC DE ID N° 4, una parte de la SEC DE ID N° 4, el péptido 86 (SEC DE ID N° 5), el péptido 87 (SEC DE ID N° 6), y el péptido 88 (SEC DE ID N° 7) en la célula eucariota e incubar la célula eucariota en un medio de cultivo celular adecuado; o

35 b) suplementar un medio de cultivo celular adecuado con una cantidad efectiva de una proteína o péptido regulador celular que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por la SEC DE ID N° 4, un homólogo de la SEC DE ID N° 4, una parte de la SEC DE ID N° 4, el péptido 86 (SEC DE ID N° 5), el péptido 87 (SEC DE ID N° 6), y el péptido 88 (SEC DE ID N° 7), e incubar la célula eucariota en dicho medio suplementado,

40 en el que dicho homólogo de la SEC DE ID N° 4 es una proteína, subunidad de proteína, parte de una proteína o un péptido que contiene una parte, región o región funcional que es estructural y funcionalmente idéntica con la SEC DE ID N° 4.

45 11. Un procedimiento de acelerar la senescencia celular o detener la proliferación de una célula eucariota *in vitro*, que comprende

50 a) inhibir o bloquear la traducción del ARNm de sentido directo contenido en dicha célula que se traduce en una proteína o péptido regulador que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo constituido por la SEC DE ID N° 4, un homólogo de la SEC DE ID N° 4, una parte de la SEC DE ID N° 4, el péptido 86 (SEC DE ID N° 5), el péptido 87 (SEC DE ID N° 6), y el péptido 88 (SEC DE ID N° 7), aplicando la estrategia de sentido contrario; o

55 b) introducir un anticuerpo que es reactivo con dicha proteína o péptido regulador celular en la célula eucariota, para disminuir el nivel intracelular de dicha proteína o péptido regulador celular,

60 en el que dicho homólogo de la SEC DE ID N° 4 es una proteína, subunidad de proteína, parte de una proteína o un péptido que contiene una parte, región o región funcional que es estructural y funcionalmente idéntica con la SEC DE ID N° 4.

65 12. El procedimiento de la reivindicación 11, que comprende introducir el ARN o APN de sentido contrario en la célula eucariota y dejar que el ARN o el APN de sentido contrario se híbride con el ARNm de sentido directo.

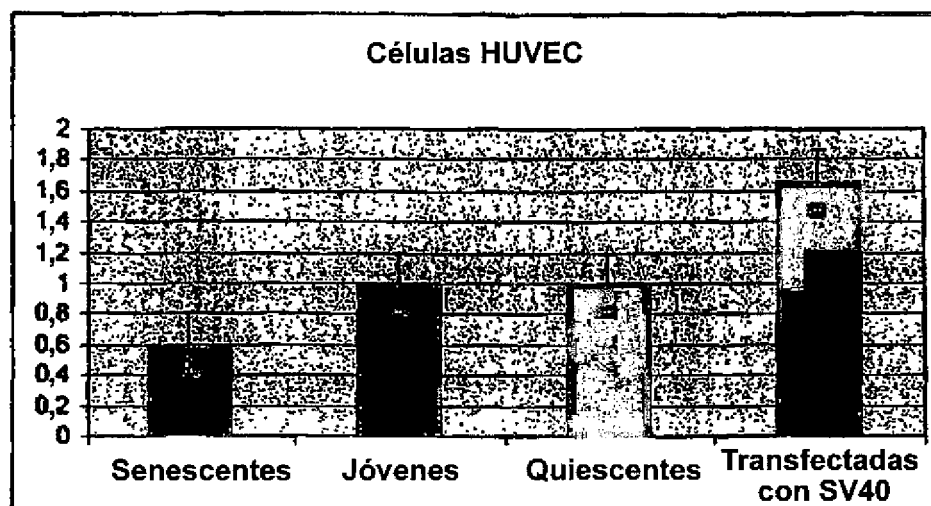


FIG. 1

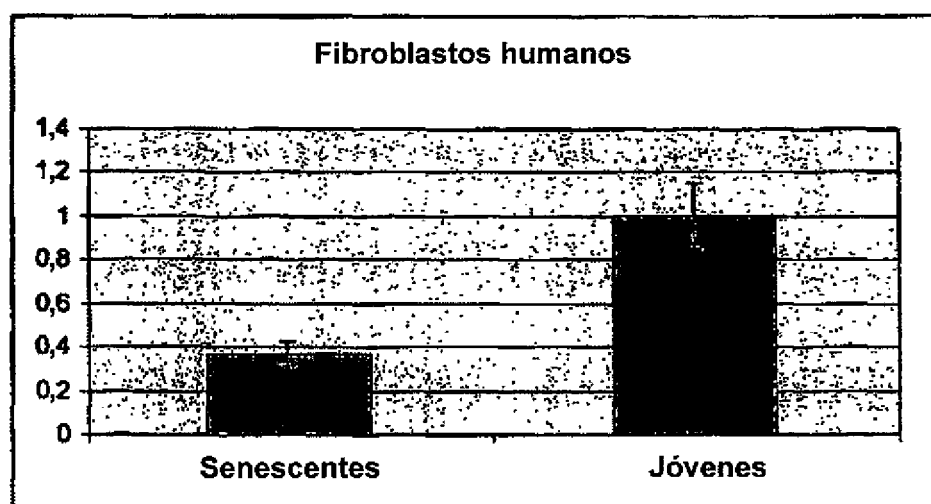


FIG. 2

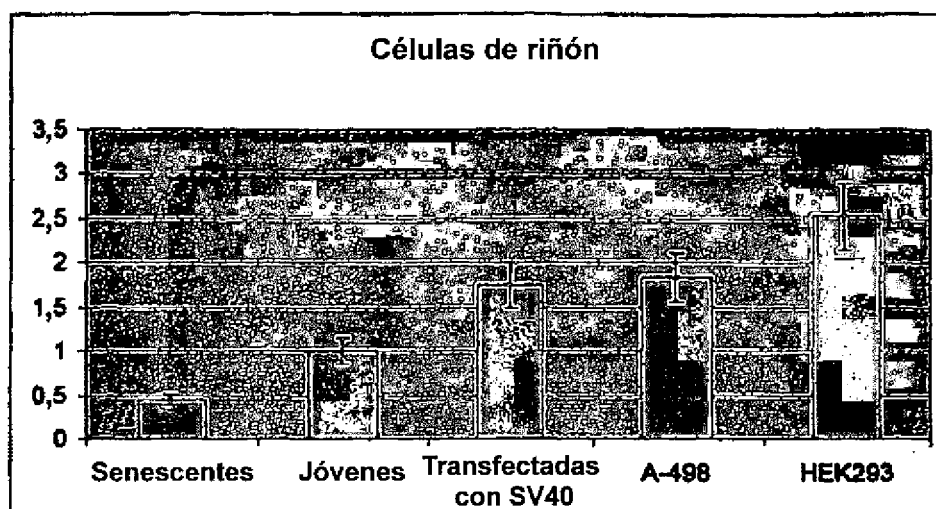


FIG. 3

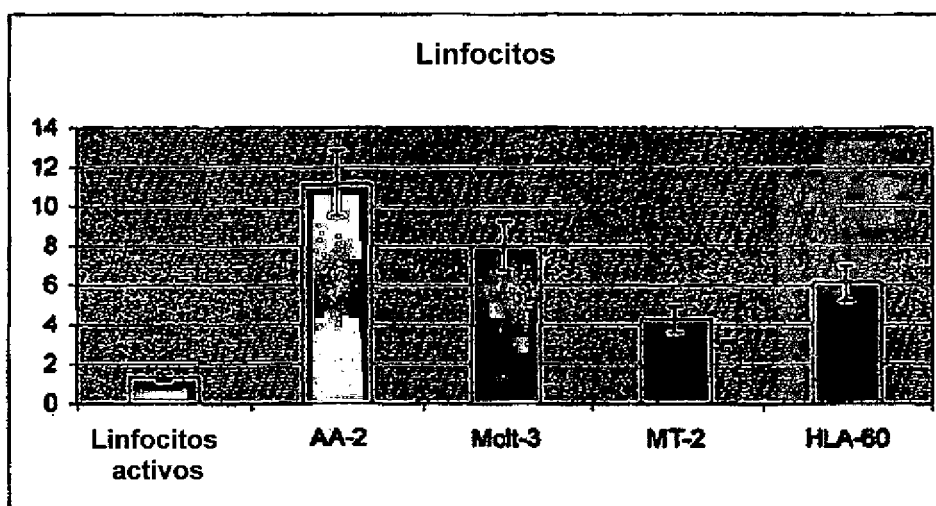


FIG. 4

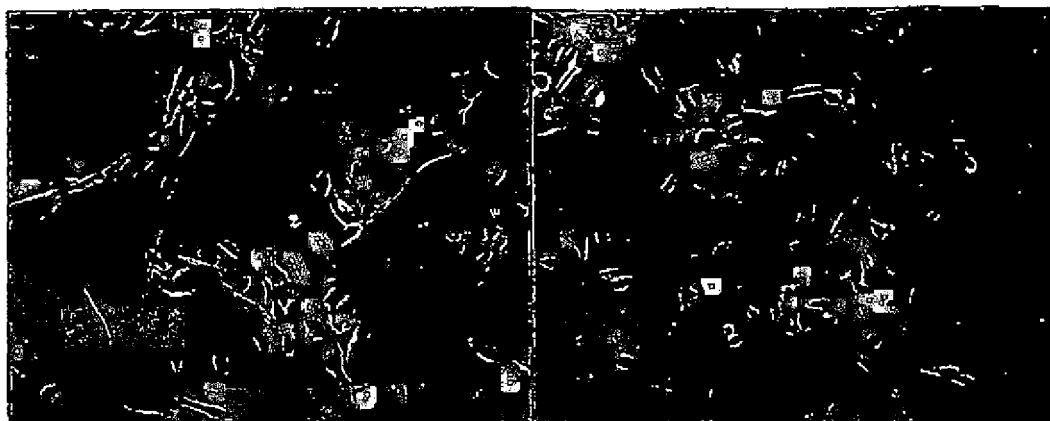


FIG. 5

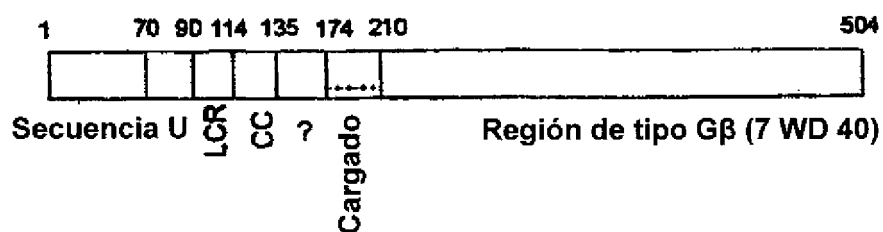


Fig. 6

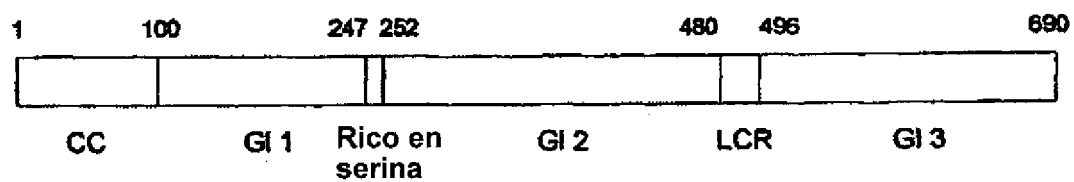


Fig. 7

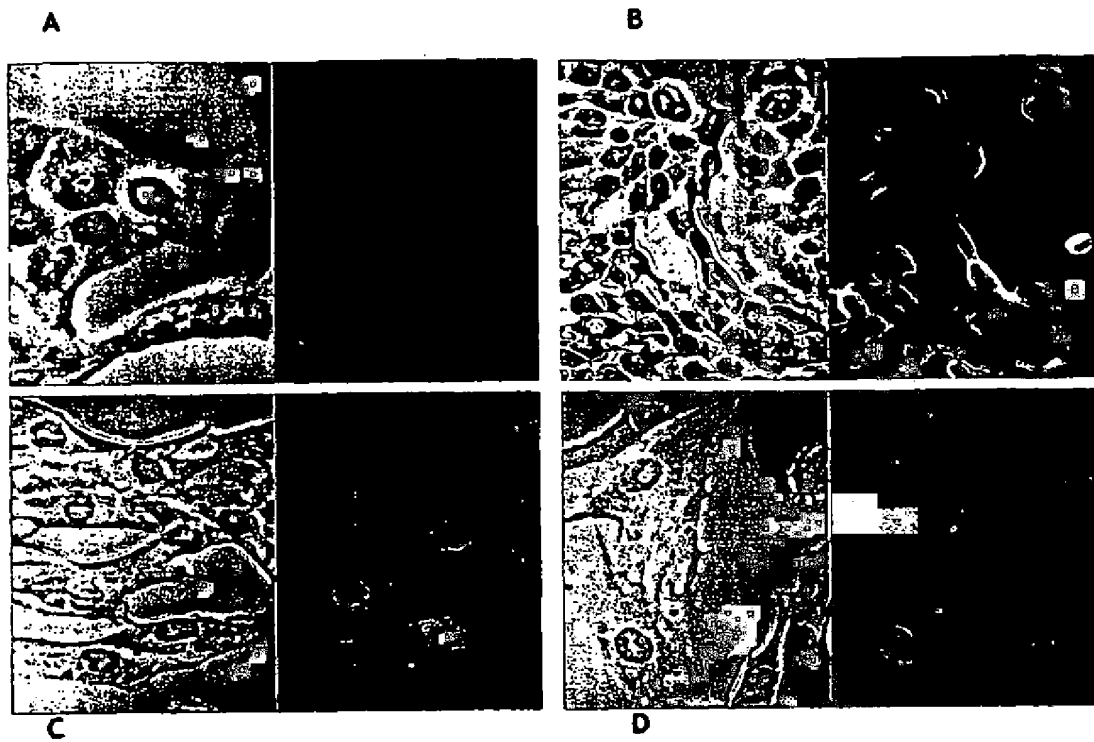


Fig. 8

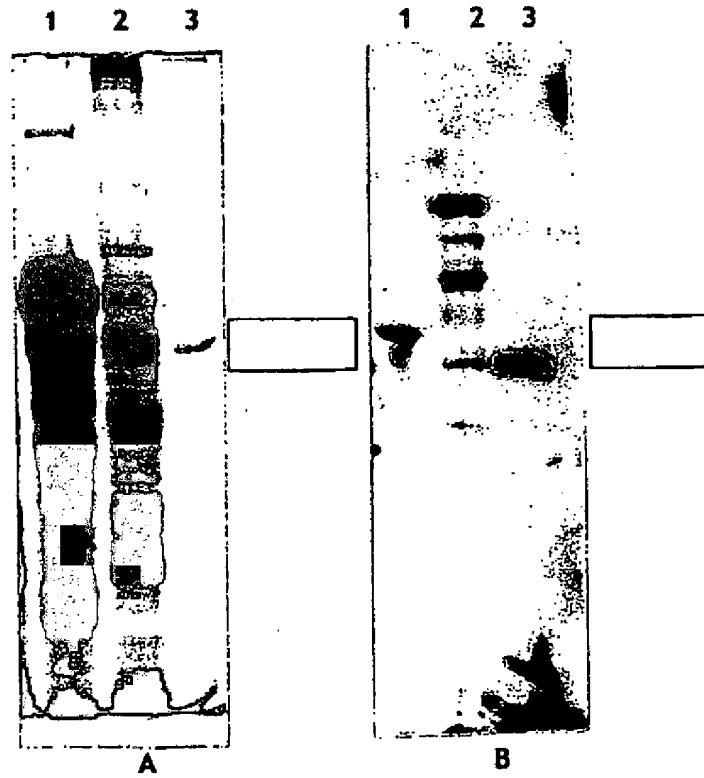


Fig. 9