

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 303**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/11** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12N 15/113** (2010.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2005 E 10183589 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2284265**

54 Título: **Procedimientos y composiciones que implican miARN y moléculas inhibidoras de miARN**

30 Prioridad:

**12.11.2004 US 627171 P**

**03.02.2005 US 649634 P**

**23.05.2005 US 683736 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.04.2015**

73 Titular/es:

**ASURAGEN, INC. (100.0%)  
2150 Woodward St Suite 100  
Austin TX 78744, US**

72 Inventor/es:

**BROWN, DAVID;  
FORD, LANCE;  
CHENG, ANGIE;  
JARVIS, RICH;  
BYROM, MIKE;  
OVCHARENKO, DMITRIY;  
DEVROE, ERIC y  
KELNAR, KEVIN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 534 303 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

Procedimientos y composiciones que implican miARN y moléculas inhibidoras de miARN

**1. Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general al campo de la biología molecular. Más particularmente, se refiere a procedimientos y composiciones que implican moléculas de ácido nucleico que simulan microARN (miARN) y que inhiben miARN. Se describen procedimientos y composiciones que implican miARN sintéticos y moléculas inhibidoras de miARN. Además, también se describen procedimientos y composiciones para identificar miARN que contribuyen a procesos celulares. Además, la identificación de miARN que contribuyen a procesos celulares proporciona dianas para intervención terapéutica así como análisis de diagnóstico y/o pronóstico.

**2. Descripción de la técnica relacionada**

En 2001, varios grupos usaron un nuevo procedimiento de clonación para aislar e identificar un gran grupo de "microARN" (miARN) de *C. elegans*, *Drosophila* y seres humanos (Lagos-Quintana y col., 2001; Lau y col., 2001; Lee y Ambros, 2001). Se han identificado varios cientos de miARN en plantas y animales, incluyendo seres humanos, que no parecen tener ARNip endógenos. Por lo tanto, aunque son similares a los ARNip, los miARN son no obstante distintos.

Los miARN observados hasta la fecha han sido de aproximadamente 21-22 nucleótidos de longitud y surgen de precursores más largos, que se transcriben de genes no codificantes de proteínas. Véase la revisión de Carrington y col. (2003). Los precursores forman estructuras que se pliegan entre sí en regiones autocomplementarias; después se procesan por la nucleasa Dicer en animales o DCL1 en plantas. Las moléculas de miARN interrumpen la traducción mediante formación de pares de bases precisa o imprecisa con sus dianas.

Los miARN parecen estar implicados en la regulación génica. Algunos miARN, incluyendo *lin-4* y *let-7*, inhiben la síntesis proteica uniéndose con regiones no traducidas 3' parcialmente complementarias (3' UTR) de ARNm diana. Otros, incluyendo el miARN *Scarecrow* hallado en plantas, actúan como ARNip y se unen con secuencias de ARNm perfectamente complementarias para destruir el transcrito diana (Grishok y col., 2001).

La investigación sobre microARN está aumentando a medida que los científicos comienzan a apreciar el papel general que estas moléculas desempeñan en la regulación de la expresión génica eucariota. Los dos miARN mejor entendidos, *lin-4* y *let-7*, regulan la temporización del desarrollo en *C. elegans* regulando la traducción de una familia de ARNm clave (revisado en Pasquinelli, 2002). Se han identificado varios cientos de miARN en *C. elegans*, *Drosophila*, ratón y seres humanos. Como se esperaría para moléculas que regulan la expresión génica, se ha mostrado que los niveles de miARN varían entre tejidos y estados del desarrollo. Además, un estudio muestra una fuerte correlación entre la expresión reducida de dos miARN y la leucemia linfocítica crónica, proporcionando una posible conexión entre miARN y cáncer (Calin, 2002). Aunque el campo aún es joven, se especula que los miARN podrían ser tan importantes como los factores de transcripción en la regulación de la expresión génica en eucariotas superiores.

Hay algunos ejemplos de miARN que desempeñan papeles críticos en la diferenciación celular, desarrollo temprano y procesos celulares como apoptosis y metabolismo de grasas. *lin-4* y *let-7* regulan ambos el paso de un estado larvario a otro durante el desarrollo de *C. elegans* (Ambros, 2003). *Mir-14* y *bantam* son miARN de *Drosophila* que regulan la muerte celular, aparentemente regulando la expresión de genes implicados en la apoptosis (Brennecke y col., 2003; Xu y col., 2003). El miR14 también se ha implicado en el metabolismo de grasas (Xu y col., 2003). *Lsy-6* y *miR-273* son miARN de *C. elegans* que regulan la simetría en neuronas quimiosensoriales (Chang y col., 2004). Otro miARN animal que regula la diferenciación celular es miR-181, que guía la diferenciación de células hematopoyéticas (Chen y col., 2004). Estas moléculas representan la serie completa de miARN animales con funciones conocidas. Además, el documento WO 03/029459 desvela el miARN miR-C14. El entendimiento potenciado de las funciones de miARN revelará sin duda redes reguladoras que contribuyan al desarrollo normal, diferenciación, comunicación inter e intracelular, ciclo celular, angiogénesis, apoptosis y muchos otros procesos celulares. Dados sus papeles importantes en muchas funciones biológicas, es probable que los miARN ofrezcan puntos importantes para intervención terapéutica o análisis de diagnóstico.

Caracterizar las funciones de biomoléculas como miARN implica con frecuencia introducir las moléculas en células o retirar las moléculas de células y medir el resultado. Si la introducción de un miARN en células da como resultado apoptosis, entonces el miARN participa sin duda en una ruta apoptótica. Se han descrito procedimientos para introducir o retirar miARN de células. Dos publicaciones recientes describen moléculas antisentido que pueden usarse para inhibir la actividad de miARN específicos (Meister y col., 2004; Hutvagner y col., 2004). Otra publicación describe el uso de plásmidos que se transcriben por ARN polimerasas endógenas y producen miARN específicos cuando se usan para transfectar células (Zeng y col., 2002). Estos dos conjuntos de reactivos se han usado para evaluar miARN individuales.

Una limitación del sistema de expresión de miARN basado en plásmidos es que las eficacias de transfección para plásmidos tienden a ser muy bajas, expresando solamente aproximadamente el 50 % de las células ARN del

plásmido en células que son fáciles de transfectar. Las eficacias de transfección para plásmidos en células primarias son mucho más bajas, expresando menos del 10 % de las células típicamente el ARN deseado. Por lo tanto, existe la necesidad de composiciones y procedimientos alternativos para introducir moléculas de miARN en células de modo que puedan caracterizarse y estudiarse.

## 5 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico de miARN sintética que comprende una secuencia con al menos 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de miR-192 humana madura para su uso en una terapia de un cáncer. También se proporciona un ácido nucleico de miARN sintético bicatenario de 17-30 nucleótidos de longitud que comprende un polinucleótido que tiene una secuencia con al menos 80 % de identidad de secuencia con una secuencia de miR-192 madura que comprende los nucleótidos 24-44 de SEC ID N°: 137, y un segundo polinucleótido separado cuya secuencia de 5' a 3' es entre 60 % y 100 % complementaria del primer polinucleótido para su uso como un medicamento.

También se proporciona el uso de un ácido nucleico de miARN sintético como se ha mencionado anteriormente para reducir o aumentar la viabilidad celular o proliferación celular o para inducir la apoptosis, a condición de que se excluyan procedimientos para el tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia. Se definen realizaciones adicionales de la invención en las reivindicaciones. La siguiente descripción detallada se refiere a la presente invención en la medida del alcance de las reivindicaciones.

El término "miARN" se usa de acuerdo con su significado habitual y corriente y se refiere a una molécula de microARN hallada en eucariotas que está implicada en la regulación génica basada en ARN. Véase, por ejemplo, Carrington y col., 2003, que se incorpora por la presente por referencia. En general, el término se usará para hacer referencia a la molécula de ARN monocatenaria procesada a partir de un precursor. Se han identificado miARN individuales y se han secuenciado en diferentes organismos, y se les han dado nombres. Se proporcionan en el presente documento nombres de miARN y sus secuencias.

La presente invención se refiere, en algunas realizaciones de la invención, a moléculas de ácido nucleico cortas que actúan como miARN o como inhibidores de miARN en una célula. El término "corto" se refiere a una longitud de un único polinucleótido que es de 150 nucleótidos o menos. Las moléculas de ácido nucleico son sintéticas. El término "sintético" significa que la molécula de ácido nucleico está aislada y no es idéntica en su secuencia (la secuencia completa) y/o estructura química a una molécula de ácido nucleico de origen natural, tal como una molécula de miARN precursora endógena. Aunque en algunas realizaciones, los ácidos nucleicos de la invención no tienen una secuencia completa que es idéntica a una secuencia de un ácido nucleico de origen natural, dichas moléculas pueden abarcar toda o parte de una secuencia de origen natural. Se contempla, sin embargo, que puede posteriormente modificarse o alterarse un ácido nucleico sintético administrado a una célula en la célula de modo que su estructura o secuencia sea la misma que la del ácido nucleico no sintético o de origen natural, tal como una secuencia de miARN madura. Por ejemplo, un ácido nucleico sintético puede tener una secuencia que difiere de la secuencia de un miARN precursor, pero esa secuencia puede alterarse una vez en una célula para ser igual que un miARN endógeno, procesado. El término "aislado" significa que las moléculas de ácido nucleico de la invención se separan inicialmente de moléculas de ácido nucleico diferentes (con respecto a secuencia o estructura) y no deseadas de modo que una población de ácidos nucleicos aislados sea al menos aproximadamente 90 % homogénea, y pueden ser al menos aproximadamente 95, 96, 97, 98, 99 o 100 % homogéneas con respecto a otras moléculas polinucleotídicas. En muchas realizaciones de la invención, un ácido nucleico se aísla en virtud de haberse sintetizado *in vitro* separado de ácidos nucleicos endógenos en una célula. Se entenderá, sin embargo, que los ácidos nucleicos aislados pueden posteriormente mezclarse o agruparse entre sí.

Por supuesto, se entiende que un "ácido nucleico sintético" de la invención significa que el ácido nucleico no tiene una estructura química o secuencia de un ácido nucleico de origen natural. En consecuencia, se entenderá que la expresión "miARN sintético" se refiere a un "ácido nucleico sintético" que actúa en una célula o en condiciones fisiológicas como un miARN de origen natural.

Se entenderá que la expresión "de origen natural" se refiere a algo hallado en un organismo sin ninguna intervención por una persona; podría referirse a una molécula de origen natural de tipo silvestre o mutante. En algunas realizaciones una molécula de miARN sintética no tiene la secuencia de una molécula de miARN de origen natural. En otras realizaciones, una molécula de miARN sintética puede tener la secuencia de una molécula de miARN de origen natural, pero la estructura química de la molécula, particularmente en la parte no relacionada específicamente con la secuencia precisa (estructura química no de secuencia) difiere de la estructura química de la molécula de miARN de origen natural con esa secuencia. En algunos casos, el miARN sintético tiene una estructura química tanto de secuencia como no de secuencia que no se encuentra en un miARN de origen natural. Además, la secuencia de las moléculas sintéticas identificará qué miARN se proporciona o inhibe eficazmente; el miARN endógeno se denominará "miARN correspondiente". Las secuencias de miARN correspondientes incluyen, pero sin limitación, las secuencias en SEC ID N°: 1-593. Además, los ácidos nucleicos sintéticos pueden incluir SEC ID N°: 594-703 así como cualquier otra secuencia de miARN, secuencia precursora de miARN o cualquier secuencia complementaria de la misma. En algunas realizaciones, la secuencia es o deriva de una secuencia sonda que se ha identificado en el apéndice que se dirige al miARN particular (o conjunto de miARN) que puede usarse con esa

secuencia sonda.

Los miARN sintéticos de la invención son ARN o análogos de ARN en algunas realizaciones de la invención. Los inhibidores de miARN pueden ser ADN o ARN, o análogos de los mismos. Los miARN e inhibidores de miARN se denominan colectivamente “ácidos nucleicos sintéticos”.

- 5 En algunas realizaciones, hay un miARN sintético que tiene una longitud de entre 17 y 25 restos. La presente invención se refiere a moléculas de miARN sintéticas que son de, son al menos de, o son como máximo de 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124 o 125 restos de longitud, o cualquier intervalo derivable en el mismo.

- 15 En ciertas realizaciones, los miARN sintéticos tienen a) una “región de miARN” cuya secuencia de 5' a 3' es idéntica a una secuencia de miARN madura, y b) una “región complementaria” cuya secuencia de 5' a 3' es entre 60 % y 100 % complementaria de la secuencia de miARN. En ciertas realizaciones, estos miARN sintéticos también están aislados, como se ha definido anteriormente. La expresión “región de miARN” se refiere a una región en el miARN sintético que es al menos 80 % idéntica a la secuencia completa de una secuencia de miARN madura, de origen natural. En ciertas realizaciones, la región de miARN es o es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9 o 100 % idéntica a la secuencia de un miARN de origen natural.

- 20 La expresión “región complementaria” se refiere a una región de un miARN sintético que es o es al menos 60 % complementaria de la secuencia de miARN madura, de origen natural a la que es idéntica la región de miARN. La región complementaria es o es al menos 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9 o 100 % complementaria, o cualquier intervalo derivable del mismo. Con secuencias polinucleotídicas individuales, hay una estructura de bucle en horquilla como resultado del enlace químico entre la región de miARN y la región complementaria. En otras realizaciones, la región complementaria está en una molécula de ácido nucleico diferente que la región de miARN, en cuyo caso la región complementaria está en la cadena complementaria y la región de miARN está en la cadena activa.

- 30 En algunas realizaciones de la invención, un miARN sintético contiene uno o más elementos de diseño. Estos elementos de diseño incluyen, pero sin limitación: i) un grupo de reemplazo para el fosfato o hidroxilo del nucleótido en el extremo 5' de la región complementaria; ii) una o más modificaciones de azúcares en los primeros o últimos 1 a 6 restos de la región complementaria; o iii) no complementariedad entre uno o más nucleótidos en los últimos 1 a 5 restos en el extremo 3' de la región complementaria y los nucleótidos correspondientes de la región de miARN.

- 35 En ciertas realizaciones, un miARN sintético tiene un nucleótido en su extremo 5' de la región complementaria en el que el grupo fosfato y/o hidroxilo se ha reemplazado con otro grupo químico (denominado “diseño de reemplazo”). En algunos casos, el grupo de fosfato se reemplaza, mientras que en otros, se ha reemplazado el grupo hidroxilo. En realizaciones particulares, el grupo de reemplazo es biotina, un grupo amina, un grupo de alquilamina inferior, un grupo acetilo, 2'O-Me (2'oxígeno-metilo), DMT0 (4,4'-dimetoxitritilo con oxígeno), fluoresceína, un tiol, o acridina, aunque se conocen bien otros grupos de reemplazo por los expertos en la materia y también pueden usarse. Este elemento de diseño también puede usarse con un inhibidor de miARN.

- 40 Realizaciones adicionales se refieren a un miARN sintético que tiene una o más modificaciones de azúcares en los primeros o últimos 1 a 6 restos de la región complementaria (denominado el “diseño de reemplazo de azúcares”). En ciertos casos, hay una o más modificaciones de azúcares en los primeros 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más restos de la región complementaria, o cualquier intervalo derivable del mismo. En casos adicionales, hay una o más modificaciones de azúcares en los 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más restos de la región complementaria, o cualquier intervalo derivable del mismo, 45 tienen una modificación de azúcar. Se entenderá que los términos “primero” y “último” son con respecto al orden de los restos del extremo 5' al extremo 3' de la región. En realizaciones particulares, la modificación de azúcares es una modificación de 2'O-Me. En realizaciones adicionales, hay una o más modificaciones de azúcares en los primeros o últimos 2 a 4 restos de la región complementaria o los primeros o últimos 4 a 6 restos de la región complementaria. Este elemento de diseño también puede usarse con un inhibidor de miARN. Por lo tanto, un inhibidor de miARN 50 puede tener este elemento de diseño y/o un grupo de reemplazo en el nucleótido en el extremo 5', como se ha analizado anteriormente.

- 55 En otras realizaciones de la invención, hay un miARN sintético en el que uno o más nucleótidos en los últimos 1 a 5 restos en el extremo 3' de la región complementaria no son complementarios de los nucleótidos correspondientes de la región de miARN (“no complementariedad”) (denominado el “diseño de no complementariedad”). La no complementariedad puede estar en los últimos 1, 2, 3, 4 y/o 5 restos del miARN complementario. En ciertas realizaciones, hay no complementariedad con al menos 2 nucleótidos en la región complementaria.

Se contempla que el miARN sintético de la invención tiene uno o más de los diseños de reemplazo, modificación de azúcares o no complementariedad. En ciertos casos, las moléculas de ARN sintéticas tienen dos de ellos, mientras

que en otros estas moléculas tienen situados los tres diseños.

La región de miARN y la región complementaria pueden estar en el mismo polinucleótido o polinucleótidos separados. En casos en los que estén contenidos sobre o en el mismo polinucleótido, la molécula de miARN se considerará un polinucleótido individual. En realizaciones en las que las diferentes regiones estén en polinucleótidos separados, se considerará que el miARN sintético está comprendido por dos polinucleótidos.

Cuando la molécula de ARN es un único polinucleótido, hay una región enlazadora entre la región de miARN y la región complementaria. En algunas realizaciones, el polinucleótido individual es capaz de formar una estructura de bucle en horquilla como resultado del enlace entre la región de miARN y la región complementaria. El enlazador constituye el bucle en horquilla. Se contempla que en algunas realizaciones, la región de engarce es, es al menos, o es como máximo de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 restos de longitud, o cualquier intervalo derivable del mismo. En ciertas realizaciones, el engarce es de entre 3 y 30 restos (inclusive) de longitud.

Además de tener una región de miARN y una región complementaria, puede haber secuencias flanqueantes también en el extremo 5' o 3' de la región. En algunas realizaciones, hay o hay al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 nucleótidos o más, o cualquier intervalo derivable del mismo, flanqueando uno o ambos extremos de estas regiones.

Los ácidos nucleicos sintéticos analizados anteriormente y en el presente documento pueden usarse en procedimientos de la invención. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, los procedimientos implican ácidos nucleicos sintéticos con los diferentes diseños en ellos.

Las características de las células que pueden evaluarse no están limitadas. Incluyen las siguientes características y características asociadas con lo siguiente: proliferación celular, índice mitótico, ciclo celular, apoptosis, motilidad, adhesión, transducción de señal, localización proteica, expresión génica, localización de ARN, división celular, replicación de ADN, modificación postraduccional, diferenciación, desdiferenciación, activación de la transcripción, activación de proteínas, angiogénesis, metabolismo (producción y/o consumo de energía), degradación de proteínas, condensación de cromatina, producción de microtúbulos, replicación de ADN, recombinación y funciones de reparación de ADN. Se contempla que estas características pueden ser relevantes globalmente para la célula (por ejemplo, producción de proteína general reducida) o para especies individuales en la célula (por ejemplo, inducción de una proteína o proteínas específicas).

Se contempla que este procedimiento puede aplicarse con respecto a una diversidad de diferentes miARN sintéticos y/o no sintéticos en células separadas o en las mismas. En algunos casos, pueden introducirse los siguientes números de moléculas de miARN sintéticas diferentes en diferentes células: 2, 3 o más. La invención no está limitada por el tipo celular. Se contempla que cualquier célula que exprese miARN o cualquier célula que tenga una característica alterada por un miARN es susceptible para los procedimientos y composiciones de la invención. El uso de dos o más miARN puede combinarse en una única composición farmacéutica como un cóctel o puede proporcionarse para su uso en cualquier procedimiento terapéutico, de diagnóstico o de pronóstico de la invención. En algunas realizaciones de la invención, los procedimientos incluyen ensayar la célula con respecto a la presencia del miARN que se introduce eficazmente por la molécula de miARN sintética o se inhibe por un inhibidor de miARN. En consecuencia, en algunas realizaciones, los procedimientos incluyen una etapa de generar un perfil de miARN para una muestra. La expresión "perfil de miARN" se refiere a un conjunto de datos con respecto al patrón de expresión para una pluralidad de miARN en la muestra; se contempla que el perfil de miARN puede obtenerse usando una matriz de miARN. En algunas realizaciones de la invención, se genera un perfil de miARN por etapas que incluyen: a) marcar miARN en la muestra; b) hibridar el miARN con una matriz de miARN; y c) determinar la hibridación de miARN con la matriz, en las que se genera un perfil de miARN. Véase Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos 60/575.743 y la Solicitud de Patente Provisional de Estados Unidos 60/649.584 y la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 11/141.707.

Adicionalmente, una célula en la que se introduce un miARN sintético o un inhibidor de miARN puede evaluarse o ensayarse posteriormente con respecto a la cantidad de miARN o inhibidor de miARN endógeno o exógeno. Se contempla cualquier tipo celular para su uso con la invención. La célula puede ser de o estar en un mamífero, tal como un mono, caballo, vaca, cerdo, oveja, perro, gato, conejo, ratón, rata o ser humano.

En otros procedimientos de la invención, se incluye una etapa para sintetizar u obtener la molécula de ARN sintética.

En realizaciones adicionales, el ácido nucleico sintético se introduce en la célula por transfección con fosfato cálcico, transfección de lípidos, electroporación, microinyección o inyección. Los ácidos nucleicos sintéticos pueden ser para administración a un sujeto o paciente usando modos de administración que se conocen bien por los expertos en la materia, particularmente para aplicaciones terapéuticas. Se contempla particularmente que un paciente es ser humano o cualquier otro mamífero o animal que tenga miARN.

Los procedimientos incluyen identificar una célula o un paciente que necesite la inducción de esas características celulares. Además, se entenderá que una cantidad de un ácido nucleico sintético que se proporciona a una célula u organismo es una "cantidad eficaz", lo que se refiere a una cantidad necesaria para conseguir un objetivo deseado, tal como inducir una característica o características celulares particulares.

En ciertas realizaciones, los procedimientos incluyen proporcionar o introducir a una célula una molécula de ácido nucleico correspondiente a un miARN maduro en la célula en una cantidad eficaz para conseguir un resultado fisiológico deseado. Dichos procedimientos se desvelan en el presente documento.

En otras realizaciones, los procedimientos implican reducir la viabilidad celular, inducir la apoptosis en una célula, o reducir la proliferación celular, a condición de que se excluyan los procedimientos para el tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia, que comprende introducir en o proporcionar a la célula una cantidad eficaz de una molécula de miARN sintética que corresponde a miR-192. La presente invención también se refiere a un procedimiento para inducir la apoptosis en una célula, a condición de que el procedimiento para el tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia se excluyan, que comprende introducir en o proporcionar a la célula una cantidad eficaz de una molécula de miARN sintético miR-192.

La presente invención también se refiere a usar composiciones de miARN que implican miR-192 para su uso en el tratamiento de cáncer, incluyendo cáncer de pulmón, cáncer de cuello uterino, cáncer de próstata, cáncer de piel o leucemia. También se contemplan uno o más miARN humanos adicionales seleccionados del grupo que consiste en let-7, miR-10a, miR-15a, miR-16, miR-17, miR-21, miR-22, miR-23, miR-24, miR-26a, miR-29b, miR-30a, miR-96, miR-101, miR-105, miR-106, miR-124, miR-125a, miR-126, miR-130, miR-130a, miR-133, miR-142, miR-143, miR-144, miR-145, miR-147, miR-181a, miR-182, miR-183, miR-188, miR-189, miR-194, miR-195, miR-199a, miR-200b, miR-201, miR-205, miR-219, 206, miR-215, miR-219, miR-223, miR-224, miR-321, miR-328, miR-331, miR-342, miR-219 y miR-346. Se contempla que 1, 2, 3 o más miARN pueden usarse para estas realizaciones. El cáncer incluye, pero sin limitación, cánceres malignos, tumores, cánceres metastásicos, cánceres no resecables, cánceres resistentes a quimioterapia y/o radiación, y cánceres terminales.

Se entenderá que se emplean anotaciones abreviadas de modo que una descripción genérica de un miARN se refiere a cualquiera de los miembros de su familia génica (distinguidos por un número), a no ser que se indique de otro modo. Se entiende por los expertos en la materia que una "familia génica" se refiere a un grupo de genes que tienen la misma secuencia codificante de miARN. Típicamente, se identifican miembros de una familia génica por un número detrás de la designación inicial. Por ejemplo, miR-16-1 y miR-16-2 son miembros de la familia génica de miR-16 y "miR-7" se refiere a miR-7-1, miR-7-2 y miR-7-3. Además, a no ser que se indique de otro modo, una anotación abreviada se refiere a miARN relacionados (distinguidos por una letra). Por lo tanto, "let-7", por ejemplo, se refiere a let-7a-1, let-7a-2, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f-1 y let-7f-2. Las excepciones a estas anotaciones abreviadas se identificarán de otro modo.

La presente invención se refiere a un ácido nucleico de miARN para su uso en el tratamiento de cáncer de mama.

También se contemplan ácidos nucleicos de miARN sintéticos para su uso en terapia de cáncer de pulmón como parte de la invención. La presente invención se refiere a un ácido nucleico de miARN sintético para su uso en el tratamiento de cáncer de piel o reducción de la proliferación celular de células de cáncer de piel.

La presente invención también se refiere a un ácido nucleico de miARN para su uso en pacientes a los que se ha diagnosticado que tienen isquemia, los que están en riesgo de isquemia, los que se sospecha que tienen isquemia o pacientes con síntomas de isquemia. En ciertos experimentos, un miARN en el que las cadenas tanto con sentido como antisentido derivan de un único miARN precursor en procedimientos y composiciones de la invención. Estos se designan frecuentemente con un sufijo "P" en el que "5P" indica que el miARN maduro deriva del extremo 5' del precursor y un "3P" correspondiente indica que deriva del extremo 3' del precursor, como se describe en la web en [sanger.ac.uk/cgi-bin/rfam/miARN](http://sanger.ac.uk/cgi-bin/rfam/miARN). Además, en algunas realizaciones, se evaluó un miARN que no corresponde a un miARN humano conocido. Se contempla que estos miARN no humanos pueden usarse en realizaciones de la invención o que puede existir un miARN humano que sea homólogo del miARN no humano.

La expresión "reducir la viabilidad celular" significa reducir el número de células vivas

Pueden usarse en general procedimientos que se refieren a la viabilidad celular y la purificación celular para terapia, diagnóstico, crear líneas celulares con propiedades de investigación interesantes, e inducir la diferenciación. Pueden emplearse miARN que reducen selectivamente la proliferación de células cancerosas como productos terapéuticos ya que pueden suministrarse a células cancerosas y no cancerosas igualmente pero afectará solamente al crecimiento de las células cancerosas. Además, los ácidos nucleicos sintéticos pueden ser para detener o evitar la metástasis o reducir el número de metástasis.

Además, se contempla en particular que una molécula de ácido nucleico que puede procesarse en un miARN maduro cuando está dentro de la célula es un miARN sintético en algunas realizaciones de la invención.

Se contempla que una cantidad eficaz de un modulador de miARN puede ser para administración. En realizaciones particulares, se confiere un beneficio terapéutico a la materia biológica, en la que un "beneficio terapéutico" se refiere a una mejora en la o las afecciones o los síntomas asociados con una enfermedad o afección o una mejora del pronóstico, duración o estado con respecto a la enfermedad. Se contempla que un beneficio terapéutico incluye, pero sin limitación, una reducción del dolor, una reducción de la morbilidad, una reducción en un síntoma. Por ejemplo, con respecto al cáncer, se contempla que un beneficio terapéutico en cáncer puede ser la inhibición del crecimiento tumoral, prevención de metástasis, reducción del número de metástasis, inhibición de la proliferación de

células cancerosas, inhibición de la proliferación de células cancerosas, inducción de muerte celular en células cancerosas, inhibición de la angiogénesis cerca de células cancerosas, inducción de la apoptosis de células cancerosas, reducción del dolor, reducción del riesgo de reaparición, inducción de la quimio o radiosensibilidad en células cancerosas, prolongación de la vida y/o retardo de la muerte directa o indirectamente relacionada con el cáncer.

Además, se contempla que las composiciones de miARN pueden proporcionarse para su uso como parte de una terapia a un paciente, junto con terapias tradicionales o agentes preventivos. Además, se contempla que puede aplicarse cualquier procedimiento analizado en el contexto de la terapia de forma preventiva, particularmente en un paciente que se ha identificado que puede necesitar potencialmente la terapia o tiene riesgo para la afección o enfermedad para la que se necesita la terapia.

Las terapias de cáncer también incluyen una diversidad de terapias de combinación con tratamientos basados tanto en productos químicos como en radiación. Las quimioterapias de combinación incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, bevacizumab, cisplatino (CDDP), carboplatino, inhibidores de EGFR (gefitinib y cetuximab), procarbina, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, inhibidores de COX-2 (por ejemplo, celecoxib) ifosfamida, melfalán, clorambucilo, busulfán, nitrosurea, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina (adriamicina), bleomicina, plicomicina, mitomicina, etopósido (VP16), tamoxifeno, raloxifeno, agentes de unión al receptor de estrógenos, taxol, taxotere, gemcitabina, navelbina, inhibidores de farnesil proteína transferasa, transplatino, 5-fluorouracilo, vincristina, vinblastina y metotrexato, o cualquier variante análoga o derivada de lo anterior.

En general, pueden proporcionarse inhibidores de miARN para conseguir el efecto opuesto en comparación con cuando se proporcionan moléculas de ácido nucleico correspondientes al miARN maduro. De forma similar, pueden proporcionarse moléculas de ácido nucleico correspondientes al miARN maduro para conseguir el efecto opuesto en comparación con cuando se proporcionan inhibidores del miARN. Por ejemplo, pueden proporcionarse moléculas de miARN que aumentan la proliferación celular a células para aumentar la proliferación o pueden proporcionarse inhibidores de dichas moléculas a células para reducir la proliferación celular. En toda la presente solicitud, el término “aproximadamente” se usa para indicar que un valor incluye la desviación típica del error para el dispositivo o procedimiento que se emplea para determinar el valor.

El uso de la palabra “un/una” cuando se usa junto con la expresión “que comprende” en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva puede significar “uno/una”, pero también es coherente con el significado de “uno/una o más”, “al menos uno/una” y “uno/una o más de uno/una”.

### **Breve descripción de los dibujos**

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar adicionalmente ciertos aspectos de la presente invención. La invención puede entenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en el presente documento.

**FIGURA 1 Visión de conjunto de la expresión y activación de miARN.** Se transcriben miARN como parte de moléculas de ARN más largas que pueden ser de hasta mil nucleótidos (Lee, 2002). Los ARN se procesan en el núcleo en ARN en horquilla de 70-100 nucleótidos por la ribonucleasa específica de ARNbc Drosha (Lee 2003) (FIGURA 1). Los ARN en horquilla se transportan al citoplasma y se digieren por una segunda ribonucleasa específica de doble cadena denominada Dicer. El miARN 19-23 unidades resultante se une con un complejo que es similar a o idéntico al Complejo Silenciador Inducido por ARN (RISC) que participa en la interferencia de ARN (Hutvagner, 2002). El miARN monocatenario, unido a un complejo, se une con ARNm con secuencias que son significativamente, aunque no completamente, complementarias del miARN. Por un mecanismo que no se entiende completamente, pero que no implica la degradación de ARNm, el ARNm unido no se traduce, dando como resultado la expresión reducida del gen correspondiente.

**FIGURA 2. Procedimientos para introducir miARN en células.** Hay tres procedimientos básicos para introducir miARN en células. En el primero, se introduce un ADN que porta un promotor cadena arriba de una secuencia que codifica un miARN en células en las que se transcribe para producir una molécula de ARN que incluye el miARN maduro. El procesamiento y captación por el complejo proteico para regulación génica inducida por miARN da como resultado la activación del miARN. Este procedimiento adolece de introducción ineficaz de la construcción de ADN en células. En el segundo procedimiento, una molécula de ARNbc de tipo ARNip, una de cuyas cadenas es idéntica a un miARN activo, se introduce en células en las que se capta por el complejo proteico para la activación de miARN. Este procedimiento proporciona un suministro eficaz, pero con frecuencia captación de la molécula de ARN complementaria no pretendida. El tercer procedimiento, descrito en el presente documento, implica modificar la cadena complementaria para favorecer la captación y activación de la cadena activa de la construcción de miARN sintética.

**FIGURA 3. Captación preferente de cadenas activas en miARN sintéticos de la invención.** Vectores indicadores con luciferasa bajo el control de sitios diana para miR-33 o let-7 o las cadenas complementarias de los ARNip anteriormente mencionados. La cotransfección de miARN sintéticos y vectores indicadores seguido de ensayo de luciferasa 24 horas después de la transfección reveló miARN que se activan después de la transfección.

**FIGURA 4. Actividad de miARN sintético para diversos miARN.** Se prepararon miARN sintéticos con diseño de ARNip y Pre-miR (5'amina) y se transfectaron en células HeLa a una concentración final de 3 y 10 nM. Los miARN sintéticos se cotransfectaron con vectores indicadores que portaban sitios diana para los miARN maduros. La expresión del indicador de luciferasa en células cotransfectadas se midió veinticuatro horas después de la transfección y se expresó en la figura como la expresión de indicador en relación con células cotransfectadas con miARN sintéticos de control negativo.

**FIGURA 5. Actividad de miARN sintético entre tipos celulares y contra dianas naturales.** Se ensayaron miARN sintéticos con respecto a activación de cadena apropiada y especificidad de tipo celular para asegurar que el diseño es robusto. Se cotransfectaron cuatro tipos celulares diferentes con miARN sintético y activación de cadena asociada activa y complementaria. El panel A muestra que diferentes tipos celulares responden de forma similar a miARN sintéticos. Después se transfectaron cuatro miARN sintéticos diferentes en diversos tipos celulares y se midieron los niveles de expresión de dianas naturales de los miARN (Panel B).

**FIGURA 6. Esquemática para cribado con bibliotecas de miARN sintéticos o inhibidores de miARN.** Se distribuyen miARN sintéticos y/o inhibidores de miARN en pocillos de una placa de microtitulación. Se añade reactivo de transfección y después células a cada pocillo. En algún momento después de la transfección, se evalúan las muestras con respecto a un fenotipo. Los miARN que inducen un cambio que es significativo en relación con un control negativo se seleccionan para estudio adicional.

**FIGURA 7. Criba con respecto a miARN que afectan a la proliferación celular.** En placas de 96 pocillos, se transfectaron de forma inversa 8.000 células HeLa con inhibidores de miARN (5 pmoles) por triplicado usando Ambion siPORT Neo-FX. 72 horas después de la transfección, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 %, se permeabilizaron con TritonX 100 al 0,1 % y se tiñeron con yoduro de propidio para observar el número de células totales. Las placas se exploraron usando el Explorador Acumen TTP labtech. La morfología cambia en las células inhibidas por miR-31. Las células HeLa se transfectaron con Anti-mir31 y las células se fijaron y se tiñeron con anticuerpo anti-beta actina y DAPI para visualizar cambios de la morfología celular en respuesta a inhibición de la función de micro ARN mir-31.

**FIGURA 8. Criba con respecto a miARN que afectan a la proliferación celular en células A549.** Criba con respecto a miARN implicado en la viabilidad celular en células A549. En placas de 96 pocillos, se transfectaron de forma inversa 8.000 células A549 con inhibidores de miARN (5 pmoles) por triplicado usando Ambion siPORT Neo-FX. 72 horas después de la transfección las células se tripsinizaron y se contaron usando el instrumento de recuento celular Guava. El número de células se representó gráficamente y se normalizó para un inhibidor de huecos. En esta figura, "mir1d" se refiere a mir-1-2.

**FIGURA 9. Criba con respecto a miARN que afectan a la apoptosis en células HeLa.** Efectos de los inhibidores de miARN en la actividad caspasa en HeLa. En placas de 96 pocillos, se transfectaron de forma inversa 8.000 células HeLa con inhibidores de miARN (5 pmoles) por triplicado usando Ambion siPORT Neo-FX. 72 horas después de la transfección las células se analizaron usando ensayo de actividad caspasa y se normalizaron basándose en el ensayo de actividad esterasa. En esta figura, "mird" se refiere a mir-1-2.

**FIGURA 10. Expresión de miARN en pacientes con cáncer de pulmón y colon.** Los perfiles de expresión de miARN de tumor frente a tejidos adyacentes normales se compararon para pacientes con cáncer de pulmón y colon. Los miARN se proporcionan en filas; los pacientes se presentan en columnas. El color verde en el mapa de calor muestra miARN que se regulan negativamente en la muestra tumoral en relación con la muestra tisular adyacente normal, y el rojo muestra miARN que se regulan positivamente en la muestra tumoral en relación con la muestra tisular adyacente normal.

**FIGURA 11. Validación de los resultados de expresión de matrices de miARN en pacientes con cáncer de pulmón.** Se analizaron muestras de ARN totales de dos pacientes con cáncer de pulmón con respecto a la expresión de miR-16, miR-21, miR-143, miR-145 y let-7 usando análisis de Northern. Los gráficos muestran la abundancia relativa de cada miARN (relación de tumor:NAT) del análisis de matrices y análisis de phosphorimager de Northern.

**FIGURA 12. Algunos miARN se expresan diferencialmente en múltiples tipos de cáncer.** Se usó análisis de matrices de miARN que comparaban tejidos tumorales y adyacentes normales de pacientes con diversos tipos de cáncer para identificar miARN que se expresan diferencialmente en cáncer. El porcentaje de pacientes que muestran regulación positiva o negativa de un miARN dado se calculó para cada tipo de cáncer. Se presentan los ocho que se expresaban diferencialmente con más frecuencia entre tipos de muestras.

**FIGURA 13.** Se muestran miARN que tienen cambios de expresión mayores de 1,5 veces tanto entre infectados frente a no infectados como entre sensibles frente a insensibles. A la derecha hay un grupo de los resultados de 2 matrices de cada modelo.

**FIGURA 14. miARN expresados diferencialmente en 3 ratones precondicionados en relación con ratones no tratados.**

**FIGURA 15A-C. miARN sintéticos que reducen la proliferación celular.** **A.** Se evaluaron células BT549 y MCF12A (mama), HeLa (cuello uterino) y 22 Rv1 (próstata) con respecto a proliferación celular. **B.** Se examinaron células TE354T y TE353SK (piel), BJ (piel) y A549 (pulmón) con respecto a proliferación celular. **C.** Se evaluaron células CRL5826 y HTB-57 (pulmón), Jurkats (linfocitos T) y linfocitos T primarios con respecto a proliferación celular.

**FIGURA 16. miARN sintéticos que aumentan la proliferación celular.** Se evaluaron células HeLa (cuello uterino), 22 Rv1 (próstata), TE354T y TE353SK (piel), BJ (piel), A549 (pulmón), Jurkats (linfocitos T), linfocitos T primarios, CRL5826 y HTB-57 (pulmón) con respecto a proliferación celular.

**FIGURA 17. Inhibidores de miARN que reducen la proliferación celular.** Se evaluaron células 22 Rv1

(próstata), TE354T (piel), MCF12a (mama) y A549 (pulmón) con respecto a proliferación celular.

**FIGURA 18. Inhibidores de miARN que reducen la proliferación celular.** Se evaluaron células 22 Rv1 (próstata), TE354T (piel), MCF12a (mama) y A549 (pulmón) con respecto a proliferación celular.

**FIGURA 19. miARN que afectan a la viabilidad celular.** Se evaluaron células Jurkats (linfocitos T), linfocitos T primarios, HeLa (cuello uterino) y A549 (pulmón) con respecto a aumentos y reducciones de la viabilidad celular.

**FIGURA 20. miARN que afectan a la apoptosis.** Se evaluaron células 22 Rv1 (próstata), TE354T (piel), Jurkats (linfocitos T) y HeLa (cuello uterino) con respecto a aumentos y reducciones de la apoptosis.

**FIGURA 21. miARN que afectan a la viabilidad celular en presencia de un producto terapéutico.** Se evaluaron células A549 (pulmón) con respecto a aumentos y reducciones de la viabilidad celular en presencia y ausencia de TRAIL o etopósido. Se evaluaron células HTB-57 y CRL5826 (pulmón) y HeLa (cuello uterino) con respecto a una reducción de la viabilidad celular en ausencia y presencia de etopósido.

**FIGURA 22. miARN que afectan al ciclo celular.** Se evaluaron células BJ (piel) y HeLa (cuello uterino) con respecto a aumentos o reducciones del número de células en ciertas fases del ciclo celular (G1, S, G2/M, replicación de ADN).

**FIGURA 23. Fenotipos de miARN con secuencias similares.** Comparación de secuencias relacionadas y sus efectos en la proliferación celular.

**FIGURA 24. Genes asociados con la regulación de hTert y secuencias de miARN que se ha predicho que modulan su expresión.**

### Descripción de realizaciones ilustrativas

La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos que se refieren a la preparación y caracterización de miARN, así como el uso de miARN para aplicaciones terapéuticas, de pronóstico y de diagnóstico. Para superar el problema con sistemas basados en plásmidos ineficaces previos para introducir miARN en células, los inventores desarrollaron ARN pequeños, parcialmente bicatenarios que pueden suministrarse con alta eficacia a células tanto inmortalizadas como primarias. Los ARN pequeños tienen las mismas actividades funcionales que los miARN expresados de forma endógena. Debido a que los ARN pequeños pueden suministrarse a las células con mucha mayor eficacia que los plásmidos, inducen un fenotipo mucho más fuerte que es más fácil de detectar y cuantificar, haciendo posible identificar muchas de las funciones de los miARN en células.

Los inventores también han creado una biblioteca de las moléculas de ARN bicatenarias, pequeñas, que pueden usarse para introducir miARN en células, así como una biblioteca de moléculas antisentido que inhiben las actividades de miARN conocidos que están presentes en células. Estas bibliotecas se han usado para regular positiva o negativamente de forma secuencial uno o más miARN en células para identificar los miARN que son críticos para procesos celulares como ciclo celular, apoptosis, diferenciación, viabilidad, angiogénesis, metabolismo y otros procesos con potencial terapéutico. También se están identificando y caracterizando miARN que regulan la expresión de genes importantes como p53, MYC y RAS para determinar adicionalmente miARN que podrían proporcionar puntos de intervención importantes para el tratamiento de la enfermedad. Por ejemplo, se ha mostrado que let-7 está implicado en RAS. Véase Johnson y col., 2005. Estos procedimientos de modulación en serie de las actividades de miARN y ensayo con respecto a fenotipos celulares se denominan colectivamente cribado funcional de miARN.

### **I. Moléculas de miARN**

Las moléculas de microARN ("miARN") son generalmente de 21 a 22 nucleótidos de longitud, aunque se han indicado longitudes de 17 y hasta 25 nucleótidos. Los miARN se procesan cada uno a partir de una molécula de ARN precursora más larga ("miARN precursor"). Los miARN precursores se transcriben de genes no codificantes de proteínas. Los miARN precursores tienen dos regiones de complementariedad que les permiten formar una estructura de tipo tallo-bucle o plegada hacia atrás, que se escinde por una enzima denominada Dicer en animales. Dicer es una nucleasa de tipo ribonucleasa III. El miARN procesado es típicamente una parte del tallo.

El miARN procesado (también denominado "miARN maduro") se convierte en parte de un complejo grande para regular negativamente un gen diana particular. Los ejemplos de miARN animales incluyen los que forman pares de bases de forma imperfecta con la diana, lo que detiene la traducción (Olsen y col., 1999; Seggerson y col., 2002). También se procesan moléculas de ARNip por Dicer, pero a partir de una molécula de ARN bicatenaria, larga. Los ARNip no se encuentran de forma natural en células animales, pero pueden actuar en dichas células en un complejo silenciador inducido por ARN (RISC) para dirigir la escisión específica de secuencia de una diana de ARNm (Denli y col., 2003).

El estudio de moléculas de miARN endógeno se describe, por ejemplo, en la Solicitud de Patente de Estados Unidos 60/575.743.

### miARN sintéticos

Los miARN están aparentemente activos en la célula cuando el ARN monocatenario maduro se une con un complejo proteico que regula la traducción de ARNm que hibridan con el miARN. La introducción de moléculas de ARN exógeno que afectan a las células de la misma manera que los miARN expresados de forma endógena requiere que

se capte una molécula de ARN monocatenaria de la misma secuencia que el miARN maduro endógeno por el complejo proteico que facilita el control de la traducción. Se ha evaluado una diversidad de diseños de moléculas de ARN. Se han identificado tres diseños generales que maximizan la captación del miARN monocatenario deseado por la ruta de miARN. Una molécula de ARN con una secuencia de miARN que tiene al menos uno de los tres diseños se denomina miARN sintético.

Los miARN sintéticos de la invención comprenden, en algunas realizaciones, dos moléculas de ARN en las que un ARN es idéntico a un miARN maduro, de origen natural. La molécula de ARN que es idéntica a un miARN maduro se denomina la cadena activa. La segunda molécula de ARN, denominada cadena complementaria, es al menos parcialmente complementaria de la cadena activa. Las cadenas activa y complementaria se hibridan para crear un ARN bicatenario, denominado miARN sintético, que es similar al precursor de miARN de origen natural que se une con el complejo proteico inmediatamente antes de la activación de miARN en la célula. La maximización de la actividad del miARN sintético requiere la maximización de la captación de la cadena activa y minimización de la captación de la cadena complementaria por el complejo proteico de miARN que regula la expresión génica al nivel de la traducción. Los diseños moleculares que proporcionan actividad de miARN óptima implican modificaciones de la cadena complementaria.

Dos diseños incorporan modificaciones químicas en la cadena complementaria. La primera modificación implica crear un ARN complementario con un grupo químico distinto de un fosfato o hidroxilo en su extremo 5' terminal. La presencia de la modificación 5' elimina aparentemente la captación de la cadena complementaria y favorece posteriormente la captación de la cadena activa por el complejo proteico de miARN. La modificación 5' puede ser cualquiera de una diversidad de moléculas incluyendo NH<sub>2</sub>, NHCOCH<sub>3</sub>, biotina y otras.

La segunda estrategia de modificación química que reduce significativamente la captación de la cadena complementaria por la ruta de miARN es incorporar nucleótidos con modificaciones de azúcares en los primeros 2-6 nucleótidos de la cadena complementaria. Debería observarse que las modificaciones de azúcares coherentes con la segunda estrategia de diseño pueden acoplarse con modificaciones 5' terminales coherentes con la primera estrategia de diseño para potenciar adicionalmente las actividades de miARN sintético.

El tercer diseño de miARN sintético implica incorporar nucleótidos en el extremo 3' de la cadena complementaria que no son complementarios de la cadena activa. Los híbridos de los ARN activos y complementarios resultantes son muy estables en el extremo 3' de la cadena activa pero relativamente inestables en el extremo 5' de la cadena activa. Los estudios con ARNip indican que la estabilidad del híbrido 5' es un indicador clave de la captación de ARN para el complejo proteico que apoya la interferencia de ARN, que está al menos relacionada con la ruta de miARN en células. Los inventores han descubierto que el uso sensato de los desapareamientos en la cadena de ARN complementaria potencia significativamente la actividad del miARN sintético.

#### A. Ácidos nucleicos

Se describen moléculas de ácido nucleico que pueden introducir o inhibir miARN en células cultivadas. Los ácidos nucleicos pueden haberse producido en células o *in vitro* por enzimas purificadas aunque se producen preferentemente por síntesis química. Pueden estar en bruto o purificados. El término "miARN", a no ser que se indique de otro modo, se refiere al ARN procesado, después de haberse escindido de su precursor. La Tabla 1 indica qué SEC ID N° corresponde a la secuencia precursora particular de un miARN y qué secuencias dentro de la SEC IN N° corresponden a la secuencia madura. El nombre del miARN se abrevia con frecuencia y se indica sin el prefijo y se entenderá como tal, dependiendo del contexto. A no ser que se indique de otro modo, los miARN indicados en la solicitud son secuencias humanas identificadas como mir-X o let-X, en las que X es un número y/o letra.

Tabla 1

| Secuencias de miARN humanas |              |                                                  |
|-----------------------------|--------------|--------------------------------------------------|
| Nombre del miARN            | Precursor    | Secuencia Procesada en Relación con el Precursor |
| hsa-mir-1-2                 | SEC ID N°: 1 | 53-73                                            |
| hsa-mir-1-1                 | SEC ID N°: 2 | 46-66                                            |
| hsa-let-7a-1                | SEC ID N°: 3 | 6-27                                             |

(continuación)

| <b>Secuencias de miARN humanas</b> |                  |                                                         |
|------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>Nombre del miARN</b>            | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada en Relación con el Precursor</b> |
| hsa-let-7a-2                       | SEC ID N°: 4     | 5-26                                                    |
| hsa-let-7a-3                       | SEC ID N°: 5     | 4-25                                                    |
| hsa-let-7b                         | SEC ID N°: 6     | 6-27                                                    |
| hsa-let-7c                         | SEC ID N°: 7     | 11-32                                                   |
| hsa-let-7d                         | SEC ID N°: 8     | 8-28                                                    |
| hsa-let-7e                         | SEC ID N°: 9     | 8-28                                                    |
| hsa-let-7f-1                       | SEC ID N°: 10    | 7-28                                                    |
| hsa-let-7f-2                       | SEC ID N°: 11    | 8-29                                                    |
| hsa-mir-7-1                        | SEC ID N°: 12    | 24-44                                                   |
| hsa-mir-7-2                        | SEC ID N°: 13    | 32-52                                                   |
| hsa-mir-7-3                        | SEC ID N°: 14    | 31-51                                                   |
| hsa-let-7g                         | SEC ID N°: 15    | 5-25                                                    |
| hsa-let-7i                         | SEC ID N°: 16    | 6-24                                                    |
| hsa-mir-9-1                        | SEC ID N°: 17    | 16-38 y/o 56-76                                         |
| hsa-mir-9-2                        | SEC ID N°: 18    | 16-38 y/o 54-74                                         |
| hsa-mir-9-3                        | SEC ID N°: 19    | 16-38 y/o 56-76                                         |
| hsa-mir-10a                        | SEC ID N°: 20    | 22-44                                                   |
| hsa-mir-10b                        | SEC ID N°: 21    | 27-48                                                   |
| hsa-mir-15a                        | SEC ID N°: 22    | 14-35                                                   |
| hsa-mir-15b                        | SEC ID N°: 23    | 20-41                                                   |
| hsa-mir-16-1                       | SEC ID N°: 24    | 14-35                                                   |
| hsa-mir-16-2                       | SEC ID N°: 25    | 10-31                                                   |
| hsa-mir-17                         | SEC ID N°: 26    | 14-37 y/o 51-70                                         |
| hsa-mir-18                         | SEC ID N°: 27    | 6-27                                                    |
| hsa-mir-19a                        | SEC ID N°: 28    | 49-71                                                   |
| hsa-mir-19b-1                      | SEC ID N°: 29    | 54-76                                                   |
| hsa-mir-19b-2                      | SEC ID N°: 30    | 62-84                                                   |
| hsa-mir-20                         | SEC ID N°: 31    | 8-29                                                    |
| hsa-mir-21                         | SEC ID N°: 32    | 8-29                                                    |
| hsa-mir-22                         | SEC ID N°: 33    | 53-74                                                   |
| hsa-mir-23a                        | SEC ID N°: 34    | 45-65                                                   |
| hsa-mir-23b                        | SEC ID N°: 35    | 58-80                                                   |

(continuación)

| <b>Secuencias de miARN humanas</b> |                  |                                                         |
|------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>Nombre del miARN</b>            | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada en Relación con el Precursor</b> |
| hsa-mir-24-1                       | SEC ID N°: 36    | 6-28 y/o 44-65                                          |
| hsa-mir-24-2                       | SEC ID N°: 37    | 50-71                                                   |
| hsa-mir-25                         | SEC ID N°: 38    | 52-73                                                   |
| hsa-mir-26a-1                      | SEC ID N°: 39    | 10-31                                                   |
| hsa-mir-26b                        | SEC ID N°: 40    | 12-32                                                   |
| hsa-mir-26a-2                      | SEC ID N°: 41    | 14-35                                                   |
| hsa-mir-27a                        | SEC ID N°: 42    | 51-72                                                   |
| hsa-mir-27b                        | SEC ID N°: 43    | 61-80                                                   |
| hsa-mir-28                         | SEC ID N°: 44    | 14-35                                                   |
| hsa-mir-29a                        | SEC ID N°: 45    | 41-62                                                   |
| hsa-mir-29b-1                      | SEC ID N°: 46    | 51-70                                                   |
| hsa-mir-29b-2                      | SEC ID N°: 47    | 52-71                                                   |
| hsa-mir-29c                        | SEC ID N°: 48    | 54-75                                                   |
| hsa-mir-30a                        | SEC ID N°: 49    | 47-68                                                   |
| hsa-mir-30c-2                      | SEC ID N°: 50    | 7-29                                                    |
| hsa-mir-30d                        | SEC ID N°: 51    | 6-27                                                    |
| hsa-mir-30b                        | SEC ID N°: 52    | 17-37                                                   |
| hsa-mir-30c-1                      | SEC ID N°: 53    | 17-39                                                   |
| hsa-mir-30e                        | SEC ID N°: 54    | 2-21                                                    |
| hsa-mir-31                         | SEC ID N°: 55    | 9-29                                                    |
| hsa-mir-32                         | SEC ID N°: 56    | 6-26                                                    |
| hsa-mir-33                         | SEC ID N°: 57    | 6-24                                                    |
| hsa-mir-34a                        | SEC ID N°: 58    | 22-43                                                   |
| hsa-mir-34b                        | SEC ID N°: 59    | 14-35                                                   |
| hsa-mir-34c                        | SEC ID N°: 60    | 13-34                                                   |
| hsa-mir-92-1                       | SEC ID N°: 61    | 48-69                                                   |
| hsa-mir-92-2                       | SEC ID N°: 62    | 48-69                                                   |
| hsa-mir-93                         | SEC ID N°: 63    | 12-33                                                   |
| hsa-mir-95                         | SEC ID N°: 64    | 49-70                                                   |
| hsa-mir-96                         | SEC ID N°: 65    | 9-30                                                    |
| hsa-mir-98                         | SEC ID N°: 66    | 2-23                                                    |
| hsa-mir-99a                        | SEC ID N°: 67    | 13-34                                                   |

(continuación)

| <b>Secuencias de miARN humanas</b> |                  |                                                         |
|------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>Nombre del miARN</b>            | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada en Relación con el Precursor</b> |
| hsa-mir-99b                        | SEC ID N°: 68    | 7-28                                                    |
| hsa-mir-100                        | SEC ID N°: 69    | 13-34                                                   |
| hsa-mir-101-1                      | SEC ID N°: 70    | 47-68                                                   |
| hsa-mir-101-2                      | SEC ID N°: 71    | 49-70                                                   |
| hsa-mir-103-2                      | SEC ID N°: 72    | 48-70                                                   |
| hsa-mir-103-1                      | SEC ID N°: 73    | 48-70                                                   |
| hsa-mir-105-1                      | SEC ID N°: 74    | 13-32                                                   |
| hsa-mir-105-2                      | SEC ID N°: 75    | 13-32                                                   |
| hsa-mir-106a                       | SEC ID N°: 76    | 13-36                                                   |
| hsa-mir-106b                       | SEC ID N°: 77    | 12-32                                                   |
| hsa-mir-107                        | SEC ID N°: 78    | 50-72                                                   |
| hsa-mir-122a                       | SEC ID N°: 79    | 15-37                                                   |
| hsa-mir-124a-1                     | SEC ID N°: 80    | 52-73                                                   |
| hsa-mir-124a-2                     | SEC ID N°: 81    | 61-82                                                   |
| hsa-mir-124a-3                     | SEC ID N°: 82    | 52-73                                                   |
| hsa-mir-125b-1                     | SEC ID N°: 83    | 15-36                                                   |
| hsa-mir-125a                       | SEC ID N°: 84    | 15-37                                                   |
| hsa-mir-125b-2                     | SEC ID N°: 85    | 17-38                                                   |
| hsa-mir-126                        | SEC ID N°: 86    | 15-35 y/o 52-72                                         |
| hsa-mir-127                        | SEC ID N°: 87    | 57-78                                                   |
| hsa-mir-128a                       | SEC ID N°: 88    | 50-71                                                   |
| hsa-mir-128b                       | SEC ID N°: 89    | 52-73                                                   |
| hsa-mir-129-2                      | SEC ID N°: 90    | 15-35                                                   |
| hsa-mir-130a                       | SEC ID N°: 91    | 55-74                                                   |
| hsa-mir-130b                       | SEC ID N°: 92    | 51-72                                                   |
| hsa-mir-132                        | SEC ID N°: 93    | 59-80                                                   |
| hsa-mir-133a-1                     | SEC ID N°: 94    | 54-75                                                   |
| hsa-mir-133a-2                     | SEC ID N°: 95    | 60-81                                                   |
| hsa-mir-133b                       | SEC ID N°: 96    | 67-87                                                   |
| hsa-mir-134                        | SEC ID N°: 97    | 8-28                                                    |
| hsa-mir-135a-1                     | SEC ID N°: 98    | 17-39                                                   |
| hsa-mir-135a-2                     | SEC ID N°: 99    | 23-45                                                   |

(continuación)

| Secuencias de miARN humanas |                |                                                  |
|-----------------------------|----------------|--------------------------------------------------|
| Nombre del miARN            | Precursor      | Secuencia Procesada en Relación con el Precursor |
| hsa-mir-135b                | SEC ID N°: 100 | 16-37                                            |
| hsa-mir-136                 | SEC ID N°: 101 | 15-37                                            |
| hsa-mir-137                 | SEC ID N°: 102 | 60-81                                            |
| hsa-mir-138-2               | SEC ID N°: 103 | 10-26                                            |
| hsa-mir-138-1               | SEC ID N°: 104 | 23-39                                            |
| hsa-mir-139                 | SEC ID N°: 105 | 7-24                                             |
| hsa-mir-140                 | SEC ID N°: 106 | 24-44                                            |
| hsa-mir-141                 | SEC ID N°: 107 | 60-80                                            |
| hsa-mir-142                 | SEC ID N°: 108 | 16-35 y/o 52-74                                  |
| hsa-mir-143                 | SEC ID N°: 109 | 61-82                                            |
| hsa-mir-144                 | SEC ID N°: 110 | 52-73                                            |
| hsa-mir-145                 | SEC ID N°: 111 | 16-39                                            |
| hsa-mir-146                 | SEC ID N°: 112 | 21-42                                            |
| hsa-mir-147                 | SEC ID N°: 113 | 47-66                                            |
| hsa-mir-148a                | SEC ID N°: 114 | 44-65                                            |
| hsa-mir-148b                | SEC ID N°: 115 | 63-84                                            |
| hsa-mir-149                 | SEC ID N°: 116 | 15-36                                            |
| hsa-mir-150                 | SEC ID N°: 117 | 16-37                                            |
| hsa-mir-151                 | SEC ID N°: 118 | 46-67                                            |
| hsa-mir-152                 | SEC ID N°: 119 | 54-74                                            |
| hsa-mir-153-1               | SEC ID N°: 120 | 54-73                                            |
| hsa-mir-153-2               | SEC ID N°: 121 | 53-72                                            |
| hsa-mir-154                 | SEC ID N°: 122 | 15-36                                            |
| hsa-mir-155                 | SEC ID N°: 123 | 4-25                                             |
| hsa-mir-181a                | SEC ID N°: 124 | 39-61                                            |
| hsa-mir-181b-1              | SEC ID N°: 125 | 36-59                                            |
| hsa-mir-181c                | SEC ID N°: 126 | 27-48                                            |
| hsa-mir-181b-2              | SEC ID N°: 127 | 16-39                                            |
| hsa-mir-182                 | SEC ID N°: 128 | 23-44 y/o 67-87                                  |
| hsa-mir-183                 | SEC ID N°: 129 | 27-49                                            |
| hsa-mir-184                 | SEC ID N°: 130 | 53-74                                            |
| hsa-mir-185                 | SEC ID N°: 131 | 15-32                                            |

(continuación)

| <b>Secuencias de miARN humanas</b> |                  |                                                         |
|------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>Nombre del miARN</b>            | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada en Relación con el Precursor</b> |
| hsa-mir-186                        | SEC ID N°: 132   | 15-37                                                   |
| hsa-mir-187                        | SEC ID N°: 133   | 71-91                                                   |
| hsa-mir-188                        | SEC ID N°: 134   | 15-36                                                   |
| hsa-mir-190                        | SEC ID N°: 135   | 15-36                                                   |
| hsa-mir-191                        | SEC ID N°: 136   | 16-37                                                   |
| hsa-mir-192                        | SEC ID N°: 137   | 24-44                                                   |
| hsa-mir-193                        | SEC ID N°: 138   | 55-75                                                   |
| hsa-mir-194-1                      | SEC ID N°: 139   | 15-36                                                   |
| hsa-mir-194-2                      | SEC ID N°: 140   | 15-36                                                   |
| hsa-mir-195                        | SEC ID N°: 141   | 15-35                                                   |
| hsa-mir-196-1                      | SEC ID N°: 142   | 7-27                                                    |
| hsa-mir-196-2                      | SEC ID N°: 143   | 25-45                                                   |
| hsa-mir-197                        | SEC ID N°: 144   | 48-69                                                   |
| hsa-mir-198                        | SEC ID N°: 145   | 6-24                                                    |
| hsa-mir-199a-1                     | SEC ID N°: 146   | 6-28 y/o 46-67                                          |
| hsa-mir-199a-2                     | SEC ID N°: 147   | 31-53 y/o 69-90                                         |
| hsa-mir-199b                       | SEC ID N°: 148   | 26-48                                                   |
| hsa-mir-200b                       | SEC ID N°: 149   | 54-77                                                   |
| hsa-mir-200c                       | SEC ID N°: 150   | 45-66                                                   |
| hsa-mir-200a                       | SEC ID N°: 151   | 54-75                                                   |
| hsa-mir-203                        | SEC ID N°: 152   | 65-86                                                   |
| hsa-mir-204                        | SEC ID N°: 153   | 33-54                                                   |
| hsa-mir-205                        | SEC ID N°: 154   | 34-55                                                   |
| hsa-mir-206                        | SEC ID N°: 155   | 53-74                                                   |
| hsa-mir-208                        | SEC ID N°: 156   | 44-65                                                   |
| hsa-mir-210                        | SEC ID N°: 157   | 66-86                                                   |
| hsa-mir-211                        | SEC ID N°: 158   | 26-47                                                   |
| hsa-mir-212                        | SEC ID N°: 159   | 71-91                                                   |
| hsa-mir-213                        | SEC ID N°: 160   | 24-46 y/o 64-85                                         |
| hsa-mir-214                        | SEC ID N°: 161   | 71-91                                                   |
| hsa-mir-215                        | SEC ID N°: 162   | 27-47                                                   |
| hsa-mir-216                        | SEC ID N°: 163   | 19-39                                                   |

(continuación)

| Secuencias de miARN humanas |                |                                                  |
|-----------------------------|----------------|--------------------------------------------------|
| Nombre del miARN            | Precursor      | Secuencia Procesada en Relación con el Precursor |
| hsa-mir-217                 | SEC ID N°: 164 | 35-58                                            |
| hsa-mir-218-1               | SEC ID N°: 165 | 25-45                                            |
| hsa-mir-218-2               | SEC ID N°: 166 | 25-45                                            |
| hsa-mir-219-1               | SEC ID N°: 167 | 21-41                                            |
| hsa-mir-219-2               | SEC ID N°: 168 | 19-39                                            |
| hsa-mir-220                 | SEC ID N°: 169 | 23-43                                            |
| hsa-mir-221                 | SEC ID N°: 170 | 65-87                                            |
| hsa-mir-222                 | SEC ID N°: 171 | 69-92                                            |
| hsa-mir-223                 | SEC ID N°: 172 | 68-88                                            |
| hsa-mir-224                 | SEC ID N°: 173 | 8-30                                             |
| hsa-mir-296                 | SEC ID N°: 174 | 14-34                                            |
| hsa-mir-299                 | SEC ID N°: 175 | 7-28                                             |
| hsa-mir-301                 | SEC ID N°: 176 | 51-73                                            |
| hsa-mir-302                 | SEC ID N°: 177 | 44-66                                            |
| hsa-mir-320                 | SEC ID N°: 178 | 48-70                                            |
| hsa-mir-321                 | SEC ID N°: 179 | 10-30                                            |
| hsa-mir-323                 | SEC ID N°: 180 | 50-71                                            |
| hsa-mir-324                 | SEC ID N°: 181 | 16-38 y/o 51-72                                  |
| hsa-mir-326                 | SEC ID N°: 182 | 60-79                                            |
| hsa-mir-328                 | SEC ID N°: 183 | 48-69                                            |
| hsa-mir-330                 | SEC ID N°: 184 | 57-79                                            |
| hsa-mir-331                 | SEC ID N°: 185 | 61-81                                            |
| hsa-mir-335                 | SEC ID N°: 186 | 16-38                                            |
| hsa-mir-337                 | SEC ID N°: 187 | 56-78                                            |
| hsa-mir-338                 | SEC ID N°: 188 | 42-64                                            |
| hsa-mir-339                 | SEC ID N°: 189 | 15-35                                            |
| hsa-mir-340                 | SEC ID N°: 190 | 58-80                                            |
| hsa-mir-342                 | SEC ID N°: 191 | 61-84                                            |
| hsa-mir-345                 | SEC ID N°: 573 | 17-37                                            |
| hsa-mir-346                 | SEC ID N°: 574 | 4-26                                             |
| hsa-mir-367                 | SEC ID N°: 575 | 44-65                                            |
| hsa-mir-368                 | SEC ID N°: 576 | 44-65                                            |

(continuación)

| <b>Secuencias de miARN humanas</b> |                  |                                                         |
|------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>Nombre del miARN</b>            | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada en Relación con el Precursor</b> |
| hsa-mir-369                        | SEC ID N°: 577   | 44-64                                                   |
| hsa-mir-370                        | SEC ID N°: 578   | 48-68                                                   |
| hsa-mir-371                        | SEC ID N°: 579   | 44-64                                                   |
| hsa-mir-372                        | SEC ID N°: 580   | 42-64                                                   |
| hsa-mir-373                        | SEC ID N°: 581   | 44-66                                                   |
| hsa-mir-374                        | SEC ID N°: 582   | 12-33                                                   |
| hsa-mir-375                        | SEC ID N°: 677   | 40-61                                                   |
| hsa-mir-376a                       | SEC ID N°: 678   | 44-64                                                   |
| hsa-mir-377                        | SEC ID N°: 679   | 45-66                                                   |
| hsa-mir-378                        | SEC ID N°: 680   | 5-26 y 44-65                                            |
| hsa-mir-379                        | SEC ID N°: 681   | 6-24                                                    |
| hsa-mir-380                        | SEC ID N°: 682   | 5-26 y 40-61                                            |
| hsa-mir-381                        | SEC ID N°: 683   | 49-70                                                   |
| hsa-mir-382                        | SEC ID N°: 684   | 11-32                                                   |
| hsa-mir-383                        | SEC ID N°: 685   | 7-28                                                    |
| hsa-mir-384                        | SEC ID N°: 686   | 57-76                                                   |
| hsa-mir-422a                       | SEC ID N°: 687   | 11-32                                                   |
| hsa-mir-423                        | SEC ID N°: 688   | 53-74                                                   |
| hsa-mir-424                        | SEC ID N°: 689   | 11-32                                                   |
| hsa-mir-425                        | SEC ID N°: 690   | 55-75                                                   |
| hsa-mir-448                        | SEC ID N°: 691   | 71-92                                                   |
| hsa-mir-429                        | SEC ID N°: 692   | 51-72                                                   |
| hsa-mir-449                        | SEC ID N°: 693   | 16-37                                                   |
| hsa-mir-450-1                      | SEC ID N°: 694   | 17-38                                                   |
| hsa-mir-450-2                      | SEC ID N°: 704   | 22-43                                                   |
| hsa-mir-451                        | SEC ID N°: 705   | 17-39                                                   |
| hsa-mir-452                        | SEC ID N°: 706   | 17-38                                                   |
| hsa-mir-453                        | SEC ID N°: 707   | 43-64                                                   |
| hsa-mir-455                        | SEC ID N°: 708   | 16-37                                                   |
| hsa-mir-483                        | SEC ID N°: 709   | 48-70                                                   |
| hsa-mir-484                        | SEC ID N°: 710   | 2-23                                                    |
| hsa-mir-485                        | SEC ID N°: 711   | 9-30                                                    |

(continuación)

| Secuencias de miARN humanas |                |                                                  |
|-----------------------------|----------------|--------------------------------------------------|
| Nombre del miARN            | Precursor      | Secuencia Procesada en Relación con el Precursor |
| hsa-mir-486                 | SEC ID N°: 712 | 4-25                                             |
| hsa-mir-487                 | SEC ID N°: 713 | 49-70                                            |
| hsa-mir-488                 | SEC ID N°: 714 | 14-34                                            |
| hsa-mir-489                 | SEC ID N°: 715 | 51-73                                            |
| hsa-mir-490                 | SEC ID N°: 716 | 76-97                                            |
| hsa-mir-491                 | SEC ID N°: 717 | 16-38                                            |
| hsa-mir-492                 | SEC ID N°: 718 | 30-52                                            |
| hsa-mir-493                 | SEC ID N°: 719 | 16-37                                            |
| hsa-mir-494                 | SEC ID N°: 720 | 48-71                                            |
| hsa-mir-495                 | SEC ID N°: 721 | 50-72                                            |
| hsa-mir-496                 | SEC ID N°: 722 | 61-77                                            |
| hsa-mir-497                 | SEC ID N°: 723 | 24-44                                            |
| hsa-mir-498                 | SEC ID N°: 724 | 34-56                                            |
| hsa-mir-499                 | SEC ID N°: 725 | 33-55                                            |
| hsa-mir-500                 | SEC ID N°: 726 | 52-73                                            |
| hsa-mir-501                 | SEC ID N°: 727 | 14-35                                            |
| hsa-mir-502                 | SEC ID N°: 728 | 1-21                                             |
| hsa-mir-503                 | SEC ID N°: 729 | 6-28                                             |
| hsa-mir-504                 | SEC ID N°: 730 | 13-33                                            |
| hsa-mir-505                 | SEC ID N°: 731 | 52-73                                            |
| hsa-mir-506                 | SEC ID N°: 732 | 71-91                                            |
| hsa-mir-507                 | SEC ID N°: 733 | 56-76                                            |
| hsa-mir-508                 | SEC ID N°: 734 | 61-83                                            |
| hsa-mir-509                 | SEC ID N°: 735 | 55-77                                            |
| hsa-mir-510                 | SEC ID N°: 736 | 10-32                                            |
| hsa-mir-511-1               | SEC ID N°: 737 | 16-36                                            |
| hsa-mir-511-2               | SEC ID N°: 738 | 16-36                                            |
| hsa-mir-512-1               | SEC ID N°: 739 | 14-36                                            |
| hsa-mir-512-2               | SEC ID N°: 740 | 20-42                                            |
| hsa-mir-513-1               | SEC ID N°: 741 | 37-58                                            |
| hsa-mir-513-2               | SEC ID N°: 742 | 36-57                                            |
| hsa-mir-514-1               | SEC ID N°: 743 | 39-58                                            |

(continuación)

| <b>Secuencias de miARN humanas</b> |                  |                                                         |
|------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>Nombre del miARN</b>            | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada en Relación con el Precursor</b> |
| hsa-mir-514-2                      | SEC ID N°: 744   | 39-58                                                   |
| hsa-mir-514-3                      | SEC ID N°: 745   | 39-58                                                   |
| hsa-mir-515-1                      | SEC ID N°: 746   | 14-37                                                   |
| hsa-mir-515-2                      | SEC ID N°: 747   | 14-37                                                   |
| hsa-mir-516-1                      | SEC ID N°: 748   | 61-78                                                   |
| hsa-mir-516-2                      | SEC ID N°: 749   | 61-78                                                   |
| hsa-mir-516-3                      | SEC ID N°: 750   | 15-37                                                   |
| hsa-mir-516-4                      | SEC ID N°: 751   | 15-37                                                   |
| hsa-mir-517a                       | SEC ID N°: 752   | 15-36                                                   |
| hsa-mir-517b                       | SEC ID N°: 753   | 6-27                                                    |
| hsa-mir-517c                       | SEC ID N°: 754   | 20-41                                                   |
| hsa-mir-518a-1                     | SEC ID N°: 755   | 14-34                                                   |
| hsa-mir-518a-2                     | SEC ID N°: 756   | 15-34                                                   |
| hsa-mir-518b                       | SEC ID N°: 757   | 51-72                                                   |
| hsa-mir-518c                       | SEC ID N°: 758   | 24-46                                                   |
| hsa-mir-518d                       | SEC ID N°: 759   | 16-36                                                   |
| hsa-mir-518e                       | SEC ID N°: 760   | 54-75                                                   |
| hsa-mir-518f                       | SEC ID N°: 761   | 16-38                                                   |
| hsa-mir-519a-1                     | SEC ID N°: 762   | 15-38                                                   |
| hsa-mir-519a-2                     | SEC ID N°: 763   | 54-78                                                   |
| hsa-mir-519b                       | SEC ID N°: 764   | 13-36                                                   |
| hsa-mir-519c                       | SEC ID N°: 765   | 16-39                                                   |
| hsa-mir-519d                       | SEC ID N°: 766   | 54-76                                                   |
| hsa-mir-519e                       | SEC ID N°: 767   | 14-35                                                   |
| hsa-mir-520a                       | SEC ID N°: 768   | 15-35                                                   |
| hsa-mir-520b                       | SEC ID N°: 769   | 41-61                                                   |
| hsa-mir-520c                       | SEC ID N°: 770   | 16-36                                                   |
| hsa-mir-520d                       | SEC ID N°: 771   | 15-37                                                   |
| hsa-mir-520e                       | SEC ID N°: 772   | 54-74                                                   |
| hsa-mir-520f                       | SEC ID N°: 773   | 55-76                                                   |
| hsa-mir-520g                       | SEC ID N°: 774   | 55-78                                                   |

(continuación)

| <b>Secuencias de miARN humanas</b> |                  |                                                         |
|------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>Nombre del miARN</b>            | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada en Relación con el Precursor</b> |
| hsa-mir-520h                       | SEC ID N°: 775   | 55-76                                                   |
| hsa-mir-521-1                      | SEC ID N°: 776   | 54-75                                                   |
| hsa-mir-521-2                      | SEC ID N°: 777   | 54-75                                                   |
| hsa-mir-522                        | SEC ID N°: 778   | 16-39                                                   |
| hsa-mir-523                        | SEC ID N°: 779   | 16-39                                                   |
| hsa-mir-524                        | SEC ID N°: 780   | 16-37                                                   |
| hsa-mir-525                        | SEC ID N°: 781   | 15-35                                                   |
| hsa-mir-526a-1                     | SEC ID N°: 782   | 15-35                                                   |
| hsa-mir-526a-2                     | SEC ID N°: 783   | 7-27                                                    |
| hsa-mir-526b                       | SEC ID N°: 784   | 14-37                                                   |
| hsa-mir-527                        | SEC ID N°: 785   | 14-34                                                   |
| ambi-mir-7100                      | SEC ID N°: 803   |                                                         |
| mir-526b*                          | SEC ID N°: 804   |                                                         |
| mir-520a*                          | SEC ID N°: 805   |                                                         |

**Tabla 2**

| <b>Secuencias de miARN de ratón</b> |                  |                                                         |
|-------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>Nombre del miARN</b>             | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada en Relación con el Precursor</b> |
| mmu-mir-1-1                         | SEC ID N°: 192   | 49-69                                                   |
| mmu-mir-1-2                         | SEC ID N°: 193   | 47-67                                                   |
| mmu-let-7g                          | SEC ID N°: 194   | 7-27                                                    |
| mmu-let-7i                          | SEC ID N°: 195   | 6-24                                                    |
| mmu-let-7d                          | SEC ID N°: 196   | 16-36 + 70-91                                           |
| mmu-let-7a-1                        | SEC ID N°: 197   | 13-34                                                   |
| mmu-let-7a-2                        | SEC ID N°: 198   | 17-38                                                   |
| mmu-let-7b                          | SEC ID N°: 199   | 7-28                                                    |
| mmu-let-7c-1                        | SEC ID N°: 200   | 16-37                                                   |
| mmu-let-7c-2                        | SEC ID N°: 201   | 14-35                                                   |
| mmu-let-7e                          | SEC ID N°: 202   | 15-35                                                   |
| mmu-let-7f-1                        | SEC ID N°: 203   | 8-29                                                    |
| mmu-let-7f-2                        | SEC ID N°: 204   | 8-29                                                    |

(continuación)

| <b>Secuencias de miARN de ratón</b> |                  |                                                         |
|-------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>Nombre del miARN</b>             | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada en Relación con el Precursor</b> |
| mmu-mir-7-1                         | SEC ID N°: 205   | 24-44                                                   |
| mmu-mir-7-2                         | SEC ID N°: 206   | 19-39                                                   |
| mmu-mir-7b                          | SEC ID N°: 207   | 30-50                                                   |
| mmu-mir-9-2                         | SEC ID N°: 208   | 8-30 y/o 46-66                                          |
| mmu-mir-9-1                         | SEC ID N°: 209   | 16-38 y/o 56-76                                         |
| mmu-mir-9-3                         | SEC ID N°: 210   | 16-38 y/o 56-76                                         |
| mmu-mir-10b                         | SEC ID N°: 21    | 7-28                                                    |
| mmu-mir-10a-1                       | SEC ID N°: 212   | 22-44                                                   |
| mmu-mir-10a-2                       | SEC ID N°: 213   | 22-44                                                   |
| mmu-mir-15b                         | SEC ID N°: 214   | 4-25                                                    |
| mmu-mir-15a                         | SEC ID N°: 215   | 15-36                                                   |
| mmu-mir-16-1                        | SEC ID N°: 216   | 16-37                                                   |
| mmu-mir-16-2                        | SEC ID N°: 217   | 17-38                                                   |
| mmu-mir-17                          | SEC ID N°: 218   | 14-37 y/o 51-70                                         |
| mmu-mir-18                          | SEC ID N°: 219   | 17-38                                                   |
| mmu-mir-19b-2                       | SEC ID N°: 220   | 54-76                                                   |
| mmu-mir-19a                         | SEC ID N°: 221   | 49-71                                                   |
| mmu-mir-19b-1                       | SEC ID N°: 222   | 54-76                                                   |
| mmu-mir-20                          | SEC ID N°: 223   | 27-49                                                   |
| mmu-mir-21                          | SEC ID N°: 224   | 18-39                                                   |
| mmu-mir-22                          | SEC ID N°: 225   | 57-78                                                   |
| mmu-mir-23b                         | SEC ID N°: 226   | 46-68                                                   |
| mmu-mir-23a                         | SEC ID N°: 227   | 46-66                                                   |
| mmu-mir-24-1                        | SEC ID N°: 228   | 6-28 y/o 44-65                                          |
| mmu-mir-24-2                        | SEC ID N°: 229   | 61-82                                                   |
| mmu-mir-25                          | SEC ID N°: 230   | 52-73                                                   |
| mmu-mir-26a-1                       | SEC ID N°: 231   | 16-37                                                   |
| mmu-mir-26b                         | SEC ID N°: 232   | 15-36                                                   |
| mmu-mir-26a-2                       | SEC ID N°: 233   | 14-35                                                   |
| mmu-mir-27b                         | SEC ID N°: 234   | 49-68                                                   |
| mmu-mir-27a                         | SEC ID N°: 235   | 56-76                                                   |

(continuación)

| <b>Secuencias de miARN de ratón</b> |                  |                                                         |
|-------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>Nombre del miARN</b>             | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada en Relación con el Precursor</b> |
| mmu-mir-28                          | SEC ID N°: 236   | 14-35                                                   |
| mmu-mir-29b-1                       | SEC ID N°: 237   | 47-68                                                   |
| mmu-mir-29a                         | SEC ID N°: 238   | 53-74                                                   |
| mmu-mir-29c                         | SEC ID N°: 239   | 54-75                                                   |
| mmu-mir-29b-2                       | SEC ID N°: 240   | 52-73                                                   |
| mmu-mir-30a                         | SEC ID N°: 241   | 47-68                                                   |
| mmu-mir-30b                         | SEC ID N°: 242   | 2-22                                                    |
| mmu-mir-30e                         | SEC ID N°: 243   | 2-21                                                    |
| mmu-mir-30c-1                       | SEC ID N°: 244   | 17-39                                                   |
| mmu-mir-30c-2                       | SEC ID N°: 245   | 14-36                                                   |
| mmu-mir-30d                         | SEC ID N°: 246   | 12-33                                                   |
| mmu-mir-31                          | SEC ID N°: 247   | 28-49                                                   |
| mmu-mir-32                          | SEC ID N°: 248   | 6-26                                                    |
| mmu-mir-33                          | SEC ID N°: 249   | 6-24                                                    |
| mmu-mir-34c                         | SEC ID N°: 250   | 13-35                                                   |
| mmu-mir-34b                         | SEC ID N°: 251   | 13-35                                                   |
| mmu-mir-34a                         | SEC ID N°: 252   | 20-42                                                   |
| mmu-mir-92-2                        | SEC ID N°: 253   | 55-75                                                   |
| mmu-mir-92-1                        | SEC ID N°: 254   | 50-70                                                   |
| mmu-mir-93                          | SEC ID N°: 255   | 15-37                                                   |
| mmu-mir-96                          | SEC ID N°: 256   | 24-46                                                   |
| mmu-mir-98                          | SEC ID N°: 257   | 2-23                                                    |
| mmu-mir-99a                         | SEC ID N°: 258   | 6-25                                                    |
| mmu-mir-99b                         | SEC ID N°: 259   | 7-28                                                    |
| mmu-mir-100                         | SEC ID N°: 260   | 13-34                                                   |
| mmu-mir-101                         | SEC ID N°: 261   | 38-57                                                   |
| mmu-mir-101b                        | SEC ID N°: 262   | 61-82                                                   |
| mmu-mir-103-1                       | SEC ID N°: 263   | 52-74                                                   |
| mmu-mir-103-2                       | SEC ID N°: 264   | 52-74                                                   |
| mmu-mir-106a                        | SEC ID N°: 265   | 5-26                                                    |
| mmu-mir-106b                        | SEC ID N°: 266   | 12-32                                                   |

(continuación)

| <b>Secuencias de miARN de ratón</b> |                  |                                                         |
|-------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>Nombre del miARN</b>             | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada en Relación con el Precursor</b> |
| mmu-mir-107                         | SEC ID N°: 267   | 52-74                                                   |
| mmu-mir-122a                        | SEC ID N°: 268   | 6-28                                                    |
| mmu-mir-124a-3                      | SEC ID N°: 269   | 43-64                                                   |
| mmu-mir-124a-1                      | SEC ID N°: 270   | 52-73                                                   |
| mmu-mir-124a-2                      | SEC ID N°: 271   | 61-82                                                   |
| mmu-mir-125a                        | SEC ID N°: 272   | 6-28                                                    |
| mmu-mir-125b-2                      | SEC ID N°: 273   | 7-28                                                    |
| mmu-mir-125b-1                      | SEC ID N°: 274   | 15-36                                                   |
| mmu-mir-126                         | SEC ID N°: 275   | 9-29 y/o 46-66                                          |
| mmu-mir-127                         | SEC ID N°: 276   | 43-64                                                   |
| mmu-mir-128a                        | SEC ID N°: 277   | 44-65                                                   |
| mmu-mir-128b                        | SEC ID N°: 278   | 48-69                                                   |
| mmu-mir-129-1                       | SEC ID N°: 279   | 6-27                                                    |
| mmu-mir-129-2                       | SEC ID N°: 280   | 15-36                                                   |
| mmu-mir-130a                        | SEC ID N°: 281   | 42-61                                                   |
| mmu-mir-130b                        | SEC ID N°: 282   | 51-72                                                   |
| mmu-mir-132                         | SEC ID N°: 283   | 42-63                                                   |
| mmu-mir-133a-1                      | SEC ID N°: 284   | 44-65                                                   |
| mmu-mir-133a-2                      | SEC ID N°: 285   | 60-81                                                   |
| mmu-mir-133b                        | SEC ID N°: 286   | 67-87                                                   |
| mmu-mir-134                         | SEC ID N°: 287   | 7-27                                                    |
| mmu-mir-135a-1                      | SEC ID N°: 288   | 17-39                                                   |
| mmu-mir-135b                        | SEC ID N°: 289   | 16-37                                                   |
| mmu-mir-135a-2                      | SEC ID N°: 290   | 23-45                                                   |
| mmu-mir-136                         | SEC ID N°: 291   | 5-27                                                    |
| mmu-mir-137                         | SEC ID N°: 292   | 46-67                                                   |
| mmu-mir-138-2                       | SEC ID N°: 293   | 2-18                                                    |
| mmu-mir-138-1                       | SEC ID N°: 294   | 23-39                                                   |
| mmu-mir-139                         | SEC ID N°: 295   | 7-24                                                    |
| mmu-mir-140                         | SEC ID N°: 296   | 7-27                                                    |
| mmu-mir-141                         | SEC ID N°: 297   | 49-69                                                   |

(continuación)

| <b>Secuencias de miARN de ratón</b> |                  |                                                         |
|-------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>Nombre del miARN</b>             | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada en Relación con el Precursor</b> |
| mmu-mir-142                         | SEC ID N°: 298   | 4-23 y/o 40-61                                          |
| mmu-mir-143                         | SEC ID N°: 299   | 40-61                                                   |
| mmu-mir-144                         | SEC ID N°: 300   | 43-64                                                   |
| mmu-mir-145                         | SEC ID N°: 301   | 7-30                                                    |
| mmu-mir-146                         | SEC ID N°: 302   | 6-27                                                    |
| mmu-mir-148a                        | SEC ID N°: 303   | 61-82                                                   |
| mmu-mir-149                         | SEC ID N°: 304   | 4-25                                                    |
| mmu-mir-150                         | SEC ID N°: 305   | 6-27                                                    |
| mmu-mir-151                         | SEC ID N°: 306   | 43-63                                                   |
| mmu-mir-152                         | SEC ID N°: 307   | 47-67                                                   |
| mmu-mir-153                         | SEC ID N°: 308   | 44-63                                                   |
| mmu-mir-154                         | SEC ID N°: 309   | 6-27                                                    |
| mmu-mir-155                         | SEC ID N°: 310   | 4-25                                                    |
| mmu-mir-181a                        | SEC ID N°: 311   | 7-29                                                    |
| mmu-mir-181b-1                      | SEC ID N°: 312   | 12-35                                                   |
| mmu-mir-181c                        | SEC ID N°: 313   | 17-38                                                   |
| mmu-mir-181b-2                      | SEC ID N°: 314   | 16-39                                                   |
| mmu-mir-182                         | SEC ID N°: 315   | 7-28                                                    |
| mmu-mir-183                         | SEC ID N°: 316   | 6-28                                                    |
| mmu-mir-184                         | SEC ID N°: 317   | 45-66                                                   |
| mmu-mir-185                         | SEC ID N°: 318   | 7-24                                                    |
| mmu-mir-186                         | SEC ID N°: 319   | 7-29                                                    |
| mmu-mir-187                         | SEC ID N°: 320   | 40-61                                                   |
| mmu-mir-188                         | SEC ID N°: 321   | 6-27                                                    |
| mmu-mir-190                         | SEC ID N°: 322   | 6-27                                                    |
| mmu-mir-191                         | SEC ID N°: 323   | 7-28                                                    |
| mmu-mir-192                         | SEC ID N°: 324   | 14-31                                                   |
| mmu-mir-193                         | SEC ID N°: 325   | 41-61                                                   |
| mmu-mir-194-1                       | SEC ID N°: 326   | 7-28                                                    |
| mmu-mir-194-2                       | SEC ID N°: 327   | 16-37                                                   |
| mmu-mir-195                         | SEC ID N°: 328   | 1-21                                                    |

(continuación)

| <b>Secuencias de miARN de ratón</b> |                  |                                                         |
|-------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>Nombre del miARN</b>             | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada en Relación con el Precursor</b> |
| mmu-mir-196-1                       | SEC ID N°: 329   | 24-44                                                   |
| mmu-mir-196-2                       | SEC ID N°: 330   | 16-36                                                   |
| mmu-mir-199a-1                      | SEC ID N°: 331   | 6-28 y/o 45-66                                          |
| mmu-mir-199a-2                      | SEC ID N°: 332   | 31-53 y/o 69-90                                         |
| mmu-mir-199b                        | SEC ID N°: 333   | 26-48                                                   |
| mmu-mir-200b                        | SEC ID N°: 334   | 45-67                                                   |
| mmu-mir-200a                        | SEC ID N°: 335   | 54-75                                                   |
| mmu-mir-200c                        | SEC ID N°: 336   | 46-67                                                   |
| mmu-mir-201                         | SEC ID N°: 337   | 6-26                                                    |
| mmu-mir-202                         | SEC ID N°: 338   | 45-66                                                   |
| mmu-mir-203                         | SEC ID N°: 339   | 49-69                                                   |
| mmu-mir-204                         | SEC ID N°: 340   | 6-28                                                    |
| mmu-mir-205                         | SEC ID N°: 341   | 7-28                                                    |
| mmu-mir-206                         | SEC ID N°: 342   | 46-67                                                   |
| mmu-mir-207                         | SEC ID N°: 343   | 52-74                                                   |
| mmu-mir-208                         | SEC ID N°: 344   | 50-71                                                   |
| mmu-mir-210                         | SEC ID N°: 345   | 66-86                                                   |
| mmu-mir-211                         | SEC ID N°: 346   | 26-47                                                   |
| mmu-mir-212                         | SEC ID N°: 347   | 56-76                                                   |
| mmu-mir-213                         | SEC ID N°: 348   | 14-36 y/o 54-75                                         |
| mmu-mir-214                         | SEC ID N°: 349   | 71-91                                                   |
| mmu-mir-215                         | SEC ID N°: 350   | 30-50                                                   |
| mmu-mir-216                         | SEC ID N°: 351   | 7-27                                                    |
| mmu-mir-217                         | SEC ID N°: 352   | 34-57                                                   |
| mmu-mir-218-2                       | SEC ID N°: 353   | 25-45                                                   |
| mmu-mir-219-1                       | SEC ID N°: 354   | 21-41                                                   |
| mmu-mir-219-2                       | SEC ID N°: 355   | 19-39                                                   |
| mmu-mir-221                         | SEC ID N°: 356   | 60-81                                                   |
| mmu-mir-222                         | SEC ID N°: 357   | 49-71                                                   |
| mmu-mir-223                         | SEC ID N°: 358   | 68-88                                                   |
| mmu-mir-224                         | SEC ID N°: 359   | 8-30                                                    |

(continuación)

| <b>Secuencias de miARN de ratón</b> |                  |                                                         |
|-------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>Nombre del miARN</b>             | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada en Relación con el Precursor</b> |
| mu-miR-290                          | SEC ID N°: 360   | 15-37                                                   |
| mmu-mir-291                         | SEC ID N°: 361   | 14-35 y/o 50-72                                         |
| mmu-mir-292                         | SEC ID N°: 362   | 12-33 y/o 51-73                                         |
| mmu-mir-293                         | SEC ID N°: 363   | 48-69                                                   |
| mmu-mir-294                         | SEC ID N°: 364   | 51-72                                                   |
| mmu-mir-295                         | SEC ID N°: 365   | 43-65                                                   |
| mmu-mir-296                         | SEC ID N°: 366   | 13-33                                                   |
| mmu-mir-297-1                       | SEC ID N°: 367   | 15-35                                                   |
| mmu-mir-297-2                       | SEC ID N°: 368   | 36-56                                                   |
| mmu-mir-298                         | SEC ID N°: 369   | 11-32                                                   |
| mmu-mir-299                         | SEC ID N°: 370   | 7-28                                                    |
| mmu-mir-300                         | SEC ID N°: 371   | 51-72                                                   |
| mmu-mir-301                         | SEC ID N°: 372   | 51-73                                                   |
| mmu-mir-302                         | SEC ID N°: 373   | 44-66                                                   |
| mmu-mir-320                         | SEC ID N°: 374   | 48-70                                                   |
| mmu-mir-321                         | SEC ID N°: 375   | 10-30                                                   |
| mmu-mir-323                         | SEC ID N°: 376   | 50-71                                                   |
| mmu-mir-324                         | SEC ID N°: 377   | 18-40 y/o 53-74                                         |
| mmu-mir-325                         | SEC ID N°: 378   | 16-38                                                   |
| mmu-mir-326                         | SEC ID N°: 379   | 60-80                                                   |
| mmu-mir-328                         | SEC ID N°: 380   | 61-82                                                   |
| mmu-mir-329                         | SEC ID N°: 381   | 61-82                                                   |
| mmu-mir-330                         | SEC ID N°: 382   | 61-83                                                   |
| mmu-mir-331                         | SEC ID N°: 383   | 61-81                                                   |
| mmu-mir-337                         | SEC ID N°: 384   | 61-83                                                   |
| mmu-mir-338                         | SEC ID N°: 385   | 61-83                                                   |
| mmu-mir-339                         | SEC ID N°: 386   | 16-36                                                   |
| mmu-mir-340                         | SEC ID N°: 387   | 61-83                                                   |
| mmu-mir-341                         | SEC ID N°: 388   | 61-81                                                   |
| mmu-mir-342                         | SEC ID N°: 389   | 61-84                                                   |
| mmu-mir-344                         | SEC ID N°: 390   | 61-83                                                   |

(continuación)

| <b>Secuencias de miARN de ratón</b> |                  |                                                         |
|-------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>Nombre del miARN</b>             | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada en Relación con el Precursor</b> |
| mmu-mir-345                         | SEC ID N°: 391   | 16-36                                                   |
| mmu-mir-346                         | SEC ID N°: 392   | 16-38                                                   |
| mmu-mir-350                         | SEC ID N°: 393   | 61-84                                                   |
| mmu-mir-351                         | SEC ID N°: 583   | 16-39                                                   |
| mmu-mir-370                         | SEC ID N°: 584   | 48-70                                                   |
| mmu-mir-376a                        | SEC ID N°: 585   | 44-64                                                   |
| mmu-mir-376b                        | SEC ID N°: 586   | 51-72                                                   |
| mmu-mir-380                         | SEC ID N°: 587   | 40-61                                                   |
| mmu-mir-409                         | SEC ID N°: 588   | 47-69                                                   |
| mmu-mir-410                         | SEC ID N°: 589   | 50-71                                                   |
| mmu-mir-411                         | SEC N°: 590      | 56-78                                                   |
| mmu-mir-412                         | SEC N°: 591      | 50-72                                                   |
| mmu-mir-425                         | SEC ID N°: 695   | 54-74                                                   |
| mmu-mir-429                         | SEC ID N°: 696   | 51-72                                                   |
| mmu-mir-448                         | SEC ID N°: 697   | 72-93                                                   |
| mmu-mir-449                         | SEC ID N°: 698   | 16-37                                                   |
| mmu-mir-450                         | SEC ID N°: 699   | 17-38                                                   |
| mmu-mir-451                         | SEC ID N°: 786   | 17-38                                                   |
| mmu-mir-452                         | SEC ID N°: 787   | 17-38                                                   |
| mmu-mir-463                         | SEC ID N°: 788   | 4-24                                                    |
| mmu-mir-464                         | SEC ID N°: 789   | 47-69                                                   |
| mmu-mir-465                         | SEC ID N°: 790   | 5-27                                                    |
| mmu-mir-466                         | SEC ID N°: 791   | 51-73                                                   |
| mmu-mir-467                         | SEC ID N°: 792   | 50-71                                                   |
| mmu-mir-468                         | SEC ID N°: 793   | 53-75                                                   |
| mmu-mir-469                         | SEC ID N°: 794   | 6-31                                                    |
| mmu-mir-470                         | SEC ID N°: 795   | 9-29                                                    |
| mmu-mir-471                         | SEC ID N°: 796   | 7-29                                                    |
| mmu-mir-483                         | SEC ID N°: 797   | 45-67                                                   |
| mmu-mir-484                         | SEC ID N°: 798   | 2-23                                                    |
| mmu-mir-485                         | SEC ID N°: 799   | 9-30                                                    |

(continuación)

| <b>Secuencias de miARN de ratón</b> |                  |                                                         |
|-------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>Nombre del miARN</b>             | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada en Relación con el Precursor</b> |
| mmu-mir-486                         | SEC ID N°: 800   | 4-25                                                    |

**Tabla 3**

| <b>Secuencias de miARN de rata</b> |                  |                                                         |
|------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>Nombre del miARN</b>            | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada en Relación con el Precursor</b> |
| rno-let-7d                         | SEC ID N°: 394   | 14-34 y/o 68-89                                         |
| rno-mir-7-1                        | SEC ID N°: 395   | 19-39 y/o 61-82                                         |
| rno-let-7a-1                       | SEC ID N°: 396   | 13-34                                                   |
| rno-let-7a-2                       | SEC ID N°: 397   | 17-38                                                   |
| rno-let-7b                         | SEC ID N°: 398   | 7-28                                                    |
| rno-let-7c-1                       | SEC ID N°: 399   | 16-37                                                   |
| rno-let-7c-2                       | SEC ID N°: 400   | 14-35                                                   |
| rno-let-7e                         | SEC ID N°: 401   | 15-35                                                   |
| rno-let-7f-1                       | SEC ID N°: 402   | 8-29                                                    |
| rno-let-7f-2                       | SEC ID N°: 403   | 8-29                                                    |
| rno-let-7i                         | SEC ID N°: 404   | 6-24                                                    |
| rno-mir-7-2                        | SEC ID N°: 405   | 19-39                                                   |
| rno-mir-7b                         | SEC ID N°: 406   | 29-49                                                   |
| rno-mir-9-1                        | SEC ID N°: 407   | 16-38                                                   |
| rno-mir-9-3                        | SEC ID N°: 408   | 16-38                                                   |
| rno-mir-9-2                        | SEC ID N°: 409   | 16-38                                                   |
| rno-mir-10a                        | SEC ID N°: 410   | 22-44                                                   |
| rno-mir-10b                        | SEC ID N°: 411   | 26-47                                                   |
| rno-mir-15b                        | SEC ID N°: 412   | 20-41                                                   |
| rno-mir-16                         | SEC ID N°: 413   | 17-38                                                   |
| rno-mir-17                         | SEC ID N°: 414   | 14-37                                                   |
| rno-mir-18                         | SEC ID N°: 415   | 17-38                                                   |
| rno-mir-19b-1                      | SEC ID N°: 416   | 54-76                                                   |
| rno-mir-19b-2                      | SEC ID N°: 417   | 62-84                                                   |
| rno-mir-19a                        | SEC ID N°: 418   | 49-71                                                   |
| rno-mir-20                         | SEC ID N°: 419   | 16-38 y/o 52-72                                         |

(continuación)

| <b>Secuencias de miARN de rata</b> |                  |                                                         |
|------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>Nombre del miARN</b>            | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada en Relación con el Precursor</b> |
| rno-mir-21                         | SEC ID Nº: 420   | 18-39                                                   |
| rno-mir-22                         | SEC ID Nº: 421   | 57-78                                                   |
| rno-mir-23a                        | SEC ID Nº: 422   | 46-66                                                   |
| rno-mir-23b                        | SEC ID Nº: 423   | 58-80                                                   |
| rno-mir-24-1                       | SEC ID Nº: 424   | 44-65                                                   |
| rno-mir-24-2                       | SEC ID Nº: 425   | 61-82                                                   |
| rno-mir-25                         | SEC ID Nº: 426   | 52-73                                                   |
| rno-mir-26a                        | SEC ID Nº: 427   | 16-37                                                   |
| rno-mir-26b                        | SEC ID Nº: 428   | 15-36                                                   |
| rno-mir-27b                        | SEC ID Nº: 429   | 61-80                                                   |
| rno-mir-27a                        | SEC ID Nº: 430   | 56-76                                                   |
| rno-mir-28                         | SEC ID Nº: 431   | 14-35                                                   |
| rno-mir-29b-2                      | SEC ID Nº: 432   | 52-73                                                   |
| rno-mir-29a                        | SEC ID Nº: 433   | 53-74                                                   |
| rno-mir-29b-1                      | SEC ID Nº: 434   | 51-72                                                   |
| rno-mir-29c                        | SEC ID Nº: 435   | 54-75                                                   |
| rno-mir-30c-1                      | SEC ID Nº: 436   | 17-39                                                   |
| rno-mir-30e                        | SEC ID Nº: 437   | 2-21                                                    |
| rno-mir-30b                        | SEC ID Nº: 438   | 16-36                                                   |
| rno-mir-30d                        | SEC ID Nº: 439   | 12-33                                                   |
| rno-mir-30a                        | SEC ID Nº: 440   | 47-68                                                   |
| rno-mir-30c-2                      | SEC ID Nº: 441   | 14-36                                                   |
| rno-mir-31                         | SEC ID Nº: 442   | 28-49                                                   |
| rno-mir-32                         | SEC ID Nº: 443   | 6-26                                                    |
| rno-mir-33                         | SEC ID Nº: 444   | 6-24                                                    |
| rno-mir-34b                        | SEC ID Nº: 445   | 13-35                                                   |
| rno-mir-34c                        | SEC ID Nº: 446   | 13-35                                                   |
| rno-mir-34a                        | SEC ID Nº: 447   | 20-42                                                   |
| rno-mir-92-1                       | SEC ID Nº: 448   | 48-68                                                   |
| rno-mir-92-2                       | SEC ID Nº: 449   | 55-75                                                   |
| rno-mir-93                         | SEC ID Nº: 450   | 15-37                                                   |

(continuación)

| <b>Secuencias de miARN de rata</b> |                  |                                                         |
|------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>Nombre del miARN</b>            | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada en Relación con el Precursor</b> |
| rno-mir-96                         | SEC ID N°: 451   | 24-46                                                   |
| rno-mir-98                         | SEC ID N°: 452   | 2-23                                                    |
| rno-mir-99a                        | SEC ID N°: 453   | 13-34                                                   |
| rno-mir-99b                        | SEC ID N°: 454   | 7-28                                                    |
| rno-mir-100                        | SEC ID N°: 455   | 13-34                                                   |
| rno-mir-101b                       | SEC ID N°: 456   | 61-82                                                   |
| rno-mir-101                        | SEC ID N°: 457   | 47-68                                                   |
| rno-mir-103-2                      | SEC ID N°: 458   | 52-74                                                   |
| rno-mir-103-1                      | SEC ID N°: 459   | 52-74                                                   |
| rno-mir-106b                       | SEC ID N°: 460   | 12-32                                                   |
| rno-mir-107                        | SEC ID N°: 461   | 52-74                                                   |
| rno-mir-122a                       | SEC ID N°: 462   | 15-37                                                   |
| rno-mir-124a-3                     | SEC ID N°: 463   | 52-73                                                   |
| rno-mir-124a-1                     | SEC ID N°: 464   | 52-73                                                   |
| rno-mir-124a-2                     | SEC ID N°: 465   | 61-82                                                   |
| rno-mir-125a                       | SEC ID N°: 466   | 15-37                                                   |
| rno-mir-125b-1                     | SEC ID N°: 467   | 15-36                                                   |
| rno-mir-125b-2                     | SEC ID N°: 468   | 17-38                                                   |
| rno-mir-126                        | SEC ID N°: 469   | 9-29 y/o 46-66                                          |
| rno-mir-127                        | SEC ID N°: 470   | 57-78                                                   |
| rno-mir-128a                       | SEC ID N°: 471   | 50-71                                                   |
| rno-mir-128b                       | SEC ID N°: 472   | 52-73                                                   |
| rno-mir-129-2                      | SEC ID N°: 473   | 19-40 y/o 61-82                                         |
| rno-mir-129-1                      | SEC ID N°: 474   | 6-27                                                    |
| rno-mir-130a                       | SEC ID N°: 475   | 55-74                                                   |
| rno-mir-130b                       | SEC ID N°: 476   | 51-72                                                   |
| rno-mir-132                        | SEC ID N°: 477   | 59-80                                                   |
| rno-mir-133a                       | SEC ID N°: 478   | 53-74                                                   |
| rno-mir-134                        | SEC ID N°: 479   | 8-28                                                    |
| rno-mir-135b                       | SEC ID N°: 480   | 16-37                                                   |
| rno-mir-135a                       | SEC ID N°: 481   | 23-45                                                   |

(continuación)

| <b>Secuencias de miARN de rata</b> |                  |                                                         |
|------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>Nombre del miARN</b>            | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada en Relación con el Precursor</b> |
| rno-mir-136                        | SEC ID N°: 482   | 15-37                                                   |
| rno-mir-137                        | SEC ID N°: 483   | 60-81                                                   |
| rno-mir-138-2                      | SEC ID N°: 484   | 9-25                                                    |
| rno-mir-138-1                      | SEC ID N°: 485   | 23-39                                                   |
| rno-mir-139                        | SEC ID N°: 486   | 7-24                                                    |
| rno-mir-140                        | SEC ID N°: 487   | 23-43 y/o 61-84                                         |
| rno-mir-141                        | SEC ID N°: 488   | 59-79                                                   |
| rno-mir-142                        | SEC ID N°: 489   | 16-35 y/o 52-74                                         |
| rno-mir-143                        | SEC ID N°: 490   | 60-81                                                   |
| rno-mir-144                        | SEC ID N°: 491   | 50-71                                                   |
| rno-mir-145                        | SEC ID N°: 492   | 16-39                                                   |
| rno-mir-146                        | SEC ID N°: 493   | 17-38                                                   |
| rno-mir-148b                       | SEC ID N°: 494   | 61-82                                                   |
| rno-mir-150                        | SEC ID N°: 495   | 16-37                                                   |
| rno-mir-151                        | SEC ID N°: 496   | 16-37 y/o 50-71                                         |
| rno-mir-152                        | SEC ID N°: 497   | 53-73                                                   |
| rno-mir-153                        | SEC ID N°: 498   | 53-72                                                   |
| rno-mir-154                        | SEC ID N°: 499   | 15-36                                                   |
| rno-mir-181c                       | SEC ID N°: 500   | 24-45                                                   |
| rno-mir-181a                       | SEC ID N°: 501   | 39-61                                                   |
| rno-mir-181b-1                     | SEC ID N°: 502   | 36-59                                                   |
| rno-mir-181b-2                     | SEC ID N°: 503   | 15-38                                                   |
| rno-mir-183                        | SEC ID N°: 504   | 27-49                                                   |
| rno-mir-184                        | SEC ID N°: 505   | 47-68                                                   |
| rno-mir-185                        | SEC ID N°: 506   | 14-31                                                   |
| rno-mir-186                        | SEC ID N°: 507   | 15-37                                                   |
| rno-mir-187                        | SEC ID N°: 508   | 66-86                                                   |
| rno-mir-190                        | SEC ID N°: 509   | 15-36                                                   |
| rno-mir-191                        | SEC ID N°: 510   | 15-36                                                   |
| rno-mir-192                        | SEC ID N°: 511   | 24-44                                                   |
| rno-mir-193                        | SEC ID N°: 512   | 54-74                                                   |

(continuación)

| Secuencias de miARN de rata |                |                                                  |
|-----------------------------|----------------|--------------------------------------------------|
| Nombre del miARN            | Precursor      | Secuencia Procesada en Relación con el Precursor |
| rno-mir-194-1               | SEC ID N°: 513 | 15-36                                            |
| rno-mir-194-2               | SEC ID N°: 514 | 15-36                                            |
| rno-mir-195                 | SEC ID N°: 515 | 15-35                                            |
| rno-mir-196                 | SEC ID N°: 516 | 25-45                                            |
| rno-mir-199a                | SEC ID N°: 517 | 31-53                                            |
| rno-mir-200c                | SEC ID N°: 518 | 46-67                                            |
| rno-mir-200a                | SEC ID N°: 519 | 54-75                                            |
| rno-mir-200b                | SEC ID N°: 520 | 54-77                                            |
| rno-mir-203                 | SEC ID N°: 521 | 52-73                                            |
| rno-mir-204                 | SEC ID N°: 522 | 33-54                                            |
| rno-mir-205                 | SEC ID N°: 523 | 33-54                                            |
| rno-mir-206                 | SEC ID N°: 524 | 51-72                                            |
| rno-mir-208                 | SEC ID N°: 525 | 50-71                                            |
| rno-mir-210                 | SEC ID N°: 526 | 66-86                                            |
| rno-mir-211                 | SEC ID N°: 527 | 26-47                                            |
| rno-mir-212                 | SEC ID N°: 528 | 72-92                                            |
| rno-mir-213                 | SEC ID N°: 529 | 55-76                                            |
| rno-mir-214                 | SEC ID N°: 530 | 71-91                                            |
| rno-mir-216                 | SEC ID N°: 531 | 19-39                                            |
| rno-mir-217                 | SEC ID N°: 532 | 32-55                                            |
| rno-mir-218-2               | SEC ID N°: 533 | 25-45                                            |
| rno-mir-218-1               | SEC ID N°: 534 | 25-45                                            |
| rno-mir-219-1               | SEC ID N°: 535 | 21-41                                            |
| rno-mir-219-2               | SEC ID N°: 536 | 19-39                                            |
| rno-mir-221                 | SEC ID N°: 537 | 65-87                                            |
| rno-mir-222                 | SEC ID N°: 538 | 62-85                                            |
| rno-mir-223                 | SEC ID N°: 539 | 68-88                                            |
| rno-mir-290                 | SEC ID N°: 540 | 14-36                                            |
| rno-mir-291                 | SEC ID N°: 541 | 14-35 y/o 50-72                                  |
| rno-mir-292                 | SEC ID N°: 542 | 12-33 y/o 51-73                                  |
| rno-mir-296                 | SEC ID N°: 543 | 13-33                                            |

(continuación)

| <b>Secuencias de miARN de rata</b> |                  |                                                         |
|------------------------------------|------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>Nombre del miARN</b>            | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada en Relación con el Precursor</b> |
| rno-mir-297                        | SEC ID N°: 544   | 26-48                                                   |
| rno-mir-298                        | SEC ID N°: 545   | 11-32                                                   |
| rno-mir-299                        | SEC ID N°: 546   | 7-28                                                    |
| rno-mir-300                        | SEC ID N°: 547   | 51-72                                                   |
| rno-mir-301                        | SEC ID N°: 548   | 61-85                                                   |
| rno-mir-320                        | SEC ID N°: 549   | 48-70                                                   |
| rno-mir-321                        | SEC ID N°: 550   | 10-30                                                   |
| rno-mir-322                        | SEC ID N°: 551   | 61-80                                                   |
| rno-mir-323                        | SEC ID N°: 552   | 50-71                                                   |
| rno-mir-324                        | SEC ID N°: 553   | 16-38 y/o 51-72                                         |
| rno-mir-325                        | SEC ID N°: 554   | 16-38                                                   |
| rno-mir-326                        | SEC ID N°: 555   | 60-80                                                   |
| rno-mir-328                        | SEC ID N°: 556   | 48-69                                                   |
| rno-mir-329                        | SEC ID N°: 557   | 61-82                                                   |
| rno-mir-330                        | SEC ID N°: 558   | 60-82                                                   |
| rno-mir-331                        | SEC ID N°: 559   | 61-81                                                   |
| rno-mir-333                        | SEC ID N°: 560   | 16-35                                                   |
| rno-mir-336                        | SEC ID N°: 561   | 16-36                                                   |
| rno-mir-337                        | SEC ID N°: 562   | 60-82                                                   |
| rno-mir-338                        | SEC ID N°: 563   | 41-63                                                   |
| rno-mir-339                        | SEC ID N°: 564   | 16-36                                                   |
| rno-mir-341                        | SEC ID N°: 565   | 61-81                                                   |
| rno-mir-342                        | SEC ID N°: 566   | 61-84                                                   |
| rno-mir-344                        | SEC ID N°: 567   | 61-83                                                   |
| rno-mir-345                        | SEC ID N°: 568   | 16-36                                                   |
| rno-mir-346                        | SEC ID N°: 569   | 16-38                                                   |
| rno-mir-349                        | SEC ID N°: 570   | 61-82                                                   |
| rno-mir-350                        | SEC ID N°: 571   | 61-84                                                   |
| rno-mir-351                        | SEC ID N°: 572   | 16-39                                                   |
| rno-mir-352                        | SEC ID N°: 592   | 61-81                                                   |
| rno-mir-421                        | SEC ID N°: 593   | 10-30                                                   |

(continuación)

| Secuencias de miARN de rata |                |                                                  |
|-----------------------------|----------------|--------------------------------------------------|
| Nombre del miARN            | Precursor      | Secuencia Procesada en Relación con el Precursor |
| rno-mir-429                 | SEC ID N°: 700 | 53-74                                            |
| rno-mir-448                 | SEC ID N°: 701 | 72-93                                            |
| rno-mir-449                 | SEC ID N°: 702 | 16-37                                            |
| rno-mir-450                 | SEC ID N°: 703 | 17-38                                            |
| rno-mir-451                 | SEC ID N°: 801 | 17-38                                            |
| rno-mir-483                 | SEC ID N°: 802 | 45-67                                            |

Se entiende que un miARN deriva de secuencias genómicas o un gen. A este respecto, el término “gen” se usa para simplificar para hacer referencia a la secuencia genómica que codifica el miARN precursor para un miARN dado. Sin embargo, las realizaciones de la invención pueden implicar secuencias genómicas de un miARN que están implicadas en su expresión, tales como un promotor u otras secuencias reguladoras.

El término “recombinante” puede usarse y este se refiere en general a una molécula que se ha manipulado *in vitro* o que es el producto replicado o expresado de dicha molécula.

La expresión “ácido nucleico” se conoce bien en la técnica. Un “ácido nucleico” como se usa en el presente documento se referirá en general a una molécula (una o más cadenas) de ADN, ARN o un derivado o análogo de la misma, que comprende una base nitrogenada. Una base nitrogenada incluye, por ejemplo, una base de purina o pirimidina de origen natural hallada en el ADN (por ejemplo, una adenina “A”, una guanina “G”, una timina “T” o una citosina “C”) o ARN (por ejemplo, una A, una G, un uracilo “U” o una C). La expresión “ácido nucleico” abarca los términos “oligonucleótido” y “polinucleótido”, cada uno como un subgénero de la expresión “ácido nucleico”.

El término “miARN” se refiere en general a una molécula monocatenaria, pero en realizaciones específicas, las moléculas implementadas en la invención también abarcarán una región o una cadena adicional que es parcialmente (entre el 10 y el 50 % complementaria a lo largo de la longitud de la cadena), sustancialmente (más del 50 % pero menos del 100 % complementaria a lo largo de la longitud de la cadena) o completamente complementaria de otra región de la misma molécula monocatenaria o de otro ácido nucleico. Por lo tanto, los ácidos nucleicos pueden abarcar una molécula que comprende una o más cadenas complementarias o autocomplementarias o “complemento o complementos” de una secuencia particular que comprende una molécula. Por ejemplo, un miARN precursor puede tener una región autocomplementaria, que es hasta el 100 % complementaria.

Como se usa en el presente documento, se entiende que “hibridación”, “hibrida” o “capaz de hibridar” significa la formación de una molécula bi o tricatenaria o una molécula de naturaleza bi o tricatenaria parcial. El término “atemperar” como se usa en el presente documento es sinónimo de “hibridar”. La expresión “hibridación”, “hibrida o hibridan” o “capaz de hibridar” abarca las expresiones “condición o condiciones rigurosas” o “alta rigurosidad” y las expresiones “baja rigurosidad” o “condición o condiciones de baja rigurosidad”.

Los ácidos nucleicos sintéticos de la invención comprenderán, en algunas realizaciones, la secuencia de miARN de cualquier miARN descrito en SEC ID N°: 1-805, y/o cualquier secuencia con el complemento del mismo. Se contempla que las secuencias de ácidos nucleicos de la invención pueden tener, tener al menos, o tener como máximo 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150 nucleótidos contiguos de SEC ID N°: 1-805 (o cualquier intervalo derivable del mismo), o ser un complemento de los mismos. En otras realizaciones, los ácidos nucleicos son, son al menos o son como máximo 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 % idénticos o complementarios de la secuencia de miARN de SEC ID N°: 1-805 o de la secuencia completa de cualquiera de SEC ID N°: 1-805, o cualquier combinación o intervalo derivable del mismo.

## 1. Bases nitrogenadas

Como se usa en el presente documento una “base nitrogenada” se refiere a una base heterocíclica, tal como por ejemplo una base nitrogenada de origen natural (es decir, una A, T, G, C o U) hallada en al menos un ácido nucleico de origen natural (es decir, ADN y ARN), y un derivado o derivados de origen natural o no natural y análogos de dicha base nitrogenada. Una base nitrogenada generalmente puede formar uno o más enlaces de hidrógeno (“atemperar” o “hibridar”) con al menos una base nitrogenada de origen natural de tal manera que se pueda sustituir la formación de pares de bases nitrogenadas de origen natural (por ejemplo, el enlace de hidrógeno entre A y T, G y C y A y U).

La base o las bases nitrogenadas “purina” y/o “pirimidina” abarcan bases nitrogenadas de purina y/o pirimidina de origen natural y también derivado o derivados y análogo o análogos de las mismas, incluyendo pero sin limitación, las de una purina o pirimidina sustituida por uno o más de un resto de alquilo, carboxialquilo, amino, hidroxilo, halógeno (es decir, flúor, cloro, bromo o yodo), tiol o alquiltiol. Los restos alquilo preferidos (por ejemplo, alquilo, carboxialquilo, etc.) comprenden de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, a aproximadamente 6 átomos de carbono. Otros ejemplos no limitantes de una purina o pirimidina incluyen una desazapurina, una 2,6-diaminopurina, un 5-fluorouracilo, una xantina, una hipoxantina, una 8-bromoguanina, una 8-cloroguanina, una bromotimina, una 8-aminoguanina, una 8-hidroxiguanina, una 8-metilguanina, una 8-tioguanina, una azaguanina, una 2-aminopurina, una 5-etilcitosina, una 5-metilcitosina, un 5-bromouracilo, un 5-etiluracilo, un 5-yodouracilo, un 5-clouracilo, un 5-propiluracilo, un tiouracilo, una 2-metiladenina, una metiltioadenina, una *N,N*-dimetiladenina, una azaadenina, una 8-bromoadenina, una 8-hidroxiadenina, una 6-hidroxiaminopurina, una 6-tiopurina, una 4-(6-aminoheptil)citosina y similares. Otros ejemplos se conocen bien por los expertos en la materia.

Una base nitrogenada puede estar comprendida en un nucleósido o nucleótido, usando cualquier procedimiento de síntesis químico o natural descrito en el presente documento o conocido por un experto habitual en la materia. Dicha base nitrogenada pueden estar marcada o puede ser parte de una molécula que está marcada y contiene la base nitrogenada.

## 2. Nucleósidos

Como se usa en el presente documento, un “nucleósido” se refiere a una unidad química individual que comprende una base nitrogenada unida covalentemente con un resto de engarce de base nitrogenada. Un ejemplo no limitante de “restos de engarce de base nitrogenada” es un azúcar que comprende 5 átomos de carbono (es decir, un “azúcar de 5 carbonos”), incluyendo pero sin limitación una desoxirribosa, una ribosa, una arabinosa o un derivado o un análogo de un azúcar de 5 carbonos. Los ejemplos no limitantes de un derivado o un análogo de un azúcar de 5 carbonos incluyen una 2'-fluoro- 2'-desoxirribosa o un azúcar carbocíclico en el que un carbono sustituye un átomo de oxígeno en el anillo de azúcar.

Se conocen en la técnica diferentes tipos de unión o uniones covalentes de una base nitrogenada con un resto de engarce de base nitrogenada. Como ejemplo no limitante, un nucleósido que comprende una purina (es decir, A o G) o una base nitrogenada de 7-desazapurina une covalentemente típicamente la posición 9 de una purina o una 7-desazapurina con la posición 1' de un azúcar de 5 carbonos. En otro ejemplo no limitante, un nucleósido que comprende una base nitrogenada de pirimidina (es decir, C, T o U) típicamente une covalentemente una posición 1 de una pirimidina con una posición 1' de un azúcar de 5 carbonos (Kornberg y Baker, 1992).

## 3. Nucleótidos

Como se usa en el presente documento, un “nucleótido” se refiere a un nucleósido que comprende además un “resto de cadena principal”. Un resto de cadena principal generalmente une covalentemente un nucleótido con otra molécula que comprende un nucleótido o con otro nucleótido para formar un ácido nucleico. El “resto de cadena principal” en nucleótidos de origen natural típicamente comprende un resto de fósforo, que se une covalentemente con un azúcar de 5 carbonos. La unión del resto de cadena principal sucede típicamente en la posición 3' o 5' del azúcar de 5 carbonos. Sin embargo, se conocen en la técnica otros tipos de uniones, particularmente cuando un nucleótido comprende derivados o análogos de un azúcar de 5 carbonos o resto de fósforo de origen natural.

## 4. Análogos de ácido nucleico

Un ácido nucleico puede comprender, o estar compuesto completamente de, un derivado o análogo de una base nitrogenada, un resto de engarce de base nitrogenada y/o resto de cadena principal que puede estar presente en un ácido nucleico de origen natural. El ARN con análogos de ácido nucleico también puede marcarse de acuerdo con procedimientos de la invención. Como se usa en el presente documento un “derivado” se refiere a una forma alterada o modificada químicamente de una molécula de origen natural, mientras que los términos “mimético” o “análogo” se refieren a una molécula que puede asemejarse o no estructuralmente a una molécula o resto de origen natural, pero posee funciones similares. Como se usa en el presente documento, un “resto” se refiere en general a un componente químico o molecular más pequeño de una estructura química o molecular mayor. Se conocen bien en la técnica análogos o derivados de bases nitrogenadas, nucleósidos y nucleótidos, y se han descrito (véase por ejemplo, Scheit, 1980, incorporado en el presente documento por referencia).

Los ejemplos no limitantes adicionales de nucleósidos, nucleótidos o ácidos nucleicos que comprenden un azúcar de 5 carbonos y/o derivados o análogos de restos de cadena principal, incluyen los de: Patente de Estados Unidos N° 5.681.947, que describe oligonucleótidos que comprenden derivados de purina que forma triples hélices con y/o evitan la expresión de ADNbc; Patentes de Estados Unidos 5.652.099 y 5.763.167, que describen ácidos nucleicos que incorporan análogos fluorescentes de nucleósidos hallados en ADN o ARN, particularmente para su uso como sondas de ácidos nucleicos fluorescentes; Patente de Estados Unidos 5.614.617, que describe análogos de oligonucleótidos con sustituciones en anillos de pirimidina que poseen estabilidad de nucleasa potenciada; Patentes de Estados Unidos 5.670.663, 5.872.232 y 5.859.221, que describen análogos de oligonucleótidos con azúcares de 5 carbonos modificados (es decir, restos de 2'-desoxifuranosilo modificados) usados en la detección de ácido nucleico; Patente de Estados Unidos 5.446.137, que describe oligonucleótidos que comprenden al menos un resto de azúcar de 5 carbonos sustituido en la posición 4' con un sustituyente distinto de hidrógeno que puede usarse en ensayos de hibridación; Patente de Estados Unidos 5.886.165, que describe oligonucleótidos tanto con desoxirribonucleótidos con enlaces internucleotídicos 3'-5' como con ribonucleótidos con enlaces internucleotídicos 2'-5'; Patente de Estados Unidos 5.714.606, que describe un enlace internucleotídico modificado en el que un oxígeno en la posición 3' del enlace internucleotídico se reemplaza por un carbono para potenciar la resistencia a nucleasa de los ácidos nucleicos; Patente de Estados Unidos 5.672.697, que describe oligonucleótidos que contienen uno o más enlaces internucleotídicos de 5' metilfosfonato que potencian la resistencia a nucleasa; Patente de Estados Unidos 5.466.786 y 5.792.847, que describen el enlace de un resto sustituyente que puede comprender un fármaco o marcador con el carbono 2' de un oligonucleótido para proporcionar estabilidad de nucleasa potenciada y capacidad para suministrar fármacos o restos de detección; Patente de Estados Unidos 5.223.618, que describe análogos de oligonucleótidos con un enlace de cadena principal de 2 o 3 carbonos que unen la posición 4' y posición 3' de resto de azúcar de 5 carbonos adyacente para potenciar la captación celular, resistencia a nucleasas e hibridación con ARN diana; Patente de Estados Unidos 5.470.967, que describe oligonucleótidos que comprenden al menos un enlace internucleotídico sulfamato o sulfamida que son útiles como sondas de hibridación de ácido nucleico; Patente de Estados Unidos 5.378.825, 5.777.092, 5.623.070, 5.610.289 y 5.602.240, que describen oligonucleótidos con un resto de engarce de tres o cuatro átomos que reemplaza el resto de cadena principal de fosfodiéster usado para mejora de la resistencia a nucleasa, captación celular y regulación de la expresión de ARN; Patente de Estados Unidos 5.858.988, que describe un agente vehículo hidrófobo unido con la posición 2'-O de oligonucleótidos para potenciar su permeabilidad de membrana y estabilidad; Patente de Estados Unidos 5.214.136, que describe oligonucleótidos conjugados con antraquinona en el extremo 5' terminal que poseen hibridación potenciada con ADN o ARN; estabilidad potenciada frente a nucleasas; Patente de Estados Unidos 5.700.922, que describe quimeras de APN-ADN-APN en las que el ADN comprende nucleótidos 2'-desoxi-eritropentofuranosilo para potenciación de la resistencia a nucleasa, afinidad de unión y capacidad para activar la RNasa H; y Patente de Estados Unidos 5.708.154, que describe ARN unido a un ADN para formar un híbrido de ADN-ARN; Patente de Estados Unidos 5.728.525, que describe el marcaje de análogos de nucleósidos con un marcador fluorescente universal.

Son enseñanzas adicionales para análogos de nucleósidos y análogos de ácido nucleico la Patente de Estados Unidos 5.728.525, que describe análogos de nucleósidos que están marcados en sus extremos; Patente de Estados Unidos 5.637.683, 6.251.666 (sustituciones de L-nucleótidos), y 5.480.980 (nucleótidos 7-desaza-2'-desoxiguanosina y análogos de ácido nucleico de los mismos).

El uso de otros análogos se contempla específicamente para su uso en el contexto de la presente invención. Dichos análogos pueden usarse en moléculas de ácido nucleico sintéticas de la invención, tanto mediante la molécula como en nucleótidos seleccionados. Incluyen, pero sin limitación, 1) modificaciones de ribosa (tales como 2'F, 2'NH<sub>2</sub>, 2'N<sub>3</sub>, 4'tio o 2' O-CH<sub>3</sub>) y 2) modificaciones de fosfato (tales como las halladas en fosforotioatos, metil fosfonatos, y fosforoboratos). Dichos análogos se han creado para conferir estabilidad en ARN reduciendo o eliminando su capacidad para escindir por ribonucleasas. Cuando estos análogos de nucleótidos están presentes en ARN, pueden tener efectos profundamente positivos en la estabilidad de los ARN en animales. Se contempla que el uso de análogos de nucleótidos puede usarse solo o junto con cualquiera de las modificaciones de diseño de un miARN sintético de cualquier ácido nucleico de la invención.

## 5. Nucleótidos modificados

Tanto los miARN como inhibidores de miARN sintéticos de la invención contemplan específicamente el uso de nucleótidos que se modifican para potenciar sus actividades. Dichos nucleótidos incluyen los que están en el extremo 5' o 3' del ARN así como los que están internos dentro de la molécula. Los nucleótidos modificados usados en las cadenas complementarias de miARN sintéticos bloquean el 5'OH o fosfato del ARN o introducen modificaciones de azúcares internos que potencian la captación de la cadena activa del miARN sintético. Las modificaciones para los inhibidores de miARN incluyen modificaciones de azúcares internas que potencian la hibridación así como estabilizan las moléculas en células y modificaciones terminales que estabilizan adicionalmente los ácidos nucleicos en células. Se contemplan además modificaciones que pueden detectarse por microscopia u otros procedimientos para identificar células que contienen los miARN o inhibidores de miARN sintéticos.

## B. Preparación de ácidos nucleicos

Un ácido nucleico puede realizarse por cualquier técnica conocida por un experto habitual en la materia, tal como por ejemplo, síntesis química, producción enzimática o producción biológica. Aunque podrían producirse miARN sintéticos de acuerdo con la invención usando procedimientos recombinantes, se prefiere producir miARN sintéticos por síntesis química o producción enzimática. De forma similar, los inhibidores de miARN se producen preferentemente por síntesis química o producción enzimática. Puede producirse miARN no sintéticos por varios procedimientos, incluyendo procedimientos que implican tecnología de ADN recombinante.

Se realiza síntesis de ácido nucleico de acuerdo con procedimientos convencionales. Véase, por ejemplo, Itakura y Riggs (1980). Adicionalmente, la Patente de Estados Unidos 4.704.362, Patente de Estados Unidos 5.221.619 y Patente de Estados Unidos 5.583.013 describen cada una diversos procedimientos para preparar ácidos nucleicos sintéticos. Los ejemplos no limitantes de un ácido nucleico sintético (por ejemplo, un oligonucleótido sintético), incluyen un ácido nucleico preparado por síntesis química *in vitro* usando química de fosfotriéster, fosfito o fosforamidita y técnicas de fase sólida tales como se describen en el documento EP 266.032, incorporado en el presente documento por referencia, o mediante intermedios de desoxinucleósido H-fosfonato como se describe en Froehler y col., 1986 y Patente de Estados Unidos N° de Serie 5.705.629. En los procedimientos de la presente invención, pueden usarse uno o más oligonucleótidos. Se han desvelado diversos mecanismos diferentes de síntesis de oligonucleótidos en, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos 4.659.774, 4.816.571, 5.141.813, 5.264.566, 4.959.463, 5.428.148, 5.554.744, 5.574.146, 5.602.244.

Un ejemplo no limitante de un ácido nucleico producido de forma enzimática incluye uno producido por enzimas en reacciones de amplificación tales como PCR™ (véase por ejemplo, Patente de Estados Unidos 4.683.202 y Patente de Estados Unidos 4.682.195, cada una incorporada en el presente documento por referencia), o la síntesis de un oligonucleótido descrito en la Patente de Estados Unidos N° 5.645.897, incorporado en el presente documento por referencia.

La síntesis de oligonucleótidos se conoce bien por los expertos en la materia. Se han desvelado diversos mecanismos diferentes de síntesis de oligonucleótidos, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos 4.659.774, 4.816.571, 5.141.813, 5.264.566, 4.959.463, 5.428.148, 5.554.744, 5.574.146, 5.602.244.

Básicamente, puede conseguirse síntesis química por el procedimiento de diéster, el procedimiento de triéster, el procedimiento de polinucleótidos fosforilasa y por química de fase sólida. Estos procedimientos se analizan en más detalles posteriormente.

**Procedimiento de diéster.** El procedimiento de diéster fue el primero en desarrollarse hasta un estado utilizable, principalmente por Khorana y colaboradores (Khorana, 1979). La etapa básica es la unión de dos desoxinucleótidos protegidos de forma adecuada para formar un didesoxinucleótido que contiene un enlace fosfodiéster. El procedimiento de diéster está bien establecido y se ha usado para sintetizar moléculas de ADN (Khorana, 1979).

**Procedimiento de triéster.** La principal diferencia entre los procedimientos de diéster y triéster es la presencia en este último de un grupo protector extra en los átomos de fosfato de los reactivos y productos (Itakura y col., 1975). El grupo protector de fosfato es habitualmente un grupo de clorfenilo, que hace a los nucleótidos e intermedios polinucleotídicos solubles en disolventes orgánicos. Por lo tanto la purificación se realiza en soluciones de cloroformo. Otras mejoras del procedimiento incluyen (i) el acoplamiento en bloque de trímeros y oligómeros mayores, (ii) el uso extensivo de cromatografía líquida de alto rendimiento para la purificación de productos tanto intermedios como finales, y (iii) síntesis de fase sólida.

**Procedimiento de polinucleótido fosforilasa.** Este es un procedimiento enzimático de síntesis de ADN que puede usarse para sintetizar muchos oligonucleótidos útiles (Gillam y col., 1978; Gillam y col., 1979). En condiciones controladas, la polinucleótido fosforilasa añade predominantemente un único nucleótido a un oligonucleótido corto. La purificación cromatográfica permite obtener el aducto individual deseado. Se requiere al menos un trímero para comenzar el procedimiento, y este cebador debe obtenerse por algún otro procedimiento. El procedimiento de la polinucleótido fosforilasa funciona y tiene la ventaja de que la mayoría de los bioquímicos están familiarizados con los procedimientos implicados.

**Procedimientos de fase sólida.** A partir de la tecnología desarrollada para la síntesis de fase sólida de los polipéptidos, ha sido posible unir el nucleótido inicial con material de soporte sólido y continuar con la adición por etapas de nucleótidos. Todas las etapas de mezcla y lavado se simplifican, y el procedimiento se hace susceptible a automatización. Estas síntesis se llevan a cabo ahora de forma rutinaria usando sintetizadores de ácidos nucleicos automáticos.

La química de fosforamidita (Beaucage y Lyer, 1992) se ha convertido de lejos en la química de acoplamiento más ampliamente usada para la síntesis de oligonucleótidos. Como se conoce bien por los expertos en la materia, la síntesis de fosforamidita de oligonucleótidos implica la activación de precursores monoméricos de nucleósido fosforamidita mediante reacción con un agente activador para formar intermedios activados, seguido de adición secuencial de los intermedios activados a la cadena oligonucleotídica creciente (generalmente anclada en un extremo de un soporte sólido adecuado) para formar el producto oligonucleotídico.

**Procedimientos recombinantes.** Se conocen bien por los expertos en la materia procedimientos recombinantes para producir ácidos nucleicos en una célula. Estos incluyen el uso de vectores, plásmidos, cósmidos y otros vehículos para suministrar un ácido nucleico a una célula, que puede ser la célula diana o simplemente una célula huésped (para producir grandes cantidades de la molécula de ARN deseada). Como alternativa, dichos vehículos pueden usarse en el contexto de un sistema sin células siempre que los reactivos para generar la molécula de ARN estén presentes. Dichos procedimientos incluyen los descritos en Sambrook, 2003, Sambrook, 2001 y Sambrook, 1989, que se incorporan por la presente por referencia.

En ciertas realizaciones, la presente invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que no son sintéticas. En algunas realizaciones, la molécula de ácido nucleico tiene una estructura química de un ácido nucleico de origen natural y una secuencia de un ácido nucleico de origen natural, tal como la secuencia exacta y completa de un miARN primario monocatenario (véase Lee 2002), un miARN precursor monocatenario o un miARN maduro monocatenario. Además del uso de tecnología recombinante, dichos ácidos nucleicos no sintéticos pueden generarse químicamente, tal como empleando tecnología usada para crear oligonucleótidos.

### C. Diseño de miARN sintéticos

Los miARN sintéticos típicamente comprenden dos cadenas, una cadena activa que es idéntica en secuencia al miARN maduro que se estudia y una cadena complementaria que es al menos parcialmente complementaria de la cadena activa. La cadena activa es la molécula biológicamente relevante y debería captarse preferentemente por el complejo en células que modulan la traducción bien mediante degradación de ARNm o bien mediante control de la traducción. La captación preferente de la cadena activa tiene dos resultados importantes: (1) la actividad observada del miARN sintético aumenta drásticamente y (2) se eliminan esencialmente los efectos no pretendidos inducidos por la captación y activación de la cadena complementaria. De acuerdo con la invención, pueden usarse varios diseños de miARN sintético para asegurar la captación preferente de la cadena activa.

**Agente de bloqueo 5'.** La introducción de un resto estable distinto de fosfato o hidroxilo en el extremo 5' de la cadena complementaria altera su actividad en la ruta de miARN. Esto asegura que solamente la cadena activa del miARN sintético se usará para regular la traducción en la célula. Las modificaciones 5' incluyen, pero sin limitación, NH<sub>2</sub>, biotina, un grupo amina, un grupo alquilamina inferior, un grupo acetilo, 2'-O-Me, DMT0, fluoresceína, un tiol o acridina o cualquier otro grupo con este tipo de funcionalidad.

**Otras modificaciones de cadena con sentido.** La introducción de modificaciones de nucleótidos como 2'-OMe, NH<sub>2</sub>, biotina, un grupo amina, un grupo alquilamina inferior, un grupo acetilo, DMT0, fluoresceína, un tiol o acridina o cualquier otro grupo con este tipo de funcionalidad en la cadena complementaria del miARN sintético puede eliminar la actividad de la cadena complementaria y potenciar la captación de la cadena activa del miARN.

**Desapareamientos de bases en la cadena con sentido.** Como con ARNip (Schwarz 2003), la estabilidad relativa de los extremos 5' y 3' de la cadena activa del miARN sintético determina aparentemente la captación y activación de la activa por la ruta de miARN. La desestabilización del extremo 5' de la cadena activa del miARN sintético por la colocación estratégica de desapareamientos de bases en el extremo 3' de la cadena complementaria del miARN sintético potencia la actividad de la cadena activa y elimina esencialmente la actividad de la cadena complementaria.

### E. Marcadores y etiquetas

Los miARN sintéticos pueden marcarse con un marcador o etiqueta radiactivo, enzimático, colorimétrico u otro para fines de detección o aislamiento. Los ácidos nucleicos pueden marcarse con fluorescencia en algunas realizaciones de la invención. Los marcadores fluorescentes contemplados para su uso como conjugados incluyen, pero sin limitación, Alexa 350, Alexa 430, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, Cascade Blue, Cy3, Cy5, 6-FAM, Fluoresceína Isotiocianato, HEX, 6-JOE, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, REG, Verde de Rodamina, Rojo de Rodamina, Renographin, ROX, SYPRO, TAMRA, TET, Tetrametilrodamina y/o Texas Red.

Se contempla que los miARN sintéticos pueden marcarse con dos marcadores diferentes. Además, puede emplearse transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (TERF) en procedimientos de la invención (por ejemplo, Klostermeier y col., 2002; Emptage, 2001; Didenko, 2001).

Están fácilmente disponibles varias técnicas para visualizar o detectar ácidos nucleicos marcados. La referencia de Stanley T. Crooke, 2000 tiene un análisis de dichas técnicas (Capítulo 6) que se incorpora por referencia. Dichas técnicas incluyen microscopia, matrices, fluorometría, cicladores luminícos u otras máquinas de PCR<sup>TM</sup> en tiempo real, análisis de FACS, contadores de centelleo, Phosphorimager, contadores Geiger, MRI, CAT, procedimientos de detección basados en anticuerpos (Western, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica), técnicas histoquímicas, HPLC (Griffey y col., 1997, espectroscopia, electroforesis en gel capilar (Cummins y col., 1996), espectroscopia; espectroscopia de masas; técnicas radiológicas; y técnicas de equilibrio de masas. Como alternativa, pueden marcarse o etiquetarse ácidos nucleicos para permitir su aislamiento eficaz. En otras realizaciones de la invención, se biotinilan ácidos nucleicos.

## F. Procedimientos de suministro

La presente invención implica en algunas realizaciones suministrar un ácido nucleico a una célula.

Las moléculas de ARN pueden codificarse por una molécula de ácido nucleico comprendida en un vector. El término “vector” se usa para hacer referencia a una molécula de ácido nucleico vehículo en la que puede insertarse una secuencia de ácido nucleico para introducción en una célula en la que puede replicarse. Una secuencia de ácido nucleico puede ser “exógena”, lo que significa que es ajena a la célula en la que se introduce el vector o que la secuencia es homóloga de una secuencia en la célula pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula huésped en la que la secuencia no se encuentra habitualmente. Los vectores incluyen plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófagos, virus animales y virus vegetales), y cromosomas artificiales (por ejemplo, YAC). Un experto en la materia estaría bien equipado para construir un vector mediante técnicas recombinantes convencionales, que se describen en Sambrook y col., 1989 y Ausubel y col., 1996. Además de codificar un polipéptido modificado tal como gelonina modificada, un vector puede codificar secuencias polipeptídicas no modificadas tales como una etiqueta o molécula de dirección. Una molécula de dirección es una que dirige el ácido nucleico deseado a un órgano, tejido, célula particular u otra localización en el cuerpo de un sujeto.

La expresión “vector de expresión” se refiere a un vector que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos parte de un producto génico capaz de transcribirse. Los vectores de expresión pueden contener una diversidad de “secuencias de control”, que se refieren a secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y posiblemente traducción de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped particular. Además de secuencias de control que gobiernan la transcripción y traducción, los vectores y vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que cumplen otras funciones también y se describen.

Hay varias maneras en las que los vectores de expresión pueden introducirse en células. En ciertas realizaciones de la invención, el vector de expresión comprende un virus o vector modificado por ingeniería genética derivado de un genoma viral. La capacidad de ciertos virus para entrar en células mediante endocitosis mediada por receptor, para integrarse en el genoma de la célula huésped y expresar genes virales de forma estable y eficazmente los hacen candidatos atractivos para transferencia de genes ajenos en células de mamífero (Ridgeway, 1988; Nicolas y Rubenstein, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Temin, 1986). Los primeros virus usados como vectores génicos fueron virus de ADN incluyendo los papovavirus (virus de simio 40, virus del papiloma bovino y poliovirus) (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986) y adenovirus (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986). Estos tienen una capacidad relativamente baja para secuencias de ADN ajenas y tienen un espectro de huéspedes restringido. Además, su potencial oncogénico y efectos citopáticos en células permisivas plantean preocupaciones de seguridad. Pueden alojar solamente hasta 8 kb de material génico ajeno pero pueden introducirse fácilmente en una diversidad de líneas celulares y animales de laboratorio (Nicolas y Rubenstein, 1988; Temin, 1986).

Los retrovirus son un grupo de virus de ARN monocatenarios caracterizados por una capacidad para convertir su ARN en ADN bicatenario en células infectadas; también pueden usarse como vectores. Otros vectores virales pueden emplearse como construcciones de expresión en la presente invención. Pueden emplearse vectores derivados de virus tales como virus vaccinia (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar y col., 1988), virus adenoasociados (AAV) (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Hermonat y Muzycska, 1984) y virus del herpes. Ofrecen varias características atractivas para diversas células de mamífero (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar y col., 1988; Horwich y col., 1990).

Se cree que otros procedimientos adecuados para suministro de ácidos nucleicos para efectuar la expresión de composiciones de la presente invención incluyen prácticamente cualquier procedimiento por el que puede introducirse un ácido nucleico (por ejemplo, ADN, incluyendo vectores virales y no virales) en un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo, como se describe en el presente documento o como se conocería por un experto habitual en la materia. Dichos procedimientos incluyen, pero sin limitación, suministro directo de ADN tal como por inyección (Patentes de Estados Unidos N° 5.994.624, 5.981.274, 5.945.100, 5.780.448, 5.736.524, 5.702.932, 5.656.610, 5.589.466 y 5.580.859), incluyendo microinyección (Harlan y Weintraub, 1985; Patente de Estados Unidos N° 5.789.215); por electroporación (Patente de Estados Unidos N° 5.384.253); por precipitación con fosfato cálcico (Graham y Van Der Eb, 1973; Chen y Okayama, 1987; Rippe y col., 1990); usando DEAE-dextrano seguido de polietilenglicol (Gopal, 1985); por carga sónica directa (Fechheimer y col., 1987); por transfección mediada por liposoma (Nicolau y Sene, 1982; Fraley y col., 1979; Nicolau y col., 1987; Wong y col., 1980; Kaneda y col., 1989; Kato y col., 1991); por bombardeo de microproyectiles (Solicitud de PCT N° WO 94/09699 y 95/06128; Patentes de Estados Unidos N° 5.610.042; 5.322.783, 5.563.055, 5.550.318, 5.538.877 y 5.538.880); por agitación con fibras de carburo de silicio (Kaepler y col., 1990; Patentes de Estados Unidos N° 5.302.523 y 5.464.765); por transformación mediada por *Agrobacterium* (Patentes de Estados Unidos N° 5.591.616 y 5.563.055); o por transformación mediada por PEG de protoplastos (Omirulleh y col., 1993; Patentes de Estados Unidos N° 4.684.611 y 4.952.500); por captación de ADN mediada por desecación/inhibición (Potrykus y col., 1985). Mediante la aplicación de técnicas tales como estas, pueden transformarse de forma estable o transitoria orgánulo u orgánulos, célula o células, tejido o tejidos u organismo u organismos.

## B. Suministro de miARN sintéticos

Se cree que los procedimientos adecuados para suministro de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención incluyen prácticamente cualquier procedimiento por el que puede introducirse un ácido nucleico (por ejemplo, ADN, ARN, incluyendo vectores virales y no virales) en un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo, como se describe en el presente documento o como se conocería por un experto habitual en la materia. Dichos procedimientos incluyen, pero sin limitación, suministro directo de ácidos nucleicos tal como por inyección (Patente de Estados Unidos 5.994.624, 5.981.274, 5.945.100, 5.780.448, 5.736.524, 5.702.932, 5.656.610, 5.589.466 y 5.580.859), incluyendo microinyección (Harland y Weintraub, 1985; Patente de Estados Unidos 5.789.215); por electroporación (Patente de Estados Unidos N° 5.384.253); por precipitación con fosfato cálcico (Graham y Van Der Eb, 1973; Chen y Okayama, 1987; Rippe y col., 1990); usando DEAE-dextrano seguido de polietilenglicol (Gopal, 1985); por carga sónica directa (Fechheimer y col., 1987); por transfección mediada por liposomas (Nicolau y Sene, 1982; *Fraley* y col., 1979; Nicolau y col., 1987; Wong y col., 1980; Kaneda y col., 1989; Kato y col., 1991); por bombardeo de microproyectiles (Publicación de Solicitud de PCT N° WO 94/09699 y 95/06128; Patentes de Estados Unidos 5.610.042; 5.322.783, 5.563.055, 5.550.318, 5.538.877 y 5.538.880); por agitación con fibras de carburo de silicio (Kaepler y col., 1990; Patentes de Estados Unidos 5.302.523 y 5.464.765); por transformación mediada por *Agrobacterium* (Patentes de Estados Unidos 5.591.616 y 5.563.055); o por transformación mediada por PEG de protoplastos (Omriulleh y col., 1993; Patentes de Estados Unidos 4.684.611 y 4.952.500); por captación de ADN mediada por desecación/inhibición (Potrykus y col., 1985). Mediante la aplicación de técnicas tales como estas, pueden transformarse de forma estable o transitoria un orgánulo u orgánulos, célula o células, tejido o tejidos u organismo u organismos.

Se ha unido una diversidad de compuestos a los extremos de oligonucleótidos para facilitar su transporte a través de membranas celulares. Se ha descubierto que péptidos señal cortos hallados en la TAT de VIH, VP22 de VHS, *antennapedia* de *Drosophila*, y otras proteínas permiten la transferencia rápida de biomoléculas a través de membranas (revisado en Schwarze 2000). Estos péptidos señal, denominados Dominios de Transducción de Proteínas (PTD), se han unido a los oligonucleótidos para facilitar su suministro a células cultivadas. Se han conjugado colesteroles con oligonucleótidos para mejorar su captación en células en animales (MacKellar 1992). Los grupos de colesterol terminales interaccionan aparentemente con receptores o lípidos en la superficies de células y facilitan la internalización de los oligonucleótidos modificados. De forma similar, se ha conjugado poli-1-lisina con oligonucleótidos para reducir la carga negativa neta y mejorar la captación en células (Leonetti 1990).

Se han desarrollado una diversidad de compuestos que forman complejo con ácidos nucleicos, los suministran a superficies de células, y facilitan su captación y liberación de endosomas. Entre estos están: (1) una diversidad de lípidos tales como DOTAP (y otro lípido catiónico), DDAB, DHDEAB y DOPE y (2) polímeros no basados en lípidos como polietilenimina, poliamidoamina y dendrímeros de estos y otros polímeros. En algunas de estas realizaciones, se emplea una combinación de lípidos tales como DOTAP y colesterol o un derivado de colesterol (Patente de Estados Unidos 6.770.291). Se ha mostrado que varios de estos reactivos facilitan la captación de ácido nucleico en animales.

Los componentes celulares implicados en la ruta de miARN se están haciendo conocidos. Las proteínas que estabilizan y/o transportan miARN dentro de células podrían potenciar la estabilidad de actividad de miARN debido a que protegerían y guiarían los miARN unidos una vez que están en las células. Las mezclas de proteínas transportadoras de miARN y miARN podrían potenciar la eficacia de productos terapéuticos basados en miARN.

Los ARN son moléculas hidrófilas en virtud de su cadena principal de azúcar y fosfato aniónico. Aunque las bases nitrogenadas son hidrófobas, la hidrofilia domina debido a los enlaces de hidrógeno extensivos resultantes de los restos de fosfato y azúcar. La cadena principal de carácter hidrófilo y aniónica reduce la permeación celular. Se ha mostrado que la conjugación de grupos lipófilos como colesterol (Manoharan, 2002) y derivados de ácido láurico y litocólico con funcionalidad C32 (Lorenz y col., 2004), mejora la captación celular. Además la unión de oligonucleótidos conjugados con esteroides con lipoproteínas diferentes en el torrente sanguíneo, tales como LDL, protege su integridad y domina su biodistribución (Rump y col., 2000). También se ha mostrado que el colesterol unido a moléculas antisentido (Bijsterbosch y col., 2001) y aptámeros (Rusconi y col., 2004) estabiliza oligonucleótidos permitiendo la unión con lipoproteínas. Se ha demostrado que el colesterol potencia la captación y estabilidad en suero de ARNip *in vitro* (Lorenz y col., 2004) e *in vivo* (Soutschek y col., 2004). Adicionalmente, varias moléculas pequeñas como SB-435495 (Blackie y col., (2002), Isradipina (Oravcova y col., 1994), amlodipina (Oravcova y col., 1994) y 2,2',4,4',5,5'-hexaclorobifenilo (Borlakoglu y col., 1990) podrían potenciar la captación celular, y mejorar la resistencia a nucleasa promoviendo la asociación con lipoproteínas.

### 1. Nucleótidos para marcar

Los nucleótidos para marcar no son nucleótidos de origen natural, sino que en su lugar se refieren a nucleótidos preparados que tienen un resto reactivo en ellos. Las funcionalidades reactivas específicas de interés incluyen: amino, sulfhidrilo, sulfoxilo, amino-sulfhidrilo, azido, epóxido, isotiocianato, isocianato, anhídrido, monoclorotriacina, diclorotriacina, piridina mono o dihalógeno sustituida, diacina mono o disustituida, maleimida, epóxido, aciridina, sulfonil haluro, haluro ácido, alquil haluro, aril haluro, alquilsulfonato, *N*-hidroxisuccinimida éster, imido éster, hidracina, azidonitrofenilo, azida, 3-(2-piridilditio)-propionamida, glioxal, aldehído, yodoacetilo, cianometil éster, *p*-

nitrofenil éster, o-nitrofenil éster, hidroxipiridina éster, carbonil imidazol y los otros grupos químicos similares. En algunas realizaciones, la funcionalidad reactiva puede unirse directamente a un nucleótido, o puede unirse con el nucleótido mediante un grupo de enlace. El resto funcional y cualquier engarce no pueden alterar sustancialmente la capacidad del nucleótido para añadir al miARN o para marcar. Los grupos de enlace representativos incluyen grupos de enlace que contienen carbono, que varían típicamente de aproximadamente 2 a 18, habitualmente de aproximadamente 2 a 8 átomos de carbono, en los que los grupos de enlace que contienen carbono pueden incluir o no uno o más heteroátomos, por ejemplo S, O, N etc., y pueden incluir o no uno o más sitios de insaturación. Son de particular interés en muchas realizaciones grupos de enlace alquilo, típicamente grupos de enlace alquilo inferior de 1 a 16, habitualmente de 1 a 4 átomos de carbono, en los que los grupos de enlace pueden incluir uno o más sitios de insaturación. Los nucleótidos funcionalizados (o cebadores) usados en los procedimientos anteriores de generación de diana funcionalizada pueden fabricarse usando protocolos conocidos u obtenidos de proveedores comerciales, por ejemplo, Sigma, Roche, Ambion, y NEN. Pueden prepararse grupos funcionales de acuerdo con modos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo la información representativa hallada en las Patentes de Estados Unidos N° 4.404.289; 4.405.711; 4.337.063 y 5.268.486, y Patente Br. N° 1.529.202.

Se usan nucleótidos modificados con amina en varias realizaciones de la invención. El nucleótido modificado con amina es un nucleótido que tiene un grupo amina reactivo para unión en el marcador. Se contempla que puede modificarse cualquier ribonucleótido (G, A, U o C) o desoxirribonucleótido (G, A, T o C) para marcaje. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, los siguientes ribo y desoxirribonucleótidos modificados: 5-(3-aminoalil)-UTP; 8-[(4-amino)butil]-amino-ATP y 8-[(6-amino)butil]-amino-ATP; N<sup>6</sup>-(4-amino)butil-ATP, N<sup>6</sup>-(6-amino)butil-ATP, N<sup>4</sup>-[2,2-oxi-bis-(etilamina)]-CTP; N<sup>6</sup>-(6-amino)hexil-ATP; 8-[(6-amino)hexil]-amino-ATP; 5-propargilamino-CTP, 5-propargilamino-UTP; 5-(3-aminoalil)-dUTP; 8-[(4-amino)butil]-amino-dATP y 8-[(6-amino)butil]-amino-dATP; N<sup>6</sup>-(4-amino)butil-dATP, N<sup>6</sup>-(6-amino)butil-dATP, N<sup>4</sup>-[2,2-oxi-bis-(etilamina)]-dCTP; N<sup>6</sup>-(6-amino)hexil-dATP; 8-[(6-amino)hexil]-amino-dATP; 5-propargilamino-dCTP y 5-propargilamino-dUTP. Dichos nucleótidos pueden prepararse de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Además, un experto en la materia podría preparar otras entidades de nucleótidos con la misma modificación de amina, tales como 5-(3-aminoalil)-CTP, GTP, ATP, dCTP, dGTP, dTTP o dUTP en lugar de un 5-(3-aminoalil)-UTP.

## 2. Técnicas de marcaje

En algunas realizaciones, se marcan ácidos nucleicos añadiendo catalíticamente al ácido nucleico un nucleótido o nucleótidos ya marcados. Pueden añadirse uno o más nucleótidos marcados a moléculas de miARN. Véase Patente de Estados Unidos 6.723.509.

En otras realizaciones, se añade catalíticamente un nucleótido o nucleótidos no marcados a un miARN, y el nucleótido no marcado se modifica con un resto químico que permite que se marque posteriormente. En realizaciones de la invención, el resto químico es una amina reactiva de modo que el nucleótido sea un nucleótido modificado con amina.

Se conocen bien por los expertos en la materia ejemplos de nucleótidos modificados con amina, estando muchos disponibles en el mercado tales como de Ambion, Sigma, Jena Bioscience y TriLink.

A diferencia del marcaje de ADNc durante su síntesis, el problema para el marcaje de miARN es cómo marcar la molécula ya existente. La presente invención se refiere al uso de una enzima capaz de usar un ribonucleótido o desoxirribonucleótido di o trifosfato como un sustrato para su adición a un miARN, una molécula de ARN pequeña. Además, en realizaciones específicas, implica usar un ribonucleótido di o trifosfato modificado, que se añade al extremo 3' de un miARN. La fuente de la enzima no es limitante. Los ejemplos de fuentes para las enzimas incluyen levadura, bacterias gram negativas tales como *E. coli*, *Lactococcus lactis* y virus de viruela de ovejas.

Las enzimas capaces de añadir dichos nucleótidos incluyen, pero sin limitación, poli(A) polimerasa, transferasa terminal y polinucleótido fosforilasa. En realizaciones específicas de la invención, se contempla que la ligasa no es la enzima usada para añadir el marcador, y en su lugar, se emplea una enzima no ligasa.

La poli(A) polimerasa se ha clonado de varios organismos de plantas a seres humanos. Se ha mostrado que cataliza la adición de tramos homopoliméricos a ARN (Martin y col., RNA, 4(2): 226-30, 1998).

La transferasa terminal cataliza la adición de nucleótidos al extremo 3' terminal de un ácido nucleico. La polinucleótido fosforilasa puede polimerizar nucleótidos difosfatos sin la necesidad de un cebador.

## 3. Marcadores

Los marcadores en miARN o sondas de miARN pueden ser colorimétricos (incluyen espectro visible y UV, incluyendo fluorescencia), luminiscentes, enzimáticos o emisores de positrones (incluyendo radiactivos). El marcador puede detectarse directa o indirectamente. Los marcadores radiactivos incluyen <sup>125</sup>I, <sup>32</sup>P, <sup>33</sup>P y <sup>35</sup>S. Los ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen fosfatasa alcalina, luciferasa, peroxidasa de rábano rusticano y β-galactosidasa. Los marcadores también pueden ser proteínas con propiedades luminiscentes, por ejemplo, proteína verde fluorescente y ficoeritrina.

Los marcadores colorimétricos y fluorescentes contemplados para su uso como conjugados incluyen, pero sin limitación, colorantes de Alexa Fluor, colorantes BODIPY, tales como BODIPY FL; Cascade Blue; Cascade Yellow; coumarina y sus derivados, tales como 7-amino-4-metilcoumarina, aminocoumarina e hidroxycoumarina; colorantes de cianina, tales como Cy3 y Cy5; eosinas y eritrosinas; fluoresceína y sus derivados, tales como fluoroescéina isotiocianato; quelados macrocíclicos de iones de lantánidos, tales como Quantum Dye™; Marina Blue; Oregon Green; colorantes de rodamina, tales como rojo de rodamina, tetrametilrodamina y rodamina 6G; Texas Red; colorantes de transferencia de energía fluorescente, tales como heterodímero de naranja de tiazol-etidio; y TOTAB.

Los ejemplos específicos de colorantes incluyen, pero sin limitación, los identificados anteriormente y los siguientes: Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 405, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 500, Alexa Fluor 514, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 610, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, Alexa Fluor 700 y Alexa Fluor 750; colorantes BODIPY sensibles a amina, tales como BODIPY 493/503, BODIPY 530/550, BODIPY 558/568, BODIPY 564/570, BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, BODIPY 630/650, BODIPY 650/655, BODIPY FL, BODIPY R6G, BODIPY TMR y BODIPY-TR; Cy3, Cy5, 6-FAM, fluoresceína isotiocianato, HEX, 6-JOE, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, REG, Verde de Rodamina, Rojo de Rodamina, Renographin, ROX, SYPRO, TAMRA, 2',4',5',7'-tetrabromosulfonafluoresceína y TET.

Están disponibles ejemplos específicos de ribonucleótidos marcados con fluorescencia de Molecular Probes y estos incluyen, Alexa Fluor 488-5-UTP, Fluoresceína-12-UTP, BODIPY FL-14-UTP, BODIPY TMR-14-UTP, tetrametilrodamina-6-UTP, Alexa Fluor 546-14-UTP, Texas Red-5-UTP y BODIPY TR-14-UTP. Están disponibles otros ribonucleótidos fluorescentes de Amersham Biosciences, tales como Cy3-UTP y Cy5-UTP.

Los ejemplos de desoxirribonucleótidos marcados con fluorescencia incluyen dinitrofenilo (DNP)-11-dUTP, Cascade Blue-7-dUTP, Alexa Fluor 488-5-dUTP, Fluoresceína-12-dUTP, Oregon Green 488-5-dUTP, BODIPY FL-14-dUTP, Verde de Rodamina-dUTP, Alexa Fluor 532-5-dUTP, BODIPY TMR-14-dUTP, tetrametilrodamina -6-dUTP, Alexa Fluor 546-14-dUTP, Alexa Fluor 568-5-dUTP, Texas Red-12-dUTP, Texas Red-5-dUTP, BODIPY TR-14-dUTP, Alexa Fluor 594-5-dUTP, BODIPY 630/650-14-dUTP, BODIPY 650/665-14-dUTP; Alexa Fluor 488-7-OBEA-dCTP, Alexa Fluor 546-16-OBEA-dCTP, Alexa Fluor 594-7-OBEA-dCTP, Alexa Fluor 647-12-OBEA-dCTP.

Se contempla que los ácidos nucleicos pueden marcarse con dos marcadores diferentes. Además, puede emplearse transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) en procedimientos de la invención (por ejemplo, Klostermeier y col., 2002; Emptage, 2001; Didenko, 2001, cada una incorporada por referencia).

Como alternativa, el marcador puede no ser detectable por sí mismo, pero ser detectable de forma indirecta o que permita el aislamiento o separación del ácido nucleico diana. Por ejemplo, el marcador puede ser biotina, digoxigenina, cationes polivalentes, grupos quelantes y los otros ligandos, incluyen ligandos para un anticuerpo.

#### 4. Técnicas de visualización

Están fácilmente disponibles varias técnicas para visualizar o detectar ácidos nucleicos marcados. La referencia de Stanley T. Crooke, 2000 tiene un análisis de dichas técnicas (Capítulo 6), que se incorpora por referencia. Dichas técnicas incluyen microscopía, matrices, fluorometría, cicladores lumínicos u otras máquinas de PCR a tiempo real, análisis de FACS, contadores de centelleo, Phosphoimagers, contadores de Geiger, MRI, CAT, procedimientos de detección basados en anticuerpos (Western, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica), técnicas histoquímicas, HPLC (Griffey y col., 1997, espectroscopia, electroforesis en gel capilar (Cummins y col., 1996), espectroscopia, espectroscopia de masas; técnicas radiológicas; y técnicas de equilibrio de masas.

Cuando se emplean dos o más marcadores de colores diferentes, pueden emplearse técnicas de transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET) para caracterizar el ARNbc. Además, un experto habitual en la técnica es bien consciente de modos de visualización, identificación y caracterización de ácidos nucleicos marcados, y en consecuencia, dichos protocolos pueden usarse como parte de la invención. Los ejemplos de herramientas que pueden usarse también incluyen microscopía fluorescente, un Bioanalizador, un lector de placas, Storm (Molecular Dynamics), Explorador de Matrices, FACS (clasificación de células activadas por fluorescencia) o cualquier instrumento que tenga la capacidad de excitar y detectar una molécula fluorescente.

#### III. Aplicaciones terapéuticas

Los miARN o inhibidores de miARN sintéticos que afectan a rasgos fenotípicos proporcionan puntos de intervención para aplicaciones terapéuticas así como aplicaciones de diagnóstico (cribando con respecto a la presencia o ausencia de un miARN particular). Se contempla específicamente que pueden usarse moléculas de ARN de la presente invención para tratar el cáncer analizado en la sección previa. Además, también puede emplearse cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente con respecto a aspectos terapéuticos de la invención.

En aplicaciones terapéuticas, una cantidad eficaz de los miARN sintéticos de la presente invención es para administrar a una célula, que puede estar o no en un animal. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de los miARN o inhibidores de miARN sintéticos de la presente invención es para administrar a un individuo para el tratamiento de cáncer. La expresión "cantidad eficaz" como se usa en el presente

documento se define como la cantidad de las moléculas de la presente invención que es necesaria para dar como resultado el cambio fisiológico deseado en la célula o tejido al que se administra. La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” como se usa en el presente documento se define como la cantidad de las moléculas de la presente invención que consigue un efecto deseado con respecto al cáncer. Un experto en la materia reconoce fácilmente que en muchos casos las moléculas pueden no proporcionar una cura pero pueden proporcionar un beneficio parcial, tal como alivio o mejora de al menos un síntoma. En algunas realizaciones, un cambio fisiológico que tiene algún beneficio también se considera terapéuticamente beneficioso. Por lo tanto, en algunas realizaciones, una cantidad de moléculas que proporciona un cambio fisiológico se considera una “cantidad eficaz” o una “cantidad terapéuticamente eficaz”.

- 10 En algunas realizaciones, la molécula tiene una secuencia que corresponde a la secuencia de miARN de ese animal particular, en oposición a de otro animal. Por tanto, en algunas realizaciones, se utiliza una secuencia humana en las moléculas de ARN de la presente invención.

#### A. Modos de administración y formulaciones

- 15 Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden ser para administración a un sujeto solo o en forma de una composición farmacéutica para el tratamiento de cáncer. Pueden formularse composiciones farmacéuticas de manera convencional usando uno o más vehículos, diluyentes, excipientes o adyuvantes fisiológicamente aceptables que facilitan el procesamiento de las proteínas en preparaciones que pueden usarse farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la vía de administración elegida.

- 20 Para administración tópica las proteínas de la invención pueden formularse como soluciones, geles, pomadas, cremas, suspensiones, etc. como se conoce bien en la técnica. Las formulaciones sistémicas incluyen las diseñadas para administración por inyección, por ejemplo inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratecal o intraperitoneal, así como las diseñadas para administración transdérmica, transmucosa, inhalación, oral o pulmonar. Para inyección, los ácidos nucleicos de la invención pueden formularse en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer o tampón de solución salina fisiológica. La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizadores y/o de dispersión. Como alternativa, las moléculas de ácido nucleico pueden estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua sin pirógenos estéril, antes de su uso. Para administración transmucosa, se usan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera para permear. Dichos penetrantes se conocen en general en la técnica. Para administración oral, los ácidos nucleicos pueden formularse fácilmente combinando las moléculas con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Dichos vehículos permiten que los ácidos nucleicos de la invención se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares, para ingesta oral por un paciente para tratar. Para formulaciones sólidas orales tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas y comprimidos, los excipientes adecuados incluyen cargas tales como azúcares, por ejemplo lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; preparaciones de celulosa tales como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica y/o polivinilpirrolidona (PVP); agentes de granulación; y agentes aglutinantes. Si se desea, pueden añadirse agentes disgregantes, tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar o ácido alginico o una sal de los mismos tales como alginato sódico. Si se desea, las formas de dosificación sólida pueden recubrirse con azúcares o recubrirse de forma entérica usando técnicas convencionales. Para preparaciones líquidas orales tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones, los vehículos, excipientes o diluyentes adecuados incluyen agua, glicoles, aceites, alcoholes, etc. Adicionalmente, pueden añadirse agentes saporíferos, conservantes, agentes colorantes y similares. Para administración bucal, las moléculas pueden tomar la forma de comprimidos, pastillas para chupar, etc., formuladas de manera convencional. Para administración por inhalación, las moléculas para su uso de acuerdo con la presente invención se suministran convenientemente en forma de una pulverización de aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de gelatina para su uso en un inhalador o insuflador pueden formularse conteniendo una mezcla en polvo de los ácidos nucleicos y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón. Las moléculas de ARN pueden formularse también en composiciones rectales o vaginales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

- 55 Además de las formulaciones descritas previamente, las moléculas también pueden formularse como una preparación de liberación prolongada. Dichas formulaciones de acción larga pueden administrarse por implantación (por ejemplo por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Por lo tanto, por ejemplo, las moléculas pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados poco solubles, por ejemplo, como una sal poco soluble.

- 60 Como alternativa, pueden emplearse otros sistemas de suministro farmacéutico. Los liposomas y emulsiones son ejemplos bien conocidos de vehículos de suministro que pueden usarse para suministrar ácidos nucleicos de la invención.

- Un ácido nucleico de la invención puede administrarse en combinación con un vehículo o lípido para aumentar la captación celular. Por ejemplo, el oligonucleótido puede administrarse en combinación con un lípido catiónico. Los ejemplos de lípidos catiónicos incluyen, pero sin limitación, lipofectina, DOTMA, DOPE y DOTAP. La publicación WO0071096 por ejemplo, describe diferentes formulaciones, tales como una formulación de DOTAP: colesterol o derivado de colesterol que puede usarse eficazmente para terapia génica. Otras divulgaciones también analizan diferentes formulaciones de lípidos o liposómicas incluyendo nanopartículas y procedimientos de administración; estos incluyen, pero sin limitación, Publicación de Patente de Estados Unidos 20030203865, 20020150626, 20030032615 y 20040048787. También se desvelan procedimientos usados para formar partículas en las Patentes de Estados Unidos N° 5.844.107, 5.877.302, 6.008.336, 6.077.835, 5.972.901, 6.200.801 y 5.972.900.
- Los ácidos nucleicos también pueden administrarse en combinación con una amina catiónica tal como poli(L-lisina). También pueden conjugarse ácidos nucleicos con un resto químico, tal como transferrina y colesterilos. Además, los oligonucleótidos pueden dirigirse a ciertos orgánulos uniéndose a grupos químicos específicos con el oligonucleótido. Por ejemplo, la unión del oligonucleótido con una matriz adecuada de restos de manosa dirigirá el oligonucleótido al hígado.
- Adicionalmente, las moléculas pueden suministrarse usando un sistema de liberación sostenida, tal como matrices semipermeables de polímeros sólidos que contienen el agente terapéutico. Se han establecido diversos materiales de liberación sostenida y se conocen bien por los expertos en la materia. Las cápsulas de liberación sostenida pueden, dependiendo de su naturaleza química, liberar las moléculas durante varias semanas hasta 100 días. Dependiendo de la naturaleza química y de la estabilidad biológica de las moléculas quiméricas, pueden emplearse estrategias adicionales para la estabilización de moléculas.
- Pueden incluirse ácidos nucleicos en cualquiera de las formulaciones anteriormente descritas como los ácidos libres o bases o como sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables son las sales que conservan sustancialmente la actividad biológica de las bases libres y que se preparan por reacción con ácidos inorgánicos. Las sales farmacéuticas tienden a ser más solubles en disolventes acuosos u otros próticos que son las formas de base libre correspondientes.
- Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad eficaz de una o más moléculas de miARN sintéticas o inhibidores de miARN disueltos o dispersos en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las frases "farmacéutico o farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica o de otro modo desafortunada cuando se administran a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano, según sea apropiado. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos un polipéptido quimérico o principio activo adicional se conocerá por los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación, como se ejemplifica en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990. Además, para la administración animal (por ejemplo, humana), se entenderá que las preparaciones pueden necesitar cumplir patrones de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza según se requiera por la Oficina de la FDA de Patrones Biológicos.
- Como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes retardantes de la absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizadores farmacológicos, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de disgregación, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saporíferos, colorantes, materiales similares y combinaciones de los mismos, como se conocerá por un experto habitual en la materia (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329). Excepto en la medida en que cualquier vehículo convencional es compatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.
- Las moléculas quiméricas pueden comprender diferentes tipos de vehículos dependiendo de si van administrarse en forma sólida, líquida o de aerosol, y si es necesario que sea estéril para vías de administración tales como inyección. La presente invención puede administrarse por vía intravenosa, por vía intradérmica, por vía intra-arterial, por vía intraperitoneal, por vía intralesional, por vía intracraneal, por vía intra-articular, por vía intraprostática, por vía intrapleuraleal, por vía intratraqueal, por vía intranasal, por vía intravítrea, por vía intravaginal, por vía intrarrectal, por vía tópica, por vía intratumoral, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía subcutánea, por vía subconjuntiva, por vía intravesicular, por vía mucosa, por vía intrapericárdica, por vía intraumbilical, por vía intraocular, por vía oral, por vía tópica, por vía local, por inhalación (por ejemplo, inhalación de aerosol), inyección, infusión, infusión continua, perfusión localizada que baña las células diana directamente, mediante un catéter, mediante un lavado, en cremas, en composiciones lipídicas (por ejemplo, liposomas), o por otro procedimiento o cualquier combinación de los anteriores como se conocerá por un experto habitual en la materia (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990).
- La cantidad de dosificación real de una composición de la presente invención para administración a un paciente animal puede determinarse por factores físicos y fisiológicos tales como peso corporal, gravedad de la afección, el tipo de enfermedad que se trate, intervenciones terapéuticas previas o simultáneas, idiopatía del paciente y la vía de administración. El practicante responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la concentración del principio o los principios activos en una composición y la o las dosis apropiadas para el sujeto individual.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente 0,1 % de un compuesto activo. En otras realizaciones, el compuesto activo puede comprender entre aproximadamente el 2 % y aproximadamente el 75 % del peso de la unidad, o entre aproximadamente el 25 % y aproximadamente el 60 %, por ejemplo, y cualquier intervalo derivable del mismo. En otros ejemplos no limitantes, una dosis también puede comprender de aproximadamente 1 microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 10 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 50 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 100 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 200 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 350 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 500 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 1 miligramo/kg de peso corporal, aproximadamente 5 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 10 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 50 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 100 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 200 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 350 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 500 miligramos/kg de peso corporal, a aproximadamente 1000 mg/kg de peso corporal o más por administración y cualquier intervalo derivable del mismo. En ejemplos no limitantes de un intervalo derivable de los números enumerados en el presente documento, puede administrarse un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, de aproximadamente 5 microgramos/kg de peso corporal a aproximadamente 500 miligramos/kg de peso corporal, etc, basándose en los números descritos anteriormente.

En cualquier caso, la composición puede comprender diversos antioxidantes para retardar la oxidación de uno o más componentes. Adicionalmente, la prevención de la acción de microorganismos puede producirse por conservantes tales como diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, incluyendo pero sin limitación parabenos (por ejemplo, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal o combinaciones de los mismos.

Las moléculas pueden formularse en una composición en una forma de base libre, neutra o sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácidos, por ejemplo, las formadas con los grupos amilo libres de una composición proteica, o que se forman con ácidos inorgánicos tales como por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como ácido acético, oxálico, tartárico o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como por ejemplo, sodio, potasio, amonio, calcio o hidróxidos férricos; o bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaina.

En realizaciones en las que la composición está en una forma líquida, un vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que comprende pero sin limitación, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, etc.), lípidos (por ejemplo, triglicéridos, aceites vegetales, liposomas) y combinaciones de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento, tal como lecitina; mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido por dispersión en vehículos tales como, por ejemplo, poliol líquido o lípidos; mediante el uso de tensioactivos tales como, por ejemplo, hidroxipropilcelulosa; o combinaciones de los mismos de dichos procedimientos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, tales como por ejemplo, azúcares, cloruro sódico o combinaciones de los mismos.

En otras realizaciones, se pueden usar colirios, soluciones nasales o pulverizaciones, aerosoles o inhalantes en la presente invención. Dichas composiciones se diseñan en general para que sean compatibles con el tipo de tejido diana. En un ejemplo no limitante, las soluciones nasales son habitualmente soluciones acuosas diseñadas para administrarse a los conductos nasales en gotas o pulverizaciones. Se preparan soluciones nasales de forma que sean similares en muchos aspectos a las secreciones nasales, de modo que se mantenga la acción ciliar normal. Por lo tanto, en realizaciones preferidas las soluciones nasales acuosas habitualmente son isotónicas o ligeramente tamponadas para mantener un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5. Además, pueden incluirse en la formulación conservantes antimicrobianos, similares a los usados en preparaciones oftálmicas, fármacos o estabilizadores farmacológicos apropiados, si se requieren. Por ejemplo, se conocen diversas preparaciones nasales comerciales e incluyen fármacos tales como antibióticos o antihistamínicos.

En ciertas realizaciones, las moléculas se preparan para administración por vías tales como la ingestión oral. En estas realizaciones, la composición sólida puede comprender, por ejemplo, soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas (por ejemplo, cápsulas de gelatina de cubierta dura o blanda), formulaciones de liberación sostenida, composiciones bucales, trociscos, elixires, suspensiones, jarabes, obleas o combinaciones de los mismos. Pueden incorporarse composiciones orales directamente con el alimento de la dieta. Los vehículos preferidos para administración oral comprenden diluyentes inertes, vehículos comestibles asimilables o combinaciones de los mismos. En otros aspectos de la invención, la composición oral puede prepararse como un jarabe o elixir. Un jarabe o elixir puede comprender, por ejemplo, al menos un agente activo, un agente edulcorante, un conservante, un agente saporífero, un colorante, un conservante o combinaciones de los mismos.

En ciertas realizaciones preferidas una composición oral puede comprender uno o más aglutinantes, excipientes, agentes de disgregación, lubricantes, agentes saporíferos y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, la composición puede comprender uno o más de los siguientes: un aglutinante, tal como, por ejemplo, goma de tragacanto, goma arábiga, almidón de maíz, gelatina o combinaciones de los mismos; un excipiente, tal como, por ejemplo, fosfato dicálcico, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio o combinaciones de los mismos; un agente disgregante, tal como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón

de patata, ácido algínico o combinaciones de los mismos; un lubricante, tal como, por ejemplo, estearato de magnesio; un agente edulcorante, tal como, por ejemplo, sacarosa, lactosa, sacarina o combinaciones de los mismos; un agente saporífero, tal como, por ejemplo, menta piperita, aceite de gauteria, saporífero de cereza, saporífero de naranja, etc.; o combinaciones de los anteriores. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede contener, además de materiales del tipo anterior, vehículos tales como un vehículo líquido. Pueden estar presentes diversos otros materiales como revestimientos o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras, o cápsulas pueden estar revestidos con goma laca, azúcar o ambos.

La composición debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento, y conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Se apreciará que la contaminación con endotoxinas debería mantenerse mínimamente a un nivel seguro, por ejemplo, menor de 0,5 ng/mg de proteína.

En realizaciones particulares, la absorción prolongada de una composición inyectable puede producirse por el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, tales como, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina o combinaciones de los mismos.

También puede emplearse cualquier realización analizada anteriormente con respecto al suministro o transporte a células con respecto a implementar el suministro de compuestos medicinales analizados en esta sección.

## B. Dosificaciones eficaces

Las moléculas de la invención se usarán en general en una cantidad eficaz para conseguir el fin pretendido. Para su uso para tratar o prevenir el cáncer, las moléculas de la invención, o composiciones farmacéuticas de las mismas, se administran o aplican en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad eficaz para aliviar o prevenir los síntomas, o prolongar la supervivencia del paciente que se trate. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de las capacidades de los expertos en la materia, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

Para administración sistémica, una dosis terapéuticamente eficaz puede estimarse inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. Por ejemplo, una dosis puede formularse en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración en circulación que incluye la  $CI_{50}$  como se determina en el cultivo celular. Dicha información puede usarse para determinar con más precisión dosis útiles en seres humanos.

Las dosificaciones iniciales también pueden estimarse a partir de datos *in vivo*, por ejemplo, modelos animales, usando técnicas que se conocen bien en este campo. Un experto habitual en la materia podría optimizar fácilmente la administración a seres humanos basándose en datos animales.

La cantidad e intervalo de dosificación pueden ajustarse individualmente para proporcionar niveles en plasma de las moléculas que son suficientes para mantener el efecto terapéutico. Las dosificaciones a pacientes habituales para administración por inyección varían de aproximadamente 0,1 a 5 mg/kg/día, preferentemente de aproximadamente 0,5 a 1 mg/kg/día. Pueden conseguirse niveles en suero terapéuticamente eficaces administrando múltiples dosis cada día.

En casos de administración local o captación selectiva, la concentración local eficaz de las proteínas puede no estar relacionada con la concentración en plasma. Un experto en la materia será capaz de optimizar las dosificaciones locales terapéuticamente eficaces sin experimentación indebida.

La cantidad de moléculas administradas dependerá, por supuesto, del sujeto que se trate, del peso del sujeto, la gravedad de la afección, el modo de administración y el criterio del médico que la receta.

La terapia puede repetirse intermitentemente mientras los síntomas sean detectables o incluso cuando no sean detectables. La terapia puede proporcionarse sola o en combinación con otros fármacos o tratamiento (incluyendo cirugía).

## C. Toxicidad

Preferentemente, una dosis terapéuticamente eficaz de las moléculas descritas en el presente documento proporcionará beneficio terapéutico sin provocar toxicidad sustancial.

La toxicidad de las moléculas descritas en el presente documento puede determinarse por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, determinando la  $DL_{50}$  (la dosis letal para el 50 % de la población) o la  $DL_{100}$  (la dosis letal para el 100 % de la población). La relación de dosis entre el efecto tóxico y terapéutico es el índice terapéutico. Se prefieren proteínas que muestran índices terapéuticos altos. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo celular y estudios animales pueden usarse en la formulación de un intervalo de dosificación que no es tóxico para su uso en seres humanos. La dosificación de las proteínas descritas en el presente documento queda preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en circulación que incluyen la dosis eficaz con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este

intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La formulación exacta, vía de administración y dosificación pueden seleccionarse por el médico individual a la vista de la condición del paciente. (Véase, por ejemplo, Fingl y col., 1975, En: The Pharmacological Basis of Therapeutics, C.1, p.1).

#### D. Grupos colgantes

- 5 Un "grupo colgante" puede estar unido o conjugado con el ácido nucleico. Los grupos colgantes pueden aumentar la capacidad celular del ácido nucleico. Los grupos colgantes pueden estar unidos a cualquier parte del ácido nucleico pero se unen habitualmente al extremo o los extremos de la cadena oligonucleotídica. Los ejemplos de grupos colgantes, incluyen, pero sin limitación; derivados de acridina (es decir, 2-metoxi-6-cloro-9-aminoacridina); reticulantes tales como derivados de psoraleno, azidofenacilo, proflavina y azidoproflavina; endonucleasas artificiales; complejos metálicos tales como EDTA-Fe(II), o-fenantrolinea-Cu(I), y porfirina-Fe(II); restos alquilantes; nucleasas tales como nucleasa amino-1-hexanoletafilocócica y fosfatasa alcalina; transferasas terminales; abzymas; restos de colesterilo; vehículos lipófilos, conjugados peptídicos; alcoholes de cadena larga; ésteres de fosfato; amino; grupos mercapto; marcadores radiactivos; marcadores no radiactivos tales como colorantes; y polilisina u otras poliaminas. En un ejemplo, el ácido nucleico está conjugado con un carbohidrato, carbohidrato sulfatado o glucano.

#### Ejemplos

A no ser que se designe de otro modo, los números de catálogo se refieren a productos disponibles por ese número de Ambion, Inc.

#### Ejemplo 1:

##### 20 Ensayo para medir la actividad de miARN precursores (indicador)

- Se creó una serie de vectores indicadores de luciferasa para medir las actividades de miARN sintéticos en células. Los vectores indicadores se basaron en plásmidos que se habían usado para controlar la actividad de miARN endógenos (artículo de Tuschl). Brevemente, se creó un vector de expresión de mamífero con el gen de luciferasa bajo el control del promotor temprano del CMV. Cadena abajo de la secuencia codificante de luciferasa, en la 3' UTR del gen, se añadieron secuencias complementarias de miR-1-2, miR-10, miR-124, miR-19a y miR-130 maduros. Los vectores indicadores se cotransfectaron a células HeLa junto con miARN sintéticos diseñados para introducir uno de los cinco miARN enumerados anteriormente. Las transfecciones implicaron mezclar 200 ng de vector indicador con 0,3, 1 y 3 pmoles de cada miARN sintético correspondiente. La mezcla de indicador/miARN se mezcló con 0,3 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) y se incubó durante 5-15 minutos. Se añadieron aproximadamente 8.000 células a cada complejo de miARN/indicador/reactivo de transfección en pocillos individuales de una placa de 96 pocillos. Se cultivaron células HeLa en D-MEM (GIBCO) complementado con suero bovino fetal al 10 % (GIBCO) a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5 %. 24-48 h después de la transfección, las células se recogieron y se ensayaron usando el ensayo de Luciferasa como se ha descrito por el fabricante (Promega). El nivel de la expresión de luciferasa en las poblaciones celulares se comparó con células transfectadas con el mismo indicador pero un miARN sintético con una secuencia que no corresponde al vector. Este miARN no de dirección se denominó el miARN de control negativo.

- El análisis final de los diseños de miARN sintético implicó medir la actividad de las cadenas tanto activa como complementaria de los miARN sintéticos de los inventores. Para estos estudios, se crearon vectores indicadores con secuencias 3' UTR de luciferasa que incluían regiones complementarias de las cadenas tanto activa como complementaria de los diseños de miARN let-7b y miARN-33 sintéticos de los inventores. Cuando se co-transfectaron con miARN sintético con mal funcionamiento, los indicadores con una secuencia a la que se dirige la cadena complementaria muestran expresión de luciferasa reducida debido a que la cadena complementaria de los miARN sintéticos están entrando en la ruta del miARN además de o incluso en lugar de la cadena activa que se desea. Para estos experimentos, los protocolos de co-transfección y análisis indicador son idénticos a los que se ha descrito anteriormente.

#### 45 Ejemplo 2:

##### Ensayo para medir la actividad de miARN precursores (gen endógeno)

- Aunque las construcciones indicadoras de luciferasa eran extremadamente valiosas en la evaluación de los diseños de miARN sintético, fue importante verificar los hallazgos de las construcciones indicadoras midiendo los efectos de los miARN sintéticos en dianas de genes endógenos. Para estos estudios, la expresión de RAS y MYC en células transfectadas con miARN de let-7 se seleccionó para el control. Tanto RAS como MYC se regulan negativamente por los diversos miembros de la familia de let-7 en seres humanos y *C. elegans*. Usando un sistema de micromatriz específico para miARN, los inventores han descubierto que las células HepG2 expresan niveles indetectables de let-7. Para ensayar las actividades de los diversos diseños de los inventores de sus miARN sintéticos, se crearon miARN let-7 sintéticos y se usaron para transfectar células HepG2 en placas de 24 pocillos usando siPORT NeoFX (Ambion) de acuerdo con las sugerencias del fabricante. Tres días después de la transfección, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 %, se tiñeron con DAPI para localizar núcleos celulares y se tiñeron con anticuerpos conjugados con FITC específicos para MYC o RAS (US Biological) de acuerdo con las sugerencias del fabricante.

La reducción relativa de la expresión de proteína diana en células transfectadas con let-7 sintético se determinó comparando la intensidad de tinción de MYC y RAS para células transfectadas con un miARN de control negativo usando software MetaMorph.

Para asegurar que los resultados de los ensayos de let-7 de los inventores podrían verificarse por interacciones de miARN adicionales que se observan de forma natural en células, se crearon ensayos para dos miARN adicionales con dianas verificadas. En el primero, se desarrolló un ensayo de PCR<sup>TM</sup> en tiempo real para medir el nivel del ARNm de HOXB8 en células transfectadas con miR-196 sintético. Se ha mostrado que miR-196 induce la degradación del ARNm de HOXB8 en células. Cuando se transfecta a células cultivadas usando siPORT NeoFX de acuerdo con las instrucciones del fabricante, los diseños de miARN sintético miR-196 eficaces reducen los niveles del ARNm del HOXB8.

Para controlar la eficacia de los miARN miR-1-2 sintéticos, se creó un vector indicador en el que se colocó la 3'UTR del gen G6PD inmediatamente cadena abajo de la región codificante de luciferasa. Se ha aplicado una interacción entre miR-1-2 y la 3'UTR de G6PD (Lewis, 2003). Se co-transfectaron diseños de miR-1-2 sintéticos con el vector indicador y se ensayaron como se ha descrito en el Ejemplo 1.

### Ejemplo 3:

#### Eficacia de miARN parcialmente complementarios

Se compararon tres diseños de secuencia generales con respecto a actividad de miARN. El primero, denominado el "diseño de miARN" presentó una cadena activa idéntica al miARN maduro hallado en animales y una cadena complementaria que fue idéntica a la secuencia en horquilla que se predice que existe en células durante el procesamiento del miARN antes de la activación del miARN (véase posteriormente). El segundo diseño, denominado el "diseño de desapareamiento", fue un híbrido de la misma cadena activa que antes con una cadena complementaria con un dinucleótido, saliente 3' y dos desapareamientos en los cinco nucleótidos finales que precedían al saliente 3' (véase posteriormente). El tercer diseño, denominado el "diseño de ARNip", comprendía la misma cadena activa que anteriormente hibridada con un segundo ARN que era completamente complementario excepto que dejaba salientes 3' di-nucleótidos en uno de los extremos de la molécula bicatenaria (dos polinucleótidos) (véase posteriormente). Los ejemplos posteriores implican o corresponden a miARN humanos.

#### miR-1-2

*secuencia de miR-1-2 madura* - UGGAUGUAAAGAAGUAUGUA (53-73 de SEC ID N°: 1)  
 diseño de miARN = CAUACUUCUUUAUAUGCCCAUA (SEC ID N°: 594) +  
 UGGAUGUAAAGAAGUAUGUA (SEC ID N°: 595)  
 diseño de desapareamiento = CAUACUUCUUACAUCUGTT (SEC ID N°: 596) +  
 UGGAUGUAAAGAAGUAUGUA (SEC ID N°: 597)  
 diseño de ARNip = CAUACUUCUUACAUCUCCATT (SEC ID N°: 598) + UGGAUGUAAAGAAGUAUGUA  
 (SEC ID N°: 599)

#### mir-124a-1

*secuencia de miR-124 madura* - UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA (52-73 de SEC ID N°: 80)  
 diseño de miARN = GUGUUCACAGCGGACCUUGAUU (SEC ID N°: 600) +  
 UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA (SEC ID N°: 601)  
 diseño de desapareamiento = GCAUUCACGCGUGCCUUGGTT (SEC ID N°: 602) +  
 UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA (SEC ID N°: 603)  
 diseño de ARNip = GCAUUCACGCGUGCCUUAATT (SEC ID N°: 604) +  
 UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA (SEC ID N°: 605)

#### miR-130a

*secuencia de miR-130 madura* - CAGUGCAAUGUAAAAGGGC (55-74 de SEC ID N°: 91)  
 diseño de miARN = UCUUUUCACAUUGUGCUAC (SEC ID N°: 606) + CAGUGCAAUGUAAAAGGGC (SEC ID N°: 607)  
 diseño de desapareamiento = UAUUUUAACAUUGCACUGTT (SEC ID N°: 608) +  
 CAGUGCAAUGUAAAAGGGC (SEC ID N°: 609)  
 diseño de ARNip = CCUUUUACAUUGCACUGTT (SEC ID N°: 610) + CAGUGCAAUGUAAAAGGGC (SEC ID N°: 611)

#### miR-19a

*secuencia de miR-19a madura* - UGUGCAAUCUAUGCAAACUGA (49-71 de SEC ID N°: 28)  
 diseño de miARN = AGUUUUGCAUAGUUGCACUA (SEC ID N°: 612) + UGUGCAAUCUAUGCAAACUGA  
 (SEC ID N°: 613)  
 diseño de desapareamiento = ACAUUUGCAUAGAUUUGCACATT (SEC ID N°: 614) +

UGUGCAAUAUCUAUGCAAACUGA

(SEC ID N°: 615)

diseño de ARNip = AGUUUUGCAUAGAUUUGCACATT (SEC ID N°: 616)+  
UGUGCAAUAUCUAUGCAAACUGA (SEC ID N°: 617)

#### 5 **mmu-miR-10a-1 (ratón)**

*secuencia de miR-10 madura* - UACCCUGUAGAUCGAAUUUGUG (22-44 de SEC ID N°: 212)

diseño de miARN = CAAAUUCGUAUCUAGGGGAAUA (SEC ID N°: 618) +

UACCCUGUAGAUCGAAUUUGUG (SEC ID N°: 619)

diseño de desapareamiento = AGAAUUCGGAUCUACAGGGUATT (SEC ID N°: 620) +

10 UACCCUGUAGAUCGAAUUUGUG (SEC ID N°: 621)

diseño de ARNip = CAAAUUCGGAUCUACAGGGUATT (SEC ID N°: 622) +

UACCCUGUAGAUCGAAUUUGUG (SEC ID N°: 623)

#### **miR-33**

*secuencia de miR-33 madura* - GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (6-24 de SEC ID N°: 57)

15 miARN = AUGUUUCCACAGUGCAUCA (SEC ID N°: 624) + GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (SEC ID N°: 625)

diseño de desapareamiento = GUCCAACUACAAUGCACTT (SEC ID N°: 626) +

GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (SEC ID N°: 627)

diseño de ARNip = AUGCAACUACAAUGCACTT (SEC ID N°: 628) + GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (SEC ID N°: 629)

#### 20 **let-7b**

*secuencia de let-7b madura* - UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (6-27 de SEC ID N°: 6)

diseño de miARN = CUAUACAACCUACUGCCUCC (SEC ID N°: 630) +

UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (SEC ID N°: 631)

diseño de desapareamiento = CCACACAACCUACUACUATT (SEC ID N°: 632) +

25 UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (SEC ID N°: 633)

diseño de ARNip = CCACACAACCUACUACCUCATT (SEC ID N°: 634) +

UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (SEC ID N°: 635)

#### **miR-196-2**

*secuencia de miR-196 madura* - UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGG (7-27 de SEC ID N°: 143)

30 diseño de ARNip = AACACAUGAAACUACCUATT (SEC ID N°: 636) + UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGG (SEC ID N°: 637)

diseño de miARN = CAAAUUCGUAUCUAGGGGAAUA (SEC ID N°: 638) +

UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGG (SEC ID N°: 639)

diseño de desapareamiento = AAUAACAUGAAACUACCUATT (SEC ID N°: 640) +

35 UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGG (SEC ID N°: 641)

Los miARN sintéticos variados miR-1-2, mmu-miR-10a-1, miR-19a, miR-124a-1 y miR-130a se ensayaron con respecto a su capacidad para reducir la expresión del gen indicador en vectores con sitios diana de miARN apropiados usando el ensayo descrito en el Ejemplo 1. Los tres diseños fueron capaces de forma similar de regular negativamente los vectores indicadores apropiados.

40 Para evaluar si hubo diferencias entre los diversos diseños de miARN en su capacidad para afectar a la expresión de genes endógenos, se transfectaron las siguientes células: células HepG2 con tres diseños de los miARN sintéticos let-7, A549 con tres diseños de los miARN sintéticos miR-196, y HeLa con el vector indicador de G6PD y tres diseños del miARN sintéticos miR-1-2. Como con los vectores indicadores, los tres diseños de miARN sintéticos demostraron ser capaces de reducir la expresión de los genes diana, aunque es notable que el diseño de ARNip  
45 rindió peor.

Como una comparación final de los tres diseños de miARN sintéticos, se co-transfectaron miARN sintéticos con vectores indicadores que incluían sitios diana para las cadenas complementarias de los miARN sintéticos de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. En este ensayo, resultó evidente que el diseño de ARNip afectaba significativamente a los vectores indicadores, lo que indicaba que estaba entrando la cadena errónea del  
50 miARN en la ruta de miARN (FIG. 3). Debido a que la cadena complementaria podría influir en la expresión de genes que no son dianas naturales del miARN que se estudia, el diseño de ARNip es inapropiado para miARN sintéticos eficaces.

**Ejemplo 4:****Eficacia de miARN sintéticos modificados químicamente en su extremo 5**

Aunque el diseño del ARNip demostró ser problemático porque mostraba una alta tasa de captación de cadena complementaria por la ruta del miARN, tenía la ventaja de que era fácil de hibridar y fácil de suministrar a las células. Por estas razones, se exploraron maneras de superar los problemas con la captación de cadena complementaria. Se usó el diseño de ARNip para ensayar los efectos de modificaciones químicas de los extremos 5' de los miARN sintéticos. Para estos estudios, se sintetizaron varias cadenas complementarias diferentes con extremos 5' únicos. Una presentaba cuatro nucleótidos de desoxirribosa en el extremo 5'; una era una combinación de cuatro nucleótidos de desoxirribosa en el extremo 5' y un 5'NH<sub>2</sub>; una tenía un 5'NH<sub>2</sub>; una tenía un 5'NHCOCH<sub>3</sub> (véase posteriormente).

**miR-33**

*secuencia de miR-33 madura* - GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (6-24 de SEC ID N°: 57)

diseño de ARNip = AUGCAACUACAAUGCACTT (SEC ID N°: 642) + GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (SEC ID N°: 643)

diseño de amino 5' = (NH<sub>2</sub>)AUGCAACUACAAUGCACTT (SEC ID N°: 644) + GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (SEC ID N°: 645)

diseño de acetilo 5' = (CH<sub>3</sub>OCNH)AUGCAACUACAAUGCACTT (SEC ID N°: 646) + GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (SEC ID N°: 647)

diseño de ADN 5' = dAdUdGdCAACUACAAUGCACTT (SEC ID N°: 648) + GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (SEC ID N°: 649)

diseño de ADN de amino 5' = (NH<sub>2</sub>)dAdUdGdCAACUACAAUGCACTT (SEC ID N°: 650) + GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (SEC ID N°: 651)

**let-7b**

*secuencia de let-7b madura* - UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (6-27 de SEC ID N°: 6)

diseño de ARNip = CCACACAACCUACUACCUCATT (SEC ID N°: 652) + UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (SEC ID N°: 653)

diseño de amino 5' = NH<sub>2</sub>CCACACAACCUACUACCUCATT (SEC ID N°: 654) + UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (SEC ID N°: 655)

diseño de ADN 5' = dCdCdAdCACAACCUACUACCUCATT (SEC ID N°: 656) + UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (SEC ID N°: 657)

diseño de ADN de amino 5' = NH<sub>2</sub>dCdCdAdCACAACCUACUACCUCATT (SEC ID N°: 658) + UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (SEC ID N°: 659)

**miR-1-2**

*secuencia de miR-1-2 madura* - UGGA AUGUAAAGAAGUAUGUA (53-73 de SEC ID N°: 1)

diseño de ARNip = CAUACUUCUUUACAUUCCATT (SEC ID N°: 660) + UGGA AUGUAAAGAAGUAUGUA (SEC ID N°: 661)

diseño de amino 5' = NH<sub>2</sub>CAUACUUCUUUACAUUCCATT (SEC ID N°: 662) + UGGA AUGUAAAGAAGUAUGUA (SEC ID N°: 663)

**miR-124a-1**

*secuencia de miR-124 madura* - UUAAGGCACGCGUGAAUGCCA (52-73 de SEC ID N°: 80)

diseño de ARNip = GCAUUCACGCGUGCCUUAATT (SEC ID N°: 664) + UUAAGGCACGCGUGAAUGCCA (SEC ID N°: 665)

diseño de amino 5' = NH<sub>2</sub>GCAUUCACGCGUGCCUUAATT (SEC ID N°: 666) + UUAAGGCACGCGUGAAUGCCA (SEC ID N°: 667)

**miR-130a**

*secuencia de miR-130 madura* - CAGUGCAAUGUUAAGGGC (55-74 de SEC ID N°: 91)

diseño de ARNip = CCUUUUUACAUGCACUGTT (SEC ID N°: 668) + CAGUGCAAUGUUAAGGGC (SEC ID N°: 669)

diseño de amino 5' = NH<sub>2</sub>CCUUUUUACAUGCACUGTT (SEC ID N°: 670) + CAGUGCAAUGUUAAGGGC (SEC ID N°: 671)

**miR-10a-I**

*secuencia de miR-10 madura* - UACCCUGUAGAUCGGAUUUGUG (22-44 of SEC ID N°: 212)

diseño de ARNip = CAAAUUCGGAUCUACAGGGUATT (SEC ID N°: 672) + UACCCUGUAGAUCGGAUUUGUG (SEC ID N°: 673)

diseño de amino 5' = NH<sub>2</sub>CAAAUUCGGAUCUACAGGGUATT (SEC ID N°: 674) + UACCCUGUAGAUCGGAUUUGUG (SEC ID N°: 675)

Los miARN sintéticos miR-33 y let-7b se co-transfectaron en células HeLa y HepG2, respectivamente, con vectores indicadores que portaban sitios diana para las cadenas activa y complementaria de miR-33 y let-7b como se describe en el Ejemplo 1. La expresión de luciferasa de los vectores indicadores específicos de cadena activa y complementaria se midió de acuerdo con el protocolo del fabricante (Promega). Como se muestra en la Figura 3, los diseños de miARN sintético con el 5'NH<sub>2</sub> y 5'NHCOCH<sub>3</sub> proporcionaron actividad de cadena activa mayor y actividad de cadena complementaria significativamente reducida a los miARN sintéticos, no modificados. Esto es ideal para miARN sintéticos ya que los efectos vistos después de la transfección serán específicos de la actividad de la cadena activa del miARN sintético. Además, la alta eficacia de los diseños modificados en 5' permitirá usar menores concentraciones para transfecciones y reducir la toxicidad que se observa con frecuencia cuando se transfectan células con cantidades mayor de ácido nucleico.

Para confirmar que la modificación amino 5' es superior al diseño de ARNip convencional para un amplio conjunto de miARN sintéticos, se midió la eficacia de ambos diseños de miARN sintéticos en células co-transfectadas con vectores indicadores con sitios diana de miARN. Como se ve en la FIG. 4, el 5' NH<sub>2</sub> es reproduciblemente superior al diseño de ARNip no modificado.

#### Ejemplo 5:

##### **Criba de biblioteca de miARN sintética con respecto a miARN que influyen en la proliferación celular**

Una característica del cáncer es la proliferación celular descontrolada; se usan habitualmente ensayos de proliferación celular por investigadores para estudiar la influencia de genes en la oncogénesis. Se usó un ensayo de proliferación celular junto con la biblioteca de inhibidores de miARN para identificar miARN que influyen en la proliferación celular.

Los inventores transfectaron células HeLa por triplicado con quince miARN sintéticos diferentes usando siPORT NeoFX (Ambion) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (FIG. 6). Se analizaron células HeLa transfectadas usando AlamarBlue (BioSource International, Inc., CA) a intervalos de 24 horas. El AlamarBlue es un compuesto que, cuando se reduce por metabolismo celular, cambia de un color azul no fluorescente a una forma roja fluorescente que se cuantifica fácilmente. La cantidad de AlamarBlue reducida es directamente proporcional al número de células proporcionando un procedimiento rápido para evaluar la proliferación celular. Para realizar el ensayo, se añadió el reactivo de AlamarBlue al medio de cultivo tisular a una concentración final del 10 %. La mezcla se incubó durante 3-6 h en condiciones de cultivo después de lo cual se cuantificó la fluorescencia usando un Spectra Max™ GeminiXS™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Las células transfectadas con miR-124 y miR-106 sintéticos mostraron proliferación significativamente menor que las muestras transfectadas con control negativo, así como muestras transfectadas con los otros miARN sintéticos.

#### Ejemplo 6:

##### **Criba de biblioteca inhibidora de miARN con respecto a miARN que influyen en la proliferación celular**

Una característica del cáncer es la proliferación celular descontrolada. Se usan habitualmente ensayos de proliferación celular por los investigadores para estudiar la influencia de los genes en la oncogénesis. Se usó un ensayo de proliferación celular junto con la biblioteca de inhibidores de miARN de los inventores para identificar miARN que influyen en la proliferación celular.

Se transfectaron células con una biblioteca de más de 90 inhibidores de miARN para identificar miARN que están implicados en el crecimiento celular. Se transfectaron células HeLa (8000 células/pocillo de una placa de 96 pocillos) por triplicado con 5 pmoles de inhibidores de miARN usando siPORT™ NeoFX™ (Ambion). Los medios se cambiaron 24 h después de la transfección. 72 horas después de la transfección, se fijaron células con paraformaldehído al 4 %, se permeabilizaron con TritonX 100 0,1 % y se tiñeron con yoduro de propidio para ver el número de células total. Las placas se exploraron usando el TTP labtech Acumen Explorer. Se representó el número de células en relación con células transfectadas con un inhibidor de miARN de control negativo (FIG. 7). Las barras horizontales rojas separan la variación normal en la proliferación celular (variación del 20 %). Insertos: Se usaron inhibidores de miARN específicos que aumentaron la proliferación celular (flecha izquierda) o no afectaron a la proliferación celular (flecha derecha) en un segundo ciclo de cribado. Las células HeLa se transfectaron con estos inhibidores de miARN y las células se fijaron y se tiñeron con anticuerpo anti-b-actina y DAPI para visualizar los cambios de morfología celular en respuesta a la función de miARN específica. Las células transfectadas con el inhibidor de miARN que aumentaron la proliferación celular muestran alteración notable en la morfología celular (inserto izquierdo) frente a morfología normal (inserto derecho).

Se identificó un grupo de nueve inhibidores de miARN que provocaban enfermedades significativas (miR 31, 150, 187, 125a, 190, 191, 193, 204 y 218) en el crecimiento celular y otros inhibidores de miARN que provocaban un aumento significativo (miR 24 y miR 21) en el crecimiento celular después de transfección en células HeLa (Tabla 4). La inhibición de miARN-31 también provocó una morfología celular definida. Se eligió un punto de corte relativo del

20 % y por debajo del 100 % como genes que se consideraban cambiados de forma significativa. Estos resultados demuestran la capacidad de miARN humanos individuales para regular importantes procesos celulares. Además, la diversidad de los efectos observados demuestra la complejidad potencial de resultados celulares de la regulación mediada por miARN de la expresión génica.

5

**Tabla 4. MiARN que afectan a la proliferación celular**

| <b>miARN</b> | <b>Impacto relativo en la proliferación celular</b> |
|--------------|-----------------------------------------------------|
| miR-31       | Regulación positiva                                 |
| miR-150      | Regulación positiva                                 |
| miR-187      | Regulación positiva                                 |
| miR-125a     | Regulación positiva                                 |
| miR-190      | Regulación positiva                                 |
| miR-191      | Regulación positiva                                 |
| miR-193      | Regulación positiva                                 |
| miR-204      | Regulación positiva                                 |
| miR-218      | Regulación positiva                                 |
| miR-21       | Regulación negativa                                 |
| miR-24       | Regulación negativa                                 |

#### **Ejemplo 7**

##### **Criba de biblioteca de miARN sintético con respecto a miARN que influyen en la apoptosis**

10 Muchas enfermedades incluyendo el cáncer se caracterizan por una incapacidad para instituir muerte celular programada, o apoptosis. Se usó un ensayo de actividad caspasa 3/7 junto con una biblioteca de miARN sintéticos para identificar miARN que están implicados en la regulación de la apoptosis.

15 Se usó una biblioteca de dieciocho miARN sintéticos para transfectar células A549 (8000 células/pocillo de una placa de 96 pocillos) por triplicado usando siPORT™ NeoFX™ (Ambion). El medio se cambió después de 24 h y las células se inspeccionaron visualmente bajo un microscopio para inspeccionar cualitativamente la muerte celular 72 horas después de la transfección. Las células se midieron con respecto a apoptosis midiendo la actividad caspasa 3 de la siguiente manera: 1) Las células se lavaron una vez con PBS y se congelaron a -80 °C. 2) Las células se lisaron añadiendo 40 µl de tampón de lisis frío (HEPES 50 mM pH 7,2, NaCl 40 mM, NP40 0,5 %, EDTA 0,5 mM) a los pocillos y se incubaron durante 20 min a 4 °C. 3) Añadir 160 µl de tampón ICE (HEPES 50 mM pH 7,4, CHAPS 0,1 %, EDTA 0,1 mM, sacarosa 10 %) + DTT 5 mM que contenía sustrato DEVDafc 20 µM. 4) Medir el aumento de fluorescencia en una hora a 400 ex, 505 em.

Las células transfectadas con miARN sintéticos miR-1-2 y miR-33 mostraron actividad caspasa 3/7 reducida y las células transfectadas con miR-20 mostraron niveles muchos más altos de apoptosis. Estos tres miARN probablemente regulen genes que estén implicados en el control de la apoptosis.

#### **Ejemplo 8**

##### **Criba con respecto a miARN que influye en la viabilidad celular**

25 También se usaron inhibidores de miARN para identificar miARN que influyen en la viabilidad celular. Se usó una biblioteca de más de 90 inhibidores de miARN para transfectar células A549 (8000 células/pocillo de una placa de 96 pocillos) por triplicado usando siPORT™ NeoFX™ (Ambion). El medio se cambió después de 24 h y las células se inspeccionaron visualmente en un microscopio para inspeccionar cualitativamente la muerte celular 72 horas después de la transfección. Las células se tripsinizaron y se tiñeron con Reactivo ViaCount Flex, que distingue entre células viables y no viables basándose en la permeabilidad de los colorantes de unión a ADN en el reactivo. Las células se analizaron usando el Guava PCA-96 (Personal Cell Analysis).

35 Veintiún inhibidores de miARN indujeron una relación significativamente diferente de células vivas y muertas que el inhibidor de miARN de control negativo (FIG. 8). Doce redujeron la viabilidad celular y nueve aumentaron la viabilidad celular (Tabla 5). Resulta interesante que hubo poco solapamiento en los miARN que afectaban a la viabilidad celular en células A549 y los que afectaban a la proliferación celular en células HeLa, lo que sugiere que diferentes células responden de forma diferente a tener actividades de miARN reducidas o la viabilidad celular y la proliferación celular no se ven afectadas por las mismas rutas celulares.

**Tabla 5. MiARN que afectan a la viabilidad celular**

| <b>miARN</b> | <b>Impacto relativo en la viabilidad celular</b> |
|--------------|--------------------------------------------------|
| miR-7        | Reducción                                        |
| miR-19a      | Reducción                                        |
| miR-23       | Reducción                                        |
| miR-24       | Reducción                                        |

40

(continuación)

| <b>miARN</b> | <b>Impacto relativo en la viabilidad celular</b> |
|--------------|--------------------------------------------------|
| miR-27a      | Reducción                                        |
| miR-31       | Reducción                                        |
| miR-32       | Reducción                                        |
| miR-134      | Reducción                                        |
| miR-140      | Reducción                                        |
| miR-150      | Reducción                                        |
| miR-192      | Reducción                                        |
| miR-193      | Reducción                                        |
| miR-107      | Aumento                                          |
| miR-133      | Aumento                                          |
| miR-137      | Aumento                                          |
| miR-152      | Aumento                                          |
| miR-155      | Aumento                                          |
| miR-181a     | Aumento                                          |
| miR-191      | Aumento                                          |
| miR-203      | Aumento                                          |
| miR-215      | Aumento                                          |

**Ejemplo 9:****Criba con respecto a miARN que influyen en la apoptosis**

- 5 La apoptosis es un proceso celular natural que ayuda a controlar el cáncer induciendo muerte en células con potencial oncogénico. Muchos oncogenes actúan alterando la inducción de la apoptosis. Para identificar los miARN que participan en la apoptosis, se usó un ensayo de apoptosis con la biblioteca de inhibidores de miARN.

- Usando una biblioteca de más de 90 inhibidores de miARN, se cribó con respecto a miARN que afecten a la apoptosis. Se transfectaron células HeLa (8000 células/pocillo de una placa de 96 pocillos) por triplicado con inhibidores de miARN (5 pmoles) usando siPORT™ NeoFX™ (Ambion). El medio se cambió 24 h después de la transfección y las células procesadas 72 horas después de la transfección. Las células se midieron con respecto a apoptosis midiendo la actividad caspasa 3 de la siguiente manera: 1) Las células se lavaron una vez con PBS y se congelaron a -80 °C. 2) Las células se lisaron añadiendo 40 µl de tampón de lisis frío (HEPES 50 mM pH 7,2, NaCl 40 mM, NP40 0,5 %, EDTA 0,5 mM) a los pocillos y se incubó durante 20 min a 4 °C. 3) Añadir 160 µl de tampón ICE (HEPES 50 mM pH 7,4, CHAPS 0,1 %, EDTA 0,1 mM, sacarosa al 10 %) + DTT 5 mM que contenía sustrato DEVDafc 20 µM. 4) Medir el aumento de fluorescencia en una hora a 400 ex, 505 em.

- También se analizaron muestras con respecto al número de células usando un ensayo de esterasa general para normalizar los resultados de caspasa 3. Se diluyó el sustrato de FDA (fluoresceína diacetato 0,4 mg/ml (FDA) en acetonitrilo) 1:19 en tampón de dilución (TrisCl 40 mM pH 7,5, NaCl 20 mM, NP-40 0,5 %, concentración final de 0,02 mg/ml). Se añadieron 40 µl de tampón (TrisCl 40 mM pH 7,5, NP-40 0,5 %, ) a cada pocillo de muestra. Las muestras se incubaron 10 min en hielo. Se añadieron 160 µl de sustrato de FDA diluido a cada pocillo. La fluorescencia se midió durante 30 min a 37 °C (ex = 488, em = 529). La pendiente del aumento de fluorescencia a lo largo del tiempo está en función del número de células de la placa.

- Se presentan datos de cribado normalizados en la FIG. 9. Los miARN que afectan a la apoptosis se enumeran en la Tabla 6.

**Tabla 6. MiARN que afectan a la apoptosis**

| <b>miARN</b> | <b>Impacto Relativo en la Proliferación Celular</b> |
|--------------|-----------------------------------------------------|
| miR-31       | Reducción                                           |
| miR-214      | Reducción                                           |
| miR-7        | Aumento                                             |
| miR-1-2      | Aumento                                             |
| miR-148      | Aumento                                             |
| miR-195      | Aumento                                             |
| miR-196      | Aumento                                             |
| miR-199a     | Aumento                                             |
| miR-204      | Aumento                                             |
| miR-210      | Aumento                                             |
| miR-211      | Aumento                                             |
| miR-212      | Aumento                                             |
| miR-215      | Aumento                                             |
| miR-216      | Aumento                                             |

(continuación)

| <b>miARN</b> | <b>Impacto Relativo en la Proliferación Celular</b> |
|--------------|-----------------------------------------------------|
| miR-218      | Aumento                                             |
| miR-296      | Aumento                                             |
| miR-321      | Aumento                                             |

**Ejemplo 10****Análisis de expresión usando ARN sintéticos**

Además de usar ensayos fenotípicos para identificar miARN que influyen en los procesos celulares generales o rutas celulares, pueden usarse colecciones de miARN sintéticos y/o inhibidores de miARN para identificar miARN que regulan directamente la expresión de un gen. Se creó un plásmido que tenía un gen de luciferasa inmediatamente cadena arriba de la 3' UTR del gen de G6PD. Se co-transfectaron células A549 con el vector indicador y dieciocho miARN sintéticos diferentes. 24 horas después de la transfección, se midió la actividad luciferasa en las diversas poblaciones celulares. Resulta interesante que el miR-1-2 redujo significativamente la expresión del gen de luciferasa/G6PD, lo que indica que esta familia de miARN regula la expresión del gen de G6PD. Pueden usarse experimentos similares para identificar miARN que regula la expresión de genes importantes tales como p53, BRCA1 y BRCA2, RAS, MYC, BCL-2, y otros.

**Ejemplo 11:****Expresión diferencial de miARN oncogénicos y regulación del cáncer**

Como se ha observado en ejemplos previos, se han identificado varios miARN que se expresan diferencialmente entre muestras de tejido tumoral y adyacente normal de los mismos pacientes de cáncer. Resulta interesante que hay un solapamiento significativo en los miARN que se expresan diferencialmente entre diferentes cánceres, lo que sugiere que hay un conjunto central de miARN que influyen en procesos celulares que cuando se alteran, conducen a cáncer. A continuación se describen experimentos dirigidos a desarrollar una conexión entre la desregulación de miARN y el cáncer.

*Expresión de miARN en el cáncer de pulmón*

Se analizaron veintidós muestras de tumor y tejido adyacente normal (TAN) de pacientes con cáncer de pulmón usando el sistema de matriz de miARN descrito anteriormente. Las matrices se analizaron y se comparó la expresión relativa de cada miARN entre el tumor y los tejidos adyacentes normales de cada paciente. Los diversos miARN se agruparon basándose en su expresión relativa en tumores entre diferentes pacientes (FIG. 14). Se expresaron seis miARN (miR-126, 30a, 143, 145, 188 y 331) a niveles significativamente menores en los tumores de más del 70 % de los pacientes. Se expresaron dos miARN (miR-21 y 200b) a niveles significativamente mayores en los tumores de más del 70 % de los pacientes. La expresión diferencial de varios de estos miARN se verificó por análisis de Northern (FIG. 15).

*Expresión de miARN en cáncer de colon*

Se analizaron veinticinco muestras de tumor y TAN de pacientes de cáncer de colon usando el procedimiento de matrices de miARN de los inventores. Como las comparaciones de cáncer de pulmón, los diversos miARN se agruparon basándose en su expresión relativa en tumores entre los diferentes pacientes de cáncer de colon (FIG. 14). Se expresaron cinco miARN (miR-143, 145, 195, 130a y miR-331) a niveles significativamente menores en los tumores de más del 70 % de los pacientes. Se expresaron cinco miARN (miR-223, 21, 31, 17 y 106) a niveles significativamente mayores en los tumores de más del 70 % de los pacientes.

*miARN como marcadores de cáncer*

Es interesante que ocho miARN diferentes se expresaban diferencialmente entre las muestras tumorales y adyacentes normales para la mayoría de las muestras de paciente de pulmón y colon que se analizaron (FIG. 16). También se descubrió que estos mismos miARN se expresaban diferencialmente en los pacientes con cáncer de mama, timo, vejiga, pancreático y de próstata que se analizaron, lo que sugiere que estos miARN podrían controlar procesos celulares que cuando se alteran conducen a cáncer.

*miARN como reguladores de la expresión oncogénica*

Para abordar si los miARN específicos podrían participar en cáncer mediante la desregulación de oncogenes, se exploraron las regiones no traducidas 3' (UTR) de 150 oncogenes bien conocidos con respecto a secuencias con homología significativa con los miARN identificados en el análisis de micromatrices de los inventores. Se seleccionaron sitios diana potenciales basándose en dos criterios:

(1) *Complementariedad perfecta entre las posiciones 2-9 del miARN y el oncogén.* Esta secuencia central de miARN se ha identificado como crítica para las actividades de los miARN y los sitios diana de miARN conocidos tienen esencialmente 100 % de complementariedad en este sitio (Doench y col. 2004).

(2)  $T_m$  general de la interacción de miARN/ARNm. Además de la secuencia central, se ha mostrado que la estabilidad de unión general entre miARN y ARNm es un indicador importante de la actividad de miARN (Doench y col., 2004).

Como se ve en la Tabla 8, se han identificado sitios de diana potenciales en las 3'UTR de oncogenes conocidos para todos los miARN que se observó que se expresaban diferencialmente de forma rutinaria en muestras tumorales. Resulta interesante que KRAS2, MYCL1 y CBL tienen múltiples sitios de unión a miARN predichos que podrían proporcionar la unión de miARN cooperativa que se ha implicado como un factor importante en la regulación de miARN (Doench y col. 20003; Zeng y col., 2003). Muchos de los genes enumerados en la Tabla 8 se vuelven oncogénicos cuando se sobreexpresan, por lo tanto es concebible que la expresión reducida de un miARN podría conducir a la regulación positiva de uno o más oncogenes y posteriormente conducir a oncogénesis.

**Tabla 8: miARN relacionado con cáncer y sus dianas oncogénicas potenciales**

| miARN    | Diana génica predicha                                                          |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------|
| let-7    | RAS                                                                            |
| let-7    | C-MYC                                                                          |
| miR-21   | homólogo de mutS 2 (MSH2)                                                      |
| miR-21   | homólogo de oncogén viral de sarcoma v-ski (aviar) (SKI)                       |
| miR-143  | región de grupo de punto de rotura (BCR)                                       |
| miR-143  | secuencia transformante derivada de línea celular MCF.2 (MCF2)                 |
| miR-143  | supresor de tumor de von Hippel-Lindau (VHL)                                   |
| miR-143  | homólogo de oncogén viral de sarcoma de rata de Kirsten 2 v-Ki-ras2 (KRAS2)    |
| miR-143  | homólogo de oncogén viral de sarcoma de rata de Kirsten 2 v-Ki-ras2 (KRAS2)    |
| miR-143  | secuencia transformante retroviral ecotrópica (murina) Cas-Br-M (CBL)          |
| miR-143  | secuencia transformante retroviral ecotrópica (murina) Cas-Br-M (CBL)          |
| miR-145  | oncogén relacionado con virus de mielocitomatosis v-myc (MYCN)                 |
| miR-145  | receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGFR2)                   |
| miR-145  | secuencia transformante retroviral ecotrópica (murina) Cas-Br-M (CBL)          |
| miR-188  | homólogo de oncogén viral de mielocitomatosis v-myc 1 (MYCL1)                  |
| miR-200b | cadherina 13 (CDH13)                                                           |
| miR-200b | homólogo del oncogén viral del sarcoma felino de Hardy-Zuckerman 4 v-kit (KIT) |
| miR-219  | homólogo de oncogén viral de mielocitomatosis v-myc 1 (MYCL1)                  |
| miR-219  | CLL de linfocitos B/linfoma 2 (BCL2)                                           |
| miR-219  | cadherina 1, tipo 1, cadherina E (epitelial) (CDH1)                            |
| miR-331  | oncogén vav 1 (VAV1)                                                           |
| miR-331  | receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGFR1)                   |
| miR-331  | antagonistas de BCL2/killer 1 (BAK1)                                           |
| miR-331  | receptor de ácido retinoico, alfa (RARA)                                       |
| miR-331  | homólogo del oncogén viral de sarcoma v-src (Schmidt-Ruppin A-2) (SRC)         |

### Ejemplo 12

#### Medición del efecto de los miARN en la expresión oncogénica

Puede realizarse confirmación de predicciones de sitio diana de miARN de diversas maneras. En *Drosophila* y *C. elegans*, se han aplicado enfoques genéticos en los que se realizan mutaciones en el miARN y el sitio o sitios diana de miARN potenciales y se muestra que dan como resultado fenotipos similares (Ha y col., 1996; Vella y col., 2004). En células de mamífero, en las que los enfoques genéticos son bastante más difíciles, se han usado construcciones indicadoras para mostrar que las 3' UTR de genes diana potenciales se regulan en células a niveles que son desproporcionados con respecto a controles de vectores indicadores que contienen mutaciones en los sitios de unión a miARN potenciales (Lewis y col. 2003). Además, se han usado vectores y oligonucleótidos para introducir o inhibir miARN en células para determinar los efectos en los niveles endógenos de genes diana potenciales (Lewis y col., 2003; Kiriakidou y col. 2004). Este último enfoque se ha realizado para validar las predicciones de sitios diana de miARN.

Se han desarrollado miARN sintéticos e inhibidores de miARN que pueden transfectarse a células de mamífero para introducir miARN en células o inhibir la actividad de miARN en células, respectivamente. Véase documento USSN 60/627.171. Se usaron un miARN sintético y un inhibidor de miARN correspondiente a let-7b para determinar si las predicciones del sitio diana eran correctas. En estos experimentos, se transfectaron células cultivadas que expresaban niveles indetectables del miARN con el miARN sintético usando Agente de Transfección siPORT™ NeoFX™ (Ambion). Se usaron ensayos de inmunofluorescencia para RAS y C-MYC en las células transfectadas. Las proteínas de ambos oncogenes se expresaron a casi tres veces menores niveles en células transfectadas con el miARN sintético que células transfectadas con miARN de Control Negativo (Ambion). En un experimento recíproco, se transfectaron células que expresaban de forma natural altos niveles del miARN con el inhibidor de miARN let-7. Como se esperaba, las proteínas de ambos oncogenes fueron mayores en células transfectadas con el inhibidor de miARN que en células transfectadas con el inhibidor de Control Negativo (Ambion). Estos resultados son coherentes con el modelo de que el miARN regula la expresión de los dos oncogenes. Estos datos sugieren que la

desregulación de un miARN clave podría participar en la progresión del cáncer no consiguiendo regular la expresión de uno o más oncogenes.

#### Ejemplo 13:

#### **Cribados de biblioteca de miARN sintéticos con respecto a miARN que influyen en la proliferación celular y viabilidad celular en diversos tipos celulares**

Una característica del cáncer es la proliferación celular descontrolada; se usan habitualmente ensayos de proliferación celular por investigadores para estudiar la influencia de los genes en la oncogénesis. Se usó un ensayo de proliferación celular junto con la biblioteca de inhibidores de miARN para identificar miARN que influyen en la proliferación celular.

Se transfectaron células HeLa (cáncer de ovario humano) y A549 (cáncer de pulmón humano) por triplicado con 150 miARN sintéticos usando siPORT NeoFX (Ambion) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los 150 son los siguientes: let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7g, miR-1, miR-7, miR-9, miR-10a, miR-10b, miR-15a, miR-16, miR-18, miR-19a, miR-17-3p, miR-20, miR-21, miR-22, miR-23a, miR-23b, miR-24, miR-25, miR-26a, miR-27a, miR-28, miR-29a, miR-31, miR-32, miR-30a-3p, miR-34a, miR-92, miR-95, miR-96, miR-98, miR-99a, miR-100, miR-101, miR-103, miR-105, miR-107, miR-108, miR-122, miR-124, miR-125a, miR-125b, miR-126, miR-128, miR-129, miR-132, miR-133A, miR-133B, miR-134, miR-135, miR-136, miR-137, miR-139, miR-140, miR-141, miR-142, miR-143, miR-144, miR-145, miR-146, miR-147, miR-148, miR-149, miR-150, miR-151, miR-152, miR-153, miR-155, miR-181a, miR-182, miR-183, miR-184, miR-186, miR-187, miR-188, miR-190, miR-191, miR-192, miR-193, miR-194, miR-195, miR-196, miR-197, miR-198, miR-199, miR-201, miR-203, miR-204, miR-205, miR-206, miR-207, miR-208, miR-210, miR-211, miR-212, miR-214, miR-215, miR-216, miR-217, miR-218, miR-219, miR-220, miR-221, miR-223, miR-224, miR-299, miR-301, miR-302, miR-320, miR-322, miR-323, miR-325, miR-324-3p, miR-328, miR-330, miR-331, miR-335, miR-337, miR-338, miR-339, miR-340, miR-345, miR-346, miR-367, miR-368, miR-369, miR-370, miR-371, miR-372, miR-373, miR-374, miR-290, mu-miR-291, mu-miR-292-3p, mu-miR-293, mu-miR-294, mu-miR-295, mu-miR-297, mu-miR-298, mu-miR-329, mu-miR-341, mu-miR-344, mu-miR-351, mu-miR-376b, mu-miR-380-3p, mu-miR-409, mu-miR-411, mu-miR-412.

Los miARN sintéticos fueron moléculas de ácido nucleico bicatenarias compuestos de una cadena activa y una cadena complementaria. La cadena activa contenía una secuencia que era idéntica al miARN maduro correspondiente. La cadena complementaria contenía una secuencia que era 100 % complementaria de la región relevante de la secuencia de miARN madura, pero que 1) carecía de dos nucleótidos en su extremo 3' que eran complementarios de la secuencia de miARN madura (en el extremo 5' de la cadena activa) y 2) tenía un saliente dinucleotídico en su extremo 5' con respecto a la cadena activa. En otras palabras, las dos cadenas eran completamente complementarias de la secuencia de la otra excepto que cada cadena tiene un saliente 5' dinucleotídico con respecto a la otra cadena. Se usó el mismo tipo de miARN sintéticos para el siguiente ejemplo o los siguientes ejemplos también. Se describe posteriormente cualquier excepción. Los miARN indicados en las tablas identifican el miARN que corresponde a la secuencia sintética proporcionada.

Se sometieron a electroporación células Jurkat (célula de leucemia humana) y linfocitos T humanos primarios con el mismo conjunto de miARN sintéticos usando siPorter-96 (Ambion) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todas las células se analizaron con respecto a células viables y no viables 72 horas después de la transfección usando el PCA-96 (Guava) con el Ensayo Viacount. El número de células viables es el número de células vivas en un pocillo en el momento del ensayo. Los números proporcionados en las tablas posteriores son iguales al número medio de células viables en pocillos transfectados con un miARN particular dividido por el número de células viables en pocillos transfectados con miARN sintéticos de control negativo multiplicado por 100 para proporcionar el % de Viabilidad Celular de células transfectadas con miARN en relación con células transfectadas con control negativo.

Se asignó significación basándose en los valores medios de las muestras transfectadas con control negativo. Los miARN que eran significativamente diferentes de los controles negativos se clasificaron como "significativos" basándose en que estuvieran al menos dos desviaciones típicas por encima o por debajo de los datos de control negativo.

La secuencia de miARN-325 es 5'-ccuaguagguguccaguaagugu-3'.

**TABLA 9**  
**miARN que reducen significativamente la viabilidad celular**  
**de células HeLa**

|         | % de viabilidad | Desv. típica |
|---------|-----------------|--------------|
| miR-345 | 75              | 5,9          |
| miR-346 | 77,8            | 8,2          |
| miR-193 | 79,6            | 14,7         |
| miR-206 | 79,6            | 6,5          |
| miR-337 | 80,8            | 3,1          |

(continuación)  
**miARN que reducen significativamente la viabilidad celular  
de células HeLA**

|                | % de viabilidad | Desv. típica |
|----------------|-----------------|--------------|
| mmu-miR-293    | 82,6            | 1,7          |
| miR-299        | 84,0            | 4,0          |
| mmu-miR-329    | 84,5            | 4,5          |
| mmu-miR-409    | 86              | 2,8          |
| mmu-miR-292-3p | 86,2            | 2,8          |
| miR-210        | 86,4            | 5,1          |
| mmu-miR-344    | 86,4            | 5,3          |
| mmu-miR-298    | 86,7            | 4,2          |
| miR-208        | 87,4            | 4,5          |
| miR-197        | 87,6            | 7,5          |
| miR-217        | 87,9            | 3,5          |
| miR-1          | 88,2            | 9,0          |
| miR-124        | 88,8            | 4,2          |

**TABLA 10**  
**miARN que reducen significativamente el número de células viables  
de células HeLA**

|             | Células Totales | Desv. típica |
|-------------|-----------------|--------------|
| Let-7b      | 16,2            | 8,1          |
| Let-7g      | 22,7            | 8,2          |
| Let-7c      | 24,1            | 7,2          |
| miR-124     | 24,5            | 3,4          |
| Let-7a      | 25,4            | 1,2          |
| Let-7d      | 37,3            | 2,3          |
| miR-337     | 37,5            | 16,9         |
| miR-1       | 38,7            | 2,2          |
| miR-299     | 38,9            | 4,2          |
| miR-34a     | 40,5            | 13,3         |
| mmu-miR-292 | 41,2            | 8,3          |
| miR-122     | 41,2            | 6,5          |
| miR-346     | 41,9            | 4,3          |
| miR-101     | 43,4            | 6,4          |
| miR-210     | 47,1            | 8,4          |
| miR-147     | 47,7            | 8,2          |
| miR-98      | 50,6            | 2,6          |
| miR-345     | 51,8            | 6,8          |
| miR-92      | 52,4            | 6,8          |
| miR-96      | 53,2            | 0,9          |
| miR-7       | 54,0            | 5,3          |
| miR-133b    | 55,9            | 3,1          |
| miR-206     | 56,0            | 12,4         |
| mmu-miR-297 | 56,0            | 5,7          |
| miR-19a     | 57,2            | 20,6         |
| mmu-miR-344 | 57,5            | 14,1         |
| miR-205     | 58,9            | 18,7         |
| miR-208     | 60,5            | 11,1         |

**TABLA 11**  
**miARN que aumentan significativamente el número de células  
viables de células HeLA**

|            | Células Totales | Desv. típica |
|------------|-----------------|--------------|
| miR-32     | 142,9           | 25,4         |
| mu-miR-290 | 143,5           | 17,6         |
| miR-212    | 143,5           | 10,4         |
| miR-92     | 144,7           | 16,8         |
| miR-323    | 147,3           | 25,9         |
| miR-145    | 148,1           | 22,2         |
| miR-324    | 148,2           | 9,0          |
| miR-198    | 152,1           | 67,8         |

(continuación)

**miARN que aumentan significativamente el número de células viables de células HeLA**

|             | <b>Células Totales</b> | <b>Desv. típica</b> |
|-------------|------------------------|---------------------|
| miR-27a     | 156,2                  | 13,4                |
| miR-369     | 158,4                  | 27,3                |
| miR-31      | 159,3                  | 16,1                |
| miR-335     | 161,7                  | 20,8                |
| mmu-miR-351 | 162,3                  | 6,9                 |
| miR-370     | 164,3                  | 4,5                 |
| miR-325     | 169,6                  | 19,8                |
| miR-331     | 172,5                  | 24,0                |
| miR-139     | 181,3                  | 11,2                |

**TABLA 12**

**miARN que reducen significativamente la viabilidad celular de células A549**

|             | <b>% de Viabilidad</b> | <b>Desv. típica</b> |
|-------------|------------------------|---------------------|
| miR-193     | 92,4                   | 2,5                 |
| miR-224     | 92,5                   | 1,4                 |
| miR-96      | 92,6                   | 0,1                 |
| miR-346     | 93,9                   | 1,6                 |
| mmu-miR-293 | 94,9                   | 0,7                 |
| miR-34a     | 95                     | 0,2                 |
| miR-216     | 95,1                   | 1,0                 |
| mmu-miR-380 | 95,2                   | 0,8                 |
| miR-182     | 95,6                   | 0,8                 |
| miR-301     | 95,6                   | 1,0                 |
| mmu-miR-344 | 95,8                   | 0,2                 |
| mmu-miR-409 | 95,8                   | 0,6                 |
| miR-369     | 95,9                   | 0,7                 |

**TABLA13**

**miARN que reducen significativamente el número de células viables en células A549**

|             | <b>Número de células</b> | <b>Desv. típica</b> |
|-------------|--------------------------|---------------------|
| miR-124     | 44,3                     | 2,2                 |
| miR-16      | 52,9                     | 1,3                 |
| miR-337     | 54,7                     | 7,0                 |
| miR-195     | 59,3                     | 6,7                 |
| miR-34a     | 60,8                     | 2,1                 |
| miR-15a     | 60,9                     | 3,7                 |
| miR-28      | 61,3                     | 0,8                 |
| Let-7g      | 61,9                     | 0,8                 |
| mmu-miR-292 | 62,2                     | 2,3                 |
| mmu-miR-344 | 62,6                     | 9,1                 |
| miR-7       | 62,9                     | 4,6                 |
| miR-193     | 63,7                     | 3,3                 |
| miR-137     | 63,9                     | 1,3                 |
| miR-147     | 64,8                     | 0,5                 |
| miR-29a     | 67,0                     | 3,8                 |
| miR-129     | 67,2                     | 3,3                 |
| miR-22      | 67,5                     | 3,4                 |
| miR-126     | 68,0                     | 2,6                 |
| miR-345     | 69,2                     | 7,4                 |
| miR-192     | 69,5                     | 5,9                 |
| Let-7b      | 70,2                     | 2,2                 |
| Let-7d      | 70,5                     | 2,7                 |
| miR-346     | 70,9                     | 7,1                 |

**TABLA 14**  
**miARN que aumenta significativamente el número de células viables en A549**

|             | <b>Células totales</b> | <b>Desv. Típica</b> |
|-------------|------------------------|---------------------|
| miR-373     | 110,4                  | 7,9                 |
| miR-25      | 111,8                  | 6,0                 |
| mmu-miR-294 | 112,1                  | 5,9                 |
| miR-32      | 120,8                  | 4,3                 |
| miR-92      | 122,4                  | 4,0                 |

**TABLA 15**  
**miARN que reducen significativamente el número de células viables de Células Jurkat**

|            | <b>% de Viabilidad</b> | <b>Desv. Típica</b> |
|------------|------------------------|---------------------|
| let-7a     | 20,54                  | 0,70                |
| miR-10b    | 35,98                  | 2,92                |
| let-7b     | 48,79                  | 5,08                |
| miR-17-3p  | 61,55                  | 15,63               |
| miR-30a-3p | 64,36                  | 26,60               |
| miR-34a    | 65,45                  | 20,44               |
| miR-122    | 65,63                  | 17,80               |
| miR-29a    | 66,44                  | 7,14                |
| miR-101    | 67,44                  | 29,56               |
| miR-133a   | 71,51                  | 17,82               |
| miR-19a    | 71,77                  | 23,79               |
| miR-32     | 75,59                  | 11,69               |
| miR-1      | 75,74                  | 12,92               |
| miR-132    | 76,32                  | 16,22               |
| miR-28     | 77,07                  | 16,58               |
| miR-20     | 77,60                  | 15,23               |
| miR-134    | 78,96                  | 1,75                |

**TABLA 16**  
**miARN que aumentan significativamente la viabilidad celular en células Jurkat**

|           | <b>Células totales</b> | <b>Desv. Típica</b> |
|-----------|------------------------|---------------------|
| miR-181-a | 122,77                 | 22,40               |
| miR-9     | 124,63                 | 9,98                |
| miR-141   | 126,08                 | 24,03               |
| miR-98    | 126,24                 | 11,90               |
| miR-10a   | 126,86                 | 8,93                |
| miR-125b  | 128,71                 | 3,50                |
| miR-126   | 130,69                 | 18,20               |
| miR-100   | 130,77                 | 14,60               |
| miR-23b   | 132,18                 | 3,50                |
| miR-140   | 135,73                 | 4,08                |
| miR-155   | 142,57                 | 22,40               |
| miR-15a   | 143,01                 | 11,29               |
| miR-129   | 146,94                 | 9,92                |
| miR-25    | 150,25                 | 17,85               |
| miR-143   | 158,74                 | 1,86                |
| miR-26a   | 166,09                 | 13,65               |

**TABLA 17**  
**miARN que reducen significativamente la viabilidad celular en linfocitos T primarios**

|         | <b>% de Viabilidad</b> | <b>Desv. Típica</b> |
|---------|------------------------|---------------------|
| miR-184 | 61,04                  | 12,16               |
| miR-145 | 68,98                  | 11,23               |
| miR-186 | 69,64                  | 6,99                |
| miR-139 | 69,85                  | 0,29                |
| miR-134 | 71,90                  | 22,42               |

(continuación)

**miARN que reducen significativamente la viabilidad celular en linfocitos**

| <b>T primarios</b> |                        |                     |
|--------------------|------------------------|---------------------|
|                    | <b>% de Viabilidad</b> | <b>Desv. Típica</b> |
| miR-190            | 75,59                  | 2,43                |
| miR-144            | 77,13                  | 4,18                |
| miR-183            | 77,71                  | 2,86                |
| miR-147            | 78,09                  | 0,33                |
| miR-140            | 78,70                  | 5,81                |
| miR-155            | 79,26                  | 10,68               |

**TABLA 18****miARN que aumentan significativamente la viabilidad celular de linfocitos**

| <b>T primarios</b> |                        |                     |
|--------------------|------------------------|---------------------|
|                    | <b>% de Viabilidad</b> | <b>Desv. Típica</b> |
| miR-126            | 120,81                 | 40,08               |
| miR-10b            | 121,28                 | 18,86               |
| miR-17             | 122,46                 | 3,71                |
| miR-10a            | 124,11                 | 9,46                |
| miR-20             | 124,75                 | 13,60               |
| let-7c             | 124,81                 | 4,00                |
| miR-125a           | 125,66                 | 5,13                |
| miR-15a            | 129,07                 | 10,96               |
| let-7b             | 130,11                 | 13,48               |
| let-7a             | 130,88                 | 16,16               |
| miR-18             | 131,73                 | 1,75                |

Es interesante observar que los miARN que afectan a un tipo celular con frecuencia no afectan a otros tipos celulares. Esto se debe probablemente al hecho de que los procesos celulares que están activos varían entre diferentes tipos celulares. Esto puede ser de importancia vital cuando se considera el potencial de los productos terapéuticos basados en miARN. Las células anómalas (enfermas) son diferentes de células normales debido al hecho de que están activos diferentes procesos celulares en los dos tipos celulares. La identificación de miARN que tienen efectos diferenciales en células normales y anómalas sería ideal ya que podrían suministrarse globalmente y esperarse que tuvieran un efecto solamente en células enfermas. Cuando se compararon los datos de viabilidad celular para las células de leucemia (linfocitos T cancerosos) y linfocitos T primarios, se observó que let-7a, let-7ab y miR-10b redujeron todos significativamente el porcentaje de células viables en las células de leucemia no teniendo al mismo tiempo esencialmente ningún efecto en los linfocitos T normales correspondientes. Estos miARN son candidatos para fármacos de leucemia.

**Ejemplo 14:****Criba con respecto a miARN que influyen en la apoptosis**

La apoptosis es un proceso celular natural que ayuda a combatir el cáncer induciendo muerte en células con potencial oncogénico. Muchos oncogenes actúan alterando la inducción de la apoptosis. Para identificar miARN que participan en la apoptosis se usó un ensayo de la apoptosis con la biblioteca de inhibidores de miARN.

Se transfectaron células HeLa (8000 células/pocillo de una placa de 96 pocillos) por triplicado con más de 150 miARN sintéticos (descrito anteriormente) (3 pmoles) usando Ambion siPORT™ NeoFX™. El medio se cambió 24 h después de la transfección y las células se procesaron 72 horas después de la transfección. Las células se midieron con respecto a apoptosis midiendo la actividad caspasa 3 de la siguiente manera: 1) Las células se lavaron una vez con PBS y se congelaron a -80 °C. 2) Las células se lisaron añadieron 40 µl de tampón de lisis frío (HEPES 50 mM pH 7,2, NaCl 40 mM, NP40 0,5 %, EDTA 0,5 mM) a los pocillos y se incubaron durante 20 min a 4 °C. 3) Añadir 160 µl de tampón ICE (HEPES 50 mM pH 7,4, CHAPS 0,1 %, EDTA 0,1 mM, sacarosa 10 %) + DTT 5 mM que contenía sustrato DEVDafc 20 µM. 4) Medir el aumento de fluorescencia en una hora a 400 ex, 505 em.

También se analizaron muestras con respecto al número de células usando un ensayo de esterasa general para normalizar los resultados de caspasa 3. Se diluyó el sustrato de FDA (fluoresceína diacetato 0,4 mg/ml (FDA) en acetonitrilo) 1:19 en tampón de dilución (TrisCl 40 mM pH 7,5, NaCl 20 mM, NP-40 0,5 %, concentración final de 0,02 mg/ml). Se añadieron 40 µl de tampón (TrisCl 40 mM pH 7,5, NP-40 0,5 %,) a cada pocillo de muestra. Las muestras se incubaron 10 min en hielo. Se añadieron 160 µl de sustrato de FDA diluido a cada pocillo. Se midió la fluorescencia durante 30 min a 37 grados (ex = 488, em = 529). La pendiente del aumento de fluorescencia a lo largo del tiempo está en función del número de células en la placa.

Se enumeran miARN que afectan a la apoptosis en la tabla posterior. Estos miARN regulan aparentemente rutas que conducen a la apoptosis. La desregulación de estos miARN podría inducir que las células experimentaran

apoptosis o podría evitar que las células experimentaran apoptosis. La introducción o inhibición de estos miARN en células cancerosas (u otra enfermedad) que han superado rutas de señalización apoptótica o células de Parkinson (u otra enfermedad) que han inducido la apoptosis de forma prematura podrían usarse para tratar las enfermedades.

**TABLA 20**  
**miARN que aumentan significativamente el porcentaje de células apoptóticas**

|             | <b>Cambio relativo en células apoptóticas</b> | <b>Desv. Típica</b> |
|-------------|-----------------------------------------------|---------------------|
| miR-338     | 773,46                                        | 69,82               |
| miR-27a     | 607,24                                        | 150,08              |
| miR-128     | 594,42                                        | 260,06              |
| miR-23a     | 473,44                                        | 208,82              |
| miR-324     | 442,99                                        | 101,03              |
| miR-22      | 439,13                                        | 62,59               |
| miR-181a    | 409,97                                        | 65,14               |
| mmu-miR-293 | 403,86                                        | 53,41               |
| mmu-miR-412 | 402,27                                        | 42,04               |
| miR-196     | 378,13                                        | 28,15               |
| miR-31      | 373,90                                        | 61,39               |
| Let-7d      | 369,10                                        | 88,94               |
| miR-23b     | 360,68                                        | 81,97               |
| mu-miR-290  | 354,90                                        | 46,63               |
| miR-217     | 347,38                                        | 56,49               |
| miR-199     | 345,75                                        | 67,55               |
| miR-24      | 317,43                                        | 62,85               |
| miR-214     | 312,25                                        | 7,38                |
| miR-198     | 303,24                                        | 44,25               |

5

**TABLA 21**  
**miARN que reducen significativamente el porcentaje de células apoptóticas**

|             | <b>Cambio relativo en células apoptóticas</b> | <b>Desv. Típica</b> |
|-------------|-----------------------------------------------|---------------------|
| miR-105     | 39,97                                         | 8,91                |
| miR-34a     | 37,75                                         | 8,41                |
| miR-96      | 31,89                                         | 13,40               |
| mmu-miR-292 | 30,72                                         | 4,27                |
| miR-126     | 28,71                                         | 4,24                |
| miR-137     | 12,69                                         | 11,80               |
| miR-101     | 7,50                                          | 6,91                |

#### **Ejemplo 15:**

#### **Cribas de bibliotecas de miARN sintéticos con respecto a miARN que influyen en el ciclo celular**

El cuerpo humano adulto consiste en aproximadamente 50-100 billones de células. Cada día, varios miles de millones de estas células se dividen en dos para reemplazar los miles de millones de células que mueren y se retiran. En el transcurso de un tiempo de vida medio, esto suma un número astronómico de divisiones celulares, la mayoría de las cuales suceden perfectamente bien. Se producen, no obstante, errores, y si no se corrigen pueden conducir a cáncer. El crecimiento y división celular se controla normalmente por un sistema intrincado de comprobaciones y equilibrios. Sin embargo, ocasionalmente una célula comenzará a proliferar sin control, dividiéndose una y otra vez y desafiando todas las restricciones normales en su crecimiento. Este es el comienzo de las formas más comunes de cáncer.

Las 4.000 células BJ/pocillo se transfectaron por triplicado con 46 miARN sintéticos usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

20 Let-7a  
Let-7a  
miR-1  
miR-1  
miR-105  
miR-125a  
25 miR-128  
miR-142  
miR-145  
miR-146  
miR-147

|    |                |
|----|----------------|
|    | miR-150        |
|    | miR-15a        |
|    | miR-16         |
|    | miR-186        |
| 5  | miR-187        |
|    | miR-188        |
|    | miR-191        |
|    | miR-195        |
|    | miR-20         |
| 10 | miR-206        |
|    | miR-21         |
|    | miR-211        |
|    | miR-223        |
|    | miR-224        |
| 15 | miR-26a        |
|    | miR-320        |
|    | miR-324-3p     |
|    | miR-325        |
|    | miR-335        |
| 20 | miR-337        |
|    | miR-338        |
|    | miR-345        |
|    | miR-371        |
|    | miR-373        |
| 25 | miR-92         |
|    | mmu-miR-201    |
|    | mmu-miR-207    |
|    | mmu-miR-290    |
|    | mmu-miR-291-3p |
| 30 | mmu-miR-294    |
|    | mmu-miR-295    |
|    | mmu-miR-297    |
|    | mmu-miR-322    |
|    | mmu-miR-376b   |
| 35 | mmu-miR-409    |

24 horas después de la transfección, la mitad de las células BJ de cada pocillo se retiraron a medio nuevo. 72 h después de la transfección se fijaron con paraformaldehído al 4 % a una concentración final de 2 %. Las células fijadas se tiñeron con yoduro de propidio (TTP LabTech protocol) y se evaluaron usando el explorador celular TTP LabTech. El yoduro de propidio tiñe el ADN y el contenido de AND relativo en una célula corresponde a su posición en el ciclo celular. El explorador celular midió la tinción de yoduro de propidio en cada célula y asignó su posición en el ciclo celular. El porcentaje de células en cada estadio del ciclo celular se calculó y se comparó con células transfectadas con miARN sintéticos de control negativo. El cambio relativo en células en cada estadio se calculó para cada miARN que se usó. Los miARN sintéticos que indujeron un cambio significativo hacia o en dirección opuesta a un estadio específico del ciclo celular se enumeran posteriormente. Estos representan miARN que regulan puntos claves en el ciclo celular y ofrecen puntos de intervención clave para el desarrollo terapéutico relacionado con el cáncer.

**TABLA 23**  
**miARN que reducen significativamente el porcentaje de células BJ en fase G1 del ciclo celular**

| miARN       | % de Dif. en células en G1 | Desv. Típica |
|-------------|----------------------------|--------------|
| miR-miR-21  | 54,4                       | 4,2          |
| miR-miR-20  | 63,6                       | 9,3          |
| miR-miR-1   | 65,3                       | 9,5          |
| miR-miR-206 | 66,8                       | 9,0          |
| miR-miR-373 | 72,6                       | 5,7          |
| miR-miR-26a | 78,0                       | 4,0          |

**TABLA 24**  
**miARN que aumentan significativamente el porcentaje de células BJ en fase G1 del ciclo celular**

| miARN           | % de Dif. en células en G1 | Desv. Típica |
|-----------------|----------------------------|--------------|
| rno-miR-miR-325 | 121,7                      | 5,3          |
| mmu-409         | 123,2                      | 13,7         |
| miR-miR-324     | 123,7                      | 4,9          |

(continuación)

**miARN que aumentan significativamente el porcentaje de células BJ en fase G1 del ciclo celular**

| <b>miARN</b> | <b>% de Dif. en células en G1</b> | <b>Desv. Típica</b> |
|--------------|-----------------------------------|---------------------|
| miR-miR-195  | 125,1                             | 2,5                 |
| mmu-376b     | 126,5                             | 3,1                 |
| miR-miR-142  | 127,0                             | 13,0                |
| miR-miR-371  | 128,9                             | 2,8                 |
| let-7a       | 131,5                             | 4,5                 |
| miR-miR-146  | 141,5                             | 7,7                 |
| miR-miR-128  | 143,0                             | 2,4                 |

**TABLA 25**

**miARN que reducen significativamente el porcentaje de células BJ en fase S del ciclo celular**

| <b>miARN</b> | <b>% de Dif. en células en S</b> | <b>Desv. Típica</b> |
|--------------|----------------------------------|---------------------|
| miR-miR-128  | 55,5                             | 3,8                 |
| let-7a       | 57,6                             | 8,7                 |
| miR-miR-142  | 59,5                             | 24,7                |
| miR-miR-146  | 63,5                             | 16,8                |
| mmu-297      | 65,0                             | 14,1                |
| miR-miR-337  | 65,3                             | 11,3                |
| miR-miR-195  | 65,6                             | 0,1                 |
| mmu-376b     | 69,1                             | 11,6                |
| miR-miR-324  | 72,2                             | 9,4                 |
| miR-miR-187  | 72,3                             | 10,9                |
| miR-miR-186  | 72,8                             | 6,1                 |

**TABLA 26**

**miARN que aumentan significativamente el porcentaje de células BJ en fase S del ciclo celular**

| <b>miARN</b> | <b>% de Dif. en células en S</b> | <b>Desv. Típica</b> |
|--------------|----------------------------------|---------------------|
| miR-miR-92   | 132,0                            | 14,7                |
| miR-miR-15a  | 134,8                            | 13,9                |
| miR-miR-191  | 135,9                            | 29,1                |
| miR-miR-26a  | 136,0                            | 7,6                 |
| miR-miR-20   | 139,7                            | 17,6                |
| mmu-290      | 141,0                            | 11,7                |
| let-7a       | 141,1                            | 19,9                |
| miR-miR-345  | 143,3                            | 45,8                |
| miR-miR-16   | 150,1                            | 24,8                |
| miR-miR-224  | 150,6                            | 9,8                 |

**TABLA 26**

**miARN que reducen significativamente el porcentaje de células BJ en fase G2/M del ciclo celular**

| <b>miARN</b> | <b>% de Dif. en células en G2/M</b> | <b>Desv. Típica</b> |
|--------------|-------------------------------------|---------------------|
| miR-miR-147  | 51,2                                | 6,1                 |
| miR-miR-371  | 52,8                                | 2,7                 |
| miR-miR-146  | 57,2                                | 5,3                 |
| miR-miR-195  | 58,9                                | 4,4                 |
| miR-miR-128  | 65,4                                | 2,7                 |
| miR-miR-15a  | 67,4                                | 13,7                |
| let-7a       | 69,1                                | 2,8                 |

**TABLA 27**

**miARN que aumentan significativamente el porcentaje de células BJ en fase G2/M del ciclo celular**

| <b>miARN</b> | <b>% de Dif. en células en G2/M</b> | <b>Desv. Típica</b> |
|--------------|-------------------------------------|---------------------|
| miR-miR-26a  | 130,2                               | 5,8                 |
| miR-miR-187  | 132,0                               | 4,3                 |
| miR-miR-145  | 136,8                               | 13,7                |
| miR-miR-373  | 137,9                               | 5,2                 |
| miR-miR-20   | 143,0                               | 10,6                |
| miR-miR-21   | 160,3                               | 7,1                 |

**TABLA 28**  
**miARN que aumentan significativamente el porcentaje de células BJ**  
**con más de 2X la cantidad de ADN**

| miARN       | % de Díf. en células con >2X ADN | Desv. Típica |
|-------------|----------------------------------|--------------|
| miR-miR-20  | 157,9                            | 23,4         |
| miR-miR-1   | 161,9                            | 13,6         |
| miR-miR-345 | 176,1                            | 17,4         |
| miR-miR-373 | 177,9                            | 32,7         |
| miR-miR-337 | 195,0                            | 52,1         |
| miR-miR-21  | 209,4                            | 45,7         |

#### Ejemplo 16:

#### **Criba de biblioteca de miARN sintéticos con respecto a miARN que influyen en la proliferación celular**

- 5 Se usaron ensayos de proliferación celular junto con la biblioteca de miARN sintéticos de los inventores para identificar miARN que influyen en la proliferación celular en una amplia serie de células, incluyendo las de tejidos de pulmón, mama, próstata, piel, cuello uterino, linfocitos T y prepucio.

10 Se transfectaron células de cuello uterino (HeLa), pulmón (A549, CRL-5826 y HTB-57), mama (MCF12A y BT549), próstata (22Rv1), linfocitos T (Jurkat y normales primarios) y piel (TE354T, TE353SK, y BJ) por triplicado con cada uno de los más de 150 miARN sintéticos en la biblioteca de los inventores. Con las excepciones de Jurkat y linfocitos T primarios, cada tipo celular se transfectó con 5 picomoles de cada uno de los miARN en la biblioteca de miARN sintéticos usando siPORT™ y NeoFX™ (Ambion) a una densidad de siembra de aproximadamente 8000 células/pocillo de una placa de 96 pocillos. Los Jurkats y linfocitos T primarios se mezclaron a una tasa de aproximadamente 50.000 células/pocillo con 500 picomoles de cada uno de los miARN sintéticos. El medio se cambió 24 h después de la transfección. 72 horas después de la transfección, se estimó el número de células por uno de tres procedimientos:

- (1) Se añadió AlamarBlue a cada pocillo y las placas de 96 pocillos se analizaron usando un lector de placas. El AlamarBlue es un sustrato para una enzima metabólica en células y el producto de reacción es fluorescente. La fluorescencia de cada pocillo se correlaciona con el número total de células en cada pocillo.
- 20 (2) Se añadió Reactivo ViaCount Flex (Guava), un colorante que fluoresce cuando interacciona con el ADN, a cada pocillo y se cuantificó la fluorescencia usando el Guava PCA-96 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- (3) Se añadió yoduro de propidio, un colorante que fluoresce cuando interacciona con el ADN, a cada pocillo y se estimó el número total de células contando sitios únicos de ADN teñido usando el Explorador Celular TTP LabTech de acuerdo con las instrucciones del fabricante.
- 25

Se evaluó la influencia de cada miARN en la proliferación celular dividiendo la lectura del número de células de cada pocillo por la lectura de número de células medio para pocillos transfectados con un miARN de control negativo (CN).

- 30 Se presentan en la FIG. 15A-C miARN sintéticos que redujeron significativamente la proliferación de los diversos tipos celulares que se analizaron. Estos miARN representan moléculas que podrían usarse para terapia, diagnóstico, crear líneas celulares con propiedades de investigación interesantes, e inducir diferenciación.

Aproximadamente el 10 % de los miARN redujeron significativamente la proliferación celular para al menos cuatro tipos celulares diferentes. Estos miARN (presentados en orden de clasificación en la tabla posterior) se proporcionan posteriormente y pueden implementarse en procedimientos y composiciones de la invención.

35

**Tabla 29**  
**miARN comunes y de proliferación**

| miARN   | nº de positivos |
|---------|-----------------|
| miR-124 | 7               |
| miR-16  | 6               |
| miR-101 | 6               |
| miR-126 | 6               |
| miR-147 | 6               |
| miR-15a | 5               |

(continuación)

| miARN   | nº de positivos |
|---------|-----------------|
| miR-96  | 5               |
| miR-105 | 5               |
| miR-142 | 5               |
| miR-215 | 5               |
| miR-346 | 4               |
| miR-206 | 4               |
| miR-192 | 4               |
| miR-194 | 4               |

Entre las células que se usaron en las cribas de biblioteca de miARN sintéticos se emparejan pares de células cancerosas y no cancerosas, de mama, piel y linfocitos T. Resulta interesante que muchos miARN sintéticos afectaron de forma diferencial a la proliferación en los pares celulares (véase tabla posterior).

**Tabla 30**

**Mama**

|         | <b>Cáncer</b> |              | <b>No Cáncer</b> |              |
|---------|---------------|--------------|------------------|--------------|
| miARN   | % CN          | % Desv. Típ. | % CN             | % Desv. Típ. |
| miR-201 | 79            | 14           | 103              | 17           |
| miR-192 | 81            | 3            | 95               | 17           |
| miR-92  | 85            | 11           | 104              | 24           |

**Piel**

|             | <b>Cáncer</b> |              | <b>Normal</b> |              |
|-------------|---------------|--------------|---------------|--------------|
| pre-MIR     | % de CN       | % Desv. Típ. | % de CN       | % Desv. Típ. |
| miR-154     | 51            | 5            | 93            | 10           |
| miR-195     | 58            | 3            | 87            | 5            |
| mu-miR-376b | 65            | 3            | 99            | 8            |
| miR-201     | 67            | 8            | 106           | 4            |
| miR-26a     | 69            | 12           | 97            | 17           |
| miR-193     | 69            | 4            | 105           | 10           |

**Linfocitos T**

|            | <b>Leucemia</b> |              | <b>Normal</b> |              |
|------------|-----------------|--------------|---------------|--------------|
|            | % CN            | % Desv. Típ. | % CN          | % Desv. Típ. |
| let-7a     | 21              | 1            | 137           | 15           |
| let-7b     | 50              | 5            | 136           | 13           |
| miR-101    | 69              | 30           | 95            | 5            |
| miR-10b    | 37              | 3            | 115           | 18           |
| miR-122    | 67              | 18           | 104           | 18           |
| miR-17-3p  | 63              | 16           | 116           | 4            |
| miR-29a    | 68              | 7            | 111           | 8            |
| miR-30a-3p | 66              | 27           | 97            | 18           |
| miR-34a    | 67              | 21           | 100           | 1            |

Se presentan en la FIG. 16 miARN sintéticos que aumenta significativamente la proliferación de los diversos tipos celulares que se analizaron.

**Ejemplo 17:**

**Cribas de biblioteca de inhibidores de miARN identifican miARN que influyen en la proliferación celular**

Se usó ensayo de proliferación celular junto con la biblioteca de miARN sintéticos de los inventores para identificar miARN que influyen en la proliferación celular en una amplia serie de células, incluyendo las de tejidos de pulmón, mama, próstata, piel, cuello uterino, linfocitos T y prepucio.

Se transfectaron células de mama (MCF12A), próstata (22Rv1), pulmón (A549), y piel (TE354T) por triplicado con cada uno de los más de 150 inhibidores de miARN de la biblioteca de los inventores. Cada tipo celular se transfectó con 10 picomoles de cada uno de los inhibidores de miARN en la biblioteca usando siPORT™ y NeoFX™ (Ambion) a una densidad de siembra de aproximadamente 8000 células/pocillo de una placa de 96 pocillos. 72 h después de la transfección, se estimó el número de células por uno de tres procedimientos:

(1) Se añadió AlamarBlue a cada pocillo y se analizaron las placas de 96 pocillos usando un lector de placas. El AlamarBlue es un sustrato para una enzima metabólica en células y el producto de reacción es fluorescente. La fluorescencia en cada pocillo se correlaciona con el número total de células en cada pocillo.

(2) Se añadió Reactivo ViaCount Flex (Guava), un colorante que fluoresce cuando interacciona con ADN, a cada pocillo y se cuantificó la fluorescencia usando el Guava PCA-96 de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

(3) Se añadió yoduro de propidio, un colorante que fluoresce cuando interacciona con ADN, a cada pocillo y se estimó el número total de células en el pocillo contando sitios únicos de ADN teñido usando el Explorador Celular TTP LabTech de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La influencia de cada miARN en la proliferación celular se evaluó dividiendo la lectura del número de células de cada pocillo por la lectura de número de células medio para pocillos transfectados con un miARN de control negativo (CN).

Se presentan en la FIG. 17 miARN cuya inhibición redujo significativamente la proliferación de los diversos tipos celulares que se analizaron. Estos miARN representan moléculas que podrían usarse para terapia, diagnóstico, crear líneas celulares con propiedades de investigación interesantes e inducir diferenciación.

Se presentan en la FIG. 18 inhibidores de miARN que aumentan significativamente la proliferación de los diversos tipos celulares que se analizaron. Estos miARN representan moléculas que podrían usarse para terapia, diagnóstico, crear líneas celulares con propiedades de investigación interesantes e inducir diferenciación.

#### **Ejemplo 18:**

#### **Criba de biblioteca de miARN sintéticos con respecto a miARN que influyen en la viabilidad celular**

La base para la mayoría de enfermedades humanas es la subversión de una o más células para que actúen de maneras distintas a lo que hacen normalmente. Por ejemplo, el cáncer se inicia con la inmortalización y transformación de una única célula que después se divide repetidas veces para formar un tumor. Se usan habitualmente compuestos que reducen la viabilidad de las células enfermas para tratar pacientes con cáncer y otras enfermedades.

Se transfectaron cuello uterino (HeLa), pulmón (A549) y linfocitos T (Jurkat y normal primario) por triplicado con cada uno de los más de 150 miARN sintéticos de la biblioteca de los inventores. Con las excepciones de Jurkat y linfocitos T primarios, cada tipo celular se transfectó con 5 picomoles de cada uno de los miARN en la biblioteca de miARN sintéticos usando siPORT™ y NeoFX™ (Ambion) a una densidad de siembra de aproximadamente 8000 células/pocillo de una placa de 96 pocillos. Las Jurkats y linfocitos T primarios se mezclaron a una tasa de aproximadamente 50.000 células/pocillo con 500 picomoles de cada uno de los miARN sintéticos. Para las células HeLa y A549, el medio se cambió 24 h después de la transfección. 72 horas después de la transfección, se estimó el número de células por uno de dos procedimientos:

(1) Reactivo ViaCount Flex (Guava), que incluye un colorante que solamente puede entrar en células muertas y que fluoresce cuando interacciona con el ADN, a cada pocillo y se cuantificó la fluorescencia usando el Guava PCA-96 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El porcentaje de células viables se midió dividiendo el número de células no muertas y no apoptóticas en la muestra por el número total de células en el pocillo y multiplicando por 100.

(2) Se añadió a cada pocillo yoduro de propidio, un colorante que fluoresce cuando interacciona con el ADN. Cada célula se analizó usando el Explorador Celular TTP LabTech de acuerdo con las instrucciones del fabricante para detectar células con patrones de tinción coherentes con la muerte celular o la apoptosis. El porcentaje de células viables se midió dividiendo el número de células no muertas y no apoptóticas en la muestra por el número total de células en el pocillo y multiplicando por 100.

Se presentan en la FIG. 19 miARN sintéticos que reducen o aumentan significativamente la viabilidad en los diversos tipos celulares que se analizaron. Una comparación de la viabilidad de Jurkat y linfocitos T primarios, que representan las formas normales y leucémicas de linfocitos T, let-7, miR-10, miR-101, miR-17-3p, miR-19 y miR-34a redujeron gravemente la viabilidad de las células de leucemia sin afectar a los linfocitos T normales.

**Ejemplo 19****Criba de biblioteca de miARN sintéticos con respecto a miARN que influyen en la apoptosis**

Para identificar miARN que participan en la apoptosis, se usó un ensayo de apoptosis con la biblioteca de inhibidores de miARN.

- 5 Se transfectaron 8000 células de cuello uterino (HeLa) próstata (22Rv1), linfocitos T (Jurkat) y piel (TE354T) por triplicado con cada uno de los más de 150 miARN sintéticos de la biblioteca de los inventores usando siPORT™ NeoFX™ (Ambion). El medio se cambió después de 24 h y las células se inspeccionaron visualmente con un microscopio para inspeccionar cualitativamente la muerte celular 72 horas después de la transfección. Las células se midieron con respecto a apoptosis midiendo la actividad caspasa 3 de la siguiente manera: 1) Las células se lavaron una vez con PBS y se congelaron a -80 °C. 2) Las células se lisaron añadiendo 40 µl de tampón de lisis frío (HEPES 50 mM pH 7,2, NaCl 40 mM, NP40 0,5 %, EDTA 0,5 mM) a los pocillos y se incubaron durante 20 min a 4 °C. 3) Añadir 160 µl de tampón ICE (HEPES 50 mM pH 7,4, CHAPS 0,1 %, EDTA 0,1 mM, sacarosa al 10 %) + DTT 5 mM que contenía sustrato DEVDafc 20 µM. 4) Medir el aumento de fluorescencia en una hora a 400 ex, 505 em. Las muestras también se analizaron con respecto al número de células usando un ensayo de esterasa general para normalizar los resultados de caspasa 3. Se diluyó sustrato de FDA (fluoresceína diacetato (FDA) 0,4 mg/ml en acetonitrilo) 1:19 en tampón de dilución (TrisCl 40 mM pH 7,5, NaCl 20 mM, NP-40 0,5 %, concentración final 0,02 mg/ml). Se añadieron 40 µl de tampón (TrisCl 40 mM pH 7,5, NP-40 0,5 %, ) a cada pocillo de muestra. Las muestras se incubaron 10 min en hielo. Se añadieron 160 µl de sustrato de FDA diluido a cada pocillo. La fluorescencia se midió durante 30 min a 37 grados (ex = 488, em = 529). La pendiente del aumento de fluorescencia a lo largo del tiempo está en función del número de células en la placa.

Se evaluó la influencia de cada miARN en la apoptosis dividiendo la lectura de caspasa 3 de cada pocillo por la lectura de caspasa 3 media para pocillos transfectados con un miARN de control negativo (CN).

- Como se ve en la FIG. 20, muchos miARN diferentes fueron capaces de aumentar o reducir la apoptosis en los cuatro tipos celulares que se analizaron. Varios miARN (miR-126, miR-26a, miR-1, miR-149 y let-7g) afectaron a la apoptosis en múltiples tipos celulares lo que sugiere que regulan la apoptosis mediante genes que son comunes en múltiples tipos celulares.

**Ejemplo 20****Criba de biblioteca de miARN sintéticos con respecto a miARN que inducen la transformación**

- La transformación es necesaria para la formación de tumores ya que supera la respuesta natural de la célula para detener la división cuando se sitúa en un ambiente muy poblado. Para identificar miARN que participan en la transformación, se usó un ensayo de transformación que presentaba NIH3T3 con la biblioteca de miARN sintéticos. Se usan células NIH3T3 en ensayos de transformación ya que carecen de la capacidad para formar colonias cuando se siembran en placas de agar blando. La modulación de los procesos celulares que inhiben la transformación puede detectarse fácilmente porque inducen que las células NIH3T3 comiencen a formar colonias cuando se siembran en placas de agar blando.

- Se transfectaron aproximadamente 8000 células NIH 3T3 por duplicado con cada uno de los más de 150 miARN sintéticos en la biblioteca de los inventores usando siPORT™ NeoFX™ (Ambion). El medio se cambió después de 24 h y las células se transfirieron a placas de 24 pocillos que contenían agar blando. El agar blando limita la movilidad y asegura que las células hermanas deban permanecer en contacto después de la división celular. El contacto cercano con otras células típicamente induce que las células NIH 3T3 paren de dividirse. El número total de células en cada pocillo se midió tomando una lectura de absorbancia a 495 nm. La lectura de absorbancia para cada pocillo se dividió por la lectura de absorbancia media para células transfectadas con miARN de control negativo y se multiplicó por 100 para obtener el porcentaje de cambio en transformación. Una exploración inicial reveló miR-10, miR-23, miR-24, miR-198, miR-192 y miR-199 como miARN que aumentaba la transformación en relación con células transfectadas con control negativo. Una repetición del experimento con los candidatos iniciales produjo los siguientes aciertos como se muestra a continuación:

| Tabla 31 |      |      |
|----------|------|------|
| miARN    | % CN | % DT |
| 198      | 103  | 2,07 |
| 192      | 108  | 5,7  |
| 199      | 113  | 5,59 |

**Ejemplo 21:****MiARN que afectan a la eficacia de los compuestos terapéuticos**

Se han ensayado muchos compuestos en ensayos clínicos con respecto a su capacidad para afectar de forma positiva al resultado de pacientes. En algunos casos, estos compuestos cumplen los criterios establecidos por la FDA y se convierten en productos terapéuticos. Desafortunadamente, muy pocos productos terapéuticos son 100 % eficaces. La potenciación de las actividades de compuestos terapéuticos proporciona una oportunidad significativa dentro de la industria médica. Los dos procedimientos más habituales que se usan para potenciar los productos terapéuticos son modificar la estructura química de los compuestos o usar múltiples compuestos terapéuticos simultáneamente. Se evaluó si sería beneficioso introducir miARN antes de añadir compuestos que se sabe que reducen significativamente la viabilidad de células cancerosas. Uno de los compuestos antineoplásicos que se introdujo fue TRAIL, un compuesto que se une al menos con dos receptores diferentes y activa la ruta de la apoptosis para inducir muerte celular principalmente en células cancerosas. El segundo compuesto que se ensayó en combinación con miARN sintéticos fue el etopósido, un inhibidor de topoisomerasa II que activa la ruta de la apoptosis de células cancerosas y normales de forma similar reduciendo la reparación del daño de ADN dentro de las células.

Se transfectaron aproximadamente 8000 células de cuello uterino (HeLa) y pulmón (A549, HTB-57 y CRL-5826) por triplicado con miARN sintéticos de la biblioteca de los inventores usando siPORT™ NeoFX™ (Ambion). El medio se cambió después de 24 h y se introdujeron etopósido y TRAIL a una concentración final de aproximadamente 25 µM después de 48 horas. Las células se inspeccionaron visualmente con un microscopio para inspeccionar cualitativamente la muerte celular 64 horas después de la transfección.

Las células tratadas con etopósido se midieron con respecto a apoptosis midiendo la actividad caspasa 3 de la siguiente manera: 1) Las células se lavaron una vez con PBS y se congelaron a -80 °C. 2) Las células se lisaron añadiendo 40 µl de tampón de lisis frío (HEPES 50 mM pH 7,2, NaCl 40 mM, NP40 0,5 %, EDTA 0,5 mM) a los pocillos y se incubaron durante 20 min a 4 °C. 3) Añadir 160 µl de tampón ICE (HEPES 50 mM pH 7,4, CHAPS 0,1 %, EDTA 0,1 mM, sacarosa al 10 %) + DTT 5 mM que contenía sustrato DEVDafc 20 µM. 4) Medir el aumento de fluorescencia en una hora a 400 ex, 505 em. Las muestras también se analizaron con respecto al número de células usando un ensayo de esterasa general para normalizar los resultados de caspasa 3. Se diluyó sustrato de FDA (fluoresceína diacetato 0,4 mg/ml (FDA) en acetonitrilo) 1:19 en tampón de dilución (TrisCl 40 mM pH 7,5, NaCl 20 mM, NP-40 0,5 %, concentración final 0,02 mg/ml). Se añadieron 40 µl de tampón (TrisCl 40 mM pH 7,5, NP-40 0,5 %), a cada pocillo de muestra. Las muestras se incubaron 10 min en hielo. Se añadieron 160 µl de sustrato de FDA diluido a cada pocillo. La fluorescencia se midió durante 30 min a 37 grados (ex = 488, em = 529). La pendiente del aumento de fluorescencia a lo largo del tiempo está en función del número de células en la placa.

Las células tratadas con TRAIL se evaluaron con respecto a viabilidad celular añadiendo AlamarBlue a cada pocillo y analizando la fluorescencia usando el lector de placas. El AlamarBlue es un sustrato para una enzima metabólica en células y el producto de reacción es fluorescente. La fluorescencia en cada pocillo se correlaciona con el número total de células en cada pocillo.

El efecto de cada miARN en los tratamientos se midió dividiendo la lectura de caspasa 3 o AlamarBlue de las células transfectadas con miARN y tratadas con TRAIL o etopósido con las mismas lecturas con respecto a células que se transfectaron solamente con los miARN. El cambio en la actividad de caspasa 3 o tinción de AlamarBlue para cada miARN se dividió después por las diferencias observadas para dos miARN de control negativo y se multiplicó por 100 para calcular el efecto relativo inducido por la combinación de cada miARN y el compuesto terapéutico. Estos valores se enumeran como % CN en la Figura G.

Como se muestra en la FIG. 21, varios miARN aumentaron significativamente la capacidad de los dos compuestos terapéuticos para inducir muerte celular en las células cancerosas que se trataron. Resulta interesante que miR-292-3p, miR-132, miR-124 y miR-28 funcionaron todos extremadamente bien en combinación tanto con TRAIL como con etopósido.

**Ejemplo 22:****Criba de biblioteca de miARN sintéticos con respecto a miARN que afectan al ciclo celular**

El cuerpo humano adulto consiste en aproximadamente 50-100 billones células. Cada día, varios miles de millones de estas células se dividen en dos para reemplazar los miles de millones de células que mueren y se eliminan. En el transcurso de un tiempo de vida medio, esto suma un número astronómico de divisiones celulares, la mayoría de las cuales suceden perfectamente bien. Se producen, sin embargo, errores, y si no se corrigen pueden conducir a cáncer. El crecimiento y división celular se controlan normalmente por un sistema intrincado de comprobaciones y equilibrios. No obstante, ocasionalmente una célula comenzará a proliferar sin control, dividiéndose una y otra vez y desafiando todas las restricciones normales en su crecimiento. Este es el comienzo de las formas más comunes de cáncer.

Aproximadamente 8000 células de cuello uterino (HeLa) y 4000 de piel (BJ) por pocillo se transfectaron por triplicado con cada uno de los más de 150 miARN sintéticos en la biblioteca de los inventores. Se transfectaron células HeLa usando siPORT™ NeoFX™ (Ambion) y se transfectaron células BJ usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. 24 horas después de la transfección, la mitad de las células de cada pocillo se retiraron a medio nuevo. 72 h después de la transfección, las células se fijaron con paraformaldehído al 4 % a una concentración final de 2 %. Las células fijadas se tiñeron con yoduro de propidio (protocolo de TTP LabTech) y se evaluaron usando el explorador celular TTP LabTech. El yoduro de propidio tiñe ADN y el contenido de ADN relativo de una célula corresponde a su posición en el ciclo celular. El explorador celular midió la tinción con yoduro de propidio en cada célula y asignó su posición en el ciclo celular. El porcentaje de células en cada estadio del ciclo celular se calculó y se comparó con células transfectadas con miARN sintéticos de control negativo. El cambio relativo en células en cada estadio se calculó para cada miARN que se usó. Los miARN sintéticos que indujeron un desplazamiento significativo hacia o en sentido contrario a un estadio específico del ciclo celular se enumeran posteriormente. Estos representan miARN que regulan puntos clave en el ciclo celular y ofrecen puntos de intervención clave para el desarrollo terapéutico relacionado con cáncer.

Como se ve en la FIG. 22, muchos miARN diferentes alteraron significativamente el porcentaje de células en los diversos estadios del ciclo celular en los dos tipos celulares que se analizaron.

### Ejemplo 23:

#### **Criba de biblioteca de miARN sintéticos con respecto a miARN que influyen en la expresión de hTert**

La telomerasa es un complejo de proteínas y ARN que mantiene los extremos de cromosomas agregando telómeros. Con raras excepciones, las células diferenciadas de forma terminal carecen de telomerasa activa. Una de las excepciones es las células cancerosas. Más del 90 % de las muestras de cáncer humano tienen telomerasa activa (revisado en Dong y col., 2005). El gen hTert codifica el dominio catalítico de la telomerasa. La expresión de hTert se correlaciona con la actividad telomerasa en células haciéndolo un buen sustituto para la actividad telomerasa. Los inventores han desarrollado y usado un ensayo basado en RT-PCR para controlar la expresión de ARNm de hTert en células negativas para telomerasa para identificar miARN que participan en la regulación de la telomerasa. Los miARN que regulan la actividad telomerasa representan puntos de intervención para terapias de cáncer.

Las células BJ son fibroblastos de prepucio normales que carecen de ARNm de hTert y actividad telomerasa. Las células BJ se tripsinizaron y se diluyeron a 13.000 células/ml en medio de crecimiento normal. Se diluyeron 0,3 µl de agente lipofectamine 2000 en 40 µl de OPTIMEM y se incubaron durante cinco minutos. El reactivo de transfección diluido se añadió a los pocillos de placas de 96 pocillos que contenían 151 miARN sintéticos así como dos miARN sintéticos de control negativo diferentes. Cada pocillo albergaba un miARN sintético diferente. Los miARN sintéticos y agentes de transfección se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y después se añadieron 200 µl (2.600 células) sobre el complejo de lípido/miARN. Las células se colocaron en un incubador y el ARN se aisló 72 horas después. El ARN se aisló de las células en cada pocillo usando el protocolo convencional del kit de Aislamiento de ARN Total RNAqueous™-MagMAX96 (Cat n° 1830) (lisado de células en pocillos). Se realizó transcripción inversa usando la reacción RETROscript añadiendo 11 µl de ARN total (20-100 ng/µl) a 1 µl de decámeros aleatorios y se incubó en un baño de agua a 70 °C durante 3 minutos, después se colocó en hielo. A continuación 8 µl del cóctel que contenía 3,8 µl de agua sin Nuc, 2,0 µl de tampón de Transcripción Inversa 10X, 2,0 µl de dNTP 2,5 mM, Proteína Inhibidora de RNasa (40 U/µl), 0,1 µl de MMLV-RT (100 U/µl) y se incubó a 42 °C durante 1 hora, después 92 °C durante 10 minutos.

Se ensamblaron reacciones de PCR en tiempo real para cuantificar el ARNm de hTert y ARNr 18S en cada una de las muestras. Se colocaron agua sin nucleasa, tampón de PCR Completo 10X/SYBR, MgCl2 25 mM, dNTP 2,5 mM, ROX 50X, cebadores específicos de 18S o hTert (mezcla dir e inv 3 µM), ADNc de las diversas muestras y Super taq polimerasa en un tubo de PCR. La reacción se calentó a 95 °C durante 5 minutos y después se sometió a 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 30 segundos. Los productos de amplificación se controlaron usando el ABI 7600 (Applied Biosystems). Las células BJ habitualmente no consiguen producir productos de amplificación con los cebadores de hTert. Las muestras transfectadas por miARN que produjeron un producto de PCR de hTert también se analizaron con respecto a niveles de ARNr 18S para asegurar que no había significativamente más células en las muestras que las que podrían haber contribuido a la cantidad de hTert en las muestras.

El ARNm de hTert se detectó en transfecciones por duplicado de cada uno de los miARN enumerados posteriormente. Estos miARN afectan supuestamente a rutas que regulan la expresión del gen de hTert. La sobreexpresión de cualquiera de estos miARN podría contribuir al cáncer activando la telomerasa. La regulación de las actividades de estos miARN en células cancerosas podría limitar su transformación y superar la oncogénesis.

Tabla 33  
**Activadores de miARN de hTert**

| miARN   | Expresión de hTert Log(2) |
|---------|---------------------------|
| miR-147 | 3,14                      |
| miR-195 | 4,25                      |
| miR-21  | 1,55                      |
| miR-24  | 4,68                      |
| miR-26a | 4,35                      |
| miR-301 | 4,14                      |
| miR-368 | 5,30                      |
| miR-371 | 2,43                      |

5 La criba de actividad telomerasa se repitió usando una serie de ARNip que se dirigen a quinasas, fosfatasas, GPCR, factores de transcripción y otros genes variados. La dirección a los genes posteriores con ARNip dio como resultado aumento de la expresión de hTert. Resulta interesante que se ha predicho que muchos de estos genes son dianas para los miARN que los inventores han descubierto que son reguladores de hTert (véase tabla posterior).

Tabla 34  
**Activadores del gen de hTert**

| Gen     | Expresión de hTert Log(2) |
|---------|---------------------------|
| ACOX1   | 3,44                      |
| AKT1    | 1,80                      |
| APAF1   | 3,40                      |
| COX-5B  | 2,78                      |
| COX6    | 2,28                      |
| COX7B   | 3,95                      |
| CPOX    | 4,66                      |
| DUOX2   | 3,80                      |
| GPX1    | 1,85                      |
| GPX2    | 2,56                      |
| GPX4    | 3,17                      |
| LPO     | 3,37                      |
| MAPK1   | 3,07                      |
| MAPK4   | 3,61                      |
| MTCO1   | 1,58                      |
| NOX3    | 2,30                      |
| NOX5    | 2,54                      |
| PAOX    | 1,72                      |
| PPOX    | 2,09                      |
| PRKCA   | 2,24                      |
| PRKCD   | 4,39                      |
| TNFRSF6 | 2,25                      |

#### Ejemplo 24:

#### 10 Efecto de la secuencia primaria de miARN en la función

15 Parece que muchos miARN están muy estrechamente relacionados con otros basándose en sus secuencias primarias. Por ejemplo, let-7a es un miembro de la familia génica de let-7, que incluye 7 genes únicos dentro del genoma humano. Los genes let-7 codifican miARN que varían tan poco como un único nucleótido y tanto como cuatro nucleótidos. En las bibliotecas de miARN sintéticos e inhibidores de miARN de los inventores, hay cinco miARN de let-7 humano diferentes. Estos miARN se han usado en muchos tipos celulares diferentes en cribas diseñadas para identificar miARN implicados en una diversidad de procesos celulares diferentes. En muchas de las cribas, los diversos miARN de let-7 generan fenotipos similares. La FIG. 23 proporciona dos ejemplos en los que todos los miembros de la familia let-7 producen respuestas similares. Por el contrario, hay algunas cribas en las que

los diversos miARN de la familia let-7 producen resultados significativamente diferentes (FIG. 23).

## REFERENCIAS

- Agrawal y Zamecnik, Nucleic Acids Research, 18(18): 5419-5423, 1990.
- Allen y col., Biochemistry, 28: 4601-4607, 1989.
- 5 Ambros, Cell, 107(7): 823-826, 2001.
- Baglioni y Nilson, Interferon, 5: 23-42, 1983.
- Bayer y Wilchek, Methods of Biochemical Analysis, 26: 1-45, 1980.
- Bayer y col., Analytical Biochemistry, 149: 529-536, 1985.
- Beaucage, y Lyer, Tetrahedron, 48: 2223-2311, 1992.
- 10 Bernstein y col., Nature, 409: 363-366, 2001.
- Bijsterbosch y col., Biochem. Pharmacol, 62(5): 627-633, 2001.
- Blaekie y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., 12(18): 2603-2606, 2002.
- Bobo y col., En: *Diagnosis of Chlamydia trachomatis Cervical Infection by Detection of Amplified DNA with an Enzyme Immunoassay*, 1990.
- 15 Borlakoglu y col., Biochem. Pharmacol, 40(2): 265-272, 1990.
- Bosher y Labouesse, Nat. Cell Biol., 2: E31-E36, 2000.
- Brennecke y col., Cell, 113: 25-36, 2003.
- Brumbaugh y col., Proc Natl Acad Sci USA, 85(15): 5610-5614, 1988.
- Brummelkamp y col., Science, 296(5567): 550-553, 2002.
- 20 Calin y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99: 15524-15529, 2002.
- Caplen y col., Proc Natl Acad Sci. USA, 98: 9742-9747, 2001.
- Cardullo y col., Proc Natl Acad Sci USA, 85(23): 8790-8794, 1988.
- Carrington y col., Science, 301(5631): 336-338, 2003.
- Chang y col., Nature, 430(7001): 785-789, 2004.
- 25 Chen y Okayama, Mol. Cell Biol., 7(8): 2745-2752, 1987.
- Chen y col., Science, 303(5654): 83-86, 2004.
- Cogoni, C., y Macino, Science, 286: 342-2344, 1999.
- Cogoni. y Macino, Nature 399: 166-169, 1999.
- Conway y col., Nucleic Acids Res. Symposium Series, 21: 43-44, 1989.
- 30 Crooke, En: *Antisense Drug Technology*, Marcel Dekker y Co, Basilea, Suiza, Capítulo 6, 2001.
- Cummins y col., En: *IRT: Nucleosides and nucleosides*, La Jolla CA, 72, 1996.
- Dalmay y col., EMBO J, 20: 2069-2078, 2001.
- Dalmay y col., Cell, 101: 543-553, 2000.
- Denli y col., Trends Biochem. Sci., 28: 196, 2003.
- 35 Dewanjee y col., Biotechniques, 5: 844-846, 1994.
- Didenko, Biotechniques, 31(5): 1106-16, 1118, 1120-1, 2001.
- Doench y col., Genes & Dev., 17: 438-442, 2003.
- Doench y col., Genes Dev., 18(5): 504-11, 2004.
- Dong y col., Crit Rev Oncol Hematol. 54(2): 85-93, 2005.
- 40 Dostie y col., RNA, 9: 180-186, 2003.
- Draper y Gold, Biochemistry, 19: 1774-1781, 1980.
- Elbashir y col., Nature, 411: 494-498, 2001.
- Emptage y col.: Neuron, ene 2001; 29(1): 197-208, 2001.
- Fechheimer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 8463-8467, 1987.
- 45 Fire y col., Nature, 391: 806-811, 1998.
- Forster y col., Nucleic Acids Res., 13(3): 745-761, 1985.
- Fraley y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 3348-3352, 1979.
- Froehler y col., Nucleic Acids Res., 14(13): 5399-5407, 1986.
- Gillam y col., J. Biol. Chem., 253: 2532, 1978.
- 50 Gillam y col., Nucleic Acids Res., 6: 2973, 1979.
- Gopal, Mol. Cell Biol., 5: 1188-1190, 1985.
- Graham y Van Der Eb, Virology, 52: 456-467, 1973.
- Griffey y col., J Mass Spectrom, 32(3): 305-13, 1997.
- Grishok y col., Cell, 106: 23-34, 2001.
- 55 Ha y col., Genes Dev., 10, 3041-3050, 1996.
- Hamilton y Baulcombe, Science, 286: 950-952, 1999.
- Hammond y col., Nat. Rev. Genet., 2(2): 110-9, 2001.
- Haralambidis y col., Nucleic Acids Res., 18(3): 493-9, 1990.
- Harland y Weintraub, J. Cell Biol., 101: 1094-1099, 1985.
- 60 Holtke y Kessler, Nucleic Acids Res., 18(19): 5843-51, 1990.
- Hutvagner y Zamore, Science, 297(5589): 2056-2060, 2002.
- Hutvagner y col., PLoS Biol. 2(4): E98, 2004.
- Hutvagner y col., Science, 293: 834-838, 2001.
- Itakura y Riggs, Science, 209: 1401-1405, 1980.

- Itakura y col., J. Biol. Chem., 250: 4592, 1975.  
 Jablonski y col., Nucleic Acids Res., 14(15): 6115-6128, 1986.  
 Kaeppler y col., Plant Cell Reports, 9: 415-418, 1990.  
 Kaneda y col., Science, 243: 375-378, 1989.  
 5 Kato y col., J. Biol. Chem., 266: 3361-3364, 1991.  
 Keller y col., Analytical Biochemistry, 170: 441-450, 1988.  
 Ketting y col., Cell, 99: 133-141, 1999.  
 Khorana, Science, 203, 614 1979.  
 Kimura y col., Cancer Research, 55: 1379-1384, 1995.  
 10 Kiriakidou y col., Genes Dev. 18(10): 1165-78, 2004.  
 Kitagawa y col., Brain Res., 561: 203-11, 1991.  
 Klostermeier y Millar, Biopolymers, 61(3): 159-79, 2001-2002  
 Knight y col., Science, 2: 2, 2001.  
 Kornberg y Baker, En: DNA Replication, 2ª Ed., Freeman, San Francisco, 1992.  
 15 Kuhnast y col., Bioconjug Chem, 5: 627-636, 2000.  
 Lagos-Quintana y col., Science, 294(5543): 853-858, 2001.  
 Langer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78(11): 663-6637, 1981.  
 Lau y col., Science, 294(5543): 858-862, 2001.  
 Lee y Ambros, Science, 294(5543): 862-864, 2001.  
 20 Lee y col., Nature, 425(6956): 415-419 2003.  
 Lee, EMBO J., 21(17): 4663-4670 2002.  
 Leonetti y col., Bioconjugate Chem., 1: 149-153, 1990.  
 Lewis, Cell, 115(7): 787-798 2003.  
 Lin y Avery, Nature, 402: 128-129, 1999.  
 25 Liu y col., Anal. Biochem., 289: 239-245, 2001.  
 Lorenz y col., Bioorg. Med. Chem. Lett., 14(19): 4975-4977, 2004.  
 MacKellar y col., Nucl. Acids Res., 20: 3411-3417, 1992.  
 Manoharan, Antisense Nucleic Acid Drug Dev., 12(2): 103-128, 2002.  
 Martin y col., RNA, 4(2): 226-20, 1998.  
 30 Meijer y col., Progress in Cell cycle research, Vol 5, 219-224. (Meijer, L., Jezequel, A., y Roberge, M. eds),  
 Capítulo 22.  
 Meister y col., RNA, 10(3): 544-50, 2004.  
 Montgomery y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 155-2-15507, 1998.  
 Mourrain y col., Cell, 101: 533, 2000.  
 35 Nicolau y Sene, Biochim. Biophys. Acta, 721: 185-190, 1982.  
 Nicolau y col., Methods Enzymol., 149: 157-176, 1987.  
 Nykanen y col., Cell, 107(3): 309-321, 2001.  
 Olsen y col., Dev. Biol., 216: 671, 1999.  
 Omirulleh y col., Plant Mol. Biol., 21(3): 415-428, 1993.  
 40 Oravcova y col., Blood Press Suppl., 1: 61-64, 1994.  
 Pasquinelli y Ruvkun, Ann. Rev. Cell Dev. Biol., 18: 495-513, 2002.  
 Piutlle y col., Gene, 112(1): 101-5, 1992.  
 Plasterk y Ketting, Curr. Opin. Genet. Dev., 10: 562-567, 2000.  
 Potrykus y col., Mol. Gen. Genet., 199(2): 169-77, 1985.  
 45 Regnier y Preat, Pharm Res, 10: 1596-602, 1998.  
 Reinhart y col., Nature, 403: 901-906, 2000.  
 Reisfeld y col., Biochem. Biophysics Res. Comm., 142(2): 519-526, 1987.  
 Richardson y Gumpert, Nucleic Acids Res., 11(18): 6167-84, 1983.  
 Richardson y Macy, Biochemistry, 20(5): 1133-9, 1981.  
 50 Rippe y col., Mol. Cell Biol., 10: 689-695, 1990.  
 Roychoudhury y Kossel, Eur. J. Biochem., 22(3): 310-20, 1971.  
 Rump y col., Biochem Pharmacol, 59(11): 1407-16, 2000.  
 Rusckowski y col., Antisense Nucleic Acid Drug Dev., 5: 333-345, 2000.  
 Rusconi y col., Nat. Biotechnol., 22(11): 1423-1428, 2004.  
 55 Saiki y col., Science, 230: 1350-1354, 1985  
 Sambrook y col., En: DNA microarrays: a molecular cloning manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold  
 Spring Harbor, NY, 2003.  
 Sambrook y col., En: Molecular cloning: a laboratory manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold  
 Spring Harbor, NY, 1989.  
 60 Sambrook y col., En: Molecular cloning: a laboratory manual, 3ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold  
 Spring Harbor, NY, 2001.  
 Scheit, En: Synthesis and Biological Function, Wiley-Interscience, Nueva York, 171-172, 1980.  
 Schwarze y col., Trends in Cell Biol., 10: 290-295, 2000.  
 Sedelnikova y col., Antisense Nucleic Acid Drug Dev., 6: 443-452, 2000.  
 65 Seggerson y col., Dev. Biol., 243: 215, 2002.  
 Sharp y Zamore, Science, 287: 2431-2433, 2000.

- Smardon y col., Curr. Biol., 10: 169-178, 2000.  
 Sodja y col., Nucleic Acids Res., 5(2): 385-401, 1978.  
 Soutschek y col., Nature, 432(7014): 173-178, 2004.  
 Sproat y col., Nucleic Acids Res., 17(9): 3373-3386, 1989.  
 5 Stalnacke y col., Eur. J. Nucl. Med., 5: 166-170, 1985.  
 Sui y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99(8): 5515-5520, 2002.  
 Tabara y col., Cell, 99: 123-132, 1999.  
 Takeda y Ikeda, Nucl. Acids Res., 15: 101-104, 1984.  
 Tuschl, Chembiochem, 2: 239-245, 2001.  
 10 Uhlenbeck y col., Nucleic Acids Res., 10(11): 3341-52, 1982.  
 Urdea y col., Clinical Chemistry, 35(8): 1571-1575, 1989.  
 Vella y col., Genes Dev., 18(2): 132-7, 2004.  
 Viscidi y col., J. Clinical Microbiology, 23(2): 311-317, 1986.  
 Vyas y col., Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 18: 1-76, 2001.  
 15 Waterhouse y col., Nature, 411: 834-842, 2001.  
 Weeks y col., Clin. Chem., 29(8): 1474-1479, 1983.  
 Williams y col., Int. J. Dev. Biol., 41(2): 359-364, 1997.  
 Winter y Brownlee, Nucleic Acids Res., 5(9): 3129-39, 1978.  
 Wong y col., Gene, 10: 87-94, 1980.  
 20 Wu y col., Eur. J. Pharm. Sci., 3: 179-186, 2000.  
 Wu-Scharf y col., Science, 290: 1159-1162, 2000.  
 Xu y col., Curr. Biol., 13: 790-795, 2003.  
 Yoo y col., Nucleic Acids Res., 21: 4225-4231, 2000.  
 Zamore y col., Cell, 101: 25-33, 2000.  
 25 Zamore, Nat. Struct. Biol., 8: 746-750, 2001.  
 Zeng y col., Mol. Cell, 9: 1327-33, 2002.  
 Zeng y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 100: 9779-9784, 2003.  
 Zhang y col., Eur. J. Nucl. Med., 11: 1700-1707, 2000.  
 Zhang y col., J. Mol. Neurosci., 1: 13-28, 1996.  
 30 Zhang y col., J. Nucl. Med., 11: 1660-1669, 2001.  
 Ziauddin y Sabatini, Nature, 411(6833):107-110, 2001.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> ASURAGEN, INC.
- <120> PROCESIMIENTOS Y COMPOSICIONES QUE IMPLICAN MOLÉCULAS DE MIARN MODIFICADAS Y  
 35 MOLÉCULAS INHIBIDORAS DE MIARN
- <130> R57230
- <140> DESCONOCIDO
- <141> 14-11-2005
- 40 <150> 60/683.736  
 <151> 23-05-2005
- <150> 60/649.634  
 <151> 03-02-2005
- 45 <150> 60/627.171  
 <151> 12-11-2004
- <160> 803
- 50 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1  
 <211> 85  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*
- 55 <400> 1

accuacucag aguacauacu ucuuuuagua ccuauugaa cauacaauugc uauuggaauu 60  
aaagaaguau guauuuuugg uaggc 85

<210>2  
<211>71  
<212> ARN  
5 <213> *Homo sapiens*  
  
<400> 2

ugggaaacau acuucuuuau augcccauau ggaccugcua agcuauaggaa uguaaaagaag 60  
uauguaucuc a 71

<210>3  
<211> 80  
10 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 3

ugggaugagg uaguagguug uauaguuuua gggucacacc caccacuggg agauaacuau 60  
acaaucuacu gucuuuuccua 80

<210>4  
15 <211> 72  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 4

agguugaggu aguagguugu auaguuuaga auuacaucaa gggagauaac uguacagccu 60  
ccuagcuuuc cu 72

<210>5  
20 <211> 74  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 5

gggugaggua guagguugua uaguuuuggg cucugcccug cuauugggaa acuauacaau 60  
cuacugucuu uccu 74

<210>6  
25 <211> 83  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
  
30 <400>6

cggggugagg uaguagguug ugugguuuca gggcagugau guugccccuc ggaagauaac 60  
uauacaaccu acugccuucc cug 83

<210>7  
35 <211> 84  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 7

gcauccgggu ugagguagua gguuguauug uuuagaguua caccucggga guuaacugua 60  
caaccuucua gcuuuccuug gagc 84

<210>8

<211> 87

<212> ARN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 8

ccuaggaaga gguaguaggu ugcauaguuu uagggcaggg auuuugccca caaggaggua 60  
acuauacgac cugcugccuu ucuuagg 87

<210>9

<211> 79

10 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

cccgggcuga gguaggaggu uguauaguug aggaggacac ccaaggagau cacuauacgg 60  
ccuccuagcu uuccccagg 79

<210> 10

15 <211> 87

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

ucagagugag guaguagau guauaguugu gggguaguga uuuuaccug uucaggagau 60  
aacuauacaa ucuaaugccu ucccuga 87

20 <210> 11

<211> 83

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 11

ugugggauga gguaguagau uguauaguuu uagggucuaa ccccaucuuug gagauaacua 60  
uacagucuac ugucuuuccc acg 83

25

<210> 12

<211> 110

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

30 <400> 12

uuggauguug gccuaguucu guguggaaga cuagugauuu uguuguuuuu agauaacuaa 60  
aucgacaaca aaucacaguc ugccauaugg cacaggccau gccucuacag 110

<210> 13

<211> 110

<212> ARN

35 <213> *Homo sapiens*

<400> 13

cuggauacag aguggaccgg cuggccccc au cuggaagacu agugauuuug uuguugucuu 60  
acugcgcuca acaacaaauc ccagucuaacc uaaugguggc agccaucgca 110

<210> 14  
<211> 110  
<212> ARN  
5 <213> *Homo sapiens*  
<400> 14

agaauagagu ggcugugguc uagugcugug uggaagacua gugauuuugu uguucugaug 60  
uacuacgaca acaagucaca gccggccuca uagcgagac ucccuucgac 110

<210> 15  
<211> 84  
10 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 15

aggcugaggu aguaguuuugu acaguuuugag ggucuaugau accacccggu acaggagaua 60  
acuguacagg ccacugccuu gcca 84

<210> 16  
15 <211> 84  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 16

cuggcugagg uaguaguuuug ugcuguuggu cggguuguga cauugcccgc uguggagaua 60  
acugcgcaag cuacugccuu gcuu 84

<210> 17  
20 <211> 89  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 17

cggggguuggu uguuauuuu gguaucuaug cuguauagau gguguggagu cuucaaaaag 60  
cuagauaacc gaaaguaaaa auaacccca 89

<210> 18  
25 <211> 87  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
30 <400> 18

ggaagcgagu uguuauuuu gguaucuaug cuguauagau guauuggucu ucauaaaagcu 60  
agauaaccga aaguaaaaac uccuua 87

<210> 19  
35 <211> 90  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 19

ggaggcccg uucucucuuu gguuauauag cuguauagau gccacagagc cgucuuuuag 60  
cuagauuaacc gaaaguagaa augauucua 90

<210> 20  
<211> 110  
<212> ARN  
5 <213> *Homo sapiens*  
<400> 20

gaucugucug ucuucugua auacccugua gaucggaau uguguaagga auuuuguggu 60  
cacaauuucg uaucuagggg aauauguagu ugacuuuuac acuccgcucu 110

<210> 21  
<211> 110  
10 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 21

ccagagguug uacguuguc uauauauacc cuguagaacc gaauuugugu gguauccgua 60  
uagucacaga uucguuucua ggggaauaua uggucgaugc aaaaacuua 110

<210> 22  
15 <211> 83  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 22

ccuuggagua aaguagcagc acuuuuuaggu uuguggauuu ugaaaaggug caggccauau 60  
ugucugccu caaaaauaca agg 83

<210> 23  
20 <211> 98  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 23

uugaggccuu aaaguacugu agcagcacau caugguuuac augcuacagu caagaugcga 60  
aucauuuuu gcugcucuag aaauuuuagg aaauucau 98

<210> 24  
25 <211> 89  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
30 <400> 24

gucagcagug ccuagcagc acguuuuuu uggcguaag auucuuuuu uaucuccagu 60  
auuacugug cugcugaagu aagguugac 89

<210> 25  
35 <211> 81  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 25

guuccacucu agcagcacgu aaauauuggc guagugaaau auauauuaaa caccaauauu 60  
 acugugcugc uuuguguga c 81

<210> 26  
 <211> 84  
 <212> ARN  
 5 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 26

gucagaauaa ugucaaagug cuuacagugc agguagugau augugcaucu acugcaguga 60  
 aggcacuugu agcauuauug ugac 84

<210> 27  
 <211> 71  
 10 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 27

uguucuaagg ugcaucuagu gcagauagug aaguagauua gcaucuacug cccuaagugc 60  
 uccuucuggc a 71

<210> 28  
 15 <211> 82  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 28

gcaguccucu guuaguuuug cauaguugca cuacaagaag aauguaguug ugcaaaucua 60  
 ugcaaaacug augguggccu gc 82

<210> 29  
 20 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 29

cacuguucua ugguuaguuu ugcagguuug cauccagcug ugugauauuc ugcugugcaa 60  
 auccaugcaa aacugacugu gguagug 87

<210> 30  
 25 <211> 96  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 30 <400> 30

acavugcuac uuacaauuag uuugcaggu uugcauuuca gcguauauau guauaugugg 60  
 cugugcaau ccaugcaaaa cugauuguga uaugu 96

<210> 31  
 <211> 71  
 35 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 31

guagcacuaa agugcuuaua gugcagguag uguuuaguua ucuacugcau uaugagcacu 60  
 uaaaguacug c 71

<210> 32  
 <211> 72  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 32

ugucggguag cuuauacagac ugauguugac uguugaauuc cauggcaaca ccagucgaug 60  
 ggcugucuga ca 72

<210> 33  
 <211> 85  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 33

10

ggcugagccg caguaguuc ucaguggcaa gcuuuuguc cugacccagc uaaagcugcc 60  
 aguugaagaa cugugcccu cugcc 85

<210> 34  
 <211> 73  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 34

15

ggccggcugg gguuccuggg gaugggauuu gcuuccuguc acaaaucaca uugccaggga 60  
 uuuccaaccg acc 73

<210> 35  
 <211> 97  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 35

20

cucaggugcu cuggcugcuu gguuccugg caugcugauu ugugacuuaa gauuaaaauc 60  
 acauugccag ggauuaccac gcaaccacga ccuuggc 97

<210> 36  
 <211> 68  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 36

25

cuccggugcc uacugagcug auaucaguuc ucauuuuaca cacuggcuca guucagcagg 60  
 aacaggag 68

30

<210> 37  
 <211> 73  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 37

cucugccucc cgugccuacu gagcugaaac acaguugguu uguguacacu ggcucaguuc 60  
 agcaggaaca ggg 73

<210> 38  
 <211> 84  
 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 38

ggccaguguu gagaggcgga gacuugggca auugcuggac gcugcccugg gcauugcacu 60  
ugucucgguc ugacagugcc ggcc 84

<210> 39

5 <211> 77

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 39

guggccucgu ucaaguaauc caggauaggc ugugcagguc ccaaugggcc uauucuuggu 60  
uacuugcacg gggacgc 77

10 <210> 40

<211> 77

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 40

ccgggaccca guucaaguaa uucaggauag guugugugcu guccagccug uucuccauua 60  
cuuggcucgg ggaccgg 77

15 <210> 41

<211> 84

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 41

ggcuguggcu ggauucaagu aauccaggau aggcuguuuc caucugugag gccuauucuu 60  
gauuacuugu uucuggaggc agcu 84

<210> 42

<211> 78

<212> ARN

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 42

cugaggagca gggcuuagcu gcuugugagc aggguccaca ccaagucgug uucacagugg 60  
cuaaguuccg cccccag 78

<210> 43

<211> 97

30 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 43

accucucuaa caaggugcag agcuuagcug auuggugaac agugauuggu uuccgcuuug 60  
uucacagugg cuaaguucug caccugaaga gaaggug 97

<210> 44

35 <211> 86

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 44

gguccuugcc cucaaggagc ucacagucua uugaguuacc uuucugacuu ucccacuaga 60  
uugugagcuc cuggagggca ggcacu 86

<210> 45

<211> 64

5 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 45

augacugauu uuuuuuggug uucagaguca auauuuuuu cuagcaccuu cugaaaucgg 60  
uuau 64

<210> 46

10 <211> 81

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 46

cuucaggaag cugguuucuu auggugguuu agauuuuuu agugauuguc uagcaccuu 60  
ugaaaucagu guucuugggg g 81

15 <210> 47

<211> 81

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 47

20 cuucuggaag cugguuucac auggugguuu agauuuuuu aucuuuguau cuagcaccuu 60  
uugaaucag uguuuuagga g 81

<210> 48

<211> 88

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 48

aucucuuaa caggcugacc gauuucuccu gguguucaga gucuguuuuu gucuagcacc 60  
auuugaaauc gguuauaug uaggggga 88

<210> 49

<211> 71

30 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 49

gcgacuguaa acauccucga cuggaagcug ugaagccaca gaugggcuuu cagucggau 60  
uuugcagcug c 71

<210> 50

<211> 72

35 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 50

agauacugua acauccuac acucucagcu guggaaagua agaaagcugg gagaaggcug 60  
uuuacucuuu cu 72

<210> 51  
<211> 70  
<212> ARN  
5 <213> *Homo sapiens*  
<400> 51

guuguuguaa acauccccga cuggaagcug uaagacacag cuaagcuuuc agucagaugu 60  
uugcugcuac 70

<210> 52  
<211> 88  
10 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 52

accaaguuuu aguucaugua acauccuac acucagcugu aauacaugga uuggcuggga 60  
gguggauguu uacuucagcu gacuugga 88

<210> 53  
15 <211> 89  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 53

accaugcugu agugugugua acauccuac acucucagcu gugagcucaa gguggcuggg 60  
agaggguuu uuacuccuuc ugccaugga 89

<210> 54  
20 <211> 64  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 54

cuguaaaca ccuugacugg aagcuguaag guguucagag gagcuuucag ucggauguuu 60  
acag 64

<210> 55  
<211> 71  
<212> ARN  
25 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 55

ggagaggagg caagaugcug gcuaugcugu ugaacuggga accugcuauug ccaacauuu 60  
gccaucuuuc c 71

<210> 56  
<211> 70  
35 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 56

ggagauauug cacauuacua aguugcaugu ugucacggcc ucaaugcaau uuagugugug 60  
 ugauauuuuc 70  
 <210> 57  
 <211> 69  
 <212> ARN  
 5 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 57  
 cugugggugca uuguaguugc auugcauguu cuggugguac ccaugcaaug uuuccacagu 60  
 gcaucacag 69  
 <210> 58  
 <211> 110  
 10 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 58  
 ggccagcugu gaguguuucu uuggcagugu cuuagcuggu uguugugagc aaugaguaagg 60  
 aagcaaucag caaguauacu gcccuagaag ugcugcacgu ugugggggccc 110  
 <210> 59  
 15 <211> 84  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 59  
 gugcucgguu uguaggcagu gucauuagcu gauuguacug uggugguuac aaucacuaac 60  
 uccacugcca ucaaaacaag gcac 84  
 <210> 60  
 20 <211> 77  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 60  
 agucuaguuu cuaggcagug uaguuagcug auugcuaaua guaccaauca cuaaccacac 60  
 25 ggccagguaa aaagauu 77  
 <210> 61  
 <211> 78  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 30 <400> 61  
 cuuucuacac agguugggau cgguugcaau gcuguguuuc uguauggau ugcacuuguc 60  
 ccggccuguu gaguuug 78  
 <210> 62  
 <211> 75  
 <212> ARN  
 35 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 62  
 ucaucccugg guggggauuu guugcauuac uuguguucua uauaaaguu ugcacuuguc 60  
 ccggccugug gaaga 75

<210> 63  
 <211> 80  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5 <400> 63  
 cuggggguc caaagugcug uucgugcagg uagugugauu acccaaccua cugcugagcu 60  
 agcacuuccc gagcccccg 80  
 <210> 64  
 <211> 81  
 <212> ARN  
 10 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 64  
 aacacagugg gcacucaaua aaugucuguu gaauugaaau gcguuacauu caacggguau 60  
 uuaugagca cccacucugu g 81  
 <210> 65  
 <211> 78  
 15 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 65  
 uggccgaauu uggcacuagc acauuuuugc uugugucucu ccgcucugag caaucaugug 60  
 cagugccaau augggaaa 78  
 <210> 66  
 20 <211> 80  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 66  
 gugagguagu aaguugauu guuguggguu agggauaua ggccccaauu agaagauaac 60  
 uauacaacuu acuacuuucc 80  
 <210> 67  
 25 <211> 81  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 67  
 cccauuggca uaaacccgua gauccgaucu uguggugaag uggaccgcac aagcucgcuu 60  
 cuaugggucu gugucagugu g 81  
 <210> 68  
 30 <211> 70  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 35 <400> 68  
 ggacccacc cguagaaccg accuugcggg gccuucgccg cacacaagcu cgugucugug 60  
 gguccguguc 70  
 <210> 69  
 <211> 80

<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 69

ccugugcca caaacccgua gauccgaacu ugugguauua guccgcacaa gcuuguaucu 60  
auagguaugu gucuguuagg 80

5 <210> 70  
<211> 75  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 70

10 ugcccuggcu caguauacac agugcugaug cugucuauuc uaaagguaca guacugugau 60  
aacugaagga uggca 75

<210> 71  
<211> 79  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 71

acuguccuuu uucgguuuac augguaccga ugcuguaauu cugaaaggua caguacugug 60  
auaacugaag aaugguggu 79

<210> 72  
<211> 78  
<212> ARN  
20 <213> *Homo sapiens*  
<400> 72

uugugcuuuc agcuucuuua cagugcugcc uuguagcauu caggucaagc agcauuguac 60  
agggcuauga aagaacca 78

<210> 73  
<211> 78  
25 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 73

uacugcccuc ggcuucuuua cagugcugcc uuguugcaua uggaucaagc agcauuguac 60  
agggcuauga aggcauug 78

<210> 74  
30 <211> 81  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 74

ugugcaucgu ggucaaaugc ucagacuccu gugguggcug cucaugcacc acggauguuu 60  
gagcaugugc uacggugucu a 81

35 <210> 75  
<211> 81  
<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 75

ugugcaucgu ggucaaaguc ucagacuccu gugguggcug cuuauagcacc acggauguuu 60  
gagcaugugc uauaggugucu a 81

<210> 76

5 <211> 81

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 76

ccuuggccau guaaaagugc uuacagugca gguagcuuuu ugagaucuaac ugcaauguaa 60  
gcacuuuuuau cauuaccaug g 81

<210> 77

10 <211> 82

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 77

ccugccgggg cuaaagugcu gacagugcag auaguggucc ucuccgugcu accgcacugu 60  
ggguacuugc ugcuccagca gg 82

15

<210> 78

<211> 81

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 78

cucucugcuu ucagcuuuu uacaguguug ccuuguggca uggaguuaa gcagcauugu 60  
acagggcuau caaagcacag a 81

<210> 79

<211> 85

<212> ARN

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 79

ccuuagcaga gcuguggagu gugacaaugg uguuuguguc uaaacuauc aacgccauua 60  
ucacacuaaa uagcuacugc uaggc 85

<210> 80

<211> 85

30 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 80

agggccucucu cuccguguuc acagcggacc uugauuuuaa uguccauaca auuaaggcac 60  
gcggugaaug ccaagaauagg ggcug 85

<210> 81

35 <211> 109

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400>81

aucaagauua gaggcucugc ucuccguguu cacagcggac cuugauuuuaa ugucuuuaca 60  
uuuaggcacg cggugaauugc caagagcgga gccuacggcu gcacuugaa 109

<210> 82

5 <211> 87

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 82

ugagggcccc ucugcguguu cacagcggac cuugauuuuaa ugucuuuaca auuaggcac 60  
gcggugaauug ccaagagagg cgccucc 87

10 <210> 83

<211> 88

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 83

ugcgucuccuc ucagucccug agaccuaac uugugauguu uaccguuuuaa auccacgggu 60  
uaggcucuuug ggagcugcga gucgugcu 88

15

<210> 84

<211> 86

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 84

ugccagucuc uaggucccug agaccuuua accugugagg acauccaggg ucacagguga 60  
gguuuuuggg agccuggcgu cuggcc 86

<210> 85

<211> 89

<212> ARN

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 85

accagacuuu uccuaguccc ugagaccua acuuugugagg uauuuuagua acaucacaag 60  
ucaggcucuu gggaccuagg cggagggga 89

<210> 86

<211> 85

30 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 86

cgugggcgac gggacuuua uacuuuuggu acgcgugug acacuucaaa cucguaccgu 60  
gaguaauaau gcgccgucca cggca 85

<210> 87

35 <211> 97

<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 87

ugugaucacu guccagcc ugcugaagcu cagagggcuc ugaucagaa agaucaucgg 60  
auccgucuga gcuuggcugg ucggaagucu caucauc 97

5 <210> 88  
<211> 82  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 88

ugagcuguug gauucggggc cguagcacug ucugagaggu uuacauuucu cacagugaac 60  
cggucucuuu uucagcugcu uc 82

10 <210> 89  
<211> 84  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
15 <400> 89

ugugcagugg gaaggggggc cgauacacug uacgagagug aguagcaggu cucacaguga 60  
accggucucu uucccuacug uguc 84

<210> 90  
<211> 90  
<212> ARN  
20 <213> *Homo sapiens*  
<400> 90

ugcccuucgc gaauuuuuu gcggucuggg cuugcuguac auaacucaau agccggaagc 60  
ccuuacccca aaaagcauuu gcggagggcg 90

<210> 91  
<211> 89  
25 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 91

ugcugcuggc cagagcucu uucacauugu gcuacugucu gcaccuguca cuagcagugc 60  
aauguuaaaa gggcauuggc cguguagug 89

<210> 92  
<211> 82  
30 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 92

ggccugcccg acacucuuuc ccuguugcac uacuauaggc cgcugggaag cagugcaaug 60  
augaaagggc aucggucagg uc 82

<210> 93  
 <211> 101  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 93

ccgccccgcg gucuccaggg caactguggc uuucgauugu uacuguggga acuggaggua 60  
 acagucuaca gccauggucg ccccgagca cgcccacgcg c 101

<210> 94  
 <211> 88  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 94

acaugcuuu gcuagagcug guaaaaugga accaaucgc cucucaaug gauuuggucc 60  
 ccuacaacca gcuguagcua ugcauuga 88

<210> 95  
 <211> 102  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 95

gggagccaaa ugcuuugcua gaggcuggua aauggaacca aaucgacugu ccaugggau 60  
 uggucuccuu caaccagcug uagcugugca uugauggcgc cg 102

<210> 96  
 <211> 119  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

20

<400> 96

ccucagaaga aagaugcccc cugcucuggc uggucaaaacg gaaccaaguc cgucuuccug 60  
 agagguuugg ucccccuaaa ccagcuacag cagggcuggc aaugcccagu ccuuggaga 119

<210> 97  
 <211> 73  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 97

cagggugugu gacugguuga ccagaggggc augcacugug uucacccugu gggccaccua 60  
 gucaccaacc cuc 73

30

<210> 98  
 <211> 90  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

35

<400> 98

aggccucgcu guucucuau gcuuuuuuuu ccuaugugau ucuacugcuc acucauuauag 60  
 ggaauuggagc cguggcgac ggcggggaca 90

<210> 99  
 <211> 100  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5 <400> 99  
  
 agauaaaauuc acucuagugc uuuauggcuu uuuaauuccua ugugauagua auaaagucuc 60  
 auguagggau ggaagccaug aaauacaug ugaaaaauca 100  
  
 <210> 100  
 <211> 97  
 <212> ARN  
 10 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 100  
  
 cacucugcug uggccuagg cuuuucauuc cuaugugauu gcugucccaa acucauguag 60  
 ggcuaaaagc caugggcua c agugaggggc gagcucc 97  
  
 <210> 101  
 <211> 82  
 15 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 101  
  
 ugagcccucg gaggacucca uuuguuuuga ugauggauuc uuaugcucca ucaucgucuc 60  
 aaauagagucu ucagaggguu cu 82  
  
 <210> 102  
 20 <211> 102  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 102  
  
 gguccucuga cucucuucgg ugacggguau ucuugggugg auaaucgga uuacguuguu 60  
 auugcuuaag aauacgcgua gucgaggaga guaccagcgg ca 102  
  
 <210> 103  
 25 <211> 84  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 103  
  
 cguugcugca gcugguguug ugaauaggc cgacgagcag cgauccucu uaccggcua 60  
 uuucacgaca ccaggguugc auca 84  
 30  
 <210> 104  
 <211> 99  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 35 <400> 104

cccuggcaug gugugguggg gcagcuggug uugugaauc ggcguugcc aaucagagaa 60  
cggcuacuuc acaacaccag ggccacacca cacuacagg 99

<210> 105  
<211> 68  
<212> ARN  
5 <213> *Homo sapiens*  
<400> 105

guguauucua cagugcacgu gucuccagug uggcucggag gcuggagacg cggcccuguu 60  
ggaguaac 68

<210> 106  
<211> 100  
10 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 106

ugugucucuc ucuguguccu gccagugguu uuacccuug guagguuacg ucaugcuguu 60  
cuaccacagg guagaaccac ggacaggaua ccggggcacc 100

<210> 107  
15 <211> 95  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 107

cggccggccc ugguuccauc uuccaguaca guguggaug gucuauuugu gaagcuccua 60  
acacugucug guaaagaugg cucccgggug gguuc 95

<210> 108  
20 <211> 87  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 108

gacagugcag ucacccauaa aguagaaagc acuacuaaca gcacuggagg guguaguguu 60  
uccuacuua uggaugagug uacugug 87

25 <210> 109  
<211> 106  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 109

gcgcagcgcc cugucuccca gccugaggug cagugcugca ucucugguca guugggaguc 60  
ugagaugaag cacuguagcu caggaagaga gaaguuguuc ugcagc 106

<210> 110  
<211> 86  
35 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 110

uggggcccug gcugggauau caucauauac uguaaguug cgaugagaca cuacaguaua 60  
gaugauguac uaguccgggc acccc 86

<210> 111  
<211> 88  
<212> ARN  
5 <213> *Homo sapiens*  
<400> 111

caccugugucc ucacggucca guuuucccag gauccuua gaugcuaaga uggggauuucc 60  
uggaauuacu guucuugagg ucauguu 86

<210> 112  
<211> 99  
10 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 112

ccgaugugua uccucagcu ugagaacuga auuccauggg uugugucagu gucagaccuc 60  
ugaauuucag uucuucagcu gggauaucuc ugucaucu 99

<210> 113  
15 <211> 72  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 113

aaucuaaaga caacauuucu gcacacacac cagacuaugg aagccagugu guggaaaugc 60  
uucugcuaga uu 72

<210> 114  
20 <211> 68  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 114

gaggcaaagu ucugagacac uccgacucug aguaugauag aagucagugc acuacagaac 60  
uuugucuc 68

<210> 115  
25 <211> 99  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
30 <400> 115

caagcacgau uagcauuuga ggugaaguuc uguuauacac ucaggcugug gcucucugaa 60  
agucagugca ucacagaacu uugucucgaa agcuuucua 99

<210> 116  
<211> 89  
35 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 116

gccggcgccc gagcucuggc uccgugucuu cacucccgug cuuguccgag gaggagggga 60  
gggacggggg cugugcuggg gcagcugga 89

<210> 117  
<211> 84  
<212> ARN  
5 <213> *Homo sapiens*  
<400> 117

cuccccaugg ccugucucc caacccuugu accagugcug ggcucagacc cugguacagg 60  
ccugggggac agggaccugg ggac 84

<210> 118  
<211> 90  
10 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 118

uuuccugccc ucgaggagcu cacagucuag uaugucucuu ccccuacuag acugaagcuc 60  
cuugaggaca gggauuguca uacucaccuc 90

<210> 119  
15 <211> 87  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 119

ugucgggggg ggcccagguu cugugauaca cuccgacucg ggcucuggag cagucagugc 60  
augacagaac uggggcccg aaggacc 87

<210> 120  
20 <211> 90  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 120

cucacagcug ccagugucuu uuugugauc ugcagcuagu auucucacuc caguugcaua 60  
gucacaaaag ugaucuuugg caggugggc 90

<210> 121  
<211> 87  
25 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 121

agcgguggcc agugucuuu uuugauguu gcagcuagua auaugagccc aguugcauag 60  
ucacaaaagu gaucuuugga aacugug 87

<210> 122  
<211> 84  
35 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 122

**gugguacuuu aagauagguu auccguguug ccuucgcuuu auuugugacg aaucuuacac 60**  
**gguugaccua uuuuucagua ccaa 84**

<210> 123  
 <211> 65  
 <212> ARN  
 5 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 123

**cuguuaaugg uauucgugau agggguuuuu gccuccaacu gacuccuaca uauuagcauu 60**  
**aacag 65**

<210> 124  
 <211> 110  
 10 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 124

**agaagggcua ucaggccagc cuucagagga cuccaaggaa caucaacgc ugucggugag 60**  
**uuugggguuu gaaaaaacca cugaccguug acuguaccuu gggguccuua 110**

<210> 125  
 15 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 125

**ccugugcaga gauuauuuuu uaaaagguca caaucaacau ucauugcugu cgguggguug 60**  
**aacugugugg acaagcucac ugaacaauga augcaacugu ggccccgcuu 110**

<210> 126  
 20 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 126

**cggaaaauuu gccaaagguu ugggggaaca uucaaccugu cggugaguuu gggcagcuca 60**  
**ggcaaaccuu cgaccguuga guggaccug aggcugga uugccauccu 110**

<210> 127  
 25 <211> 89  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 127

**cugauggcug cacucaacau ucauugcugu cgguggguuu gagucugaau caacucacug 60**  
**aucaauagaau gcaaacugcg gaccaaaca 89**

<210> 128  
 35 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 128

**gagcugcuug ccucccccg uuuuuggcaa ugguagaacu cacacuggug agguaacagg 60**  
**auccgguggu ucuagacuug ccaacuauug ggcgaggacu cagccggcac 110**

<210> 129  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 129

**ccgcagagug ugacuccugu ucuguguauug gcacugguag aaucacugu gaacagucuc 60**  
**agucagugaa uuaccgaagg gccauaaaca gagcagagac agauccacga 110**

<210> 130  
 <211> 84  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 130

**ccagucacgu cccuuauca cuuuuccagc ccagcuuugu gacuguaagu guuggacgga 60**  
**gaacugauaa gguuagguga uuga 84**

<210> 131  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 131

**agggggcgag ggauuggaga gaaaggcagu uccugauggu cccucccca ggggcuggcu 60**  
**uuccucuggu ccuucccucc ca 82**

<210> 132  
 <211> 86  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 132

**ugcuuguaac uuuccaaaga auucuccuuu ugggcuuuu gguuuuuuu uaagcccaaa 60**  
**ggugaauuuu uuggaaguu ugagcu 86**

<210> 133  
 <211> 109  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 133

**ggucgggcuc accaugacac agugugagac cucgggcuac aacacaggac ccgggcgcug 60**  
**cucugacccc ucgugucuug uguugcagcc ggagggacgc agguccgca 109**

<210> 134  
 <211> 86  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 134

ugcucccucu cucatauccc uugcauggug gagggugagc uuucugaaaa cccuccccac 60  
augcagggguu ugcaggaugg cgagcc 86

<210> 135  
<211> 85  
<212> ARN  
5 <213> *Homo sapiens*  
<400> 135

ugcaggccuc ugugugauau guuugauaua uuagguuguu auuuauuca acuaauauac 60  
aaacauauuc cuacaguguc uugcc 85

<210> 136  
<211> 92  
10 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 136

cggcuggaca gcgggcaacg gaaucccaa agcagcuguu gucuccagag cauuccagcu 60  
gcgcuuggau uucguccccc gcucuccugc cu 92

<210> 137  
15 <211> 110  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 137

gccgagaccg agugcacagg gcucugaccu augaaugac agccagugcu cucgucuccc 60  
cucuggcugc caauuccaua ggucacaggu auguucgccu caaugccagc 110

<210> 138  
20 <211> 88  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 138

cgaggauugg agcugagggc ugggucuuug cgggagagau gagggugucg gaucaacugg 60  
ccuacaaagu cccaguucuc ggcccccg 88

25 <210> 139  
<211> 85  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 139

augguguuau caaguguaac agcaacucca uguggacugu guaccaauuu ccaguggaga 60  
ugcuguuacu uuugaugguu accaa 85

<210> 140  
<211> 85  
35 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 140

ugguuuccgc cccuguaac agcaacucca uguggaagug cccacugguu ccaguggggc 60  
ugcuguuauC uggggcgagg gccag 85

<210> 141  
<211> 87  
<212> ARN  
5 <213> *Homo sapiens*  
<400> 141

agcuucccug gcucuagcag cacagaaaua uggcacagg gaagcgaguc ugccaauau 60  
ggcugugcug cuccaggcag gguggug 87

<210> 142  
<211> 70  
10 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 142

gugaauuagg uaguuucaug uuguugggcc uggguuucug aacacaaca cauuuaacca 60  
cccgaauac 70

<210> 143  
15 <211> 110  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 143

ugcucgcuca gcugaucugu ggcuuaggua guuucauguu guugggauug aguuaugaac 60  
ucggcaaca gaaacugccu gaguuacauc agucgguuuu cgucgagggc 110

<210> 144  
20 <211> 75  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 144

ggcugugccg gguagagagg gcagugggag guaagagcuc uucacccuuc accaccuuc 60  
ccacccagca uggcc 75

25 <210> 145  
<211> 62  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 145

ucauugguCC agaggggaga uagguuccug ugaauuuuCC uucuucucua uagaauaaa 60  
ga 62

<210> 146  
<211> 71  
35 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 146

gccaaacccag uguucagacu accuguucag gaggcucuca auguguacag uagucugcac 60  
auugguuagg c 71

<210> 147  
<211> 110  
<212> ARN  
5 <213> *Homo sapiens*  
<400> 147

aggaagcuuc uggagaucuu gcuccgucgc cccaguguuc agacuaccug uucaggacaa 60  
ugccguugua caguagucug cacauugguu agacugggca agggagagca 110

<210> 148  
<211> 110  
10 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 148

ccagaggaca ccuccacucc gucuaccag uguuuagacu aucuguucag gacucccaaa 60  
uuguacagua gucugcacau ugguuaggcu gggcuggguu agacccucgg 110

<210> 149  
15 <211> 95  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 149

ccagcucggg cagccguggc caucuuacug ggcagcauug gauggaguca ggucucuaau 60  
acugccuggu aaugaugacg gcggagcccu gcacg 95

<210> 150  
20 <211> 68  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 150

cccucgucuu acccagcagu guuugggugc gguugggagu cucuaauacu gccggguaau 60  
gauggagg 68

<210> 151  
25 <211> 90  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
30 <400> 151

ccgggccccu gugagcaucu uaccggacag ugcuggauuu cccagcuuga cucuaacacu 60  
gucugguaac gauguucaa ggugacccgc 90

<210> 152  
<211> 110  
35 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 152

guguugggga cucgcgcgcu ggguccagug guucuaaca guucaacagu ucuguagcgc 60  
aaugugaaa uguuuaggac cacuagacc ggcgggcgcg gcgacagcga 110

<210> 153  
<211> 110  
<212> ARN  
5 <213> *Homo sapiens*  
<400> 153

ggcuacaguc uuucuucaug ugacucgugg acuucccuu gucauccuau gccugagaau 60  
auaugaaaga ggcugggaag gcaaagggac guucaauugu caucacuggc 110

<210> 154  
<211> 110  
10 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 154

aaagauccuc agacaaucca ugugcuucuc uuguccuua uuccaccgga gucugucuca 60  
uacccaacca gauuucagug gagugaaguu caggaggcau ggagcugaca 110

<210> 155  
15 <211> 86  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 155

ugcuuuccga ggccacaugc uucuuuauau ccccauauagg auuacuuugc uauggaauug 60  
aaggaagugu gugguuucgg caagug 86

<210> 156  
20 <211> 71  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 156

ugacgggcga gcuuuuggcc cggguuauac cugaugcuca cguauaagac gagcaaaaag 60  
cuuguugguc a 71

25 <210> 157  
<211> 110  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 157

acccggcagu gccuccaggc gcagggcagc ccugcccac cgcacacugc gcugccccag 60  
acccacugug cgugugacag cggcugaucu gugccugggc agcgcgaccc 110

<210> 158  
<211> 110  
<212> ARN  
35 <213> *Homo sapiens*  
<400> 158

ucaccuggcc augugacuug ugggcuuccc uuugucaucc uucgccuagg gcucugagca 60  
gggcagggac agcaaagggg ugcucaguug uacuuucca cagcacggag 110

<210> 159  
<211> 110  
<212> ARN  
5 <213> *Homo sapiens*  
<400> 159

cggggcacc cggccggaca ggcgcgggc accuuggcuc uagacugcuu acugcccggg 60  
ccgcccucag uaacagucuc cagucacggc caccgacgcc uggccccgcc 110

<210> 160  
<211> 110  
10 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 160

ugaguuuuga gguugcuuca gugaacauuc aacgcugucg gugaguuugg aaauaaaauc 60  
aaaaccaucg accguugauu guacccuauu gcuuacauuc aucuacucca 110

<210> 161  
15 <211> 110  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 161

ggccuggcug gacagaguug ucaugugucu gccugucuac acuugcugug cagaacauuc 60  
gcucaccugu acagcaggca cagacaggca gucacaugac aaccagccu 110

<210> 162  
20 <211> 110  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 162

aucauucaga aaugguauac aggaaaauga ccuaugaauu gacagacaau auagcugagu 60  
uuugucuguca uuucuuuagg ccaauauucu guaugacugu gcuacuucca 110

<210> 163  
25 <211> 110  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
30 <400> 163

gauggcugug aguuggcuua aucucagcug gcaacuguga gauguucaua caaucccuca 60  
caguggucuc ugggauuauu cuaaacagag caauuuccua gccucacga 110

<210> 164  
<211> 110  
35 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 164

aguauaaaua uuacauaguu uuugaugucg cagauacugc aucaggaacu gauuggauaa 60  
gaaucaguca ccaucaguuc cuaaugcauu gccuucagca ucuaaacaag 110

<210> 165  
<211> 110  
<212> ARN  
5 <213> *Homo sapiens*  
<400> 165

gugauaaugu agcgagauuu ucuguugucg uugaucuaac caugugguug cgagguauga 60  
guaaaacaug guuccgucaa gcaccaugga acgucacgca gcuuucuaca 110

<210> 166  
<211> 110  
10 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 166

gaccagucgc ugcggggcuu uccuuugucg uugaucuaac caugugguug aacgauggaa 60  
acggaacaug guucugucuaa gcaccgcgga aagcaccgug cucuccugca 110

<210> 167  
15 <211> 110  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 167

ccgccccggg ccgcggcucc ugauugucca aacgcaauuc ucgagucuau ggcuccggcc 60  
gagaguugag ucuggacguc ccgagccgcc gcccccaaac cucgagcggg 110

<210> 168  
20 <211> 97  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 168

acucaggggc uucgccacug auuguccaaa cgcaauucuu guacgagucu gcggccaacc 60  
gagaauugug gcuggacauc uguggcugag cuccggg 97

<210> 169  
25 <211> 110  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 169

gacagugugg cauuguaggg cuccacaccg uaucugacac uuugggagag ggcaccaugc 60  
ugaagguguu caugaugcgg ucugggaacu ccucacggau cuuacugaug 110

<210> 170  
<211> 110  
<212> ARN  
35 <213> *Homo sapiens*  
<400> 170

ugaacaucca ggucuggggc augaaccugg cauacaaugu agauuucugu guucguuagg 60  
caacagcuac auugucugcu ggguuucagg cuaccuggaa acauguucuc 110

<210> 171  
<211> 110  
<212> ARN  
5 <213> *Homo sapiens*  
<400> 171

gcugcuggaa gguguaggua cccucaaugg cucaguagcc aguguagauc cugucuuuuc 60  
uaaucagcag cuacaucugg cuacuggguc ucugauggca ucuucuagcu 110

<210> 172  
<211> 110  
10 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 172

ccuggccucc ugcagugcca cgcuccgugu auuugacaag cugaguugga cacuccaugu 60  
gguagagugu caguuuugua aauaccccaa gugcggcaca ugcuuaccag 110

<210> 173  
15 <211> 81  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 173

gggcuuucaa gucacuagug guuccguua guagaugauu gugcauuguu ucaaaauggu 60  
gcccuaguga cuacaaagcc c 81

<210> 174  
20 <211> 80  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 174

aggacccuuc cagagggccc ccccucaauc cuguugugcc uaaauucagag gguuggggugg 60  
aggcucuccu gaagggcucu 80

<210> 175  
25 <211> 63  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
30 <400> 175

aagaaauggu uuaccguccc acuuacauuu ugaauaugua ugugggaugg uaaaccgcuu 60  
cuu 63

<210> 176  
<211> 86  
<212> ARN  
35 <213> *Homo sapiens*  
<400> 176

acugcuaacg aaugcucuga cuuuauugca cuacuguacu uuacagcuag cagugcaaua 60  
guauugucaa agcaucugaa agcagg 86

<210> 177

<211> 69

<212> ARN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 177

ccaccacuuu aacguggaug uacuugcuuu gaaacuaaag aaguaagugc uuccauguuu 60  
uggugaugg 69

<210> 178

<211> 82

10 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 178

gcuucgcucc ccuccgccuu cucuucccgg uucuucccgg agucgggaaa agcuggguug 60  
agagggcgaa aaagggaugag gu 82

<210> 179

15 <211> 59

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 179

uuggccuccu aagccaggga uuguggguuc gagucccacc cgggguaaag aaaggccga 59

20 <210> 180

<211> 86

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 180

uugguacuuu gagagaggug guccguggcg cguucgcuuu auuuauuggcg cacauuacac 60  
ggucgaccuc uuugcaguau cuaauc 86

25

<210> 181

<211> 83

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

30 <400> 181

cugacuauug cuccccgcuu ccccuagggc auugguguaa agcuggagac ccacugcccc 60  
aggugcugcu gggggguugua guc 83

<210> 182

<211> 95

<212> ARN

35 <213> *Homo sapiens*

<400> 182

cucaucuguc uguugggcug gaggcagggc cuuugugaag gcggguggug cucagaucgc 60  
cucugggccc uuccuccagc cccgaggcgg auuca 95

<210> 183  
<211> 75  
<212> ARN  
5 <213> *Homo sapiens*  
<400> 183

uggagugggg gggcaggagg ggcucagggg gaaagugcau acagccccug gccucucug 60  
cccuuccguc ccug 75

<210> 184  
<211> 94  
10 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 184

cuuuggcgau cacugccucu cugggccugu gucuuaggcu cugcaagauc aaccgagcaa 60  
agcacacggc cugcagagag gcagcgcucu gccc 94

<210> 185  
15 <211> 94  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 185

gaguugguu uguuuugggu uguuucuagg uaugguccca gggaucccag aucaaaccag 60  
gccccugggc cuauccuaga accaaccuaa gcuc 94

<210> 186  
20 <211> 94  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 186

uguuuugagc gggggucaag agcaauaacg aaaauguuu gucauaaacc guuuuucuu 60  
auugcuccug accuccucuc auuugcuaua uuca 94

<210> 187  
25 <211> 93  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
30 <400> 187

guagucagua guuggggggu gggaacggcu ucauacagga guugaugcac aguuaaccag 60  
cuccuauaug augccuuucu ucauccccuu caa 93

<210> 188  
35 <211> 67  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 188

ucuccaaca uauccuggug cugagugaug acucaggcga cuccagcauc agugauuuug 60  
uugaaga 67

<210> 189  
<211> 94  
<212> ARN  
5 <213> *Homo sapiens*  
<400> 189

cggggcggcc gcucuccug uccuccagga gcucacgugu gccugccugu gagcgccucg 60  
acgacagagc cggcgccugc cccagugucu gcgc 94

<210> 190  
<211> 95  
10 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 190

uuguaccugg ugugauuaua aagcaaugag acugauuguc auaugucguu ugugggaucc 60  
gucucaguua cuuuauagcc auaccuggua ucuua 95

<210> 191  
15 <211> 99  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 191

gaaacugggc ucaaggugag gggugcuauc ugugauugag ggacaugguu aauggaauug 60  
ucucacacag aaauccgacc cgucaccuug gccuacua 99

<210> 192  
20 <211> 77  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 192

gcuugggaca cauacuucu uauaugccca uaugaaccug cuaagcuug gaauguaaag 60  
aaguauguau uucaggc 77

<210> 193  
25 <211> 72  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 193

ucagagcaca uacuucuuu uguacccaaua ugaacauuca gugcuugga auguaaagaa 60  
guauguauuu ug 72

<210> 194  
<211> 88  
35 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 194

ccaggcugag guaguaguuu guacaguug agggućuug auaccacccg guacaggaga 60  
uaacuguaca ggccacugcc uugccagg 88

<210> 195  
<211> 85  
<212> ARN  
5 <213> *Homo sapiens*  
  
<400> 195

cuggcugagg uaguaguuug ugcuguuggu cggguuguga cauugcccg uguggagaua 60  
acugcgcaag cuacugccuu gcuag 85

<210> 196  
<211> 103  
10 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 196

aauggguucc uaggaagagg uaguagguug cauaguuuu gggcagagau uuugcccaca 60  
aggaguuaac uauacgaccu gcugccuuuc uuagggccuu auu 103

<210> 197  
15 <211> 94  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 197

uucacugugg gaugagguag uagguuguau aguuuuaggg ucacaccac cacugggaga 60  
uaacuaaaca aucuacuguc uuuccuaagg ugau 94

<210> 198  
20 <211> 96  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 198

cugcauguuc ccagguugag guaguagguu guauaguua gaguacauc aaggagaua 60  
acuguacagc cuccuagcuu uccuugggac uugcac 96

<210> 199  
25 <211> 85  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 199

gcaggguag guaguagguu gugugguuuc agggcaguga uguugcccu ccgaagauaa 60  
cuauacaacc uacugccuuc ccuga 85

<210> 200  
35 <211> 94  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
  
<400> 200

ugugugcauc cggguugagg uaguagguug uagguuuag aguacaccc ugggaguuaa 60  
cuguacaacc uucuaagcuu ccuuggagca cacu 94

<210> 201  
 <211> 95  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5 <400> 201  
  
 acggccuuug gggugaggua guagguugua ugguuuuggg cucugccccg cucugcggua 60  
 acuauacaau cuacugucuu uccugaagug gccgc 95  
  
 <210> 202  
 <211> 93  
 <212> ARN  
 10 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 202  
  
 cgcgcccccc gggcugaggu aggagguugu auaguugagg aagacacccg aggagaucac 60  
 uauacggccu ccuagcuuuc cccaggcugc gcc 93  
  
 <210> 203  
 <211> 89  
 15 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 203  
  
 aucagaguga gguaguagau uguauaguug uggguagug auuuuacccu guuuaggaga 60  
 uaacuauaca aucuauugcc uucccugag 89  
  
 <210> 204  
 <211> 83  
 20 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 204  
  
 ugugggauga gguaguagau uguauaguuu uagggucaua ccccaucuuu gagauaacua 60  
 uacagucuaac ugucuuuucc acg 83  
  
 <210> 205  
 <211> 108  
 25 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 205  
  
 uuggauguug gccuaguucu guguggaaga cuagugauuu uguuguuuuu agauaacuaa 60  
 aacgacaaca aaucacaguc ugccauaugg cacaggccac cucuacag 108  
 30  
  
 <210> 206  
 <211> 97  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 35 <400> 206  
  
 ggucgggcca gccccguuug gaagacuagu gauuuuguug uugugucucu guauccaaca 60  
 acaaguccca gucugccaca uggugcuggu cauuuca 97  
  
 <210> 207  
 <211> 111

<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 207

aggagcggag uacgugagcc agugcuauu ggaagacuug ugauuuuguu guucugauau 60  
gauaugacaa caagucacag ccagccucuu agcguggacu ccuauacaccu u 111

5 <210> 208  
<211> 72  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 208

guuguuauuu uugguuauuu agcuguauga guguaauuggu cuucauaaag cuagauaacc 60  
gaaaguaaaa ac 72

10 <210> 209  
<211> 89  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 209

cgggguuuggu uguuauuuuu gguuauuuuag cuguaugagu gguguggagu cuucauaaag 60  
cuagauaacc gaaaguaaaa auuacccca 89

<210> 210  
<211> 90  
<212> ARN  
20 <213> *Homo sapiens*  
<400> 210

ggaggccccu uucucucuuu gguuauuuuag cuguaugagu gccacagagc cguaauaag 60  
cuagauaacc gaaaguagaa augacucua 90

<210> 211  
<211> 68  
25 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 211

uauauacccu guagaaccga auuugugugg uaccacaua gucacagauu cgauucuagg 60  
ggaauaua 68

<210> 212  
30 <211> 110  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 212

gaucugucug ucuucuguu auaccugua gaucggaauu uguguaagga auuuuguggu 60  
cacaauuucg uaucuagggg aauauguagu ugacauaaac acuccgcua 110

35 <210> 213  
<211> 110  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 213

gaccugucug ucuuucuguau auaccucgua gauccgaauu uguguaagga auuuuguggu 60  
cacaauuucg uaucuagggg aauauguagu ugacauaaac acuccgcuca 110

<210> 214

<211> 64

5 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 214

cuguagcagc acaucauggu uuacauacua cagucaagau gcgaaucauu auuugcugcu 60  
cuag 64

<210> 215

10 <211> 84

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 215

cccuuggagu aaaguagcag cacauaaugg uuuguggaug uugaaaaggu gcaggccaua 60  
cugugcugcc ucaaaaauaca agga 84

<210> 216

<211> 93

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 216

augucagcgg ugccuuagca gcacguaaau auuggcgua agauucugaa auuaccucca 60  
guauugacug ugcugcugaa guaagguugg caa 93

<210> 217

<211> 95

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 217

caugcuuguu ccacucuagc agcacguaaa uauuggcgua gugaaauaaa uauuaaacac 60  
caauuuuuu ggcugcuuu agugugacag ggaua 95

<210> 218

<211> 84

<212> ARN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 218

gucagaauaa ugucaaagug cuuacagugc agguagugau gugugcaucu acugcaguga 60  
gggcacuugu agcauuuugc ugac 84

<210> 219

<211> 96

35 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 219

ugcgugcuuu uuguucuaag gugcaucuag ugcagauagu gaaguagacu agcaucuacu 60  
gcccuaagug cuccuucugg cauaagaagu uauguc 96

<210> 220  
<211> 84  
<212> ARN  
5 <213> *Homo sapiens*  
<400> 220

acuuacgauu aguuuugcag auuugcaguu cagcguauau gugaaauauu ggcugugcaa 60  
auccaugcaa aacugauugu ggga 84

<210> 221  
<211> 82  
10 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 221

gcagcccucu guuaguuuug cauaguugca cuacaagaag aauguaguug ugcaaaucua 60  
ugcaaaacug augguggccu gc 82

<210> 222  
15 <211> 87  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 222

cacuggucua ugguuaguuu ugcagguuug cauccagcug uauaaauuuc ugcugugcaa 60  
auccaugcaa aacugacugu gguggug 87

<210> 223  
20 <211> 107  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 223

gugugaugug acagcuucug uagcacuaaa gugcuuauag ugcagguagu gugugaccau 60  
cuacugcauu acgagcacuu aaaguacugc cagcuguaga acuccag 107

<210> 224  
25 <211> 92  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 224

uguaccaccu ugucggauag cuuauagac ugauguugac uguugaauu cauggcaaca 60  
gcagucgaug ggcugucuga cauuuuggua uc 92

<210> 225  
35 <211> 95  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 225

accuggcuga gccgcaguag uucuuacagug gcaagcuuuu uguccugacc cagcuaaagc 60  
ugccaguuga agaacuguug cccucugccc cuggc 95

<210> 226  
<211> 74  
<212> ARN  
5 <213> *Homo sapiens*  
<400> 226

ggcugcuugg guuccuggca ugcugauuug ugacuugaga uuaaaaucac auugccaggg 60  
auuaccacgc aacc 74

<210> 227  
<211> 75  
10 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 227

cggacggcug gggguuccugg ggaugggauu ugaugccagu cacaaaucac auugccaggg 60  
auuuccaacu gacc 75

<210> 228  
15 <211> 68  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 228

cuccggugcc uacugagcug auaucaguuc ucauuucaca cacuggcuca guucagcagg 60  
aacaggag 68

<210> 229  
20 <211> 107  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 229

gccucucucc gggcuccgcc ucccuguccu acugagcuga aacaguugau uccagugcac 60  
uggcucaguu cagcaggaac aggaguccag ccccuagga gcuggca 107

<210> 230  
25 <211> 84  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
30 <400> 230

ggccaguguu gagagggcga gacuugggca auugcuggac gcugcccugg gcauugcacu 60  
ugucucgguc ugacagugcc ggcc 84

<210> 231  
35 <211> 90  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 231

aaggccgugg ccucguuca gaaauccagg auaggcugug caggucccaa ggggccuauu 60  
cuugguuacu ugcacgggga cgcgggccug 90

<210> 232  
<211> 85  
<212> ARN  
5 <213> *Homo sapiens*  
<400> 232

ugcccgggac ccaguucaag uaaauccagga uagguugugg ugcugaccag ccuguucucc 60  
auuacuuggc ucggggggccg gugcc 85

<210> 233  
<211> 84  
10 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 233

ggcugcgguu ggauucaagu aauccaggau aggcuguguc cguccaugag gccuguucuu 60  
gauuacuugu uucuggaggc agcg 84

<210> 234  
15 <211> 73  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 234

aggugcagag cuuagcugau uggugaacag ugaauugguu ccgcuuuguu cacaguggcu 60  
aaguucugca ccu 73

<210> 235  
20 <211> 87  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 235

uggccugagg agcaggguu agcugcuugu gagcaagguc cacagcaaag ucguguucac 60  
aguggcuuag uuccggcccc uggaccc 87

<210> 236  
25 <211> 86  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
30 <400> 236

ggucccuacc uucaaggagc ucacagucua uugaguugcc uuucugauuc ucccacuaga 60  
uugugagcug cuggagggca ggcacu 86

<210> 237  
35 <211> 71  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 237

aggaagcugg uucauaugg ugguuuagau uuaauagug auugucuagc accauuugaa 60  
aucaguguuc u 71

<210> 238  
<211> 88  
<212> ARN  
5 <213> *Homo sapiens*  
<400> 238

accccuuaga ggaugacuga uuucuuuugg uguucagagu caauagaauu uucuaagcacc 60  
aucugaaauc gguuaaaug auugggga 88

<210> 239  
<211> 88  
10 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 239

aucucuuaa caggcugacc gauuucuccu gguguucaga gucuguuuuu gucuagcacc 60  
auuugaaauc gguuaugaug uaggggga 88

<210> 240  
15 <211> 81  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 240

cuucuggaag cugguuucac augguggcuu agauuuuucc aucuuuguau cuagcaccuu 60  
uugaaaucag uguuuuagga g 81

<210> 241  
20 <211> 71  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 241

gcgacuguaa acauccucga cuggaagcug ugaagccaca aaugggcuuu cagucggau 60  
uuugcagcug c 71

<210> 242  
25 <211> 60  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
30 <400> 242

auguaaaca ccuacacuca gcugucuuac augcguuggc uggaugugg auguuuacgu 60

<210> 243  
35 <211> 64  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 243

cuguaaaca ccuugacugg aagcuguaag gugugagag gagcuuucag ucggauuuu 60

acag 64

<210> 244

<211> 89

<212> ARN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 244

accauguugu agugugugua aacaucacu acucucagcu gugagcucaa gguggcuggg 60  
agaggguugu uuacuccuuc ugccaugga 89

<210> 245

10 <211> 84

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 245

gagugacaga uauuguaaac auccuacacu cucagcugug aaaaguaaga aagcuggggag 60  
aaggcuguuu acucucucug ccuu 84

<210> 246

15 <211> 82

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 246

aagucugugu cuguaaaca ccccgacugg aagcuguaag ccacagccaa gcuuucaguc 60  
agauguuugc ugcuacuggc uc 82

20

<210> 247

<211> 106

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 247

ugcuccugua acucggaacu ggagaggagg caagaugcug gcauagcugu ugaacugaga 60  
accugcuau ccaacauuu gccaucuuuc cugucugaca gcagcu 106

<210> 248

<211> 70

<212> ARN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 248

ggagauauug cacauuacua aguugcaugu ugucacggcc ucaaugcaau uuagugugug 60  
ugauauuuuc 70

<210> 249

<211> 69

35 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 249

**cuguggugca uuguaguugc auugcauguu cuggcaauac cugugcaaug uuuccacagu 60**  
**gcaucacgg 69**

<210> 250

<211> 77

5 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 250

**agucuaguua cuaggcagug uaguuagcug auugcuaaua guaccaauca cuaaccacac 60**

**agccagguaa aaagacu 77**

<210> 251

10 <211> 84

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 251

**gugcucgguu uguaggcagu guaaauagcu gauuguagug cggugcugac aaucacuaac 60**  
**uccacugcca ucaaaacaag gcac 84**

<210> 252

<211> 102

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 252

**ccagcuguga guaaauuuuu ggcagugucu uagcugguug uugugaguau uagcuaagga 60**  
**agcaaucagc aaguauacug cccuagaagu gcugcacauu gu 102**

<210> 253

<211> 91

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 253

**ugcccauua uccacaggug gggauuggug gcauuacuug uguuagauau aaaguauugc 60**  
**acuugucccg gccugaggaa gaaagagggu u 91**

<210> 254

<211> 80

<212> ARN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 254

**cuuuuacac agguugggau uugucgcaau gcuguguuuc ucuguauugu auugcacuug 60**  
**ucccggccug uugaguuuug 80**

<210> 255

<211> 88

35 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 255

agucaugggg gcuccaaagu gcuguucgug cagguagugu aaauaccuga ccuacugcug 60  
agcuagcacu ucccgaagccc ccaggaca 88

<210> 256

5 <211> 106

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 256

ccaguaccuu cugcuuggcc gauuuuggca cuagcacauu uuugcuugug ucucuccgcu 60  
gugagcaauc auguguagug ccaauauggg aaaagcgggc ugcugc 106

<210> 257

<211> 80

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 257

gugagguagu aaguuguauu guuguggggg agggauuuua ggccccagua agaagauaac 60

uauacaacuu acuacuuucc

80

<210> 258

<211> 65

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 258

cauaaaccgg uagauccgau cuugugguga aguggaccgc gcaagcucgu uucuaugggg 60  
cugug 65

<210> 259

<211> 70

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 259

ggcaccacc cguagaaccg accuugcggg gccuucgccg cacacaagcu cgugucugug 60  
gguccguguc 70

<210> 260

<211> 80

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 260

ccuguugcca caaaccgaa gauccgaacu ugugcugauu cugcacacaa gcuuugugucu 60  
auagguaugu gucuguuagg 80

<210> 261

<211> 57

<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 261

ucaguuauca cagugcugau gcuguccauu cuaaagguac aguacuguga uaacuga 57

5 <210> 262  
<211> 97  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 262

10 aucugagacu gaacugcccu uuuucgguaa ucaugguacc gaugcuguag cucugaaagg 60  
uacaguacug ugauagcuga agaauaggcg ugccauc 97

<210> 263  
<211> 86  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
15 <400> 263

uucuuacugc ccucggcuuc uuuacagugc ugccuuguug cauauggauc aagcagcauu 60  
guacagggcu augaaggcau ugagac 86

<210> 264  
<211> 86  
<212> ARN  
20 <213> *Homo sapiens*  
<400> 264

gucuucgugc uuucagcuuc uuuacagugc ugccuuguag cauucagguc aagcagcauu 60  
guacagggcu augaaagaac caagaa 86

<210> 265  
<211> 65  
25 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 265

augucaaagu gcuaacagug cagguagcuu uuugaguucu acugcagugc cagcacuucu 60  
uacau 65

<210> 266  
30 <211> 82  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 266

ccugcuggga cuaaagugcu gacagugcag auaguggucc ucucugugcu accgcacugu 60  
ggguacuugc ugcuccagca gg 82

35 <210> 267  
<211> 87  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 267

uuucucugugc uuucagcuuc uuuaacagugu ugccuugugg cauggaguuc aagcagcauu 60  
guacagggcu aucaaagcac agagagc 87

<210> 268

<211> 66

5 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 268

agcuguggag ugugacaaug guguuugugu ccaaaccauc aaacgccauu aucacacuaa 60  
auagcu 66

<210> 269

10 <211> 68

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 269

cucugcgugu ucacagcgga ccuugauuuu augucuauac aaauaaggca cgcgguugaau 60  
gccaaagag 68

15 <210> 270

<211> 85

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 270

aggccucucu cuccguguuc acagcggacc uugauuuuaa uguccauaca auuaaggcac 60  
gcggugaauug ccaagaauug ggcug 85

20

<210> 271

<211> 109

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 271

aucaagauga gagacucugc ucuccguguu cacagcggac cuugauuuua ugucauacaa 60  
uuaggcacg cggugaauug caagagcggg gccuacggcu gcacuugaa 109

<210> 272

<211> 68

<212> ARN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 272

cugggucccu gagacccuuu aaccugugag gacguccagg gucacaggug agguuccuug 60  
gagccug 68

<210> 273

<211> 71

35 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 273

gccuaguccc ugagacccua acuuugaggg uauuuuagua acaucacaag ucagguucuu 60  
gggaccuagg c 71

<210> 274

5 <211> 77

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 274

ugcgucuccc ucagucccug agacccuaac uugugauguu uaccguuuua auccacgggu 60  
uaggcucuuu ggagcug 77

10 <210> 275

<211> 73

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 275

ugacagcaca uuauuacuuu ugguacgcgc ugugacacuu caaacucgua ccgugaguua 60  
uaauugcgcg uca 73

15

<210> 276

<211> 70

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 276

ccagccugcu gaagcucaga gggcucugau ucagaaagau caucggaucc gucugagcuu 60  
ggcuggucgg 70

<210> 277

<211> 70

<212> ARN

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 277

guuggauucg gggccguagc acugucugag agguuuacau uucucacagu gaaccggucu 60  
cuuuuucagc 70

<210> 278

<211> 76

30 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 278

cagugggaag gggggccgau gcacuguaag agagugagua gcaggucuca cagugaaccg 60  
gucucuuuucc cuacug 76

<210> 279

35 <211> 73

<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 279

uggaucuuuu ugcgguucugg gcuugcuguu cucucgacag uagucaggaa gccuuaccc 60  
caaaaaguau cua 73

5 <210> 280  
<211> 90  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 280

10 ugccuuucgc gaauuuuuu gcgguucugg cuugcuguac auaacucaau agccggaagc 60  
ccuuacccca aaaagcauuc gcgaggggcg 90

<210> 281  
<211> 64  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 281

gagcucuuuu cacauugugc uacugucuaa cguguaccga gcagugcaau guuaaaaggg 60  
cauc 64

20 <210> 282  
<211> 82  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 282

ggcuuguugg acacucuuc ccuguugcac uacugugggc cucugggaag cagugcaaug 60  
augaaagggc aucugucggg cc 82

25 <210> 283  
<211> 66  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 283

gggcaaccgu ggcuuucgau uguuacugug ggaaccggag gaaacagucu acagccaugg 60  
ucgccc 66

30 <210> 284  
<211> 68  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 284

gcuaaagcug guaaaaugga accaaaucgc cucuuccaag gauuuggucc ccuuccaaca 60  
gcuguagc 68

35 <210> 285  
<211> 104  
<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 285

agaagccaaa ugcuuugcug aagcugguaa aauggaacca aaucagcugu uggauggauu 60  
uggu'cccuu caaccagcug uagcugcgca uugaucacgc cgca 104

<210> 286

<211> 119

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 286

ccuccaaagg gaguggcccc cugcucuggc uggucaaacg gaaccaaguc cgucuuccug 60  
agagguuugg ucc'ccucaa ccagcuacag cagggcuggc aaagcucaau auuuggaga 119

<210> 287

<211> 71

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 287

aggguugugug acugguugac cagagggg'cg ugcacucugu ucacccugug ggccaccuag 60  
ucaccaaccc u 71

<210> 288

<211> 90

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 288

aggccucacu guucucu'aug gcuuuuuauu ccu'augau ucuauugcuc gcucauauag 60  
ggauggagc cguggcguac ggugaggaua 90

<210> 289

<211> 97

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 289

cgcucugcug uggccu'augg cuuuucauuc cuaugugauu gcugcuccga acucauguag 60  
ggcu'aaaagc caugggcua'c agugaggggc aagcucc 97

<210> 290

<211> 100

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 290

agau'aaaauuc acucuagugc uuu'auggcuu uuuauuccua ugugaucgua au'aaagucuc 60  
auguagggau ggaagcca'ug aaauaca'auug ugaaaa'u'ca 100

<210> 291

<211> 62

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 291

**gaggacucca uuuguuuuga ugauggauuc uuaagcucca ucaucgucuc aaaugagucu 60**  
**uc 62**

<210> 292

<211> 73

5 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 292

**cuucggugac gguuauucuu ggguggauaa uacggauuac guuguuauug cuuaagaaua 60**  
**cgcguagucg agg 73**

<210> 293

10 <211> 71

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 293

**cagcuggugu ugugaauca ggcgacgagc agcgcauccu cuuacccggc uauuucacga 60**  
**caccagguu g 71**

15 <210> 294

<211> 99

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 294

**cucuagcaug guguuuggg acagcuggug uugugaauca ggccguugcc aaucagagaa 60**  
**cggcuacuuc acaacaccag ggccacacug cacugcaag 99**

20

<210> 295

<211> 68

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 295

**guguauucua cagugcacgu gucuccagug uggcucggag gcuggagacg cggcccuguu 60**  
**ggaguaac 68**

<210> 296

<211> 70

<212> ARN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 296

**ccugccagug guuuuacccu augguagguu acgucaugcu guucuaccac aggguagaac 60**  
**cacggacagg 70**

<210> 297

<211> 72

<212> ARN

35 <213> *Homo sapiens*

<400> 297

ggguccaucu uccagugcag uguuggaugg uugaaguaug aagcuccuaa cacugucugg 60  
uaaagauggc cc 72

<210> 298

<211> 64

5 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 298

acccauaaag uagaaagcac uacuaacagc acuggaggggu guaguguuuc cuacuuuaug 60  
gaug 64

<210> 299

10 <211> 63

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 299

ccugaggugc agugcugcau cucuggucag uugggagucu gagaugaagc acuguagcuc 60  
agg 63

15 <210> 300

<211> 66

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 300

20 ggcuggggaua ucaucauaua cuguaaguuu gugaugagac acuacaguau agaugaugua 60  
cuaguc 66

<210> 301

<211> 70

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 301

cucacggucc aguuuuuccca ggaaucccuu ggaugcuaag augggggauuc cuggaaauac 60  
uguuucuugag 70

<210> 302

<211> 65

<212> ARN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 302

agcucugaga acugaauuucc augggguuaua ucaaugucag accugugaaa uucaguucu 60  
cagcu 65

<210> 303

<211> 99

35 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 303

agccaguuuug gucuuuuugag acaaaguucc gagacacucc gacucugagu augauagaag 60  
ucagugcacu acagaacuuu gucucuagag gcugugguc 99

<210> 304  
<211> 66  
<212> ARN  
5 <213> *Homo sapiens*  
<400> 304

ggcucuggcu ccgugucuuc acucccgugu uuguccgagg agggagggag ggacgggggc 60  
ggugcu 66

<210> 305  
<211> 65  
10 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 305

cccugucucc caacccuugu accagugcug ugccucagac ccugguacag gccuggggga 60  
uaggg 65

<210> 306  
15 <211> 68  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 306

ccugcccucg aggagcucac agucuaguau gucuccuccc uacuagacug aggcuccuug 60  
aggacagg 68

<210> 307  
20 <211> 73  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 307

ccgggccuag guucugugau acacuccgac ucgggcucug gagcagucag ugcaugacag 60  
aacuugggcc cgg 73

<210> 308  
25 <211> 69  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 308

cggugucauu uuugugacgu ugcagcuagu aauaugagcc caguugcaua gucacaaaag 60  
ugaucauug 69

<210> 309  
<211> 66  
35 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 309

gaagauaggu uauccguguu gccuucgcuu uauucgugac gaaucauaca cgguugaccu 60  
auuuuu 66

<210> 310  
<211> 65  
<212> ARN  
5 <213> *Homo sapiens*  
<400> 310

cuguuaaavgc uauuugugau agggguuuug gccucugacu gacuccuacc uguuagcauu 60  
aaCag 65

<210> 311  
<211> 76  
10 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 311

cCauggaaca uucaacgcug ucggugaguu ugggauucaa aaacaaaaaa accaccgacc 60  
guugacugua ccuugg 76

<210> 312  
15 <211> 80  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 312

aggucacaau caacauucau ugcugucggu gggguugaacu guguaaaaa gcucacugaa 60  
caaugaavgc aacuguggcc 80

<210> 313  
20 <211> 89  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 313

gccaaggguu ugggggaaca uucaaccugu cggugaguuu gggcagcuca gacaaaccuu 60  
cgaccguuga guggaCCCCg aggccugga 89

<210> 314  
25 <211> 89  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 314

uugauggcug cacucaacau ucauugcugu cgguggguuu gaaugucaac caacucacug 60  
aucaaugaau gcaaacugcg ggccaaaaa 89

<210> 315  
<211> 75  
35 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 315

accuuuuug gcaauuguag aacucacacc gguaagguaa ugggacccgg ugguucuaga 60  
cuugccaacu auggu 75

<210> 316  
<211> 70  
<212> ARN  
5 <213> *Homo sapiens*  
<400> 316

cuguguaugg cacugguaga auucacugug aacagucuca gucagugaau uaccgaaggg 60  
ccauaaacag 70

<210> 317  
<211> 69  
10 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 317

ccuuuccuua ucacuuuucc agccagcuuu gugacucuaa guguuggacg gagaacugau 60  
aagguuagg 69

<210> 318  
15 <211> 65  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 318

agggauugga gagaaaggca guuccugaug guccccuccc aggggcuggc uuuccucugg 60  
uccuu 65

<210> 319  
20 <211> 71  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 319

acuuuccaaa gaauucuccu uuugggcuuu cucuuuuau uuuuagcccu aaggugaauu 60  
uuuugggaag u 71

<210> 320  
<211> 61  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
30 <400> 320

ucaggcuaca acacaggacc cgggcgcugc ucugaccccu cgugucuugu guugcagccg 60  
g 61

<210> 321  
<211> 68  
<212> ARN  
35 <213> *Homo sapiens*  
<400> 321

ucucacaucc cuugcauggu ggagggugag cucucugaaa accccuccca caugcagggg 60  
uugcagga 68

<210> 322  
<211> 67  
<212> ARN  
5 <213> *Homo sapiens*  
<400> 322

cugugugaua uguuugauau auuagguugu uauuuauucc aacuaauau caagcauau 60  
ccuacag 67

<210> 323  
<211> 74  
10 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 323

agcgggcaac ggaaucccaa aagcagcugu ugucuccaga gcauuccagc ugcacuugga 60  
uuucguuccc ugc 74

<210> 324  
15 <211> 89  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 324

cgugcacagg gcucugaccu augaauugac agccaguacu cuuuucucuc cucuggcugc 60  
caauuccaua ggucacaggu auguucacc 89

<210> 325  
20 <211> 66  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 325

gagagcuggg ucuuugcggg caagaugaga gugucaguuc aacugggccua caaaguucca 60  
guccuc 66

<210> 326  
25 <211> 67  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
30 <400> 326

aucgggugua acagcaacuc cauguggacu gugcucggau uccaguggag cugcuguuac 60  
uucugau 67

<210> 327  
35 <211> 86  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 327

guggcuccca cccucuguaa cagcaacucc auguggaagu gcccacuggu uccagugggg 60  
cugcuguuau cugggguggc ggcuaag 86

<210> 328  
<211> 58  
<212> ARN  
5 <213> *Homo sapiens*  
<400> 328

uagcagcaca gaaauauugg cauggggaag ugagucugcc aauauuggcu gugcugcu 58

<210> 329  
<211> 102  
10 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 329

ugagccggga cuguugagug aaguagguag uuucauguug uuggggcugg cuuucugaac 60  
acaacgacau caaaccaccu gauucauggc aguacugcu uc 102

<210> 330  
15 <211> 85  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 330

agcugaucug uggcuuaggu aguuucaugu uguugggauu gaguuuugaa cucggcaaca 60  
agaaacugcc ugaguuaacau caguc 85

<210> 331  
20 <211> 70  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 331

gccaucccag uguucagacu accuguucag gaggcuggga cauguacagu agucugcaca 60  
uugguuaggc 70

<210> 332  
25 <211> 110  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 332

uggaagcuuc aggagaucuu gcuccgucgc cccaguguuc agacuaccug uucaggacaa 60  
ugccguugua caguagucug cacauugguu agacugggca agggccagca 110

<210> 333  
35 <211> 110  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 333

ccagaggaua ccuccacucc gucuacccag uguuuagacu accuguucag gacucccaaa 60  
uuguacagua gucugcacau ugguuagguu gggcuggguu agaccucgg 110

<210> 334  
<211> 70  
<212> ARN  
5 <213> *Homo sapiens*  
<400> 334

gccguggcca ucuuacuggg cagcauugga uagugucuga ucucuaauac ugccugguaa 60  
ugaugacggc 70

<210> 335  
<211> 90  
10 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 335

cuggggccucu guggggcaucu uaccggacag ugcuggauuu cuuggcuuga cucuaacacu 60  
gucugguaac gauguucaaa ggugaccac 90

<210> 336  
15 <211> 69  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 336

cccucgucuu acccagcagu guuugggugc ugguugggag ucucuaauac ugccggguuaa 60  
ugauggagg 69

<210> 337  
20 <211> 66  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 337

uaccuuacuc aguaaggcau uguucuucua uauuaauaaa ugaacagugc cuuucugugu 60  
aggua 66

<210> 338  
25 <211> 72  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 338

guuccuuuuu ccuaugcaua uacuucuuug uggaucuggu cuaaagaggu auagcgcaug 60  
ggaagaugga gc 72

<210> 339  
<211> 76  
<212> ARN  
35 <213> *Homo sapiens*

<400> 339

gccuggucca gugguucuu acaguucaac aguucuguag cacaauugug aaauguuuag 60  
gaccacuaga cccggc 76

<210> 340

<211> 68

5 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 340

uggacuuccc uuugucaucc uaugccugag aaauaugaa ggaggcuggg aaggcaaagg 60  
gacguuca 68

<210> 341

10 <211> 68

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 341

cucuuguccu ucauuccacc ggagucuguc uuauccaac cagauuucag uggagugaag 60  
cucaggag 68

15 <210> 342

<211> 73

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 342

ccaggccaca ugcuuuuua uauccucaua gaaucucag cacuauggaa uguaaggaag 60  
ugugugguuu ugg 73

20

<210> 343

<211> 79

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 343

aaggcagggg ugaggggcuu cgggaggagc cgggcggagg cugcggcuug cgcuuuccu 60  
ggcucuccuc ccucuuuu 79

<210> 344

<211> 83

<212> ARN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 344

uuuccuuugac gggugagcuu uuggccccggg uuauaccuga cacucacgua uaagacgagc 60  
aaaaagcuug uggucagag gag 83

<210> 345

<211> 110

35 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 345

ccggggcagu cccuccaggc ucaggacagc cacugcccac cgcacacugc guugcuccgg 60  
acccacugug cgugugacag cggcugaucu gucccugggc agcgcgaacc 110

<210> 346

<211> 106

5 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 346

cugcuuggac cugugaccug ugggcuuccc uuugucaucc uuugccuagg ccucugagug 60  
aggcaaggac agcaaagggg ggcucagugg ucaccucuac ugcaga 106

<210> 347

10 <211> 91

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 347

gggcagcgcg ccggcaccuu ggcucuagac ugcuuacugc ccgggccgcc uucaguaaca 60  
gucuccaguc acggccaccg acgccuggcc c 91

15 <210> 348

<211> 87

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 348

gguugcuuca gugaacauuc aacgcugucg gugaguugg aaaucaaaau aaaaccaucg 60  
accguugauu guaccuaua gcuaacc 87

20

<210> 349

<211> 110

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 349

ggccuggcug gacagaguug ucaugugucu gccugucuac acuugcugug cagaacauc 60  
gcucaccugu acagcaggca cagacaggca guacaugac aaccagccu 110

<210> 350

<211> 112

<212> ARN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 350

agcucucagc aucaacggug uacaggagaa ugaccuauga uuugacagac cgugcagcug 60  
uguauugucug ucauucugua ggccaauauu cuguauuca cugcuacuaa aa 112

<210> 351

<211> 72

35 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 351

uugguuuaau cucagcuggc aacugugaga ugucccuauC auuccucaca guggucucug 60  
ggauuaugcu aa 72

<210> 352

<211> 108

5 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 352

aaacauaguc auuacaguuu uugauguugc agauacugca ucaggaacug acuggauaag 60  
acuuauuccc caucaguucc uaaugcauug ccuucagcau cuaaacaa 108

<210> 353

10 <211> 110

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 353

gaccaguugc cgcggggcuu uccuuugugc uugaucuaac cauguggugg aacgauggaa 60  
acggaacaug guucugucaa gcaccgcgga aagcaucgcu cucuccugca 110

15 <210> 354

<211> 110

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 354

20 ccgucccggg ccgcggcucc ugauugucca aacgcaauuc ucgagucucu ggcuccggcc 60  
gagaguugcg ucuggacguc ccgagccgcc gcccccaaac cucgaggggg 110

<210> 355

<211> 97

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 355

acucaggggc uucgccacug auuguccaaa cgcaauucuu guacgagucu gcggccaacc 60  
gagaauugug gcuggacauc uguuguugag cuccggg 97

<210> 356

<211> 95

<212> ARN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 356

auccaggucu ggggcaugaa ccuggcauac aauguagauu ucuguguuug uuaggcaaca 60  
gcuacauugu cugcuggguu ucaggcuacc uggaa 95

<210> 357

<211> 79

35 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 357

cccucagugg cucaguagcc aguguagauc cugucuugg uaucagcag cuacaucugg 60  
cuacuggguc ucugguggc 79

<210> 358

<211> 110

5 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 358

ucuggccauc ugcaguguca cgcuccgugu auuugacaag cugaguugga cacucugugu 60  
gguagagugu caguuguca aaauaccccaa guguggcuca ugccuauag 110

<210> 359

10 <211> 82

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 359

gggcuuuuaa gucacuagug guuccguua guagaugguu ugugcauugu uucaaaaugg 60  
ugcccuagug acuacaaagc cc 82

15 <210> 360

<211> 83

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 360

20 cucaucuugc gguacucaaa cuauuggggc acuuuuuuu uucuuuaaaa agugccgccu 60  
aguuuuaagc cccgccgguu gag 83

<210> 361

<211> 82

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 361

ccuauuguagc ggccaucaaa guggaggccc ucucuugagc cugaauagaga aagugcuucc 60  
acuuugugug ccacugaug gg 82

<210> 362

<211> 82

<212> ARN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 362

cagccuguga uacucaaacu gggggcucuu uuggauuuuc aucggaagaa aagugccgcc 60  
agguuuugag ugucaccggg ug 82

<210> 363

<211> 80

35 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 363

uucaaucugu gguacucaaa cugugugaca uuuuguucuu uguaagaagu gccgcagagu 60  
uuguaguguu gccgauugag 80

<210> 364

<211> 84

5 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 364

uuccauauag ccuacucuaa aauggaggcc cuaucuaagc uuuuaagugg aaagugcuuc 60  
ccuuuugugu guugccaugu ggag 84

<210> 365

10 <211> 69

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 365

ggugagacuc aaaugugggg cacacuucug gacuguacau agaaagugcu acuacuuuug 60  
agucucucc 69

15 <210> 366

<211> 79

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 366

gggccuuucu ggagggcccc ccuacuauc uguugugcuc gcuucagagg guugggugga 60  
ggcucuccug aaggugucc 79

20

<210> 367

<211> 76

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 367

auauguaugu auguauguau gugugcaugu gcaugugcau guaугcauau uguauguaua 60  
uauuaugcau acaugu 76

<210> 368

<211> 64

<212> ARN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 368

uguaugugca ugcauaugug cucaugugug uguacaugua ugugugcaug ugcauguaua 60  
uauug 64

<210> 369

<211> 82

35 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 369

ccaggccuuu ggcagaggag ggcuguucuu cccuugaguu uuaugacugg gaggaacuag 60  
ccuucucuca gcuuaggagu gg 82

<210> 370

<211> 63

5 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 370

aagaaauggu uuaccguccc acauacauuu ugaguaugua ugugggacgg uaaaccgcuu 60  
cuu 63

<210> 371

10 <211> 79

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 371

gcuacuugaa gagagguuau cccuugugug uuugcuuuac gcgaaaugaa uaugcaaggg 60  
caagcucucu ucgaggagc 79

<210> 372

<211> 86

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 372

ccugcuaacg gcugcucuga cuuuauugca cuacuguacu uuacagcgag cagugcaaua 60  
guauugucua agcauccgcg agcagg 86

<210> 373

<211> 69

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 373

ccaccacuua aacgugguug uacuugcuuu agaccuaaga aaguaagugc uuccauguuu 60  
uggugaugg 69

<210> 374

<211> 82

<212> ARN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 374

gccucgccgc ccuccgccuu cucuucccgg uucuuucccgg agucgggaaa agcuggguug 60  
agagggcgaa aaaggauugug gg 82

<210> 375

<211> 59

<212> ARN

35 <213> *Homo sapiens*

<400> 375

uuggccuccu aagccaggga uuuguggguuc gaguccacc cgggguaaug agguguuuu 59

<210> 376

<211> 86

5 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 376

uuuguacuug gagagaggug guccguggcg cguucgcuuc auuuauaggcg cacauuacac 60  
ggucgaccuc uuugcgguau cuaauc 86

<210> 377

10 <211> 89

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 377

aacugacuau gccuccucgc aucccuagg gcauuggugu aaagcuggag acccacugcc 60  
ccaggugcug cuggggguug uagucugac 89

<210> 378

15 <211> 98

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 378

auauagugcu ugguuccuag uaggugcuca gaaaguguuu gugacauaau ucguuuauug 60  
agcaccuccu aucaaucaag cacugugcua ggcucugg 98

<210> 379

20 <211> 95

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 379

cucaucuguc uguugggcug ggggcagggc cuuugugaag gcggguuauug cucagaucgc 60  
cucuggggccc uuccuccagu cccgaggcag auuuu 95

<210> 380

<211> 97

30 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 380

cugucucgga gccuggggca ggggggcagg aggggcucag ggagaaagua ucuacagccc 60  
cuggcccucu cugcccuucc guccccuguc cccaagu 97

<210> 381

<211> 97

35 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 381

uguucgcuuc ugguaaccgga agagagguuu ucugggucuc uguuucuug augagaauga 60  
aacacaccca gcuaaccuuu uuuuucaguau caaaucc 97

<210> 382

<211> 98

5 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 382

gacccuuugg cgaucucugc cucucugggc cugugucuua ggcucucaa gaucacacga 60  
gcaaagcata gggccugcag agagguagcg cucugcuc 98

<210> 383

10 <211> 96

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 383

gagucugguu uuguuugggu uuguucuagg uaugguccca gggauccag aucaaaccag 60  
gccccugggc cuauccuaga accaaccuaa acccgu 96

<210> 384

15 <211> 97

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 384

caguguagug agaaguuggg gggugggaac ggcgucaugc aggaguugau ugcacagcca 60  
uucagcuucc auauaugcc uuucuuaccc cccuua 97

20

<210> 385

<211> 98

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 385

caacgcugca caggccgucc uccccaaaca uauccuggug cugagugggu gcacagugac 60  
uccagcauca gugauuuugu ugaagagggc agcugcca 98

<210> 386

<211> 96

<212> ARN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 386

acgggguggc cacuaucucu guccuccagg agcucacgua ugccugccug ugagcgccuc 60  
ggcgacagag ccggugucca cccugcacu guccac 96

<210> 387

<211> 98

35 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 387

caauuguacu uggugugauu auaaagcaau gagacugauu gucauauguc guuuguggga 60  
uccgucucag uuacuuuaua gccauaccug guaucuaa 98

<210> 388

<211> 96

5 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 388

aaaauauga ugucaguugg ccggucggcc gaucgcucgg ucugucaguc agucggucgg 60  
ucgaucgguc ggucggucag ucggcuuccu gucuuc 96

<210> 389

10 <211> 99

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 389

gaaaaugggc ucaaggugag gggugcuauc ugugaauagag ggacaugguc aauggaauug 60  
ucucacacag aaauccgacc cgucaccuug gccucguga 99

<210> 390

15 <211> 95

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 390

cugcagccag gguuuuuacc agucaggcuc cuggcuagau uccagguacc agcugguacc 60  
ugaucuagcc aaagccugac uguaagcccu gaaca 95

20

<210> 391

<211> 96

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 391

acccaagucc aggccugcug accccuaguc cagugcuugu gguggcuacu gggcccugaa 60  
cuagggggucu ggagaccugg guuugaucuc cacagg 96

<210> 392

<211> 98

<212> ARN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 392

ucuguguugg ggcucugucu gcccagaguc cugccucucu guugcucuga aggaggcagg 60  
ggcuggggcu gcagcugccu gggcagagcu gcuccuuc 98

<210> 393

<211> 99

35 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 393

agaugccuug cuccuacaag aguaaaagugc augcgcuuug ggacagugag gaaaauaaug 60  
uucacaaagc ccuacacuu ucacccuuua ggagaguug 99

<210> 394

<211> 98

5 <212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 394

ugggcuccua ggaagaggua guagguugca uaguuuuagg gcagagauuu ugcccacaag 60  
gaguuuacua uacgaccugc ugccuuucuu agggccuu 98

<210> 395

10 <211> 97

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 395

uguuggccua guucugugug gaagacuagu gauuuuguug uuuuuagaua acuaagacga 60  
caacaaauca cagucugcca uauggcacag gccaccu 97

<210> 396

15 <211> 94

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 396

uucacugugg gaugagguag uagguuguau aguuuuaggg ucacaccac cacugggaga 60  
uaacuaauaca aucuacuguc uuuccuaagg ugau 94

20

<210> 397

<211> 96

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

25 <400> 397

cggcaugcuc ccaggcugag guaguagguu guauaguua gaguuacaac aaggagaua 60  
acuguacagc cuccuagcuu uccuugggac ugcac 96

<210> 398

<211> 85

<212> ARN

30 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 398

gcggggugag guaguagguu gugugguuuc agggcaguga ugucgccccu ccgaagauaa 60  
cuauacaacc uacugccuuc ccuga 85

<210> 399

<211> 94

35 <212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 399

ugugugcauc cggguugagg uaguagguug uaugguuuag aguuaacccc ugggaguuaa 60  
cuguacaacc uucuagcuuu ccuuggagca cacu 94

<210> 400

<211> 95

5 <212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 400

acggccuuug gggugaggua guagguugua ugguuuuggg cucugccccg cucugcggua 60  
acuauacaau cuacugucuu uccugaagug gccgc 95

<210> 401

10 <211> 93

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 401

cgcgcccccc gggcugaggu aggagguugu auaguugagg aagacacccg aggagauca 60  
uauacggccu ccuagcuuuc cccaggcugc gcc 93

15 <210> 402

<211> 89

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 402

aucagaguga gguaguagau uguauaguug uggguuagug auuuuacccu guuuaggaga 60  
uaacuauaca aucuauugcc uucccugag 89

20

<210> 403

<211> 83

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

25 <400> 403

ugugggauga gguaguagau uguauaguuu uagggucaua ccccaucuug gagauaacua 60  
uacagucuac ugucuuccc acg 83

<210> 404

<211> 85

<212> ARN

30 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 404

cuggcugagg uaguaguuuug ugcuguuggu cggguuguga cauugcccgc uguggagaua 60  
acugcgcaag cuacugccuu gcua 85

<210> 405

<211> 95

<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*  
<400> 405

ggacagacca gccugucug gaagacuagu gaaaauguug uugugucugu guccaacaac 60  
aagucccagu cugccacaug gugugguca cauca 95

5 <210> 406  
<211> 110  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*  
<400> 406

aggccagaac acaugagcca augcuauug gaagacuugu gaaaauguug uucugauaug 60  
aauagacaac aagucacagc cagccucaua gaguggacuc ccaucaccuu 110

10 <210> 407  
<211> 89  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

15 <400> 407

cggggguuggu uguuauuuu gguuauuag cuguauugagu gguguggagu cuucauaaag 60  
cuagauaacc gaaaguaaaa auaacccca 89

<210> 408  
<211> 90  
<212> ARN  
20 <213> *Rattus norvegicus*  
<400> 408

ggaggcccgu uucucucuuu gguuauuag cuguauugagu gccacagagc cgucuaaag 60  
cuagauaacc gaaaguagaa augacucuaa 90

<210> 409  
<211> 87  
25 <212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*  
<400> 409

ggaagcgagu uguuauuuu gguuauuag cuguauugagu guauuggucu ucauaaagcu 60  
agauaaccga aaguaaaaac uccuua 87

<210> 410  
30 <211> 110  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*  
<400> 410

gaccugucug ucuucuguau auaccugua gaucggaauu uguguaagga auuuuguggu 60  
cacaauuucg uaucuagggg aauauguagu ugacuaaaac acuccgcuca 110

35 <210> 411  
<211> 109

<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*  
<400> 411

ccaaaguugu aacguugucu auauauaccc uguagaaccg aauuugugug guaccacau 60  
agucacagau ucgauucuag gggaauauau ggucgaugca aaaacuua 109

5 <210> 412  
<211> 98  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*  
<400> 412

uuggaaccuu aaaguacugu agcagcacau caugguuuac auacuacagu caagaugcga 60  
aucauuuuu gcugcucuag aaauuaagg aaauucau 98

10 <210> 413  
<211> 95  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

15 <400> 413

cauacuuguu ccgcucuagc agcacguaaa uauuggcgua gugaaauaaa uauuaaacac 60  
caauuuuuu gugcugcuuu agugugacag ggaua 95

<210> 414  
<211> 84  
<212> ARN  
20 <213> *Rattus norvegicus*  
<400> 414

gucaggauaa ugucaaagug cuuacagugc agguaguggu gugugcaucu acugcaguga 60  
aggcacuugu ggcauugugc ugac 84

<210> 415  
<211> 96  
25 <212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*  
<400> 415

ugcgugcuuu uuguucuaag gugcaucuag ugcagauagu gaaguagacu agcaucuacu 60  
gcccuaagug cuccuucugg cauaagaagu uauguc 96

<210> 416  
30 <211> 87  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*  
<400> 416

35 cacuggucua ugguuaguuu ugcagguuug cauccagcug uauaaauuuc ugcugugcaa 60  
auccaugcaa aacugacugu gguggug 87

<210> 417  
 <211> 96  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 5 <400> 417  
  
 acauugcuac uuacgguuag uuuugcagau uugcaguca gcuauaugu ggauauaugg 60  
 cugugcaau ccaugcaaaa cugauuguga ugaugu 96  
  
 <210> 418  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 10 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 418  
  
 gcagcccucu guucguuuug cauaguugca cuacaagaag aauguaguug ugcaaaucua 60  
 ugcaaaacug augguggccu gc 82  
  
 <210> 419  
 <211> 85  
 15 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 419  
  
 cagcuucugu agcacuaaag ugcuuauagu gcagguagug ugucgucauc uacugcauua 60  
 cgagcacuaa caguacugcc agcug 85  
  
 <210> 420  
 20 <211> 92  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 420  
  
 uguaccaccu ugucggguag cuuauagac ugauguugac uguugaaucu cauggcaaca 60  
 gcagucgaug ggcugucuga cauuuuggua uc 92  
  
 <210> 421  
 25 <211> 95  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 421  
  
 accuggcuga gccgcaguag uucuuagug gcaagcuua ugucugacc cagcuaaagc 60  
 ugccaguuga agaacuguug cccucugcca cuggc 95  
 30  
 <210> 422  
 <211> 75  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 35 <400> 422  
  
 cggccggcug ggguuuccug ggaugggauu ugaugccagu cacaaucac auugccaggg 60  
 auuuccaacu gaccc 75

<210> 423  
<211> 97  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

5 <400> 423

cucaccugcu cuggcugcuu ggguuuccugg caugcugauu ugugacuuga gauuaaaauc 60  
acauugccag ggauuaccac gcaaccauga ccuuggc 97

<210> 424  
<211> 68  
<212> ARN  
10 <213> *Rattus norvegicus*  
<400> 424

cuccggugcc uacugagcug auaucaguuc ucauuucaca cacuggcuca guucagcagg 60  
aacaggag 68

<210> 425  
<211> 108  
15 <212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*  
<400> 425

gccucucccu gggcuccgcc uccugugccu acugagcuga aacaguugau uccagugcac 60  
uggcucaguu cagcaggaac aggaguccag cccccaauagg agcuggca 108

<210> 426  
20 <211> 84  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*  
<400> 426

ggccaguguu gagaggcgga gacacgggca auugcuggac gcugcccugg gcauugcacu 60  
ugucucgguc ugacagugcc ggcc 84

<210> 427  
25 <211> 90  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*  
<400> 427

aaggccgugg ccuuguuca gaaauccagg auaggcugug caggucccaa ggggccuauu 60  
cuugguuacu ugacgggga cgcgggcccug 90

<210> 428  
30 <211> 85  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

35 <400> 428

ugcccgggac ccaguucaag uaaauccagg uagguugugg ugcuggccag ccuguucucc 60  
auuacuuggc ucggggggccg gugcc 85

<210> 429  
 <211> 97  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

5 <400> 429

accucucuaa caaggugcag agcuuagcug auuggugaac agugauuggu uuccgcuuug 60  
 uucacagugg cuaaguucug caccugaaga gaaggug 97

<210> 430  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

10

<400> 430

uggccugugg agcagggcuu agcugcuugu gagcaagguc uacagcaaag ucguguucac 60  
 aguggcuaag uuccgcccc uggaccc 87

<210> 431  
 <211> 86  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

15

<400> 431

ggucccuacc cgcaaggagc ucacagucua uugaguuccu uuucugauuc ucccacuaga 60  
 uuugagagcuc cuggagggca ggcacu 86

<210> 432  
 <211> 81  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

20

<400> 432

cuucuggaag cugguuucac augguggcuu agauuuuucc aucuuuguau cuagcaccau 60  
 uugaaaucag uguuuuagga g 81

<210> 433  
 <211> 88  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

25

<400> 433

accccuuaga ggaugacuga uuucuuuugg uguucagagu caauagaauu uucuagcacc 60  
 aucugaauc gguaauaaug auugggga 88

30  
 <210> 434  
 <211> 81  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

35 <400> 434

cuucaggaag cugguuucau auggugguuu agauuuuuu agugauuguc uagcaccau 60  
 ugaaaucagu guucuuggug g 81

<210> 435  
 <211> 88  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 5 <400> 435  
  
 aucucuuaa caggcugacc gauuucuccu gguguucaga gucuguuuuu gucuagcacc 60  
 auuugaaauc gguuaugaug uaggggga 88  
  
 <210> 436  
 <211> 89  
 <212> ARN  
 10 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 436  
  
 accauguugu agugugugua aacauccuac acucucagcu gugagcucaa gguggcuggg 60  
 agagggguugu uuacuccuuc ugccaugga 89  
  
 <210> 437  
 <211> 64  
 15 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 437  
  
 cuguaaaacau ccuugacugg aagcuguaag guguuagag gagcuuucag ucggauguuu 60  
 acag 64  
  
 <210> 438  
 20 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 438  
  
 ccgaguuuca guucauguaa acauccuaca cucagcuguc auacaugagu uggcuggggau 60  
 guggauguuu acgucagcug ucuugga 87  
  
 <210> 439  
 25 <211> 82  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 439  
  
 aagucugugu cuguaaaacau ccccgacugg aagcuguaag ccacagccaa gcuuucaguc 60  
 agauguuugc ugcuaucuggc uc 82  
 30  
  
 <210> 440  
 <211> 71  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 35 <400> 440  
  
 gcaacuguaa acauccucga cuggaagcug ugaagccaca aaugggcuuu cagucggau 60  
 uuugcagcug c 71

<210> 441  
 <211> 84  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

5 <400> 441

**gagugacaga uacuguaaac auccuacacu cucagcugug aaaaguaaga aagcugggag 60**  
**aaggcuguuu acucucucug ccuu 84**

<210> 442  
 <211> 106  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

10

<400> 442

**ugcuccugaa acuuggaacu ggagaggagg caagaugcug gcuaugcugu ugaacugaga 60**  
**accugcuauug ccaacauauu gccaucuuuc cugucugaca gcagcu 106**

<210> 443  
 <211> 70  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

15

<400> 443

**ggggauauug cacauuacua aguugcaugu ugucacggcc ucaaugcaau uuagugugug 60**  
**ugauauucuc 70**

<210> 444  
 <211> 69  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

20

<400> 444

**ccguggugca uuguaguugc auugcauguu cuggcaguac cugugcaaug uuuccacagu 60**  
**gcaucacgg 69**

<210> 445  
 <211> 84  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

25

<400> 445

**gugcucgguu uguaggcagu guaaauagcu gauuguagug cggugcugac aaucacuaac 60**  
**uccacugcca ucaaaacaag gcac 84**

30  
 <210> 446  
 <211> 77  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

35 <400> 446

**agucuaguua cuaggcagug uaguuagcug auugcuaaua guaccaauca cuaaccacac 60**  
**agccagguaa aaagacu 77**

<210> 447  
 <211> 102  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 5 <400> 447  
  
 ccggcuguga guaaauuuu ggcagugucu uagcugguug uugugaguau uagcuaagga 60  
 agcaaucagc aaguauacug cccuagaagu gcugcacguu gu 102  
  
 <210> 448  
 <211> 78  
 <212> ARN  
 10 <213> *Rattus norvegicus*  
  
 <400>448  
 cuuucuaacac agguugggau uugucgcaau gcuguguuuc uguauaguau ugcacuuguc 60  
 ccggccuguu gaguuugg 78  
  
 <210> 449  
 <211> 92  
 15 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
  
 <400> 449  
  
 ugccccauuca uccacaggug gggauuagug ccauuacuug uguuagauaa aaaguauugc 60  
 acuugucccg gccugaggaa gaaaagaggg uu 92  
  
 <210> 450  
 20 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
  
 <400> 450  
  
 agucaugggg gcuccaaagu gcuguucgug cagguagugc auugccugac cuacugcuga 60  
 gcuagcacuu cccgagcccc caggaca 87  
  
 <210> 451  
 25 <211> 106  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
  
 <400> 451  
  
 ccaguaccan cugcuuggcc gauuuuggca cuagcacauu uuugcuugug ucucuccgcu 60  
 cugagcaauc augugcagug ccaauauggg aaaagcgggc ugcugc 106  
 30  
  
 <210> 452  
 <211> 80  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 35 <400> 452  
  
 gugagguagu aaguuguauu guuguggggu agggauuuua ggccccauua agaagauaac 60  
 uauacaacuu acuaauuucc 80

<210> 453  
 <211> 81  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

5 <400> 453

cccauuggca uaaacccgua gauccgaucu uguggugaag uggaccgcac aagcucguuu 60  
 cuaugggucu guggcagugu g 81

<210> 454  
 <211> 70  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

10 <400> 454

ggcaccacc cguagaaccg accuugcggg gccuucgccg cacacaagcu cgugucugug 60  
 gguccguguc 70

<210> 455  
 <211> 80  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

15 <400> 455

ccguugcca caaacccgua gauccgaacu ugugcugacc augcacacaa gcuugugucu 60  
 auagguaugu gucuguuagg 80

<210> 456  
 <211> 97  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

20 <400> 456

aucugagacu gaacuguccu uuucgguaa ucaugguacc gaugcuguag aucugaaagg 60  
 uacaguacug ugauagcuga agauggugug ugccauc 97

<210> 457  
 <211> 75  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

25 <400> 457

ugcccuggcu caguauacac agugcugaug cuguccauuc uaaagguaca guacugugau 60  
 aacugaagga uggca 75

30 <400> 458

<210> 458  
 <211> 86  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

35 <400> 458

gucuuugugc uuucagcuuc uuucagugc ugccuuguag cauucagguc aagcagcauu 60  
 guacagggcu augaaagaac caagaa 86

<210> 459  
 <211> 86  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 5 <400> 459  
 uuuuuacugc ccucggcuuc uuuacagugc ugccuuguug cauauggauc aagcagcauu 60  
 guacagggcu augaaggcau ugagac 86  
 <210> 460  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 10 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 460  
 ccugcuggga cuaaagugcu gacagugcag auaguggucc ucucugugcu accgcacugu 60  
 gguacuugc ugcuccagca gg 82  
 <210> 461  
 <211> 87  
 15 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 461  
 uuucucugc uuuaagcuuc uuuacagugu ugccuugugg cauggaguuc aagcagcauu 60  
 guacagggcu aucaaagcac agagagc 87  
 <210> 462  
 <211> 85  
 20 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 462  
 ccuuagcaga gcucuggagu gugacaaugg uguuuugugc caaaacauca aacgccauca 60  
 ucacacuaaa cagcuacugc uaggc 85  
 <210> 463  
 <211> 87  
 25 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 463  
 ugagggcccc ucugcguguu cacagcggac cuugauuuuaa ugucuauaca auuaaggcac 60  
 gcggugaauug ccaagagagg cgccucc 87  
 30 <210> 464  
 <211> 85  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 35 <400> 464  
 aggccucucu cuccguguuc acagcggacc uugauuuuaa uguccauaca auuaaggcac 60  
 gcggugaauug ccaagaauug gccug 85

<210> 465  
 <211> 109  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 5 <400> 465  
  
 aucaagauca gagacucugc ucuccguguu cacagcggac cuugauuuuaa ugucauacaa 60  
 uuaaggcacg cggugaaugc caagagcggg gccuacggcu gcacuugaa 109  
  
 <210> 466  
 <211> 85  
 <212> ARN  
 10 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 466  
  
 ugccggccuc uggguccug agaccuuua accugugagg acguccaggg ucacagguga 60  
 gguucuuagg agccuggcgc cuggc 85  
  
 <210> 467  
 <211> 87  
 15 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 467  
  
 ugcgcucucc ucaguccug agaccuaac uugugauguu uaccguuuua auccacgggu 60  
 uaggcucuug ggagcugcga gucgugc 87  
  
 <210> 468  
 <211> 88  
 20 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 468  
  
 accagacuuu uccuagucc ugagaccua acuuugugagg uuuuuagua acaucacaag 60  
 ucaggcucu uggaccuagg cggagagg 88  
  
 <210> 469  
 <211> 73  
 25 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 469  
  
 ugacagcaca uuauuacuuu ugguacgcgc ugugacacuu caaacucgua ccgugaguaa 60  
 uaaugcgugg uca 73  
 30  
  
 <210> 470  
 <211> 97  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 35 <400> 470  
  
 uuugaucacu gucuccagcc ugcugaagcu cagagggcuc ugaauacagaa agaucaucgg 60  
 auccgucuga gcuuggcugg ucggaagucu cauauuc 97

<210> 471  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 5 <400> 471  
  
 ugagcuguuu gauucggggc cguagcacug ucugagaggu uuacauuucu cacagugaac 60  
 cggucucuuu uucagcugcu uc 82  
  
 <210> 472  
 <211> 84  
 <212> ARN  
 10 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 472  
  
 ugugcagugg gaaggggggc cgaugcacug uaagagagug aguagcaggu cucacaguga 60  
 accggucucu uucccuacug uguc 84  
  
 <210> 473  
 <211> 97  
 15 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 473  
  
 agacugcccu ucgcgaauu uuuugcgguc ugggcuugcu guacauaacu caauagccgg 60  
 aagcccuuac cccaaaaagc auucgcggag ggcgcgc 97  
  
 <210> 474  
 20 <211> 72  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 474  
  
 ugggucuuuu ugcggucugg gcuugcuguu cucuccacag uagucaggaa gcccuuaccc 60  
 caaaaaguau cu 72  
  
 25 <210> 475  
 <211> 88  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 475  
  
 30 ugcugcuggc cggagcucu uucacauugu gcuacugucu acacguguac cgagcagugc 60  
 aauguuaaaa gggcaucggc cuuguagu 88  
  
 <210> 476  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 35 <400> 476  
  
 ggcuugcugg acacucuuuc ccuguugcac uacugugggc cucugggaag cagugcaaug 60  
 augaaagggc auccgucagg cc 82

<210> 477  
 <211> 101  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

5 <400> 477

ccgccccgc gucuccaggg caaccguggc uuucgauugu uacuguggga accggaggua 60  
 acagucuaca gccauggucg ccccgagca cgcccacgcu c 101

<210> 478  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

10 <400> 478

<210> 478

caaugcuuug cuaaagcugg uaaauggaa ccaaauvcgc ucuucaaugg auuugguccc 60  
 cuucaaccag cuguagcuau gcauuga 87

<210> 479  
 <211> 73  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

15 <400> 479

<210> 479

cagggugugu gacugguuga ccagaggggc gugcacuuug uucacccugu gggccaccua 60  
 gucaccaacc cuc 73

<210> 480  
 <211> 97  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

20 <400> 480

<210> 480

cgcucugcug uggccuauug cuuuucauuc cuaugugauu gcuguuccga acucauguag 60  
 ggcuaaaagc caugggcuac agugaggggc aagcucc 97

<210> 481  
 <211> 100  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

25 <400> 481

<210> 481

agauaaaauuc acucuagugc uuuauggcuu uuuaauccua ugugaucgua auaaagucuc 60  
 auguagggau ggaagccaug aaauacauug ugaaaauua 100

30 <400> 482

<210> 482  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

35 <400> 482

ugagcccucg gaggacucca uuuguuuuga ugauggauuc uuaagcucca ucaucgucuc 60  
 aaauagucuc ucagaggguu cu 82

<210> 483  
 <211> 102  
 <212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 483

ggcccucuga cucucuucgg ugacggguau ucuugggugg auaauacgga uuacguuguu 60  
auugcuuaag aaucgcgua gucgaggaga guaccagcgg ca 102

<210> 484

5 <211> 82

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 484

guugcugcag cugguguugu gaucaggcc gacgagcaac gcauccucu acccgguau 60  
uucacgacac caggguugca cc 82

<210> 485

10 <211> 99

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 485

cucuggcaug guguuugggg acagcuggug uugugaauc ggcguugcc aaucagagaa 60  
cggcuacuuc acaacaccag ggucucacug cacugcagg 99

15

<210> 486

<211> 68

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

20 <400> 486

guguauucua cagugcacgu gucuccagug uggcucggag gcuggagacg cggcccuguu 60  
ggaguaac 68

<210> 487

<211> 99

<212> ARN

25 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 487

gugucucucu cuguguccug ccagugguuu uaccuauagg uagguuacau caugcuguuc 60  
uaccacaggg uagaaccacg gacaggauac uggagcacc 99

<210> 488

<211> 94

30 <212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 488

ggcugacucu gaguccaucu uccagugcag uguuggaugg uugaaguacg aagcuccuaa 60  
cacugucugg uaaagauggc ccccgguuca guuc 94

<210> 489

35 <211> 87

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 489

gacagugcag ucacccauaa aguagaaagc acuaaaca gcacuggagg guguguguu 60  
uccuacuuua uggaugagug uacugug 87

<210> 490

5 <211> 105

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 490

gcggagcgcc ugucucccag ccugaggugc agugcugcau cucuggucag uugggagucu 60  
gagaugaagc acuguagcuc aggaaggag aagauguucu gcagc 105

<210> 491

<211> 83

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 491

gggccuuggc uggaauaaca ucauauacug uaaguugug augagacacu acaguauaga 60  
ugauguacua gucuggguac ccc 83

<210> 492

<211> 88

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 492

caccuugucc ucacggucca guuuucccag gaaucccuug gaugcuaaga uggggauucc 60  
uggaaauacu guucuuagagg ucauggcu 88

<210> 493

<211> 95

<212> ARN

25 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 493

uguguauccu cagcucugag aacugaauuc cauggguuau agcaauguca gaccugugaa 60  
guucaguucu uuagcuggga uagcucuauc gucau 95

<210> 494

<211> 97

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 494

caggcacucu uagcauuuga ggugaaguuc uguuauacac ucaggcugug gcucugaaag 60  
ucagugcauc acagaacuuu gucucgaaag cuuucua 97

<210> 495

35 <211> 85

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 495

cuucucaagg ccugucucc caaccuugu accagugcug ugccucagac ccugguacag 60  
gccuggggga cagggaucug gggac 85

<210> 496

<211> 97

5 <212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 496

agcgcuuucc ugcccucgag gaggcucacag ucuaguaugu cuccucccua cuagacugag 60  
gcuccuugag gacaggggac gucauacua ccucccg 97

<210> 497

10 <211> 85

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 497

uguuuccccgg gccagguuc ugugauacac uccgacucgg gcucuggagc agucagugca 60  
ugacagaacu ugggcccggg aggac 85

<210> 498

15 <211> 87

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 498

agcgguggcc agugucauuu uugugauguu gcagcuagua auaugagccc aguugcauag 60  
ucacaaaagu gaucauugga aacugug 87

20

<210> 499

<211> 84

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

25 <400> 499

gaggugcuug aagauagguu auccgugug ccuucgcuuu auucgugacg aaucuuacac 60  
gguugaccua uuuuucagua ccaa 84

<210> 500

<211> 106

<212> ARN

30 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 500

agaacuugcc aaggguuugg gggaacauuc aaccugucgg ugaguuuugg cagcucagac 60  
aaaccaucga ccguugagug gaccccagag ccuggaacug ccaccc 106

<210> 501

<211> 117

35 <212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 501

agaugggcaa ccaaggcagc cuuaagagga cuccauggaa cauucaacgc ugucggugag 60  
uuugggguuc aaaaacaaaa aaaaccacca accguugacu guaccuuggg auucuua 117

<210> 502

<211> 110

5 <212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 502

ccugugcaga gaugauguuu acaaagguca caaucaacau ucauugcugu cgguggguug 60  
aacuguguag aaaagcucac ugaacaauga augcaacugu ggccccgcuu 110

<210> 503

10 <211> 88

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 503

ugauggcugc acucaacauu cauugcuguc gguggguuug aaugucaacc aacucacugg 60  
ucaaugaaug caaacugcgg gccaaaaa 88

15 <210> 504

<211> 110

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 504

ccagagagug ugacuccugu ccuguguauug gcacugguag aaucacugu gaacagucuc 60  
ggucagugaa uuaccgaagg gccauaaaca gacagagac agauccgcga 110

20

<210> 505

<211> 77

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

25 <400> 505

cacuuucccu uaucaguuuu ccagccagcu uugugacugu aaauuguga cggagaacug 60  
auaaggguua gugacug 77

<210> 506

<211> 80

<212> ARN

30 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 506

gggggugagg gauuggagag aaaggcaguu ccugaugguc cccucccagg ggcuggcuuu 60  
ccucuggucc uucucucca 80

<210> 507

<211> 86

35 <212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 507

ugcuuacaac uuuccaaaga auucuccuuu ugggcuuuu cauuuuuuu uaagcccaa 60  
ggugaauuuu uugggaagu uagcu 86

<210> 508  
<211> 104  
<212> ARN  
5 <213> *Rattus norvegicus*  
<400> 508

gggcucacag gacacaaugc ggauccucag gcuacaacac aggacccggg cgcugcucug 60  
accccucgug ucuuguguug cagccggagg gacgcagguc ugca 104

<210> 509  
<211> 85  
10 <212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*  
<400> 509

ugcaggccuc ugugugauau guuugauua uuagguuguu auuuaucca acuauauauc 60  
aagcauauuc cuacaguguc uugcc 85

<210> 510  
15 <211> 91  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*  
<400> 510

ggcuggacag cgggcaacgg aaucacaaa gcagcuguug ucuccagagc auuccagcug 60  
cacuuggauu ucguucccug cucuccugc u 91

<210> 511  
20 <211> 110  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*  
<400> 511

gucaagaugg agugcacagg gcucugaccu augaaugac agccaguacu cugaucucgc 60  
cucuggcugc caguuccaua ggucacaggu auguucgcu caaugccagc 110

<210> 512  
25 <211> 86  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*  
30 <400> 512

gcggacggga gcugagagcu gggucuuugc gggcaagaug agggugucag uucaacuggc 60  
cuacaaaguc ccaguuccug gcuccc 86

<210> 513  
<211> 83  
<212> ARN  
35 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 513

au<sup>-</sup>ggaguc<sup>-</sup>au cacguguaac agcaacucca uguggacugu gcacaga<sup>-</sup>ucc caguggagcu 60  
gcuguuacuu uugauggccu cca 83

<210> 514

<211> 85

5 <212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 514

uggcucccac ccccu<sup>-</sup>guaac agcaacucca uguggaagug cccacugauu ccaguggggc 60  
ugcuguu<sup>-</sup>auc ug<sup>-</sup>ggguggag gcugg 85

<210> 515

10 <211> 87

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 515

aacucuccug gcucuagcag cacagaa<sup>-</sup>uaa uuggcacggg uaagugaguc ugccaauauu 60  
ggcugugcug cuccaggcag gguggug 87

15 <210> 516

<211> 110

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 516

uguuugcuca gcugaucugu ggcuuaggua guuuc<sup>-</sup>auguu guugggauug agu<sup>-</sup>uuugaac 60  
ucggcaacaa gaaacugccu gaguuacauc agucgguuuu cgucgagggc 110

20

<210> 517

<211> 110

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

25 <400> 517

uggaagcuuc uggaga<sup>-</sup>uccu gcuccgucgc cccaguguuc agacuaccug uucaggacaa 60  
ugccguugua caguagucug cacauugguu agacugggca agggccagca 110

<210> 518

<211> 69

30 <212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 518

cccucgucuu acccagcagu guuugggugc ugguugggag ucucuaauac ugccggguaa 60  
ugauggagg 69

<210> 519

<211> 89

35 <212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 519

cuggggccucv guggggcaucv uaccggacag ugcuggauuu cuuggcvuga cucuaacacu 60  
gucuggguaac gauguucaaa ggugaccca 89

<210> 520

<211> 95

5 <212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 520

ccaacuuaggg cagccguggc caucuuacug ggcagcauug gauagugucu gaucucuaau 60  
acugccuggu aaugaugacg gcggagccccu gcacg 95

<210> 521

10      <211> 97

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 521

gcgcgccuggg uccagugguu cuuaacaguu caacaguucu guagcgcaau ugugaaaugu 60  
uuaggaccac uagacccggc gcgcacggca gcggcgga 97

15      <210> 522

$\langle 211 \rangle$  110

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 522

ggcuacagcc cuucuucaug ugacucgugg acuuccuuuu gucauccuau gccugagaau 60  
auaugaagga ggcuggggaag gcaaagggaac guucaauugu caucacuggc 110

20

<210> 523

<211> 108

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

25      <400> 523

aaacagcccc agacaaucca uggguccucc ugvccuucau uccaccggag ucugucuuau 60  
 gccaacccaga uuucagugga gugaagcuca ggaggcaugg agcugcca 108

<210> 524

<211> 84

<212> ARN

30 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 524

cuuucccagg ccacaugcuu cuuuauaucc ucauagauau cacugcgcua uggaauгуaa 60  
 ggaagugugu gguuuuggca agug 84

<210> 525

$\langle 211 \rangle$  83

35 <212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 525

uuccuuugac gggugagcuu uuggccccggg uuauaccuga cucucacgua uaagacgagc 60  
aaaaagcuug uggucagag gag 83

<210> 526

<211> 110

5 <212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 526

ccggggcagu ccuuccaggc ucaggacagc cacugcccac agcacacugc guugcuccgg 60  
accacugug cgugugacag cggcugaucu gucccugggc agcgcgaacc 110

<210> 527

10 <211> 106

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 527

cagcuuggac cugugaccuc ugggcuuccc uuugucaucc uuugccuagg ccucugagug 60  
gggcaaggac agcaaagggg ggcucagugg ucaccucuac ugcaga 106

15 <210> 528

<211> 111

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 528

cgggauaucc ccgccccggc agcgcgccgg caccuuggcu cuagacugcu uacugcccgg 60  
gccgcccua guaacagucu ccagucacgg ccaccgacgc cuggccccgc c 111

20

<210> 529

<211> 100

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

25 <400> 529

agguugcuuc agugaacauu caacgcuguc ggugaguug gaauucaaau aaaaaccauc 60  
gaccguugau uguacccuau agcuuaccuau uaucuacucc 100

<210> 530

<211> 110

<212> ARN

30 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 530

guccuggaug gacagaguug ucaugugucu gccugucuac acuugcugug cagaacauc 60  
gcucaccugu acagcaggca cagacaggca gucaaugac aaccagccu 110

<210> 531

<211> 106

35 <212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 531

guuagcuaug aguuaguuua aucucagcug gcaacuguga gauguccua ucauuccua 60  
caguggucuc ugggauuaug cuaaacagag caauuuuccu gaccuc 106

<210> 532

<211> 105

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 532

accacaguca uuguaguuuu gaugucgcag auacugcauc aggaacugac uggauaagac 60  
ucagucacca ucaguuccua augcauugcc uucagcaucu aaaca 105

<210> 533

<211> 110

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 533

gaccaguugc cgcggggcuu uccuuugugc uugaucuaac cauguggugg aacgauggaa 60  
acggaacaug guucugucuaa gcaccgcgga aagcaucgcu cucuccugca 110

<210> 534

<211> 110

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 534

gugauaacgu agcgagauuu ucuguugugc uugaucuaac caugugcuug cgagguauga 60  
guaaaacaug guuccgucaa gcaccaugga acgucacgca gcuuucuaca 110

<210> 535

<211> 110

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 535

cugucccggg ccgcggcucc ugauugucca aacgcaauuc ucgagucucu ggcuccggcc 60  
gagaguugcg ucuggacguc ccgagccgcc gcccccaaac cucgaggggg 110

<210> 536

<211> 96

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 536

acucaggggc uucaccacug auuguccaaa cgcaauucuu guacgagucu gcggccaacc 60  
gagaauugug gcuggacauc ugugguugag cuccgg 96

<210> 537

<211> 109

<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*  
<400> 537

ugaauaucca ggucuggggc augaaccugg cauacaagu agauuucugu guuuguuagg 60  
caacagcuac auugucugcu ggguuucagg cuaccuggaa gcauuucuc 109

5 <210> 538  
<211> 103  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*  
<400> 538

aaggauuagg gugccucag uggcucagua gccaguguag auccugucuu ugguaaucag 60  
cagcuacauc uggcuacugg gvcucugaug gcaucaucua gcu 103

10  
  
15 <210> 539  
<211> 110  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*  
<400> 539

ucuggccuuc ugcaguguua cgcuccgugu auuugacaag cugaguugga cacucugugu 60  
gguagagugu caguuuugua aaauaccccaa guguggcuca ugcuuauca 110

20 <210> 540  
<211> 81  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*  
<400> 540

ucaucucugcg guucuaaac uauugggggca cuuuuuuuuu cuuuuuuuuag ugccgccagg 60  
uuuuagggcc ugccggguuga g 81

25 <210> 541  
<211> 82  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*  
<400> 541

ccgguguagu agccaucaaa guggaggccc ucucuugggc ccgagcuaga aagugcuucc 60  
acuuuugugug ccacugcaug gg 82

30 <210> 542  
<211> 82  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*  
<400> 542

caaccuguga uacucaaaacu gggggcucuu uuuggguuuuc uuuggaagaa aagugccgcc 60  
agguuuugag uguuaccgau ug 82

<210> 543  
 <211> 78  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

5 <400> 543

ggaccuuucu ggagggcccc ccucaaacc uguugugcuc gcuucagagg guugggugga 60  
 ggcucuccug aagguguc 78

<210> 544  
 <211> 68  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 544

10

uauuguaugua uguauugaug uaugcaugua ugugugcaug uaugcaugca ugcauguaug 60  
 uauugaug 68

<210> 545  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 545

15

ccaggccuuc ggcagaggag ggcuguucuu ccuuggguu uauugacugg gaggaacuag 60  
 ccuucucucu gcuuaggagu gg 82

<210> 546  
 <211> 63  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 546

20

aagaaauggu uuaccguccc acauacauuu ugaguaugua ugugggacgg uaaaccgcuu 60  
 cuu 63

<210> 547  
 <211> 79  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 547

25

gcuacuugaa gagagguuau ccuugugug uuugcuuac gcgaaaugaa uaugcaaggg 60  
 caagcucucu ucgaggagc 79

30

<210> 548  
 <211> 100  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

35 <400> 548

ccugcuggcu acugcugacg acugcucuga cuuuauugca cuacuguacu guacagcuag 60  
 cagugcaaua guauugucua agcauccggg agcaggcuac 100

<210> 549  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

5 <400> 549

gccucgcugu ccuccgccuu cucuucccgagg uucuuucccgagg agucgggaaa agcuggguug 60  
 agagggcgaa aaaggauaug gg 82

<210> 550  
 <211> 59  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

10

<400> 550

uuggccuccu aagccaggga uuguggguuc gaguccacc cgggguaaga gguuguguu 59

<210> 551  
 <211> 95  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

15

<400> 551

ccucgcugac uccgaaggga ugcagcagca auucauguuu uggaguauug ccaagguuca 60  
 aaacaugaag cgcugcaaca ccccuucgug ggaaa 95

<210> 552  
 <211> 86  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

20

<400> 552

uugguacuuu gagagaggug guccguggcg cguucgcuuc auuuauaggcg cacauuacac 60  
 ggucgaccuc uuugcgguau cuaauc 86

<210> 553  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

25

<400> 553

cugacuauug cuccucgcau ccccuagggc auugguguaa agcuggagac ccacugcccc 60  
 agguugcugcu gggguugua guc 83

30

<210> 554  
 <211> 98  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

35 <400> 554

auauagugcu ugguuccuag uaggugcuca guaauguuuu gugacauaau ucguuuauug 60  
 agcaccuccu aucaaucaag cacugugcua ggcucugg 98

<210> 555  
 <211> 95

<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*  
<400> 555

cucaucuguc uguggggucg ggggcagggc cuuugugaag gcggguuug cucagaucgc 60  
cucugggccc uuccuccagu cccgaggcag auuuu 95

5 <210> 556  
<211> 84  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*  
<400> 556

10 uggggcaggg gggcaggagg ggcucagggg gaaagcaucu acagccccug gcccucucug 60  
cccucccguc cccugucccc aaau 84

<210> 557  
<211> 97  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*  
15 <400> 557

uguucgcuuc ugguaccgga agagagguuu ucugggucuc uguuucuuug augagaauga 60  
aacacacca gcuaaccuuu uuuucaguau caaaucc 97

<210> 558  
<211> 97  
<212> ARN  
20 <213> *Rattus norvegicus*  
<400> 558

acccuuggc gaucucugcc ucucugggcc ugugucuuag gcucuuaag aucuaacgag 60  
caaagcacag ggccugcaga gagguagcgc ucugcuc 97

<210> 559  
<211> 96  
25 <212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*  
<400> 559

gagucugguc uuguuvggu uuguucuagg uaugguccca gggauccag aucaaaccag 60  
gccccugggc cuauccuaga accaaccuaa acccau 96

<210> 560  
30 <211> 95  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*  
<400> 560

ccccggugga accacguggu gugcuaguua cuuugggcu ggagagacgg cucagggguu 60  
aagagcacag acugcucuuc cagagguccu gaguu 95

35 <210> 561  
<211> 96  
<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 561

augugaccgu gccucucacc cuuccauauc uagucucuga gaaaaaugaa gacuggauuc 60  
caugaaggga ugugaggccu ggaaacugga gcuuaa 96

<210> 562

5 <211> 97

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 562

aguguaguga gaaguugggg ggugggaacg ggcugaugca ggaguugauu gcacagccau 60  
ucaguccua uaugaugccu uucuuacccc ccuuaa 97

<210> 563

<211> 66

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 563

uccccaacaa uauccuggug cugagugggu gcacagugac uccagcauca gugauuuugu 60  
ugaaga 66

<210> 564

<211> 96

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 564

acggggugga caccgucccu guccuccagg agcucacgua ugccugccug ugagcgccuc 60  
gacgacagag ccagagucca cccugcacu gcccaa 96

<210> 565

<211> 96

<212> ARN

25 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 565

aaaaugauga ugucaguugg ccggucggcc gaucgcucgg ucugucaguc agucggucgg 60  
ucgaucgguc ggucggucag ucggcuuccu gucuuc 96

<210> 566

<211> 99

30 <212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 566

gaaaaugggc ucaaggugag gggugcuauu ugugauugag ggacaugguc aauggaaauug 60  
ucucacacag aaauccgacc cgucaccuug gccugcuga 99

<210> 567

35 <211> 98

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 567

cugcagccag aguuuuuacc agucaggcuc cuggcuagau uccagguacc aacugguacc 60  
ugaucuagcc aaagccugac cguagcugc aaaagaaa 98

<210> 568

<211> 96

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 568

acccaagucc aggccugcug accccuaguc cagugcuugu gguggcuacu gggcccugaa 60  
cuaggggucu ggagaccugg guuugaucuc cacagg 96

<210> 569

<211> 98

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 569

ucuguguugg gcaucugucu gccugagugc cugccucucu guugcucuga aggaggcagg 60  
ggcugggccu gcagcugccu gggcagagcu gcuccuuc 98

<210> 570

<211> 97

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 570

gaagacucua gcauguaagg uugggggagg gggcuguguc uagcaagucu ucuuuuuuuu 60  
cagcccugcu gucuuaaccu cuagguguuc cggcuuc 97

<210> 571

<211> 99

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 571

agaugccuug cuccuacaag aguaaagugc acgugcuuug ggacagugag gaaaauaauug 60  
uucacaaagc ccuacacuu uacccuuua ggagaguug 99

<210> 572

<211> 81

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<220>

<223> Descripción de Molécula de ADN/ARN Combinada:c

<400> 572

cauggcaccu ccuuuuuccu gaggagcccu uugagccuga ggugaaaaaa aaacagguca 60  
agaggcgccu gggaacugga g 81

<210> 573  
 <211> 98  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 573

acccaaacc uaggucugcu gacuccuagu ccagggcucg ugauggcugg ugggcccuga 60  
 acgagggguc uggaggccug gguuugaaua ucgacagc 98

<210> 574  
 <211> 86  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 574

gucugucugc ccgcaugccu gccucucugu ugcucugaag gaggcagggg cugggccugc 60  
 agcugccugg gcagagcggc uccugc 86

<210> 575  
 <211> 68  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 575

ccauuacugu ugcuaauaug caacucuguu gaauauaaau uggaauugca cuuagcaau 60  
 ggugaugg 68

<210> 576  
 <211> 66  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

20

<400> 576

aaaaggugga uauuccuucu auguuuauugu uauuuauugu uaaacauaga ggaaauucca 60  
 cguuuu 66

<210> 577  
 <211> 70  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 577

uugaagggag aucgaccgug uuauauucgc uuauuugacu ucgaauaaua caugguugau 60  
 cuuuucucag 70

30

<210> 578  
 <211> 75  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 578

agacagagaa gccaggucac gucucugcag uuacacagcu cacgagugcc ugcuggggug 60  
 gaaccugguc ugucu 75

<210> 579  
 <211> 67  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 579

guggcacuca aacugugggg gcacuuucug cucucuggug aaagugccgc caucuuuuga 60  
 guguuac 67

<210> 580  
 <211> 67  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 580

gugggccuca aauguggagc acuaauucuga uguccaagug gaaagugcug cgacauuuga 60  
 gcgucac 67

<210> 581  
 <211> 69  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 581

gggauacuca aaaugggggc gcuuuccuuu uugucuguac ugggaagugc uucgauuuug 60  
 ggguguccc 69

<210> 582  
 <211> 72  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

20

<400> 582

uacauccggcc auuauauac aaccugauaa guguuauagc acuuaucaga uuguauugua 60  
 auugucugug ua 72

<210> 583  
 <211> 99  
 <212> ARN  
 <213> *Mus musculus*

25

<400> 583

cauggcaaccu ccguuucccu gaggagcccu uugagccugg agugaaaaaa aaaaacaggu 60  
 caagaggcgc cugggaacug gagaagagug uuaaacuuc 99

30

<210> 584  
 <211> 79  
 <212> ARN  
 <213> *Mus musculus*

35

<400> 584

agacggagag accaggucac gucucugcag uuacacagcu caugagugcc ugcuggggug 60  
 gaaccugguu ugucugucu 79

<210> 585  
 <211> 68  
 <212> ARN  
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 585

uaaaagguag auucuccuuc uaugaguaca auauuauga cuaaucguag aggaaaaucc 60  
 acguuuuc 68

<210> 586  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 <213> *Mus musculus*

10

<400> 586

ugguauuuuaa aagguggaua uuuccuucua uuguacgugc uuccuggaua aucauagagg 60  
 aacauccacu uuucaguau ca 82

<210> 587  
 <211> 61  
 <212> ARN  
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 587

aagaugguug accauagaac augcgcuauc ucugugucgu auguaguaug guccacauc 60  
 u 61

<210> 588  
 <211> 79  
 <212> ARN  
 <213> *Mus musculus*

20

<400> 588

ugguacucgg agagagguua cccgagcaac uuugcaucug gaggacgaau guugcucggu 60  
 gaacccuuu ucguauca 79

<210> 589  
 <211> 81  
 <212> ARN  
 <213> *Mus musculus*

25

<400> 589

ggguacuuga ggagagguug ucugugauga guucgcuuua uuaaugacga auauaacaca 60  
 gauggccugu uuucaauacc a 81

30

<210> 590  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 <213> *Mus musculus*

35 <400> 590

ugguacuugg agagauagua gaccguauag cguacgcuu aucugugacg uauguaacac 60  
gguccacuaa cccucaguau ca 82

<210> 591  
<211> 80  
<212> ARN  
5 <213> *Mus musculus*  
<400> 591

ggguauuggga cggauuggucg accagcugga aaguaauugu uucuaaugua cuucaccugg 60  
uccacuagcc gucggugccc 80

<210> 592  
<211> 96  
10 <212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*  
<400> 592

guacauaugu ugaagauuau uaaauauauag aguggguguu guggugguag uaugauaugu 60  
agaguaguag guugcauagu acgauguagu guauga 96

<210> 593  
15 <211> 79  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<220>  
<223> Descripción de Molécula de ADN/ARN Combinada:c

20 <400> 593

cacacuguag gccucauuua auguuuguug aaugaaaaa ugaaucauca acagacauua 60  
auugggcgcc ugcucugug 79

<210> 594  
<211> 22  
25 <212> ARN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 594

cauacuucuu uauaugccca ua 22

<210> 595  
30 <211> 21  
<212> ARN  
<213> Secuencia Artificial

<220>

<220>  
35 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 595

uggaauguaa agaaguaugu a 21

<210> 596

<211>21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 5 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 596  
 cauacuucuu uacauucugt t 21  
 <210> 597  
 10 <211>21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <220>  
 15 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 597  
 uggaauguaa agaaguaugu a 21  
 <210> 598  
 <211>21  
 20 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 25 <400> 598  
 cauacuucuu uacauuccat t 21  
 <210> 599  
 <211>21  
 30 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 599  
 35 uggaauguaa agaaguaugu a 21  
 <210> 600  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 40 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 600

guguucacag cggaccuuga uu 22

<210> 601  
<211> 22  
<212> ARN  
5 <213> Secuencia Artificial

<220>  
<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
<400> 601

10 uuaaggcacg cggugaauGC ca 22

<210> 602  
<211> 22  
<212> ARN  
<213> Secuencia Artificial

15 <220>  
<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
<400> 602

gcauucaccg cgugccuugg tt 22

20 <210> 603  
<211> 22  
<212> ARN  
<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
<400> 603

uuaaggcacg cggugaauGC ca 22

30 <210> 604  
<211> 22  
<212> ARN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<220>  
35 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
<400> 604

gcauucaccg cgugccuuaa tt 22

<210> 605  
<211> 22  
40 <212> ARN  
<213> Secuencia Artificial

<220>  
<220>  
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 605  
 uuaaggcacg cggugaaugc ca 22

<210> 606  
 <211> 19  
 5 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

10 <400> 606  
 ucuuuucaca uuugucuac 19

<210> 607  
 <211> 20  
 <212> ARN  
 15 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 607  
 20 cagugcaaug uuaaaagggc 20

<210> 608  
 <211> 20  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 608  
 uauuuuaaca uugcacugtt 20

30 <210> 609  
 <211> 20  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>

35 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 609  
 cagugcaaug uuaaaagggc 20

<210> 610  
 40 <211> 20  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 610  
 cccuuuaaca uugcacugtt 20  
 <210> 611  
 5 <211> 20  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <220>  
 10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 611  
 cagugcaaug uuaaaagggc 20  
 <210> 612  
 <211> 20  
 15 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 20 <400> 612  
 aguuuugcau aguugcacua 20  
 <210> 613  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 25 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 613  
 ugugcaaauc uaugcaaaac uga 23  
 30 <210> 614  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 35 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 614  
 acauuugcau agauuugcac att 23  
 40 <210> 615  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 615

5        ugugcaaauc uaugcaaaac uga        23

<210> 616

<211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

10       <220>

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 616

      aguuuugcau agauuugcac att        23

15       <210> 617

<211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

20       <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 617

      ugugcaaauc uaugcaaaac uga        23

<210> 618

25       <211> 22

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<220>

30       <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 618

      caaaauucgua ucuaggggaa ua        22

<210> 619

35       <211> 23

<212> ARN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

40       <400> 619

      uaccugugag auccgaauuu gug        23

<210> 620

<211> 23

<212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <220>  
 5 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 620  
 agaauucgga ucuacaggu att 23  
 <210> 621  
 <211> 23  
 10 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 15 <400> 621  
 uaccuguag auccgaauuu gug 23  
 <210> 622  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 20 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 622  
 25 caauucgga ucuacaggu att 23  
 <210> 623  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 623  
 uaccuguag auccgaauuu gug 23  
 35 <210> 624  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 40 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 624  
 auguuuccac agugcauca 19

<210> 625  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 5 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 625  
 gugcauugua guugcauug 19  
 10 <210> 626  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 626  
 guccaacuac aaugcactt 19  
 20 <210> 627  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <220>  
 25 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 627  
 gugcauugua guugcauug 19  
 30 <210> 628  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 35 <400> 628  
 augcaacuac aaugcactt 19  
 40 <210> 629  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 629

gugcauugua guugcauug 19

<210> 630  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 5 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 630

cuauacaacc uacugccuuc c 21

10 <210> 631  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 631

ugagguagua gguugugugg uu 22

20 <210> 632  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 25 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 632

ccacacaacc uacuaucuaa tt 22

30 <210> 633  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <220>  
 35 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 633

ugagguagua gguugugugg uu 22

<210> 634  
 <211> 22  
 40 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 634  
 ccacacaacc uacuaccuca tt 22

5 <210> 635  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>

10 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 635  
 ugagguagua gguugugugg uu 22

15 <210> 636  
 <211>21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <220>

20 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 636  
 aacaacauga aacuaccuat t 21

25 <210> 637  
 <211>21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <220>

30 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 637  
 uagguaguuu cauguuguug g 21

35 <210> 638  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <220>

40 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 638  
 caaaauucgua ucuaggggaa ua 22

<210> 639  
 <211>21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 639

5      uagguaguuu cauguuguug g      21

<210> 640  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

10      <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 640

    aauaacauga aacuaccuat t      21

15      <210> 641  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>

20      <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 641

    uagguaguuu cauguuguug g      21

25      <210> 642  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>

30      <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 642

    augcaacuac aaugcactt      19

35      <210> 643  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

40      <400> 643

    gugcauugua guugcauug      19

<210> 644  
 <211> 19

<212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <220>  
 5 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 644  
 augcaacuac aaugcactt 19  
 <210> 645  
 <211> 19  
 10 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 15 <400> 645  
 gugcauugua guugcauug 19  
 <210> 646  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 20 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 646  
 25 augcaacuac aaugcactt 19  
 <210> 647  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 647  
 gugcauugua guugcauug 19  
 35 <210> 648  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 40 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 648  
 augcaacuac aaugcactt 19

<210> 649  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 5 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 649  
 gugcauugua guugcauug 19  
 10 <210> 650  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 650  
 augcaacuac aaugcactt 19  
 20 <210> 651  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <220>  
 25 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 651  
 gugcauugua guugcauug 19  
 30 <210> 652  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <220>  
 35 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 652  
 ccacacaacc uacuaccuca tt 22  
 40 <210> 653  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 653  
 ugagguagua gguugugugg uu 22  
  
 <210> 654  
 <211> 22  
 5 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 10 <400> 654  
 ccacacaacc uacuaccuca tt 22  
  
 <210> 655  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 15 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
  
 <400> 655  
 20 ugagguagua gguugugugg uu 22  
  
 <210> 656  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 25 <220>  
  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
  
 <400> 656  
 ccacacaacc uacuaccuca tt 22  
 30 <210> 657  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 35 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
  
 <400> 657  
 ugagguagua gguugugugg uu 22  
  
 <210> 658  
 40 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>

<220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 658  
 ccacacaacc uacuaccuca tt 22

5 <210> 659  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>

10 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 659  
 ugagguagua gguugugugg uu 22

15 <210> 660  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>

20 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 660  
 cauacuucuu uacauuccat t 21

25 <210> 661  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>

30 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 661  
 uggaauguaa agaaguaugu a 21

35 <210> 662  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>

40 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 662  
 cauacuucuu uacauuccat t 21

<210> 663  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 663

5      uggauguaa agaaguaugu a      21  
 <210> 664  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial

10      <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 664

            gcauucaccg cgugccuuaa tt      22

15      <210> 665  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>

20      <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 665

            uuaaggcacg cggugaaugc ca      22

25      <210> 666  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>

30      <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 666

            gcauucaccg cgugccuuaa tt      22

35      <210> 667  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>

40      <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 667

            uuaaggcacg cggugaaugc ca      22

            <210> 668  
 <211> 20

<212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <220>  
 5 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 668  
 ccuuuuuaca uugcacugtt 20  
 <210> 669  
 <211> 20  
 10 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 15 <400> 669  
 cagugcaaug uuaaaagggc 20  
 <210> 670  
 <211> 20  
 <212> ARN  
 20 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 670  
 25 ccuuuuuaca uugcacugtt 20  
 <210> 671  
 <211> 20  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 30 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 671  
 cagugcaaug uuaaaagggc 20  
 35 <210> 672  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 40 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 672  
 caaaauucgga ucuacagggg att 23

<210> 673  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 5 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 673  
 uaccuguag auccgaauuu gug 23  
 10 <210> 674  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 15 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 674  
 caaaauccgga ucuacaggu att 23  
 20 <210> 675  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <220>  
 25 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 <400> 675  
 uaccuguag auccgaauuu gug 23  
 30 <210> 676  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético  
 35 <400> 676  
 uauacaagag augaaauccu c 21  
 40 <210> 677  
 <211> 64  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 677  
 ccccgcgacg agccccucgc acaaaccgga ccugagcguu uuguucguuc ggcucgcgug 60  
 aggc 64  
 <210> 678

<211> 68  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 678

5 uaaaagguag auucuccuuc uaugaguaca uuauuuanga uuaaucuag agggaaaaucc 60  
acguuuuc 68

<210> 679  
<211> 69  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 679

uugagcagag guugcccuug gugaauucgc uuuuuuuuug uugaaucaca caaaggcaac 60  
uuuuuuuug 69

<210> 680  
<211> 66  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 680

agggcuccug acuccagguc cuguguguaa ccuagaaaua gcacuggacu uggagucaga 60  
aggccu 66

<210> 681  
<211> 67  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 681

agagauggua gacuauggaa cguaggcguu augauuucug accuauguaa caugguccac 60  
uaacucu 67

<210> 682  
<211> 61  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 682

aagaugguug accauagaac augcgcuau ucugugucgu auguaauaug guccacaucv 60  
u 61

30 <210> 683  
<211> 75  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 683

uacuuaaagc gagguugccc uuuguauauu cgguuuuuug acauggaaua uacaagggca 60  
agcucucugu gagua 75

<210> 684  
<211> 76  
<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 684

uacuugaaga gaaguuguuc gugguggauu cgcuuuacuu augacgaauc auucacggac 60  
aacacuuuuu ucagua 76

<210> 685

5 <211> 73

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 685

cuccucagau cagaagguga uuguggcuuu ggguggauau uaaucagcca cagcacugcc 60  
uggucagaaa gag 73

<210> 686

<211> 88

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 686

uguuaaauc ggaauuuuaa acaauuccua gacaauaugu auaauguua uaagucuuuc 60  
cuagaaaauug uucauaaugg cuguaaca 88

<210> 687

<211> 90

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 687

gagagaagca cuggacuuag ggucagaagg ccugagucuc ucugcugcag augggcucuc 60  
ugucccugag ccaagcuuug uccucccugg 90

<210> 688

<211> 94

<212> ARN

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 688

auaaaggaag uuaggcugag gggcagagag cgagacuuuu cuauuuucca aaagcucggg 60  
cugaggcccc ucagucuugc uuccuaaccc gcgc 94

<210> 689

<211> 98

<212> ARN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 689

cgaggggaau cagcagcaau ucauguuuug aaguguucua aaugguuca aacgugaggg 60  
gcugcuauac cccucgugg ggaagguaga agguagggg 98

<210> 690

35 <211> 87

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 690

**gaaagcgcuu uggaaugaca cgaucacucc cguugagugg gcacccgaga agccaucggg 60**  
**aaugucgugu ccgccagug cucuuuc 87**

5 <210> 691  
<211> 111  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 691

**gccgggaggu ugaacauccu gcauagugcu gccaggaaau ccuauuuca uauaagaggg 60**  
**ggcuggcugg uugcauauu aggauguccc aucucccagc ccacuucguc a 111**

10 <210> 692  
<211> 83  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 692

**cgccggccga ugggcgucuu accagacaug guuagaccug gccucuguc uauuacuguc 60**  
**ugguaaaacc guccauccgc ugc 83**

15 <210> 693  
<211> 91  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 693

**cuguguguga ugagcuggca guguauguu agcugguuga auaugugaau ggcaucggcu 60**  
**aacaugcaac ugcugucuua uugcauauac a 91**

25 <210> 694  
<211> 91  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 694

**aaacgauacu aaacuguuuu ugcgaugugu uccuaauaug cacuaauaa uauuugggaa 60**  
**cauuuugcau guauaguuuu guaucaauau a 91**

30 <210> 695  
<211> 85  
<212> ARN  
<213> *Mus musculus*  
<400> 695

**aaagugcuuu ggaugacac gaucacuccc guugaguggg cacccaagaa gccaucggga 60**  
**augucguguc cgcccagugc ucuuu 85**

35 <210> 696  
<211> 112  
<212> ARN  
<213> *Mus musculus*

<400> 696

acgaggaggu ugaacauccu gcavagugcu gccaggaaau ccuacuucac uacuaagagg 60  
gggcuggcug guugcauau uaggaugucc caucuccugg cccacuucgu ca 112

<210> 697

<211> 83

5 <212> ARN

<213> *Mus musculus*

<400> 697

ccugcugaug gaugucuuac cagacauggu ugaucugga ugcaucuguc uauuacuguc 60  
ugguaauggc guccauccac ggc 83

<210> 698

10 <211> 91

<212> ARN

<213> *Mus musculus*

<400> 698

cuguguguga uggcuuggca guguaauugu agcugguuga guaugugagc ggcaccagcu 60  
aacauugcgc ugcucuccua uugcacacac a 91

15 <210> 699

<211> 91

<212> ARN

<213> *Mus musculus*

<400> 699

gagagauacu gagcuguuuu ugcgaugugu uccuaauaug ugcuaauauu auauugggaa 60  
cauuuugcau aaauagcuuu gugucaauac a 91

20

<210> 700

<211> 112

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

25 <400> 700

acggggaggu ugaacauccu gcavagugcu gccaggaaau ccuacuucac uacuaagagg 60  
gggcuggcug guugcauau uaggaugucc caucucccg cccacuucgu ca 112

<210> 701

<211> 85

<212> ARN

30 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 701

ugccugcuga uggaugucuu accagacaug guuagaucug gauguaucug ucuaauacug 60  
ucugguaaugg ccguccaucc auggc 85

<210> 702

<211> 91

35 <212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 702

cugugugcga uggguuggca guguauguu agcugguuga guaanguaaa ggcaccagcu 60  
aacaugcaac ugcucuccua uugcacauac a 91

<210> 703  
<211> 91  
<212> ARN  
5 <213> *Rattus norvegicus*  
<400> 703

gagagaugcg gagcuguuuu ugcgaugugu uccuaaugug ugcuaaaau auauugggaa 60  
cauuugcau aaauaguuuu acaucgacac a 91

<210> 704  
10 <211> 100  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 704

ccaaagaaag augcuaaacu auuuuugcga uguguuccua auauguaaua uaaauguauu 60  
ggggacauuu ugcauucava guuuuguauc aaauauaugg 100

<210> 705  
15 <211> 72  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 705

cuugggaaug gcaaggaaac cguuaccuu acugaguuaa guaauagguaa ugguucucuu 60  
gcuaauacca ga 72

<210> 706  
20 <211> 85  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 706

gcuaagcacu uacaacuguu ugcagaggaa acugagacuu uguaacuaug ucucagucuc 60  
aucugcaaag aaguaagugc uuugc 85

<210> 707  
25 <211> 22  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 707  
gagguuguccguggugaguu cg 22

<210> 708  
35 <211> 96  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 708

uccuuggcgu gaggguaugu gccuuuggac uacaucgugy aagccagcac caugcagucc 60  
augggcavau acacuugccu caaggccuau gucauc 96

<210> 709  
 <211> 76  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 709

gagggggaag acgggaggaa agaagggagu gguuccauca cggccucca cuccucuccu 60  
 cccgucuuu ccucuc 76

<210> 710  
 <211> 63  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 710

gucaggcuca guccccucc gauaaacccc uaaauaggga cuuucccggg gggugacccu 60  
 ggc 63

<210> 711  
 <211> 73  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 711

acuuggagag aggcuggccg ugaugaauuc. gauucaucaa agcgagucav acacggcucu 60  
 ccucucuuuu agu 73

<210> 712  
 <211> 68  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

20

<400> 712

guauccugua cugagcugcc ccgagcuggg cagcaugaag ggccucgggg cagcucagua 60  
 caggaugc 68

<210> 713  
 <211> 80  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 713

gguaacuuga gagugguuau cccugcugug uucgcuuau uuaugacgaa ucauacaggg 60  
 acauccaguu uuucaguauc 80

30

<210> 714  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

35

<400> 714

gagaaucauc ucucccagau aauggcacuc ucaaacaagu uuccaaaauug uuugaaaggc 60  
 uauuuuuugg ucagaugacu cuc 83

<210> 715  
 <211> 84  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5 <400> 715  
     **guggagcguu gguggucgua ugugugacgc cauuuacuug aaccuuuagg agugacauca 60**  
     **cauauacggc agcuaaacug cuac 84**  
 <210> 716  
 <211> 128  
 <212> ARN  
 10 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 716  
     **uggaggccuu gcugguuugg aaaguucuu guucgacacc auggaucucc agguggguca 60**  
     **aguuuagaga ugcaccaacc uggaggacuc caugcuguug agcuguucac aagcagcgga 120**  
     **cacuucca 128**  
 <210> 717  
 <211> 84  
 15 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 717  
     **uugacuuagc uggguagugg ggaacccuuc caugaggagu agaacacucc uuaugcaaga 60**  
     **uucccuucua ccuggcuggg uugg 84**  
 <210> 718  
 20 <211> 116  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 718  
     **caacuacagc cacuacuaca ggaccaucga ggaccugcgg gacaagauuc uuggugccac 60**  
     **cauugagaac gccaggauug uccugcagau caacaauvcu caacuggcug cagaug 116**  
 25 <210> 719  
 <211> 89  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 719  
     **cuggccucca gggcuuugua caugguaggc uuucuuuau ucguuugcac auucggugaa 60**  
     **ggucuacugu gugccaggcc cugugccag 89**  
 30 <210> 720  
 <211> 24  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 35 <400> 720  
     ugaaacaauac acgggaaacc ucuu 24  
 <210> 721  
 <211> 82  
 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 721

ugguaccuga aaagaaguug cccauguuau uuucgcuua uaugugacga aacaaacaug 60  
gugcacuucu uuuucgguau ca 82

<210> 722

5 <211> 17

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 722

auuacauggc caaucuc 17

<210> 723

<211> 21

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 723

cagcagcaca cugugguuug u 21

<210> 724

<211> 124

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 724

aaccuccuu gggaagugaa gcucaggcug ugauuuaag ccagggggcg uuuuucuaua 60  
acuggaugaa aagcaccucc agagcuugaa gcucacaguu ugagagcaau cgucuaagga 120  
agu 124

<210> 725

<211> 122

<212> ARN

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 725

gcccuguccc cugugccuug ggcggggcgc uguuaagacu ugcagugaug uuuuacuccu 60  
cuccacguga acaucacagc aagucugugc ugcuucccgu ccuacgcug ccugggcagg 120  
gu 122

<210> 726

<211> 84

30 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 726

gcucccccuc ucuaauccuu gcuaccuggg ugagagugcu gucugaaugc aaugcaccug 60  
ggcaaggauu cugagagcga gagc 84

<210> 727

35 <211> 84

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 727

gcucuuccuc ucuaauccuu ugucccuggg ugagagugcu uucugaaugc aaugcacccg 60  
ggcaaggauu cugagagggg gagc 84

<210> 728

<211> 55

5 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 728

auccuugcua ucugggugcu agugcuggcu caaugcaaug caccugggca aggau 55

<210> 729

10 <211> 71

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 729

ugcccuagca gcggaacag uucugcagug agcgauccgu gcucuggggg auuguuuccg 60  
cugccagggg a 71

15 <210> 730

<211> 83

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 730

gcugcuguug ggagaccug gucugcacuc uaucuguauu cuuacugaag ggagugcagg 60  
gcagggguuc ccuacagag ggc 83

20

<210> 731

<211> 84

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 731

gaugcaccca gugggggagc caggaaguau ugauguuucu gccaguuuag cgucaacacu 60  
ugcugguuuc cucucuggag cauc 84

<210> 732

<211> 124

<212> ARN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 732

gccaccacca ucagccauac uauguguagu gccuuauuca ggaagguguu acuuauuaga 60  
uuauuuuug uaaggcacc uucugaguag aguaaugugc aacauggaca acuuuugugg 120  
uggc 124

<210> 733

<211> 94

35 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 733

gugcugugug uagugcuuca cuucaagaag ugccaugcau gugucuagaa auauguuuug 60  
caccuuuugg agugaaauaa ugcacaacag auac 94

<210> 734

<211> 115

5 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 734

ccaccuucag cugaguguag ugcccuacuc cagagggcgu cacucaugua aacuaaaaca 60  
ugauuguagc cuuuuggagu agaguaauac acaucacgua acgcauauuu ggugg 115

<210> 735

10 <211> 94

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 735

caugcugugu gugguacccu acugcagaca guggcaauca uguauauua aaaaugauug 60  
guacgucugu ggguagagua cugcaugaca caug 94

<210> 736

15 <211> 74

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 736

gugguguccu acucaggaga guggcaauca cauguaauua ggugugauug aaaccucuaa 60  
gaguggagua acac 74

<210> 737

<211> 87

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 737

caauagacac ccaucguguc uuuugcucug cagucaguaa auauuuuuuu gugaauugugu 60  
agcaaaagac agaauuggugg uccaauug 87

<210> 738

<211> 87

<212> ARN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 738

caauagacac ccaucguguc uuuugcucug cagucaguaa auauuuuuuu gugaauugugu 60  
agcaaaagac agaauuggugg uccaauug 87

<210> 739

<211> 84

35 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 739

ucucagucug uggcacucag ccuugagggc acuuucuggu gccagaauga aagugcuguc 60  
auagcugagg uccaaugacu gagg 84

<210> 740

<211> 98

5 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 740

ggacuucuc agucuguggc acucagccuu gagggcacuu ucuggugcca gaaugaaagu 60  
gcugucauag cugaggucca augacugagg cgagcacc 98

<210> 741

10 <211> 129

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 741

gggaugccac auucagccau ucagcguaca gugccuuuca cagggaggug ucauuuauugu 60  
gaacuaaaaau auaaaauuca ccuuucugag aaggguaaug uacagcaugc acugcauauug 120  
ugguguccc 129

15 <210> 742

<211> 127

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 742

ggauGCCaca uucagccauu cagugugcag ugccuuucac agggaggugu cauuuauugu 60  
aacuaaaaau uaaauuucac cuuucugaga aggguaaugu acagcaugca cugcauauug 120  
ggugucc 127

20

<210> 743

<211> 58

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 743

cuacucugga gagugacaau cauguauaa uaaaauugau ugacacuucu gugaguag 58

<210> 744

<211> 58

<212> ARN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 744

cuacucugga gagugacaau cauguauaac uaaaauugau ugacacuucu gugaguag 58

<210> 745

<211> 58

35 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 745

cuacucugga gagugacaau cauguauaac uaaauuugau ugacacuucu gugaguag 58

<210> 746  
<211> 83  
<212> ARN  
5 <213> *Homo sapiens*  
<400> 746

ucucaugcag ucauucucca aaagaaagca cuuucuguug ucugaaagca gagugccuuc 60  
uuuuggagcg uuacuguuug aga 83

<210> 747  
<211> 83  
10 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 747

ucucaugcag ucauucucca aaagaaagca cuuucuguug ucugaaagca gagugccuuc 60  
uuuuggagcg uuacuguuug aga 83

<210> 748  
15 <211> 90  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 748

ucucaggcug ugaccuucuc gaggaaagaa gcacuucug uugucugaaa gaaaagaaag 60  
ugcuuccuuu cagaggguaa cgguuugaga 90

<210> 749  
20 <211> 90  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 749

ucucagguug ugaccuucuc gaggaaagaa gcacuucug uugucugaaa gaaaagaaag 60  
ugcuuccuuu cagaggguaa cgguuugaga 90

<210> 750  
25 <211> 85  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 750

ucucaugaug ugaccaucug gagguaagaa gcacuugug uuuugugaaa gaaagugcuu 60  
ccuuucagag gguuacucu ugaga 85

<210> 751  
<211> 90  
35 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 751

ucucagggcug ugaccaucug gagguaagaa gcacuuucug uuuugugaaa gaaaagaaag 60  
ugcuuccuuu cagaggguaa cucuuugaga 90

<210> 752

<211> 87

<212> ARN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 752

ucucagggcag ugaccucua gauggaagca cugucuguug uauaaaagaa aagaucgugc 60  
aucccuuag aguguuacug uuugaga 87

<210> 753

<211> 67

10 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 753

gugaccucuc agauggaagc acugucuguu gucuaagaaa agaucgugca ucccuuuga 60  
guguuac - 67

<210> 754

15 <211> 95

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 754

gaagaucuca ggcagugacc cucuagaugg aagcacuguc uguugucuaa gaaaagaucg 60  
ugcauccuuu uagaguguua cuguuugaga aauc 95

20 <210> 755

<211> 85

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 755

ucucaagcug ugacugcaaa gggaagcccu uucuguuguc ugaaagaaga gaaagcgcuu 60  
cccuuugcug gauuacgguu ugaga 85

25

<210> 756

<211> 87

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

30 <400> 756

ucucaagcug ugggucugca aagggaagcc cuuucuguug ucuaaaagaa gagaaagcgc 60  
uucccuuugc uggauuacgg uuugaga 87

<210> 757

<211> 83

<212> ARN

35 <213> *Homo sapiens*

<400> 757

ucaugcugug gccuccaga ggggaagcgc uucuguuguc ugaaagaaa caaagcgcuc 60  
ccuuuagag guuuacggu uga 83

<210> 758

<211> 101

<212> ARN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 758

gcgagaagau cucaugcugu gacucucugg aggggaagcac uuucuguugu cugaaagaaa 60  
acaaagcgc ucucuuuaga guguuacggu uugagaaaag c 101

<210> 759

<211> 87

10 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 759

ucccaugcug ugaccucua gaggggaagca cuuucuguug ucugaaagaa accaaagcgc 60  
uucccuuug agcguuacgg uuugaga 87

<210> 760

15 <211> 88

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 760

ucucaggcug ugaccucua gaggggaagcg cuuucuguug gcuaaaagaa aagaaagcgc 60  
uucccuuag aguguuaacg cuuugaga 88

<210> 761

20 <211> 87

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 761

ucucaugcug ugaccucua gaggggaagca cuuucucuug ucuaaaagaa aagaaagcgc 60  
uucucuuaag aggauuacuc uuugaga 87

25

<210> 762

<211> 85

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

30 <400> 762

cucaggcugu gacacucuag aggggaagcgc uuucuguugu cugaaagaaa ggaaagugca 60  
uccuuuuaga guguuacugu uugag 85

<210> 763

<211> 87

<212> ARN

35 <213> *Homo sapiens*

<400> 763

ucucagggcug ugucccucua caggggaagcg cuuucuguug ucugaaagaa aggaaagugc 60  
auccuuuuag aguguuacug uuugaga 87

<210> 764  
<211> 81  
<212> ARN  
5 <213> *Homo sapiens*  
<400> 764

caugcuguga cccucuagag ggaagcgcuu ucuguugucu gaaagaaaag aaagugcauc 60  
cuuuuagagg uuucuguuu g 81

<210> 765  
<211> 87  
10 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 765

ucucagccug ugaccucua gaggggaagcg cuuucuguug ucugaaagaa aagaaagugc 60  
aucuuuuuag aggaauacag uuugaga 87

<210> 766  
15 <211> 88  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 766

ucccaugcug ugaccucca aaggggaagcg cuuucuguuu guuuucucu aaacaaagug 60  
ccuccuuua gaguguuacc guuuggga 88

<210> 767  
20 <211> 84  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 767

ucucaugcag ucauucucca aaagggagca cuuucuguuu gaaagaaaac aaagugccuc 60  
cuuuuagagu guuacuguuu gaga 84

<210> 768  
25 <211> 85  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 768

cucagggcugu gaccuccag aggggaaguac uuucuguugu cugagagaaa agaaagugcu 60  
ucccuuugga cuguuucggu uugag 85

<210> 769  
35 <211> 61  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 769

cccucuaacag ggaagcgcuu ucuguugucu gaaagaaaag aaagugcuuc cuuuuagagg 60  
g 61

<210> 770

<211> 87

5 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 770

ucucaggcug ucguccucua gagggaagca cuuucuguug ucugaaagaa aagaaagugc 60  
uuccuuuuag aggguuaccg uuugaga 87

<210> 771

10 <211> 87

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 771

ucucaagcug ugagucuaca aagggaagcc cuuucuguug ucuaaaagaa aagaaagugc 60  
uucucuuuug uggguuaccg uuugaga 87

<210> 772

15 <211> 87

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 772

ucuccugcug ugaccucuaa gauggaagca guuucuguug ucugaaagga aagaaagugc 60  
uuccuuuuug aggguuaccg uuugaga 87

20

<210> 773

<211> 87

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 773

ucucaggcug ugaccucua aagggaagcg cuuucugugg ucagaaagaa aagcaagugc 60  
uuccuuuuag aggguuaccg uuuggga 87

<210> 774

<211> 90

<212> ARN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 774

ucccaugcug ugaccucua gaggaagcac uuucuguuug uugucugaga aaaaacaaag 60  
ugcuuccuu uagaguguua ccguuuggga 90

<210> 775

<211> 88

35 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 775

ucccaugcug ugaccucua gaggaagcac uuucuguug uugucugaga aaaaacaaag 60  
ugcuucccuu uagaguuaacu guuuggga 88

<210> 776

<211> 87

5 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 776

ucucagggcug ugaccucca aagggagaagaa cuuucuguug ucuaaaagaa aagaacgcac 60  
uucccuuuag aguguuaccg ugugaga 87

<210> 777

10 <211> 87

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 777

ucucgggcug ugacucucca aagggagaagaa uuucucuguug ucuaaaagaa aagaacgcac 60  
uucccuuuag aguguuaccg ugugaga 87

<210> 778

<211> 87

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 778

ucucagggcug uguccucua gaggggaagcg cuuucuguug ucugaaagaa aagaaaaaugg 60  
uucccuuuag aguguuaccg uuugaga 87

<210> 779

<211> 87

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 779

ucucaugcug ugaccucua gaggggaagcg cuuucuguug ucugaaagaa aagaacgcgc 60  
uucccuauag aggguuaccc uuugaga 87

<210> 780

<211> 87

<212> ARN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 780

ucucaugcug ugaccuaca aaggggaagca cuuucucuug uccaaaggaa aagaaggcgc 60  
uucccuuug aguguuaccg uuugaga 87

<210> 781

<211> 85

35 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 781

**cucaagcugu gacucuccag agggauhcac uuucucuau gugaaaaaa agaaggcgcu 60**  
**uccuuuaga gcguuacggu uuggg 85**

<210> 782

<211> 85

5 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 782

**cucaggcugu gaccucuag agggauhcac uuucuguugc uugaaagaag agaaagcgcu 60**  
**uccuuuaga ggauuacucu uugag 85**

<210> 783

10 <211> 65

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 783

**gugaccucucu agagggaagc acuuucuguu gaaagaaaag aacaugcauc cuuucagagg 60**  
**guuac 65**

15 <210> 784

<211> 83

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 784

**ucaggcugug acccucuuga gggaagcacu uuucuguugc ugaagaaga gaaagugcuu 60**  
**ccuuuagag gcuuacuguc uga 83**

20

<210> 785

<211> 85

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 785

**ucucaagcug ugacugcaaa gggaagcccu uuucuguugc uaaaagaaaa gaaagugcuu 60**  
**cccuuuggug aauuacgguu ugaga 85**

<210> 786

<211> 72

30 <212> ARN

<213> *Mus musculus*

<400> 786

**cuugggaug gcgaggaaac cguuaccauu acugaguuaa guaaugguaa cggucucuu 60**  
**gcugcucca ca 72**

35 <210> 787

<211> 85

<212> ARN

<213> *Mus musculus*

<400> 787

gcuaagcagu uacaacuguu ugcagaggaa acugagacuu uauaacuauug ucucagucuc 60  
aucugcaaag agguaagugc uuugc 85

<210> 788

<211> 75

5 <212> ARN

<213> *Mus musculus*

<400> 788

cuuuaccuaa uuuguugucc aucauguaaa acauaaauga ugauagacac cauauaaggu 60  
agaggaaggu ucacu 75

<210> 789

10 <211> 71

<212> ARN

<213> *Mus musculus*

<400> 789

accuuguuau gggggucugg gguaaggagu ggucaucagg ggguaacuacc aaguuuauuc 60  
ugugagauag a 71

15 <210> 790

<211> 74

<212> ARN

<213> *Mus musculus*

<400> 790

gcccuaauua gaugggcacu gaugugauaa aauaaaaau ugaucagggc cuuucuaagu 60  
agaguaaggc uuac 74

20

<210> 791

<211> 73

<212> ARN

<213> *Mus musculus*

25 <400> 791

uauauguguu uaugugugug uacauguaca uaugugaaua ugauauccau auacauacac 60  
gcacacauaa gac 73

<210> 792

<211> 71

<212> ARN

30 <213> *Mus musculus*

<400> 792

gugccugugu gcguaagugc cugcauguau augcguguau auuuuauuca uauacauaca 60  
cacaccuaca c 71

<210> 793

<211> 78

35 <212> ARN

<213> *Mus musculus*

<400> 793

auaagaaacu uggcgugucg ugacugaugu acugauaaga aacucagugu gauaugacug 60  
augugcgugu gucugucu 78

<210> 794

<211> 74

5 <212> ARN

<213> *Mus musculus*

<400> 794

cgcggugccu cuuucuuuga ucuugguguc cucaauuga aagccaagga agaggugggg 60  
ggcgugguag ccuu 74

<210> 795

10 <211> 75

<212> ARN

<213> *Mus musculus*

<400> 795

cagugcucuu cuuggacugg cacuggugag uaaaacuaaa uacaaccagu accuuucuga 60  
gaagaguaaa gcuca 75

<210> 796

15 <211> 67

<212> ARN

<213> *Mus musculus*

<400> 796

gugcuuuacg uaguauagug cuuuucacau uaaacaaaaa gugaaaggug ccuacuaug 60  
uuuagga 67

<210> 797

<211> 73

<212> ARN

<213> *Mus musculus*

25 <400> 797

gagggggaag acgggagaag agaagggagu gguuuuuggg ugccucacuc cuccccucucc 60  
gucuuguucu cuc 73

<210> 798

<211> 58

<212> ARN

30 <213> *Mus musculus*

<400> 798

gucaggcuca gucccccucc gauaaaccuc aaaaauagggu cuuaccuagg gggcuggc 58

<210> 799

<211> 73

35 <212> ARN

<213> *Mus musculus*

<400> 799

acuuggagag aggcuggccg ugaugaauuc gauucaucua aacgagucan acacggcucu 60  
ccucucucucu agu 73

<210> 800

<211> 65

5 <212> ARN

<213> *Mus musculus*

<400> 800

gcauccugua cugagcugcc ccgagcugag cacagugaag gaccucgggg cagcucagua 60  
cagga 65

<210> 801

10 <211> 72

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 801

uuugggaaug gcgaggaaac cguuaccauu acugaguuaa guaaugguaa ugguucucuu 60  
gcugcuccca ca 72

15 <210> 802

<211> 73

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 802

gagggggaag acgggagaag agaagggagu gguuuuuggg ugccucacuc cuccccuccc 60  
gucuuuuucu cuc 73

20

<210> 803

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 803

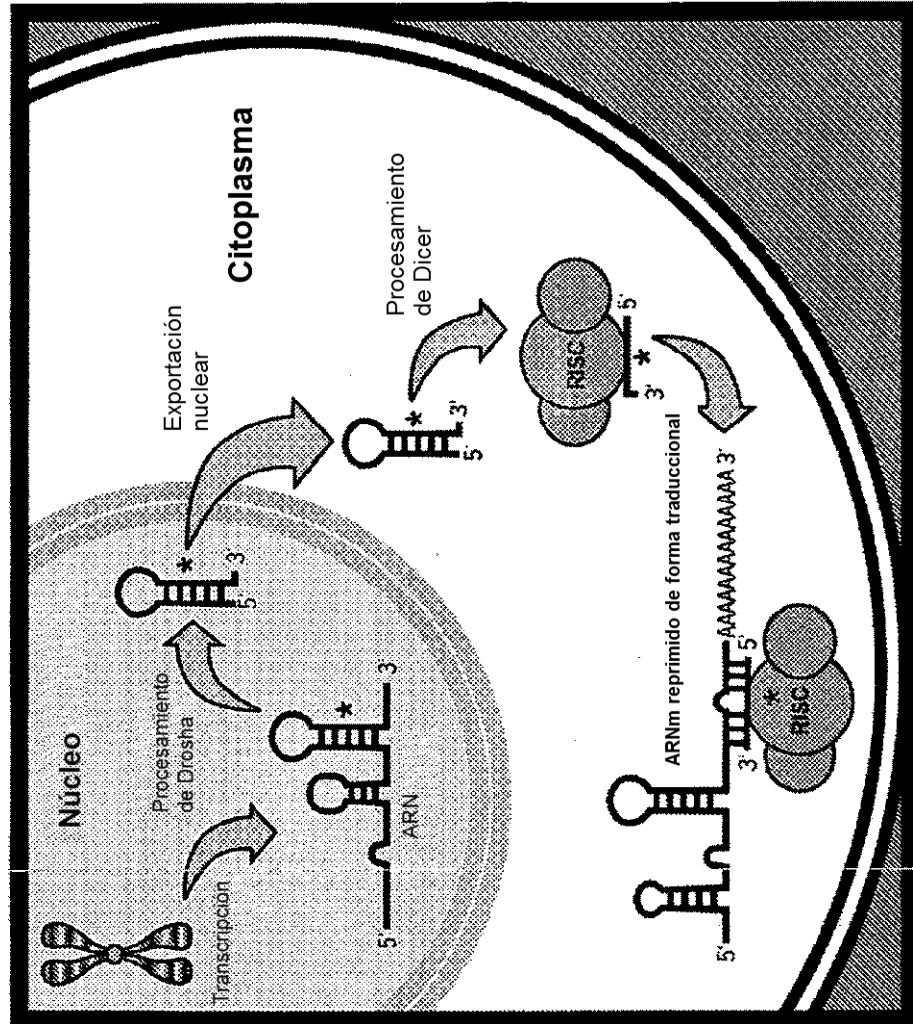
tcatcgtctc aaatgagtct 20

30

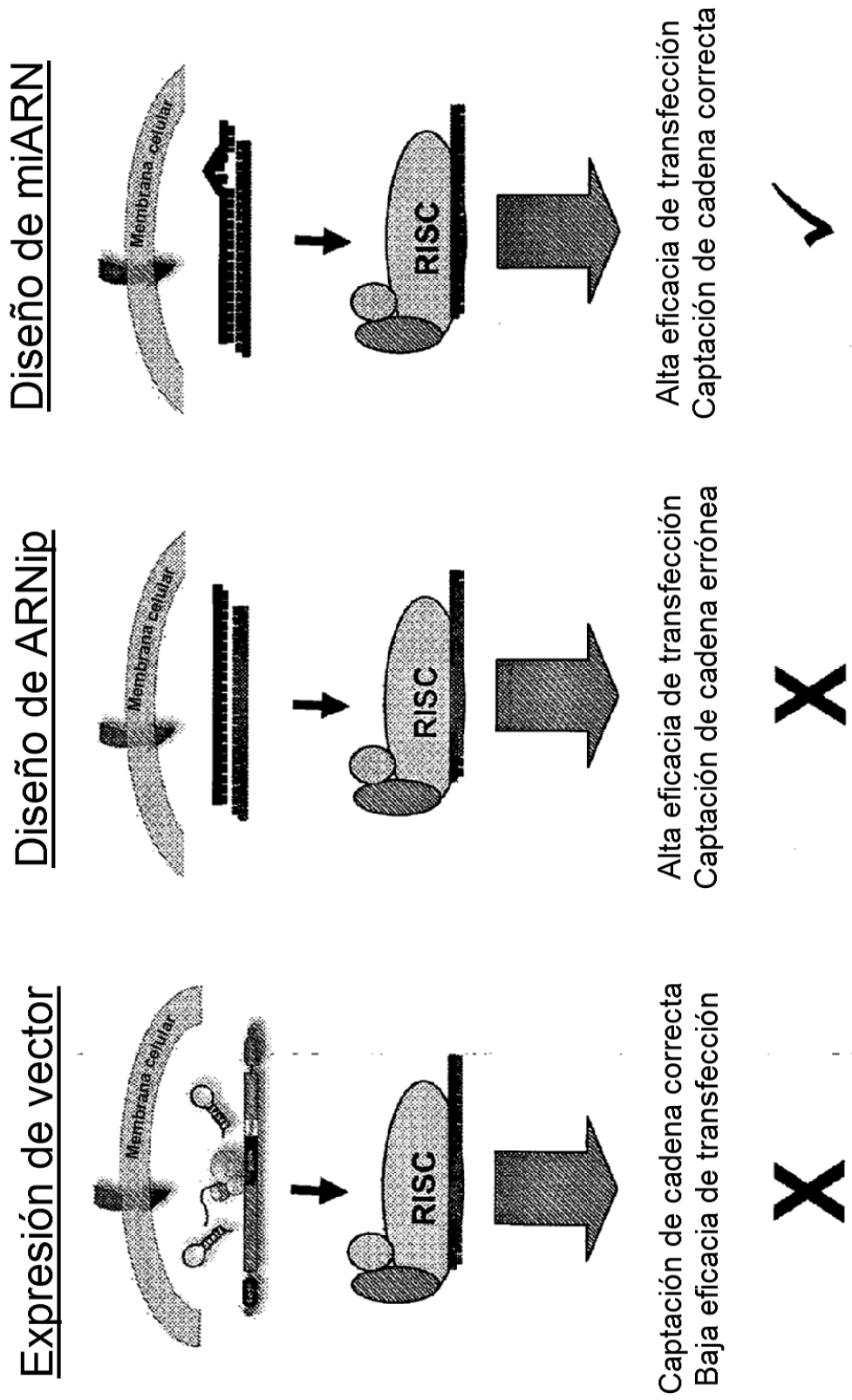
## REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico de miARN sintético que comprende una secuencia con al menos 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de miR-192 humana madura para su uso en una terapia de un cáncer.
- 5 2. Ácido nucleico de miARN sintético para su uso en una terapia de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 1 definido además como una molécula de ácido nucleico de entre 17 y 125 restos de longitud, que comprende:
  - una región de miARN cuya secuencia de 5' a 3' es al menos 80 % idéntica a un miARN maduro de miR-192, y
  - una región complementaria cuya secuencia de 5' a 3' es entre 60 % y 100 % complementaria de la región de miARN.
- 10 3. Ácido nucleico de miARN sintético para su uso en una terapia de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende una región de miARN cuya secuencia de 5' a 3' es al menos 85 % idéntica a una secuencia de miR-192 madura.
4. Ácido nucleico de miARN sintético para su uso en una terapia de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende una región de miARN cuya secuencia de 5' a 3' es al menos 90 % idéntica a una secuencia de miR-192 madura.
- 15 5. Ácido nucleico de miARN sintético para su uso en una terapia de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, que comprende una región de miARN cuya secuencia de 5' a 3' es idéntica a una secuencia de miR-181a madura.
6. Ácido nucleico de miARN sintético para su uso en una terapia de un cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el ácido nucleico está comprendido por dos polinucleótidos separados.
- 20 7. Ácido nucleico de miARN sintético para su uso en una terapia de un cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el ácido nucleico es una molécula en horquilla.
8. Ácido nucleico de miARN sintético para su uso en una terapia de un cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para administración a una célula o un paciente que tiene la célula identificada como que necesita una terapia de un cáncer.
- 25 9. Ácido nucleico de miARN sintético para su uso en una terapia de un cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en una terapia para el tratamiento de cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon o cáncer de piel.
- 30 10. Un ácido nucleico de miARN sintético bicatenario de 17-30 nucleótidos de longitud que comprende un polinucleótido que tiene una secuencia con al menos 80 % de identidad de secuencia con una secuencia de miR-192 madura que comprende los nucleótidos 22-44 de SEC ID N°: 137, y un segundo polinucleótido separado cuya secuencia de 5' a 3' es entre 60 % y 100 % complementaria del primer polinucleótido para su uso como un medicamento.
- 35 11. Ácido nucleico de miARN sintético para su uso como un medicamento de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado porque** el ácido nucleico se define adicionalmente como en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7.
- 40 12. Ácido nucleico de miARN sintético para su uso como un medicamento de acuerdo con las reivindicaciones 10 u 11 que comprende además uno o más de los siguientes:
  - i) un grupo de reemplazo para fosfato o hidroxilo del nucleótido en el extremo 5' de la cadena complementaria de la molécula de ARN;
  - ii) una o más modificaciones de azúcares en los primeros o últimos 1 a 6 restos de la región complementaria; o
  - iii) no complementariedad entre uno o más nucleótidos en los últimos 1 a 5 restos en el extremo 3' de la región complementaria y los nucleótidos correspondientes de la región de miARN.
- 45 13. Ácido nucleico de miARN sintético para su uso como un medicamento de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, que comprende i) al menos un nucleótido modificado que bloquea el 5' OH o fosfato en el extremo 5', en el que la al menos una modificación de un nucleótido es una modificación de NH<sub>2</sub>, biotina, un grupo amina, un grupo de alquilamina inferior, un grupo acetilo o 2'oxígeno-metilo(2'O-Me) o ii) al menos una modificación de ribosa seleccionada de 2'F, 2' NH<sub>2</sub>, 2'N<sub>3</sub>, 4'tio o 2' O-CH<sub>3</sub>.
- 50 14. Ácido nucleico de miARN sintético para su uso como un medicamento de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 13 que es un polinucleótido individual o un polinucleótido bicatenario.
15. Uso de un ácido nucleico de miARN sintético como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para reducir la viabilidad celular, o la proliferación celular o para inducir la apoptosis, con la condición de que los procedimientos para el tratamiento del cuerpo humano o animal por cirugía o terapia estén excluidos.

**Fig. 1**

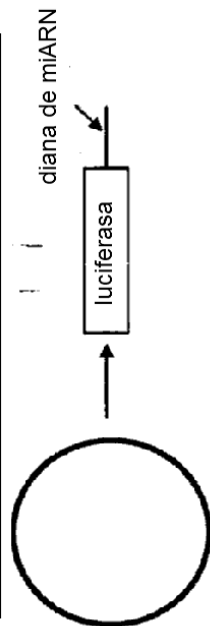


**Fig. 2**

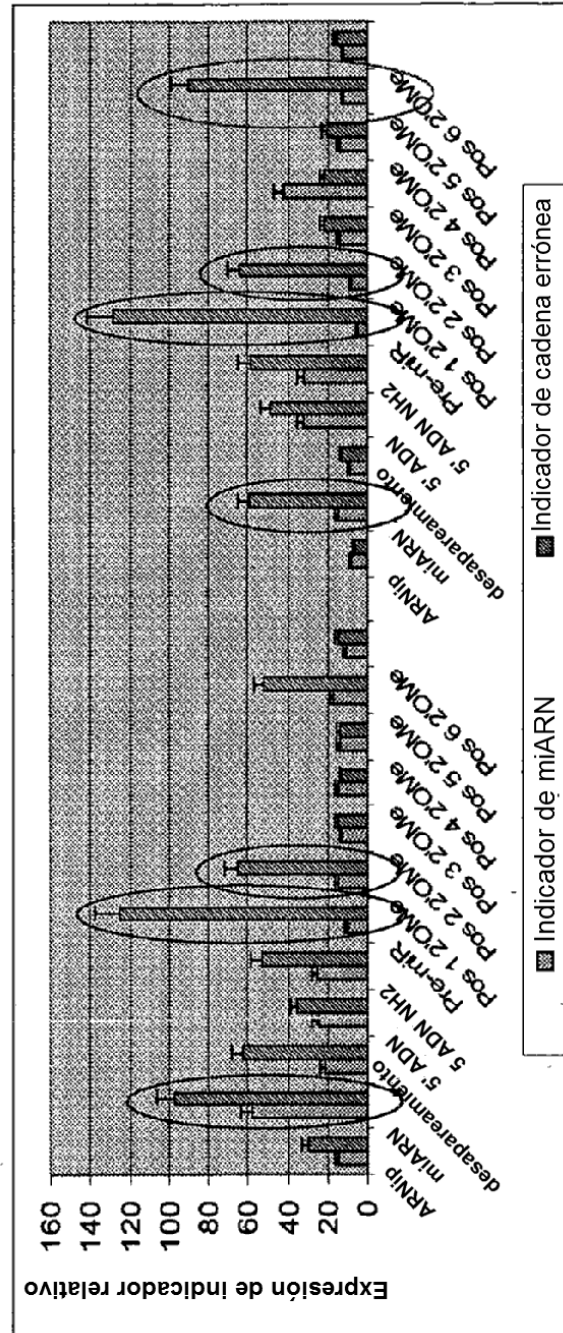
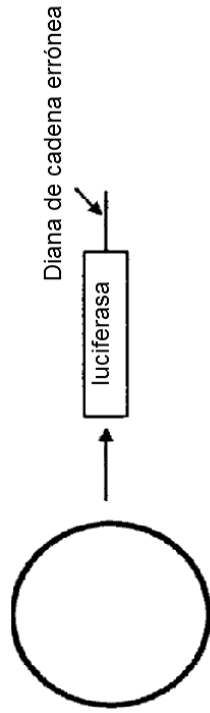


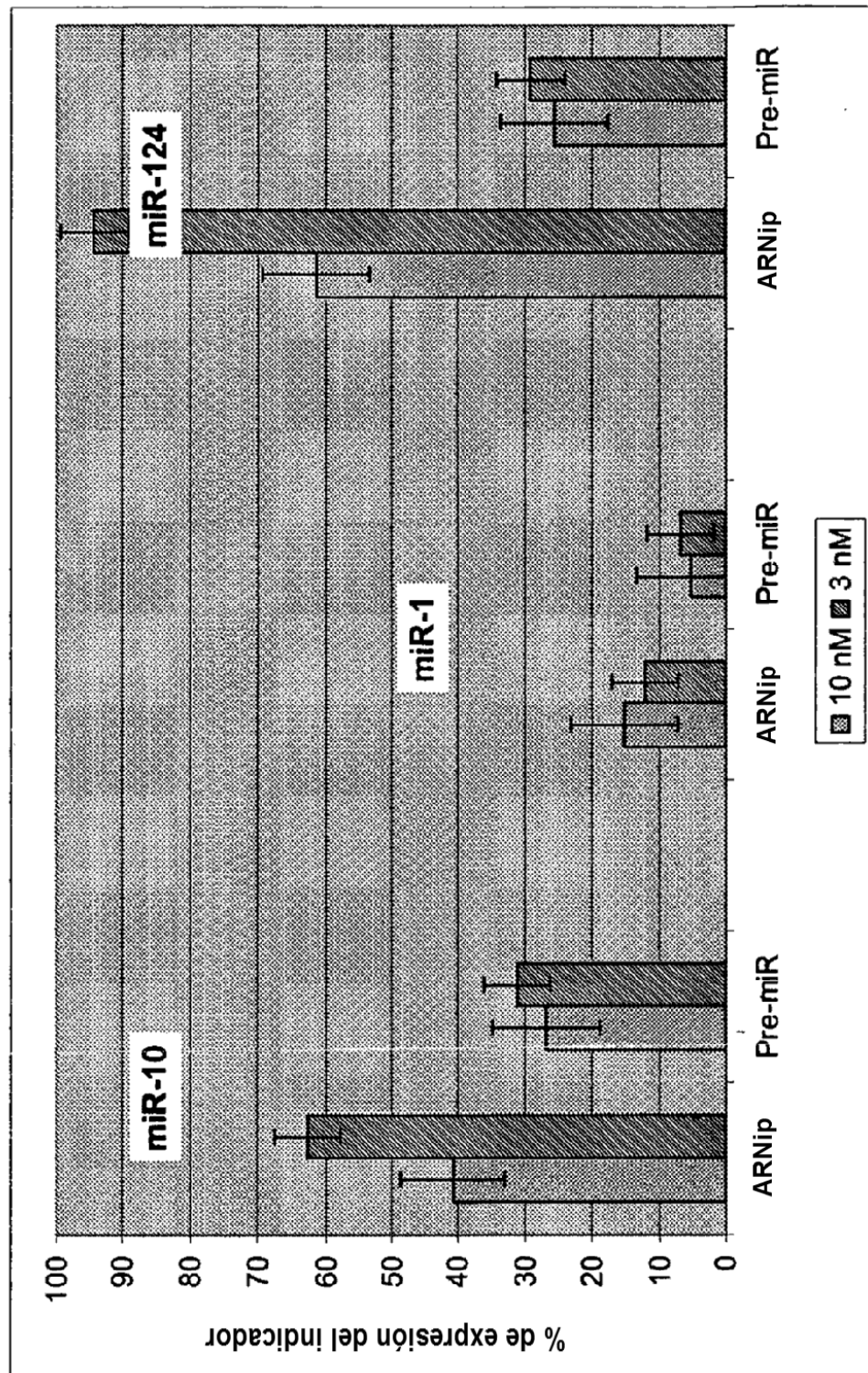
**Fig. 3**

Indicador de cadena activa



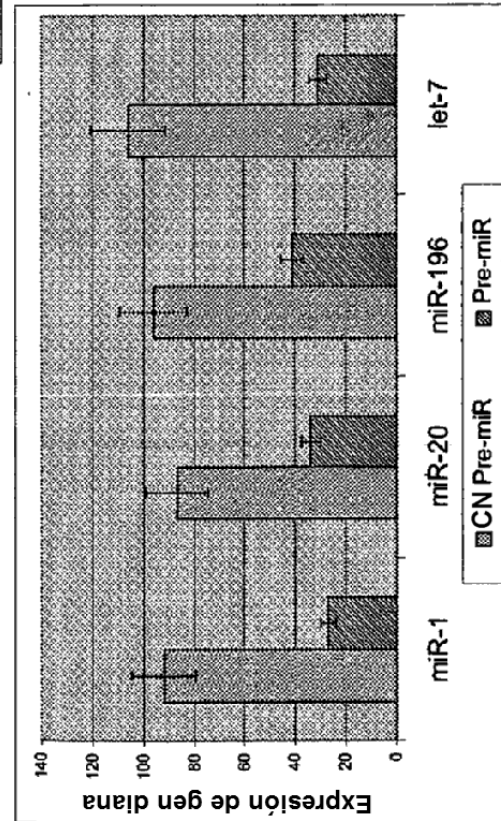
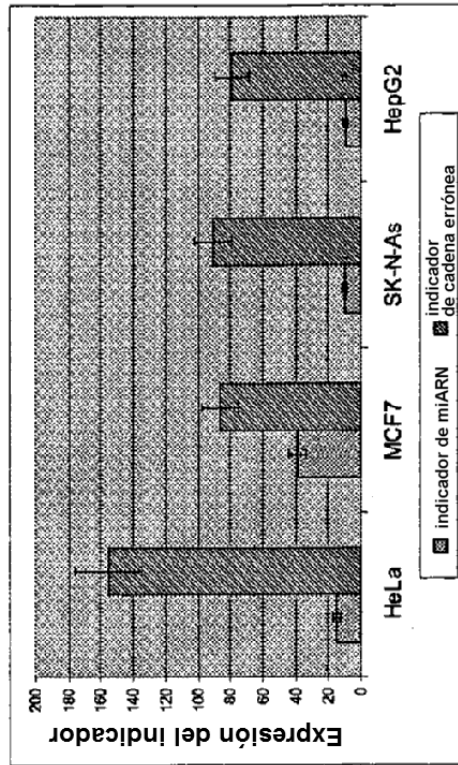
Indicador de cadena complementaria



**Fig. 4**

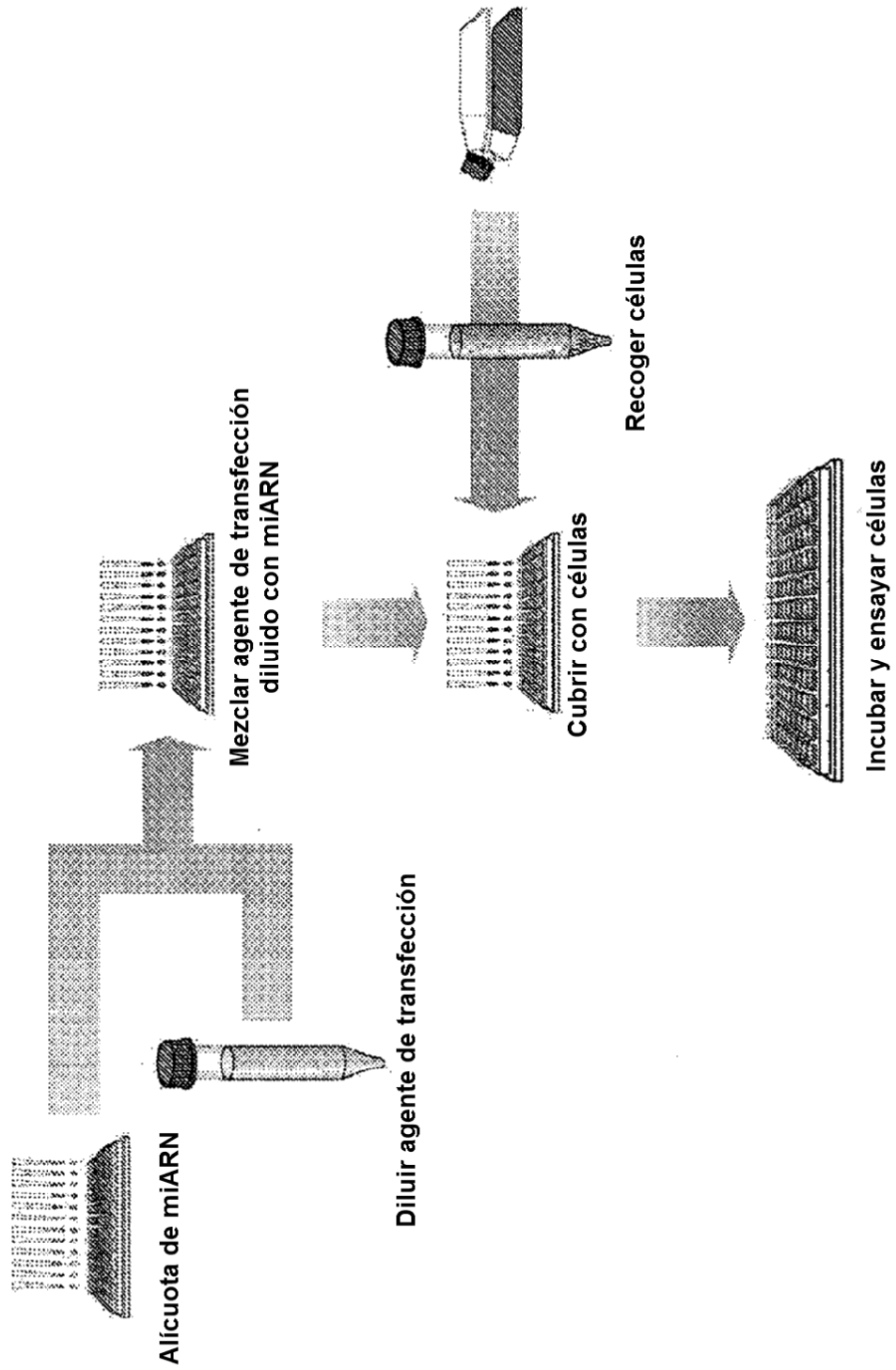
**Fig. 5**

miARN sintéticos  
en múltiples tipos celulares

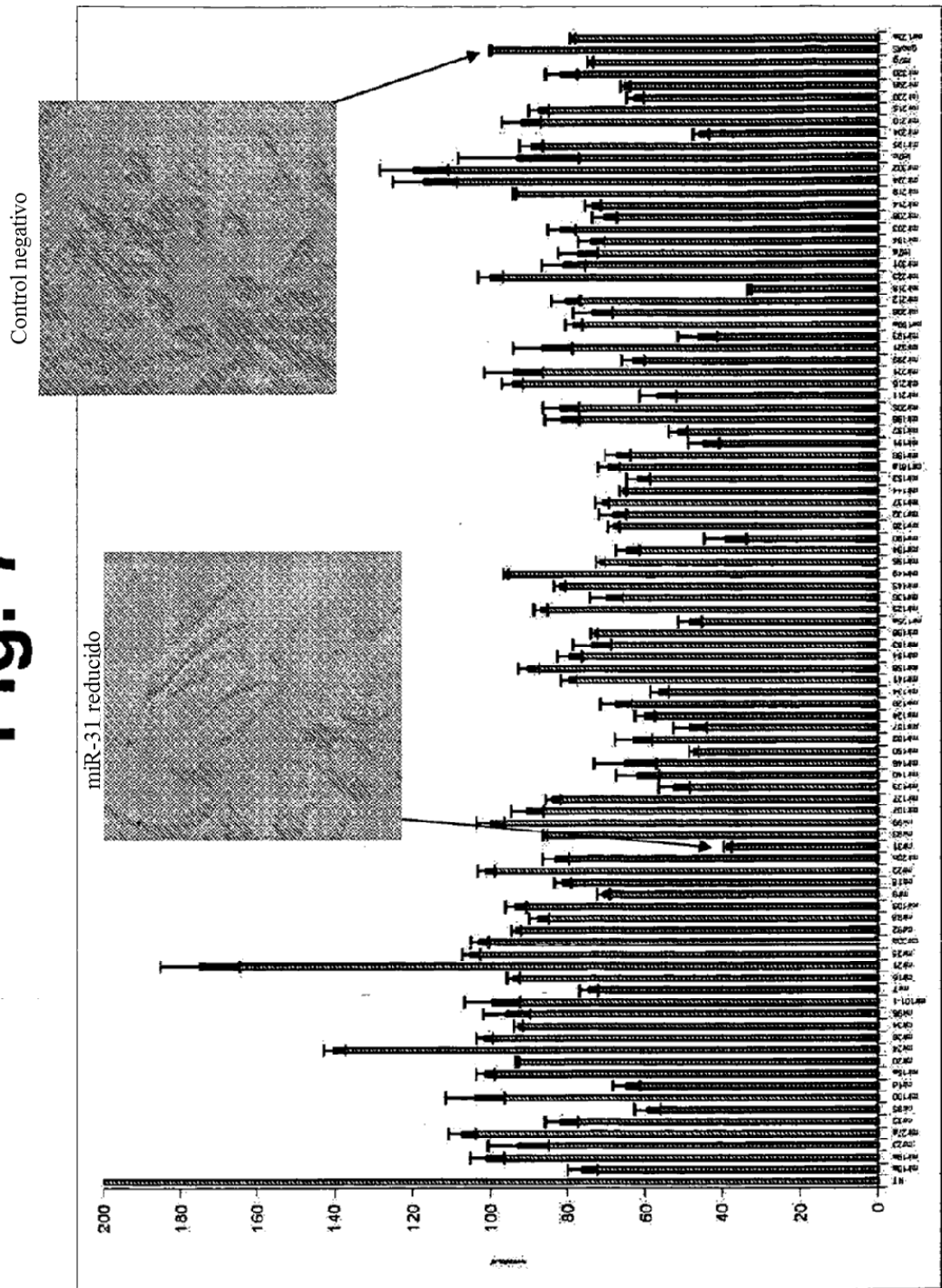


Efecto de los miARN sintéticos  
en dianas endógenas

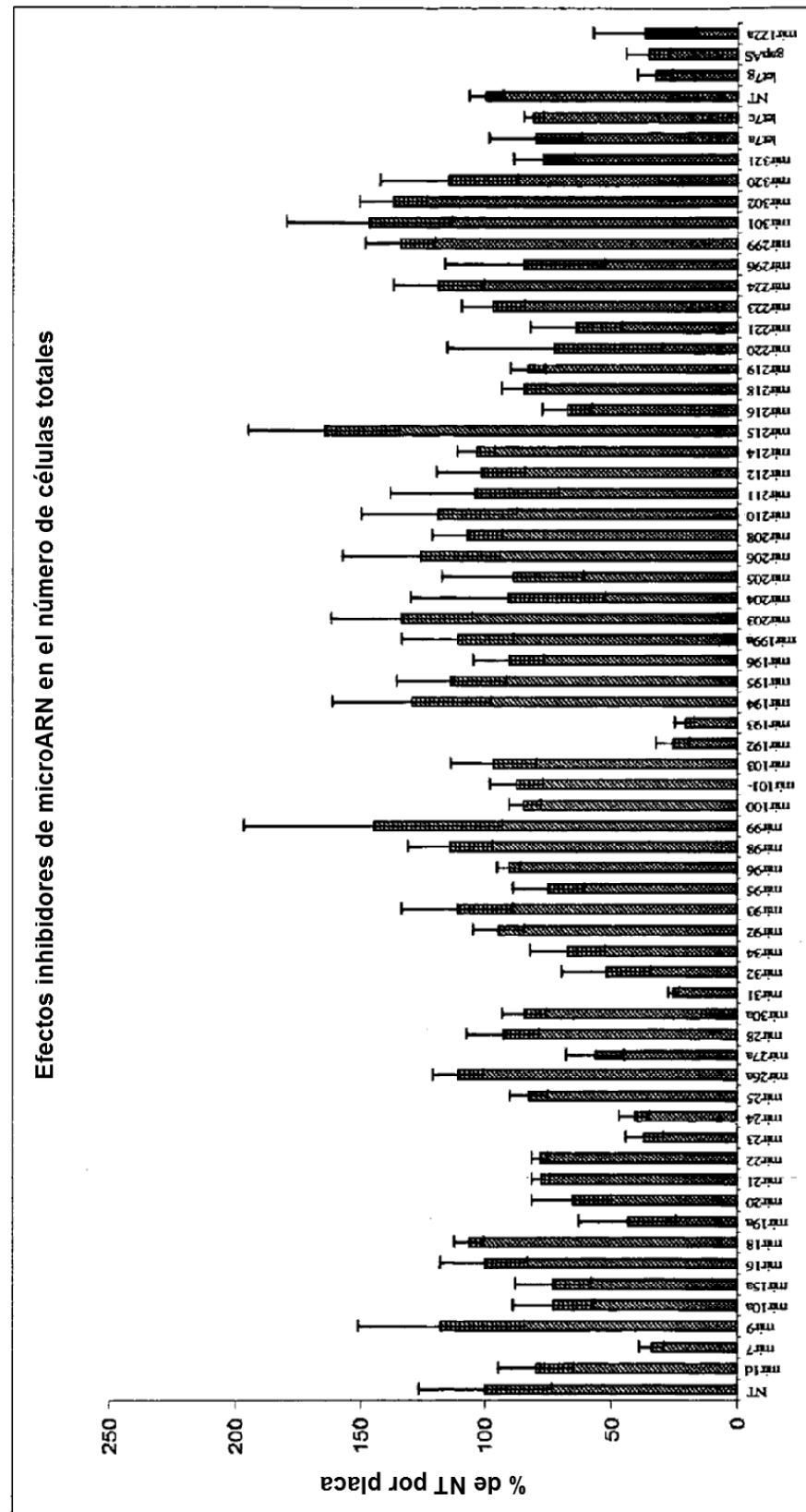
**Fig. 6**



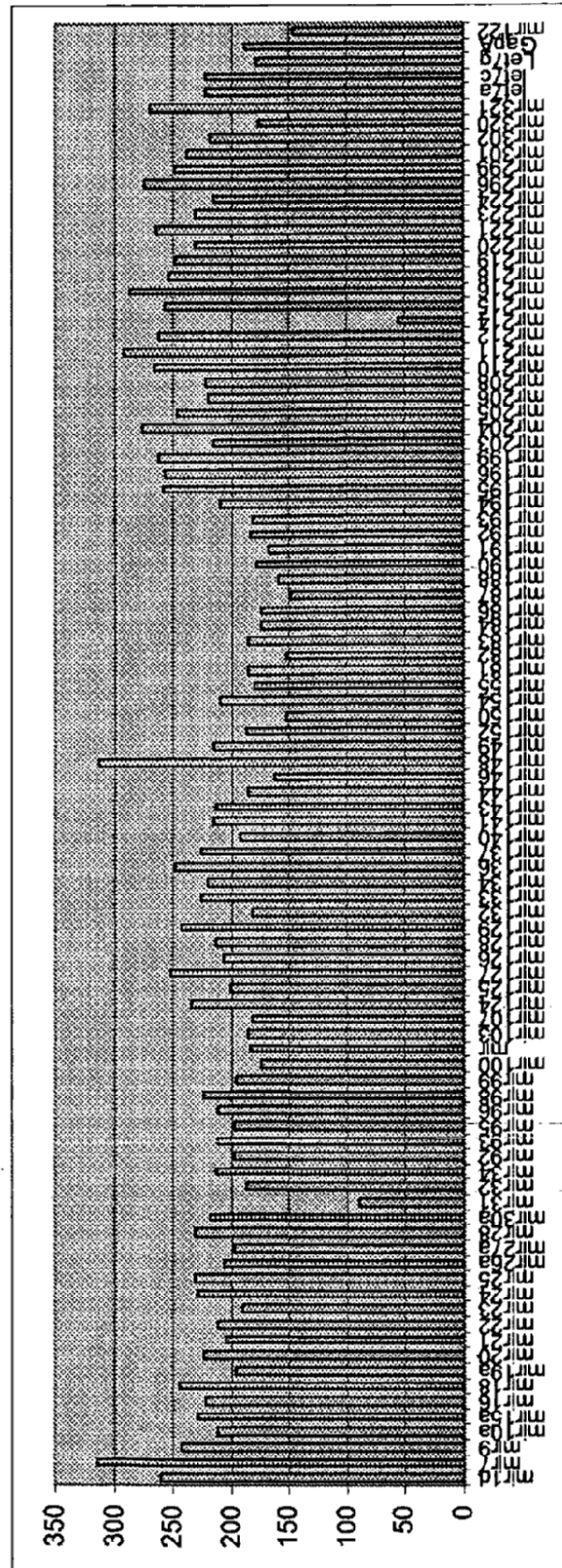
**Fig. 7**



**Fig. 8**



**Fig. 9**



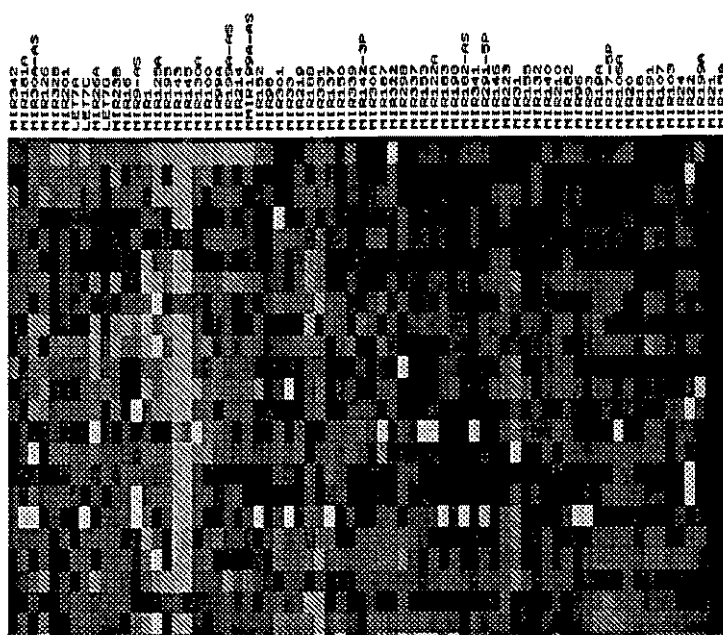
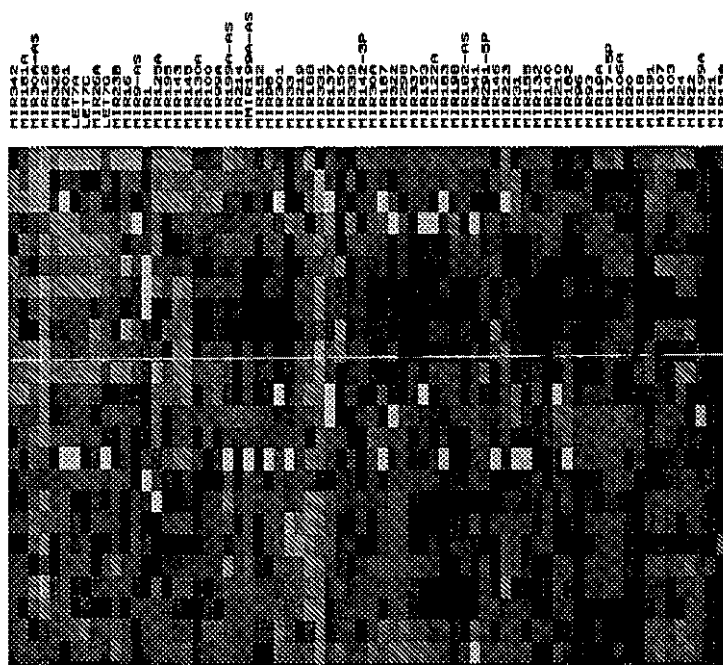
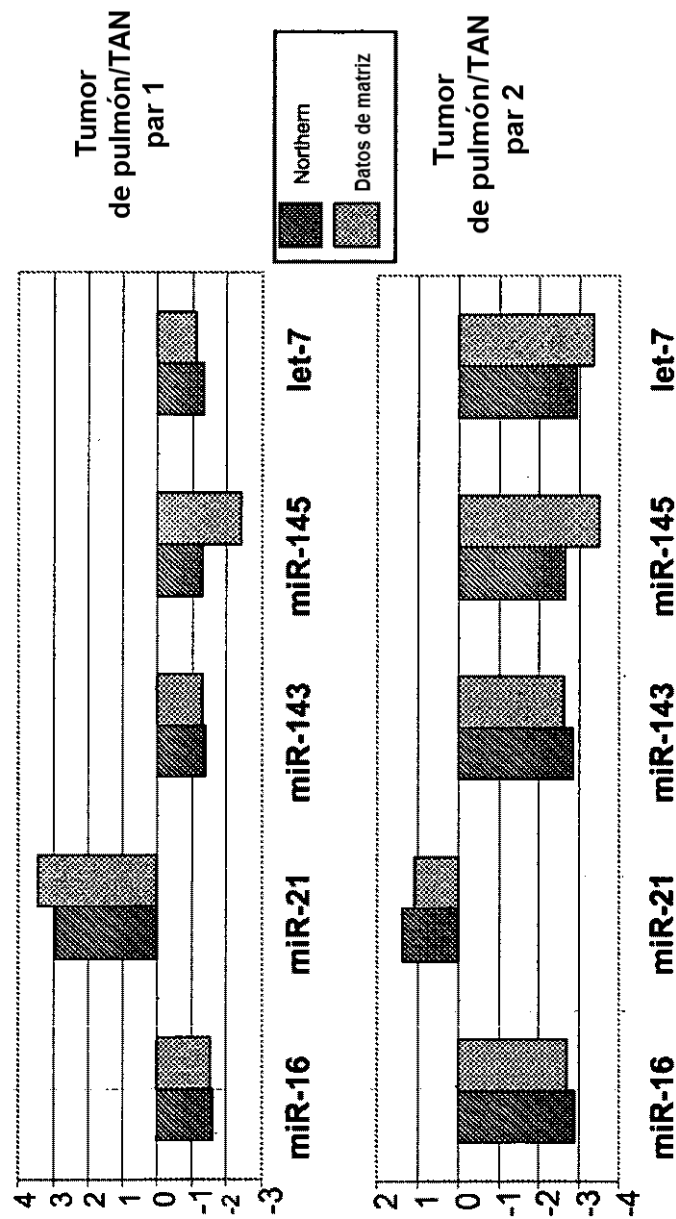


FIG. 10





**FIG. 11**

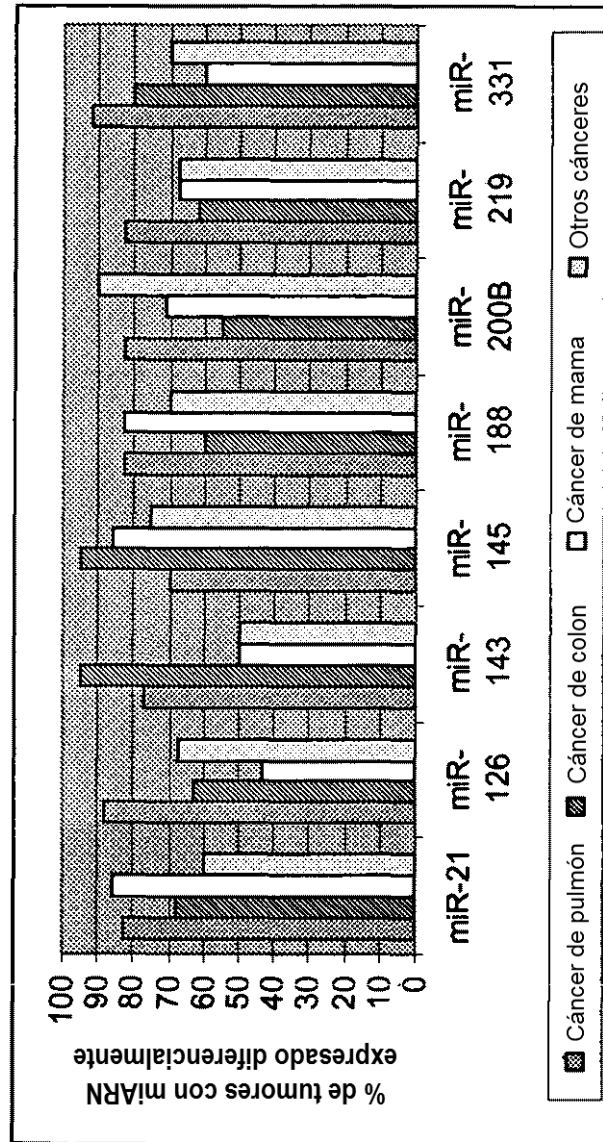
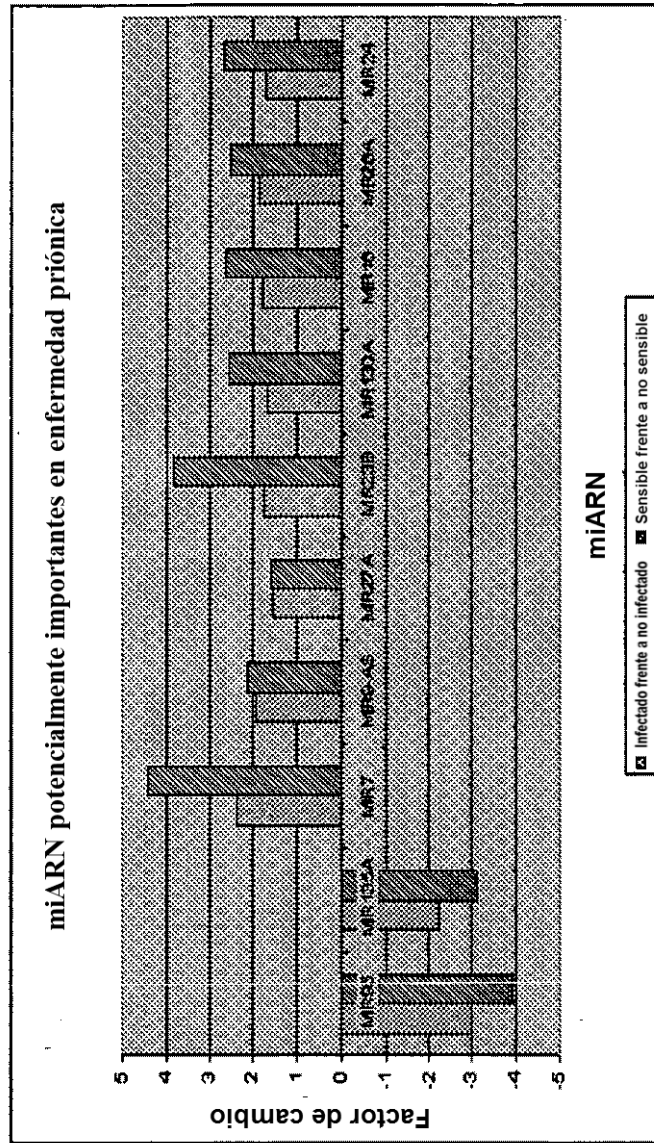


FIG. 12



**FIG. 13**

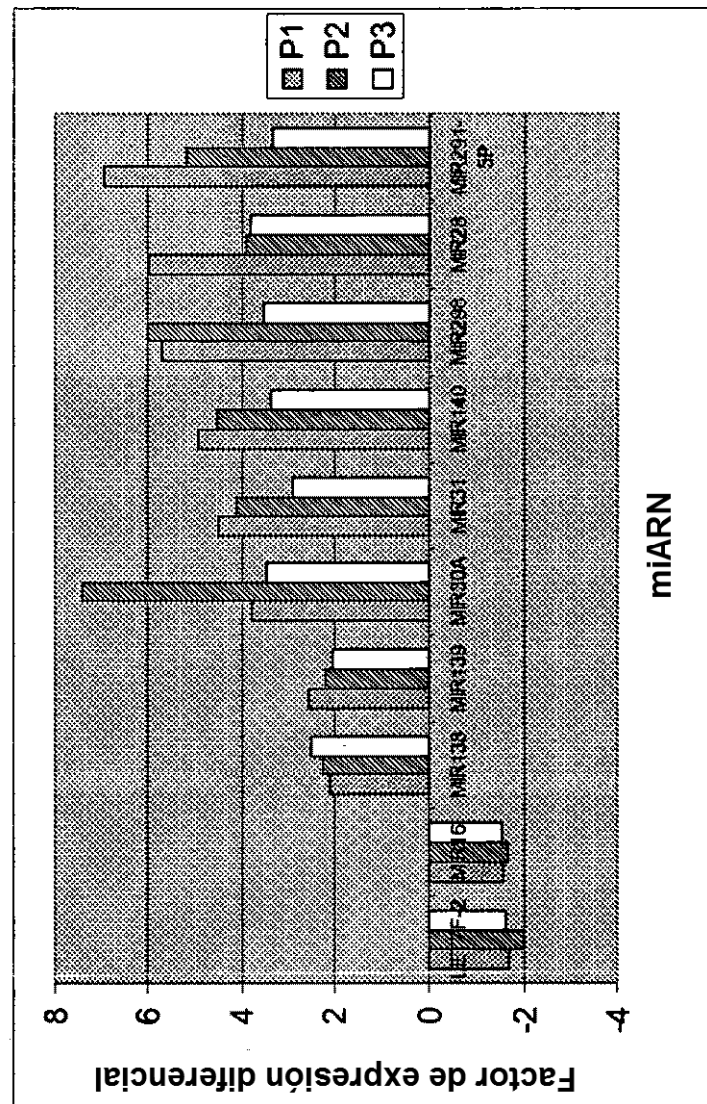


FIG. 14

| BT549 de mama |                     |    | MCF12A de mama |                     |    | HeLa<br>de cuello uterino |                     |    | 22 Rv1 de próstata |                     |    |
|---------------|---------------------|----|----------------|---------------------|----|---------------------------|---------------------|----|--------------------|---------------------|----|
| miARN         | % de<br>cont<br>neg | DT | miARN          | % de<br>cont<br>neg | DT | miARN                     | % de<br>cont<br>neg | DT | miARN              | % de<br>cont<br>neg | DT |
| mir-101       | 87                  | 3  | mir-126        | 88                  | 32 | mir-1                     | 20                  | 2  | mir-126            | 63                  | 3  |
| mir-105       | 88                  | 2  | mir-142        | 87                  | 27 | mir-101                   | 12                  | 2  | mir-101            | 77                  | 9  |
| mir-124       | 88                  | 5  | mir-147        | 87                  | 33 | mir-124                   | 16                  | 4  | mir-103            | 75                  | 10 |
| mir-126       | 82                  | 2  | mir-206        | 86                  | 12 | mir-192                   | 13                  | 3  | mir-105            | 75                  | 12 |
| mir-129       | 85                  | 1  | mir-208        | 87                  | 12 | mir-193                   | 5                   | 2  | mir-107            | 84                  | 22 |
| mir-132       | 87                  | 4  | mir-210        | 86                  | 11 | mir-195                   | 21                  | 7  | mir-124            | 77                  | 6  |
| mir-142       | 87                  | 4  | mir-211        | 83                  | 7  | mir-201                   | 26                  | 7  | mir-128            | 81                  | 4  |
| mir-192       | 81                  | 3  | mir-214        | 85                  | 19 | mir-206                   | 12                  | 6  | mir-129            | 81                  | 4  |
| mir-201       | 79                  | 14 | mir-215        | 70                  | 10 | mir-208                   | 21                  | 12 | mir-132            | 84                  | 10 |
| mir-215       | 82                  | 1  | mir-219        | 88                  | 10 | mir-210                   | 23                  | 4  | mir-135            | 79                  | 4  |
| mir-27a       | 87                  | 4  | mir-220        | 85                  | 7  | mir-215                   | 33                  | 21 | mir-137            | 81                  | 4  |
| mir-346       | 88                  | 1  | mir-221        | 88                  | 7  | mir-299                   | 20                  | 18 | mir-141            | 85                  | 2  |
| mir-92        | 85                  | 11 | mir-223        | 87                  | 10 | mir-337                   | 18                  | 3  | mir-142            | 69                  | 4  |
| mir-96        | 87                  | 9  | mir-331        | 88                  | 12 | mir-339                   | 31                  | 2  | mir-147            | 66                  | 4  |
| mir-98        | 87                  | 1  | mir-345        | 88                  | 10 | mir-340                   | 31                  | 7  | mir-15a            | 85                  | 9  |
| mir-99a       | 88                  | 1  | mir-346        | 82                  | 12 | mir-345                   | 31                  | 21 | mir-16             | 74                  | 6  |
|               |                     |    | mir-297        | 78                  | 15 | mir-34a                   | 35                  | 7  | mir-27a            | 83                  | 7  |
|               |                     |    | mir-329        | 82                  | 17 | mir-367                   | 31                  | 12 | mir-28             | 82                  | 9  |
|               |                     |    | mir-409        | 86                  | 11 | mir-292-3p                | 29                  | 21 | mir-30a-3p         | 80                  | 8  |
|               |                     |    | mir-411        | 86                  | 7  | mir-293                   | 26                  | 30 | mir-34a            | 72                  | 8  |
|               |                     |    |                |                     |    | mir-297                   | 19                  | 16 | mir-297            | 84                  | 5  |
|               |                     |    |                |                     |    | mir-344                   | 32                  | 1  |                    |                     |    |
|               |                     |    |                |                     |    | mir-409                   | 30                  | 16 |                    |                     |    |

FIG. 15A

| TE354T de piel |               |    | TE353SK de piel |               |    | Células BJ |               |      | A549 de pulmón |               |    |
|----------------|---------------|----|-----------------|---------------|----|------------|---------------|------|----------------|---------------|----|
| miARN          | % de cont neg | DT | miARN           | % de cont neg | DT | miARN      | % de cont neg | DT   | miARN          | % de cont neg | DT |
| mir-1          | 53            | 7  | mir-101         | 63            | 11 | miR-206    | 19            | 7    | mir-124        | 44            | 0  |
| mir-101        | 49            | 6  | mir-105         | 42            | 40 | let7a      | 69            | 10   | Let-7b         | 70            | 0  |
| mir-124        | 64            | 10 | mir-124         | 70            | 8  | mir1       | 38            | 2,65 | Let-7d         | 71            | 0  |
| mir-136        | 59            | 4  | mir-126         | 56            | 8  | miR-105    | 65            | 5    | Let-7g         | 62            | 1  |
| mir-154        | 51            | 5  | mir-128         | 53            | 46 | miR-147    | 35            | 7    | mir-126        | 68            | 0  |
| mir-15a        | 63            | 4  | mir-132         | 66            | 8  | miR-15a    | 43            | 8    | mir-129        | 67            | 1  |
| mir-16         | 58            | 5  | mir-133A        | 56            | 49 | miR-16     | 51            | 4    | mir-137        | 64            | 0  |
| mir-192        | 62            | 7  | mir-136         | 27            | 24 | miR-195    | 48            | 10   | mir-147        | 65            | 0  |
| mir-193        | 69            | 4  | mir-137         | 55            | 13 | miR-297    | 46            | 6,85 | mir-15a        | 61            | 0  |
| mir-195        | 58            | 3  | mir-141         | 62            | 23 | miR-324-3p | 68            | 8,84 | mir-16         | 53            | 1  |
| mir-201        | 67            | 8  | mir-142         | 60            | 19 | miR-337    | 27            | 7,26 | mir-192        | 70            | 2  |
| mir-206        | 51            | 4  | mir-144         | 65            | 22 | miR-376b   | 63            | 6,53 | mir-193        | 64            | 3  |
| mir-215        | 59            | 6  | mir-15a         | 57            | 20 |            |               |      | mir-195        | 59            | 0  |
| mir-221        | 62            | 8  | mir-16          | 59            | 9  |            |               |      | mir-22         | 68            | 1  |
| mir-26a        | 69            | 12 | mir-181a        | 65            | 23 |            |               |      | mir-28         | 61            | 0  |
| mir-28         | 60            | 18 | mir-20          | 47            | 41 |            |               |      | mir-292-3p     | 62            | 0  |
| mir-346        | 67            | 6  | mir-206         | 67            | 15 |            |               |      | mir-29a        | 67            | 1  |
| mir-34a        | 65            | 5  | mir-215         | 68            | 11 |            |               |      | mir-337        | 55            | 0  |
| mir-7          | 63            | 1  | mir-223         | 56            | 49 |            |               |      | mir-344        | 63            | 0  |
| mir-96         | 60            | 8  | mir-302         | 63            | 1  |            |               |      | mir-345        | 69            | 1  |
| mir-329        | 60            | 4  | mir-330         | 66            | 59 |            |               |      | mir-34a        | 61            | 0  |
| mir-376b       | 65            | 3  | mir-346         | 59            | 52 |            |               |      | mir-7          | 63            | 1  |
|                |               |    | mir-373         | 66            | 7  |            |               |      |                |               |    |
|                |               |    | mir-96          | 65            | 16 |            |               |      |                |               |    |
|                |               |    | mir-291         | 48            | 17 |            |               |      |                |               |    |
|                |               |    | mir-329         | 68            | 62 |            |               |      |                |               |    |
|                |               |    | mir-380-3p      | 64            | 55 |            |               |      |                |               |    |
|                |               |    | mir-411         | 54            | 47 |            |               |      |                |               |    |

FIG. 15B

| CRL5826 de pulmón |         |    | HTB-57 de pulmón |         |    | Jurkats    |               |    | Linfocitos T primarios |               |    |
|-------------------|---------|----|------------------|---------|----|------------|---------------|----|------------------------|---------------|----|
| miARN             | % de CN | DT | miARN            | % de CN | DT | miARN      | % de cont neg | DT | miARN                  | % de cont neg | DT |
| ambi-mir7100      | 63      | 21 | mir-108          | 79      |    | let-7a     | 21            | 1  | miR-107                | 89            | 15 |
| mir-101           | 70      | 20 | mir-122          | 79      |    | let-7b     | 50            | 5  | miR-134                | 75            | 23 |
| mir-105           | 74      | 11 | mir-124          | 79      |    | miR-101    | 69            | 30 | miR-135                | 88            | 13 |
| mir-124           | 63      | 8  | mir-125a         | 77      | 11 | miR-10b    | 37            | 3  | miR-139                | 87            | 0  |
| mir-125b          | 74      | 11 | mir-126          | 78      | 2  | miR-122    | 67            | 18 | miR-141                | 89            | 1  |
| mir-126           | 61      | 3  | mir-132          | 59      | 7  | miR-133a   | 73            | 18 | miR-145                | 86            | 12 |
| mir-128           | 71      | 13 | mir-133A         | 77      | 7  | miR-17-3p  | 63            | 16 |                        |               |    |
| mir-132           | 73      | 18 | mir-136          | 78      | 13 | miR-29a    | 68            | 7  |                        |               |    |
|                   |         |    |                  |         |    | miR-30a-3p | 66            | 27 |                        |               |    |
| mir-141           | 74      | 5  | mir-147          | 72      | 4  | miR-34a    | 67            | 21 |                        |               |    |
| mir-142           | 67      | 5  | mir-151          | 67      | 10 |            |               |    |                        |               |    |
| mir-147           | 75      | 7  | mir-152          | 73      | 13 |            |               |    |                        |               |    |
| mir-149           | 71      | 9  | mir-16           | 79      | 6  |            |               |    |                        |               |    |
| mir-188           | 67      | 11 | mir-182          | 63      | 9  |            |               |    |                        |               |    |
| mir-223           | 68      | 14 | mir-183          | 72      | 9  |            |               |    |                        |               |    |
| mir-28            | 74      | 19 | mir-186          | 69      | 17 |            |               |    |                        |               |    |
| mir-29a           | 74      | 14 | mir-188          | 67      | 20 |            |               |    |                        |               |    |
| mir-337           | 74      | 17 | mir-28           | 79      | 16 |            |               |    |                        |               |    |
| mir-346           | 72      | 13 | mir-377          | 79      | 3  |            |               |    |                        |               |    |
| mir-96            | 74      | 6  | mir-526b*        | 79      | 0  |            |               |    |                        |               |    |
|                   |         |    | mir-96           | 76      | 10 |            |               |    |                        |               |    |

FIG. 15C

| HeLa<br>de cuello uterino |                     |    | 22 Rv1 de próstata |                     |    | TE354T de piel |                     |    | TE353SK de piel |                     |    |
|---------------------------|---------------------|----|--------------------|---------------------|----|----------------|---------------------|----|-----------------|---------------------|----|
| miARN                     | % de<br>cont<br>neg | DT | miARN              | % de<br>cont<br>neg | DT | miARN          | % de<br>cont<br>neg | DT | miARN           | % de<br>cont<br>neg | DT |
| Let-7a                    | 119                 | 15 | Let-7a             | 124                 | 6  | mir-139        | 117                 | 20 | mir-138         | 126                 | 7  |
| Let-7b                    | 124                 | 12 | Let-7b             | 127                 | 27 | mir-141        | 120                 | 52 | mir-196         | 134                 | 7  |
| Let-7c                    | 114                 | 21 | mir-127            | 127                 | 11 | mir-143        | 122                 | 35 | mir-197         | 135                 | 8  |
| Let-7d                    | 113                 | 29 | mir-154            | 123                 | 10 | mir-145        | 156                 | 71 | mir-198         | 144                 | 4  |
| Let-7g                    | 114                 | 27 | mir-181a           | 124                 | 11 | mir-146        | 143                 | 85 | mir-199         | 135                 | 9  |
| mir-145                   | 111                 | 29 | mir-194            | 132                 | 16 | mir-188        | 117                 | 37 | mir-204         | 125                 | 6  |
| mir-155                   | 114                 | 17 | mir-198            | 126                 | 10 | mir-190        | 131                 | 55 | mir-216         | 136                 | 13 |
| mir-181a                  | 113                 | 21 | mir-199            | 146                 | 16 | mir-198        | 119                 | 3  | mir-410         | 134                 | 7  |
| mir-186                   | 111                 | 29 | mir-201            | 125                 | 24 | mir-204        | 125                 | 8  |                 |                     |    |
| mir-190                   | 114                 | 21 | mir-369            | 130                 | 9  | mir-410        | 133                 | 3  |                 |                     |    |
| mir-191                   | 116                 | 22 | mir-93             | 129                 | 16 | mir-412        | 125                 | 11 |                 |                     |    |
| mir-199                   | 118                 | 14 |                    |                     |    |                |                     |    |                 |                     |    |
| mir-9                     | 112                 | 27 |                    |                     |    |                |                     |    |                 |                     |    |

| Células BJ |                     |       | A549 de cáncer de pulmón |                     |    | Jurkats  |                     |    | Linfocitos T primarios |                     |    |
|------------|---------------------|-------|--------------------------|---------------------|----|----------|---------------------|----|------------------------|---------------------|----|
| miARN      | % de<br>cont<br>neg | DT    | miARN                    | % de<br>cont<br>neg | DT | miARN    | % de<br>cont<br>neg | DT | miARN                  | % de<br>cont<br>neg | DT |
| miR-26a    | 130                 | 17    | mir-25                   | 112                 | 0  | miR-100  | 134                 | 15 | let-7a                 | 151                 | 17 |
| miR-128    | 131                 | 24    | mir-294                  | 112                 | 1  | miR-125b | 132                 | 4  | let-7b                 | 150                 | 14 |
| miR-223    | 134                 | 14    | mir-32                   | 121                 | 0  | miR-126  | 134                 | 19 | let-7c                 | 159                 | 4  |
| miR-188    | 139                 | 19    | mir-92                   | 122                 | 0  | miR-129  | 150                 | 10 | let-7d                 | 142                 | 10 |
| miR-125a   | 140                 | 10    |                          |                     |    | miR-140  | 139                 | 4  | let-7g                 | 141                 | 7  |
| miR-201    | 153                 | 18    |                          |                     |    | miR-143  | 162                 | 2  | miR-10a                | 130                 | 10 |
| miR-291-3p | 155                 | 30    |                          |                     |    | miR-155  | 146                 | 23 | miR-10b                | 127                 | 20 |
| miR-145    | 161                 | 2     |                          |                     |    | miR-15a  | 146                 | 12 | miR-125a               | 131                 | 5  |
| miR-294    | 165                 | 21    |                          |                     |    | miR-23b  | 135                 | 4  | miR-126                | 126                 | 42 |
| miR-150    | 171                 | 7     |                          |                     |    | miR-25   | 154                 | 18 | miR-15a                | 135                 | 11 |
| miR-322    | 212                 | 19,93 |                          |                     |    | miR-26a  | 170                 | 14 | miR-17-3p              | 128                 | 4  |
| miR-295    | 215                 | 40,78 |                          |                     |    |          |                     |    | miR-18                 | 138                 | 2  |
| miR-187    | 246                 | 19    |                          |                     |    |          |                     |    | miR-182                | 126                 | 18 |
| miR-373    | 266                 | 41,39 |                          |                     |    |          |                     |    | miR-19a                | 126                 | 5  |
|            |                     |       |                          |                     |    |          |                     |    | miR-20                 | 130                 | 14 |
|            |                     |       |                          |                     |    |          |                     |    | miR-7                  | 126                 | 1  |

| CRL5826    |         |    | MTB-57  |         |    |
|------------|---------|----|---------|---------|----|
| miARN      | % de CN | DT | miARN   | % de CN | DT |
| mir-130a   | 126     | 27 | mir-135 | 121     | 8  |
| mir-145    | 112     | 8  | mir-216 | 126     | 7  |
| mir-30e-5p | 122     | 11 | mir-293 | 121     | 4  |
| mir-333    | 112     | 35 | mir-338 | 122     | 14 |
| mir-335    | 114     | 33 | mir-341 | 118     | 22 |
| mir-369    | 111     | 8  |         |         |    |
| mir-350    | 111     | 5  |         |         |    |
| mir-412    | 123     | 14 |         |         |    |

FIG. 16

| 22Rv1 de próstata |         |    | TE354T de piel |         |    | MCF12a de mama |         |    | A549 de pulmón |         |    |
|-------------------|---------|----|----------------|---------|----|----------------|---------|----|----------------|---------|----|
| miARN             | % de CN | DT | miARN          | % de CN | DT | miARN          | % de CN | DT | miARN          | % de CN | DT |
| mir-100           | 59      | 26 | mir-210        | 67      | 13 | mir-216        | 92      | 9  | mir-129        | 90      | 5  |
| mir-130a          | 58      | 16 | mir-216        | 53      | 1  | mir-217        | 95      | 14 | mir-326        | 88      | 2  |
| mir-211           | 54      | 7  |                |         |    | mir-294        | 93      | 23 | mir-331        | 92      | 2  |
| mir-212           | 58      | 1  |                |         |    |                |         |    | mir-338        | 91      | 2  |
| mir-213           | 57      | 11 |                |         |    |                |         |    | mir-341        | 89      | 5  |
| mir-215           | 59      | 8  |                |         |    |                |         |    | mir-370        | 91      | 0  |
| mir-224           | 49      | 30 |                |         |    |                |         |    | mir-92         | 88      | 0  |
| mir-292           | 59      | 4  |                |         |    |                |         |    |                |         |    |
| mir-320           | 58      | 6  |                |         |    |                |         |    |                |         |    |
| mir-324           | 55      | 6  |                |         |    |                |         |    |                |         |    |
| mir-325           | 59      | 10 |                |         |    |                |         |    |                |         |    |
| mir-330           | 58      | 28 |                |         |    |                |         |    |                |         |    |
| mir-338           | 55      | 10 |                |         |    |                |         |    |                |         |    |
| mir-369           | 57      | 6  |                |         |    |                |         |    |                |         |    |
| mir-370           | 54      | 16 |                |         |    |                |         |    |                |         |    |
| mir-99a           | 58      | 15 |                |         |    |                |         |    |                |         |    |

**FIG. 17**

| 22Rv1 de próstata |         |    | TE354T de piel |         |    | MCF12a de mama |         |    | A549 de pulmón |         |    |
|-------------------|---------|----|----------------|---------|----|----------------|---------|----|----------------|---------|----|
| miARN             | % de CN | DT | miARN          | % de CN | DT | miARN          | % de CN | DT | miARN          | % de CN | DT |
| mir-10b           | 104     | 27 | Let-7a         | 139     | 9  | let7a          | 180     | 35 | let7a-1        | 116     | 5  |
| mir-152           | 111     | 20 | Let-7b         | 148     | 8  | let7b-1        | 176     | 36 | mir-133a-2     | 126     | 2  |
|                   |         |    | Let-7g         | 133     | 8  | let7c          | 177     | 21 | mir-142        | 112     | 4  |
|                   |         |    | mir-10a        | 135     | 10 | let7d          | 172     | 37 | mir-187        | 110     | 6  |
|                   |         |    | mir-10b        | 140     | 10 | mir-10a        | 178     | 22 | mir-199a-1     | 111     | 4  |
|                   |         |    | mir-133B       | 135     | 8  | mir-10b        | 190     | 18 | mir-208        | 110     | 4  |
|                   |         |    | mir-155        | 138     | 3  | mir-133a       | 182     | 33 | mir-211        | 110     | 6  |
|                   |         |    | mir-15a        | 142     | 12 | mir-152        | 175     | 33 | mir-222        | 111     | 2  |
|                   |         |    | mir-16         | 134     | 8  | mir-153        | 178     | 27 | mir-223        | 112     | 2  |
|                   |         |    | mir-181a       | 138     | 6  | mir-155        | 186     | 24 | mir-23b        | 118     | 6  |
|                   |         |    | mir-182        | 133     | 9  | mir-16         | 174     | 30 | mir-298        | 111     | 1  |
|                   |         |    | mir-193        | 134     | 12 | mir-181a       | 172     | 26 | mir-328        | 115     | 1  |
|                   |         |    | mir-194        | 137     | 28 | mir-183        | 184     | 15 | mir-342        | 118     | 0  |
|                   |         |    | mir-196        | 133     | 6  | mir-184        | 177     | 14 | mir-371        | 122     | 2  |
|                   |         |    | mir-204        | 135     | 9  | mir-186        | 176     | 16 |                |         |    |
|                   |         |    | mir-23a        | 133     | 16 | mir-191        | 174     | 11 |                |         |    |
|                   |         |    | mir-24         | 132     | 11 | mir-200b       | 179     | 8  |                |         |    |
|                   |         |    | mir-25         | 142     | 13 | mir-412        | 174     | 24 |                |         |    |
|                   |         |    | mir-92         | 132     | 11 | mir-9          | 178     | 24 |                |         |    |
|                   |         |    | mir-95         | 137     | 5  |                |         |    |                |         |    |

FIG. 18

| <b>Jurkat</b>                                  |         |         | <b>Linfocitos T primarios</b> |         |         | <b>HeLa</b>        |         |         | <b>A549</b>        |         |         |
|------------------------------------------------|---------|---------|-------------------------------|---------|---------|--------------------|---------|---------|--------------------|---------|---------|
| Viabilidad celular                             |         |         | Viabilidad celular            |         |         | Viabilidad celular |         |         | Viabilidad celular |         |         |
| miARN                                          | % de CN | % de DT | miARN                         | % de CN | % de DT | miARN              | % de CN | % de DT | miARN              | % de CN | % de DT |
| <b>miARN que reduce la viabilidad celular</b>  |         |         |                               |         |         |                    |         |         |                    |         |         |
| let-7a                                         | 21      | 1       | miR-107                       | 89      | 15      | mir-1              | 20      | 2       | mir-193            | 80      | 15      |
| let-7b                                         | 50      | 5       | miR-134                       | 75      | 23      | mir-101            | 12      | 2       | mir-206            | 80      | 7       |
| miR-101                                        | 69      | 30      | miR-135                       | 88      | 13      | mir-124            | 16      | 4       | mir-210            | 86      | 5       |
| miR-108                                        | 75      | 18      | miR-139                       | 87      | 0       | mir-192            | 13      | 3       | mir-292-3p         | 86      | 3       |
| miR-10b                                        | 37      | 3       | miR-141                       | 89      | 1       | mir-193            | 5       | 2       | mir-293            | 83      | 2       |
| miR-122                                        | 67      | 18      | miR-145                       | 86      | 12      | mir-195            | 21      | 7       | mir-299            | 84      | 4       |
| miR-133a                                       | 73      | 18      |                               |         |         | mir-206            | 12      | 6       | mir-329            | 85      | 5       |
| miR-17-3p                                      | 63      | 16      |                               |         |         | mir-208            | 21      | 12      | mir-337            | 81      | 3       |
| miR-19a                                        | 73      | 24      |                               |         |         | mir-210            | 23      | 4       | mir-345            | 75      | 6       |
| miR-29a                                        | 68      | 7       |                               |         |         | mir-297            | 19      | 16      | mir-346            | 78      | 8       |
| miR-30a-3p                                     | 66      | 27      |                               |         |         | mir-299            | 20      | 18      | mir-409            | 86      | 3       |
| miR-34a                                        | 67      | 21      |                               |         |         | mir-337            | 18      | 3       |                    |         |         |
| <b>miARN que aumenta la viabilidad celular</b> |         |         |                               |         |         |                    |         |         |                    |         |         |
| miR-129                                        | 150     | 10      | let-7a                        | 151     | 17      | mir-128            | 128     | 18      |                    |         |         |
| miR-143                                        | 162     | 2       | let-7b                        | 150     | 14      | mir-139            | 133     | 12      |                    |         |         |
| miR-155                                        | 146     | 23      | let-7c                        | 159     | 4       | mir-23a            | 159     | 13      |                    |         |         |
| miR-15a                                        | 146     | 12      | let-7d                        | 142     | 10      | mir-23b            | 155     | 12      |                    |         |         |
| miR-25                                         | 154     | 18      | let-7g                        | 141     | 7       | mir-24             | 132     | 20      |                    |         |         |
| miR-26a                                        | 170     | 14      | miR-10a                       | 130     | 10      | mir-32             | 133     | 20      |                    |         |         |
|                                                |         |         | miR-10b                       | 127     | 20      | mir-331            | 128     | 13      |                    |         |         |
|                                                |         |         | miR-125a                      | 131     | 5       |                    |         |         |                    |         |         |
|                                                |         |         | miR-126                       | 126     | 42      |                    |         |         |                    |         |         |
|                                                |         |         | miR-15a                       | 135     | 11      |                    |         |         |                    |         |         |
|                                                |         |         | miR-17-3p                     | 128     | 4       |                    |         |         |                    |         |         |
|                                                |         |         | miR-18                        | 138     | 2       |                    |         |         |                    |         |         |
|                                                |         |         | miR-182                       | 126     | 18      |                    |         |         |                    |         |         |
|                                                |         |         | miR-19a                       | 126     | 5       |                    |         |         |                    |         |         |
|                                                |         |         | miR-20                        | 130     | 14      |                    |         |         |                    |         |         |

FIG. 19

22Rv1

de próstata

TE354T de piel

Jurkat

HeLa

miARN sintéticos que aumentan la apoptosis

| miARN   | % de CN | DT | miARN   | % de CN | DT | miARN     | % de CN | DT | miARN     | % de CN | DT  |
|---------|---------|----|---------|---------|----|-----------|---------|----|-----------|---------|-----|
| Let-7g  | 164     | 17 | mir-149 | 179     | 22 | let-7b    | 201     | 41 | let-7b    | 369     | 89  |
| mir-1   | 192     | 20 | mir-154 | 252     | 15 | let-7g    | 152     | 19 | let-7g    | 594     | 260 |
| mir-10a | 205     | 15 | mir-195 | 174     | 16 | miR-1     | 170     | 11 | miR-1     | 410     | 65  |
| mir-149 | 169     | 14 | mir-208 | 189     | 18 | miR-10b   | 198     | 24 | miR-10b   | 378     | 28  |
| mir-184 | 166     | 19 | mir-214 | 187     | 14 | miR-122   | 154     | 29 | miR-122   | 303     | 44  |
| mir-186 | 166     | 23 | mir-217 | 177     | 21 | miR-17-3p | 171     | 12 | miR-17-3p | 346     | 68  |
| mir-188 | 197     | 12 | mir-293 | 234     | 19 | miR-19a   | 153     | 6  | miR-19a   | 312     | 7   |
| mir-192 | 182     | 26 | mir-299 | 193     | 12 | miR-28    | 154     | 20 | miR-28    | 347     | 56  |
|         |         |    | mir-328 | 198     | 17 | miR-29a   | 155     | 15 | miR-29a   | 439     | 63  |
|         |         |    | mir-344 | 204     | 8  | miR-32    | 156     | 30 | miR-32    | 473     | 209 |
|         |         |    |         |         |    | miR-34a   | 181     | 39 | miR-34a   | 361     | 82  |

miARN sintéticos que reducen la apoptosis

|            |    |    |            |    |    |          |    |    |            |    |    |
|------------|----|----|------------|----|----|----------|----|----|------------|----|----|
| mir-128    | 54 | 27 | Let-7b     | 56 | 10 | miR-125b | 75 | 2  | miR-32     | 8  | 7  |
| mir-21     | 47 | 23 | mir-100    | 55 | 11 | miR-126  | 66 | 11 | mir-105    | 40 | 9  |
| mir-216    | 48 | 37 | mir-101    | 44 | 9  | miR-143  | 68 | 3  | mir-108    | 39 | 12 |
| mir-223    | 54 | 36 | mir-126    | 38 | 11 | miR-155  | 67 | 22 | mir-126    | 29 | 4  |
| mir-23b    | 46 | 44 | mir-207    | 59 | 8  | miR-23b  | 70 | 14 | mir-137    | 13 | 12 |
| mir-328    | 22 | 29 | mir-25     | 59 | 9  | miR-26a  | 68 | 11 | mir-292-3p | 31 | 4  |
| mir-335    | 40 | 26 | mir-28     | 41 | 7  | miR-98   | 74 | 27 | mir-34a    | 38 | 8  |
| mir-340    | 51 | 11 | mir-29a    | 39 | 8  |          |    |    | mir-96     | 32 | 13 |
| mir-367    | 37 | 34 | mir-30a-3p | 30 | 6  |          |    |    |            |    |    |
| mir-368    | 53 | 36 |            |    |    |          |    |    |            |    |    |
| mir-380-3p | 30 | 42 |            |    |    |          |    |    |            |    |    |
| mir-410    | 50 | 47 |            |    |    |          |    |    |            |    |    |
| mir-341    | 53 | 0  |            |    |    |          |    |    |            |    |    |

FIG. 20

| A549 +/- TRAIL                                                                   |         | A549 +/- etopósido |         | HTB-57 +/- etopósido |         | CRL-5826 +/- etopósido |         | HeLa +/- etopósido |         |
|----------------------------------------------------------------------------------|---------|--------------------|---------|----------------------|---------|------------------------|---------|--------------------|---------|
| miARN que reducen la viabilidad celular en presencia de un producto terapéutico  |         |                    |         |                      |         |                        |         |                    |         |
| miARN                                                                            | % de CN | miARN              | % de CN | miARN                | % de CN | miARN                  | % de CN | miARN              | % de CN |
| mir-101                                                                          | 135     | mir-28             | 319     | mir-126              | 171     | mir-132                | 142     | mir-124            | 162     |
| mir-124                                                                          | 158     | mir-124            | 139     | mir-132              | 201     | mir-182                | 134     | mir-126            | 161     |
| mir-125a                                                                         | 134     | mir-126            | 141     | mir-28               | 176     | mir-28                 | 154     | mir-132            | 170     |
| mir-132                                                                          | 147     | mir-147            | 120     | mir-337              | 217     | mir-292-3p             | 212     | mir-147            | 171     |
| mir-136                                                                          | 178     | mir-216            | 108     | mir-292-3p           | 268     |                        |         | mir-216            | 199     |
| mir-155                                                                          | 181     | mir-292-3p         | 489     | miR-7100             | 227     |                        |         | mir-28             | 169     |
| mir-182                                                                          | 153     | mir-337            | 251     |                      |         |                        |         | mir-292-3p         | 208     |
| mir-186                                                                          | 176     |                    |         |                      |         |                        |         | mir-337            | 285     |
| mir-202                                                                          | 152     |                    |         |                      |         |                        |         |                    |         |
| mir-206                                                                          | 138     |                    |         |                      |         |                        |         |                    |         |
| mir-221                                                                          | 143     |                    |         |                      |         |                        |         |                    |         |
| mir-224                                                                          | 129     |                    |         |                      |         |                        |         |                    |         |
| mir-28                                                                           | 136     |                    |         |                      |         |                        |         |                    |         |
| mir-291                                                                          | 145     |                    |         |                      |         |                        |         |                    |         |
| mir-292-3p                                                                       | 169     |                    |         |                      |         |                        |         |                    |         |
| mir-297                                                                          | 140     |                    |         |                      |         |                        |         |                    |         |
| mir-302                                                                          | 134     |                    |         |                      |         |                        |         |                    |         |
| mir-372                                                                          | 125     |                    |         |                      |         |                        |         |                    |         |
| mir-373                                                                          | 169     |                    |         |                      |         |                        |         |                    |         |
| mir-376b                                                                         | 145     |                    |         |                      |         |                        |         |                    |         |
| miARN que aumentan la viabilidad celular en presencia de un producto terapéutico |         |                    |         |                      |         |                        |         |                    |         |
| mir-125b                                                                         | 83      |                    |         |                      |         |                        |         |                    |         |
| mir-152                                                                          | 73      |                    |         |                      |         |                        |         |                    |         |
| mir-16                                                                           | 90      |                    |         |                      |         |                        |         |                    |         |
| mir-194                                                                          | 78      |                    |         |                      |         |                        |         |                    |         |
| mir-197                                                                          | 82      |                    |         |                      |         |                        |         |                    |         |
| mir-214                                                                          | 82      |                    |         |                      |         |                        |         |                    |         |
| mir-24                                                                           | 87      |                    |         |                      |         |                        |         |                    |         |
| mir-30a-3p                                                                       | 63      |                    |         |                      |         |                        |         |                    |         |
| mir-331                                                                          | 73      |                    |         |                      |         |                        |         |                    |         |

**FIG. 21**

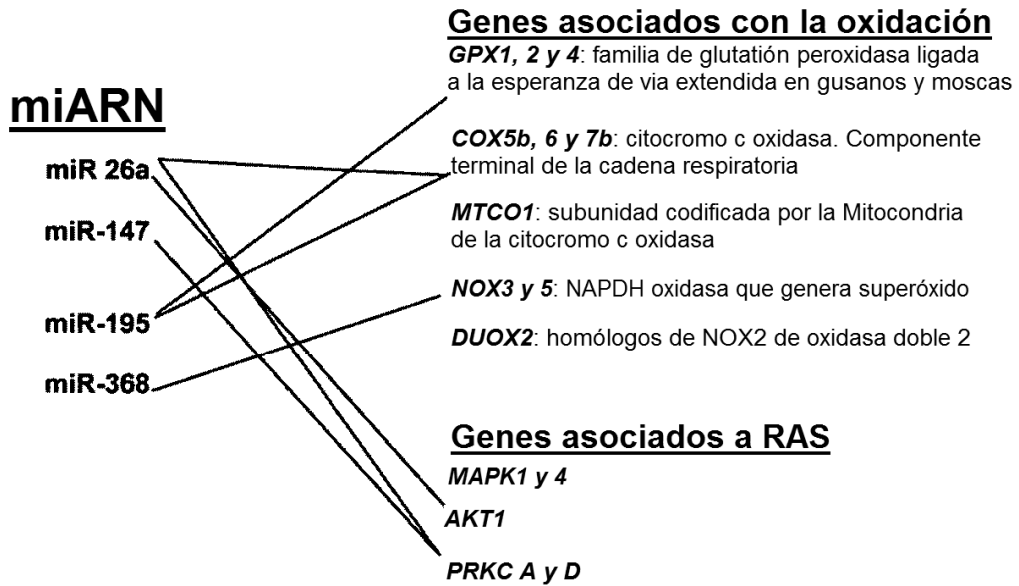
Figura 22. miARN que afectan al ciclo celular

| Células BJ            |                       |                       |                       | HeLa Pre-miR          |                       |                       |                       |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| G1                    |                       | S                     |                       | >2N                   |                       | G2/M                  |                       |
| miARN % de CN % de DT | miARN % de CN % de DT | miARN % de CN % de DT | miARN % de CN % de DT | miARN % de CN % de DT | miARN % de CN % de DT | miARN % de CN % de DT | miARN % de CN % de DT |
| let7a 90 22           | miR128 46 7           | miR128 69 4           | miR125a 50 22         | miR1 171 9            | miR197 163,8 1,7      | miR-122 38,6 7,2      |                       |
| miR1 87 12            | miR142 49 41          | miR146 61 9           | miR128 31 29          | miR-122 171,7 0,3     | miR-205 183,7 0,9     | miR-124 58,4 10,4     |                       |
| miR20 87 15           | miR146 53 27          | miR147 54 12          | miR142 59 38          | miR-124 150,0 0,2     | miR-220 170,9 0,7     | miR-126 55,7 13,5     |                       |
| miR208 70 13          | miR186 60 8           | miR15a 71 20          | miR146 40 45          | miR-126 153,6 0,3     | miR-290 167,2 1,4     | miR-129 68,0 4,9      |                       |
| miR21 57 8            | miR187 60 15          | miR195 62 7           | miR18 49 21           | miR-129 145,1 0,3     | miR-291 200,5 0,9     | miR-137 48,1 13,1     |                       |
| miR28a 82 5           | miR195 54 0           | miR371 56 5           | miR191 56 40          | miR-137 165,9 0,2     | miR-294 164,6 1,1     | miR-147 60,0 4,0      |                       |
| miR290 85 2           | miR297 54 22          |                       | miR201 59 27          | miR-147 150,1 0,4     | miR-295 188,2 0,9     | miR-18 62,5 12,2      |                       |
| miR294 84 17          | miR324-3p 60 13       |                       | miR224 53 17          | miR-337 147,2 0,4     | miR-302 214,6 1,7     | miR-219 64,2 1,9      |                       |
| miR373 76 8           | miR337 54 17          |                       | miR324-3p 46 33       |                       | miR-372 203,3 0,8     | miR-337 66,7 1,0      |                       |
|                       | miR376b 57 17         |                       | miR92 41 20           |                       | miR-411 168,8 0,9     |                       |                       |
|                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| miR125a 120 3         | let7a 117 14          | miR145 145 10         | miR1 171 9            | miR-108 143,9 0,7     | miR-197 163,8 1,7     | miR-1 161,2 1,9       |                       |
| miR128 150 2          | miR15a 112 10         | miR187 140 3          | miR21 205 22          | miR-122 171,7 0,3     | miR-205 183,7 0,9     | miR-192 171,9 4,5     |                       |
| miR142 133 10         | miR16 124 17          | miR20 151 7           | miR337 191 27         | miR-124 150,0 0,2     | miR-220 170,9 0,7     | miR-193 185,3 5,9     |                       |
| miR146 148 5          | miR191 113 21         | miR21 169 4           | miR345 172 10         | miR-126 153,6 0,3     | miR-290 167,2 1,4     | miR-206 187,9 7,1     |                       |
| miR147 126 6          | miR20 116 13          | miR223 131 11         | miR373 174 18         | miR-129 145,1 0,3     | miR-291 200,5 0,9     | miR-215 147,5 2,7     |                       |
| miR195 131 2          | miR224 125 6          | miR26a 138 4          |                       | miR-137 165,9 0,2     | miR-294 164,6 1,1     | miR-220 170,1 3,9     |                       |
| miR201 122 6          | miR26a 113 6          | miR284 135 13         |                       | miR-147 150,1 0,4     | miR-295 188,2 0,9     | miR-329 171,5 1,2     |                       |
| miR297 125 8          | miR290 117 8          | miR373 146 4          |                       | miR-337 147,2 0,4     | miR-302 214,6 1,7     | miR-371 171,6 3,0     |                       |
| miR320 124 2          | miR345 119 32         |                       |                       |                       | miR-372 203,3 0,8     | miR-409 169,7 7,6     |                       |
| miR324-3p 130 4       |                       |                       |                       |                       | miR-411 168,8 0,9     | miR-7a 154,6 4,7      |                       |
| miR325 128 4          |                       |                       |                       |                       |                       | miR-7d 159,1 2,8      |                       |
| miR371 135 2          |                       |                       |                       |                       |                       | miR-7g 160,8 3,0      |                       |
| miR376b 133 2         |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |
| miR409 129 11         |                       |                       |                       |                       |                       |                       |                       |

FIG. 22

| <b>miARN</b>  | <b>secuencia</b>        | <b>Proliferación de A549<br/>(% de CN)</b> | <b>Proliferación de Jurkats<br/>(% de CN)</b> |
|---------------|-------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| <b>let-7a</b> | ugagguaguagguuguauaguu  | <b>119</b>                                 | <b>21</b>                                     |
| <b>let-7b</b> | ugagguaguagguugugugguu  | <b>124</b>                                 | <b>50</b>                                     |
| <b>let-7c</b> | ugagguaguagguuguauugguu | <b>114</b>                                 | <b>85</b>                                     |
| <b>let-7d</b> | agagguaguagguugcauagu   | <b>113</b>                                 | <b>97</b>                                     |
| <b>let-7g</b> | ugagguaguaguuuguacagu   | <b>114</b>                                 | <b>105</b>                                    |

**FIG. 23**



**FIG. 24**