(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 503 743**

(51) Int. CI.:

C12N 15/11 (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 10183543 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014 EP 2314688**

(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:
07.10.2014

(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

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

Campo de la invención

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

Descripción de la técnica relacionada

En 2001, varios grupos utilizaron 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 cientos de miARN en plantas y animales –incluyendo seres humanos- en los que no parece haber ARNsi endógenos. Por lo tanto, aunque son similares a los ARNsi, no obstante los miARN son distintos.

Los miARN observados tienen una longitud de aproximadamente 21-22 nucleótidos y provienen de precursores más largos, que ese transcriben a partir de genes que no codifican proteínas. Véase la revisión de Carrington y col. (2003). Las formas precursoras forman estructuras que se pliegan unas sobre otras; son procesadas por la nucleasa Dicer en los animales o DCL1 en las plantas. Las moléculas de miARN interrumpen la traducción por medio del emparejamiento de bases preciso o impreciso con sus dianas.

Unos miARN parece que están implicados en la regulación genética. Algunos miARN, que incluyen lin-4 y let-7 inhiben la síntesis proteica uniéndose a regiones 3' sin traducir (3' UTR) complementarias de los ARNm diana. Otros, incluyendo el miARN Scarecrow que se encuentra en plantas, funcionan como el ARNsi y se unen a secuencias de ARNm perfectamente complementarias para destruir la transcripción diana (Grishok *y col.,* 2001).

La investigación en microARN se incrementa según los científicos están empezando a apreciar el amplio papel que estas moléculas tienen en la regulación de la expresión genética en eucariotas. Los dos miARN mejor conocidos, lin-4 y let-7, regulan el tiempo de desarrollo en C. elegans regulando la traducción de una familia de miARN clave (revisado en Pasquinelli, 2002). Se han identificado varios cientos de miARN en C. elegans, Drosophila, ratón y seres humanos. Como sería de esperar en moléculas que regulan la expresión genética, los niveles de miARN muestran una variación entre tejidos y estadios de desarrollo. Además, un estudio muestra una fuerte correlación entre la expresión reducida de dos miARN y la leucemia linfocítica crónica, proporcionando un posible enlace entre los miARN y el cáncer (Calin, 2002). Aunque el campo aún es joven, hay una especulación sobre que los miARN podrían ser factores de transcripción importantes en la regulación de la expresión genética en eucariotas superiores.

Hay unos pocos ejemplos de que los miARN tienen papeles críticos en la diferenciación celular, el desarrollo temprano, y los procesos celulares tales como apoptosis y metabolismo de las grasas. Tanto lin-4 como let-7 regulan el paso de un estado larvario a otro durante el desarrollo de C. elegans (Ambros, 2003). El mir-15 y bantam son los miARN de Drosophila que regulan la muerte celular, aparentemente regulando la expresión de los genes implicados en la apoptosis (Brennecke *y col.,* 2003, Xu *y col.,* 2003). El miR14 también se ha implicado en el metabolismo graso (Xu y col., 2003). El Lsy-6 y miR-273 son miARN de C. elegans que regulan la asimetría en las neuronas quimiosensoriales (Chang y col., 2004). Otro miARN animal que regula la diferenciación celular es el miR-181, que dirige la diferenciación de células hematopoyéticas (Chen y col., 2004). Estas moléculas representan el intervalo total de miARN animales con funciones conocidas. Además, el documento WO 03/029459 desvela el miARN miR-126. La mejora del entendimiento de las funciones de los miARN sin duda revelará sistemas reguladores que contribuyen al desarrollo normal, diferenciación, comunicaciones inter e intra celulares, ciclo celular, angiogénesis, apoptosis, y muchos otros procesos celulares. Debido a sus importantes papeles en muchas funciones biológicas, es probable que los miARN ofrezcan puntos importantes para la intervención terapéutica o el análisis diagnóstico.

Caracterizar las funciones de biomoléculas como los miARN a menudo implica la introducción de las moléculas en las células o retirar las moléculas de las células y medir el resultado. Si se introduce un miARN en una célula y se produce apoptosis, entonces el miARN indudablemente participa en una ruta apoptótica. Los procedimientos para introducir y retirar miARN de las células se han descrito. Dos publicaciones recientes describen moléculas antisentido que se pueden utilizar 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 y que producen miARN específicos cuando son transfectados en las células (Zeng y col., 2002). Estos dos grupos de reactivos se han utilizado para evaluar miARN sencillos.

Una limitación del sistema de expresión de miARN basado en plásmidos es que la eficacia de transfección de los plásmidos tiende a ser muy baja, con solo aproximadamente un 50% de células que expresan el ARN del plásmido en las células que son fáciles de transfectar. La eficacia de transfección para los plásmidos en células primarias son mucho más bajas con poco más del 10% de las células típicamente que expresan el ARN deseado. Por lo tanto, existe una necesidad para composiciones alternativas y procedimientos para introducir moléculas de miARN en células de forma que se puedan caracterizar y estudiar.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico miARN sintético que comprende una secuencia con al menos un 80% de identidad de secuencia con la secuencia del miR-126 humano maduro para su uso en una terapia de un cáncer. También se proporciona un ácido nucleico miARN sintético de doble cadena de 17-30 nucleótidos de longitud que comprende un polinucleótido que tiene una secuencia con al menos un 80% de identidad de secuencia con una secuencia de miR-126 maduro que comprende los nucleótidos 52-72 de las SEC ID Nº 86, y un segundo polinucleótido separado cuya secuencia de 5' a 3' es complementaria entre un 60% y el 100% para su uso como un medicamento.

La siguiente descripción detallada se refiere a la presente invención en la medida del alcance de las reivindicaciones.

El término "miARN" se utiliza de acuerdo con su significado habitual y simple y se refiere a una molécula de microARN que se encuentra en las eucariotas que está implicada en la regulación genética basada en ARN. Véase, por ejemplo Carrington y col., 2003, que se incorpora en el presente documento por referencia. Generalmente, el término se utilizará para referirse a la molécula de ARN de cadena sencilla procesada a partir de un precursor. Se han identificado miARN individuales y se han secuenciado en distintos organismos, y se les ha dado nombres. Los nombres de los miARN y sus secuencias se proporcionan en el presente documento.

La presente invención se refiere, en algunas realizaciones de la invención, a moléculas cortas de ácido nucleico que funcionan como miARN o como inhibidores de miARN en una célula. El término "corto" se refiere a una longitud de un nucleótido simple que tenga 150 nucleótidos o poco más. Las moléculas de ácido nucleico son sintéticas. El término "sintético" significa que la molécula de ácido nucleico es aislada y no es idéntica a la secuencia (la secuencia entera) y/o estructura química de una molécula de ácido nucleico de origen natural, tal como una molécula precursora de miARN endógeno. Aunque en algunas realizaciones, los ácidos nucleicos de la invención no tienen una secuencia *entera* que es idéntica a una secuencia de un ácido nucleico de origen naturalm, tales moléculas pueden englobar todo o una parte de la secuencia de origen natural. Se contempla, sin embargo, que un ácido nucleico que se administra a una célula puede modificarse o alterarse posteriormente en la célula tal que su estructura o secuencia es la misma que el ácido nucleico no sintético o de origen natural, tal como una secuencia de miARN maduro. Por ejemplo, un ácido nucleico sintético puede tener una secuencia que se diferencia de la secuencia de un precursor de miARN, pero que se puede modificar la secuencia una vez en una célula para que sea la misma que un miARN procesado, endógeno. El término "aislado" significa que las moléculas de ácido nucleico de la invención se separan inicialmente de moléculas de ácido nucleico distintas (en términos de secuencia o estructura) y no deseadas tal que una población de ácidos nucleicos aislados es al menos homogénea en aproximadamente un 90%, y puede ser al menos aproximadamente homogénea en un 95, 96, 97, 98, 99 o el 100% con respecto a otras moléculas de polinucleótido. En muchas realizaciones de la invención, un ácido nucleico se aísla gracias a que se sintetiza *in vitro* separado de los ácidos nucleicos endógenos de la célula. Se entenderá, sin embargo, que los ácidos nucleicos aislados pueden mezclarse o agruparse juntos posteriormente.

Por supuesto, se entiende que un "ácido nucleico sintético" de la invención quiere decir que el ácido nucleico no tiene la estructura química o la 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 funciona en una célula o bajo condiciones fisiológicas como un miARN de origen natural.

Se entenderá que la expresión "de origen naturalm" se refiere a algo que se encuentra en un organismo sin ninguna intervención de una persona; podría referirse a una molécula de origen natural de tipo silvestre o mutante. En algunas realizaciones, una molécula de miARN sintético no tiene la misma secuencia que la molécula del miARN de origen natural. En otras realizaciones, una molécula de miARN sintético puede tener la misma secuencia que una molécula de miARN de origen natural, pero la estructura química de la molécula, particularmente la parte que no se relaciona específicamente con la secuencia que se precisa (estructura química de la no secuencia) es diferente 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 de secuencia y de la no secuencia que no se encuentra en un miARN de origen natural. Además, la secuencia de las moléculas sintéticas identificará cuál miARN se ha proporcionado o inhibido eficazmente; el miARN endógeno se designará como "miARN correspondiente". Las secuencias del miARN correspondiente incluyen, pero sin limitarse a estas, las secuencias de las SEC ID N^{os} 1-593. Además, los ácidos nucleicos sintéticos pueden incluir las SEC ID N^{os} 594-703 así como cualquier otra secuencia de miARN, secuencia de miARN precursor, o cualquier secuencia complementaria de los mismos. En algunas realizaciones, la secuencia es o se deriva de una secuencia de sonda identificada en el apéndice que se dirige contra el miARN particular (o grupo de miARN) que se puede utilizar con esa secuencia de sonda.

El miARN sintético de la invención es un ARN o análogo de ARN en algunas realizaciones de la invención. Los inhibidores del miARN pueden ser ADN, ARN, o análogos de los mismos. A los miARN e inhibidores de miARN se les designa colectivamente como “ácidos nucleicos sintéticos”.

En algunas realizaciones, hay un miARN sintético que tiene una longitud de entre 17 y 125 restos. La presente invención afecta a moléculas de miARN sintéticas que son, son al menos, o son como mucho 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 que se derive de éste.

En ciertas realizaciones, el miARN sintético tiene a) una “región de miARN” cuya secuencia de 5’ a 3’ es idéntica a una secuencia de un miARN maduro, y b) una “región complementaria” cuya secuencia de 5’ a 3’ es entre un 60% y el 100% complementaria a la secuencia del miARN. En ciertas realizaciones, este miARN sintético también está aislado, como se ha definido anteriormente. La expresión “región de miARN” se refiere a una región del miARN sintético que es idéntica al menos en un 80% a la secuencia entera de una secuencia de miARN maduro de origen natural. En ciertas realizaciones, la región de miARN es o al menos es idéntica en un 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 el 100% a la secuencia de miARN de origen natural.

La expresión “región complementaria” se refiere a una región de un miARN sintético que es al menos complementaria en un 60% de la secuencia de miARN maduro de origen natural de la que es idéntica la región activa del miARN. La región complementaria es al menos complementaria en un 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 el 100%, o cualquier intervalo derivado de éste. En las secuencias de polinucleótido sencillas, hay una estructura de bucle en horquilla como resultado del enlace químico entre la región miARN y la región complementaria. En otras realizaciones, la región complementaria está en una molécula de ácido nucleico diferente que la de la región miARN, en cuyo caso la región complementaria está en la cadena complementaria y la región miARN está en la cadena activa.

En algunas realizaciones de la invención, un miARN sintético contiene uno o más elementos de diseño. Estos elementos de diseño incluyen, pero no se limitan a estos: i) un grupo de sustitución 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 los últimos 1 a 6 restos de la región complementaria; o, iii) sin 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 miARN.

En ciertas realizaciones, un miARN tiene un nucleótido en su extremo 5’ de la región complementaria en el que el grupo fosfato y/o hidroxilo se ha sustituido con otro grupo químico (a lo que se denomina como “diseño de sustitución”). En algunos casos, el grupo fosfato se sustituye, mientras que en otros, se sustituye el grupo hidroxilo. En realizaciones particulares, el grupo sustituyente es biotina, un grupo amino, un grupo alquilamino inferior, un grupo acetilo, 2’ O-Me (2’ oxígeno-metilo), DMTO (4,4’-dimetoxitritil con oxígeno), fluoresceína, un tiol, o acridina, aunque son bien conocidos otros grupos sustituyentes por los expertos en la técnica que se pueden utilizar también. Estos elementos de diseño también se pueden utilizar con un inhibidor de miARN.

Realizaciones adicionales se refieren a un miARN sintético que tiene una o más modificaciones del azúcar en los primeros o los últimos 1 a 6 restos de la región complementaria (a las que se denominan “diseños de sustitución de azúcar”). En ciertos casos, hay una o más modificaciones de azúcar en los primeros 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más restos de la región complementaria, o cualquier intervalo que se derive de éste. En casos adicionales hay una o más modificaciones de azúcar en los últimos 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más restos de la región complementaria, o cualquier intervalo que se derive de éste. tienen una modificación del azúcar. Se entenderá que los términos “primeros” y “últimos” son con respecto al orden de restos desde el extremo 5’ al extremo 3’ de la región. En realizaciones particulares, la modificación del azúcar es una modificación 2’O-Me. En más realizaciones, hay una o más modificaciones de azúcar 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. El elemento de diseño también se puede utilizar con un inhibidor de miARN. Por tanto, un inhibidor de miARN puede tener este elemento de diseño y/o grupo de sustitución en el nucleótido del extremo 5’, como se ha tratado anteriormente.

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

Se contempla que el miARN sintético de la invención tiene uno o más diseños de sustitución, modificación de azúcar o sin complementariedad. En ciertos casos, las moléculas de ARN sintético tienen dos de ellos, mientras que en otros estas moléculas tienen a su vez los tres diseños.

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

Cuando la molécula de ARN está en un único polinucleótido, hay una región enlazadora entre la región miARN y la región complementaria. En algunas realizaciones, el único polinucleótido es capaz de formar una estructura de bucle en horquilla como resultado del enlace entre la región miARN y la región complementaria. La enlazadora constituye el bucle en horquilla. Se contempla que en algunas realizaciones, la región enlazadora es, al menos es, o es como mucho 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 que derive de éste. En ciertas realizaciones, la enlazadora tiene entre 3 y 30 restos (incluidos) de longitud.

Además de tener una región miARN y una región complementaria, puede haber secuencias flanqueantes también en los extremos 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 que derive de éste, flanqueando uno o ambos lados de estar regiones.

Los ácidos nucleicos sintéticos tratados anteriormente y aquí se pueden utilizar en procedimientos de la invención. Así, en ciertas realizaciones, los procedimientos implican ácidos nucleicos sintéticos con diferentes diseños en ellos.

Las características de las células que se pueden evaluar no están limitadas. Incluyen las siguientes características y características asociadas con las siguientes: proliferación celular, índice mitótico, ciclo celular, apoptosis, motilidad, adhesión, transducción de la señal, localización proteica, expresión genética, localización del ARN, división celular, replicación de ADN, modificación post-traduccional, diferenciación, des-diferenciación, activación transcripcional, activación proteica, angiogénesis, metabolismo (producción y/o consumo de energía), degradación proteica, condensación cromatínica, 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 proteica total reducida) o en especies individuales en la célula (por ejemplo, inducción de proteína(s) específica(s)).

Se contempla que este procedimiento se puede aplicar con respecto a una variedad de diferentes miARN sintéticos y/o no sintéticos en células separadas o en la misma célula. En algunos casos, se pueden introducir el siguiente número de miARN sintéticos en diferentes células: 2, 3, o más. La invención no está limitada por un tipo celular. Se contempla que cualquier célula que exprese miARN o cualquier célula que tiene una característica alterada por un miARN son tratable por los procedimientos y composiciones de la invención. Se puede combinar el uso de dos o más miARN en una composición farmacéutica única como un cóctel o se puede proporcionar para su uso en cualquier procedimiento terapéutico, diagnóstico o pronóstico de la invención. En algunas realizaciones de la invención, los procedimientos incluyen el ensayo de la presencia del miARN en la célula que ha sido presentado eficazmente por una molécula de miARN sintético o inhibido por un inhibidor de miARN. En consecuencia, en algunas realizaciones, los procedimientos incluyen una etapa de generación de un perfil de miARN en una muestra. La expresión "perfil de miARN" se refiere a un grupo 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 utilizando una matriz de miARN. En algunas realizaciones de la invención, se genera por etapas un perfil de miARN que incluyen: a) marcar el miARN en la muestra; b) hibridar el miARN con una matriz miARN; y c) determinar la hibridación de miARN a la matriz, en la que se genera un perfil de miARN. Véase la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. 60/575.743 y la Solicitud de Patente Provisional de EE. UU. 60/649.584, y la Solicitud de Patente de EE. UU. Serie Nº 11/141.707.

Adicionalmente, una célula a la que se introduce un miARN sintético o un miARN inhibidor puede evaluarse o ensayarse posteriormente para hallar la cantidad de miARN endógeno o exógeno o inhibidor de miARN. Se contempla cualquier tipo celular para su uso en 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 de síntesis u obtención de la molécula de ARN sintético.

En realizaciones adicionales, el ácido nucleico sintético se introduce en las células por transfección de fosfato de calcio, transfección lipídica, electroporación, microinyección, o inyección. Los ácidos nucleicos sintéticos pueden administrarse a un sujeto o pacientes utilizando modos de administración que se conocen bien por los expertos en la técnica, particularmente para aplicaciones terapéuticas. Se contempla particularmente que un paciente es un ser humano o cualquier otro mamífero o animal que tiene miARN.

Los procedimientos incluyen identificar una célula o un paciente que tiene la necesidad de inducir esas características celulares. También se entenderá que un cantidad de ácido nucleico sintético que se proporciona a una célula u organismo es una "cantidad eficaz·, lo que se refiere a una cantidad que se necesita para conseguir un objetivo deseado, tal que induzca característica(s) celular(es) particular(es).

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

La presente invención también se refiere a la utilización de composiciones de miARN que implican el miR-126 para su uso en el tratamiento del cáncer. También se contemplan uno o más miARN humanos seleccionados de entre el grupo compuesto por 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-130, miR130a, miR-133, miR-142, miR-143, miR-144, miR-145, miR-147, miR-181a, miR-182, miR-183, miR-188, miR-189, miR-192, miR-194, miR-195, miR-199a, miR-200b, miR-201, miR-205, miR-219, miR-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 se pueden utilizar 1, 2, 3, o más miARN para estas realizaciones. El cáncer incluye, pero no se limita a estos, cánceres malignos, tumores, cánceres metastáticos, cánceres inoperables, cánceres resistentes a quimioterapia y/o radiación, y cánceres terminales.

Adicionalmente, se puede utilizar un miARN correspondiente con mirR-126 para inhibir la proliferación celular. Se contempla que estos miARN se pueden utilizar independientemente de la fuente de la célula en la que no se desea la proliferación. Se entenderá que se emplean notaciones abreviadas tal que una descripción genérica de un miARN se refiere a cualquier miembro de su familia de genes (distinguido por un número), a menos de que se indique otra cosa. Se entiende por los expertos en la técnica que una “familia de genes” se refiere a un grupo de genes que tienen la misma secuencia codificante miARN. Típicamente, los miembros de una familia de genes se identifican por un número seguido de la designación inicial. Por ejemplo, miR-16-1 y miR-16-2 son miembros de la familia miR-16 y “miR-7” se refiere a miR-7-1, miR-7-2 y miR-7-3. Además, a menos de que se indique otra cosa, una notación abreviada se refiere a los miARN relacionados (distinguidos por una letra). Así, “let-7”, por ejemplo, se refiere a let7-a-2, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f-1, y let-7f-2. Las excepciones a estas notaciones abreviadas se identificarán de otra manera.

En realizaciones particulares, también se contempla un uso para el tratamiento del cáncer de pulmón. Los procedimientos implican introducir o proporcionar a una célula de cáncer de pulmón una cantidad eficaz de uno o más miARN correspondientes con miR-126.

La presente invención se refiere a un ácido nucleico miARN sintético para su uso en el tratamiento del cáncer de próstata o la disminución de la proliferación de las células del cáncer de próstata introduciendo o proporcionando a la célula una cantidad eficaz de uno o más miARN que corresponden con miR-126. La presente invención se refiere a un ácido nucleico miARN sintético para su uso en el tratamiento de un cáncer de piel o el descenso de la proliferación celular de las células de cáncer de piel introduciendo o proporcionando a la célula una cantidad eficaz de una molécula de miARN sintético que corresponde con una secuencia de miARN. En ciertas realizaciones, los procedimientos implican proporcionar una cantidad eficaz de al menos uno o más miARN correspondiente a miR-126. La presente invención se refiere a un ácido nucleico miARN sintético para su uso en el tratamiento de la leucemia o el descenso de la proliferación celular de los linfocitos T cancerosos introduciendo o proporcionando a la célula una cantidad eficaz de una molécula de miARN sintético que se corresponde con miR-126.

En ciertos experimentos, se utiliza en los procedimientos y composiciones de la invención un miARN sintético en el que ambas cadenas en sentido y antisentido se derivan de un único miARN precursor. 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 correspondiente “3P” indica que deriva del extremo 3’ del precursor, como se describe en internet en sanger.ac.uk/cgi-bin/rfam/mirna. Además, en algunas realizaciones, se evaluó un miARN que no se corresponde con un miARN humano conocido. Se contempla que estos miARN no humanos se pueden utilizar en realizaciones de la invención o que puede existir un miARN que es homólogo del miARN no humano.

Los procedimientos que se refieren a la viabilidad celular y la proliferación celular se pueden utilizar generalmente para tratamientos, diagnósticos, creación de líneas celulares con propiedades interesantes de investigación, y la inducción de diferenciación. Los miARN que reducen selectivamente la proliferación de las células cancerosas se pueden emplear como terapia puesto que se pueden suministrar a células cancerosas y no cancerosas de igual manera pero solo afectarán al crecimiento de las cancerosas. Además, los ácidos nucleicos sintéticos pueden detener o prevenir la metástasis o reducir el número de metástasis.

Además, se contempla particularmente que una molécula de ácido nucleico capaz de 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 por administración. En realizaciones particulares, hay un beneficio terapéutico conferido a la materia biológica, donde un “beneficio terapéutico” se refiere a una mejoría en una o más afecciones o síntomas asociados con una enfermedad o afección o una mejoría del pronóstico, duración o estado con respecto a la enfermedad. Se contempla que un beneficio terapéutico incluye, pero no se limita a estos, disminución del dolor, un descenso de la morbilidad, un descenso de un síntoma. Por ejemplo, con respecto al cáncer, se contempla que un beneficio terapéutico en el cáncer puede ser la inhibición del crecimiento tumoral, prevención de metástasis, reducción del número de metástasis, inhibición de la proliferación celular cancerosa, inducción de muerte celular en células cancerosas, inhibición de angiogénesis cerca de células

cancerosas, inducción de apoptosis en las células cancerosas, reducción del dolor, reducción del riesgo de recurrencia, inducción de quimio o radiosensibilidad en las células cancerosas, prolongación de la vida, y/o retraso de la muerte directa o indirectamente relacionada con el cáncer.

Además, se contempla que las composiciones de miARN se pueden proporcionar para su uso como parte de una terapia para un paciente, en conjunción con terapias tradicionales o agentes preventivos. Además, se contempla que cualquier procedimiento tratado en el contexto de la terapia se puede aplicar preventivamente, particularmente en un paciente identificado como que potencialmente necesita la terapia o en riesgo de la afección o la enfermedad para la que necesita terapia.

Las terapias del cáncer también incluyen una variedad de combinación de terapias con tratamientos tanto químicos como basados en radiación. La combinación de quimioterapias incluyen pero no están limitadas a estas, por ejemplo, bevacizumab, cisplatino (CDDP), carboplatino, inhibidores de EGFR (gefitinib y cetuximab), procarbazina, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, inhibidores de COX-2 (por ejemplo, celecoxib) ifosfamida, melfalán, clorambucilo, busulfán, nitrosurea, dactinomicina, daunorrubicina, doxorrubicina (adriamicina), bleomicina, plicomicina, mitomicina, etopósido (VP16), tamoxifeno, raloxifeno, receptor estrogénico agentes de unión, taxol, taxotere, gemcitabien, navelbine, inhibidores de farnesil-proteína transferasa, transplatino, 5-fluorouracilo, vincristina, vinblastina y metotrexato, o cualquier análogo o variante derivado de los anteriores.

Generalmente, se pueden dar inhibidores de los miARN para conseguir el efecto contrario en comparación con cuando se dan las correspondientes moléculas de ácido nucleico miARN maduro. De manera similar, se pueden dar las moléculas correspondientes de ácido nucleico miARN maduro para conseguir el efecto contrario en comparación con cuando se dan los inhibidores de miARN. Por ejemplo, se pueden proporcionar a las células moléculas de miARN que aumentan la proliferación celular para aumentar la proliferación o se pueden proporcionar inhibidores de tales moléculas para disminuir la proliferación celular. A lo largo de esta solicitud, el término “aproximadamente” se utiliza para indicar que un valor incluye la desviación estándar del error para el dispositivo o procedimiento que se emplea para determinar el valor.

El uso de la palabra “un” o “una” cuando se utiliza en conjunción con el término “que comprende” en las reivindicaciones y/o la especificación puede significar “uno”, pero también es consistente con el significado de “uno o más”, “al menos uno”, y “uno o más de uno”.

Breve descripción de los dibujos

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

FIG. 1 Visión en conjunto de la expresión y activación de miARN. Los miARN se transcriben como parte de moléculas de ARN más largas que pueden tener hasta cien nucleótidos (Lee, 2002). Los ARN se procesan en el núcleo en ARN en horquilla de 70-100 nucleótidos por la ribonucleasa Drosha específica de ARNds (Lee, 2003) (FIG. 1). Los ARN en horquilla se transportan al citoplasma y se digieren por una segunda ribonucleasa específica de doble cadena llamada Dicer. Los miARN resultantes de 19-23meros se unen a un complejo que es similar o idéntico al Complejo de Silenciamiento Inducido por ARN (RISC) que participa en la interferencia de ARN (Hutvagner, 2002). En el complejo de unión, el miARN de cadena sencilla se une a ARNm con secuencias que son significativamente, aunque no completamente, complementarias al miARN. Por un mecanismo que no se comprende del todo, pero que no implica degradación del ARNm, el ARNm unido no se traduce, dando como resultado la expresión reducida del gen correspondiente.

FIG. 2. Procedimientos para introducir los miARN en las células. Hay tres procedimientos básicos para introducir miARN en las células. En el primero, un ADN que tiene un promotor corriente arriba de una secuencia que codifica un miARN se introduce en las células donde se transcribe para producir una molécula de ARN que incluye el miARN maduro. El procesamiento y la captación por el complejo proteico para la regulación genética inducida por miARN dan como resultado la activación del miARN. Este procedimiento padece de introducción ineficaz de la construcción de ADN en las células. En el segundo procedimiento, una molécula de ARNds similar ARNsi, que tiene una de las cadenas idénticas al miARN activo se introduce en las células donde es captada por el complejo proteico para la activación del miARN. Este procedimiento proporciona un suministro eficaz, pero a menudo la captación de molécula de ARN complementaria accidental. El tercer procedimiento, descrito en el presente documento, implica la modificación de la cadena complementaria de forma que favorezca la captación y activación de la cadena activa de la construcción de miARN sintético.

FIG. 3. Captación preferencial de cadenas activas en los 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 ARNsi mencionados anteriormente. La co-transfección de miARN sintéticos y vectores indicadores seguida por un ensayo de luciferasa 24 horas post-transfección reveló los miARN activados tras la transfección.

FIG. 4. Actividad de miARN sintético para varios miARN. Se prepararon miARN con ARNsi y diseño Pre-miR (5’ amina) y se transfectaron en células HeLa con una concentración final de 3 y 10 nM. Los miARN sintéticos se

co-transfectaron con vectores indicadores que llevaban sitios diana para los miARN maduros. La expresión del indicador luciferasa en las células transfectadas se midió veinticuatro horas tras la transfección y se expresó en la figura como la expresión del indicador con respecto a las células co-transfectadas con miARN sintéticos controles negativos.

FIG. 5. Actividad de miARN sintético a través de tipos celulares y contra dianas naturales. Se ensayaron los miARN sintéticos para comprobar la activación apropiada de la cadena y la especificidad del tipo celular para asegurar que el diseño era robusto. Se co-transfectaron cuatro tipos celulares diferentes con el miARN y la cadena complementaria y activa asociada. El panel A muestra que distintos tipos celulares responden igual a los miARN sintéticos. Se transfectaron entonces cuatro miARN diferentes en varios tipos celulares y se midieron los niveles de expresión de dianas naturales de los miARN Panel B).

FIG. 6. Esquema de la selección con bibliotecas de miARN sintéticos o inhibidores de miARN. Los miARN sintéticos o los inhibidores de miARN se distribuyeron en los pocillos de una placa microtiter. Se añadieron el reactivo de transfección y luego las células en cada pocillo. A cierto tiempo post-transfección, se evaluó el fenotipo de las muestras. Los miARN que inducen un cambio que es significativo con respecto a un control negativo se seleccionan para estudios posteriores.

FIG. 7. Selección de miARN que afectan la proliferación celular. En placas de 96 pocillos, se transfectaron inversamente 8.000 células HeLa con inhibidores de miARN (5 pmoles) por triplicado utilizando siPORT Neo-FX Ambion. A las 72 horas post-transfección, se fijaron las células con paraformaldehído al 4 %, se permeabilizaron con TritonX 100 al 0,1 % y se tiñeron con yoduro de propidio para ver el número total de células. Las placas se escanearon, utilizando el Explorer Acumen TTP LabTech, los cambios de morfología en las células inhibidos por miR-31. Se transfectaron las células HeLa con anti-mir31 y se fijaron y se tiñeron las células con anticuerpo anti-beta activa y DAPI para visualizar los cambios en la morfología en respuesta a la inhibición de la función del micro-ARN mir-31.

FIG. 8. Selección de miARN que afectan la proliferación en células A549. La selección de miARN implicados en la viabilidad celular en células A549. En placas de 96 pocillos se transfectaron inversamente 8.000 células A549 con inhibidores de miARN (5 pmoles) por triplicado utilizando siPORT Neo-FX. A las 72 horas post-transfección se tripsinizaron las células y se contaron utilizando el instrumento de recuento celular Guava. El número de células se representó en el gráfico y se normalizó con un inhibidor de huecos. En esta figura, “mir1d” refiere a mir-1-2.

FIG. 9. Selección de miARN que afectan a la apoptosis en células HeLa. Efectos de los inhibidores de la actividad de la caspasa en HeLa. En placas de 96 pocillos, se transfectaron inversamente 8.000 células con inhibidores de miARN (5 pmoles) por triplicado utilizando Ambion siPORT Neo-FX. A las 72 horas post-transfección se analizaron las células utilizando el ensayo de actividad de la caspasa y se normalizaron basándose en el ensayo de actividad de la esterasa. En esta figura, “mir1d” se refiere a mir-1-2.

FIG. 10. Expresión de miARN en pacientes con cáncer de pulmón y de colon. Se compararon los perfiles de expresión de miARN de los tejidos tumorales frente a normales adyacentes para pacientes con cáncer de pulmón y de colon. Los miARN se proporcionan en filas; los pacientes se presentan en columnas. El verde en el mapa caliente muestra los miARN que están regulados negativamente en la muestra tumoral con respecto a la muestra de tejido normal adyacente, y el rojo muestra los miARN que están regulados positivamente en la muestra tumoral frente a la muestra de tejido normal adyacente.

FIG. 11. Validación de los resultados de expresión de la matriz de miARN en pacientes con cáncer de pulmón. Se analizaron las muestras de ARN total de dos pacientes con cáncer de pulmón para hallar la expresión de miR-16, miR-21, miR-143, miR-145, y let-7 utilizando el análisis de Northern. Los gráficos muestran la relativa abundancia de cada miARN (relación de tumor: TNA) a partir del análisis de la matriz y el análisis de la cámara fosforescente de Northern.

FIG.12. Algunos miARN se expresan diferencialmente en múltiples tipos de cáncer. Se utilizó el análisis de matriz de miARN que compara los tejidos tumorales y normales adyacentes de los pacientes con varios tipos de cáncer para identificar los miARN que se expresaban diferencialmente en el cáncer. Se calculó el porcentaje de pacientes que mostraban regulación positiva o negativa de un determinado miARN para cada tipo de cáncer. Se representan los ocho que se expresaban diferencialmente más a menudo a través de los tipos de muestra.

FIG. 13. Se muestran los miARN que tienen cambios en la expresión mayores de 1,5 veces, entre ambos infectados frente a no infectados y sensibles frente a no sensibles. A la derecha hay un agrupamiento de los resultados de 2 matrices de cada modelo.

FIG. 14. miARN expresados diferencialmente en 3 ratones pre-condicionados respecto a ratones no tratados.

FIG. 15A-C. miARN sintéticos que disminuyen la proliferación celular. A. Se evaluaron las células BT549 y MCF 12 A (mama), HeLa (cuello uterino) y 22 Rv1 (próstata) en cuanto a su proliferación celular. **B.** Se

examinaron las células TE354T y TE353SK (piel), BJ (piel), y A549 (pulmón) en cuanto a su proliferación celular. **C.** Se evaluaron CRL5826 y HTB-57 (pulmón), Jurkat (linfocitos T), y linfocitos T primarios en cuanto a su proliferación celular.

FIG. 16. miARN sintéticos que aumentan la proliferación celular. Se evaluaron las células HeLa (cuello uterino), 22 Rv1 (próstata), TE354T y TE353SK (piel), BJ (piel), A549 (pulmón), Jurkat (linfocito T), linfocitos T primarios, CRL5826 y HTB-57 (pulmón) en cuanto a su proliferación celular.

FIG. 17. Inhibidores de miARN que reducen la proliferación celular. Se evaluaron las células 22 Rv1 (próstata), TE354T (piel), MCF12a (mama), y A549 (pulmón) en cuanto a su proliferación celular.

FIG. 18. Inhibidores de miARN que aumentan la proliferación celular. Las células 22 Rv1 (próstata), TE354T (piel), MCF12a (mama), y A549 (pulmón) se evaluaron en cuanto a su proliferación celular.

FIG. 19. miARN que afectan la viabilidad celular. Se evaluaron los linfocitos Jurkat (linfocito T), linfocitos T primarios, HeLa (cuello uterino) y A549 (pulmón) en cuanto a su proliferación celular.

FIG. 20. miARN que afectan a la apoptosis. Se evaluaron 22 Rv1 (próstata), TE354T (piel), Jurkat (linfocito T), y HeLa (cuello uterino) en cuanto a su proliferación celular.

FIG. 21. miARN que afectan la viabilidad celular en presencia de un agente terapéutico. Las células A549 (pulmón) se evaluaron en cuanto a su aumento y descenso de la viabilidad celular en presencia y ausencia de TRAIL o etopósido. Las células HTB-57 y CRL5826 (pulmón) y HeLa (cuello uterino) se evaluaron en cuanto a su viabilidad celular en ausencia y presencia de etopósido.

FIG. 22. miARN que afectan al ciclo celular. Se evaluaron las células BJ (piel) y HeLa (cuello uterino) en cuanto a aumentos y descensos en el número de células en ciertas fases del ciclo celular (G1, S, G2/M, replicación de ADN).

FIG. 23. Fenotipos de miARN con secuencias similares. Comparación de las secuencias relacionadas y sus efectos sobre la proliferación celular.

FIG. 24. Genes asociados con la regulación de hTert y secuencias de miARN previstas que modulan su expresión.

Descripción de las realizaciones ilustrativas

La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos relativos a la preparación y caracterización de miARN, así como al uso de miARN para aplicaciones terapéuticas, pronósticas y diagnósticas. Para superar el problema con los sistemas previos ineficaces basados en plásmidos para introducir el miARN dentro de las células, los inventores desarrollaron ARN pequeños, parcialmente bicatenarios que se pueden suministrar con alta eficacia en células tanto inmortalizadas como primarias. Los ARN pequeños tienen las mismas actividades funcionales que los miARN expresados endógenamente. Debido a que los ARN pequeños se pueden suministrar a las células con una eficacia mucho más alta que con 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 las células.

Los inventores también han creado una biblioteca de moléculas de ARN pequeñas, bicatenarias que se pueden utilizar para introducir los miARN en las células, así como una biblioteca de moléculas antisentido que inhiben las actividades de miARN conocidos que están presentes en las células. Estas bibliotecas se han utilizado para regular positiva o negativamente secuencialmente uno o más miARN en las células para identificar los miARN que son críticos para los procesos celulares como el ciclo celular, apoptosis, diferenciación, viabilidad, angiogénesis, metabolismo, y otros procesos con potencial terapéutico. Los miARN que regulan la expresión de genes importantes como p53, MYC, y RAS se han identificado y caracterizado también para ubicar más los miARN que pueden proporcionar puntos importantes de intervención para tratar enfermedades. Por ejemplo se ha demostrado que let-7 está implicado con RAS. Véase, Johnson y col, 2005. Estos procesos de modulación seriada de las actividades de miARN y el ensayo de fenotipos celulares se denominan colectivamente como selección funcional de miARN.

I. Moléculas de miARN

Las moléculas de microARN (“miARN”) tienen una longitud de 21 a 22 nucleótidos, aunque se han informado longitudes de 17 y hasta 25 nucleótidos. Cada miARN se procesa a partir de una molécula de ARN precursor más largo (“precursor de miARN”). El precursor de miARN se transcribe a partir de genes no codificadores de proteínas. Los precursores de miARN tienen dos regiones de complementariedad que les capacitan para formar una estructura tipo vástago-lazo o plegamiento hacia atrás, que es escindida por una enzima que se denomina Dicer en los animales. Dicer es una nucleasa tipo ribonucleasa III. El miARN procesado típicamente es una parte del vástago.

El miARN procesado (también denominado “miARN maduro”) forma parte de un gran complejo para regular negativamente un gen diana particular. Ejemplos de miARN animales incluyen los que se emparejan imperfectamente con las bases de la diana, lo que detiene la traducción (Olsen y col., 1999; Seggerson y col., 2002).

Las moléculas de ARNsi también las procesa la Dicer, pero a partir de una molécula de ARN larga, bicatenaria. Los ARNsi no se encuentran naturalmente en las células animales, pero pueden funcionar en tales células en un complejo silenciador inducido por ARN (RISC) para dirigir la escisión específica de secuencia de un ARNm diana (Denli y col, 2003).

El estudio de moléculas endógenas de miARN se ha descrito, por ejemplo, en la Solicitud de Patente de EE. UU. 60/575.743.

miARN sintéticos

Los miARN aparentemente son activos en la célula cuando el ARN maduro de una cadena se une a un complejo proteico que regula la traducción de ARNm que se hibrida con el miARN. La introducción de moléculas exógenas de ARN que afecten a las células de la misma manera que los miARN expresados endógenamente necesita que una molécula de ARN de una cadena con la misma secuencia que el miARN maduro endógeno pueda captarse por el complejo proteico que facilita el control traduccional. Se han evaluado una variedad de diseños de moléculas de ARN. Se han identificado tres diseños generales que maximizan la captación del miARN de cadena única 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, llamada cadena complementaria, es al menos parcialmente complementaria a la cadena activa. La cadena activa y la complementaria se hibridan para crear un ARN de doble cadena, llamado miARN sintético, que es similar al precursor de miARN de origen natural que se une al complejo proteico inmediatamente antes de la activación de miARN en la célula. Para maximizar la actividad del miARN sintético se necesita maximizar la captación de la cadena activa y minimizar la captación de la cadena complementaria por el complejo proteico de miARN que regula la expresión genética a nivel de la traducción. Los diseños moleculares que proporcionan la actividad de miARN óptima implican modificaciones de la cadena complementaria.

Dos diseños incorporan modificaciones químicas en la cadena complementaria. La primera modificación implica la creación de un ARN complementario con un grupo químico distinto de fosfato o hidroxilo en su extremo 5'. La presencia de la modificación en 5' aparentemente elimina la captación de la cadena complementaria y en consecuencia, favorece la captación de la cadena activa por el complejo proteico de miARN. La modificación en 5' puede ser cualquiera de una variedad de moléculas que incluyen NH_2, $NHCOCH_3$, biotina y otras.

La segunda estrategia de modificación química que reduce significativamente la captación de la cadena complementaria por la ruta de miARN es incorporando nucleótidos con modificaciones del azúcar en los primeros 2-6 nucleótidos de la cadena complementaria. Se debería señalar que las modificaciones del azúcar que corresponden con la segunda estrategia de diseño se pueden compaginar con las modificaciones en el extremo 5' que corresponden con la primera estrategia de diseño para mejorar más las actividades del miARN sintético.

El tercer diseño de miARN sintético implica la incorporación de nucleótidos en el extremo 3' de la cadena complementaria que no es complementaria con la cadena activa. Los híbridos de los ARN activo y complementario 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 de los ARNsi indican que la estabilidad del híbrido 5' es un indicador clave de la captación de ARN por el complejo proteico que soporta la interferencia de ARN, la cual se relaciona al menos con la ruta de miARN en las células. Los inventores han descubierto que el uso cabal de la falta de coincidencia en la cadena de ARN complementaria mejora significativamente la actividad del miARN sintético.

A. Ácidos nucleicos

Se describen moléculas de ácido nucleico que puede introducir o inhibir los miARN en células cultivadas. Los ácidos nucleicos pueden haberse producido en células o *in vitro* por enzimas purificadas aunque preferencialmente se producen por síntesis química. Pueden estar en bruto o purificadas. El término "miARN", a menos de que se indique otra cosa, se refiere al ARN procesado después de que se ha escindido de su precursor. La tabla 1 indica qué SEC ID Nº se corresponde con la secuencia de un precursor de miARN particular y qué secuencias con la SEC ID Nº se corresponde con la secuencia madura. El nombre de miARN a menudo está abreviado y se designa sin prefijo y se entenderá como tal dependiendo del contexto. A menos de que se indique otra cosa, los miARN a los que se refiere la solicitud son secuencias humanas identificadas como mir-X o let-X, donde X es un número y/o una letra.

Tabla 1

Secuencias miARN Humano		
Nombre de miARN	**Precursor**	**Secuencia Procesada Respecto al Precursor**
hsa-mir-1-2	SEC ID Nº 1	53-73
hsa-mir-1-1	SEC ID Nº 2	46-66
hsa-let-7a-1	SEC ID Nº 3	6-27
hsa-let-7a-2	SEC ID Nº 4	5-26
hsa-let-7a-3	SEC ID Nº 5	4-25
hsa-let-7b	SEC ID Nº 6	6-27
hsa-let-7c	SEC ID Nº 7	11-32
hsa-let-7d	SEC ID Nº 8	8-28
hsa-let-7e	SEC ID Nº 9	8-28
hsa-let-7f-1	SEC ID Nº 10	7-28
hsa-let-7f-2	SEC ID Nº 11	8-29
hsa-mir-7-1	SEC ID Nº 12	24-44
hsa-mir-7-2	SEC ID Nº 13	32-52
hsa-mir-7-3	SEC ID Nº 14	31-51
hsa-let-7g	SEC ID Nº 15	5-25
hsa-let-7i	SEC ID Nº 16	6-24
hsa-mir-9-1	SEC ID Nº 17	16-38 y/o 56-76
hsa-mir-9-2	SEC ID Nº 18	16-38 y/o 54-74
hsa-mir-9-3	SEC ID Nº 19	16-38 y/o 56-76
hsa-mir-10a	SEC ID Nº 20	22-44
hsa-mir-10b	SEC ID Nº 21	27-48
hsa-mir-15a	SEC ID Nº 22	14-35
hsa-mir-15b	SEC ID Nº 23	20-41
hsa-mir-16-1	SEC ID Nº 24	14-35
hsa-mir-16-2	SEC ID Nº 25	10-31
hsa-mir-17	SEC ID Nº 26	14-37 y/o 51-70
hsa-mir-18	SEC ID Nº 27	6-27
hsa-mir-19a	SEC ID Nº 28	49-71
hsa-mir-19b-1	SEC ID Nº 29	54-76
hsa-mir-19b-2	SEC ID Nº 30	62-84
hsa-mir-20	SEC ID Nº 31	8-29
hsa-mir-21	SEC ID Nº 32	8-29
has-mir-22	SEC ID Nº 33	53-74
hsa-mir-23a	SEC ID Nº 34	45-65
hsa-mir-23b	SEC ID Nº 35	58-80
hsa-mir-24-1	SEC ID Nº 36	6-28 y/o 44-65

(Continuación)

Secuencias miARN Humano		
Nombre de miARN	**Precursor**	**Secuencia Procesada Respecto al Precursor**
hsa-mir-24-2	SEC ID Nº 37	50-71
hsa-mir-25	SEC ID Nº 38	52-73
hsa-mir-26a-1	SEC ID Nº 39	10-31
hsa-mir-26b	SEC ID Nº 40	12-32
hsa-mir-26a-2	SEC ID Nº 41	14-35
hsa-mir-27a	SEC ID Nº 42	51-72
hsa-mir-27b	SEC ID Nº 43	61-80
hsa-mir-28	SEC ID Nº 44	14-35
hsa-mir-29a	SEC ID Nº 45	41-62
hsa-mir-29b-1	SEC ID Nº 46	51-70
hsa-mir-29b-2	SEC ID Nº 47	52-71
hsa-mir-29c	SEC ID Nº 48	54-75
hsa-mir-30a	SEC ID Nº 49	47-68
hsa-mir-30c-2	SEC ID Nº 50	7-29
hsa-mir-30d	SEC ID Nº 51	6-27
hsa-mir-30b	SEC ID Nº 52	17-37
hsa-mir-30c-1	SEC ID Nº 53	17-39
hsa-mir-30e	SEC ID Nº 54	2-21
hsa-mir-31	SEC ID Nº 55	9-29
hsa-mir-32	SEC ID Nº 56	6-26
hsa-mir-33	SEC ID Nº 57	6-24
hsa-mir-34a	SEC ID Nº 58	22-43
hsa-mir-34b	SEC ID Nº 59	14-35
hsa-mir-34c	SEC ID Nº 60	13-34
hsa-mir-92-1	SEC ID Nº 61	48-69
hsa-mir-92-2	SEC ID Nº 62	48-69
hsa-mir-93	SEC ID Nº 63	12-33
hsa-mir-95	SEC ID Nº 64	49-70
hsa-mir-96	SEC ID Nº 65	9-30
hsa-mir-98	SEC ID Nº 66	2-23
hsa-mir-99a	SEC ID Nº 67	13-34
hsa-mir-99b	SEC ID Nº 68	7-28
hsa-mir-100	SEC ID Nº 69	13-34
hsa-mir-101-1	SEC ID Nº 70	47-68

(Continuación)

Secuencias miARN Humano		
Nombre de miARN	**Precursor**	**Secuencia Procesada Respecto al Precursor**
hsa-mir-101-2	SEC ID Nº 71	49-70
hsa-mir-103-2	SEC ID Nº 72	48-70
hsa-mir-103-1	SEC ID Nº 73	48-70
hsa-mir-105-1	SEC ID Nº 74	13-32
hsa-mir-105-2	SEC ID Nº 75	13-32
hsa-mir-106a	SEC ID Nº 76	13-36
hsa-mir-106b	SEC ID Nº 77	12-32
hsa-mir-107	SEC ID Nº 78	50-72
hsa-mir-122a	SEC ID Nº 79	15-37
hsa-mir-124a-1	SEC ID Nº 80	52-73
hsa-mir-124a-2	SEC ID Nº 81	61-82
hsa-mir-124a-3	SEC ID Nº 82	52-73
hsa-mir-125b-1	SEC ID Nº 83	15-36
hsa-mir-125a	SEC ID Nº 84	15-37
hsa-mir-125b-2	SEC ID Nº 85	17-38
hsa-mir-126	SEC ID Nº 86	15-35 y/o 52-72
hsa-mir-127	SEC ID Nº 87	57-78
hsa-mir-128a	SEC ID Nº 88	50-71
hsa-mir-128b	SEC ID Nº 89	52-73
hsa-mir-129-2	SEC ID Nº 90	15-35
hsa-mir-130a	SEC ID Nº 91	55-74
hsa-mir-130b	SEC ID Nº 92	51-72
hsa-mir-132	SEC ID Nº 93	59-80
hsa-mir-133a-1	SEC ID Nº 94	54-75
hsa-mir-133a-2	SEC ID Nº 95	60-81
hsa-mir-133b	SEC ID Nº 96	67-87
hsa-mir-134	SEC ID Nº 97	8-28
hsa-mir-135a-1	SEC ID Nº 98	17-39
hsa-mir-135a-2	SEC ID Nº 99	23-45
hsa-mir-135b	SEC ID Nº 100	16-37
hsa-mir-136	SEC ID Nº 101	15-37
hsa-mir-137	SEC ID Nº 102	60-81
hsa-mir-138-2	SEC ID Nº 103	10-26
hsa-mir-138-1	SEC ID Nº 104	23-39
hsa-mir-139	SEC ID Nº 105	7-24

(Continuación)

Secuencias miARN Humano		
Nombre de miARN	**Precursor**	**Secuencia Procesada Respecto al Precursor**
hsa-mir-140	SEC ID Nº 106	24-44
hsa-mir-141	SEC ID Nº 107	60-80
hsa-mir-142	SEC ID Nº 108	16-35 y/o 52-74
hsa-mir-143	SEC ID Nº 109	61-82
hsa-mir-144	SEC ID Nº 110	52-73
hsa-mir-145	SEC ID Nº 111	16-39
hsa-mir-146	SEC ID Nº 112	21-42
hsa-mir-147	SEC ID Nº 113	47-66
hsa-mir-148a	SEC ID Nº 114	44-65
hsa-mir-148b	SEC ID Nº 115	63-84
hsa-mir-149	SEC ID Nº 116	15-36
hsa-mir-150	SEC ID Nº 117	16-37
hsa-mir-151	SEC ID Nº 118	46-67
hsa-mir-152	SEC ID Nº 119	54-74
hsa-mir-153-1	SEC ID Nº 120	54-73
hsa-mir-153-2	SEC ID Nº 121	53-72
hsa-mir-154	SEC ID Nº 122	15-36
hsa-mir-155	SEC ID Nº 123	4-25
hsa-mir-181a	SEC ID Nº 124	39-61
hsa-mir-181b-1	SEC ID Nº 125	36-59
hsa-mir-181c	SEC ID Nº 126	27-48
hsa-mir-181b-2	SEC ID Nº 127	16-39
hsa-mir-182	SEC ID Nº 128	23-44 y/o 67-87
hsa-mir-183	SEC ID Nº 129	27-49
hsa-mir-184	SEC ID Nº 130	53-74
hsa-mir-185	SEC ID Nº 131	15-32
hsa-mir-186	SEC ID Nº 132	15-37
hsa-mir-187	SEC ID Nº 133	71-91
hsa-mir-188	SEC ID Nº 134	15-36
hsa-mir-190	SEC ID Nº 135	15-36
hsa-mir-191	SEC ID Nº 136	16-37
hsa-mir-192	SEC ID Nº 137	24-44
hsa-mir-193	SEC ID Nº 138	55-75
hsa-mir-194-1	SEC ID Nº 139	15-36
hsa-mir-194-2	SEC ID Nº 140	15-36

(Continuación)

Secuencias miARN Humano		
Nombre de miARN	**Precursor**	**Secuencia Procesada Respecto al Precursor**
hsa-mir-195	SEC ID Nº 141	15-35
hsa-mir-196-1	SEC ID Nº 142	7-27
hsa-mir-196-2	SEC ID Nº 143	25-45
hsa-mir-197	SEC ID Nº 144	48-69
hsa-mir-198	SEC ID Nº 145	6-24
hsa-mir-199a-1	SEC ID Nº 146	6-28 y/o 46-67
hsa-mir-199a-2	SEC ID Nº 147	31-53 y/o 69-90
hsa-mir-199b	SEC ID Nº 148	26-48
hsa-mir-200b	SEC ID Nº 149	54-77
hsa-mir-200c	SEC ID Nº 150	45-66
hsa-mir-200a	SEC ID Nº 151	54-75
hsa-mir-203	SEC ID Nº 152	65-86
hsa-mir-204	SEC ID Nº 153	33-54
hsa-mir-205	SEC ID Nº 154	34-55
hsa-mir-206	SEC ID Nº 155	53-74
hsa-mir-208	SEC ID Nº 156	44-65
hsa-mir-210	SEC ID Nº 157	66-86
hsa-mir-211	SEC ID Nº 158	26-47
hsa-mir-212	SEC ID Nº 159	71-91
hsa-mir-213	SEC ID Nº 160	24-46 y/o 64-85
hsa-mir-214	SEC ID Nº 161	71-91
hsa-mir-215	SEC ID Nº 162	27-47
hsa-mir-216	SEC ID Nº 163	19-39
hsa-mir-217	SEC ID Nº 164	35-58
hsa-mir-218-1	SEC ID Nº 165	25-45
hsa-mir-218-2	SEC ID Nº 166	25-45
hsa-mir-219-1	SEC ID Nº 167	21-41
hsa-mir-219-2	SEC ID Nº 168	19-39
hsa-mir-220	SEC ID Nº 169	23-43
hsa-mir-221	SEC ID Nº 170	65-87
hsa-mir-222	SEC ID Nº 171	69-92
hsa-mir-223	SEC ID Nº 172	68-88
hsa-mir-224	SEC ID Nº 173	8-30
hsa-mir-296	SEC ID Nº 174	14-34
hsa-mir-299	SEC ID Nº 175	7-28

(Continuación)

Secuencias miARN Humano		
Nombre de miARN	**Precursor**	**Secuencia Procesada Respecto al Precursor**
hsa-mir-301	SEC ID Nº 176	51-73
hsa-mir-302	SEC ID Nº 177	44-66
hsa-mir-320	SEC ID Nº 178	48-70
hsa-mir-321	SEC ID Nº 179	10-30
hsa-mir-323	SEC ID Nº 180	50-71
hsa-mir-324	SEC ID Nº 181	16-38 y/o 51-72
hsa-mir-326	SEC ID Nº 182	60-79
hsa-mir-328	SEC ID Nº 183	48-69
hsa-mir-330	SEC ID Nº 184	57-79
hsa-mir-331	SEC ID Nº 185	61-81
hsa-mir-335	SEC ID Nº 186	16-38
hsa-mir-337	SEC ID Nº 187	56-78
hsa-mir-338	SEC ID Nº 188	42-64
hsa-mir-339	SEC ID Nº 189	15-35
hsa-mir-340	SEC ID Nº 190	58-80
hsa-mir-342	SEC ID Nº 191	61-84
hsa-mir-345	SEC ID Nº 573	17-37
hsa-mir-346	SEC ID Nº 574	4-26
hsa-mir-367	SEC ID Nº 575	44-65
hsa-mir-368	SEC ID Nº 576	44-65
hsa-mir-369	SEC ID Nº 577	44-64
hsa-mir-370	SEC ID Nº 578	48-68
hsa-mir-371	SEC ID Nº 579	44-64
hsa-mir-372	SEC ID Nº 580	42-64
hsa-mir-373	SEC ID Nº 581	44-66
hsa-mir-374	SEC ID Nº 582	12-33
hsa-mir-375	SEC ID Nº 677	40-61
hsa-mir-376a	SEC ID Nº 678	44-64
hsa-mir-377	SEC ID Nº 679	45-66
hsa-mir-378	SEC ID Nº 680	5-26 y 44-65
hsa-mir-379	SEC ID Nº 681	6-24
hsa-mir-380	SEC ID Nº 682	5-26 y 40-61
hsa-mir-381	SEC ID Nº 683	49-70
hsa-mir-382	SEC ID Nº 684	11-32
hsa-mir-383	SEC ID Nº 685	7-28

(Continuación)

Secuencias miARN Humano		
Nombre de miARN	**Precursor**	**Secuencia Procesada Respecto al Precursor**
hsa-mir-384	SEC ID Nº 686	57-76
hsa-mir-422a	SEC ID Nº 687	11-32
hsa-mir-423	SEC ID Nº 688	53-74
hsa-mir-424	SEC ID Nº 689	11-32
hsa-mir-425	SEC ID Nº 690	55-75
hsa-mir-448	SEC ID Nº 691	71-92
hsa-mir-429	SEC ID Nº 692	51-72
hsa-mir-449	SEC ID Nº 693	16-37
hsa-mir-450-1	SEC ID Nº 694	17-38
hsa-mir-450-2	SEC ID Nº 704	22-43
hsa-mir-451	SEC ID Nº 705	17-39
hsa-mir-452	SEC ID Nº 706	17-38
hsa-mir-453	SEC ID Nº 707	43-64
hsa-mir-455	SEC ID Nº 708	16-37
hsa-mir-483	SEC ID Nº 709	48-70
hsa-mir-484	SEC ID Nº 710	2-23
hsa-mir-485	SEC ID Nº 711	9-30
hsa-mir-486	SEC ID Nº 712	4-25
hsa-mir-487	SEC ID Nº 713	49-70
hsa-mir-488	SEC ID Nº 714	14-34
hsa-mir-489	SEC ID Nº 715	51-73
hsa-mir-490	SEC ID Nº 716	76-97
hsa-mir-491	SEC ID Nº 717	16-38
hsa-mir-492	SEC ID Nº 718	30-52
hsa-mir-493	SEC ID Nº 719	16-37
hsa-mir-494	SEC ID Nº 720	48-71
hsa-mir-495	SEC ID Nº 721	50-72
hsa-mir-496	SEC ID Nº 722	61-77
hsa-mir-497	SEC ID Nº 723	24-44
hsa-mir-498	SEC ID Nº 724	34-56
hsa-mir-499	SEC ID Nº 725	33-55
hsa-mir-500	SEC ID Nº 726	52-73
hsa-mir-501	SEC ID Nº 727	14-35
hsa-mir-502	SEC ID Nº 728	1-21
hsa-mir-503	SEC ID Nº 729	6-28

(Continuación)

Secuencias miARN Humano		
Nombre de miARN	**Precursor**	**Secuencia Procesada Respecto al Precursor**
hsa-mir-504	SEC ID Nº 730	13-33
hsa-mir-505	SEC ID Nº 731	52-73
hsa-mir-506	SEC ID Nº 732	71-91
hsa-mir-507	SEC ID Nº 733	56-76
hsa-mir-508	SEC ID Nº 734	61-83
hsa-mir-509	SEC ID Nº 735	55-77
hsa-mir-510	SEC ID Nº 736	10-32
hsa-mir-511-1	SEC ID Nº 737	16-36
hsa-mir-511-2	SEC ID Nº 738	16-36
hsa-mir-512-1	SEC ID Nº 739	14-36
hsa-mir-512-2	SEC ID Nº 740	20-42
hsa-mir-513-1	SEC ID Nº 741	37-58
hsa-mir-513-2	SEC ID Nº 742	36-57
hsa-mir-514-1	SEC ID Nº 743	39-58
hsa-mir-514-2	SEC ID Nº 744	39-58
hsa-mir-514-3	SEC ID Nº 745	39-58
hsa-mir-515-1	SEC ID Nº 746	14-37
hsa-mir-515-2	SEC ID Nº 747	14-37
hsa-mir-516-1	SEC ID Nº 748	61-78
hsa-mir-516-2	SEC ID Nº 749	61-78
hsa-mir-516-3	SEC ID Nº 750	15-37
hsa-mir-516-4	SEC ID Nº 751	15-37
hsa-mir-517a	SEC ID Nº 752	15-36
hsa-mir-517b	SEC ID Nº 753	6-27
hsa-mir-517c	SEC ID Nº 754	20-41
hsa-mir-518a-1	SEC ID Nº 755	14-34
hsa-mir-518a-2	SEC ID Nº 756	15-34
hsa-mir-518b	SEC ID Nº 757	51-72
hsa-mir-518c	SEC ID Nº 758	24-46
hsa-mir-518d	SEC ID Nº 759	16-36
hsa-mir-518e	SEC ID Nº 760	54-75
hsa-mir-518f	SEC ID Nº 761	16-38
hsa-mir-519a-1	SEC ID Nº 762	15-38
hsa-mir-519a-2	SEC ID Nº 763	54-78
hsa-mir-519b	SEC ID Nº 764	13-36

(Continuación)

Secuencias miARN Humano		
Nombre de miARN	**Precursor**	**Secuencia Procesada Respecto al Precursor**
hsa-mir-519c	SEC ID Nº 765	16-39
hsa-mir-519d	SEC ID Nº 766	54-76
hsa-mir-519e	SEC ID Nº 767	14-35
hsa-mir-520a	SEC ID Nº 768	15-35
hsa-mir-520b	SEC ID Nº 769	41-61
hsa-mir-520c	SEC ID Nº 770	16-36
hsa-mir-520d	SEC ID Nº 771	15-37
hsa-mir-520e	SEC ID Nº 772	54-74
hsa-mir-520f	SEC ID Nº 773	55-76
hsa-mir-520g	SEC ID Nº 774	55-78
hsa-mir-520h	SEC ID Nº 775	55-76
hsa-mir-521-1	SEC ID Nº 776	54-75
hsa-mir-521-2	SEC ID Nº 777	54-75
hsa-mir-522	SEC ID Nº 778	16-39
hsa-mir-523	SEC ID Nº 779	16-39
hsa-mir-524	SEC ID Nº 780	16-37
hsa-mir-525	SEC ID Nº 781	15-35
hsa-mir-526a-1	SEC ID Nº 782	15-35
hsa-mir-526a-2	SEC ID Nº 783	7-27
hsa-mir-526b	SEC ID Nº 784	14-37
hsa-mir-527	SEC ID Nº 785	14-34
ambi-mir-7100	SEC ID Nº 803	
mir-526b*	SEC ID Nº 804	
mir-520a*	SEC ID Nº 805	

Tabla 2

Secuencias de miARN de ratón		
Nombre de miARN	**Precursor**	**Secuencia Procesada Respecto al Precursor**
mmu-mir-1-1	SEC ID Nº 192	49-69
mmu-mir-1-2	SEC ID Nº 193	47-67
mmu-let-7g	SEC ID Nº 194	7-27
mmu-let-7i	SEC ID Nº 195	6-24
mmu-let-7d	SEC ID Nº 196	16-36 + 70-91
mmu-let-7a-1	SEC ID Nº 197	13-34
mmu-let-7a-2	SEC ID Nº 198	17-38

(Continuación)

Secuencias de miARN de ratón		
Nombre de miARN	**Precursor**	**Secuencia Procesada Respecto al Precursor**
mmu-let-7b	SEC ID Nº 199	7-28
mmu-let-7c-1	SEC ID Nº 200	16-37
mmu-let-7c-2	SEC ID Nº 201	14-35
mmu-let-7e	SEC ID Nº 202	15-35
mmu-let-7f-1	SEC ID Nº 203	8-29
mmu-let-7f-2	SEC ID Nº 204	8-29
mmu-mir-7-1	SEC ID Nº 205	24-44
mmu-mir-7-2	SEC ID Nº 206	19-39
mmu-mir-7b	SEC ID Nº 207	30-50
mmu-mir-9-2	SEC ID Nº 208	8-30 y/o 46-66
mmu-mir-9-1	SEC ID Nº 209	16-38 y/o 56-76
mmu-mir-9-3	SEC ID Nº 210	16-38 y/o 56-76
mmu-mir-10b	SEC ID Nº 211	7-28
mmu-mir-10a-1	SEC ID Nº 212	22-44
mmu-mir-10a-2	SEC ID Nº 213	22-44
mmu-mir-15b	SEC ID Nº 214	4-25
mmu-mir-15a	SEC ID Nº 215	15-36
mmu-mir-16-1	SEC ID Nº 216	16-37
mmu-mir-16-2	SEC ID Nº 217	17-38
mmu-mir-17	SEC ID Nº 218	14-37 y/o 51-70
mmu-mir-18	SEC ID Nº 219	17-38
mmu-mir-19b-2	SEC ID Nº 220	54-76
mmu-mir-19a	SEC ID Nº 221	49-71
mmu-mir-19b-1	SEC ID Nº 222	54-76
mmu-mir-20	SEC ID Nº 223	27-49
mmu-mir-21	SEC ID Nº 224	18-39
mmu-mir-22	SEC ID Nº 225	57-78
mmu-mir-23b	SEC ID Nº 226	46-68
mmu-mir-23a	SEC ID Nº 227	46-66
mmu-mir-24-1	SEC ID Nº 228	6-28 y/o 44-65
mmu-mir-24-2	SEC ID Nº 229	61-82
mmu-mir-25	SEC ID Nº 230	52-73
mmu-mir-26a-1	SEC ID Nº 231	16-37
mmu-mir-26b	SEC ID Nº 232	15-36

(Continuación)

Secuencias de miARN de ratón		
Nombre de miARN	**Precursor**	**Secuencia Procesada Respecto al Precursor**
mmu-mir-26a-2	SEC ID Nº 233	14-35
mmu-mir-27b	SEC ID Nº 234	49-68
mmu-mir-27a	SEC ID Nº 235	56-76
mmu-mir-28	SEC ID Nº 236	14-35
mmu-mir-29b-1	SEC ID Nº 237	47-68
mmu-mir-29a	SEC ID Nº 238	53-74
mmu-mir-29c	SEC ID Nº 239	54-75
mmu-mir-29b-2	SEC ID Nº 240	52-73
mmu-mir-30a	SEC ID Nº 241	47-68
mmu-mir-30b	SEC ID Nº 242	2-22
mmu-mir-30e	SEC ID Nº 243	2-21
mmu-mir-30c-1	SEC ID Nº 244	17-39
mmu-mir-30c-2	SEC ID Nº 245	14-36
mmu-mir-30d	SEC ID Nº 246	12-33
mmu-mir-31	SEC ID Nº 247	28-49
mmu-mir-32	SEC ID Nº 248	6-26
mmu-mir-33	SEC ID Nº 249	6-24
mmu-mir-34c	SEC ID Nº 250	13-35
mmu-mir-34b	SEC ID Nº 251	13-35
mmu-mir-34a	SEC ID Nº 252	20-42
mmu-mir-92-2	SEC ID Nº 253	55-75
mmu-mir-92-1	SEC ID Nº 254	50-70
mmu-mir-93	SEC ID Nº 255	15-37
mmu-mir-96	SEC ID Nº 256	24-46
mmu-mir-98	SEC ID Nº 257	2-23
mmu-mir-99a	SEC ID Nº 258	6-25
mmu-mir-99b	SEC ID Nº 259	7-28
mmu-mir-100	SEC ID Nº 260	13-34
mmu-mir-101	SEC ID Nº 261	38-57
mmu-mir-101b	SEC ID Nº 262	61-82
mmu-mir-103-1	SEC ID Nº 263	52-74
mmu-mir-103-2	SEC ID Nº 264	52-74
mmu-mir-106a	SEC ID Nº 265	5-26
mmu-mir-106b	SEC ID Nº 266	12-32
mmu-mir-107	SEC ID Nº 267	52-74

(Continuación)

Secuencias de miARN de ratón		
Nombre de miARN	**Precursor**	**Secuencia Procesada Respecto al Precursor**
mmu-mir-122a	SEC ID Nº 268	6-28
mmu-mir-124a-3	SEC ID Nº 269	43-64
mmu-mir-124a-1	SEC ID Nº 270	52-73
mmu-mir-124a-2	SEC ID Nº 271	61-82
mmu-mir-125a	SEC ID Nº 272	6-28
mmu-mir-125b-2	SEC ID Nº 273	7-28
mmu-mir-125b-1	SEC ID Nº 274	15-36
mmu-mir-126	SEC ID Nº 275	9-29 y/o 46-66
mmu-mir-127	SEC ID Nº 276	43-64
mmu-mir-128a	SEC ID Nº 277	44-65
mmu-mir-128b	SEC ID Nº 278	48-69
mmu-mir-129-1	SEC ID Nº 279	6-27
mmu-mir-129-2	SEC ID Nº 280	15-36
mmu-mir-130a	SEC ID Nº 281	42-61
mmu-mir-130b	SEC ID Nº 282	51-72
mmu-mir-132	SEC ID Nº 283	42-63
mmu-mir-133a-1	SEC ID Nº 284	44-65
mmu-mir-133a-2	SEC ID Nº 285	60-81
mmu-mir-133b	SEC ID Nº 286	67-87
mmu-mir-134	SEC ID Nº 287	7-27
mmu-mir-135a-1	SEC ID Nº 288	17-39
mmu-mir-135b	SEC ID Nº 289	16-37
mmu-mir-135a-2	SEC ID Nº 290	23-45
mmu-mir-136	SEC ID Nº 291	5-27
mmu-mir-137	SEC ID Nº 292	46-67
mmu-mir-138-2	SEC ID Nº 293	2-18
mmu-mir-138-1	SEC ID Nº 294	23-39
mmu-mir-139	SEC ID Nº 295	7-24
mmu-mir-140	SEC ID Nº 296	7-27
mmu-mir-141	SEC ID Nº 297	49-69
mmu-mir-142	SEC ID Nº 298	4-23 y/o 40-61
mmu-mir-143	SEC ID Nº 299	40-61
mmu-mir-144	SEC ID Nº 300	43-64
mmu-mir-145	SEC ID Nº 301	7-30
mmu-mir-146	SEC ID Nº 302	6-27

(Continuación)

Secuencias de miARN de ratón		
Nombre de miARN	**Precursor**	**Secuencia Procesada Respecto al Precursor**
mmu-mir-148a	SEC ID Nº 303	61-82
mmu-mir-149	SEC ID Nº 304	4-25
mmu-mir-150	SEC ID Nº 305	6-27
mmu-mir-151	SEC ID Nº 306	43-63
mmu-mir-152	SEC ID Nº 307	47-67
mmu-mir-153	SEC ID Nº 308	44-63
mmu-mir-154	SEC ID Nº 309	6-27
mmu-mir-155	SEC ID Nº 310	4-25
mmu-mir-181a	SEC ID Nº 311	7-29
mmu-mir-181b-1	SEC ID Nº 312	12-35
mmu-mir-181c	SEC ID Nº 313	17-38
mmu-mir-181b-2	SEC ID Nº 314	16-39
mmu-mir-182	SEC ID Nº 315	7-28
mmu-mir-183	SEC ID Nº 316	6-28
mmu-mir-184	SEC ID Nº 317	45-66
mmu-mir-185	SEC ID Nº 318	7-24
mmu-mir-186	SEC ID Nº 319	7-29
mmu-mir-187	SEC ID Nº 320	40-61
mmu-mir-188	SEC ID Nº 321	6-27
mmu-mir-190	SEC ID Nº 322	6-27
mmu-mir-191	SEC ID Nº 323	7-28
mmu-mir-192	SEC ID Nº 324	14-31
mmu-mir-193	SEC ID Nº 325	41-61
mmu-mir-194-1	SEC ID Nº 326	7-28
mmu-mir-194-2	SEC ID Nº 327	16-37
mmu-mir-195	SEC ID Nº 328	1-21
mmu-mir-196-1	SEC ID Nº 329	24-44
mmu-mir-196-2	SEC ID Nº 330	16-36
mmu-mir-199a-1	SEC ID Nº 331	6-28 y/o 45-66
mmu-mir-199a-2	SEC ID Nº 332	31-53 y/o 69-90
mmu-mir-199b	SEC ID Nº 333	26-48
mmu-mir-200b	SEC ID Nº 334	45-67
mmu-mir-200a	SEC ID Nº 335	54-75
mmu-mir-200c	SEC ID Nº 336	46-67
mmu-mir-201	SEC ID Nº 337	6-26

(Continuación)

Secuencias de miARN de ratón		
Nombre de miARN	**Precursor**	**Secuencia Procesada Respecto al Precursor**
mmu-mir-202	SEC ID Nº 33	45-66
mmu-mir-203	SEC ID Nº 339	49-69
mmu-mir-204	SEC ID Nº 340	6-28
mmu-mir-205	SEC ID Nº 341	7-28
mmu-mir-206	SEC ID Nº 342	46-67
mmu-mir-207	SEC ID Nº 343	52-74
mmu-mir-208	SEC ID Nº 344	50-71
mmu-mir-210	SEC ID Nº 345	66-86
mmu-mir-211	SEC ID Nº 346	26-47
mmu-mir-212	SEC ID Nº 347	56-76
mmu-mir-213	SEC ID Nº 348	14-36 y/o 54-75
mmu-mir-214	SEC ID Nº 349	71-91
mmu-mir-215	SEC ID Nº 350	30-50
mmu-mir-216	SEC ID Nº 351	7-27
mmu-mir-217	SEC ID Nº 352	34-57
mmu-mir-218-2	SEC ID Nº 353	25-45
mmu-mir-219-1	SEC ID Nº 354	21-41
mmu-mir-219-2	SEC ID Nº 355	19-39
mmu-mir-221	SEC ID Nº 356	60-81
mmu-mir-222	SEC ID Nº 357	49-71
mmu-mir-223	SEC ID Nº 358	68-88
mmu-mir-224	SEC ID Nº 359	8-30
mu-miR-290	SEC ID Nº 360	15-37
mmu-mir-291	SEC ID Nº 361	14-35 y/o 50-72
mmu-mir-292	SEC ID Nº 362	12-33 y/o 51-73
mmu-mir-293	SEC ID Nº 363	48-69
mmu-mir-294	SEC ID Nº 364	51-72
mmu-mir-295	SEC ID Nº 365	43-65
mmu-mir-296	SEC ID Nº 366	13-33
mmu-mir-297-1	SEC ID Nº 367	15-35
mmu-mir-297-2	SEC ID Nº 368	36-56
mmu-mir-298	SEC ID Nº 369	11-32
mmu-mir-299	SEC ID Nº 370	7-28
mmu-mir-300	SEC ID Nº 371	51-72
mmu-mir-301	SEC ID Nº 372	51-73

(Continuación)

Secuencias de miARN de ratón		
Nombre de miARN	**Precursor**	**Secuencia Procesada Respecto al Precursor**
mmu-mir-302	SEC ID Nº 373	44-66
mmu-mir-320	SEC ID Nº 374	48-70
mmu-mir-321	SEC ID Nº 375	10-30
mmu-mir-323	SEC ID Nº 376	50-71
mmu-mir-324	SEC ID Nº 377	18-40 y/o 53-74
mmu-mir-325	SEC ID Nº 378	16-38
mmu-mir-326	SEC ID Nº 379	60-80
mmu-mir-328	SEC ID Nº 380	61-82
mmu-mir-329	SEC ID Nº 381	61-82
mmu-mir-330	SEC ID Nº 382	61-83
mmu-mir-331	SEC ID Nº 383	61-81
mmu-mir-337	SEC ID Nº 384	61-83
mmu-mir-338	SEC ID Nº 385	61-83
mmu-mir-339	SEC ID Nº 386	16-36
mmu-mir-340	SEC ID Nº 387	61-83
mmu-mir-341	SEC ID Nº 388	61-81
mmu-mir-342	SEC ID Nº 389	61-84
mmu-mir-344	SEC ID Nº 390	61-83
mmu-mir-345	SEC ID Nº 391	16-36
mmu-mir-346	SEC ID Nº 392	16-38
mmu-mir-350	SEC ID Nº 393	61-84
mmu-mir-351	SEC ID Nº 583	16-39
mmu-mir-370	SEC ID Nº 584	48-70
mmu-mir-376a	SEC ID Nº 585	44-64
mmu-mir-376b	SEC ID Nº 586	51-72
mmu-mir-380	SEC ID Nº 587	40-61
mmu-mir-409	SEC ID Nº 588	47-69
mmu-mir-410	SEC ID Nº 589	50-71
mmu-mir-411	SEC ID Nº 590	56-78
mmu-mir-412	SEC ID Nº 591	50-72
mmu-mir-425	SEC ID Nº 695	54-74
mmu-mir-429	SEC ID Nº 696	51-72
mmu-mir-448	SEC ID Nº 697	72-93
mmu-mir-449	SEC ID Nº 698	16-37
mmu-mir-450	SEC ID Nº 699	17-38

(Continuación)

Secuencias de miARN de ratón		
Nombre de miARN	**Precursor**	**Secuencia Procesada Respecto al Precursor**
mmu-mir-451	SEC ID Nº 786	17-38
mmu-mir-452	SEC ID Nº 787	17-38
mmu-mir-463	SEC ID Nº 788	4-24
mmu-mir-464	SEC ID Nº 789	47-69
mmu-mir-465	SEC ID Nº 790	5-27
mmu-mir-466	SEC ID Nº 791	51-73
mmu-mir-467	SEC ID Nº 792	50-71
mmu-mir-468	SEC ID Nº 793	53-75
mmu-mir-469	SEC ID Nº 794	6-31
mmu-mir-470	SEC ID Nº 795	9-29
mmu-mir-471	SEC ID Nº 796	7-29
mmu-mir-483	SEC ID Nº 797	45-67
mmu-mir-484	SEC ID Nº 798	2-23
mmu-mir-485	SEC ID Nº 799	9-30
mmu-mir-486	SEC ID Nº 800	4-25

Tabla 3

Secuencias de miARN de rata		
Nombre de miARN	**Precursor**	**Secuencia Procesada Respecto al Precursor**
rno-let-7d	SEC ID Nº 394	14-34 y/o 68-89
rno-mir-7-1	SEC ID Nº 395	19-39 y/o 61-82
rno-let-7a-1	SEC ID Nº 396	13-34
rno-let-7a-2	SEC ID Nº 397	17-38
rno-let-7b	SEC ID Nº 398	7-28
rno-let-7c-1	SEC ID Nº 399	16-37
rno-let-7c-2	SEC ID Nº 400	14-35
rno-let-7e	SEC ID Nº 401	15-35
rno-let-7f-1	SEC ID Nº 402	8-29
rno-let-7f-2	SEC ID Nº 403	8-29
rno-let-7i	SEC ID Nº 404	6-24
rno-mir-7-2	SEC ID Nº 405	19-39
rno-mir-7b	SEC ID Nº 406	29-49
rno-mir-9-1	SEC ID Nº 407	16-38
rno-mir-9-3	SEC ID Nº 408	16-38

(Continuación)

Secuencias de miARN de rata		
Nombre de miARN	**Precursor**	**Secuencia Procesada Respecto al Precursor**
rno-mir-9-2	SEC ID Nº 409	16-38
rno-mir-10a	SEC ID Nº 410	22-44
rno-mir-10b	SEC ID Nº 411	26-47
rno-mir-15b	SEC ID Nº 412	20-41
rno-mir-16	SEC ID Nº 413	17-38
rno-mir-17	SEC ID Nº 414	14-37
rno-mir-18	SEC ID Nº 415	17-38
rno-mir-19b-1	SEC ID Nº 416	54-76
rno-mir-19b-2	SEC ID Nº 417	62-84
rno-mir-19a	SEC ID Nº 418	49-71
rno-mir-20	SEC ID Nº 419	16-38 y/o 52-72
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
mo-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

(Continuación)

Secuencias de miARN de rata		
Nombre de miARN	**Precursor**	**Secuencia Procesada Respecto al Precursor**
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
rno-mir-96	SEC ID Nº 451	24-46
rno-mir-98	SEC ID Nº 452	2-23
rno-mir-99a	SEC ID Nº 453	13-34
rno-mir-99b	SEC ID Nº 454	7-28
rno-mir-100	SEC ID Nº 455	13-34
rno-mir-101b	SEC ID Nº 456	61-82
rno-mir-101	SEC ID Nº 457	47-68
rno-mir-103-2	SEC ID Nº 458	52-74
rno-mir-103-1	SEC ID Nº 459	52-74
rno-mir-106b	SEC ID Nº 460	12-32
rno-mir-107	SEC ID Nº 461	52-74
rno-mir-122a	SEC ID Nº 462	15-37
rno-mir-124a-3	SEC ID Nº 463	52-73
rno-mir-124a-1	SEC ID Nº 464	52-73
rno-mir-124a-2	SEC ID Nº 465	61-82
rno-mir-125a	SEC ID Nº 466	15-37
rno-mir-125b-1	SEC ID Nº 467	15-36
rno-mir-125b-2	SEC ID Nº 468	17-38
rno-mir-126	SEC ID Nº 469	9-29 y/o 46-66
rno-mir-127	SEC ID Nº 470	57-78
mo-mir-128a	SEC ID Nº 471	50-71
mo-mir-128b	SEC ID Nº 472	52-73
rno-mir-129-2	SEC ID Nº 473	19-40 y/o 61-82
rno-mir-129-1	SEC ID Nº 474	6-27
rno-mir-130a	SEC ID Nº 475	55-74
rno-mir-130b	SEC ID Nº 476	51-72
rno-mir-132	SEC ID Nº 477	59-80
rno-mir-133a	SEC ID Nº 478	53-74

(Continuación)

Secuencias de miARN de rata		
Nombre de miARN	**Precursor**	**Secuencia Procesada Respecto al Precursor**
rno-mir-134	SEC ID Nº 479	8-28
rno-mir-135b	SEC ID Nº 480	16-37
rno-mir-135a	SEC ID Nº 481	23-45
rno-mir-136	SEC ID Nº 482	15-37
rno-mir-137	SEC ID Nº 483	60-81
rno-mir-138-2	SEC ID Nº 484	9-25
mo-mir-138-1	SEC ID Nº 485	23-39
rno-mir-139	SEC ID Nº 486	7-24
rno-mir-140	SEC ID Nº 487	23-43 y/o 61-84
rno-mir-141	SEC ID Nº 488	59-79
rno-mir-142	SEC ID Nº 489	16-35 y/o 52-74
rno-mir-143	SEC ID Nº 490	60-81
rno-mir-144	SEC ID Nº 491	50-71
rno-mir-145	SEC ID Nº 492	16-39
rno-mir-146	SEC ID Nº 493	17-38
rno-mir-148b	SEC ID Nº 494	61-82
rno-mir-150	SEC ID Nº 495	16-37
rno-mir-151	SEC ID Nº 496	16-37 y/o 50-71
rno-mir-152	SEC ID Nº 497	53-73
rno-mir-153	SEC ID Nº 498	53-72
rno-mir-154	SEC ID Nº 499	15-36
rno-mir-181c	SEC ID Nº 500	24-45
rno-mir-181a	SEC ID Nº 501	39-61
rno-mir-181b-1	SEC ID Nº 502	36-59
rno-mir-181b-2	SEC ID Nº 503	15-38
rno-mir-183	SEC ID Nº 504	27-49
rno-mir-184	SEC ID Nº 505	47-68
rno-mir-185	SEC ID Nº 506	14-31
rno-mir-186	SEC ID Nº 507	15-37
rno-mir-187	SEC ID Nº 508	66-86
rno-mir-190	SEC ID Nº 509	15-36
rno-mir-191	SEC ID Nº 510	15-36
rno-mir-192	SEC ID Nº 511	24-44
rno-mir-193	SEC ID Nº 512	54-74
rno-mir-194-1	SEC ID Nº 513	15-36

(Continuación)

Secuencias de miARN de rata		
Nombre de miARN	**Precursor**	**Secuencia Procesada Respecto al Precursor**
rno-mir-194-2	SEC ID Nº 514	15-36
rno-mir-195	SEC ID Nº 515	15-35
rno-mir-196	SEC ID Nº 516	25-45
rno-mir-199a	SEC ID Nº 517	31-53
rno-mir-200c	SEC ID Nº 518	46-67
rno-mir-200a	SEC ID Nº 519	54-75
rno-mir-200b	SEC ID Nº 520	54-77
rno-mir-203	SEC ID Nº 521	52-73
rno-mir-204	SEC ID Nº 522	33-54
rno-mir-205	SEC ID Nº 523	33-54
rno-mir-206	SEC ID Nº 524	51-72
rno-mir-208	SEC ID Nº 525	50-71
rno-mir-210	SEC ID Nº 526	66-86
rno-mir-211	SEC ID Nº 527	26-47
rno-mir-212	SEC ID Nº 528	72-92
rno-mir-213	SEC ID Nº 529	55-76
rno-mir-214	SEC ID Nº 530	71-91
rno-mir-216	SEC ID Nº 531	19-39
rno-mir-217	SEC ID Nº 532	32-55
rno-mir-218-2	SEC ID Nº 533	25-45
rno-mir-218-1	SEC ID Nº 534	25-45
rno-mir-219-1	SEC ID Nº 535	21-41
rno-mir-219-2	SEC ID Nº 536	19-39
rno-mir-221	SEC ID Nº 537	65-87
rno-mir-222	SEC ID Nº 538	62-85
rno-mir-223	SEC ID Nº 539	68-88
rno-mir-290	SEC ID Nº 540	14-36
rno-mir-291	SEC ID Nº 541	14-35 y/o 50-72
rno-mir-292	SEC ID Nº 542	12-33 y/o 51-73
rno-mir-296	SEC ID Nº 543	13-33
rno-mir-297	SEC ID Nº 544	26-48
rno-mir-298	SEC ID Nº 545	11-32
rno-mir-299	SEC ID Nº 546	7-28
rno-mir-300	SEC ID Nº 547	51-72
rno-mir-301	SEC ID Nº 548	61-85

(Continuación)

Secuencias de miARN de rata		
Nombre de miARN	**Precursor**	**Secuencia Procesada Respecto al Precursor**
rno-mir-320	SEC ID Nº 549	48-70
rno-mir-321	SEC ID Nº 550	10-30
rno-mir-322	SEC ID Nº 551	61-80
rno-mir-323	SEC ID Nº 552	50-71
rno-mir-324	SEC ID Nº 553	16-38 y/o 51-72
rno-mir-325	SEC ID Nº 554	16-38
rno-mir-326	SEC ID Nº 555	60-80
rno-mir-328	SEC ID Nº 556	48-69
rno-mir-329	SEC ID Nº 557	61-82
rno-mir-330	SEC ID Nº 558	60-82
rno-mir-3 31	SEC ID Nº 559	61-81
rno-mir-333	SEC ID Nº 560	16-35
rno-mir-336	SEC ID Nº 561	16-36
rno-mir-337	SEC ID Nº 562	60-82
rno-mir-338	SEC ID Nº 563	41-63
rno-mir-339	SEC ID Nº 564	16-36
rno-mir-341	SEC ID Nº 565	61-81
rno-mir-342	SEC ID Nº 566	61-84
rno-mir-344	SEC ID Nº 567	61-83
rno-mir-345	SEC ID Nº 568	16-36
rno-mir-346	SEC ID Nº 569	16-38
rno-mir-349	SEC ID Nº 570	61-82
rno-mir-350	SEC ID Nº 571	61-84
rno-mir-351	SEC ID Nº 572	16-39
rno-mir-352	SEC ID Nº 592	61-81
rno-mir-421	SEC ID Nº 593	10-30
rno-mir-429	SEC ID Nº 700	53-74
rno-mir-448	SEC ID Nº 701	72-93
rno-mir-449	SEC ID Nº 702	16-37
rno-mir-450	SEC ID Nº 703	17-38
rno-mir-451	SEC ID Nº 801	17-38
rno-mir-483	SEC ID Nº 802	45-67

Se entiende que un miARN se deriva de secuencias genómicas de un gen. A este respecto, el término “gen” se utiliza por simplicidad para referirse a la secuencia genómica que codifica el precursor de miARN de un determinado

miARN. Sin embargo, las realizaciones de la invención puede implicar secuencias genómicas de un miARN que está implicado en su expresión, tal como un promotor u otras secuencias reguladoras.

El término "recombinante" se puede utilizar y generalmente se refiere a una molécula que se ha modificado *in vitro* o que es el producto replicado o expresado de tal molécula.

La expresión "ácido nucleico" se conoce bien en la técnica. Un "ácido nucleico" como se utiliza en el presente documento generalmente se refiere a una molécula (de una o más cadenas) de ADN, ARN o un derivado o análogo del mismo, que comprende una base nitrogenada. Una base nitrogenada incluye, por ejemplo, una base purínica o pirimidínica de origen natural en el ADN (por ejemplo, una adenina "A", una guanina "G", una timina "T" o una citosina "C") o de ARN (por ejemplo, una A, una G, un uracilo "U" o una C). La expresión "ácido nucleico" engloba los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido", cada uno como un subgénero de la expresión "ácido nucleico".

El término "miARN" generalmente se refiere a una molécula de una cadena, pero en realizaciones específicas, las moléculas implementadas en la invención también englobarán 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 totalmente complementaria con otra región de la misma molécula de la cadena única o con otro ácido nucleico. Por lo tanto, los ácidos nucleicos pueden englobar una molécula que comprende una o más cadenas complementarias o autocomplementarias o "complementos" de una secuencia particular que comprende una molécula. Por ejemplo, el precursor de miARN puede tener una región autocomplementaria que es complementaria hasta en el 100%.

Como se utiliza en el presente documento, "hibridación", "se hibrida" o "capaz de hibridarse" se entiende que significa la formación de una molécula de doble o triple cadena o una molécula con naturaleza parcial de doble o triple cadena. El término "templarse" como se utiliza en el presente documento es sinónimo de "hibridarse". El término "hibridación, "se hibrida(n)" o "capaz de hibridarse" engloba los términos "condiciones rigurosas" o "alta rigurosidad" y los términos "baja rigurosidad" 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 las SEC ID N^{os} 1-805, y/o cualquier secuencia con el complemento de la misma. Se contempla que las secuencias de los ácidos nucleicos de la invención pueden tener, tener al menos, o tener como mucho 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 la SEC ID N^{os} 1-805 (o cualquier intervalo derivado de las mismas), o es un complemento de las mismas. En otras realizaciones, los ácidos nucleicos son, son al menos, o son como mucho el 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% idénticos o complementarios a la secuencia de miARN de las SEC ID N^{os} 1-805, o cualquier combinación o intervalo derivable de las mismas.

1. Bases nitrogenadas

Como se utiliza 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) que se encuentra en al menos un ácido nucleico de origen natural (es decir, un ADN y ARN), y derivados y análogos de tal base nitrogenada que se encuentran natural o no naturalmente. Una base nitrogenada puede generalmente formar uno o más enlaces de hidrógeno ("templarse" o "hibridarse") con al menos una base nitrogenada de origen natural de manera que puede sustituir el emparejamiento con la base nitrogenada de origen natural (por ejemplo, el enlace de hidrógeno entre A y T, G y C, y A y U).

La(s) base(s) nitrogenada(s) "de purina" y/o "pirimidina" engloban las bases nitrogenadas purínicas y pirimidínicas de origen natural y también los derivados y análogos de las mismas, incluyendo pero sin limitarse a estas, las purinas o pirimidinas sustituidas por uno o más restos de entre un alquilo, carboxialquilo, amino, hidroxilo, halógeno (es decir, fluoro, 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 de una purina o pirimidina incluye una deazapurina, 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-clorouracilo, un 5-propiluracilo, un tiouracilo, una 2-metiladenina, una metiltioadenina, una N,N-diemetiladenina, una azadenina, una 8-bromoadenina, una 8-hidroxiadenina, una 6-hidroxiaminopurina,una 6-tiopurina, una 4-(6-aminohexil/citosina), y similares. Otros ejemplos son conocidos por un experto en la técnica.

Una base nitrogenada puede estar comprendida en un nucleósido o nucleótido, que utiliza cualquier procedimiento de síntesis química o natural descrito en el presente documento o conocido por un experto en la técnica. Tal base nitrogenada se puede marcar o puede ser parte de una molécula que está marcada y contiene la base nitrogenada.

2. Nucleósidos

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

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

3. Nucleótidos

Como se utiliza en el presente documento, un "nucleótido" se refiere a un nucleósido que comprende además un "resto de estructura". Un resto de estructura generalmente se une covalentemente a otra molécula que comprende un nucleótido, o a otro nucleótido que forma un ácido nucleico. El "resto de estructura" en los nucleótidos de origen natural comprende típicamente un resto de fósforo que está unido covalentemente a un azúcar de 5 carbonos. Sin embargo, se conocen otros tipos de unión en la técnica, particularmente cuando un nucleótido comprende derivados o análogos de un azúcar de 5 carbonos de origen natural o un resto de fósforo.

4. Análogos de ácido nucleico

Un ácido nucleico puede comprender o estar compuesto enteramente de, un derivado o análogo de una base nitrogenada, un resto de base nitrogenada engarce y/o un resto de estructura que puede estar presente en un ácido nucleico de origen natural. El ARN con análogos de ácidos nucleicos también se pueden marcar de acuerdo con los procedimientos de la invención. Como se utiliza en el presente documento un "derivado" se refiere a una forma modificada o alterada químicamente de una molécula de origen natural, mientras que los términos "mimético" o "análogo" se refiere a una molécula que puede o no parecerse estructuralmente a una molécula o resto de origen natural, pero posee funciones similares. Como se utiliza en el presente documento, un "resto" generalmente se refiere a un componente químico más pequeño o molecular o una estructura química más grande o molecular. Se conocen bien en la técnica los análogos de bases nitrogenadas, nucleósidos y nucleótidos, y han sido descritos (véase por ejemplo, Scheit, 1980, incorporado en el presente documento por referencia).

Ejemplos no limitantes adicionales de nucleósidos, nucleótidos o ácidos nucleicos y/o derivados o análogos que comprenden un azúcar de 5 carbonos y/o un resto de estructura, incluyen los de: la Patente de EE. UU. Nº 5.681.947, que describe oligonucleótidos que comprenden derivados de purina que forman hélices triples y/o evitan la expresión de ADNds; las Patentes de EE. UU. 5.652.099 y 5.763.167, que describen ácidos nucleicos que incorporan análogos de nucleósidos fluorescentes que se encuentran en ADN o ARN, particularmente para su uso como sondas de ácidos nucleicos fluorescentes; la Patente de EE. UU. 5.614.617, que describe análogos de oligonucleótidos con sustituciones en los anillos de pirimidina que poseen una estabilidad mejorada frente a nucleasas; las Patentes de EE. UU. 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) que se utilizan en la detección de ácidos nucleicos; la Patente de EE. UU. 5.446.137, que describe oligonucleótidos que comprenden al menos un resto de azúcar de 5 carbonos sustituidos en la posición 4' con un sustituyente distinto de hidrógeno que se puede utilizar en ensayos de hibridación; la Patente de EE. UU. 5.886.165, que describe oligonucleótidos tanto desoxirribonucleótidos con uniones internucleótido 3'-5' como ribonucleótidos con uniones internucleótido 2'-5'; la Patente de EE. UU. 5.714.606, que describe una unión internucleótido modificada en la que un oxígeno en la posición 3' de la unión internucleótido se sustituye con un carbono para mejorar la resistencia a nucleasas de los ácidos nucleicos; la Patente de EE. UU. 5.672.697, que describe oligonucleótidos que contienen una o más uniones internucleótidos 5' metilen fosfonato que aumentan las resistencia a nucleasas; las Patentes de EE. UU. 5.466.786 y 5.792.847, que describen la unión de un resto sustituyente que puede comprender un fármaco o una marca en el carbono 2' de un oligonucleótido para proporcionar una mayor estabilidad frente a nucleasas y la capacidad de suministrar fármacos y restos de detección; la Patente de EE. UU. 5.223.618, que describe análogos de oligonucleótidos con 2 o 3 uniones de carbono estructurales unidas en la posición 4' y posición 3' adyacentes al resto de azúcar de 5 carbonos para mejorar la captación celular, la resistencia a las nucleasas y la hibridación con un ARN diana; la Patente de EE. UU. 5.470.967, que describe oligonucleótidos que comprenden al menos una unión internucleótido sulfamato o sulfamida que son útiles como sondas de hibridación de ácidos nucleicos: las Patentes

de EE. UU. 5.378.825. 5.777.092. 5.623.070. 5.610.289 y 5.602.240, que describen oligonucleótidos con restos de engarce de tres o cuatro átomos que sustituyen el medio estructural de fosfodiéster utilizado para mejorar la resistencia a nucleasas, captación celular y regulación de la expresión de ARN; la Patente de EE. UU. 5.858.988, que describe un agente portador hidrofóbico unido en la posición 2'-O de los oligonucleótidos para mejorar su permeabilidad de membrana y la estabilidad; la Patente de EE. UU. 5.214.136, que describe oligonucleótidos conjugados con antraquinona en el extremo 5' que posee una hibridación al ADN, o ARN mejorada, estabilidad frente a nucleasas mejorada; la Patente de EE. UU. 5.700.922, que describe quimeras PAN-ADN-PAN en las que el ADN comprende 2'-desoxi-eritro-pentofuranosil nucleótidos para mejorar la resistencia a las nucleasas, afinidad de unión, y capacidad para activar la RNasa H; y la Patente de EE. UU. 5.708.154, que describe la unión de ARN a un ADN para formar un híbrido ADN-ARN; la Patente de EE. UU. 5.728.525, que describe el marcaje de análogos de nucleósidos con una marca fluorescente universal.

Enseñanzas adicionales de análogos de nucleósidos y análogos de ácidos nucleicos están en la Patente de EE. UU. 5.728.525, que describe análogos de nucleósidos que están marcados en un extremo; la Patente de EE. UU. 5.637.683, 6.251.666 (sustituciones L-nucleótido) y 5.480.980 (nucleótidos 7-deaza-2' desoxiguanosina y análogos de ácido nucleicos de los mismos).

El uso de otros análogos se contempla específicamente para su uso en el contexto de la presente invención. Tales análogos se pueden utilizar en moléculas de ácido nucleico sintético de la invención, en toda la molécula o en los nucleótidos seleccionados. Incluyen, pero no se limitan a estos, 1) modificaciones en la ribosa (tal como 2' F, 2' NH_2, 2' N_3, 4' tio, o 2' O-CH_3) y 2) modificaciones fosfato (tales como los que se encuentran en los fosforotioatos, metil fosfonatos, y fosforoboratos). Tales análogos se han creado para conferir una estabilidad a los ARN reduciendo o eliminando su capacidad para ser escindido por ribonucleasas. Cuando estos análogos de nucleótidos están presentes en los ARN, puede tener efectos profundamente positivos en la estabilidad de ARN de animales. Se contempla que el uso de análogos de nucleótidos se pueden utilizar solos o en conjunción con cualquiera de las modificaciones de diseño de un miARN sintético para cualquier ácido nucleico de la invención.

5. Nucleótidos modificados

Tanto los miARN como los inhibidores de miARN de la invención contemplan específicamente el uso de nucleótidos que se han modificado para aumentar sus actividades. Tales nucleótidos incluyen los que están en los extremos 5' o 3' del ARN así como los que están internamente en la molécula. Los nucleótidos modificados que se utilizan en las cadenas complementarias de los miARN sintéticos o bien bloquean el OH o fosfato 5' del ARN o introducen modificaciones del azúcar internas que aumenta la captación de la cadena activa del miARN sintético. Las modificaciones por los inhibidores de miARN incluyen las modificaciones del azúcar interno que aumenta la hibridación así como la estabilidad de las moléculas en las células y las modificaciones de los extremos que estabilizan más los ácidos nucleicos en las células. Se contemplan además las modificaciones que se pueden detectar por microscopía y otros procedimientos para identificar células que contienen miARN sintéticos o inhibidores de miARN.

B. Preparación de los ácidos nucleicos

Un ácido nucleico se puede preparar por cualquier técnica conocida por un experto en la técnica, tal como por ejemplo, síntesis química, producción enzimática o producción biológica. Aunque los miARN sintéticos de acuerdo con la invención se podrían producir utilizando procedimientos recombinantes, se prefiere producir los miARN sintéticos por síntesis químicas o producción enzimática. Por otro lado, los inhibidores de miARN se producen preferentemente por síntesis química o producción enzimática. Los miARN no sintéticos se pueden producir por varios procedimientos, incluyendo los procedimientos que implican tecnologías de ADN recombinante.

La síntesis de ácido nucleico se lleva a cabo de acuerdo con los procedimientos de referencia. Véase, por ejemplo, Itakura y Riggs (1980). Adicionalmente, la Patente de EE. UU. 4.704.362, Patente de EE. UU. 5.221.619, y Patente de EE. UU. 5.583.013 describe cada una varios procedimientos para preparar ácidos nucleicos sintéticos. Ejemplos no limitantes de ácidos nucleicos sintéticos (por ejemplo, un oligonucleótido sintético), incluyen un ácido nucleico hecho por síntesis química *in vitro* utilizando química fosfotriéster, fosfita o fosforamidita y técnicas en fase sólida tales como las descritas en el documento EP 266.032, incorporado en el presente documento por referencia, o por medio de desoxinucleósidos H-fosfonato intermedios como se describe en Froehler y col., 1986 y Patente de EE. UU. Serie Nº 5.705.629. En los procedimientos de la presente invención, se pueden utilizar uno o más oligonucleótidos. Se han desvelado varios mecanismos diferentes de síntesis de oligonucleótidos en por ejemplo, Patentes de EE. UU. 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 enzimáticamente incluye el producido por enzimas en reacciones de amplificación tales como PCR™ (véase por ejemplo, Patente de EE. UU. 4.683.202 y Patente de EE. UU. 4.682.195, incorporada cada una en el presente documento como referencia), o la síntesis de un oligonucleótido descrito en la Patente de EE. UU. Nº 5.645.897, incorporada en el presente documento por referencia.

La síntesis de oligonucleótidos se conoce bien por los expertos en la técnica. Se han desvelado varios mecanismos de síntesis de oligonucleótidos en por ejemplo las Patentes de EE. UU. 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, la síntesis química se puede conseguir por el procedimiento diéster, el procedimiento triéster, el procedimiento de polinucleótido fosforilasa y por química en fase sólida. Estos procedimientos se tratan posteriormente.

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

Procedimiento triéster. La diferencia principal entre los procedimientos diéster y triéster es la presencia en el último de un grupo extra protector de los átomos de fosfato de los reactivos y productos (Itakura y col., 1975). El grupo protector del fosfato normalmente es un grupo clorofenilo, que hace solubles a los nucleótidos y polinucleótidos intermedios en disolventes orgánicos. Por lo que la purificación se hace en soluciones de cloroformo. Otras mejoras en el procedimientos incluyen (i) el bloqueo del emparejamiento de trímeros y oligómeros más grandes, (ii) el uso extensivo de cromatografía líquida de altas prestaciones para la purificación de productos tanto intermedios como finales, y (iii) síntesis en fase sólida.

Procedimiento de polinucleótido fosforilasa. Este es un procedimiento enzimático de síntesis de ADN que se puede utilizar para sintetizar muchos oligonucleótidos útiles (Gillam y col., 1978; Gillam y col., 1979). Bajo condiciones controladas, la polinucleótido fosforilasa añade predominantemente un único nucleótido a un oligonucleótido corto. La purificación cromatográfica permite la purificación del añadido a obtener. Al menos se necesita un trímero para empezar el procedimiento, y este cebador se debe obtener por algún otro procedimiento. El procedimiento de polinucleótido fosforilasa funciona y tiene la ventaja de que los procedimientos implicados son familiares para la mayoría de los bioquímicos.

Procedimientos en fase sólida. El avance en la tecnología de la síntesis en fase sólida de polipéptidos, ha sido posible al fijar el nucleótido inicial en un material de soporte sólido y se procede con la adición de nucleótidos por etapas. Todas las etapas de mezclado y lavado se simplifican, y el procedimiento se puede automatizar. Estas síntesis se llevan a cabo actualmente de manera rutinaria utilizando sintetizadores automáticos de ácidos nucleicos.

La síntesis química con fosforamidita (Beaucage y Lyer, 1992) ha llegado a ser con mucho la técnica química de acoplamiento que se utiliza más ampliamente para la síntesis de oligonucleótidos. Como es bien conocido por los expertos en la técnica, la síntesis con fosforamidita de oligonucleótidos implica la activación de precursores de monómeros de nucleósido fosforamidita por la reacción con agente activador para formar intermedios activados, y después por adición secuencial de intermedios activantes a la cadena de oligonucleótidos en crecimiento (generalmente anclada por un extremo a un soporte sólido adecuado) para formar el producto oligonucleótido.

Procedimientos recombinantes. Los procedimientos recombinantes para producir ácidos nucleicos en una célula son bien conocidos por los expertos en la técnica. Incluyen el uso de vectores, plásmidos, cósmidos, y otros vehículos para suministrar un ácido nucleico a una célula, que puede ser una célula diana o simplemente una célula huésped (para producir grandes cantidades de la molécula de ARN deseada). De manera alternativa, tales vehículos pueden utilizarse en el contexto de un sistema libre de células siempre y cuando estén presentes los reactivos que generan la molécula de ARN. Tales procedimientos incluyen los que se describen en Sambrook, 2003, Sambrook, 2001 y Sambrook, 1989, que se incorpora en el presente documento por referencia.

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

C. Diseño de miARN sintéticos

Los miARN sintéticos comprenden típicamente dos cadenas, una cadena activa que es idéntica respecto a la secuencia del miARN maduro que se está estudiando y una cadena complementaria que es al menos parcialmente complementaria a la cadena activa. La cadena activa es la molécula biológicamente relevante y debería ser captada preferentemente por el complejo celular que modula la traducción, sea a través de degradación de ARNm o por control traduccional. La captación preferente de la cadena activa tienen dos profundos resultados: (1) la actividad observada del miARN sintético aumenta drásticamente y (2) se eliminan esencialmente los efectos no deseados inducidos por la captación y activación de la cadena complementaria. De acuerdo con la invención, se pueden utilizar varios diseños de miARN sintéticos para asegurar la captación preferente de la cadena activa.

Agente bloqueante 5'. La introducción de un resto estable distinto de fosfato o hidroxilo en el extremo 5' de la cadena complementaria incapacita su actividad en la ruta del miARN. Esto asegura que solo se utilizará la cadena activa del miARN sintético para regular la traducción en la célula. Las modificaciones en 5' incluyen, pero no se limitan a estas, NH_2, biotina, un grupo amino, un grupo alquilamina inferior, un grupo acetilo, 2'O-Me, DMTO, fluoresceína, un tiol, o acridina o cualquier otro grupo de este tipo de funcionalidad.

Otras modificaciones de cadena en sentido. La introducción de modificaciones en nucleótidos tales como 2'-OMe, NH_2, biotina, un grupo amino, un grupo alquilamina inferior, un grupo acetilo, DMTO, 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 aumenta la captación de la cadena activa del miARN.

Falta de coincidencia de bases en la cadena en sentido. Como con los ARNsi (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 del miARN. La desestabilización del extremo 5' de la cadena activa del miARN sintético por la colocación estratégica de falta de coincidencias en el extremo 3' de la cadena complementaria del miARN aumenta la actividad de la cadena activa y elimina esencialmente la actividad de la cadena complementaria.

E. Marcadores y marcas

Los miARN sintéticos se pueden marcar con un marcador o marca radioactiva, enzimática, colorimétrica, u otro marcador o marca con fines de detección o aislamiento. Los ácidos nucleicos pueden marcarse con fluorescencia en algunas realizaciones de la invención. Los marcadores fluorescentes que se contemplan para el uso como conjugados incluyen ,pero no se limitan a estos, Alexa 350, Alexa 430, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, azul cascada, Cy3, Cy5, 6-FAM, Isotiocianato de fluoresceína, HEX, 6-JOE, Verde Oregón 488, verde Oregón 500, verde Oregón 514, Azul pacífico, REG, verde rodamina, Renografina, ROX, SYPRO, TAMRA, TET, Tetrametilrodamina, y/o Rojo Tejas.

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

Hay disponibles varias técnicas para visualizar o detectar fácilmente los ácidos nucleicos marcados. La referencia de Stanley T. Crooke, 2000 trata tales técnicas (Capítulo 6) que se incorpora en el presente documento por referencia. Tales técnicas incluyen, microscopía, matrices, fluorometría, cicladores de luz u otras máquinas de PCR™ en tiempo real, análisis FACS, contadores de centelleo, fosfocámaras, contadores Geiger, MRI, CAT, procedimientos de detección basados en anticuerpos (Westerns, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica), técnicas histoquímicas, HPLC (Griffey y col., 1997, espectroscopia, electroforesis en gel de capilaridad (Cummins y col., 1996), espectroscopia, espectroscopia de masas; técnicas radiológicas; y técnicas de equilibrio de masas. De manera alternativa, los ácidos nucleicos se pueden marcar para permitir su aislamiento eficaz. En otras realizaciones de la invención, los ácidos nucleicos están biotinilados.

F. Procedimientos de suministro

La presente invención implica en algunas realizaciones el suministro de un ácido nucleico a una célula.

Las moléculas de ARN se pueden codificar por una molécula de ácido nucleico que está comprendido en un vector. El término "vector" se utiliza para referirse a una molécula portadora de ácido nucleico en la que se puede insertar una molécula de ácido nucleico para su introducción en una célula donde pueda replicarse. Una secuencia de ácido nucleico puede ser "exógena", que significa que es ajena a la célula en la que el vector se introduce o que la secuencia es homóloga a una secuencia de la célula pero en una posición en la que el ácido nucleico de la célula huésped no se encuentra normalmente. Los vectores incluyen plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófagos, virus animales, y virus vegetales), y cromosomas artificiales (por ejemplo, YAC). Un experto en la técnica estaría bien equipado para construir un vector por medio de técnicas recombinantes de referencia, que se describen en Sambrook y col., 1989 y Ausubel y col., 1996. Además para codificar un polipéptido modificado tal como una gelonina modificada, un vector puede codificar secuencias de polipéptido no modificadas tales como un marcador o una molécula dirigida. Una molécula dirigida es la que dirige una molécula de ácido nucleico deseada a un órgano, tejido, célula, u otra localización en particular del 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 una parte de un producto génico capaz de ser transcrito. Los vectores de expresión pueden contener una variedad de "secuencias de control", que se refiere a secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y posible traducción de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped en particular. Además de las secuencias de control que gobiernan la transcripción y la traducción, los vectores y los vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que sirven también para otras funciones y que se han descrito.

Hay varias formas en las que los vectores de expresión se pueden introducir en las células. En ciertas realizaciones de la invención, el vector de expresión comprende un virus o un vector modificado derivado de un genoma vírico. La

capacidad de ciertos virus para entrar en las células por medio de endocitosis mediada por receptor, para integrarse en el genoma de la célula huésped y expresar los genes víricos estable y eficazmente los ha hecho candidatos atractivos para la transferencia de genes ajenos en células de mamífero (Ridgeway, 1988; Nicolas y Rubenstein, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Temin, 1986). Los primeros virus utilizados como vectores víricos eran ADN virus incluyendo papovavirus (virus 40 de simio, virus del papiloma bovino, y polioma) (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986) y adenovirus (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986). Estos tienen una capacidad relativamente baja para secuencias de ADN ajeno y tienen un espectro de huéspedes restringido. Además, su potencial oncogénico y sus efectos citopáticos en las células permisivas planteaban problemas de seguridad. Se pueden albergar en ellos solamente hasta 9 kb de material genético ajeno pero se pueden introducir fácilmente en una variedad de líneas celulares y animales de laboratorio (Nicolas y Rubenstein, 1988; Temin, 1986).

Los retrovirus son un grupo de ARN virus de cadena sencilla que se caracterizan por una capacidad para convertir su ARN en ADN de doble cadena en las células infectadas; también se pueden utilizar como vectores. Se pueden emplear otros vectores víricos como construcciones de expresión en la presente invención. Se pueden emplear vectores derivados de virus tales como los virus vacunales (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar y col., 1988), virus adenoasociados (AAV) (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Hermonat y Muzycska, 1984) y herpesvirus. Ofrecen varias características atractivas para varias células de mamífero (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar y col., 1988; Horwich y col., 1990).

Otros procedimientos adecuados para el suministro de ácidos nucleicos para efectuar la expresión de composiciones de la presente invención se cree que incluyen virtualmente cualquier procedimiento por los que un ácido nucleico (por ejemplo, ADN, incluyendo vectores víricos y no víricos) se pueden introducir en un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo, como se describe en el presente documento o como podría conocer un experto en la técnica. Tales procedimientos incluyen, pero sin limitarse a estos, suministro directo de ADN tal como por inyección (Patentes de EE. UU. N^{os} 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), que incluye la microinyección (Harlan y Weintraub, 1985; Patente de EE. UU. Nº 5.789.215); por electroporación (Patente de EE. UU. Nº 5.384.253); por precipitación en fosfato cálcico (Graham y Van Der Eb, 1973; Chen y Okayama, 1987; Rippe y col., 1990); utilizando DEAE-dextrano y después 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 con microproyectiles (Solicitud PCT N^{os} WO 94/09699 y 95/06128; Patentes de EE. UU. N^{os} 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 (Kaeppler y col., 1990; Patentes de EE. UU. N^{os} 5.302.523 y 5.464.765); por transformación mediada por Agrobacterium (Patentes de EE. UU. N^{os} 5.591.616 y 5.563.055); o por transformación mediada por PEG de protoplastos (Omirulleh y col., 1993; Patentes de EE. UU. Nos. 4.684.611 y 4.952.500); por captación de ADN mediado por inhibición/ desecación (Potrykus y col., 1985). A través de la aplicación de técnicas tales como estas, se pueden transformar estable o transitoriamente orgánulos, células, tejidos u organismos.

B. Suministro de miARN sintéticos

Se cree que los procedimientos adecuados para el suministro de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención incluyen virtualmente cualquiera de los procedimientos por los que un ácido nucleico (por ejemplo, ADN, ARN, incluyendo vectores víricos y no víricos) se puede introducir en un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo, como se describe en el presente documento o como sería conocido por un experto en la técnica. Tales procedimientos incluyen, aunque no se limita a estos, el suministro directo de ácidos nucleicos tales como por inyección (Patente de EE. UU. Nos 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), que incluye la microinyección (Harlan y Weintraub, 1985; Patente de EE. UU. Nº 5.789.215); por electroporación (Patente de EE. UU. Nº 5.384.253); por precipitación en fosfato cálcico (Graham y Van Der Eb, 1973; Chen y Okayama, 1987; Rippe y col., 1990); utilizando DEAE-dextrano y después 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 con microproyectiles (Solicitud PCT N^{os} WO 94/09699 y 95/06128; Patentes de EE. UU. N^{os} 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 (Kaeppler y col., 1990; Patentes de EE. UU. N^{os} 5.302.523 y 5.464.765); por transformación mediada por Agrobacterium (Patentes de EE. UU. N^{os} 5.591.616 y 5.563.055); o por transformación mediada por PEG de protoplastos (Omirulleh y col., 1993; Patentes de EE. UU. N^{os} 4.684.611 y 4.952.500); por captación de ADN mediado por inhibición/desecación (Potrykus y col., 1985). A través de la aplicación de técnicas tales como estas, se pueden transformar estable o transitoriamente orgánulos, células, tejidos u organismos.

Se han fijado a los extremos de los oligonucleótidos una variedad de compuestos para facilitar su transporte a través de las membranas celulares. Se ha descubierto que los péptidos cortos de señal encontrados en el VIH, TAT, HSV VP22, Drosophila antennapedia, y otras proteínas son capaces de la rápida transferencia de biomoléculas a través de membranas (revisado por Schwarze 2000). Estos péptidos de señal, a los que se designan como Dominios de Transducción Proteica (DTP), se han fijado a los oligonucleótidos para facilitar su suministro en células cultivadas. Los colesteroles se han conjugado a oligonucleótidos para mejorar su captación por las células animales (MacKellar 1992). Los grupos de colesterol en los extremos aparentemente interactúan con los receptores o lípidos de las superficies de las células y facilitan la internalización de oligonucleótidos modificados. Asimismo, la poli-1-lisina se

ha conjugado con oligonucleótidos para disminuir la carga negativa neta y mejorar la captación por las células (Leonetti 1990).

Se han desarrollado una variedad de compuestos que forman complejos con ácidos nucleicos, suministrarlos a las superficies de las células y facilitar su captación y la liberación a partir de los endosomas. Entre estos están: (1) una variedad de lípidos tales como DOTAP (u otro lípido catiónico), DDAB, DHDEAB, y DOPE y (2) polímeros basados en sustancias no lipídicas como la polietilenimina, poliamidoamina, y dendrímeros de estos y otros polímeros. En ciertas de estas realizaciones se emplea una combinación de lípidos tales como DOTAP y colesterol o una derivado del colesterol (Patente de EE. UU. 6.770.291). Varios de estos reactivos han demostrado facilitar la captación de ácido nucleico en los animales.

Se han llegado a conocer los componentes celulares implicados en la ruta de miARN. Las proteínas que estabilizan y transportan miARN en las células pueden potenciar la estabilidad y actividad de los miARN porque deberían proteger y guiar el miARN al que se unen una vez que está en las células. Las mezclas de proteínas transportadoras de miARN y los miARN podrían aumentar la eficacia de las terapias basadas en miARN.

Los ARN son moléculas hidrófilas gracias a su estructura de fosfato aniónico y azúcar. Aunque las bases nitrogenadas son hidrofóbicas, domina la hidrofilia debido a la unión extensa de hidrógeno que resulta de los restos de fosfato y azúcar. El carácter hidrófilo y la estructura aniónica reduce la penetración celular. La conjugación con grupos lipófilos como el colesterol (Manoharan, 2002) y los derivados del ácido láurico y litocólico con funcionalidad C32 ha demostrado que (Lorenz y col., 2004), mejoran la captación celular. Además la unión de oligonucleótidos conjugados con esteroides a diferentes lipoproteínas en la corriente sanguínea, tales como el LDL, protegen su integridad y gobiernan su biodistribución (Rump y col., 2000). También se ha demostrado que el colesterol unido a moléculas antisentido (Bijsterbosch y col., 2001) y aptámeros (Rusconi y col., 2004) estabilizan oligonucleótidos permitiendo la unión con lipoproteínas. Se ha demostrado que el colesterol aumenta la captación y la estabilidad en el suero de los ARNsi *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 aumentar la captación celular, y mejorar la resistencia a las nucleasas favoreciendo la asociación con lipoproteínas.

1. Nucleótidos para marcado

Los nucleótidos para marcado no son nucleótidos de origen natural, sino al contrario, se refiere a nucleótidos preparados que tienen un resto reactivo en ellos. Los reactivos de interés con funcionalidades específicas incluyen: amino, sulfhidrilo, sulfoxilo, amino-sulfhidrilo, azido, epóxido, isotiocianato, anhídrido, monoclortriazina, pirimidina mono o dihalógeno sustituida, diazina mono o disustituida, maleimida, epóxido, aziridina, sulfonil halido, ácido hálido, alquil hálido, aril hálido alquilsulfonato, éster de N-hidroxisuccinimida, éster imido, hidrazina, azidonitrofenil, azida, 3-(2-piridil ditio)- propionamida, glioxal, aldehído, yodoacetilo, éster de cianometilo, éster de p-nitrofenilo, éster de o-nitrofenilo, éster de hidroxipiridina, imidazol de carbonilo, y otros de tales grupos químicos. En algunas realizaciones la funcionalidad reactiva se puede unir directamente a un nucleótido, o se puede unir al nucleótido por medio de un grupo de unión. El resto funcional y cualquier engarce no pueden sustancialmente alterar la capacidad del nucleótido que se va a añadir al miARN o que se va a marcar. Los grupos de unión representativos incluyen grupos de unión que contienen carbono, típicamente variando desde aproximadamente 2 a 18, normalmente desde aproximadamente 2 a 8 átomos de carbono, donde los grupos de unión que contienen carbono pueden o no incluir uno o más heteroátomos, por ejemplo, S, O, N, etc., y pueden o no incluir uno o más sitios de insaturación. De particular interés en muchas realizaciones son los grupos de unión alquilo, típicamente grupos de unión alquilo de menos de 1 a 16, normalmente 1 a 4 átomos de carbono, en donde los grupos de unión puede incluir uno o más sitios no saturados. Los nucleótidos funcionalizados (o cebadores) que se usan en los procedimientos anteriores de generación de diana funcionalizada se pueden fabricar utilizando protocolos conocidos o se pueden adquirir en los vendedores comerciales, por ejemplo, Sigma, Rocho, Ambion, y NEN. Los grupos funcionales se pueden preparar de acuerdo con las formas conocidas por los expertos en la técnica, incluyendo la información representativa encontrada en las Pat. de EE. UU. N^{os} 4.404.289; 4.405.711; 4.337.063 y 5.268.486, y la Pat. Br. Nº 1.529.202.

Los nucleótidos amino modificados se utilizan en varias realizaciones de la invención. El nucleótido amino modificado es un nucleótido que tiene un grupo amino reactivo para la unión del marcador. Se contempla que cualquier ribonucleótido (G, A, U, o C) o desoxirribonucleótido (G, A, T, o C) se pueden modificar para marcado. Ejemplos, incluyen, pero no se limitan a estos, los ribo y desoxirribonucleótidos modificados siguientes: 5-(3-aminoalil)-UTP; 8-[(4-amino) butil]-amino-ATP y 8-[(6-amino) butil]-amino-ATP; N6-(4-amino) butil-ATP, N6-(6-amino) butil-ATP, N4-[2,2-oxi-bis-(etilamina)]-CTP; N6-(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; N6-(4-amino) butil-dATP, N6-(6-amino) butil-dATP, N4-[2,2-oxi-bis-(etilamina)]-dCTP; N6-(6-Amino) hexil-dATP; 8-[(6-Amino) hexil]-amino-dATP; 5-propargilamino-dCTP, y 5-propargilamino-dUTP. Tales nucleótidos se pueden preparar según los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Además, un experto en la técnica podría preparar otras entidades de nucleótidos con la misma modificación amina, tales como un 5-(3-aminoalil)-CTP, GTP, ATP, dCTP, dGTP, dTTP, o dUTP en lugar de un 5-(3-aminoalil)-UTP.

2. Técnicas de marcado

En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos se marcan por adición catalítica de un nucleótido o nucleótidos ya marcados al ácido nucleico. Se pueden añadir uno o más nucleótidos marcados a moléculas de miARN. Véase la Patente de EE. UU. 6.723.509.

En otras realizaciones, un nucleótido o nucleótido sin marcar se añade catalíticamente a un miARN, y el nucleótido sin marcar se modifica con un resto químico que le capacita para ser marcado posteriormente. En realizaciones de la invención, el resto químico es un reactivo amino tal que el nucleótido es un nucleótido amino modificado.

Ejemplos de nucleótidos amino modificados son bien conocidos por los expertos en la técnica, muchos están disponibles comercialmente tal como en Ambion, Sigma, Jena Bioscience, y TriLink.

Al contrario que el marcado de ADNc durante su síntesis, el problema para marcar miARN es cómo marcar una molécula que ya existe. La presente invención se refiere al uso de una enzima capaz de utilizar un ribonucleótido o desoxirribonucleótido di o trifosfato como sustrato para su adición a un miARN, una molécula de ARN pequeña. Además en realizaciones específicas, implica el uso de un ribonucleótido di o trifosfato modificado, que se añade al extremo 3' de un miARN. La fuente de la enzima no es limitante. Ejemplos de fuentes de enzimas incluyen levaduras, bacterias gram-negativas tales como E. coli, Lactococcus lactis, y virus de la viruela ovina.

Las enzimas capaces de añadir tales nucleótidos incluyen, pero sin limitarse a estas, polimerasa poli (A), transferasa terminal, y polinucleótido fosforilasa. En realizaciones específicas de la invención, se contempla que la ligasa NO sea la enzima utilizada para añadir un marcador, y en vez de ello, se utiliza una enzima no ligasa.

La polimerasa poli(A) se ha clonado a partir de varios organismos desde vegetales hasta humanos. Se ha demostrado que cataliza la adición de tractos de homopolímero al ARN (Martin y col., RNA, 4(2):226-30, 1998).

La transferasa terminal cataliza la adición de nucleótidos al extremo 3' de un ácido nucleico.

La polinucleótido fosforilasa puede polimerizar difosfatos de nucleótidos sin necesidad de un cebador.

3. Marcadores

Los marcadores de los miARN o las sondas de miARN pueden ser colorimétricos (que incluyen el espectro visible y el UV, incluyendo los fluorescentes), luminiscentes, enzimáticos, o emisión de positrones (incluyendo los radioactivos). El marcador se puede detectar directa o indirectamente. Los marcadores radioactivos incluyen ^{125}I, ^{32}P, ^{33}P, y ^{35}S. Ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen fosfatasa alcalina, luciferasa, peroxidasa de rábano rusticano, y β-galactosidasa. Los marcadores pueden ser también proteínas con propiedades luminiscentes, por ejemplo, proteína fluorescente verde y ficoeritrina.

Los marcadores colorimétricos y fluorescentes contemplados para su uso como conjugados incluyen, pero no se limitan a estos, colorantes Alexa Flúor, colorantes BODIPY, tal como BODIPY FL; Cascada azul, Cascada amarillo; cumarina y sus derivados, tales como 7-amino-4-metilcumarina, aminocumarina e hidroxicumarina; colorantes de cianina, tales como Cy3 y Cy5; eosinas y eritrosinas; fluoresceína y sus derivados, tales como isotiocianato de fluoresceína; quelados macrocíclicos e iones de lantánidos, tales como Quantum Dye™; Azul Marina; verde Oregón; colorantes de rodamina, tales como el rojo rodamina, tetrametilrodamina y rodamina 6G; Rojo Texas; colorantes de transferencia de energía fluorescente, tales como el heterodímero de etidio-tiazol naranja, y , TOTAB.

Ejemplos específicos de colorantes incluyen, pero sin limitarse a estos, los que se han identificado anteriormente y los siguientes: Alexa Flúor 350, Alexa Flúor 405, Alexa Flúor 430, Alexa Flúor 488, Alexa Flúor 500. Alexa Flúor 514, Alexa Flúor 532, Alexa Flúor 546, Alexa Flúor 555, Alexa Flúor 568, Alexa Flúor 594, Alexa Flúor 610, Alexa Flúor 633, Alexa Flúor 647, Alexa Flúor 660, Alexa Flúor 680, Alexa Flúor 700, y, Alexa Flúor 750; colorantes amino-reactivos BODIPY, 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, Isotiocianato de Fluoresceína, HEX, 6-JOE, Verde Oregón 488, Verde Oregón 500, Verde Oregón 514, Azul pacífico, REG, Verde Rodamina, Rojo Rodamina, Renografina, ROX, SYPRO, TAMRA, 2',4',5',7'-Tetrabromosulfona Fluoresceína, y TET.

Ejemplos específicos de ribonucleótidos marcados por fluorescencia están disponibles en Molecular Probes, y estos incluyen Alexa Flúor 488-5-UTP, Fluoresceína-12-UTP, BODIPY FL-14-UTP, BODIPY TMR-14-UTP, TetrametilRodamina-6-UTP, Alexa Flúor 546-14-UTP, Rojo Texas-5-UTP, y BODIPY TR-14-UTP. Otros ribonucleótidos fluorescentes están disponibles en Amersham Biosciences, tales como Cy3-UTP y Cy5-UTP.

Ejemplos de desoxirribonucleótidos marcados por fluorescencia incluyen Dinitrofenil (DNP)-11-dUTP, Azul Cascada-7-dUTP, Alexa Flúor 488-5-dUTP, Fluoresceína-12-dUTP, Verde Oregón 488-5-dUTP, BODIPY FL-14-dUTP, Rodamina Verde-5-dUTP, Alexa Flúor 532-5-dUTP, BODIPY TMR-14-dUTP, TetrametilRodamina-6-dUTP, Alexa Flúor 546-14-dUTP, Alexa Flúor 568-5-dUTP, Rojo Texas-12-dUTP, Rojo Texas-5-dUTP, BODIPY TR-14-dUTP, Alexa Flúor 594-5-dUTP, BODIPY 630/650-14-dUTP, BODIPY 650/665-14-dUTP; Alexa Flúor 488-7-OBEA-dCTP, Alexa Flúor 546-16-OBEA-dCTP, Alexa Flúor 594-7-OBEA-dCTP, Alexa Flúor 647-12-OBEA-dCTP.

Se contempla que los ácidos nucleicos se pueden marcar con dos marcadores diferentes. Además, se puede emplear la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) en procedimientos de la invención (por ejemplo, Klostermeier y col., 2002; Emptage, 2001; Didenko, 2001, incorporados cada uno en el presente documento por referencia).

De manera alternativa, el marcador puede no ser detectable per se, sino indirectamente detectable o que es posible por el aislamiento o separación del ácido nucleico seleccionado. Por ejemplo, el marcador podría ser biotina, digoxigenina, cationes polivalentes, grupos quelantes y otros ligandos, incluidos ligandos para un anticuerpo.

4. Técnicas de visualización

Varias técnicas están disponibles fácilmente para visualizar o detectar los ácidos nucleicos marcados. La referencia de Stanley T. Crooke, 2000 trata tales técnicas (Capítulo 6), que se incorpora en el presente documento por referencia. Tales técnicas incluyen, microscopía, matrices, fluorometría, cicladores de luz y otras máquinas de PCR en tiempo real, análisis FACS, contadores de centelleo, fosfoimágenes, contadores Geiger, MRI, CAT, procedimientos de detección basado en anticuerpos (Westerns, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica), técnicas histoquímicas, HPLC (Griffey y col., 1997), espectroscopia, electroforesis en gel de capilaridad (Cummins y col., 1996), espectroscopia; espectroscopia de masas; técnicas radiológicas; y técnicas de equilibrio de masas.

Cuando se emplean dos o más marcadores coloreados diferencialmente, se pueden emplear técnicas de transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET) para caracterizar el ARNds. Además, un experto en la técnica está bien informado de formas de visualización, identificación, y caracterización de ácidos nucleicos marcados, y en consecuencia, tales protocolos se pueden utilizar como parte de la invención. Ejemplos de herramientas que también se pueden utilizar incluyen la microscopía fluorescente, un BioAnalyzer, un lector de placas, Storm (Molecular Dynamics), escáner de matriz, FACS (clasificador celular activada fluorescente), o cualquier instrumento que tiene la capacidad de excitar y detectar una molécula fluorescente.

III. Aplicaciones terapéuticas

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

En las aplicaciones terapéuticas, una cantidad eficaz de los miARN sintéticos de la presente invención se administran a una célula, la cual puede estar o no en un animal. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz de los miARN sintéticos o inhibidores de miARN de la presente invención se administra a un individuo para el tratamiento del cáncer. La expresión “cantidad eficaz” como se utiliza en el presente documento se define como la cantidad de 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 utiliza en el presente documento se define como la cantidad de moléculas de la presente invención que consiguen el efecto deseado con respecto al cáncer. Un experto reconoce fácilmente que en muchos casos las moléculas pueden no proporcionar una cura pero pueden proporcionar un beneficio parcial, tal como el alivio o la mejoría de al menos un síntoma. En algunas realizaciones, un cambio fisiológico que tiene algún beneficio se considera terapéuticamente beneficioso. Por lo tanto, en algunas realizaciones, una cantidad de moléculas que proporcionan un cambio fisiológico se considera una “cantidad eficaz” o una “cantidad terapéuticamente eficaz”.

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

A. Modos de administración y formulaciones

Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden administrarse a un sujeto solas o en forma de una composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de una manera convencional utilizando uno o más vehículos fisiológicamente aceptables, diluyentes, excipientes o auxiliares que facilitan el procesamiento de las proteínas en preparaciones que se pueden utilizar farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la ruta de administración que se elija.

Para la administración tópica, las proteínas de la invención se pueden formular como soluciones, geles, ungüentos, cremas, suspensiones, etc. como se conocen bien en la técnica. Las formulaciones sistémicas incluyen las designadas para la administración por inyección, por ejemplo, inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratecal o intraperitoneal, así como aquellas designadas para la administración vía transdérmica, transmucosa, inhalatoria, oral o pulmonar. Para inyección, los ácidos nucleicos de la invención se pueden formular en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como la solución de Hank, solución de Ringer, o tampón salino fisiológico. La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes de

suspensión, estabilización y/o dispersión. De manera alternativa, las moléculas de ácido nucleico pueden estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso. Para la administración transmucosa, en la formulación se utilizan penetrantes de barrera apropiados para que se absorban. Tales penetrantes generalmente se conocen en la técnica. Para la administración oral, los ácidos nucleicos se pueden formular fácilmente combinando las moléculas con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales vehículos capacitan a los ácidos nucleicos de la invención para formularse como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares. Para las formulaciones sólidas vía oral 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, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetil celulosa sódica, y/o polivinilpirrolidona (PVP); agentes granulantes; y agentes aglutinantes. Si se desea se pueden añadir agentes desintegrantes, tales como polivinilpirrolidona reticular, agar, o ácido algínico o una sal del mismo tal como alginato sódico. Si se desea, las formas de dosificación sólida pueden estar revestidas con azúcar o revestimiento entérico utilizando técnicas de referencia. Para las preparaciones líquidas por vía oral tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones, se pueden añadir, vehículos adecuados, excipientes o diluyentes incluyendo el agua, glicoles, aceites, alcoholes, etc. Adicionalmente se pueden añadir, agentes saborizantes, conservantes, agentes colorantes y similares. Para la administración bucal, las moléculas pueden tomar la forma de comprimidos, comprimidos para chupar, etc. formulados de una manera convencional. Para la administración por inhalación, las moléculas para su uso de acuerdo con la presente invención se suministran convenientemente en forma de un pulverizador en aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorofluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluorometano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de gelatina para su uso en un inhalador o insuflador se pueden formular de forma que contenga una mezcla en polvo de ácidos nucleicos y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón. Las moléculas de ARN también se pueden formular en composiciones rectales o vaginales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contengan las bases para supositorios tales como la manteca de coco u otros glicéridos.

Además de las formulaciones descritas anteriormente, las moléculas pueden formularse también como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por implantación (por ejemplo subcutáneamente o intramuscularmente) o por inyección intramuscular. Por lo tanto, por ejemplo, las moléculas se pueden formular con materiales poliméricos o hidrofóbicos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite adecuado) o resinas de intercambio de iones, o en derivados moderadamente solubles, por ejemplo una sal moderadamente soluble.

De manera alternativa, se pueden utilizar otros sistemas farmacéuticos de suministro. Los liposomas y emulsiones son ejemplos bien conocidos de vehículos de suministro que se pueden utilizar para suministrar los ácidos nucleicos de la invención.

Un ácido nucleico de la invención se puede administrar en combinación con un vehículo o lípido para aumentar la captación celular. Por ejemplo, el oligonucleótido se puede administrar en combinación con un lípido catiónico. Ejemplos de lípidos catiónicos incluyen, pero sin limitarse a estos, lipofectina, DOTMA, DOPE, y DOTAP. La publicación WO0071096, por ejemplo, describe diferentes formulaciones, tales como DOTAP: formulación de colesterol o derivada de colesterol que se puede utilizar eficazmente para terapia genética. Otras divulgaciones también tratan diferentes formulaciones lipídicas o liposómicas incluyendo nanopartículas y procedimientos de administración; estas incluyen, pero no se limitan a, Publicaciones de Patentes de EE. UU. 20030203865, 20020150626, 20030032615, y 20040048787. Los procedimientos para formar partículas se desvelan también en las Pat. de EE. UU. N^{os} 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 se pueden administrar también en combinación con aminas catiónicas tales como la poli (L-lisina). Los ácidos nucleicos se pueden también conjugar con resto químico, tal como transferrina y colesterilos. Además, los oligonucleótidos se pueden dirigir a ciertos orgánulos por unión específica de grupos químicos específicos al oligonucleótido. Por ejemplo, uniendo el oligonucleótido a una matriz adecuada de restos de manosa dirigirá el oligonucleótido al hígado.

Adicionalmente, las moléculas se pueden suministrar utilizando un sistema de liberación sostenida, tal como matrices semipermeables de polímeros sólidos que contienen el agente terapéutico. Se han establecido varios materiales de liberación sostenida y son bien conocidos por los expertos en la técnica. Las cápsulas de liberación sostenida pueden, dependiendo de su naturaleza química, liberar las moléculas durante unas pocas semanas hasta más de 100 días. Dependiendo de la naturaleza química y la estabilidad biológica de moléculas quiméricas, se pueden emplear estrategias adicionales para la estabilización de las moléculas.

Los ácidos nucleicos se pueden incluir en cualquiera de las formulaciones descritas anteriormente como ácidos libres o bases o como sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables son las sales que mantienen 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 y otros disolventes próticos que las correspondientes formas de bases libres.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad eficaz de una o más moléculas de miARN sintéticos o inhibidores de miARN disueltos o dispersos en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las frases "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica o inadecuada cuando se administra a un animal, por ejemplo, un ser humano, como es apropiado. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos un polipéptido quimérico o un principio activo adicional será conocida por un experto en la técnica 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 a animales (por ejemplo, seres humanos), se entenderá que las preparaciones puede que necesiten cumplir con las referencias de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza que requiere la oficina de Referencias Biológicas de la FDA.

Como se utiliza 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 de retraso de absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizadores de fármacos, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, colorantes, tales como materiales y combinaciones de las mismas, como sería conocido por un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329). Excepto si no es cualquiera de los vehículos compatibles con el principio activo, su uso se contempla en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

Las moléculas quiméricas pueden comprender diferentes tipos de vehículos dependiendo de si se van a administrar en forma sólida, líquida o en aerosol, y si se necesita, que estén estériles para tales vías de administración como las inyecciones. La presente invención se puede administrar por vía intravenosa, intradérmica, intraarterial, intraperitoneal, intralesional, intracraneal, intraarticular, intraprostática, intrapleural, intratraqueal, intranasal, intravítrea, intravaginal, intrarrectal, tópica, intratumoral, intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, subconjuntival, intravesicular, mucosa, intrapericárdica, intraumbilical, intraocular, oral, tópica, local, por inhalación (por ejemplo, inhalación de un aerosol), por inyección, infusión, infusión continua, perfusión localizada, baño de células diana directamente, por medio de un catéter, por medio de un lavado, en crema, en composiciones lipídicas (por ejemplo, liposomas), o por otro procedimiento o cualquier combinación de los anteriores como conocería un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990).

La cantidad de dosificación actual de una composición de la presente invención que se administra a un paciente animal se puede determinar por factores físicos y fisiológicos tales como peso corporal, gravedad de la afección, el tipo de enfermedad que se va a tratar, intervenciones terapéuticas concurrentes o previas, idiopatía del paciente y la ruta de administración. El médico responsable de la administración, determinará, en cada caso, la concentración de principio(s) activo(s) en una composición y la dosis adecuada(s) para un sujeto particular.

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente el 0,1% de un principio activo. En otras realizaciones, el principio activo puede estar comprendido entre aproximadamente un 2% a aproximadamente un 75% del peso de la unidad, o entre aproximadamente un 25% a aproximadamente un 60%, por ejemplo, y cualquier intervalo derivable del mismo. En otros ejemplos no limitantes, una dosis puede también comprender desde aproximadamente un 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 10000 mg/kg de peso corporal o más por administración, y cualquier intervalo derivable del mismo. En ejemplo no limitantes de un intervalo derivable de los números listados aquí, se puede administrar un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, 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 varios antioxidantes para retrasar la oxidación de uno o más componentes. Adicionalmente, se puede conseguir la prevención de la acción de microorganismos con conservantes tales como varios 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 se pueden formular en una composición en forma de bases libres, neutras o sales. Las sales farmacéuticamente aceptables, incluyen las sales por adición de ácidos, por ejemplo, las que se forman con los grupos amino libres de una composición proteinácea, o las que se forman con ácidos inorgánicos tales como por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como el acético, oxálico, tartárico o mandélico. Las

sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar a partir de bases inorgánicas tales como por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos; o bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína.

En realizaciones en las que la composición está en forma líquida, un vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que comprende pero no se limita a agua, etanol, poliol, (por ejemplo, glicerol, propilenglicol polietilenglicol líquido, etc.), lípidos (por ejemplo, triglicéridos, aceites vegetales, liposomas) y combinaciones de los mismos. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, por el uso de un revestimiento, tal como lecitina; por el mantenimiento del tamaño de partícula que se necesita por dispersión en vehículos tales como, por ejemplo poliol líquido o lípidos; por el uso de tensioactivos tales como, por ejemplo hidroxipropilcelulosa; o combinaciones de tales 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 utilizar gotas oftálmicas, soluciones nasales o pulverizadores, aerosoles o inhalantes en la presente invención. Tales composiciones se diseñan generalmente para ser compatibles con el tipo de tejido diana. En un ejemplo no limitante, las soluciones nasales habitualmente son soluciones acuosas diseñadas para administrarse en los conductos nasales en gotas o pulverizadores. Las soluciones nasales se preparan de forma que son similares en muchos aspectos a las secreciones nasales, de forma que se mantenga la acción ciliar normal. Por lo tanto, en realizaciones preferidas las soluciones nasales acuosas son habitualmente isotónicas o ligeramente tamponadas para mantener un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5. Además, se pueden incluir en la formulación conservantes antimicrobianos, similares a los que se utilizan en preparaciones oftálmicas, fármacos, o estabilizantes de fármacos apropiados, si es necesario. Por ejemplo, se conocen varias 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 con cubierta dura o blanda), formulaciones de liberación sostenida, composiciones bucales, trociscos, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, o combinaciones de los mismos. Las composiciones orales se pueden incorporar directamente con el alimento de la dieta. 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 se puede preparar como un jarabe o un elixir. Un jarabe o elixir que puede comprender, por ejemplo, al menos un principio activo, un agente edulcorante, un conservante, un agente saborizante, 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 desintegración, lubricantes, agentes saborizantes y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, una 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 magnésico, sacarina sódica, celulosa, carbonato magnésico 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 magnésico; un agente edulcorante, tal como, por ejemplo, sacarosa, lactosa, sacarina o combinaciones de las mismas; un agente saborizante, tal como, por ejemplo menta, aceite de gaulteria, saborizante de cereza, saborizante de naranja, etc.; o combinaciones de los anteriores. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, vehículos tales como un vehículo líquido. Otros varios materiales pueden estar presentes como revestimientos o de otra manera que modifiquen la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras, o cápsulas se pueden cubrir con goma laca, azúcar o ambas.

La composición debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento, y se debe conservar contra la acción contaminante de los microorganismos, tales como bacterias y hongos. Se debe apreciar que la contaminación con endotoxinas se debería mantener mínimamente a un nivel seguro, por ejemplo, menos de 0,5 ng/mg de proteína.

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

Cualquiera de las realizaciones tratadas anteriormente con respecto al suministro o transporte a las células también se puede emplear con respecto a implementar el suministro de compuestos medicinales tratados en esta sección.

B. Dosificaciones eficaces

Las moléculas de la invención se utilizarán generalmente en una cantidad eficaz para alcanzar el fin que se pretende. Para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer, las moléculas de la invención, o las composiciones farmacéuticas de las mismas, se administran o aplican en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad eficaz para mejorar o prevenir los síntomas, o prolongar la supervivencia de

los pacientes que se tratan. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

Para la administración sistémica, una dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos *in vitro*. Por ejemplo, una dosis se puede formular en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración circulante que incluye la CI_{50} que se determina en un cultivo celular. Tal información se puede utilizar para determinar con más precisión las dosis útiles en seres humanos.

Las dosis iniciales también se pueden estimar a partir de datos *in vivo*, por ejemplo, con modelos animales, utilizando técnicas que se conocen bien en la técnica. Un experto habituado en la técnica podría fácilmente optimizar la administración en seres humanos basándose en los datos de animales.

La cantidad y el intervalo de dosificación se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles en el plasma de las moléculas que sean suficientes para mantener el efecto terapéutico. Las dosificaciones habituales en los pacientes para su administración por inyección varían desde aproximadamente 0,1 a 5 mg/kg/día, preferentemente de aproximadamente 0,5 a 1 mg/kg/día. Los niveles en suero terapéuticamente eficaces se pueden alcanzar administrando múltiples dosis cada día.

En los casos de administración local o de captación selectiva, la concentración eficaz local de las proteínas puede no relacionarse con la concentración en el plasma. Un experto en la técnica será capaz de optimizar las dosificaciones terapéuticamente locales sin una experimentación innecesaria.

La cantidad de moléculas administradas dependerá, por supuesto, del sujeto que se vaya a tratar, del peso del sujeto, la gravedad de la afección, la manera de administración y el juicio el médico que las prescribe.

La terapia se puede repetir intermitentemente mientras son detectables los síntomas o incluso cuando no son detectables. La terapia puede proporcionarse sola o en combinación con otros fármacos o tratamientos (incluyendo la cirugía).

C. Toxicidad

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

La toxicidad de las moléculas descritas en el presente documento se puede determinar por procedimientos farmacéuticos de referencia en cultivos celulares o animales de experimentación, 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 dosis de la relación entre los efectos tóxico y terapéutico es el índice terapéutico. Se prefieren las proteínas que muestran altos índices terapéuticos. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo celular y estudios con animales se pueden utilizar en la formulación de un intervalo de dosificación que no sea tóxico para su uso en seres humanos. La dosificación de las proteínas descrita en el presente documento se basa preferentemente en un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen dosis eficaces con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar en este intervalo de concentraciones circulantes dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La formulación, vía de administración y dosificación exactas la puede elegir el médico individual en vista de la afección del paciente, (Véase, por ejemplo, Fingl y col., 1975, En: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Cáp.1, p.1).

D. Grupos laterales

Se puede fijar o conjugar un “grupo lateral” con un ácido nucleico. Los grupos laterales pueden aumentar la captación celular del ácido nucleico. Los grupos laterales se pueden unir a cualquier parte del ácido nucleico pero comúnmente se unen a los extremos de la cadena de oligonucleótido. Ejemplos de grupos laterales incluyen, pero sin limitarse a estos: derivados de acridina (es decir, 2-metoxi-6-cloro-9-aminoacridina); reticulares tales como derivados del psoraleno, azidofenacilo, proflavina, y azidoproflavina; endonucleasas artificiales; complejos de metal tales como el EDTA-Fe (II), o-fenantrolina-Cu(I), y porfirina-Fe (II): restos alquilantes; nucleasas tales como nucleasa amino-1-hexanolstafilocócica y fosfatasa alcalina; transferasas terminales; abzimas; restos de colesterilo; portadores lipofílicos; conjugados peptídicos; alcoholes de cadena larga; ésteres de fosfato; amino; grupos mercapto; marcadores radioactivos; marcadores no radioactivas tales como colorantes; y polilisina u otras poliaminas. En un ejemplo, el ácido nucleico se conjuga con un carbohidrato, carbohidrato sulfatado, o glucano.

Ejemplos

A menos de que se designe otra cosa, los números de catálogo se refieren a los productos disponibles en Ambion, Inc. con ese número.

Ejemplo 1:

Ensayo para medir la actividad de miARN precursores (indicadores)

Se crearon una serie de vectores indicadores de luciferasa para medir las actividades de los miARN sintéticos en las células. Los vectores indicadores se basaron en plásmidos que se había utilizado para controlar la actividad de miARN endógenos (trabajo de Tuschl). En resumen, se creó un vector de expresión de mamífero con el gen de la luciferasa bajo el control del promotor precoz de CMV. Corriente abajo de la secuencia codificante de luciferasa, en la UTR 3' del gen, se añadieron secuencias complementarias a miR-1-2, miR-10, miR-124, miR-19a, y miR-130 maduros. Los vectores indicadores se co-transfectaron en células HeLa junto con miARN sintéticos diseñados para introducir uno de los cinco miARN enumerados anteriormente. Las transfecciones implicaban la mezcla de 200 ng de vector indicador con 0,3, 1, y 3 pmoles de cada uno de los miARN sintéticos correspondientes. La mezcla indicador/miARN se mezcló con 0,3 µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y se incubó durante 5-15 minutos. Se añadieron aproximadamente 8.000 células a cada complejo miARN/indicador/reactivo de transfección en pocillos individuales de una placa de 96 pocillos. Se cultivaron las células HeLa en D-MEM (GIBCO) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (GIBCO) a 37 ºC y un 5% de CO_2. A las 24-48 horas tras la transfección, las células se recolectaron y se ensayaron utilizando el ensayo de Luciferasa como describe el fabricante (Promega). El nivel de expresión de Luciferasa en las poblaciones celulares se comparó con las células transfectadas con el mismo indicador pero con un miARN sintético con una secuencia que no corresponde al vector. A este miARN no dirigido se le designó como el miARN control negativo.

El análisis final de los diseños de miARN implicaba la medición de la actividad tanto de la cadena activa como de la complementaria de los miARN de la invención. Para estos estudios, se crearon vectores indicadores con secuencias 3' UTR de luciferasa que incluían regiones complementarias tanto a la cadena activa como a la complementaria de los diseños de miARN sintéticos miR-33 y let-7b de la invención. Cuando los indicadores se co-transfectan con miARN sintéticos que no funcionan, los indicadores con una secuencia seleccionada por la cadena complementaria muestran una expresión de luciferasa reducida debido a que la cadena complementaria de los miARN sintéticos entran en la ruta de miARN además o incluso en vez de la cadena activa que es la que se desea. Para estos experimentos, los protocolos de co-transfección y análisis del indicador son idénticos a los descritos anteriormente.

Ejemplo 2

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

Como las construcciones de indicador de luciferasa eran extremadamente valiosas para evaluar los diseños de miARN sintético, era importante verificar los hallazgos de las construcciones indicadoras midiendo los efectos de los miARN sintéticos sobre los genes diana. Para estos estudios, se eligió como control la expresión de RAS y MYC en células transfectadas con miARN let-7. Tanto RAS como MYC están regulados negativamente por varios miembros de la familia let-7 en seres humanos y C. elegans. Utilizando un sistema de micromatrices específico para miARN, los inventores encontraron que las células HepG2 expresaban niveles no detectables de let-7. Para ensayar las actividades de los varios diseños de miARN de la invención, se crearon miARN let-7 y se utilizaron para transfectar HepG2 en placas de 24 pocillos utilizando siPORT *NeoFx* (Ambion) según las sugerencias del fabricante. La reducción relativa en la expresión de la proteína diana en las células transfectadas con let-7 sintético se determinó comparando la intensidad de tinción de MYC y RAS con las células transfectadas con un miARN control negativo utilizando el software MetaMorph.

Para asegurarse de que los resultados de los ensayos del let-7 de la invención se podría verificar por interacciones adicionales de miARN que se observan en las células naturalmente, los inventores han creado ensayos para dos miARN adicionales con dianas verificadas. En el primero, se ha desarrollado un ensayo PCR™ en tiempo real para medir el nivel de ARNm HOXB8 en células transfectadas con el miR-196 sintético. Se ha demostrado que el miR-196 induce la degradación de ARNm HOXB8 en las células. Cuando se transfectaba en células cultivadas utilizando siPORT *NeoFx* según las instrucciones del fabricante, los diseños eficaces de miARN sintéticos miR-196 reducen los niveles de ARNm HOXB8.

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

Ejemplo 3

Efectividad de miARN parcialmente complementarios

Se compararon tres secuencias generales de diseños en cuanto a la actividad de miARN. La primera, a la que se designa como "diseño miARN", presentaba una cadena activa idéntica al miARN maduro que se encuentra en animales y una cadena complementaria que era idéntica a una secuencia en horquilla que se predecía que existía en las células durante el procesamiento del miARN antes de la activación del miARN (véase posteriormente). El segundo diseño, al que se designa como "diseño sin coincidencia", era un híbrido de la misma cadena activa anterior con una cadena complementaria con un dinucleótido, protuberante en 3' y dos faltas de coincidencia en los cinco nucleótidos finales que precedían a la protuberancia en 3' (véase posteriormente). El tercer diseño, designado como "diseño ARNsi", comprende la misma cadena activa anterior hibridada con un segundo ARN que era totalmente

complementario excepto por que dejaba protuberancias de dinucleótido 3' o bien en el final de la molécula de doble cadena (dos polinucleótidos) (véase posteriormente). Los ejemplos posteriores implican o se corresponden con miARN humanos.

miR-1-2

secuencia de miR-1-2 maduro - UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUA (53-73 of SEC ID Nº 1)
diseño miARN = CAUACUUCUUUAUAUGCCCAUA (SEC ID Nº 594) + UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUA (SEC ID Nº 595)
diseño sin coincidencia = CAUACUUCUUUACAUUCUGTT (SEC ID Nº 596) + UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUA (SEC ID Nº 597)
diseño ARNsi = CAUACUUCUUUACAUUCCATT (SEC ID Nº 598) + UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUA (SEC ID Nº 599)

mir-124a-1

secuencia miR-124 maduro - UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA (52-73 of SEC ID Nº 80)
diseño miARN = GUGUUCACAGCGGACCUUGAUU (SEC ID Nº 600) + UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA (SEC ID Nº 601)
diseño sin coincidencia = GCAUUCACCGCGUGCCUUGGTT (SEC ID Nº 602) + UUAAGGCACGCGGUGAAU GCCA (SEC ID Nº 603)
diseño ARNsi = GCAUUCACCGCGUGCCUUAATT (SEC ID Nº 604) + UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA (SEC ID Nº 605)

miR-130a

secuencia miR-130 maduro - CAGUGCAAUGUUAAAAGGGC (55-74 of SEC ID Nº 91)
diseño miARN = UCUUUUCACAUUGUGCUAC (SEC ID Nº 606) + CAGUGCAAUGUUAAAAGGGC (SEC ID Nº 607)
diseño sin coincidencia = UAUUUUAACAUUGCACUGTT (SEC ID Nº 608) + CAGUGCAAUGUUAAAAGGGC (SEC ID Nº 609)
diseño ARNsi = CCUUUUAACAUUGCACUGTT (SEC ID Nº 610) + CAGUGCAAUGUUAAAAGGGC (SEC ID Nº 611)

miR-19a

secuencia miR-19a maduro - UGUGCAAAUCUAUGCAAAACUGA (49-71 of SEC ID Nº 28)
diseño miARN = AGUUUUGCAUAGUUGCACUA (SEC ID Nº 612) + UGUGCAAAUCUAUGCAAAACUGA (SEC ID Nº 613)
diseño sin coincidencia = ACAUUUGCAUAGAUUUGCACATT (SEC ID Nº 614) + UGUGCAAAUCUAUGCAAAA CUGA (SEC ID Nº 615)
diseño ARNsi = AGUUUUGCAUAGAUUUGCACATT (SEC ID Nº 616)+ UGUGCAAAUCUAUGCAAAACUGA (SEC ID Nº 617)

mmu-miR-10a-1 (ratón)

secuencia miR-10 maduro - UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUG (22-44 of SEC ID Nº 212)
diseño miARN = CAAAUUCGUAUCUAGGGGAAUA (SEC ID Nº 618) + UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUG (SEC ID Nº 619)
diseño sin coincidencia = AGAAUUCGGAUCUACAGGGUATT (SEC ID Nº 620) + UACCCUGUAGAUCCGAAU UUGUG (SEC ID Nº 621)
diseño ARNsi = CAAAUUCGGAUCUACAGGGUATT (SEC ID Nº 622) + UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUG (SEC ID Nº 623)

miR-33

secuencia miR-33 maduro - GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (6-24 of SEC ID Nº 57)
miARN = AUGUUUCCACAGUGCAUCA (SEC ID Nº 624) + GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (SEC ID Nº 625)
diseño sin coincidencia = GUCCAACUACAAUGCACTT (SEC ID Nº 626) + GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (SEC ID Nº 627)
diseño ARNsi = AUGCAACUACAAUGCACTT (SEC ID Nº 628) + GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (SEC ID Nº 629)

let-7b

secuencia let-7b maduro - UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (6-27 of SEC ID Nº 6)
diseño miARN = CUAUACAACCUACUGCCUUCC (SEC ID Nº 630) + UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (SEC ID Nº 631)

diseño sin coincidencia = CCACACAACCUACUAUCUUATT (SEC ID Nº 632) + UGAGGUAGUAGGUUGUGUG GUU (SEC ID Nº 633)
diseño ARNsi = CCACACAACCUACUACCUCATT (SEC ID Nº 634) + UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (SEC ID Nº 635)

miR-196-2

secuencia miR-196 maduro - UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGG (7-27 of SEC ID Nº 143)
diseño ARNsi = AACAACAUGAAACUACCUATT (SEC ID Nº 636) + UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGG (SEC ID Nº 637)
diseño miARN = CAAAUUCGUAUCUAGGGGAAUA (SEC ID Nº 638) + UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGG (SEC ID Nº 639)
diseño sin coincidencia = AAUAACAUGAAACUACCUATT (SEC ID Nº 640) + UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGG (SEC ID Nº 641)

Se ensayó la capacidad de varios miARN sintéticos miR-1-2, mmu-miR-10a-1, miR-19a, miR-124a-1, y miR-130a para reducir la expresión del gen indicador en vectores con sitios diana apropiados para miARN utilizando el ensayo descrito en el Ejemplo 1. Los tres diseños fueron capaces similarmente de regular negativamente los vectores indicadores adecuados.

Para evaluar si había diferencias entre los distintos diseños de miARN en su capacidad para afectar la expresión de los genes endógenos, se transfectaron las siguientes células: células HepG2 con tres diseños de los miARN sintéticos let-7, A549 con tres diseños de miARN sintéticos miR-196, y HeLa con el vector indicador G6PD y tres diseños del miARN sintético miR-1-2. Como con los vectores indicadores, los tres diseños miARN sintéticos eran capaces de reducir la expresión de los genes diana, aunque hay que destacar que el diseño ARNsi lo llevaba a cabo más pobremente.

Como comparación final de los tres diseños de miARN sintéticos, los miARN sintéticos se co-transfectaron con los vectores indicadores que incluyen sitios diana para las cadenas complementarias de los miARN sintéticos según el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. En este ensayo, era aparente que el diseño ARNsi afectaba significativamente los vectores indicadores, indicando que la cadena errónea del miARN entraba en la ruta del miARN (FIG. 3). Debido a que la cadena complementaria puede impactar en la expresión de genes que no son dianas naturales del miARN que se están estudiando, el diseño ARNsi es inapropiado para los miARN sintéticos eficaces.

Ejemplo 4

Eficacia de miARN sintéticos modificados quimicamente en el extremo 5'

Aunque el diseño ARNsi se mostró problemático porque mostraba una alta tasa de captación de la cadena complementaria por la ruta miARN, tenía la ventaja de que era fácil de hibridar y fácil de suministrar a las células. Por estas razones, se exploraron las maneras de superar los problemas con la captación de las cadenas complementarias. El diseño ARNsi se utilizó para ensayar los efectos de las modificaciones químicas en los extremos 5' de los miARN sintéticos. Para estos estudios, se sintetizaron varias cadenas complementarias diferentes con extremos 5' únicos. Una de ellas mostraba cuatro nucleótidos desoxirribosa en el extremo 5'; otro era una combinación de cuatro nucleótidos desoxirribosa en el extremo 5' y un NH_2 5'; otro tenía un NH_2 5'; otro tenía un 5' $NHCOCH_3$ (véase posteriormente).

miR-33

secuencia miR-33 maduro - GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (6-24 de SEC ID Nº 57)
diseño ARNsi = AUGCAACUACAAUGCACTT (SEC ID Nº 642) + GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (SEC ID Nº 643)
diseño 5' amino = (NH_2) AUGCAACUACAAUGCACTT (SEC ID Nº 644) + GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (SEC ID Nº 645)
diseño 5' acetilo = (CH_3OCNH) AUGCAACUACAAUGCACTT (SEC ID Nº 646) + GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (SEC ID Nº 647)
diseño 5' DNA = dAdUdGdCAACUACAAUGCACTT (SEC ID Nº 648) + GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (SEC ID Nº 649)
diseño 5' amino DNA = (NH_2) dAdUdGdCAACUACAAUGCACTT (SEC ID Nº 650) + GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (SEC ID Nº 651)

let-7b

secuencia let-7b maduro - UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (6-27 of SEC ID Nº 6)
diseño ARNsi = CCACACAACCUACUACCUCATT (SEC ID Nº 652) + UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (SEC ID Nº 653)

diseño 5' amino = NH_2 CCACACAACCUACUACCUCATT (SEC ID Nº 654) + UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGU U (SEC ID Nº 655)
diseño 5' DNA = dCdCdAdCACAACCUACUACCUCATT (SEC ID Nº 656) + UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (SEC ID Nº 657)
diseño 5' amino DNA = NH_2 dCdCdAdCACAACCUACUACCUCATT (SEC ID Nº 658) + UGAGGUAGUAGGUUG UGUGGUU (SEC ID Nº 659)

miR-1-2

secuencia miR-1-2 maduro - UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUA (53-73 of SEC ID Nº 1)
diseño ARNsi = CAUACUUCUUUACAUUCCATT (SEC ID Nº 660) + UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUA (SEC ID Nº 661)
diseño 5' amino = NH_2 CAUACUUCUUUACAUUCCATT (SEC ID Nº 662) + UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUA (SEC ID Nº 663)

miR-124a-1

secuencia miR-124 maduro - UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA (52-73 of SEC ID Nº 80)
diseño ARNsi = GCAUUCACCGCGUGCCUUAATT (SEC ID Nº 664) + UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA (SEC ID Nº 665)
diseño 5' amino = NH_2 GCAUUCACCGCGUGCCUUAATT (SEC ID Nº 666) + UUAAGGCACGCGGUGAAUGCC A (SEC ID Nº 667)

miR-130a

secuencia miR-130 maduro - CAGUGCAAUGUUAAAAGGGC (55-74 of SEC ID Nº 91)
diseño ARNsi = CCUUUUAACAUUGCACUGTT (SEC ID Nº 668) + CAGUGCAAUGUUAAAAGGGC (SEC ID Nº 669)
diseño 5' amino = NH_2 CCUUUUAACAUUGCACUGTT (SEC ID Nº 670) + CAGUGCAAUGUUAAAAGGGC (SEC ID Nº 671)

miR-10a-1

secuencia miR-10 maduro - UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUG (22-44 of SEC ID Nº 212)
diseño ARNsi = CAAAUUCGGAUCUACAGGGUATT (SEC ID Nº 672) + UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUG (SEC ID Nº 673)
diseño 5'amino = NH_2 CAAAUUCGGAUCUACAGGGUATT (SEC ID Nº 674) + UACCCUGUAGAUCCGAAUUUG UG (SEC ID Nº 675)

Los miARN sintéticos miR-33 y let-7b se co-transfectaron en células HeLa y HepG2, respectivamente, con vectores indicadores que tenían 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 complementaria y activa se midieron según el protocolo del fabricante (Promega). Como se muestra en la FIG.3, los diseños miARN sintéticos con el 5' NH_2 y 5' $NHCOCH_3$ proporcionaban una actividad mayor de la cadena activa y reducía significativamente la actividad de la cadena complementaria con respecto a los miARN sintéticos sin modificar. Esto es ideal para los miARN sintéticos puesto que los efectos que se ven 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 que se utilicen menores concentraciones en las transfecciones y se reduce la toxicidad que se observa a menudo cuando se transfectan las células con cantidades mayores de ácido nucleico.

Para confirmar que la modificación 5' amino es superior a los diseños ARNsi de referencia en un amplio grupo de miARN, se midió la eficacia de ambos diseños de miARN sintético en células co-transfectadas con vectores indicadores con sitios diana de miARN. Como se aprecia en la FIG. 4, el 5' NH_2 es superior de manera reproducible al diseño sin modificar de ARNsi.

Ejemplo 5

Selección de miARN en la biblioteca de miARN sintéticos que tiene influencia en la proliferación celular

Una característica distintiva del cáncer es la proliferación celular incontrolada; habitualmente los investigadores utilizan ensayos de proliferación celular para estudiar la influencia de los genes en la oncogénesis. Se utilizó un ensayo de proliferación celular en conjunción con la biblioteca de inhibidores de miARN para identificar los miARN que tenían influencia sobre la proliferación celular.

Los inventores transfectaron por triplicado células HeLa con quince miARN sintéticos diferentes utilizando siPORT *NeoFx* (Ambion) según las instrucciones del fabricante (FIG. 6). Se analizaron las células HeLa utilizando Azul Alamar (BioSource International, Inc., CA) a intervalos de 24 h. El Azul Alamar es un compuesto, que cuando se reduce en el metabolismo celular, cambia de un color azul no fluorescente a una forma roja fluorescente que es

fácilmente cuantificable. La cantidad de Azul Alamar reducido es directamente proporcional al número de células, proporcionando un procedimiento rápido para evaluar la proliferación celular. Para llevar a cabo el ensayo, se añadió el reactivo Azul Alamar en el medio de cultivo tisular con una concentración final del 10%. Se incubó la mezcla durante 3-6 h en condiciones de crecimiento tras lo cual se cuantificó la fluorescencia utilizando un Spectra Max™ GeminisXS™ (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Las células transfectadas con miR-124 y miR-106 sintéticos mostraban una proliferación menor que las muestras transfectadas con el control negativo, así como las muestras transfectadas con los otros miARN sintéticos.

Ejemplo 6

Selección de miARN en la biblioteca de inhibidores de miARN que tienen influencia en la proliferación celular

Una característica distintiva del cáncer es la proliferación celular incontrolada. Los investigadores utilizan habitualmente ensayos de proliferación para estudiar la influencia de los genes en la oncogénesis. Se utilizó un ensayo de proliferación en conjunción con la biblioteca de miARN inhibidor para identificar los miARN que tenían influencia en la proliferación celular.

Se transfectaron las células con una biblioteca de unos 90 inhibidores de miARN para identificar los miARN que están implicados en el crecimiento celular. Las células HeLa (8.000 células/pocillo de una placa de 96 pocillos) se transfectaron por triplicado con 5 pmoles de inhibidores de miARN utilizando siPORT™ *NeoFx*™ (Ambion). Los medios se cambiaron a las 24 h tras la transfección. A las 72 h tras la transfección, los inventores fijaron las células con paraformaldehído al 4%, se permeabilizaron con 0,1% de TritonX 100, y se tiñeron con yoduro de propidio para ver el número total de células. Las placas se exploraron utilizando el TTP LabTech Acumen Explorer. El número de células se representó en relación a las células transfectadas con un inhibidor de miARN control negativo (FIG. 7). Las barras rojas horizontales agrupan la variación normal en la proliferación celular (variación del 20%). Inserciones: Los inhibidores de miARN específicos que o bien aumentan la proliferación celular (flecha izquierda) o que no afectan la proliferación celular (flecha derecha) se utilizaron en una segunda ronda de selección. Las células HeLa se transfectaron con estos inhibidores de miARN y se fijaron y tiñeron las células con un anticuerpo anti b-actina y DAPI para visualizar los cambios en la morfología celular en respuesta a la función del miARN específico. Las células se transfectaron con el inhibidor de miARN que aumentaba la proliferación celular mostraba una marcada alteración de la morfología celular (inserción izquierda) frente a la morfología normal (inserción derecha).

Se identificó un grupo de nueve inhibidores de miARN (miR 31, 150, 187, 125a, 190, 191, 193, 204 y 218) que producían descensos significativos del crecimiento celular y dos inhibidores de miARN que producían un aumento significativo (miR 24 y miR 21) del crecimiento celular después de la transfección en las células HeLa (Tabla 4). La inhibición de miARN-31 también producía una morfología celular distintiva. Se eligió un punto de corte del 20% por encima y del 100% por debajo como genes que se consideraban cambiados significativamente. Estos resultados demuestran la capacidad de los miARN individuales humanos para regular procesos celulares importantes, Además, la diversidad de los efectos demuestra la complejidad potencial del os resultados celulares de la regulación de la expresión genética mediada por miARN.

Tabla 4. miARN que afectan la proliferación celular

miARN	Impacto relativo sobre la proliferación celular
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

Selección de miARN en la biblioteca de miARN sintéticos que tienen influencia sobre la apoptosis

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

Se utilizó una biblioteca de dieciocho miARN sintéticos para transfectar por triplicado células A549 (8.000 células por pocillo de una placa de 96 pocillos) utilizando siPORT™ *NeoFx*™ (Ambion). El medio se cambió tras 24 h y se

inspeccionaron visualmente las células bajo un microscopio para inspeccionar cualitativamente la muerte celular 72 h tras la transfección. Las células se midieron para valorar la apoptosis calculando actividad de la caspasa 3 de la siguiente manera: 1) Se lavaron las células una vez con PBS y se congelaron a -80 ºC. 2). Se lisaron las células añadiendo 40 µl de tampón de lisado frío (HEPES 50 mM pH 7,2, NaCl 40 mM, NP40 0,5%, EDTA 0,5 mM) en los pocillos y se incubó durante 20 min a 4 ºC. 3) Se añadió tampón ICE (HEPES 50 mM pH 7,4, CHAPS al 0,1%, EDTA 0,1 mM, un 10% de sacarosa) + DTT 5 mM que contiene sustrato DEVDafc 20 µm. 4) Se midió el aumento de fluorescencia en una hora a 400 ex, 505 em.

Las células transfectadas con los miARN sintéticos miR-1-2 y miR-33 mostraban una actividad de la caspasa 3/7 reducida y las células transfectadas con miR-20 mostraban niveles de apoptosis mucho más altos. Estos tres miARN probablemente regulan genes que están implicados en el control de la apoptosis.

Ejemplo 8

Selección de miARN que tienen influencia en la viabilidad celular

Los inhibidores de miARN también se utilizaron para identificar los miARN que tenían influencia en la viabilidad celular. Una biblioteca de unos 90 inhibidores de miARN se utilizó para transfectar por triplicado células A549 (8.000 células/pocillo de placas de 96 pocillos) utilizando siPORT™ *NeoFx*™ (Ambion). El medio se cambió tras 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 tripsinizaron y se tiñeron con el Reactivo ViaCount Flex, que distingue entre células viables y no viables basándose en la permeabilidad de ADN que se une a los colorantes del reactivo. Las células se analizaron utilizando PCA-96 Guava (Análisis Celular Personal).

Veintiún inhibidores de miARN inducían una relación de células vivas con respecto a las muertas significativamente diferente de lo que lo hacía el inhibidor de miARN control negativo (FIG, 8). Doce reducían la viabilidad celular y nueve aumentaban la viabilidad celular (Tabla 5). Resulta interesante que había un pequeño solapamiento entre los miARN que afectaban la viabilidad celular en células A549 y los que afectaban la proliferación celular en células HeLa, sugiriendo que las diferentes células responden de manera diferente al hecho de tener actividades reducidas de miARN o que la viabilidad celular y la proliferación celular no están afectadas por las mismas rutas celulares.

Tabla 5. miARN que afectan la viabilidad celular

miARN	Impacto relativo sobre la viabilidad celular
miR-7	Bajo
miR-19a	Bajo
miR-23	Bajo
miR-24	Bajo
miR-27a	Bajo
miR-31	Bajo
miR-32	Bajo
miR-134	Bajo
miR-140	Bajo
miR-150	Bajo
miR-192	Bajo
miR-193	Bajo
miR-107	Alto
miR-133	Alto
miR-137	Alto
miR-152	Alto
miR-155	Alto
miR-181a	Alto
miR-191	Alto
miR-203	Alto
miR-215	Alto

Ejemplo 9

Selección de miARN que tienen influencia sobre la apoptosis

La apoptosis es un proceso celular natural que ayuda al control del cáncer induciendo la muerte en las células con potencial oncogénico. Muchos oncogenes funcionan alterando la inducción de la apoptosis. Para identificar la participación en la apoptosis, se usó un ensayo de apoptosis con la biblioteca de inhibidores de miARN.

Utilizando una biblioteca de unos 90 inhibidores de miARN, los inventores seleccionaron los miARN que afectaban a la apoptosis. Se transfectaron por triplicado células HeLa (8.000 células/pocillo de placas de 96 pocillos) con inhibidores de miARN (5 pmoles) utilizando siPORT™ *NeoFx*™. El medio se cambió 24 h después de la transfección y las células se procesaron 72 horas después de la transfección. Se calculó la apoptosis de las células midiendo la actividad de la caspasa 3 de la siguiente manera: 1) Se lavaron las células una vez con PBS y se congelaron a -80 ºC. 2) Se lisaron las células añadiendo 40 µl de tampón de lisado frío (HEPES 50 mM pH 7,2, NaCl 40 mM, NP40 0,5%, EDTA 0,5 mM) en los pocillos y se incubó durante 20 min a 4 ºC. 3) Se añadió tampón ICE (HEPES 50 mM pH 7,4, CHAPS al 0,1%, EDTA 0,1 mM, un 10% de sacarosa) + DTT 5 mM que contiene sustrato DEVDafc 20 µm. 4) Se midió el aumento de fluorescencia en una hora a 400 ex, 505 em.

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

Los datos de selección normalizados se presentan 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

miARN	Impacto relativo sobre la proliferación celular
miR-31	Bajo
miR-214	Bajo
miR-7	Alto
miR-1-2	Alto
miR-148	Alto
miR-195	Alto
miR-196	Alto
miR-199a	Alto
miR-204	Alto
miR-210	Alto
miR-211	Alto
miR-212	Alto
miR-215	Alto
miR-216	Alto
miR-218	Alto
miR-296	Alto
miR-321	Alto

Ejemplo 10

Análisis de expresión utilizando ARN sintéticos

Además del uso de los ensayos fenotípicos para identificar los miARN que tienen influencia sobre los procesos celulares importantes o rutas celulares, se pueden utilizar colecciones de miARN sintéticos y/o inhibidores de miARN para identificar los miARN que regulan directamente la expresión de un gen. Se creó un plásmido que tenía un gen de luciferasa inmediatamente corriente arriba del UTR 3' del gen G6PD. Se utilizaron experimentos similares para identificar los miARN que regulan 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 en el cáncer

Como se ha señalado en los ejemplos previos, se han identificado varios miARN que se expresan diferencialmente entre las muestras tumorales y de tejido normal adyacente de los mismos pacientes de cáncer. Resulta interesante que haya un solapamiento significativo en los miARN que se expresan diferencialmente en los distintos cánceres, sugiriendo que hay un grupo central de miARN que tienen influencia en los procesos celulares que cuando se alteran, dan lugar a cáncer. A continuación se describen experimentos con el fin de desarrollar un vínculo entre la mala regulación del miARN y el cáncer.

Expresión de miARN en cáncer de pulmón

Se analizaron veintidós muestras tumorales y de tejido normal adyacente (TNA) de pacientes con cáncer de pulmón utilizando el sistema de matrices de miARN descrito anteriormente. Se analizaron las matrices y se comparó la expresión relativa de cada miARN entre el tumor y los tejidos normales adyacentes de cada paciente. Se agruparon los distintos miARN basándose en su expresión relativa en tumores a través de los diferentes pacientes (FIG. 14). Se expresaban seis miARN (miR-126, 30a, 143, 145, 188, y 331) a niveles significativamente bajos en los tumores en más del 70% de los pacientes. Se expresaban dos miARN (miR-21 y 200b) a niveles significativamente más altos 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 tumores y TNA de pacientes de cáncer de colon utilizando el proceso de matrices de miARN de la invención. Como en las comparaciones en el cáncer de pulmón, se agruparon distintos miARN basándose en su expresión relativa en los tumores en los diferentes pacientes de cáncer de colon (FIG. 14). Se expresaban cinco miARN (miR-143, 145, 195, 130a, y miR-331) a niveles significativamente más bajos en los tumores de más del 70% de los pacientes. Se expresaban cinco miARN (miR-223, 21, 31, 17, y 106) a niveles significativamente más altos en los tumores de más del 70% de los pacientes.

miARN como marcadores de cáncer

Es interesante que ocho miARN diferentes se expresaran diferencialmente entre las muestras del tumor y del tejido adyacente normal en la mayoría de las muestras de pacientes de tumor de pulmón y colon que analizaron los inventores (FIG. 16). Se encontró también que estos mismos miARN se expresaban diferencialmente en los pacientes de cáncer de mama, timo, vejiga, páncreas, y próstata que analizaron los inventores, sugiriendo que estos miARN podían controlar procesos celulares que cuando se alteran dan lugar al cáncer.

miARN como reguladores de la expresión de oncogenes

Para abordar si miARN específicos pueden ser partícipes en el cáncer por medio de la mala regulación de los oncogenes, se exploraron regiones 3' sin traducir (UTR) de 150 oncogenes bien conocidos para hallar secuencias con una homología significativa con los miARN identificados en el análisis de micromatrices de la invención. Se seleccionaron los 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 tienen esencialmente un 100% de complementariedad en este sitio (Doench y col., 2004).

(2) Interacción total de Tm del miARN/ARNm. Además de la secuencia central, la estabilidad total de unión entre los miARN y los ARNm ha demostrado ser un indicador importante de la actividad del miARN (Doench y col., 2004).

Como se aprecia en la Tabla 8, se identificaron los sitios diana potenciales en las UTR 3' de los oncogenes conocidos para todos los miARN en los que se observó rutinariamente su expresión diferencial en las muestras tumorales. Resulta interesante que KRAS2, MYCL1, y CBL tienen múltiples sitios de unión de miARN previstos que podrían proporcionar uniones cooperativas de miARN lo que se ha implicado como un factor importante en la regulación de miARN (Doench y col., 2003; Zeng y col., 2003). Muchos de los genes enumerados en la Tabla 8 se convierten en oncogénicos cuando se sobre-expresan, por lo tanto se concibe que la expresión reducida de un miARN podría dar lugar a la regulación positiva de uno o más de los oncogenes y en consecuencia dan lugar a oncogénesis.

Tabla 8: miARN relacionados con el cáncer y sus supuestas dianas oncogénicas

miARN	Diana genética prevista
let-7	RAS
let-7	C-MYC
miR-21	Homólogo 2 mutS (MSH2)
miR-21	Homólogo del oncogén vírico v-ski sarcoma (aviar) (SKI)
miR-143	Región de punto de rotura del grupo (BCR)
miR-143	Secuencia transformante derivada de la línea celular MCF.2 (MCF2)
miR-143	Supresor tumoral de von Hippel-Lindau (VHL)
miR-143	homólogo del oncogén vírico del sarcoma 2 de la rata Kirsten v-Ki-ras2 (KRAS2)
miR-143	homólogo del oncogén vírico del sarcoma 2 de la rata Kirsten v-Ki-ras2 (KRAS2)
miR-143	Secuencia transformante retrovírica ecotrópica (murina) Cas-Br-M (CBL)
miR-143	Secuencia transformante retrovírica ecotrópica (murina) Cas-Br-M (CBL)

(continuación)

miARN	Diana genética prevista
miR-145	Oncogén vírico relacionado con la mielocitomatosis v-myc (MYCN)
miR-145	Receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR2)
miR-145	Secuencia transformante retrovírica ecotrópica Cas-Br-M (murina) (CBL)
miR-188	Homólogo 1 del oncogén vírico de la mielocitomatosis (MYCL1)
miR-200b	Cadherina 13 (CDH13)
miR-200b	Homólogo del oncogén vírico Hardy-Zuckerman 4 del sarcoma felino v-kit (KIT)
miR-219	Homólogo 1 del oncogén vírico de la mielocitomatosis (MYCL1)
miR-219	CLL de linfocitos B /linfoma 2 (BCL2)
miR-219	Cadherina 1, tipo 1, E-cadherina (epitelial) (CDH1)
miR-331	Oncogén vav 1 (VAV1)
miR-331	Receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR1)
miR-331	Antagonista BCL2/citolítico 1 (BAK1)
miR-331	Receptor del ácido retinoico, alfa (RARA)
miR-331	Homólogo del oncogén vírico del sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) v-src (SRC)

Ejemplo 12

Medición del efecto de los miARN sobre la expresión oncogénica

La confirmación de las predicciones de sitios diana de miARN se pueden hacer de varias maneras. En Drosophila y C. elegans, se han aplicado estrategias genéticas en las que se hicieron mutaciones en el miARN y los supuestos sitios diana de miARN y mostraron un resultado de fenotipos similares (Ha y col., 1996; Vella y col., 2004). En las células de mamíferos, en las que las estrategias genéticas son mucho más difíciles, se han utilizado construcciones indicadoras para mostrar que las UTR 3' de los supuestos genes diana están regulados en las células a niveles que están desproporcionadas con respecto a los vectores indicadores de control que contienen mutaciones en los supuestos sitios de unión de miARN (Lewis y col., 2003). Además, se han utilizado vectores y oligonucleótidos para introducir o inhibir miARN en las células para determinar efectos sobre los niveles endógenos de los supuestos genes diana (Lewis y col., 2003; Kiriakidou y col. 2004). La última estrategia se ha emprendido para validar las predicciones de los sitios diana de miARN.

Se han desarrollado miARN e inhibidores de miARN que pueden transfectarse en células de mamíferos para introducir miARN en las células o para inhibir la actividad de miARN en las células, respectivamente. Véase USSN 60/627.171. Un miARN sintético y un inhibidor de miARN que corresponden al let-7b se utilizaron para determinar si la predicciones del sitio diana eran correctas. En estos experimentos, las células cultivadas que expresan niveles indetectables del miARN se transfectaron con el miARN sintético utilizando el agente de transfección siPORT™ *NeoFx*™ (Ambion). Se utilizaron ensayos de inmunofluorescencia para RAS y C-MYC en las células transfectadas. Las proteínas de ambos oncogenes se expresaban a niveles casi tres veces más bajos en las células transfectadas con el miARN sintético que en las células transfectadas con el miARN negativo de control (Ambion). En un experimento recíproco, las células que expresan naturalmente altos niveles del miARN se transfectaron con el inhibidor del miARN let-7. Como se esperaba, las proteínas de ambos oncogenes eran mayores en las células transfectadas con el inhibidor del miARN que en las células transfectadas con el inhibidor negativo de control (Ambion). Estos resultados son coherentes con el modelo de que el miARN regula la expresión de los dos oncogenes. Estos datos sugieren que la mala regulación de un miARN clave podría participar en la progresión del cáncer por el fallo en la regulación de la expresión de uno o más oncogenes.

Ejemplo 13

Selección de miARN en la biblioteca de miARN sintéticos que tienen influencia en la proliferación celular y la viabilidad celular en varios tipos celulares

Una característica distintiva del cáncer es la proliferación celular incontrolada; habitualmente los investigadores utilizan ensayos de proliferación celular para estudiar la influencia de los genes en la oncogénesis. Se utilizó un ensayo de proliferación celular en conjunción con la biblioteca de inhibidores de miARN para identificar los miARN que tenían influencia sobre la proliferación celular.

Las células HeLa (cáncer ovárico humano) y A549 (cáncer de pulmón humano) se transfectaron por triplicado con 150 miARN sintéticos utilizando siPORT *NeoFx* (Ambion) según 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- 46, miR-147, miR-148, miR-149, miR-150, miR-151, miR-152, miR-153, miR-155, miR-181a, miR-182, miR-83, 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-21, 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, mumiR-290, mu-miR-291, mu-miR-92-3p, 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 eran moléculas de ácido nucleico de cadena doble, compuestos por una cadena activa y una cadena complementaria. La cadena activa contenía una secuencia que era idéntica al correspondiente miARN maduro. La cadena complementaria contenía una secuencia que era un 100% complementaria con la región relevante de la secuencia de miARN maduro, pero 1) carecía de dos nucleótidos en su extremo 3' que fueran complementarios con la secuencia de miARN maduro (en el extremo 5' de la cadena activa) y 2) tenía un dinucleótido protuberante en su extremo 5' con respecto a la cadena activa. En otras palabras, las dos cadenas eran completamente complementarias entre sus secuencias excepto en que cada cadena tenía un dinucleótido 5' protuberante con respecto a la otra cadena. Se utilizó el mismo tipo de miARN para los siguientes Ejemplo(s) también. Se describen posteriormente algunas excepciones. Los miARN indicados en las tablas identifican el miARN que se corresponde con la secuencia sintética proporcionada.

Se electroporaron linfocitos Jurkat (células de leucemia humana) y linfocitos T primarios humanos por triplicado con el mismo grupo de miARN sintéticos utilizando siPorter-96 (Ambion) según las instrucciones del fabricante. Se analizaron todas las células para hallar las células viables y no viables 72 horas después de la transfección utilizando 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 los pocillos transfectados con un miARN en particular dividido por el número de células viables en los pocillos transfectados con miARN sintéticos negativos de control multiplicado por 100 para dar lugar al % de Viabilidad Celular de las células transfectadas con miARN con respecto a las células transfectadas con el control negativo.

La significación se asignó basándose en los valores medios de las muestras transfectadas con el control negativo. Los miARN que eran significativamente diferentes a los controles negativos se calificaron como "significativos" basándose en que fueran al menos dos desviaciones estándar por encima o por debajo de los datos del 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. estánd.**
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
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

(continuación)

miARN que reducen significativamente la viabilidad celular de células HeLa

	% de Viabilidad	desv. estánd.
miR-217	87,9	3,5
miR-1	88,2	9,0
miR-124	88,8	4,2

TABLA 10

miARN que reducen el número de células viables de células HeLa

	Células Totales	desv. estánd.
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 de células HeLa

	Células Totales	desv. Estánd.
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

(continuación)

miARN que aumentan significativamente el número de células de células HeLa

	Células Totales	desv. Estánd.
miR-198	152,1	67,8
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

	% de Viabilidad	desv. Estánd.
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

TABLA 13

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

	Número de células	desv. Estánd.
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

(continuación)

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

Número de células	Número de células	Número de células
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 aumentan significativamente el número de células viables en A549

	Células Totales	desv. estánd.
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 la viabilidad celular de los linfocitos Jurkat

	% de Viabilidad	desv. estánd.
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 de linfocitos Jurkat

	Células totales	desv. estánd.
miR-181-a	122,77	22,40
miR-9	124,63	9,98
miR-141	126,08	24,03

(continuación)

miARN que aumentan significativamente la viabilidad celular de linfocitos Jurkat		
	Células totales	**desv. estánd.**
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		
	% de Viabilidad	**desv. estánd.**
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
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 T primarios		
	% de Viabilidad	**desv. estánd.**
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 señalar que los miARN que afectan un tipo celular a menudo no afectan otros tipos celulares. Esto se debe probablemente al hecho de que los procesos celulares que están activos varían entre los distintos tipos celulares. Esto puede ser vitalmente importante cuando se considera el potencial de las terapias basadas en miARN. Las células anormales (enfermas) son diferentes de las células normales debido al hecho de que están activos procesos celulares diferentes en los dos tipos de células. Sería ideal identificar los miARN que tienen efectos diferenciales sobre las células normales y anormales ya que podrían suministrarse globalmente y se esperaría que solamente tengan un efecto sobre células enfermas. Cuando se compararon los datos de viabilidad celular de las

células de leucemia (linfocitos T cancerosos) y los linfocitos T primarios, se notó que let-7a, let-7b, y miR-10b, reducían significativamente el porcentaje de células viables en las células de leucemia, mientras que no tenían esencialmente ningún efecto en los correspondientes linfocitos T normales. Estos miARN eran candidatos a fármacos para la leucemia.

Ejemplo 14

Selección de miARN que tienen influencia en la apoptosis

La apoptosis es un proceso celular natural que ayuda al control del cáncer induciendo la muerte de las células con un potencial oncogénico. Muchos oncogenes funcionan alterando la inducción de la apoptosis. Para identificar los miARN que participan en la apoptosis, se utilizó un ensayo de apoptosis con la biblioteca de inhibidores de miARN.

Se transfectaron por triplicado células HeLa (8000 células/pocillo de placas de 96 pocillos) con más de 150 miARN sintéticos (descritos anteriormente) (3 pmoles) utilizando el Ambion siPORT™ *NeoFx*™. Se cambió el medio a las 24 h después de la transfección y se procesaron las células 72 h tras la transfección. Se midió la apoptosis de las células midiendo la actividad de la caspasa 3 de la manera siguiente: 1) Las células se lavaron una vez con PBS y se congelaron a – 80 ºC. 2) Las células se lisaron añadiendo 40 µl de tampón de lisado frío (50 mM HEPES pH 7,2, 40 mM de NaCl, 0,5% de NP40, 0,5 mM EDTA) en los pocillos y se incubaron durante 20 min a 4 ºC. 3) Se añadieron 160 µl de tampón ICE (50 mM HEPES pH 7,4, 0,1% de CHAPS, 0,1 mM de EDTA, 10% de sacarosa) + 5 mM de DTT que contiene 20 uM de sustrato DEVDafc. 4) Medición del aumento de fluorescencia en una hora a 400 ex., 505 em.

Se analizó también el número de células de las muestras utilizando un ensayo general de esterasa para normalizar los resultados de caspasa 3. Se diluyó el sustrato FDA (0,4 mg/ml de diacetato de fluoresceína (FDA) en acetonitrilo) 1:19 en un tampón de dilución (40 mM TrisCl pH 7,5, 20 mM de NaCl, 0,5% de NP-40, con una concentración final de 0,02 mg/ml). Se añadieron 40 µl de tampón (40 mM TrisCl, pH 7,5, 0,05% de NP-40) a cada pocillo de muestra. Las muestras se incubaron durante 10 min en hielo. Se añadieron 160 ul de sustrato FDA diluido a cada pocillo. La fluorescencia se midió durante 30 min a 37 grados (ex = 488, em = 529). El aumento de la pendiente de fluorescencia con el tiempo es una función del número de células en la placa.

Los miARN que afectan a la apoptosis se enumeran en la tabla siguiente. Estos miARN regulan aparentemente las rutas que dan lugar a la apoptosis. La mala regulación de estos miARN podría inducir apoptosis en las células o pueden evitar que las células sufran apoptosis. La introducción o inhibición de estos miARN en células cancerosas (u otras enfermedades) que han superado la señalización de las rutas de apoptóticas o en células del Parkinson (u otras enfermedades) que se han inducido prematuramente a la apoptosis, podrían utilizarse para tratar las enfermedades.

TABLA 20

miARN que aumentan significativamente el porcentaje de células apoptóticas

	Cambio relativo en células apoptóticas	**desv. estánd.**
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

TABLA 21

miARN que disminuyen significativamente el porcentaje de células apoptóticas

	Cambio relativo en células apoptóticas	desv. estánd.
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

Selección de miARN de la biblioteca de miARN sintéticos que tienen influencia en el ciclo celular

El cuerpo de un ser humano adulto está compuesto por aproximadamente 50-100 trillones de células. Cada día, varios billones de estas células se dividen en dos para remplazar los billones de células que mueren y se eliminan. En el curso de una vida media, esto supone un número astronómico de divisiones celulares, la mayoría de las cuales van perfectamente bien. Sin embargo, ocurren errores, y si no se corrigen pueden dar lugar al cáncer. El crecimiento y división de las células se controlan normalmente por un intrincado sistema de controles y equilibrios. Pero ocasionalmente una células que empieza a proliferar salvajemente, dividiéndose una y otra vez y desafiando todas las restricciones sobre su crecimiento. Este es el principio de las formas más comunes de cáncer.

Se transfectaron por triplicado 4.000 células BJ/pocillo con 46 miARN sintéticos utilizando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante.

Let-7a
Let-7a
miR-1
miR-1
miR-105
miR-125a
miR-128
miR-142
miR-145
miR-146
miR-147
miR-150
miR-15a
miR-16
miR-186
miR-187
miR-188
miR-191
miR-195
miR-20
miR-206
miR-21
miR-211
miR-223
miR-224
miR-26a
miR-320
miR-324-3p

(Continuación)

miR-325
miR-335
miR-337
miR-338
miR-345
miR-371
miR-373
miR-92
mmu-miR-201
mmu-miR-207
mmu-miR-290
mmu-miR-291-3p
mmu-miR-294
mmu-miR-295
mmu-miR-297
mmu-miR-322
mmu-miR-376b
mmu-miR-409

A las 24 horas post-transfección, la mitad de las células BJ de cada pocillo se trasladaron a un medio reciente. A las 72 horas post-transfección, las células se fijaron con de paraformaldehído al 4% con una concentración final del 2%. Las células fijadas se tiñeron con yoduro de propidio (protocolo de TTP LabTech) y se evaluaron utilizando el escáner celular TTP LabTech. El yoduro de propidio tiñe el ADN y el contenido relacionado con ADN en una célula corresponde con su posición en el ciclo celular. El escáner celular medía la tinción de yoduro de propidio en cada célula y asignaba su posición en el ciclo celular. El porcentaje de células en cada estado del ciclo celular se calculó y se comparó con las células transfectadas con los miARN sintéticos de control negativo. El cambio relativo en las células en cada estado se calculó para cada miARN que se utilizó. Los miARN sintéticos que inducían un cambio significativo hacia o en contra de un estado específico del ciclo celular se enumeran a continuación. Estos representan los miARN que regulan puntos clave en el ciclo celular y ofrecen puntos clave de intervención para el desarrollo de terapias relacionadas con el cáncer.

TABLA 23

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

miARN	% Dif de Células en G1	desv. estánd.
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	% Dif de Células en G1	desv. estánd.
rno-miR-miR-325	121,7	5,3
mmu-409	123,2	13,7
miR-miR-324	123,7	4,9
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

(continuación)

miARN que aumentan significativamente el porcentaje de células BJ en fase G1 del ciclo celular		
miARN	**% Dif de Células en G1**	**desv. estánd.**
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

miARN	% Dif de Células en S	desv. estánd.
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

miARN	% Dif de Células en G1	desv. estánd.
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

miARN	% Dif de Células en G2/M	desv. estánd.
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

miARN	% Dif de Células en G2/M	desv. estánd.
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 una cantidad mayor de 2x de ADN

miARN	% Dif células c/>2x DNA	desv. estánd.
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

Selección de miARN en la biblioteca de miARN sintéticos que tienen influencia en la proliferación celular

Se utilizaron ensayos de proliferación celular en conjunción con la biblioteca de miARN sintéticos de los inventores para identificar miARN que tienen influencia en la proliferación celular en un amplio intervalo de células, incluyendo las de pulmón, mama, próstata, piel, cérvix, linfocitos T, y tejidos prepuciales.

Se transfectaron por triplicado células del cuello uterino (HeLa), de pulmón (A549, CRL-5826 y HTB-57), mama (MCF12A y BT549), próstata (22rev1), linfocitos T (Jurkat y normales primarios), y piel (TE354T, TE353SK, y BJ) con cada uno de los más de 150 miARN sintéticos de la biblioteca de los inventores. Con las excepciones de linfocitos Jurkat y linfocitos T primarios, cada tipo celular se transfectó con 5 picomoles de cada uno de los miARN de la biblioteca de miARN sintéticos utilizando siPORT™ *NeoFx*™ (Ambion) con una densidad en las placas de aproximadamente 8.000 células/pocillo de una placa de 96 pocillos. Los linfocitos Jurkat y los linfocitos T primarios se mezclaron a una tasa de aproximadamente 50.000 células por pocillo con 500 picomoles de cada uno de los miARN sintéticos. El medio se cambió 24 h tras la transfección. Se estimó el número de células a las 72 h post-transfección por uno de tres métodos:

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

(2) Se añadió a cada pocillo Reactivo Flex ViaCount (Guava), un colorante que es fluorescente cuando interactúa con ADN, y se cuantificó la fluorescencia utilizando el Guava PCA-96 según las instrucciones del fabricante.

(3) Se añadió a cada pocillo yoduro de propidio, un colorante que es fluorescente cuando interactúa con ADN, y el número total de células en el pocillo se estimó por recuento de los sitios únicos de ADN teñido utilizando el Escáner Celular TTP LabTech según las instrucciones del fabricante.

El impacto de cada miARN sobre la proliferación celular se evaluó dividiendo el número de células leídas en cada pocillo por el número medio de células leído en los pocillos transfectados con un miARN control negativo (CN).

En la FIG. 15 A-C se presentan miARN sintéticos que reducían significativamente la proliferación de varios tipos de células que se analizaron. Estos miARN representan moléculas que se podrían utilizar para terapias, diagnósticos, creación de líneas celulares con propiedades de investigación interesantes, e inducción de diferenciación.

Aproximadamente el 10% de los miARN reducían significativamente la proliferación celular en al menos cuatro tipos celulares diferentes. Estos miARN (presentados en orden de prioridad en la tabla siguiente) se proporcionan a continuación y se pueden utilizar en procedimientos y composiciones de la invención.

TABLA 29

miARN Anti-Proliferación Comunes	
miARN	**nº de Positivos**
miR-124	7
miR-16	6
miR-101	6
miR-126	6
miR-147	6
miR-15a	5
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 utilizaron para la selección en la biblioteca de miARN sintéticos se hicieron parejas de células cancerosas y no cancerosas de mama, piel y linfocitos T. Era interesante, que muchos miARN sintéticos afectaban de manera distinta la proliferación de las parejas de células (véase la tabla a continuación).

Tabla 30

Mama				
	Cancerosas		**No Cancerosas**	
miARN	%CN	% desv. estánd.	%CN	% desv. estánd.
miR-201	79	14	103	17
miR-192	81	3	95	17
miR-92	85	11	104	24
Piel				
	Cancerosas		**Normales**	
pre-MIR	% CN	% desv. estánd.	% CN	% desv. estánd.
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				
	Leucemia		**Normales**	
	%CN	% desv. estánd.	%CN	% desv. estánd.
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

(continuación)

Linfocitos T				
	Leucemia		**Normales**	
	%CN	% desv. estánd.	%CN	% desv. estánd.
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

En la FIG. 16 se presentan miARN sintéticos que aumentan significativamente la proliferación de varios tipos celulares que se habían analizado.

Ejemplo 17

Selección para identificar miARN en la biblioteca de inhibidores de miARN que tienen influencia en la proliferación celular

Se utilizó un ensayo de proliferación celular en conjunción con la biblioteca de miARN sintéticos de los inventores para identificar miARN que tenían influencia sobre la proliferación celular en un amplio intervalo de células, incluyendo las de pulmón, mama, próstata, piel, cérvix, linfocitos T, y tejidos prepuciales.

Se transfectaron por triplicado las células de mama (MCF12A), próstata (22Rv1), pulmón (A549), y piel (TE354T) 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 de la biblioteca utilizando siPORT™ *NeoFx*™ (Ambion) con una densidad en la placa de aproximadamente 8.000 células/pocillo de una placa de 96 pocillos. Se estimó el número de células a las 72 h post-transfección por uno de tres métodos:

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

(2) Se añadió a cada pocillo Reactivo Flex ViaCount (Guava), un colorante que es fluorescente cuando interactúa con DNA, y se cuantificó la fluorescencia utilizando el Guava PCA-96 según las instrucciones del fabricante.

(3) Se añadió a cada pocillo yoduro de propidio, un colorante que es fluorescente cuando interactúa con ADN, y se estimó el número total de células en el pocillo por recuento de los sitios únicos de ADN teñido utilizando el Escáner Celular TTP LabTech según las instrucciones del fabricante.

El impacto de cada inhibidor de miARN sobre la proliferación celular se evaluó dividiendo el número leído de células de cada pocillo por el número medio de células leído en los pocillos transfectados con un miARN control negativo (CN).

En la FIG. 17 se presentan miARN cuya inhibición reducían significativamente la proliferación de varios tipos celulares que se analizaron. Estos miARN representan moléculas que se podrían utilizar para terapias, diagnóstico, creación de líneas celulares con propiedades de investigación interesantes, e inducción de diferenciación.

En la FIG. 18 se presentan inhibidores de miARN que aumentan significativamente la proliferación de varios tipos celulares que se analizaron. Estos miARN representan moléculas que se podrían utilizar para terapias, diagnóstico, creación de líneas celulares con propiedades de investigación interesantes, e inducción de diferenciación.

Ejemplo 18

Selección de miARN en la biblioteca de miARN sintéticos que tienen influencia sobre la viabilidad celular

La base de la mayoría de las enfermedades humanas es la subversión de una o más células que funcionan de forma que se salen de lo que hacen normalmente. Por ejemplo, el cáncer se inicia con la inmortalización y transformación de una sola célula que se divide repetidamente para formar un tumor. Los compuestos que reducen la viabilidad de las células enfermas se utilizan de manera rutinaria para tratar pacientes con cáncer y otras enfermedades.

Se transfectaron por triplicado células del cuello uterino ((HeLa), de pulmón (A549), y linfocitos T (Jurkat y normales primarios) con cada uno de los más de 150 miARN de la biblioteca de los inventores. Con las excepciones de los linfocitos Jurkat y linfocitos T primarios, cada tipo celular se transfectó con 5 picomoles de cada uno de los miARN de la biblioteca de miARN sintéticos utilizando siPORT™ *NeoFx*™ (Ambion) con una densidad en las placas de aproximadamente 8.000 células/pocillo de placas de 96 pocillos. Los linfocitos Jurkat y los 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, se cambió el medio a las 24 h tras la transfección. Se estimó la viabilidad celular 72 horas post-transfección por uno de dos procedimientos:

(1) Se añadió a cada pocillo Reactivo ViaCount Flex (Guava), que incluye un colorante que solamente penetra en células muertas y que es fluorescente cuando interactúa con ADN, y se cuantificó la fluorescencia utilizando el Guava PCA-96 según las instrucciones del fabricante. El porcentaje de células viables se halló dividiendo el número de células no muertas y no apoptóticas en la muestra por el número total de células en el pocillo y multiplicándolo por 100.

(2) Se añadió a cada pocillo yoduro de propidio, un colorante que es fluorescente cuando interactúa con ADN. Cada célula se analizó utilizando el Escáner Celular TTP LabTech según las instrucciones del fabricante para detectar células con patrones de tinción que concuerdan con muerte celular o 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.

En la FIG. 19 se presentan miARN sintéticos que disminuyen o aumentan significativamente la viabilidad en los varios tipos celulares que se analizaron. En una comparación de la viabilidad entre linfocitos Jurkat y linfocitos T primarios, que representan las formas leucemia y normal de los linfocitos T, let-7, miR-10, miR-101, miR-17-3p, miR-19, y miR-34a reducían mucho la viabilidad de las células de leucemia sin afectar a los linfocitos T normales.

Ejemplo 19

Selección de miARN en la biblioteca de miARN sintéticos que tienen influencia en la apoptosis

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

Se transfectaron por triplicado aproximadamente 8.000 células por pocillo del cuello uterino (HeLa), de próstata (22Rv1), linfocitos T (Jurkat), y de piel (TE354T) con cada uno de los más de 150 miARN sintéticos de la biblioteca de los inventores utilizando siPORT™ *NeoFx*™ (Ambion). El medio se cambió después de 24 h y se visualizaron las células inspeccionándolas bajo un microscopio para inspeccionar cualitativamente la muerte celular a las 72 horas después de la transfección. Se midió la apoptosis en las células midiendo la actividad de la caspasa 3 de la siguiente manera: 1) Se lavaron las células una vez con PBS y se congelaron a -80 ºC. 2) Las células se destruyen añadiendo 40 µl de tampón de lisado frío (50 mM de HEPES pH 7,2, 40 mM de NaCl, 0,5% de NP40, 0,5 mM EDTA) en los pocillos y se incubaron durante 20 min a 4 ºC. 3) Se añadieron 160 µl de tampón ICE (50 mM HEPES pH 7,4, 0,1% CHAPS, 0,1 mM EDTA, 10% sacarosa) + 5 mM DTT que contenía 20 µM de sustrato DEVDafc. 4) Se mide el aumento de fluorescencia en una hora con 400 ex, 505 em. Las muestras se analizaron también para hallar el número de células utilizando un ensayo general de esterasa para normalizar los resultados de caspasa 3. El sustrato FDA (0,4 mg/ml de diacetato de fluoresceína (FDA) en acetonitrilo) se diluyó 1:19 en un tampón de dilución (40 mM TrisCl pH 7.5, 20 mM NaCl, 0,5% NP-40, concentración final 0,02 mg/ml). Se añadieron 40 µl de tampón (40 mM TrisCl pH 7,5, 0,5% NP-40) a cada pocillo de muestra. Las muestras se incubaron 10 min en hielo. Se añadieron 160 µl de sustrato FDA diluido a cada pocillo. Se midió la fluorescencia durante 30 minutos a 37 grados (ex = 488, em = 529). La pendiente del aumento de fluorescencia en el tiempo es una función del número de células en la placa.

El impacto de cada miARN sobre la apoptosis se evaluó dividiendo la lectura de caspasa 3 de cada pocillo por la media de la lectura de caspasa 3 de los pocillos transfectados con un miARN control negativo (CN).

Como se aprecia en la FIG. 20, muchos miARN diferentes eran capaces de aumentar o disminuir la apoptosis en los cuatro tipos celulares que se ensayaron. Unos cuantos miARN (miR-126, miR-26a, miR-1, miR-149, y let-7g) afectaban a la apoptosis en múltiples tipos celulares sugiriendo que regulan la apoptosis por medio de genes que son comunes en múltiples tipos celulares.

Ejemplo 20

Selección de miARN en la biblioteca de miARN sintéticos que inducen transformación

La transformación es necesaria para la formación del tumor ya que sobrepasa la respuesta natural de la célula de parar de dividirse cuando se sitúa en un entorno abarrotado. Para identificar los miARN que participan en la transformación, se utilizó un ensayo de transformación con la actuación de células NIH3T3 con la biblioteca de miARN sintéticos. Las células NIH3T3 se utilizan en los ensayos de transformación porque carecen de la capacidad para formar colonias cuando se colocan en placas de agar blando. La modulación de los procesos que inhiben la transformación se pueden detectar fácilmente debido a que inducen a las células NIH3T3 a que empiecen a formar colonias cuando se colocan en placas de agar blando.

Se transfectaron por duplicado aproximadamente 8.000 células NIH3T3 con cada uno de los más de 150 miARN sintéticos de la biblioteca de los inventores utilizando siPORT™ *NeoFx*™ (Ambion). El medio se cambió a las 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 permanezcan en contacto a continuación de la división celular. El contacto íntimo

con otras células induce típicamente a las células NIH3T3 que paren de dividirse. El número total de las células de cada pocillo se midió tomando una lectura de la absorbancia a 495 nm. La lectura de la absorbancia para cada pocillo se dividía por la lectura media de absorbancia de las células transfectadas con el miARN control negativo y se multiplicó por 100 para obtener el porcentaje de cambio en la transformación. Una selección inicial revelaba que miR-10, miR-23, miR-24, miR-198, miR-192, y miR-199 eran miARN que aumentaban la transformación con respecto a las células transfectadas con el control negativo. Una repetición del experimento con los candidatos iniciales arrojó el siguiente resultado que se muestra a continuación:

Tabla 31

miARN	%CN	%DE
198	103	2,07
192	108	5,7
199	113	5,59

Ejemplo 21

miARN que afectan la eficacia de compuestos terapéuticos

Se han ensayado muchos compuestos en ensayos clínicos para hallar su capacidad de que afecten positivamente al resultado de los pacientes. En algunos casos estos compuestos se encuentran en el grupo de referencias de la FDA y se convierten en agentes terapéuticos. Desafortunadamente, muy pocos agentes terapéuticos son eficaces al 100%. El aumento de las actividades de los compuestos terapéuticos proporciona una oportunidad significativa a la industria médica. Los dos procedimientos más comunes que se utilizan para mejorar los terapéuticos son la modificación química de la estructura de los compuestos o el uso simultáneo de compuestos terapéuticos múltiples. Se evaluó si sería beneficioso introducir miARN con antelación a la adición de compuestos de los que se sabe que reducen significativamente la viabilidad de las células cancerosas. Uno de los compuestos anticáncer que se introdujeron era TRAIL, un compuesto que se une al menos a dos receptores diferentes y activa la ruta de apoptosis para inducir la muerte celular primariamente en células cancerosas. El segundo compuesto que se ensayó en combinación con los miARN sintéticos era etopósido, un inhibidor de la topoisomerasa II que activa la ruta de apoptosis en células cancerosas al igual que en las normales reduciendo la reparación del ADN dañado en las células.

Se transfectaron por triplicado aproximadamente 8.000 células del cuello uterino (HeLa) y de pulmón (A549, HTB-57, y CRL-5826) por pocillo con miARN sintéticos de la biblioteca de los inventores utilizando siPORT™ *NeoFx*™ (Ambion). Se cambió el medio a las 24 h y se introdujeron el etopósido y el TRIAL a una concentración final de aproximadamente 25 μM después de 48 horas. Las células se inspeccionaron visualmente bajo el microscopio para inspeccionar cualitativamente la muerte celular 64 horas tras la transfección.

Se midió la apoptosis de las células tratadas con etopósido midiendo la actividad de la caspasa 3 de la manera siguiente: 1) Se lavaron las células una vez con PBS y se congelaron a -80 ºC. 2) Las células se lisaron añadiendo 40 μl de tampón de lisado frío (50 mM HEPES pH 7.2, 40 mM NaCl, 0.5% NP40, 0.5 mM EDTA) a los pocillos y se incubaron durante 20 min a 4 ºC. 3) Se añadieron 160 μl de tampón ICE (50 mM HEPES pH 7,4, 0,1% CHAPS, 0,1 mM EDTA, 10% sacarosa) + 5 mM DTT que contenía 20 μM de sustrato DEVDafc. 4) Se midió el aumento de fluorescencia en una hora a 400 ex., 505 em. También se analizaron las muestras para hallar el número de células utilizando un ensayo general de esterasa para normalizar los resultados de caspasa 3. El sustrato FDA (0,4 mg/ml de diacetato de fluoresceína (FDA) en acetonitrilo) se diluyó 1:19 en un tampón de dilución (40 mM TrisCl pH 7,5, 20 mM NaCl, 0,5% NP-40, concentración final 0,02 mg/ml). Se añadieron 40 μl de tampón (40 mM TrisCl pH 7,5, 0,5% NP-40) a cada pocillo de muestra. Las muestras se incubaron 10 min en hielo. Se añadieron 160 μl de sustrato FDA diluido a cada pocillo. Se midió la fluorescencia durante 30 minutos a 37 grados (ex = 488, em = 529). La pendiente del aumento de fluorescencia en el tiempo es una función del número de células en la placa.

Se evaluó la viabilidad celular de las células tratadas con TRAIL añadiendo azul alamar a cada pocillo y se analizó la fluorescencia utilizando un lector de placas. El azul alamar es un sustrato para una enzima metabólica de las células y el producto de la reacción es fluorescente. La fluorescencia de cada pocillo se correlaciona con el número total de células en cada pocillo.

El efecto de cada miARN sobre los tratamientos se midió dividiendo la lectura de caspasa 3 o el azul alamar de las células transfectadas con los miARN y tratadas con TRAIL o etopósido con las mismas lecturas de células que solo se transfectaron con los miARN. El cambio de la actividad de la caspasa 3 o la tinción por azul alamar para cada miARN se dividió entonces por las diferencias observadas en los dos miARN controles negativos y se multiplicaron por 100 para calcular el efecto relativo inducido por la combinación de cada uno de los miARN y el compuesto terapéutico. Estos valores se enumeran como el % CN en la Figura G.

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

Ejemplo 22

Selección de miARN en la biblioteca de miARN que afectan al ciclo celular

El cuerpo de un ser humano adulto está compuesto por aproximadamente 50-100 trillones de células. Cada día, varios billones de estas células se dividen en dos para remplazar los billones de células que mueren y se eliminan. En el curso de una vida media, esto supone un número astronómico de divisiones celulares, la mayoría de las cuales van perfectamente bien. Sin embargo, ocurren errores, y si no se corrigen pueden dar lugar al cáncer. El crecimiento y división de las células se controlan normalmente por un intrincado sistema de controles y equilibrios. Pero ocasionalmente una células que empieza a proliferar salvajemente, dividiéndose una y otra vez y desafiando todas las restricciones sobre su crecimiento. Este es el principio de las formas más comunes de cáncer.

Se transfectaron por triplicado aproximadamente 8.000 células del cuello uterino (HeLa) y 4.000 células de piel (BJ) por pocillo con cada uno de los más de 150 miARN sintéticos de la biblioteca de los inventores. Las células HeLa se transfectaron utilizando siPORT™ *NeoFx*™ (Ambion) y las células BJ se transfectaron utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. A las 24 h de la transfección, la mitad de las células de cada pocillo se retiraron a un medio reciente. A las 72 h post-transfección, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% con una concentración final del 2%. Las células fijadas se tiñeron con yoduro de propidio (protocolo de TTP LabTech) y se evaluaron utilizando el escáner celular TTP LabTech. El yoduro de propidio tiñe el ADN y el contenido relativo de ADN en una célula se corresponde con su posición en el ciclo celular. El escáner celular medía la tinción de yoduro de propidio en cada célula y asignaba su posición en el ciclo celular. Se calculó el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular y se comparó con las células transfectadas por los controles negativos de miARN sintéticos. Se calculó el cambio en las células relativo a cada fase para cada miARN que se había utilizado. Estos miARN sintéticos que inducen un cambio significativo del ciclo celular hacia o en contra de una fase específica del ciclo celular se enumeran posteriormente. Estos representan unos miARN que regulan puntos clave en el ciclo celular y ofrecen puntos clave de intervención para el desarrollo terapéutico relacionado con el cáncer.

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

Ejemplo 23

Selección de miARN en la biblioteca de miARN sintéticos que tienen influencia en la expresión de hTert

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

Las células BJ son fibroblastos normales del prepucio que carecen de actividad de ARNm hTert y telomerasa. Las células BJ se tripsinizaron y se diluyeron hasta 13.000 células/ml en medio de cultivo normal. Se diluyeron 0,3 µl de agente lipofectamina 2000 en 40 µl de OPTIMEM y se incubaron durante cinco minutos. Se añadió reactivo de transfección diluido a los pocillos de placas de 96 pocillos que contenían 151 miARN sintéticos así como dos controles negativos de miARN diferentes. Cada pocillo albergaba un miARN sintético diferente. Los miARN sintéticos y el agente de transfección se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego se añadieron 200 µl (2.600 células) sobre el complejo lípido/miARN. Las células se colocaron en una incubadora y se aisló el ARN 72 horas más tarde. El ARN se aisló de las células de cada pocillo utilizando el protocolo de referencia del kit de Aislamiento de ARN Total RNAqueous™-MagMAX96 (nº de catálogo 1830) (lisis de las células en los pocillos). Se hizo la transcripción inversa utilizando una reacción RETROscript añadiendo 11 ul de ARN total (20-100 ng/µl) a 1 µl de decámeros aleatorios e incubándolos en baño de agua a 70 ºC durante 3 minutos y luego colocándolos en hielo. Después, se le añadieron 8 µl del cóctel que contenía 3,8 µl de agua libre de Nucleasa, 2,0 µl de 10x de tampón de transcripción inversa, 2,0 µl de dNTPs 2,5 mM, Proteína inhibidora de RNasa (40 U/µl), 0,1 µl de MMLV-RT (100 U/µl), y se incubaron a 42 ºC durante 1 hora, y después a 92 ºC durante 10 minutos.

Se ensamblaron reacciones PCR en tiempo real para cuantificar el ARNm hTert y el ARNr 18S en cada una de las muestras. Se colocaron en un tubo de PCR: Agua libre de nucleasa, 10x tampón completo de PCR/SYBR, $MgCl_2$ 25 mM, 2,5 mM de dNTPs, 50x de ROX, cebadores específicos de 18S o hTert (mezcla de directos e inversos 3 µM), el

ADNc de la distintas muestras, y polimerasa Súper taq. Se calentó la reacción a 95 ºC durante 5 minutos y luego se sometió a 40 ciclos a 95 ºC durante 15 segundos, 60 ºC durante 30 segundos, 72 ºC durante 30 segundos. Los productos de amplificación se controlaron utilizando ABI 7600 (Applied Biosystems). Las células BJ normalmente no producen productos de amplificación con los cebadores de hTert. También se analizaron las muestras transfectadas con miARN que daban lugar a productos de PCR hTert para hallar niveles de ARNr 18S para asegurar de que no hubiera significativamente más células en las muestras que pudieran haber contribuido a la cantidad de hTert en las muestras.

Se detectó el ARNm hTert en transfecciones duplicadas de cada uno de los miARN enumerados posteriormente. Estos miARN presumiblemente afectan las rutas que regulan la expresión del gen hTert. La sobre-expresión de cualquiera de estos miARN podría contribuir al cáncer por activación de la telomerasa. La regulación de las actividades de estos miARN en las células cancerosas podría limitar su trasformación y superar la oncogénesis.

Tabla 33

miARN activadores de hTert

miARN	Expresión Log(2) de hTert
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

La exploración de la actividad de telomerasa se repitió utilizando una serie de ARNsi dirigidos a quinasas, fosfatasas, GPCR, factores de transcripción y otros genes variados. La dirección de ARNsi contra los genes siguientes da como resultado un aumento de la expresión de hTert. Resulta interesante que se predijo que muchos de estos genes eran dianas de los miARN que los inventores encontraron reguladores de hTert (véase la tabla siguiente).

Tabla 34

Activadores del Gen hTert

Gen	Expresión Log(2) de hTert
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

Efecto de la secuencia primaria de miARN sobre la función

Parece que muchos miARN están estrechamente relacionados unos con otros basándose en sus secuencias primarias. Por ejemplo, let-7a es un miembro de la familia genética let-7, que incluye 7 genes únicos en el genoma humano. Los genes let-7 codifican miARN que varían por tan poco como un único nucleótido y como mucho en cuatro nucleótidos. En las bibliotecas de miARN sintéticos e inhibidores de miARN, los inventores tienen cinco miARN let-7 humanos diferentes. Estos miARN se han utilizado en muchos tipos celulares diferentes en selecciones diseñadas para identificar los miARN implicados en una variedad de distintos procesos celulares. En muchas de las selecciones, los distintos miARN let-7 generan fenotipos similares. La FIG. 23 proporciona dos ejemplos en los que todos los miembros de la familia let-7 dan lugar a respuestas similares. Por el contrario, hay algunas selecciones en las que los distintos miARN de la familia let-7 dan lugar a 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.
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.
Bernstein y col, Nature, 409: 363-366, 2001.
Bijsterbosch y col, Biochem. Pharmacol., 62(5):627-633, 2001.
Blackie 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.
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
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.
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 zap, Nucleic Acids Res Symposium Series, 21:43-44, 1989.
Crooke, En: Antisense Drug Technology, Marcel Dekker and Co, Basel, Switzerland, 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.
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.
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, 2001 Ene; 29(1):197-208, 2001.
Fechheimer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:8463-8467, 1987.
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.
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.
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.
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.
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.
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, 2d Ed., Freeman, San Francisco, 1992.
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.
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.
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.
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.
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.
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.
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 Gumport, Nucleic Acids Res., 11(18):6167-84, 1983.
Richardson y Macy, Biochemistry, 20(5):1133-9, 1981.
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.
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, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
Sambrook y col., En: Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd Ed., Cold Spring Harbor LaboratoryPress, Cold Spring Harbor, NY, 2001.
Scheit, en: Synthesis and Biological Function, Wiley-Interscience, New 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.
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.
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 e Ikeda, Nucl. Acids Res., 15:101-104,1984.
Tuschl, Chembiochem, 2:239-245,2001.
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.
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.
Wu et at, 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.
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.
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> PROCEDIMIENTOS Y COMPOSICIONES QUE IMPLICAN MOLÉCULA DE MIARN MODIFICADAS Y MOLÉCULAS INHIBIDORAS DE MIARN

<130> R 57137

<140> DESCONOCIDO
<141> 14-11-2005

<150> 60/683.736
<151> 23-05-2005

<150> 60/649.634
<151> 03-02-2005

<150> 60/627.171
<151> 12-11-2004

<160> 803

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 85
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

accuacucag aguacauacu ucuuuaugua cccauaugaa cauacaaugc uauggaaugu 60
aaagaaguau guauuuuugg uaggc 85

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

<400> 2

ugggaaacau acuucuuuau augcccauau ggaccugcua agcuauggaa uguaaagaag 60
uauguaucuc a 71

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

<400> 3

ugggaugagg uaguagguug uauaguuuua gggucacacc caccacuggg agauaacuau 60
acaaucuacu gucuuuccua 80

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

<400> 4

agguugaggu aguagguugu auaguuuaga uuuacaucaa gggagauaac uguacagccu 60
ccuagcuuuc cu 72

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

<400> 5

gggugaggua guagguugua uaguuugggg cucugcccug cuaugggaua acuauacaau 60
cuacugucuu uccu 74

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

<400> 6

cggggugagg uaguagguug ugugguuuca gggcagugau guugccccuc ggaagauaac 60
uauacaaccu acugccuucc cug 83

<210> 7

<211> 84
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 7

gcauccgggu ugagguagua gguuguaugg uuuagaguua cacccuggga guuaacugua 60
caaccuucua gcuuuccuug gagc 84

<210> 8
<211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 8

ccuaggaaga gguaguaggu ugcauaguuu uagggcaggg auuuugccca caaggaggua 60
acuauacgac cugcugccuu ucuuagg 87

<210> 9
<211> 79
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 9

cccgggcuga gguaggaggu uguauaguug aggaggacac ccaaggagau cacuauacgg 60
ccuccuagcu uuccccagg 79

<210> 10
<211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 10

ucagagugag guaguagauu guauaguugu gggguaguga uuuuacccug uucaggagau 60
aacuauacaa ucuauugccu ucccuga 87

<210> 11
<211> 83
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 11

ugugggauga gguaguagau uguauaguuu uagggucaua ccccaucuug gagauaacua 60
uacagucuac ugucuuuccc acg 83

<210> 12
<211> 110
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 12

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

<210> 13
<211> 110
<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 13

cuggauacag aguggaccgg cuggccccau cuggaagacu agugauuuug uuguugucuu 60
acugcgcuca acaacaaauc ccagucuacc uaauggugcc agccaucgca 110

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

<400> 14

agauuagagu ggcugugguc uagugcugug uggaagacua gugauuuugu uguucugaug 60
uacuacgaca acaagucaca gccggccuca uagcgcagac ucccuucgac 110

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

<400> 15

aggcugaggu aguaguuugu acaguuugag ggucuaugau accacccggu acaggagaua 60
acuguacagg ccacugccuu gcca 84

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

<400> 16

cuggcugagg uaguaguuug ugcuguuggu cggguuguga cauugcccgc uguggagaua 60
acugcgcaag cuacugccuu gcua 84

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

<400> 17

cgggguuggu uguuaucuuu gguuaucuag cuguaugagu gguguggagu cuucauaaag 60
cuagauaacc gaaaguaaaa auaacccca 89

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

<400> 18

ggaagcgagu uguuaucuuu gguuaucuag cuguaugagu guauuggucu ucauaaagcu 60
agauaaccga aaguaaaaac uccuuca 87

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

<400> 19

ggaggcccgu uucucucuuu gguuaucuag cuguaugagu gccacagagc cgucauaaag 60
cuagauaacc gaaaguagaa augauucuca 90

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

<400> 20

gaucugucug ucuucuguau auacccugua gauccgaauu uguguaagga auuuuguggu 60
cacaaauucg uaucuagggg aauauguagu ugacauaaac acuccgcucu 110

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

<400> 21

ccagagguug uaacguuguc uauauauacc cuguagaacc gaauuugugu gguauccgua 60
uagucacaga uucgauucua ggggaauaua uggucgaugc aaaaacuuca 110

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

<400> 22

ccuuggagua aaguagcagc acauaauggu uuguggauuu ugaaaaggug caggccauau 60
ugugcugccu caaaaauaca agg 83

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

<400> 23

uugaggccuu aaaguacugu agcagcacau caugguuuac augcuacagu caagaugcga 60
aucauuauuu gcugcucuag aaauuuaagg aaauucau 98

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

<400> 24

gucagcagug ccuuagcagc acguaaauau uggcguuaag auucuaaaau uaucuccagu 60
auuaacugug cugcugaagu aagguugac 89

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

<400> 25

guuccacucu agcagcacgu aaauauuggc guagugaaau auauauuaaa caccaauauu 60
acugugcugc uuuaguguga c 81

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

<400> 26

gucagaauaa ugucaaagug cuuacagugc agguagugau augugcaucu acugcaguga 60
aggcacuugu agcauuaugg ugac 84

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

<400> 27

uguucuaagg ugcaucuagu gcagauagug aaguagauua gcaucuacug cccuaagugc 60
uccuucuggc a 71

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

<400> 28

gcaguccucu guuaguuuug cauaguugca cuacaagaag aauguaguug ugcaaaucua 60
ugcaaaacug augguggccu gc 82

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

<400> 29

cacuguucua ugguuaguuu ugcagguuug cauccagcug ugugauauuc ugcugugcaa 60
auccaugcaa aacugacugu gguagug 87

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

<400> 30

acauugcuac uuacaauuag uuuugcaggu uugcauuuca gcguauauau guauaugugg 60
cugugcaaau ccaugcaaaa cugauuguga uaaugu 96

<210> 31
<211> 71
<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*

<400> 32

ugucggguag cuuaucagac ugauguugac uguugaaucu cauggcaaca ccagucgaug 60
ggcugucuga ca 72

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

<400> 33

ggcugagccg caguaguucu ucaguggcaa gcuuuauguc cugacccagc uaaagcugcc 60
aguugaagaa cuguugcccu cugcc 85

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

<400> 34

ggccggcugg gguuccuggg gaugggauuu gcuuccuguc acaaaucaca uugccaggga 60
uuuccaaccg acc 73

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

<400> 35

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

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

<400> 36

cuccggugcc uacugagcug auaucaguuc ucauuuuaca cacuggcuca guucagcagg 60
aacaggag 68

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

<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
<211> 77
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 39

guggccucgu ucaaguaauc caggauaggc ugugcagguc ccaaugggcc uauucuuggu 60
uacuugcacg gggacgc 77

<210> 40
<211> 77
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 40

ccgggaccca guucaaguaa uucaggauag guugugugcu guccagccug uucuccauua 60
cuuggcucgg ggaccgg 77

<210> 41
<211> 84
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 41

ggcuguggcu ggauucaagu aauccaggau aggcuguuuc caucugugag gccuauucuu 60
gauuacuugu uucuggaggc agcu 84

<210> 42
<211> 78
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 42

cugaggagca gggcuuagcu gcuugugagc aggguccaca ccaagucgug uucacagugg 60
cuaaguuccg ccccccag 78

<210> 43
<211> 97
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 43

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

<210> 44
<211> 86
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 44

ggucccuugcc cucaaggagc ucacagucua uugaguuacc uuucugacuu ucccacuaga 60
uugugagcuc cuggagggca ggcacu 86

<210> 45
<211> 64
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 45

augacugauu ucuuuuggug uucagaguca auauaauuuu cuagcaccau cugaaaucgg 60
uuau 64

<210> 46
<211> 81
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 46

cuucaggaag cuggcuuucau auggugguuu agauuuaaau agugauuguc uagcaccauu 60
ugaaaucagu guucuuggggg g 81

<210> 47
<211> 81
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 47

cuucuggaag cuggcuuucac auggcuggcuu agauuuuucc aucuuuguau cuagcaccau 60
uugaaaucag uguuuuagga g 81

<210> 48
<211> 88
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 48

aucucuuaca caggcugacc gauuucuccu gguguucaga gucuguuuuu gucuagcacc 60
auuugaaauc gguuaugaug uaggggga 88

<210> 49
<211> 71
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 49

gcgacuguaa acauccucga cuggaagcug ugaagccaca gaugggcuuu cagucggaug 60
uuugcagcug c 71

<210> 50
<211> 72
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 50

agauacugua aacauccuac acucucagcu guggaaagua agaaagcugg gagaaggcug 60
uuuacucuuu cu 72

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

<400> 51

guuguuguaa acaucccega cuggaagcug uaagacacag cuaagcuuuc agucagaugu 60
uugcugcuac 70

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

<400> 52

accaaguuuc aguucaugua aacauccuac acucagcugu aauacaugga uuggcuggga 60
gguggauguu uacuucagcu gacuugga 88

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

<400> 53

accaugcugu agugugugua aacauccuac acucucagcu gugagcucaa gguggcuggg 60
agaggguugu uuacuccuuc ugccaugga 89

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

<400> 54

cuguaaacau ccuugacugg aagcuguaag guguucagag gagcuuucag ucggauguuu 60
acag 64

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

<400> 55

ggagaggagg caagaugcug gcauagcugu ugaacuggga accugcuaug ccaacauauu 60
gccaucuuuc c 71

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

<400> 56

ggagauauug cacauuacua aguugcaugu ugucacggcc ucaaugcaau uuagugugug 60
ugauauuuuc 70

<210> 57
<211> 69
<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 57

cuguggugca uuguaguugc auugcauguu cuggugguac ccaugcaaug uuuccacagu 60
gcaucacag 69

<210> 58
<211> 110
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 58

ggccagcugu gaguguuucu uuggcagugu cuuagcuggu uguugugagc aauaguaagg 60
aagcaaucag caaguauacu gcccuagaag ugcugcacgu ugugggggccc 110

<210> 59
<211> 84
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 59

gugcucgguu uguaggcagu gucauuagcu gauuguacug ugguggguuac aaucacuaac 60
uccacugcca ucaaaacaag gcac 84

<210> 60
<211> 77
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 60

agucuaguua cuaggcagug uaguuagcug auugcuaaua guaccaauca cuaaccacac 60
ggccagguaa aaagauu 77

<210> 61
<211> 78
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 61

cuuucuacac agguugggau cgguugcaau gcuguguuuc uguaugguau ugcacuuguc 60
ccggccuguu gaguuugg 78

<210> 62
<211> 75
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 62

ucaucccugg gugggguuu guugcauuac uuguguucua uauaaaguau ugcacuuguc 60
ccggccugug gaaga 75

<210> 63
<211> 80
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 63

cuggggcuc caaagugcug uucgugcagg uagugugauu acccaaccua cugcugagcu 60
agcacuuccc gagccccgg 80

<210> 64
<211> 81
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 64

aacacagugg gcacucaaua aaugucuguu gaauugaaau gcguuacauu caacggguau 60
uuauugagca cccacucugu g 81

<210> 65
<211> 78
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 65

uggccgauuu uggcacuagc acauuuuugc uugugucucu ccgcucugag caaucaugug 60
cagugccaau augggaaa 78

<210> 66
<211> 80
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 66

gugagguagu aaguuguauu guuguggggu agggauauua ggccccaauu agaagauaac 60
uauacaacuu acuacuuucc 80

<210> 67
<211> 81
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 67

cccauuggca uaaacccgua gauccgaucu uguggugaag uggaccgcac aagcucgcuu 60
cuaugggucu gugucagugu g 81

<210> 68
<211> 70
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 68

ggcacccacc cguagaaccg accuugcggg gccuucgccg cacacaagcu cgugucugug 60
gguccguguc 70

<210> 69
<211> 80
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 69

ccuguugcca caaacccgua gauccgaacu ugugguauua guccgcacaa gcuuguaucu 60
auagguaugu gucuguuagg 80

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

<400> 70

ugcccuggcu caguuaucac agugcugaug cugucuauuc uaaagguaca guacugugau 60
aacugaagga uggca 75

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

<400> 71

acuguccuuu uucgguuauc augguaccga ugcuguauau cugaaaggua caguacugug 60
auaacugaag aaugguggu 79

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

<400> 72

uugugcuuuc agcuucuuua cagugcugcc uuguagcauu caggucaagc agcauuguac 60
agggcuauga aagaacca 78

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

<400> 73

uacugcccuc ggcuucuuua cagugcugcc uuguugcaua uggaucaagc agcauuguac 60
agggcuauga aggcauug 78

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

<400> 74

ugugcaucgu ggucaaaugc ucagacuccu gugguggcug cucaugcacc acggauguuu 60
gagcaugugc uacggugucu a 81

<210> 75
<211> 81
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 75

ugugcaucgu ggucaaaugc ucagacuccu gugguggcug cuuaugcacc acggauguuu 60
gagcaugugc uauggugucu a 81

<210> 76
<211> 81
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 76

ccuuggccau guaaaagugc uuacagugca gguagcuuuu ugagaucuac ugcaauguaa 60
gcacuucuua cauuaccaug g 81

<210> 77
<211> 82
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 77

ccugccgggg cuaaagugcu gacagugcag auaguggucc ucuccgugcu accgcacugu 60
ggguacuugc ugcuccagca gg 82

<210> 78
<211> 81
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 78

cucucugcuu ucagcuucuu uacaguguug ccuuguggca uggaguucaa gcagcauugu 60
acagggcuau caaagcacag a 81

<210> 79
<211> 85
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 79

ccuuagcaga gcuguggagu gugacaaugg uguuuguguc uaaacuauca aacgccauua 60
ucacacuaaa uagcuacugc uaggc 85

<210> 80
<211> 85
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 80

aggccucucu cuccguguuc acagcggacc uugauuuaaa uguccauaca auuaaggcac 60
gcggugaaug ccaagaaugg ggcug 85

<210> 81
<211> 109
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 81

aucaagauua gaggcucugc ucuccguguu cacagcggac cuugauuuaa ugucauacaa 60
uuaaggcacg cggugaaugc caagagcgga gccuacggcu gcacuugaa 109

<210> 82
<211> 87
<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 82

ugagggcccc ucugcguguu cacagcggac cuugauuuaa ugucuauaca auuaaggcac 60
gcggugaaug ccaagagagg cgccucc 87

<210> 83
<211> 88
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 83

ugcgcuccuc ucagucccug agacccuaac uugugauguu uaccguuuaa auccacgggu 60
uaggcucuug ggagcugcga gucgugcu 88

<210> 84
<211> 86
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 84

ugccagucuc uaggucccug agacccuuua accugugagg acauccaggg ucacagguga 60
gguucuuggg agccuggcgu cuggcc 86

<210> 85
<211> 89
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 85

accagacuuu uccuaguccc ugagacccua acuugugagg uauuuuagua acaucacaag 60
ucaggcucuu gggaccuagg cggagggga 89

<210> 86
<211> 85
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 86

cgcuggcgac gggacauuau uacuuuuggu acgcgcugug acacuucaaa cucguaccgu 60
gaguaauaau gcgccgucca cggca 85

<210> 87
<211> 97
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 87

ugugaucacu gucuccagcc ugcugaagcu cagagggcuc ugauucagaa agaucaucgg 60
auccgucuga gcuuggcugg ucggaagucu caucauc 97

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

<400> 88

ugagcuguug gauucggggc cguagcacug ucugagaggu uuacauuucu cacagugaac 60
cggucucuuu uucagcugcu uc 82

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

<400> 89

ugugcagugg gaaggggggc cgauacacug uacgagagug aguagcaggu cucacaguga 60
accggucucu uucccuacug uguc 84

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

<400> 90

ugcccuucgc gaaucuuuuu gcggucuggg cuugcuguac auaacucaau agccggaagc 60
ccuuacccca aaaagcauuu gcggagggcg 90

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

<400> 91

ugcugcuggc cagagcucuu uucacauugu gcuacugucu gcaccuguca cuagcagugc 60
aauguuaaaa gggcauuggc cguguagug 89

<210> 92
<211> 82
<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*

<400> 93

ccgcccccgc gucuccaggg caaccguggc uuucgauugu uacugUggga acuggaggua 60
acagucuaca gccauggucg ccccgcagca cgcccacgcg c 101

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

<400> 94

acaaugcuuu gcuagagcug guaaaaugga accaaaucgc cucuucaaug gauuuggucc 60
ccuucaacca gcuguagcua ugcauuga 88

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

<400> 95

gggagccaaa ugcuuugcua gagcugguaa aauggaacca aaucgacugu ccaauggauu 60
uggucccuu caaccagcug uagcugugca uugauggcgc cg 102

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

<400> 96

ccucagaaga aagaugcccc cugcucuggc uggucaaacg gaaccaaguc cgucuuccug 60
agagguuugg ucccccuuca ccagcuacag cagggcuggc aaugcccagu ccuuggaga 119

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

<400> 97

cagggugugu gacugguuga ccagaggggc augcacugug uucacccugu gggccaccua 60
gucaccaacc cuc 73

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

<400> 98

aggccucgcu guucucuaug gcuuuuuauu ccuaugugau ucuacugcuc acucauauag 60
ggauuggagc cguggcgcac ggcggggaca 90

<210> 99
<211> 100
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 99

agauaaauuc acucuagugc uuuauggcuu uuuauuccua ugugauagua auaaagucuc 60
auguagggau ggaagccaug aaauacauug ugaaaaauca 100

<210> 100
<211> 97
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 100

cacucugcug uggccuaugg cuuuucauuc cuaugugauu gcugucccaa acucauguag 60
ggcuaaaagc caugggcuac agugaggggc gagcucc 97

<210> 101
<211> 82
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 101

ugagcccucg gaggacucca uuuguuuuga ugauggauuc uuaugcucca ucaucgucuc 60
aaaugagucu ucagaggguu cu 82

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

<400> 102

gguccucuga cucucuucgg ugacggguau ucuugggugg auaauacgga uuacguuguu 60
auugcuuaag aauacgcgua gucgaggaga guaccagcgg ca 102

<210> 103
<211> 84
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 103

cguugcugca gcugguguug ugaaucaggc cgacgagcag cgcauccucu uacccggcua 60
uuucacgaca ccaggguugc auca 84

<210> 104
<211> 99
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 104

cccuggcaug gugugguggg gcagcuggug uugugaauca ggccguugcc aaucagagaa 60
cggcuacuuc acaacaccag ggccacacca cacuacagg 99

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

<400> 105

guguauucua cagugcacgu gucuccagug uggcucggag gcuggagacg cggcccuguu 60
ggaguaac 68

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

<400> 106

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

<210> 107
<211> 95

<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 107

cggccggccc uggguccauc uuccaguaca guguuggaug gucuaauugu gaagcuccua 60
acacugucug guaaagaugg cucccgggug gguuc 95

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

<400> 108

gacagugcag ucacccauaa aguagaaagc acuacuaaca gcacuggagg guguaguguu 60
uccuacuuua uggaugagug uacugug 87

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

<400> 109

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

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

<400> 110

uggggcccug gcugggauau caucauauac uguaaguuug cgaugagaca cuacaguaua 60
gaugauguac uaguccgggc accccc 86

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

<400> 111

caccuugucc ucacggucca guuuucccag gaaucccuua gaugcuaaga uggggauucc 60
uggaaauacu guucuugagg ucaugguu 88

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

<400> 112

ccgaugugua uccucagcuu ugagaacuga auuccauggg uuugugucagu gucagaccuc 60
ugaaauucag uucuucagcu gggauaucuc ugucaucgu 99

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

<400> 113

aaucuaaaga caacauuucu gcacacacac cagacuaugg aagccagugu guggaaaugc 60
uucugcuaga uu 72

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

<400> 114

gaggcaaagu ucugagacac uccgacucug aguaugauag aagucagugc acuacagaac 60
uuugucuc 68

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

<400> 115

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

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

<400> 116

gccggcgccc gagcucuggc uccgugucuu cacucccgug cuuguccgag gagggaggga 60
gggacggggg cugugcuggg gcagcugga 89

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

<400> 117

cuccccaugg cccugucucc caacccuugu accagugcug ggcucagacc cugguacagg 60
ccugggggac agggaccugg ggac 84

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

<400> 118

uuuccugccc ucgaggagcu cacagucuag uaugucucau ccccuacuag acugaagcuc 60
cuugaggaca gggaugguca uacucaccuc 90

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

<400> 119

uguccccccc ggcccagguu cugugauaca cuccgacucg ggcucuggag cagucagugc 60
augacagaac uugggcccgg aaggacc 87

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

<400> 120

cucacagcug ccagugucau uuuugugauc ugcagcuagu auucucacuc caguugcaua 60
gucacaaaag ugaucauugg caggugguggc 90

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

<400> 121

agcgguggcc agugucauuu uugugauguu gcagcuagua auaugagccc aguugcauag 60
ucacaaaagu gaucauugga aacugug 87

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

<400> 122

gugguacuug aagauagguu auccguguug ccuucgcuuu auuugugacg aaucauacac 60
gguugaccua uuuuucagua ccaa 84

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

<400> 123

cuguuaaugc uaaucgugau agggguuuuu gccuccaacu gacuccuaca uauuagcauu 60
aacag 65

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

<400> 124

agaagggcua ucaggccagc cuucagagga cuccaaggaa cauucaacgc ugucggugag 60
uuugggauuu gaaaaaacca cugaccguug acuguaccuu gggguccuua 110

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

<400> 125

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

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

<400> 126

cggaaaauuu gccaaggguu ugggggaaca uucaaccugu cggugaguuu gggcagcuca 60
ggcaaaccau cgaccguuga guggacccug aggccuggaa uugccauccu 110

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

<400> 127

cugauggcug cacucaacau ucauugcugu cgguggguuu gagucugaau caacucacug 60
aucaaugaau gcaaacugcg gaccaaaca 89

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

<400> 128

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

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

<400> 129

ccgcagagug ugacuccugu ucuguguaug gcacugguag aauucacugu gaacagucuc 60
agucagugaa uuaccgaagg gccauaaaca gagcagagac agauccacga 110

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

<400> 130

ccagucacgu ccccuuauca cuuuuccagc ccagcuuugu gacuguaagu guuggacgga 60
gaacugauaa ggguagguga uuga 84

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

<400> 131

aggggcgag ggauuggaga gaaaggcagu uccugauggu ccccucccca ggggcuggcu 60
uuccucuggu ccuucccucc ca 82

<210> 132

<211> 86
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 132

ugcuuguaac uuuccaaaga auucuccuuu ugggcuuucu gguuuuauuu uaagcccaaa 60
ggugaauuuu uugggaaguu 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 cucacauccc uugcauggug gagggugagc uuucugaaaa ccccucccac 60
augcaggguu ugcaggaugg cgagcc 86

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

<400> 135

ugcaggccuc ugugugauau guuugauaua uuagguuguu auuuaaucca acuauauauc 60
aaacauauuc cuacaguguc uugcc 85

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

<400> 136

cggcuggaca gcgggcaacg gaaucccaaa agcagcuguu gucuccagag cauuccagcu 60
gcgcuuggau uucgucccca gcucuccugc cu 92

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

<400> 137

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

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

<400> 138

cgaggauggg agcugagggc ugggucuuug cgggcgagau gagggugucg gaucaacugg 60
ccuacaaagu cccaguucuc ggcccccg 88

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

<400> 139

augguguuau caaguguaac agcaacucca uguggacugu guaccaauuu ccaguggaga 60
ugcuguuacu uuugaugguu accaa 85

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

<400> 140

ugguucccgc ccccuguaac agcaacucca uguggaagug cccacugguu ccaguggggc 60
ugcuguuauc uggggcgagg gccag 85

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

<400> 141

agcuucccug gcucuagcag cacagaaaua uuggcacagg gaagcgaguc ugccaauauu 60
ggcugugcug cuccaggcag gguggug 87

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

<400> 142

gugaauuagg uaguuucaug uuguugggcc uggguuucug aacacaacaa cauuaaacca 60
cccgauucac 70

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

<400> 143

ugcucgcuca gcugaucugu ggcuuaggua guuucauguu guugggauug aguuuugaac 60
ucggcaacaa gaaacugccu gaguuacauc agucgguuuu cgucgagggc 110

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

<400> 144

ggcugugccg gguagagagg gcagugggag guaagagcuc uucacccuuc accaccuucu 60
ccacccagca uggcc 75

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

<400> 145

ucauuggucc agaggggaga uagguuccug ugauuuuucc uucuucucua uagaauaaau 60
ga 62

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

<400> 146

gccaacccag uguucagacu accuguucag gaggcucuca auguguacag uagucugcac 60
auugguuagg c 71

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

<400> 147

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

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

<400> 148

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

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

<400> 149

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

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

<400> 150

cccucgucuu acccagcagu guuugggugc gguugggagu cucuaauacu gccggguaau 60
gauggagg 68

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

<400> 151

ccgggccccu gugagcaucu uaccggacag ugcuggauuu cccagcuuga cucuaacacu 60
gucugguaac gauguucaaa ggugacccgc 90

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

<400> 152

guguugggga cucgcgcgcu ggguccagug guucuuaaca guucaacagu ucuguagcgc 60
aauugugaaa uguuuaggac cacuagaccc ggcgggcgcg gcgacagcga 110

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

<400> 153

ggcuacaguc uuucuucaug ugacucgugg acuucccuuu gucauccuau gccugagaau 60
auaugaagga ggcugggaag gcaaagggac guucaauugu caucacuggc 110

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

<400> 154

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

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

<400> 155

ugcuucccga ggccacaugc uucuuuauau ccccauaugg auuacuuugc uauggaaugu 60
aaggaagugu gugguuucgg caagug 86

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

<400> 156

ugacgggcga gcuuuuggcc cggguuauac cugaugcuca cguauaagac gagcaaaaag 60
cuuguugguc a 71

<210> 157
<211> 110

<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 157

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

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

<400> 158

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

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

<400> 159

cggggcaccc cgcccggaca gcgcgccggc accuuggcuc uagacugcuu acugcccggg 60
ccgcccucag uaacagucuc cagucacggc caccgacgcc uggccccgcc 110

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

<400> 160

ugaguuuuga gguugcuuca gugaacauuc aacgcugucg gugaguuugg aauuaaaauc 60
aaaaccaucg accguugauu guacccuaug gcuaaccauc aucuacucca 110

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

<400> 161

ggccuggcug gacagaguug ucaugugucu gccugucuac acuugcugug cagaacaucc 60
gcucaccugu acagcaggca cagacaggca gucacaugac aacccagccu 110

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

<400> 162

aucauucaga aaugguauac aggaaaauga ccuaugaauu gacagacaau auagcugagu 60
uugucuguca uuucuuuagg ccaauauucu guaugacugu gcuacuucaa 110

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

<400> 163

gauggcugug aguuggcuua aucucagcug gcaacuguga gauguucaua caaucccuca 60
caguggucuc ugggauuaug cuaaacagag caauuuccua gcccucacga 110

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

<400> 164

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

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

<400> 165

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

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

<400> 166

gaccagucgc ugcggggcuu uccuuugugc uugaucuaac cauguggugg aacgauggaa 60
acggaacaug guucugucaa gcaccgcgga aagcaccgug cucuccugca 110

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

<400> 167

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

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

<400> 168

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

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

<400> 169

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

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

<400> 170

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

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

<400> 171

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

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

<400> 172

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

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

<400> 173

gggcuuucaa gucacuagug guuccguuua guagaugauu gugcauuguu ucaaaauggu 60
gcccuaguga cuacaaagcc c 81

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

<400> 174

aggacccuuc cagagggccc ccccucaauc cuguugugcc uaauucagag gguuugggugg 60
aggcucuccu gaagggcucu 80

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

<400> 175

aagaaauggu uuaccguccc acauacauuu ugaauaugua ugugggaugg uaaaccgcuu 60
cuu 63

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

<400> 176

acugcuaacg aaugcucuga cuuuauugca cuacuguacu uuacagcuag cagugcaaua 60
guauugucaa agcaucugaa agcagg 86

<210> 177
<211> 69
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 177

ccaccacuua aacguggaug uacuugcuuu gaaacuaaag aaguaagugc uuccauguuu 60
uggugaugg 69

<210> 178
<211> 82
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 178

gcuucgcucc ccuccgccuu cucuucccgg uucuucccgg agucgggaaa agcuggguug 60
agagggcgaa aaaggaugag gu 82

<210> 179
<211> 59
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 179
uuggccuccu aagccaggga uuguggguuc gaguccacc cggguaaag aaaggccga 59

<210> 180
<211> 86
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 180

uugguacuug gagagaggug guccguggcg cguucgcuuu auuuauggcg cacauuacac 60
ggucgaccuc uuugcaguau cuaauc 86

<210> 181
<211> 83
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 181

cugacuaugc cucccccgcau ccccuagggc auugguguaa agcuggagac ccacugcccc 60
aggugcugcu ggggguugua guc 83

<210> 182
<211> 95
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 182

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

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

<400> 183

uggagugggg gggcaggagg ggcucaggga gaaagugcau acagccccug gcccucucug 60
cccuuccguc cccug 75

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

<400> 184

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

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

<400> 185

gaguuugguu uuguuugggu uuguucuagg uauggcccca gggaucccag aucaaaccag 60
gccccugggc cuauccuaga accaaccuaa gcuc 94

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

<400> 186

uguuuugagc gggggucaag agcaauaacg aaaaauguuu gucauaaacc guuuuucauu 60
auugcuccug accuccucuc auuugcuaua uuca 94

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

<400> 187

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

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

<400> 188

ucuccaacaa uauccuggug cugagugaug acucaggcga cuccagcauc agugauuuug 60
uugaaga 67

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

<400> 189

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

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

<400> 190

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

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

<400> 191

gaaacugggc ucaaggugag gggugcuauc ugugauugag ggacaugguu aauggaauug 60
ucucacacag aaaucgcacc cgucaccuug gccuacuua 99

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

<400> 192

gcuugggaca cauacuucuu uauaugccca uaugaaccug cuaagcuaug gaauguaaag 60
aaguauguau uucaggc 77

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

<400> 193

ucagagcaca uacuucuuua uguacccaua ugaacauuca gugcuaugga auguaaagaa 60
guauguauuu ug 72

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

<400> 194

ccaggcugag guaguaguuu guacaguuug agggucuaug auaccacccg guacaggaga 60
uaacuguaca ggccacugcc uugccagg 88

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

<400> 195

cuggcugagg uaguaguuug ugcuguuggu cgggguuguga cauugcccgc uguggagaua 60
acugcgcaag cuacugccuu gcuag 85

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

<400> 196

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

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

<400> 197

uucacugugg gaugagguag uagguuguau aguuuuaggg ucacacccac cacugggaga 60
uaacuauaca aucuacuguc uuuccuaagg ugau 94

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

<400> 198

cugcauguuc ccagguugag guaguagguu guauaguuua gaguuacauc aagggagaua 60
acuguacagc cuccuagcuu uccuugggac uugcac 96

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

<400> 199

gcagggugag guaguagguu gugugguuuc agggcaguga uguugccccu ccgaagauaa 60
cuauacaacc uacugccuuc ccuga 85

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

<400> 200

ugugugcauc cggguugagg uaguagguug uaugguuuag aguuacaccc ugggaguuaa 60
cuguacaacc uucuagcuuu ccuuggagca cacu 94

<210> 201
<211> 95
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 201

acggccuuug gggugaggua guagguugua ugguuuuggg cucugccccg cucugcggua 60
acuauacaau cuacugucuu uccugaagug gccgc 95

<210> 202
<211> 93
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 202

cgcgcccccc gggcugaggu aggagguugu auaguugagg aagacacccg aggagaucac 60
uauacggccu ccuagcuuuc cccaggcugc gcc 93

<210> 203
<211> 89
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 203

aucagaguga gguaguagau uguauaguug ugggguagug auuuuacccu guuuaggaga 60
uaacuauaca aucuauugcc uucccugag 89

<210> 204
<211> 83
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 204

ugugggauga gguaguagau uguauaguuu uagggucaua ccccaucuug gagauaacua 60
uacagucuac ugucuuuccc acg 83

<210> 205
<211> 108
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 205

uuggauguug gccuaguucu guguggaaga cuagugauuu uguuguuuuu agauaacuaa 60
aacgacaaca aaucacaguc ugccauaugg cacaggccac cucuacag 108

<210> 206
<211> 97
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<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 agugcuaugu ggaagacuug ugauuuuguu guucugauau 60
gauaugacaa caagucacag ccagccucau agcguggacu ccuaucaccu u 111

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

<400> 208

guuguuaucu uugguuaucu agcuguauga guguauuggu cuucauaaag cuagauaacc 60
gaaaguaaaa ac 72

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

<400> 209

cgggguuggu uguuaucuuu gguuaucuag cuguaugagu gguguggagu cuucauaaag 60
cuagauaacc gaaaguaaaa auaacccca 89

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

<400> 210

ggaggcccgu uucucucuuu gguuaucuag cuguaugagu gccacagagc cgucauaaag 60
cuagauaacc gaaaguagaa augacucuca 90

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

<400> 211

uauauacccu guagaaccga auuugugugg uacccacaua gucacagauu cgauucuagg 60
ggaauaua 68

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

<400> 212

gaucugucug ucuucuguau auacccugua gauccgaauu uguguaagga auuuuguggu 60
cacaaauucg uaucuagggg aauauguagu ugacauaaac acuccgcuca 110

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

<400> 213

gaccugucug ucuucuguau auacccugua gauccgaauu uguguaagga auuuuguggu 60
cacaaauucg uaucuagggg aauauguagu ugacauaaac acuccgcuca 110

<210> 214
<211> 64
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 214

cuguagcagc acaucauggu uuacauacua cagucaagau gcgaaucauu auuugcugcu 60
cuag 64

<210> 215
<211> 84
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 215

cccuuggagu aaaguagcag cacauaaugg uuuguggaug uugaaaaggu gcaggccaua 60
cugugcugcc ucaaaauaca agga 84

<210> 216
<211> 93
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 216

augucagcgg ugccuuagca gcacguaaau auuggcguua 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
caauauuauu gugcugcuuu agugugacag ggaua 95

<210> 218
<211> 84
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 218

gucagaauaa ugucaaagug cuuacagugc agguagugau gugugcaucu acugcaguga 60
gggcacuugu agcauuaugc ugac 84

<210> 219
<211> 96
<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
<213> *Homo sapiens*

<400> 220

acuuacgauu aguuuugcag auuugcaguu cagcguauau gugaauauau ggcugugcaa 60
auccaugcaa aacugauugu ggga 84

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

<400> 221

gcagcccucu guuaguuuug cauaguugca cuacaagaag aauguaguug ugcaaaucua 60
ugcaaaacug augguggccu gc 82

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

<400> 222

cacuggucua ugguuaguuu ugcagguuug cauccagcug uauaauauuc ugcugugcaa 60
auccaugcaa aacugacugu gguggug 87

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

<400> 223

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

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

<400> 224

uguaccaccu ugucggauag cuuaucagac ugauguugac uguugaaucu cauggcaaca 60
gcagucgaug ggcugucuga cauuuuggua uc 92

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

<400> 225

accuggcuga gccgcaguag uucuucagug gcaagcuuua uguccugacc cagcuaaagc 60
ugccaguuga agaacuguug cccucugccc cuggc 95

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

<400> 226

ggcugcuugg guuccuggca ugcugauuug ugacuugaga uuaaaaucac auugccaggg 60
auuaccacgc aacc 74

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

<400> 227

cggacggcug ggguuccugg ggaugggauu ugaugccagu cacaaaucac auugccaggg 60
auuuccaacu gaccc 75

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

<400> 228

cuccggugcc uacugagcug auaucaguuc ucauuucaca cacuggcuca guucagcagg 60
aacaggag 68

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

<400> 229

gccucucucc gggcuccgcc ucccgugccu acugagcuga aacaguugau uccagugcac 60
uggcucaguu cagcaggaac aggaguccag cccccuagga gcuggca 107

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

<400> 230

ggccaguguu gagaggcgga gacuugggca auugcuggac gcugcccugg gcauugcacu 60
ugucucgguc ugacagugcc ggcc 84

<210> 231

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

<400> 231

aaggccgugg ccucguucaa guaauccagg auaggcugug caggucccaa ggggccuauu 60
cuugguuacu ugcacgggga cgcgggccug 90

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

<400> 232

ugcccgggac ccaguucaag uaauucagga uagguugugg ugcugaccag ccuguucucc 60
auuacuuggc ucgggggccg gugcc 85

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

<400> 233

ggcugcggcu ggauucaagu aauccaggau aggcuguguc cguccaugag gccuguucuu 60
gauuacuugu uucuggaggc agcg 84

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

<400> 234

aggugcagag cuuagcugau uggugaacag ugauuggguu ccgcuuuguu cacaguggcu 60
aaguucugca ccu 73

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

<400> 235

uggccugagg agcagggcuu agcugcuugu gagcaagguc cacagcaaag ucguguucac 60
aguggcuaag uuccgccccc uggaccc 87

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

<400> 236

ggucccuacc uucaaggagc ucacagucua uugaguugcc uuucugauuc ucccacuaga 60
uugugagcug cuggagggca ggcacu 86

<210> 237
<211> 71
<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 237

aggaagcugg uuucauaugg ugguuuagau uuaaauagug auugucuagc accauuugaa 60
aucaguguuc u 71

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

<400> 238

accccuuaga ggaugacuga uuucuuuugg uguucagagu caauagaauu uucuagcacc 60
aucugaaauc gguuauaaug auuugggga 88

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

<400> 239

aucucuuaca caggcugacc gauuucuccu gguguucaga gucuguuuuu gucuagcacc 60
auuugaaauc gguuaugaug uaggggga 88

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

<400> 240

cuucuggaag cugguuucac augguggcuu agauuuuucc aucuuuguau cuagcaccau 60
uugaaaucag uguuuuagga g 81

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

<400> 241

gcgacuguaa acauccucga cuggaagcug ugaagccaca aaugggcuuu cagucggaug 60
uuugcagcug c 71

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

<400> 242
auguaaacau ccuacacuca gcugucauac augcguuggc ugggaugugg auguuuacgu 60

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

<400> 243

cuguaaacau ccuugacugg aagcuguaag guguugagag gagcuuucag ucggauguuu 60

acag 64

<210> 244
<211> 89
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 244

accauguugu agugugugua aacauccuac acucucagcu gugagcucaa gguggcuggg 60
agaggguugu uuacuccuuc ugccaugga 89

<210> 245
<211> 84
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 245

gagugacaga uauuguaaac auccuacacu cucagcugug aaaaguaaga aagcugggag 60
aaggcuguuu acucucucug ccuu 84

<210> 246
<211> 82
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 246

aagucugugu cuguaaacau ccccgacugg aagcuguaag ccacagccaa gcuuucaguc 60
agauguuugc ugcuacuggc uc 82

<210> 247
<211> 106
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 247

ugcuccugua acucggaacu ggagaggagg caagaugcug gcauagcugu ugaacugaga 60
accugcuaug ccaacauauu gccaucuuuc cugucugaca gcagcu 106

<210> 248
<211> 70
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 248

ggagauauug cacauuacua aguugcaugu ugucacggcc ucaaugcaau uuagugugug 60
ugauauuuuc 70

<210> 249
<211> 69
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 249

cuguggugca uuguaguugc auugcauguu cuggcaauac cugugcaaug uuuccacagu 60
gcaucacgg 69

<210> 250
<211> 77
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 250

agucuaguua cuaggcagug uaguuagcug auugcuaaua guaccaauca cuaaccacac 60

agccagguaa aaagacu 77

<210> 251
<211> 84
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 251

gugcucgguu uguaggcagu guaauuagcu gauuguagug cggugcugac aaucacuaac 60
uccacugcca ucaaaacaag gcac 84

<210> 252
<211> 102
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 252

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

<210> 253
<211> 91
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 253

ugcccauuca uccacaggug gggauuggug gcauuacuug uguuagauau aaaguauugc 60
acuugucccg gccugaggaa gaaagagggu u 91

<210> 254
<211> 80
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 254

cuuucuacac agguugggau uugucgcaau gcuguguuuc ucuguauggu auugcacuug 60
ucccggccug uugaguuugg 80

<210> 255
<211> 88
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 255

agucaugggg gcuccaaagu gcuguucgug cagguagugu aauuaccuga ccuacugcug 60
agcuagcacu ucccgagccc ccaggaca 88

<210> 256
<211> 106
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 256

ccaguaccau 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 guuguggggu agggauuuua ggccccagua agaagauaac 60
uauacaacuu acuacuuucc 80

<210> 258
<211> 65
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 258

cauaaacccg uagauccgau cuugugguga aguggaccgc gcaagcucgu uucuaugggu 60
cugug 65

<210> 259
<211> 70
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 259

ggcacccacc cguagaaccg accuugcggg gccuucgccg cacacaagcu cgugucugug 60
gguccguguc 70

<210> 260
<211> 80
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 260

ccuguugcca caaacccgua gauccgaacu ugugcugauu cugcacacaa gcuugugucu 60
auagguaugu gucuguuagg 80

<210> 261
<211> 57
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 261

ucaguuauca cagugcugau gcuguccauu cuaaagguac aguacuguga uaacuga 57

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

<400> 262

aucugagacu gaacugcccu uuuucgguua ucaugguacc gaugcuguag cucugaaagg 60
uacaguacug ugauagcuga agaauggcgg ugccauc 97

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

<400> 263

uucuuacugc ccucggcuuc uuuacagugc ugccuuguug cauauggauc aagcagcauu 60
guacagggcu augaaggcau ugagac 86

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

<400> 264

gucuucgugc uuucagcuuc uuuacagugc ugccuuguag cauucagguc aagcagcauu 60
guacagggcu augaaagaac caagaa 86

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

<400> 265

augucaaagu gcuaacagug cagguagcuu uuugaguucu acugcagugc cagcacuucu 60
uacau 65

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

<400> 266

ccugcuggga cuaaagugcu gacagugcag auaguggucc ucucugugcu accgcacugu 60
ggguacuugc ugcuccagca gg 82

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

<400> 267

uucucugugc uuucagcuuc uuuacagugu ugccuugugg cauggaguuc aagcagcauu 60
guacagggcu aucaaagcac agagagc 87

<210> 268
<211> 66
<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 268

agcuguggag ugugacaaug guguuugugu ccaaaccauc aaacgccauu aucacacuaa 60
auagcu 66

<210> 269
<211> 68
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 269

cucugcgugu ucacagcgga ccuugauuua augucuauac aauuaaggca cgcggugaau 60
gccaagag 68

<210> 270
<211> 85
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 270

aggccucucu cuccguguuc acagcggacc uugauuuaaa uguccauaca auuaaggcac 60
gcggugaaug ccaagaaugg ggcug 85

<210> 271
<211> 109
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 271

aucaagauca gagacucugc ucuccguguu cacagcggac cuugauuuaa ugucauacaa 60
uuaaggcacg cggugaaugc caagagcgga gccuacggcu gcacuugaa 109

<210> 272
<211> 68
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 272

cugggucccu gagacccuuu aaccugugag gacguccagg gucacaggug agguucuugg 60
gagccugg 68

<210> 273
<211> 71
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 273

gccuaguccc ugagacccua acuugugagg uauuuuagua acaucacaag ucagguucuu 60
gggaccuagg c 71

<210> 274
<211> 77
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 274

ugcgcucccc ucagucccug agacccuaac uugugauguu uaccguuuaa auccacgggu 60
uaggcucuug ggagcug 77

<210> 275
<211> 73
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 275

ugacagcaca uuauuacuuu ugguacgcgc ugugacacuu caaacucgua ccgugaguaa 60
uaaugcgcgg uca 73

<210> 276
<211> 70
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 276

ccagccugcu gaagcucaga gggcucugau ucagaaagau caucggaucc gucugagcuu 60
ggcuggucgg 70

<210> 277
<211> 70
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 277

guuggauucg gggccguagc acugucugag agguuuacau uucucacagu gaaccggucu 60
cuuuuucagc 70

<210> 278
<211> 76
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 278

cagugggaag gggggccgau gcacuguaag agagugagua gcaggucuca cagugaaccg 60
gucucuuucc cuacug 76

<210> 279
<211> 73
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 279

uggaucuuuu ugcggucugg gcuugcuguu cucucgacag uagucaggaa gcccuuaccc 60
caaaaaguau cua 73

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

<400> 280

ugccuuucgc gaaucuuuuu gcggucuggg cuugcuguac auaacucaau agccggaagc 60
ccuuacccca aaaagcauuc gcggagggcg 90

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

<400> 281

gagcucuuuu cacauugugc uacugucuaa cguguaccga gcagugcaau guuaaaaggg 60
cauc 64

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

<400> 282

ggcuuguugg acacucuuuc ccuguugcac uacugugggc cucugggaag cagugcaaug 60
augaaagggc aucugucggg cc 82

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

<400> 283

gggcaaccgu ggcuuucgau uguuacugug ggaaccggag guaacagucu acagccaugg 60
ucgccc 66

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

<400> 284

gcuaaagcug guaaaaugga accaaaucgc cucuucaaug gauuuggucc ccuucaacca 60
gcuguagc 68

<210> 285
<211> 104
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 285

agaagccaaa ugcuuugcug aagcugguaa aauggaacca aaucagcugu uggauggauu 60
ugguccccuu caaccagcug uagcugcgca uugaucacgc cgca 104

<210> 286
<211> 119
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 286

ccuccaaagg gaguggcccc cugcucuggc uggucaaacg gaaccaaguc cgucuuccug 60
agaggguuug uccccuucaa ccagcuacag cagggcuggc aaagcucaau auuuggaga 119

<210> 287
<211> 71
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 287

agggugugug acugguugac cagaggggcg ugcacucugu ucacccugug ggccaccuag 60
ucaccaaccc u 71

<210> 288
<211> 90
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 288

aggccucacu guucucuaug gcuuuuuauu ccuaugugau ucuauugcuc gcucauauag 60
ggauuggagc cguggcguac ggugaggaua 90

<210> 289
<211> 97
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 289

cgcucugcug uggccuaugg cuuuucauuc cuaugugauu gcugcuccga acucauguag 60
ggcuaaaagc caugggcuac agugaggggc aagcucc 97

<210> 290
<211> 100
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 290

agauaaauuc acucuagugc uuuauggcuu uuuauuccua ugugaucgua auaaagucuc 60
auguagggau ggaagccaug aaauacauug ugaaaauuca 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
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 292

cuucggugac ggguauucuu ggguggauaa uacggauuac guuguuauug cuuaagaaua 60
cgcguagucg agg 73

<210> 293

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

<400> 293

cagcuggugu ugugaaucag gccgacgagc agcgcauccu cuuacccggc uauuucacga 60
caccaggguu g 71

<210> 294
<211> 99
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 294

cucuagcaug guguuguggg acagcuggug uugugaauca ggccguugcc aaucagagaa 60
cggcuacuuc acaacaccag ggccacacug cacugcaag 99

<210> 295
<211> 68
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 295

guguauucua cagugcacgu gucuccagug uggcucggag gcuggagacg cggcccuguu 60
ggaguaac 68

<210> 296
<211> 70
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 296

ccugccagug guuuuacccu augguagguu acgucaugcu guucuaccac aggguagaac 60
cacggacagg 70

<210> 297
<211> 72
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 297

ggguccaucu uccagugcag uguuggaugg uugaaguaug aagcuccuaa cacugucugg 60
uaaagauggc cc 72

<210> 298
<211> 64
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 298

acccauaaag uagaaagcac uacuaacagc acuggagggu guaguguuuc cuacuuuaug 60
gaug 64

<210> 299
<211> 63
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 299

ccugaggugc agugcugcau cucuggucag uugggagucu gagaugaagc acuguagcuc 60
agg 63

<210> 300
<211> 66
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 300

ggcugggaua ucaucauaua cuguaaguuu gugaugagac acuacaguau agaugaugua 60
cuaguc 66

<210> 301
<211> 70
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 301

cucacggucc aguuuuccca ggaaucccuu ggaugcuaag auggggauuc cuggaaauac 60
uguucuugag 70

<210> 302
<211> 65
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 302

agcucugaga acugaauucc auggguuaua ucaaugucag accugugaaa uucaguucuu 60
cagcu 65

<210> 303
<211> 99
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 303

agccaguuug gucuuuugag acaaaguucu gagacacucc gacucugagu augauagaag 60
ucagugcacu acagaacuuu gucucuagag gcuguggguc 99

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

<400> 304

ggcucuggcu ccgugucuuc acucccgugu uuguccgagg agggagggag ggacgggggc 60
ggugcu 66

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

<400> 305

cccugucucc caacccuugu accagugcug ugccucagac ccugguacag gccugggga 60
uaggg 65

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

<400> 306

ccugcccucg aggagcucac agucuaguau gucuccuccc uacuagacug aggcuccuug 60
aggacagg 68

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

<400> 307

ccgggccuag guucugugau acacuccgac ucgggcucug gagcagucag ugcaugacag 60
aacuugggcc cgg 73

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

<400> 308

cggugucauu uuugugacgu ugcagcuagu aauaugagcc caguugcaua gucacaaaag 60
ugaucauug 69

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

<400> 309

gaagauaggu uauccguguu gccuucgcuu uauucgugac gaaucauaca cgguugaccu 60
auuuuu 66

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

<400> 310

cuguuaaugc uaauugugau agggguuuug gccucugacu gacuccuacc uguuagcauu 60
aacag 65

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

<400> 311

ccauggaaca uucaacgcug ucggugaguu ugggauucaa aaacaaaaaa accaccgacc 60
guugacugua ccuugg 76

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

<400> 312

aggucacaau caacauucau ugcugucggu ggguugaacu guguagaaaa gcucacugaa 60
caaugaaugc aacuguggcc 80

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

<400> 313

gccaaggguu ugggggaaca uucaaccugu cggugaguuu gggcagcuca gacaaaccau 60
cgaccguuga guggaccccg aggccugga 89

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

<400> 314

uugauggcug cacucaacau ucauugcugu cgguggguuu gaaugucaac caacucacug 60
aucaaugaau gcaaacugcg ggccaaaaa 89

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

<400> 315

accauuuuug gcaaugguag aacucacacc gguaagguaa ugggacccgg ugguucuaga 60
cuugccaacu auggu 75

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

<400> 316

cuguguaugg cacugguaga auucacugug aacagucuca gucagugaau uaccgaaggg 60
ccauaaacag 70

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

<400> 317

ccuuuccuua ucacuuuucc agccagcuuu gugacucuaa guguuggacg gagaacugau 60
aaggguagg 69

<210> 318
<211> 65

<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 318

agggauugga gagaaaggca guuccugaug gucccccucc aggggcuggc uuuccucugg 60
uccuu 65

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

<400> 319

acuuuccaaa gaauucuccu uuugggcuuu cucauuuuau uuuaagcccu aaggugaauu 60
uuuugggaag u 71

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

<400> 320

ucaggcuaca acacaggacc cgggcgcugc ucugaccccu cgugucuugu guugcagccg 60
g 61

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

<400> 321

ucucacaucc cuugcauggu ggagggugag cucucugaaa accccucccа caugcagggu 60
uugcagga 68

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

<400> 322

cugugugaua uguuugauau auuagguugu uauuuaaucc aacuauauau caagcauauu 60
ccuacag 67

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

<400> 323

agcgggcaac ggaaucccaa aagcagcugu ugucuccaga gcauuccagc ugcacuugga 60
uuucguuccc ugcu 74

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

<400> 324

cgugcacagg gcucugaccu augaauugac agccaguacu cuuuucucuc cucuggcugc 60
caauuccaua ggucacaggu auguucacc 89

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

<400> 325

gagagcuggg ucuuugcggg caagaugaga gugucaguuc aacuggccua caaaguccca 60
guccuc 66

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

<400> 326

aucgggugua acagcaacuc cauguggacu gugcucggau uccaguggag cugcuguuac 60
uucugau 67

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

<400> 327

guggcuccca cccucuguaa cagcaacucc auguggaagu gcccacuggu uccagugggg 60
cugcuguuau cugggguggc ggcuag 86

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

<400> 328
uagcagcaca gaaauauugg caugggaag ugagucugcc aauauuggcu gugcugcu 58

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

<400> 329

ugagccggga cuguugagug aaguagguag uuucauguug uugggccugg cuuucugaac 60
acaacgacau caaaccaccu gauucauggc aguuacugcu uc 102

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

<400> 330

agcugaucug uggcuuaggu aguuucaugu uguugggauu gaguuuugaa cucggcaaca 60
agaaacugcc ugaguuacau caguc 85

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

<400> 331

gccaucccag uguucagacu accuguucag gaggcuggga cauguacagu agucugcaca 60
uugguuaggc 70

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

<400> 332

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

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

<400> 333

ccagaggaua ccuccacucc gucuacccag uguuuagacu accuguucag gacucccaaa 60
uuguacagua gucugcacau uggguaggcu gggcuggguu agacccucgg 110

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

<400> 334

gccguggcca ucuuacuggg cagcauugga uagugucuga ucucuaauac ugccugguaa 60
ugaugacggc 70

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

<400> 335

cugggccucu gugggcaucu uaccggacag ugcuggauuu cuuggcuuga cucuaacacu 60
gucugguaac gauguucaaa ggugacccac 90

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

<400> 336

cccucgucuu acccagcagu guuugggugc ugguugggag ucucuaauac ugccggguaa 60
ugauggagg 69

<210> 337
<211> 66
<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 337

uaccuuacuc aguaaggcau uguucuucua uauuaauaaa ugaacagugc cuuucugugu 60
agggua 66

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

<400> 338

guuccuuuuu ccuaugcaua uacuucuuug uggaucuggu cuaaagaggu auagcgcaug 60
ggaagaugga gc 72

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

<400> 339

gccuggucca gugguucuug acaguucaac aguucuguag cacaauugug aaauguuuag 60
gaccacuaga cccggc 76

<210> 340
<211> 68
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 340

uggacuuccc uuugucaucc uaugccugag aauauaugaa ggaggcuggg aaggcaaagg 60
gacguuca 68

<210> 341
<211> 68
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 341

cucuuguccu ucauuccacc ggagucuguc uuaugccaac cagauuucag uggagugaag 60
cucaggag 68

<210> 342
<211> 73
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 342

ccaggccaca ugcuucuuua uauccucaua gauaucucag cacuauggaa uguaaggaag 60
ugugugguuu ugg 73

<210> 343
<211> 79
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 343

aaggcagggg ugaggggcug cgggaggagc cgggcggagg cugcggcuug cgcuucuccu 60
ggcucuccuc ccucucuuu 79

<210> 344
<211> 83
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 344

uuccuuugac gggugagcuu uuggcccggg uuauaccuga cacucacgua uaagacgagc 60
aaaaagcuug uuggucagag gag 83

<210> 345
<211> 110
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 345

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

<210> 346
<211> 106
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 346

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

<210> 347
<211> 91
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 347

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

<210> 348
<211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 348

gguugcuuca gugaacauuc aacgcugucg gugaguuugg aauucaaaua aaaaccaucg 60
accguugauu guacccuaua gcuaacc 87

<210> 349
<211> 110
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 349

ggccuggcug gacagaguug ucaugugucu gccugucuac acuugcugug cagaacaucc 60
gcucaccugu acagcaggca cagacaggca gucacaugac aacccagccu 110

<210> 350
<211> 112
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 350

agcucucagc aucaacggug uacaggagaa ugaccuauga uuugacagac cgugcagcug 60
uguaugucug ucauucugua ggccaauauu cuguauguca cugcuacuua aa 112

<210> 351
<211> 72
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 351

uugguuuaau cucagcuggc aacugugaga ugucccuauc auuccucaca guggucucug 60
ggauuaugcu aa 72

<210> 352
<211> 108
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 352

aaacauaguc auuacaguuu uugauguugc agauacugca ucaggaacug acuggauaag 60
acuuaauccc caucaguucc uaaugcauug ccuucagcau cuaaacaa 108

<210> 353
<211> 110
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 353

gaccaguugc cgcggggcuu uccuuugugc uugaucuaac cauguggugg aacgauggaa 60
acggaacaug guucugucaa gcaccgcgga aagcaucgcu cucuccugca 110

<210> 354
<211> 110
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 354

ccgucccggg ccgcggcucc ugauugucca aacgcaauuc ucgagucucu ggcuccggcc 60
gagaguugcg ucuggacguc ccgagccgcc gcccccaaac cucgaggggg 110

<210> 355
<211> 97
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 355

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

<210> 356
<211> 95
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 356

auccaggucu ggggcaugaa ccuggcauac aauguagauu ucuguguuug uuaggcaaca 60
gcuacauugu cugcuggguu ucaggcuacc uggaa 95

<210> 357
<211> 79
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 357

cccucagugg cucaguagcc aguguagauc cugucuuugg uaaucagcag cuacaucugg 60
cuacuggguc ucugguggc 79

<210> 358
<211> 110
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 358

ucuggccauc ugcaguguca cgcuccgugu auuugacaag cugaguugga cacucugugu 60
gguagagugu caguuuguca aauaccccaa guguggcuca ugccuaucag 110

<210> 359
<211> 82
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 359

gggcuuuuaa gucacuagug guuccguuua guagaugguu ugugcauugu uucaaaaugg 60
ugcccuagug acuacaaagc cc 82

<210> 360
<211> 83
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 360

cucaucuugc gguacucaaa cuaugggggc acuuuuuuuu uucuuuaaaa agugccgccu 60
aguuuuaagc cccgccgguu gag 83

<210> 361
<211> 82
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 361

ccuauguagc ggccaucaaa guggaggccc ucucuugagc cugaaugaga aagugcuucc 60
acuuugugug ccacugcaug gg 82

<210> 362

<211> 82
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 362

cagccuguga uacucaaacu gggggcucuu uuggauuuuc aucggaagaa aagugccgcc 60
agguuuugag ugucaccggu ug 82

<210> 363
<211> 80
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 363

uucaaucugu gguacucaaa cugugugaca uuuuguucuu uguaagaagu gccgcagagu 60
uuguaguguu gccgauugag 80

<210> 364
<211> 84
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 364

uuccauauag ccauacucaa aauggaggcc cuaucuaagc uuuuaagugg aaagugcuuc 60
ccuuuugugu guugccaugu ggag 84

<210> 365
<211> 69
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 365

ggugagacuc aaaaugugggg cacacuucug gacuguacau agaaagugcu acuacuuuug 60
agucucucc 69

<210> 366
<211> 79
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 366

gggccuuucu ggagggcccc cccucaaucc uguugugcuc gcuucagagg guugggugga 60
ggcucuccug aaggugucc 79

<210> 367
<211> 76
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 367

auauguaugu auguauguau gugugcaugu gcaugugcau guaugcauau uguauguaua 60
uauuaugcau acaugu 76

<210> 368
<211> 64
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 368

uguaugugca ugcauaugug cucaugugug uguacaugua ugugugcaug ugcauguaua 60
uaug 64

<210> 369
<211> 82
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 369

ccaggccuuu ggcagaggag ggcuguucuu cccuugaguu uuaugacugg gaggaacuag 60
ccuucucuca gcuuaggagu gg 82

<210> 370
<211> 63
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 370

aagaaauggu uuaccguccc acauacauuu ugaguaugua ugugggacgg uaaaccgcuu 60
cuu 63

<210> 371
<211> 79
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 371

gcuacuugaa gagagguuau ccuuugugug 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
guauugucaa 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
<213> *Homo sapiens*

<400> 374

gccucgccgc ccuccgccuu cucuucccgg uucuucccgg agucgggaaa agcuggguug 60
agagggcgaa aaaggaugug gg 82

<210> 375
<211> 59
<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 375
uuggccuccu aagccaggga uuguggguuc gagucccacc cgggguaaug agguguuuu 59

<210> 376
<211> 86
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 376

uugguacuug gagagaggug guccguggcg cguucgcuuc auuuauggcg cacauuacac 60
ggucgaccuc uuugcgguau cuaauc 86

<210> 377
<211> 89
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 377

aacugacuau gccuccucgc auccccuagg gcauuggugu aaagcuggag acccacugcc 60
ccaggugcug cuggggguug uagucugac 89

<210> 378
<211> 98
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 378

auauagugcu ugguuccuag uaggugcuca guaaguguuu gugacauaau ucguuuauug 60
agcaccuccu aucaaucaag cacugugcua ggcucugg 98

<210> 379
<211> 95
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 379

cucaucuguc uguugggcug ggggcagggc cuuugugaag gcgggguaug cucagaucgc 60
cucugggccc uuccuccagu cccgaggcag auuua 95

<210> 380
<211> 97
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 380

cugucucgga gccuggggca ggggggcagg aggggcucag ggagaaagua ucuacagccc 60
cuggcccucu cugcccuucc gucccccuguc cccaagu 97

<210> 381
<211> 97
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 381

uguucgcuuc ugguaccgga agagagguuu ucugggucuc uguuucuuug augagaauga 60
aacacaccca gcuaaccuuu uuuucaguau caaaucc 97

<210> 382
<211> 98
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 382

gacccuuugg cgaucucugc cucucugggc cugugucuua ggcucuucaa gauccaacga 60
gcaaagcaca gggccugcag agagguagcg cucugcuc 98

<210> 383
<211> 96
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 383

gagucugguu uuguuugggu uuguucuagg uaugguccca gggaucccag aucaaaccag 60
gccccugggc cuauccuaga accaaccuaa acccgu 96

<210> 384
<211> 97
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 384

caguguagug agaaguuggg gggugggaac ggcgucaugc aggaguugau ugcacagcca 60
uucagcuccu auaugaugcc uuucuucacc cccuuca 97

<210> 385
<211> 98
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 385

caacgcugca caggccgucc uccccaacaa uauccuggug cugagugggu gcacagugac 60
uccagcauca gugauuuugu ugaagagggc agcugcca 98

<210> 386
<211> 96
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 386

acgggguggc cacuaucccu guccuccagg agcucacgua ugccugccug ugagcgccuc 60
ggcgacagag ccgggugucca ccccugcacu guccac 96

<210> 387

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

<400> 387

caauuguacu uggugugauu auaaagcaau gagacugauu gucauauguc guuuguggga 60
uccgucucag uuacuuuaua gccauaccug guaucuua 98

<210> 388
<211> 96
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 388

aaaaugauga ugucaguugg ccggucggcc gaucgcucgg ucugucaguc agucggucgg 60
ucgaucgguc ggucggucag ucggcuuccu gucuuc 96

<210> 389
<211> 99
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 389

gaaaaugggc ucaaggugag gggugcuauc ugugauugag ggacaugguc aauggaauug 60
ucucacacag aaaucgcacc cgucaccuug gccugcuga 99

<210> 390
<211> 95
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 390

cugcagccag gguuuuuacc agucaggcuc cuggcuagau uccagguacc agcugguacc 60
ugaucuagcc aaagccugac uguaagcccu gaaca 95

<210> 391
<211> 96
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 391

acccaagucc aggccugcug accccuaguc cagugcuugu gguggcuacu gggcccugaa 60
cuaggggucu ggagaccugg guuugaucuc cacagg 96

<210> 392
<211> 98
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 392

ucuguguugg gcgucugucu gcccgagugc cugccucucu guugcucuga aggaggcagg 60
ggcugggccu gcagcugccu gggcagagcu gcuccuuc 98

<210> 393
<211> 99
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 393

agaugccuug cuccuacaag aguaaagugc augcgcuuug ggacagugag gaaaauaaug 60
uucacaaagc ccauacacuu ucacccuuua ggagaguug 99

<210> 394
<211> 98
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 394

ugggcuccua ggaagaggua guagguugca uaguuuuagg gcagagauuu ugcccacaag 60
gaguuaacua uacgaccugc ugccuuucuu agggccuu 98

<210> 395
<211> 97
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 395

uguuggccua guucugugug gaagacuagu gauuuuguug uuuuuagaua acuaagacga 60
caacaaauca cagucugcca uauggcacag gccaccu 97

<210> 396
<211> 94
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 396

uucacugugg gaugagguag uagguuguau aguuuuaggg ucacacccac cacugggaga 60
uaacuauaca aucuacuguc uuuccuaagg ugau 94

<210> 397
<211> 96
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 397

cggcaugcuc ccaggcugag guaguagguu guauaguuua gaguuacaac aagggagaua 60
acuguacagc cuccuagcuu uccuugggac uugcac 96

<210> 398
<211> 85
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 398

gcggggugag guaguagguu gugugguuuc agggcaguga ugucgccccu ccgaagauaa 60
cuauacaacc uacugccuuc ccuga 85

<210> 399
<211> 94
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 399

ugugugcauc cggguugagg uaguagguug uaugguuuag aguuacaccc ugggaguuaa 60
cuguacaacc uucuagcuuu ccuuggagca cacu 94

<210> 400
<211> 95
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 400

acggccuuug gggugaggua guagguugua ugguuuuggg cucugccccg cucugcggua 60
acuauacaau cuacugucuu uccugaagug gccgc 95

<210> 401
<211> 93
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 401

cgcgcccccc gggcugaggu aggagguugu auaguugagg aagacacccg aggagaucac 60
uauacggccu ccuagcuuuc cccaggcugc gcc 93

<210> 402
<211> 89
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 402

aucagaguga gguaguagau uguauaguug ugggguagug auuuuacccu guuuaggaga 60
uaacuauaca aucuauugcc uucccugag 89

<210> 403
<211> 83
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 403

ugugggauga gguaguagau uguauaguuu uagggucaua ccccaucuug gagauaacua 60
uacagucuac ugucuuuccc acg 83

<210> 404
<211> 85
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 404

cuggcugagg uaguaguuug ugcuguuggu cggguuguga cauugcccgc uguggagaua 60
acugcgcaag cuacugccuu gcuag 85

<210> 405
<211> 95
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 405

ggacagacca gcccugucug gaagacuagu gauuuuguug uugugucugu guccaacaac 60
aagucccagu cugccacaug guguugguca cauca 95

<210> 406
<211> 110
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 406

aggccagaac acaugagcca augcuaugug gaagacuugu gauuuuguug uucugauaug 60
auaugacaac aagucacagc cagccucaua gaguggacuc ccaucaccuu 110

<210> 407
<211> 89
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 407

cgggguuggu uguuaucuuu gguuaucuag cuguaugagu gguguggagu cuucauaaag 60
cuagauaacc gaaaguaaaa auaacccca 89

<210> 408
<211> 90
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 408

ggaggcccgu uucucucuuu gguuaucuag cuguaugagu gccacagagc cgucauaaag 60
cuagauaacc gaaaguagaa augacucuaa 90

<210> 409
<211> 87
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 409

ggaagcgagu uguuaucuuu gguuaucuag cuguaugagu guauuggucu ucauaaagcu 60
agauaaccga aaguaaaaac uccuuca 87

<210> 410
<211> 110
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 410

gaccugucug ucuucuguau auacccugua gauccgaauu uguguaagga auuuuguggu 60
cacaaauucg uaucuagggg aauauguagu ugacauaaac acuccgcuca 110

<210> 411
<211> 109
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 411

ccaaaguugu aacguugucu auauauaccc uguagaaccg aauuugugug guacccacau 60
agucacagau ucgauucuag gggaauauau ggucgaugca aaaacuuca 109

<210> 412
<211> 98

<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 412

uuggaaccuu aaaguacugu agcagcacau caugguuuac auacuacagu caagaugcga 60
aucauuauuu gcugcucuag aaauuuaagg aaauucau 98

<210> 413
<211> 95
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 413

cauacuuguu ccgcucuagc agcacguaaa uauuggcgua gugaaauaaa uauuaaacac 60
caauauuauu gugcugcuuu agugugacag ggaua 95

<210> 414
<211> 84
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 414

gucaggauaa ugucaaagug cuuacagugc agguaguggu gugugcaucu acugcaguga 60
aggcacuugu ggcauugugc ugac 84

<210> 415
<211> 96
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 415

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

<210> 416
<211> 87
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 416

cacuggucua ugguuaguuu ugcagguuug cauccagcug uauaauauuc ugcugugcaa 60
auccaugcaa aacugacugu gguggug 87

<210> 417
<211> 96
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 417

acauugcuac uuacgguuag uuuugcagau uugcaguuca gcguauaugu ggauauaugg 60
cugugcaaau ccaugcaaaa cugauuguga ugaugu 96

<210> 418
<211> 82
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 418

gcagcccucu guucguuuug cauaguugca cuacaagaag aauguaguug ugcaaaucua 60
ugcaaaacug augguggccu gc 82

<210> 419
<211> 85
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 419

cagcuucugu agcacuaaag ugcuuauagu gcagguagug ugucgucauc uacugcauua 60
cgagcacuua caguacugcc agcug 85

<210> 420
<211> 92
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 420

uguaccaccu ugucggguag cuuaucagac ugauguugac uguugaaucu cauggcaaca 60
gcagucgaug ggcugucuga cauuuuggua uc 92

<210> 421
<211> 95
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 421

accuggcuga gccgcaguag uucuucagug gcaagcuuua uguccugacc cagcuaaagc 60
ugccaguuga agaacuguug cccucugcca cuggc 95

<210> 422
<211> 75
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 422

cggccggcug ggguuccugg ggaugggauu ugaugccagu cacaaaucac auugccaggg 60
auuuccaacu gaccc 75

<210> 423
<211> 97
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 423

cucaccugcu cuggcugcuu ggguuccugg caugcugauu ugugacuuga gauuaaaauc 60
acauugccag ggauuaccac gcaaccauga ccuuggc 97

<210> 424
<211> 68
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 424

cuccggugcc uacugagcug auaucaguuc ucauuucaca cacuggcuca guucagcagg 60
aacaggag 68

<210> 425
<211> 108
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 425

gccucucccu gggcuccgcc uccugugccu acugagcuga aacaguugau uccagugcac 60
uggcucaguu cagcaggaac aggaguccag cccccauagg agcuggca 108

<210> 426
<211> 84
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 426

ggccaguguu gagaggcgga gacacgggca auugcuggac gcugcccugg gcauugcacu 60
ugucucgguc ugacagugcc ggcc 84

<210> 427
<211> 90
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 427

aaggccgugg ccuuguucaa guaauccagg auaggcugug caggucccaa ggggccuauu 60
cuugguuacu ugcacgggga cgcgggccug 90

<210> 428
<211> 85
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 428

ugcccgggac ccaguucaag uaauucagga uagguugugg ugcuggccag ccuguucucc 60
auuacuuggc ucgggggccg gugcc 85

<210> 429
<211> 97
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 429

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

<210> 430
<211> 87
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 430

uggccugugg agcagggcuu agcugcuugu gagcaagguc uacagcaaag ucguguucac 60
aguggcuaag uuccgccccc uggaccc 87

<210> 431
<211> 86
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 431

ggucccuacc cgcaaggagc ucacagucua uugaguuccu uuucugauuc ucccacuaga 60
uugugagcuc cuggagggca ggcacu 86

<210> 432
<211> 81
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 432

cuucuggaag cuggauuucac augguggcuu agauuuuucc aucuuuguau cuagcaccau 60
uugaaaucag uguuuuagga g 81

<210> 433
<211> 88
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 433

accccuuaga ggaugacuga uuucuuuugg uguucagagu caauagaauu uucuagcacc 60
aucugaaauc gguuauaaug auugggga 88

<210> 434
<211> 81
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 434

cuucaggaag cuggauuucau augguggauu agauuuaaau agugauuguc uagcaccauu 60
ugaaaucagu guucuuggug g 81

<210> 435
<211> 88
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 435

aucucuuaca caggcugacc gauuucuccu gguguucaga gucuguuuuu gucuagcacc 60
auuugaaauc gguuaugaug uaggggga 88

<210> 436
<211> 89
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 436

accauguugu agugugugua aacauccuac acucucagcu gugagcucaa gguggcuggg 60
agaggguugu uuacuccuuc ugccaugga 89

<210> 437
<211> 64
<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 437

cuguaaacau ccuugacugg aagcuguaag guguugagag gagcuuucag ucggauguuu 60
acag 64

<210> 438
<211> 87
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 438

ccgaguuuca guucauguaa acauccuaca cucagcuguc auacaugagu uggcugggau 60
guggauguuu acgucagcug ucuugga 87

<210> 439
<211> 82
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 439

aagucugugu cuguaaacau ccccgacugg aagcuguaag ccacagccaa gcuuucaguc 60
agauguuugc ugcuacuggc uc 82

<210> 440
<211> 71
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 440

gcaacuguaa acauccucga cuggaagcug ugaagccaca aaugggcuuu cagucggaug 60
uuugcagcug c 71

<210> 441
<211> 84
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 441

gagugacaga uacuguaaac auccuacacu cucagcugug aaaaguaaga aagcugggag 60
aaggcuguuu acucucucug ccuu 84

<210> 442
<211> 106
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 442

ugcuccugaa acuuggaacu ggagaggagg caagaugcug gcauagcugu ugaacugaga 60
accugcuaug ccaacauauu gccaucuuuc cugucugaca gcagcu 106

<210> 443
<211> 70
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 443

ggggauauug cacauuacua aguugcaugu ugucacggcc ucaaugcaau uuagugugug 60
ugauauucuc 70

<210> 444
<211> 69
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 444

ccguggugca uuguaguugc auugcauguu cuggcaguac cugugcaaug uuuccacagu 60
gcaucacgg 69

<210> 445
<211> 84
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 445

gugcucgguu uguaggcagu guaauuagcu gauuguagug cggugcugac aaucacuaac 60
uccacugcca ucaaaacaag gcac 84

<210> 446
<211> 77
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 446

agucuaguua cuaggcagug uaguuagcug auugcuaaua guaccaauca cuaaccacac 60
agccagguaa aaagacu 77

<210> 447
<211> 102
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 447

ccggcuguga guaauucuuu ggcagugucu uagcugguug uugugaguau uagcuaagga 60
agcaaucagc aaguauacug cccuagaagu gcugcacguu gu 102

<210> 448
<211> 78
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 448

cuuucuacac agguugggau uugucgcaau gcuguguuuc uguauaguau ugcacuuguc 60
ccggccuguu gaguuugg 78

<210> 449
<211> 92
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 449

ugcccauuca uccacaggug gggauuagug ccauuacuug uguuagauaa aaaguauugc 60
acuugucccg gccugaggaa gaaaagaggg uu 92

<210> 450
<211> 87
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 450

agucaugggg gcuccaaagu gcuguucgug cagguagugc auugccugac cuacugcuga 60
gcuagcacuu cccgagcccc caggaca 87

<210> 451
<211> 106
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 451

ccaguaccau cugcuuggcc gauuuuggca cuagcacauu uuugcuugug ucucuccgcu 60
cugagcaauc augugcagug ccaauauggg aaaagcgggc ugcugc 106

<210> 452
<211> 80
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 452

gugagguagu aaguuguauu guuguggggu agggauuuua ggccccaaua agaagauaac 60
uauacaacuu acuacuuucc 80

<210> 453
<211> 81
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 453

cccauuggca uaaacccgua gauccgaucu uguggugaag uggaccgcac aagcucguuu 60
cuaugggucu guggcagugu g 81

<210> 454
<211> 70
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 454

ggcacccacc cguagaaccg accuugcggg gccuucgccg cacacaagcu cgugucugug 60
gguccguguc 70

<210> 455
<211> 80
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 455

ccuguugcca caaacccgua gauccgaacu ugugcugacc augcacacaa gcuugugucu 60
auagguaugu gucuguuagg 80

<210> 456
<211> 97
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 456

aucugagacu gaacuguccu uuuucgguua ucaugguacc gaugcuguag aucugaaagg 60
uacaguacug ugauagcuga agaauggugg ugccauc 97

<210> 457
<211> 75
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 457

ugcccuggcu caguuaucac agugcugaug cuguccauuc uaaagguaca guacugugau 60
aacugaagga uggca 75

<210> 458
<211> 86
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 458

gucuucgugc uuucagcuuc uuuacagugc ugccuuguag cauucagguc aagcagcauu 60
guacagggcu augaaagaac caagaa 86

<210> 459
<211> 86
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 459

uucuuacugc ccucggcuuc uuuacagugc ugccuuguug cauauggauc aagcagcauu 60
guacagggcu augaaggcau ugagac 86

<210> 460
<211> 82
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 460

ccugcuggga cuaaagugcu gacagugcag auaguggucc ucucugugcu accgcacugu 60
ggguacuugc ugcuccagca gg 82

<210> 461
<211> 87
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 461

uucucucugc uuuaagcuuc uuuacagugu ugccuugugg cauggaguuc aagcagcauu 60
guacagggcu aucaaagcac agagagc 87

<210> 462
<211> 85
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 462

ccuuagcaga gcucuggagu gugacaaugg uguuuguguc caaaacauca aacgccauca 60
ucacacuaaa cagcuacugc uaggc 85

<210> 463
<211> 87
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 463

ugagggcccc ucugcguguu cacagcggac cuugauuuaa ugucuauaca auuaaggcac 60
gcggugaaug ccaagagagg cgccucc 87

<210> 464
<211> 85
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 464

aggccucucu cuccguguuc acagcggacc uugauuuaaa uguccauaca auuaaggcac 60
gcggugaaug ccaagaaugg ggcug 85

<210> 465
<211> 109
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 465

aucaagauca gagacucugc ucuccguguu cacagcggac cuugauuuaa ugucauacaa 60
uuaaggcacg cggugaaugc caagagcgga gccuacggcu gcacuugaa 109

<210> 466
<211> 85
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 466

ugccggccuc ugggucccug agacccuuua accugugagg acguccaggg ucacagguga 60
gguucuuggg agccuggcgc cuggc 85

<210> 467
<211> 87
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 467

ugcgcucccc ucagucccug agacccuaac uugugauguu uaccguuuaa auccacgggu 60
uaggcucuug ggagcugcga gucgugc 87

<210> 468
<211> 88
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 468

accagacuuu uccuaguccc ugagacccua acuugugagg uauuuuagua acaucacaag 60
ucaggcucuu gggaccuagg cggagagg 88

<210> 469
<211> 73
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 469

ugacagcaca uuauuacuuu ugguacgcgc ugugacacuu caaacucgua ccgugaguaa 60
uaaugcgugg uca 73

<210> 470
<211> 97
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 470

uuugaucacu gucuccagcc ugcugaagcu cagagggcuc ugauucagaa agaucaucgg 60
auccgucuga gcuuggcugg ucggaagucu caucauc 97

<210> 471
<211> 82
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 471

ugagcuguug gauucggggc cguagcacug ucugagaggu uuacauuucu cacagugaac 60
cggucucuuu uucagcugcu uc 82

<210> 472
<211> 84
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 472

ugugcagugg gaaggggggc cgaugcacug uaagagagug aguagcaggu cucacaguga 60
accggucucu uucccuacug uguc 84

<210> 473
<211> 97
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 473

agacugcccu ucgcgaaucu uuuugcgguc ugggcuugcu guacauaacu caauagccgg 60
aagcccuuac cccaaaaagc auucgcggag ggcgcgc 97

<210> 474
<211> 72
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 474

ugggucuuuu ugcggucugg gcuugcuguu cucuccacag uagucaggaa gcccuuaccc 60
caaaaaguau cu 72

<210> 475
<211> 88
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 475

ugcugcuggc cggagcucuu uucacauugu gcuacugucu acacguguac cgagcagugc 60
aauguuaaaa gggcaucggc cuuguagu 88

<210> 476
<211> 82
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 476

ggcuugcugg acacucuuuc ccuguugcac uacugugggc cucugggaag cagugcaaug 60
augaaagggc auccgucagg cc 82

<210> 477
<211> 101
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 477

ccgccccccgc gucuccaggg caaccguggc uuucgauugu uacuguggga accggaggua 60
acagucuaca gccauggucg ccccgcagca cgcccacgcu c 101

<210> 478
<211> 87
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 478

caaugcuuug cuaaagcugg uaaaauggaa ccaaaucgcc ucuucaaugg auuuggcccc 60
cuucaaccag cuguagcuau gcauuga 87

<210> 479
<211> 73
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 479

cagggugugu gacugguuga ccagaggggc gugcacuuug uucacccugu gggccaccua 60
gucaccaacc cuc 73

<210> 480
<211> 97

<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 480

cgcucugcug uggccuaugg cuuuucauuc cuaugugauu gcuguuccga acucauguag 60
ggcuaaaagc caugggcuac agugaggggc aagcucc 97

<210> 481
<211> 100
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 481

agauaaauuc acucuagugc uuuauggcuu uuuauuccua ugugaucgua auaaagucuc 60
auguagggau ggaagccaug aaauacauug ugaaaauuca 100

<210> 482
<211> 82
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 482

ugagcccucg gaggacucca uuuguuuuga ugauggauuc uuaagcucca ucaucgucuc 60
aaaugagucu ucagaggguu cu 82

<210> 483
<211> 102
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 483

ggcccucuga cucucuucgg ugacggguau ucuugggugg auaauacgga uuacguuguu 60
auugcuuaag aauacgcgua gucgaggaga guaccagcgg ca 102

<210> 484
<211> 82
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 484

guugcugcag cugguguugu gaaucaggcc gacgagcaac gcauccucuu acccggcuau 60
uucacgacac caggguugca cc 82

<210> 485
<211> 99
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 485

cucuggcaug guguuguggg acagcuggug uugugaauca ggccguugcc aaucagagaa 60
cggcuacuuc acaacaccag ggucucacug cacugcagg 99

<210> 486
<211> 68
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 486

guguauucua cagugcacgu gucuccagug uggcucggag gcuggagacg cggcccuguu 60
ggaguaac 68

<210> 487
<211> 99
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 487

gugucucucu cuguguccug ccagugguuu uacccuaugg uaggguuacau caugcuguuc 60
uaccacaggg uagaaccacg gacaggauac uggagcacc 99

<210> 488
<211> 94
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 488

ggcugacucu gaguccaucu uccagugcag uguuggaugg uugaaguacg aagcuccuaa 60
cacugucugg uaaagauggc ccccggguca guuc 94

<210> 489
<211> 87
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 489

gacagugcag ucacccauaa aguagaaagc acuacuaaca gcacuggagg guguaguguu 60
uccuacuuua uggaugagug uacugug 87

<210> 490
<211> 105
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 490

gcggagcgcc ugucucccag ccugaggugc agugcugcau cucuggucag uugggagucu 60
gagaugaagc acuguagcuc aggaagggag aagauguucu gcagc 105

<210> 491
<211> 83
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 491

gggccuuggc ugggauauca ucauauacug uaaguuugug 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 guucuugagg ucauggcu 88

<210> 493
<211> 95
<212> ARN
<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
<211> 85
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 495

cuucucaagg cccugucucc caacccuugu accagugcug ugccucagac ccugguacag 60
gccugggggа cagggacuug gggac 85

<210> 496
<211> 97
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 496

agcgcuuucc ugcccucgag gagcucacag ucuaguaugu cuccucccua cuagacugag 60
gcuccuugag gacagggauc gucauacuca ccucccg 97

<210> 497
<211> 85
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 497

uguuccccgg gcccagguuc ugugauacac uccgacucgg gcucuggagc agucagugca 60
ugacagaacu ugggcccggu aggac 85

<210> 498
<211> 87
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 498

agcgguggcc agugucauuu uugugauguu gcagcuagua auaugagccc aguugcauag 60
ucacaaaagu gaucauugga aacugug 87

<210> 499
<211> 84
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 499

gcggugcuug aagauagguu auccguguug ccuucgcuuu auucgugacg aaucauacac 60
gguugaccua uuuuucagua ccaa 84

<210> 500
<211> 106
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 500

agaacuugcc aaggguuugg gggaacauuc aaccugucgg ugaguuuggg cagcucagac 60
aaaccaucga ccguugagug gaccccgagg ccuggaacug ccaccc 106

<210> 501
<211> 117
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 501

agaugggcaa ccaaggcagc cuuaagagga cuccauggaa cauucaacgc ugucggugag 60
uuugggauuc aaaaacaaaa aaaaccacca accguugacu guaccuuggg auucuua 117

<210> 502
<211> 110
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 502

ccugugcaga gaugauguuu acaaagguca caaucaacau ucauugcugu cgguggguug 60
aacuguguag aaaagcucac ugaacaauga augcaacugu ggccccgcuu 110

<210> 503
<211> 88
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 503

ugauggcugc acucaacauu cauugcuguc gguggguuug aaugucaacc aacucacugg 60
ucaaugaaug caaacugcgg gccaaaaa 88

<210> 504
<211> 110
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 504

ccagagagug ugacuccugu ccuguguaug gcacugguag aauucacugu gaacagucuc 60
ggucagugaa uuaccgaagg gccauaaaca gagcagagac agauccgcga 110

<210> 505

<211> 77
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 505

cacuuucccu uaucaguuuu ccagccagcu uugugacugu aaauguugga cggagaacug 60
auaaggguaa gugacug 77

<210> 506
<211> 80
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 506

gggggugagg gauuggagag aaaggcaguu ccugaugguc cccucccagg ggcuggcuuu 60
ccucuggucc uucucuccca 80

<210> 507
<211> 86
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 507

ugcuuacaac uuuccaaaga auucuccuuu ugggcuuucu cauuuuauuu uaagcccaaa 60
ggugaauuuu uugggaaguu ugagcu 86

<210> 508
<211> 104
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 508

gggcucacag gacacaaugc ggauccucag gcuacaacac aggacccggg cgcugcucug 60
accccucgug ucuuguguug cagccggagg gacgcaggguc ugca 104

<210> 509
<211> 85
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 509

ugcaggccuc ugugugauau guuugauaua uuagguuguu auuuaaucca acuauauauc 60
aagcauauuc cuacaguguc uugcc 85

<210> 510
<211> 91
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 510

ggcuggacag cgggcaacgg aaucccaaaa gcagcuguug ucuccagagc auuccagcug 60
cacuuggauu ucguucccug cucuccugcc u 91

<210> 511
<211> 110
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 511

gucaagaugg agugcacagg gcucugaccu augaauugac agccaguacu cugaucucgc 60
cucuggcugc caguuccaua ggucacaggu auguucgccu caaugccagc 110

<210> 512
<211> 86
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 512

gcggacggga gcugagagcu gggucuuugc gggcaagaug agggugucag uucaacuggc 60
cuacaaaguc ccaguccucg gcuccc 86

<210> 513
<211> 83
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 513

auggagucau cacguguaac agcaacucca uguggacugu gcacagaucc caguggagcu 60
gcuguuacuu uugauggccu cca 83

<210> 514
<211> 85
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 514

uggcucccac ccccuguaac agcaacucca uguggaagug cccacugauu ccaguggggc 60
ugcuguuauc ugggguggag gcugg 85

<210> 515
<211> 87
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 515

aacucuccug gcucuagcag cacagaaaua uuggcacggg uaagugaguc ugccaauauu 60
ggcugugcug cuccaggcag gguggug 87

<210> 516
<211> 110
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 516

uguuugcuca gcugaucugu ggcuuaggua guuucauguu guugggauug aguuuugaac 60
ucggcaacaa gaaacugccu gaguuacauc agucgguuuu cgucgagggc 110

<210> 517
<211> 110
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 517

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

<210> 518
<211> 69
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 518

cccucgucuu acccagcagu guuugggugc ugguugggag ucucuaauac ugccggguaa 60
ugauggagg 69

<210> 519
<211> 89
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 519

cugggccucu gugggcaucu uaccggacag ugcuggauuu cuuggcuuga cucuaacacu 60
gucugguaac gauguucaaa ggugaccca 89

<210> 520
<211> 95
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 520

ccaacuuggg cagccguggc caucuuacug ggcagcauug gauagugucu gaucucuaau 60
acugccuggu aaugaugacg gcggagcccu gcacg 95

<210> 521
<211> 97
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 521

gcgcgccugg uccagugguu cuuaacaguu caacaguucu guagcgcaau ugugaaaugu 60
uuaggaccac uagacccggc gcgcacggca gcggcga 97

<210> 522
<211> 110
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 522

ggcuacagcc cuucuucaug ugacucgugg acuucccuuu gucauccuau gccugagaau 60
auaugaagga ggcugggaag gcaaagggac guucaauugu caucacuggc 110

<210> 523
<211> 108
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 523

aaacagcccc agacaaucca uggguccucc uguccuucau uccaccggag ucugucuuau 60
gccaaccaga uuucagugga gugaagcuca ggaggcaugg agcugcca 108

<210> 524
<211> 84
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 524

cuucccccagg ccacaugcuu cuuuauaucc ucauagauau cacugcgcua uggaauguaa 60
ggaagugugu gguuuuggca agug 84

<210> 525
<211> 83
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 525

uuccuuugac gggugagcuu uuggcccggg uuauaccuga cucucacgua uaagacgagc 60
aaaaagcuug uuggucagag gag 83

<210> 526
<211> 110
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 526

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

<210> 527
<211> 106
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 527

cagcuuggac cugugaccuc ugggcuuccc uuugucaucc uuugccuagg ccucugagug 60
gggcaaggac agcaaagggg ggcucagugg ucaccucuac ugcaga 106

<210> 528
<211> 111
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 528

cgggauaucc ccgcccgggc agcgcgccgg caccuuggcu cuagacugcu uacugcccgg 60
gccgcccuca guaacagucu ccagucacgg ccaccgacgc cuggccccgc c 111

<210> 529
<211> 100
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 529

agguugcuuc agugaacauu caacgcuguc ggugaguuug gaauucaaau aaaaaccauc 60
gaccguugau uguacccuau agcuaaccau uaucuacucc 100

<210> 530
<211> 110

<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 530

guccuggaug gacagaguug ucaugugucu gccugucuac acuugcugug cagaacaucc 60
gcucaccugu acagcaggca cagacaggca gucacaugac aacccagccu 110

<210> 531
<211> 106
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 531

guuagcuaug aguuaguuua aucucagcug gcaacuguga gaugucccua ucauuccuca 60
caguggucuc ugggauuaug cuaaacagag caauuuccuu 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 guucugucaa 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 uguggguugag cuccgg 96

<210> 537
<211> 109
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 537

ugaauaucca ggucuggggc augaaccugg cauacaaugu agauuucugu guuuguuagg 60
caacagcuac auugucugcu ggguuucagg cuaccuggaa gcauuucuc 109

<210> 538
<211> 103
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 538

aaggauuagg gugcccucag uggcucagua gccaguguag auccugucuu ugguaaucag 60
cagcuacauc uggcuacugg gucucugaug gcaucaucua gcu 103

<210> 539
<211> 110
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 539

ucuggccuuc ugcaguguua cgcuccgugu auuugacaag cugaguugga cacucugugu 60
gguagagugu caguuuguca aauaccccaa guguggcuca ugcuuaucag 110

<210> 540
<211> 81
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 540

ucaucuugcg guucucaaac uauggggggca cuuuuuuuuu cuuuaaaaag ugccgccagg 60
uuuuagggcc ugccgguuga g 81

<210> 541
<211> 82
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 541

ccgguguagu agccaucaaa guggaggccc ucucuugggc ccgagcuaga aagugcuucc 60
acuuugugug ccacugcaug gg 82

<210> 542
<211> 82
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 542

caaccuguga uacucaaacu gggggcucuu uuggguuuuc uuuggaagaa aagugccgcc 60
agguuuugag uguuaccgau ug 82

<210> 543
<211> 78
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 543

ggaccuuucu ggagggcccc cccucaaucc uguugugcuc gcuucagagg guugggugga 60
ggcucuccug aagguguc 78

<210> 544
<211> 68
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 544

uauguaugua uguauguaug uaugcaugua ugugugcaug uaugcaugca ugcauguaug 60
uauguaug 68

<210> 545
<211> 82
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 545

ccaggccuuc ggcagaggag ggcuguucuu cccuuggguu uuaugacugg gaggaacuag 60
ccuucucucu gcuuaggagu gg 82

<210> 546
<211> 63
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 546

aagaaauggu uuaccguccc acauacauuu ugaguaugua ugugggacgg uaaaccgcuu 60
cuu 63

<210> 547
<211> 79
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 547

gcuacuugaa gagagguuau ccuuugugug uuugcuuuac gcgaaaugaa uaugcaaggg 60
caagcucucu ucgaggagc 79

<210> 548
<211> 100
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 548

ccugcuggcu acugcugacg acugcucuga cuuuauugca cuacuguacu guacagcuag 60
cagugcaaua guauugucaa agcauccggg agcaggcuac 100

<210> 549
<211> 82
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 549

gccucgcugu ccuccgccuu cucuucccgg uucuucccgg agucgggaaa agcuggguug 60
agagggcgaa aaaggauaug gg 82

<210> 550
<211> 59
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 550
uuggccuccu aagccaggga uuguggguuc gagucccacc cgggguaaga gguuguguu 59

<210> 551
<211> 95
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 551

ccucgcugac uccgaaggga ugcagcagca auucauguuu uggaguauug ccaaggguca 60
aaacaugaag cgcugcaaca ccccuucgug ggaaa 95

<210> 552
<211> 86
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 552

uugguacuug gagagaggug guccguggcg cguucgcuuc auuuauggcg cacauuacac 60
ggucgaccuc uuugcgguau cuaauc 86

<210> 553
<211> 83
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 553

cugacuaugc cuccucgcau ccccuagggc auugguguaa agcuggagac ccacugcccc 60
aggugcugcu ggggguugua guc 83

<210> 554
<211> 98
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 554

auauagugcu ugguuccuag uaggugcuca guaaguguuu gugacauaau ucguuuauug 60
agcaccuccu aucaaucaag cacugugcua ggcucugg 98

<210> 555
<211> 95
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 555

cucaucuguc uguggggcug ggggcagggc cuuugugaag gcgggguaug cucagaucgc 60
cucugggccc uuccuccagu cccgaggcag auuua 95

<210> 556
<211> 84
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 556

uggggcaggg gggcaggagg ggcucaggga gaaagcaucu acagccccug gcccucucug 60
cccuuccguc cccugucccc aaau 84

<210> 557
<211> 97
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 557

uguucgcuuc ugguaccgga agagagguuu ucugggucuc uguuucuuug augagaauga 60
aacacaccca gcuaaccuuu uuuucaguau caaaucc 97

<210> 558
<211> 97
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 558

acccuuuggc gaucucugcc ucucugggcc ugugucuuag gcucuucaag aucuaacgag 60
caaagcacag ggccugcaga gagguagcgc ucugcuc 97

<210> 559
<211> 96
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 559

gagucugguc uuguuugggu uuguucuagg uauggcccca gggaucccag aucaaaccag 60
gccccugggc cuauccuaga accaaccuaa acccau 96

<210> 560
<211> 95
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 560

ccccggugga accacguggu gugcuaguua cuuuugggcu ggagagacgg cucagggguu 60
aagagcacag acugcucuuc cagagguccu gaguu 95

<210> 561
<211> 96
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 561

augugaccgu gccucucacc cuuccauauc uagucucuga gaaaaaugaa gacuggauuc 60
caugaaggga ugugaggccu ggaaacugga gcuuua 96

<210> 562
<211> 97
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 562

aguguaguga gaaguugggg ggugggaacg gcgucaugca ggaguugauu gcacagccau 60
ucagcuccua uaugaugccu uucuucaccc ccuucaa 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 ccccugcacu gcccaa 96

<210> 565
<211> 96
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 565

aaaaugauga ugucaguugg ccggucggcc gaucgcucgg ucugucaguc agucggucgg 60
ucgaucgguc ggucggucag ucggcuuccu gucuuc 96

<210> 566
<211> 99
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 566

gaaaaugggc ucaaggugag gggugcuauc ugugauugag ggacaugguc aauggaauug 60
ucucacacag aaaucgcacc cgucaccuug gccugcuga 99

<210> 567
<211> 98
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 567

cugcagccag aguuuuuacc agucaggcuc cuggcuagau uccagguacc aacugguacc 60
ugaucuagcc aaagccugac cguaagcugc 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 uuggggggagg gggcuguguc uagcaagucu ucuuccccca 60
cagcccugcu gucuuaaccu cuagguguuc cggcucc 97

<210> 571
<211> 99
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 571

agaugccuug cuccuacaag aguaaagugc acgugcuuug ggacagugag gaaaauaaug 60
uucacaaagc ccauacacuu ucacccuuua ggagaguug 99

<210> 572
<211> 81
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<220>
<223> Descripción de molécula de ADN/ARN combinada:c

<400> 572

cauggcaccu ccauuucccu gaggagcccu uugagccuga ggugaaaaaa aaacagguca 60
agaggcgccu gggaacugga g 81

<210> 573
<211> 98
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 573

acccaaaccc uaggucugcu gacuccuagu ccagggcucg ugauggcugg ugggcccuga 60
acgagggguc uggaggccug gguuugaaua ucgacagc 98

<210> 574
<211> 86
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 574

gucugucugc ccgcaugccu gccucucugu ugcucugaag gaggcagggg cugggccugc 60
agcugccugg gcagagcggc uccugc 86

<210> 575
<211> 68
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 575

ccauuacugu ugcuaauaug caacucuguu gaauauaaau uggaauugca cuuuagcaau 60
ggugaugg 68

<210> 576
<211> 66
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 576

aaaaggugga uauuccuucu auguuuaugu uauuuauggu uaaacauaga ggaaauucca 60
cguuuu 66

<210> 577
<211> 70
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 577

uugaagggag aucgaccgug uuauauucgc uuuauugacu ucgaauaaua caugguugau 60
cuuuucucag 70

<210> 578
<211> 75
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 578

agacagagaa gccaggucac gucucugcag uuacacagcu cacgagugcc ugcuggggug 60
gaaccugguc ugucu 75

<210> 579
<211> 67
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 579

guggcacuca aacugugggg gcacuuucug cucucuggug aaagugccgc caucuuuuga 60
guguuac 67

<210> 580
<211> 67
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 580

gugggccuca aauguggagc acuauucuga uguccaagug gaaagugcug cgacauuuga 60
gcgucac 67

<210> 581
<211> 69
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 581

gggauacuca aaaugggggc gcuuuccuuu uugucuguac ugggaagugc uucgauuuug 60
gggugcccc 69

<210> 582
<211> 72
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 582

uacaucggcc auuauaauac aaccugauaa guguuauagc acuuaucaga uuguauugua 60
auugucugug ua 72

<210> 583
<211> 99
<212> ARN

<213> *Mus musculus*
<400> 583

cauggcaccu ccguuucccu gaggagcccu uugagccugg agugaaaaaa aaaaacaggu 60
caagaggcgc cugggaacug gagaagagug uuaaacuuc 99

<210> 584
<211> 79
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 584

agacggagag accaggucac gucucugcag uuacacagcu caugagugcc ugcuggggug 60
gaaccugguu ugucugucu 79

<210> 585
<211> 68
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 585

uaaaagguag auucuccuuc uaugaguaca auauuaauga cuaaucguag aggaaaaucc 60
acguuuuc 68

<210> 586
<211> 82

<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 586

ugguauuuaa aagguggaua uuccuucuau gguuacgugc uuccuggaua aucauagagg 60
aacauccacu uuuucaguau ca 82

<210> 587
<211> 61
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 587

aagaugguug accauagaac augcgcuacu ucugugucgu auguaguaug guccacaucu 60
u 61

<210> 588
<211> 79
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 588

ugguacucgg agagagguua cccgagcaac uuugcaucug gaggacgaau guugcucggu 60
gaaccccuuu ucgguauca 79

<210> 589
<211> 81
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 589

ggguacuuga ggagagguug ucugugauga guucgcuuua uuaaugacga auauaacaca 60
gauggccugu uuucaauacc a 81

<210> 590
<211> 82
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 590

ugguacuugg agagauagua gaccguauag cguacgcuuu aucugugacg uauguaacac 60
gguccacuaa cccucaguau ca 82

<210> 591
<211> 80
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 591

ggguauggga cggauggucg accagcugga aaguaauugu uucuaaugua cuucaccugg 60
uccacuagcc gucggugccc 80

<210> 592
<211> 96
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 592

guacauaugu ugaagauuau uaauauauag aguggguguu guggugguag uaugauaugu 60
agaguaguag guugcauagu acgauguagu guauga 96

<210> 593
<211> 79
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<220>
<223> Descripción de molécula de ADN/ARN combinada:c

<400> 593

cacacuguag gccucauuaa auguuuguug aaugaaaaaa ugaaucauca acagacauua 60
auugggcgcc ugcucugug 79

<210> 594
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 594
cauacuucuu uauaugccca ua 22

<210> 595
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 595
uggaauguaa agaaguaugu a 21

<210> 596
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 596
cauacuucuu uacauucugt t 21

<210> 597
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 597
uggaauguaa agaaguaugu a 21

<210> 598
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 598
cauacuucuu uacauuccat t 21

<210> 599
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 599
uggaauguaa agaaguaugu a 21

<210> 600
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 600
guguucacag cggaccuuga uu 22

<210> 601
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 601
uuaaggcacg cggugaaugc ca 22

<210> 602
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 602
gcauucaccg cgugccuugg tt 22

<210> 603
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 603
uuaaggcacg cggugaaugc ca 22

<210> 604
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 604
gcauucaccg cgugccuuaa tt 22

<210> 605
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 605
uuaaggcacg cggugaaugc ca 22

<210> 606
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 606
ucuuuucaca uugugcuac 19

<210> 607
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 607
cagugcaaug uuaaaagggc 20

<210> 608

<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 608
uauuuuaaca uugcacugtt 20

<210> 609
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 609
cagugcaaug uuaaaagggc 20

<210> 610
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 610
ccuuuuaaca uugcacugtt 20

<210> 611
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 611
cagugcaaug uuaaaagggc 20

<210> 612
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 612
aguuuugcau aguugcacua 20

<210> 613
<211> 23

<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 613
ugugcaaauc uaugcaaaac uga 23

<210> 614
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 614
acauuugcau agauuugcac att 23

<210> 615
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 615
ugugcaaauc uaugcaaaac uga 23

<210> 616
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 616
aguuuugcau agauuugcac att 23

<210> 617
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 617
ugugcaaauc uaugcaaaac uga 23

<210> 618
<211> 22
<212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 618
caaauucgua ucuaggggaa ua 22

<210> 619
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 619
uacccuguag auccgaauuu gug 23

<210> 620
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 620
agaauucgga ucuacagggu att 23

<210> 621
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 621
uacccuguag auccgaauuu gug 23

<210> 622
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 622
caaauucgga ucuacagggu att 23

<210> 623
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 623
uacccuguag auccgaauuu gug 23

<210> 624
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 624
auguuuccac agugcauca 19

<210> 625
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 625
gugcauugua guugcauug 19

<210> 626
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 626
guccaacuac aaugcactt 19

<210> 627
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 627
gugcauugua guugcauug 19

<210> 628
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 628
augcaacuac aaugcactt 19

<210> 629
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 629
gugcauugua guugcauug 19

<210> 630
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 630
cuauacaacc uacugccuuc c 21

<210> 631
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 631
ugagguagua gguugugugg uu 22

<210> 632
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 632
ccacacaacc uacuaucuua tt 22

<210> 633
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 633
ugagguagua gguugugugg uu 22

<210> 634
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 634
ccacacaacc uacuaccuca tt 22

<210> 635
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 635
ugagguagua gguugugugg uu 22

<210> 636
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 636
aacaacauga aacuaccuat 21

<210> 637
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 637
uagguaguuu cauguuguug g 21

<210> 638
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 638
caaauucgua ucuaggggaa ua 22

<210> 639
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 639
uagguaguuu cauguuguug g 21

<210> 640
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 640
aauaacauga aacuaccuat t 21

<210> 641
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 641
uagguaguuu cauguuguug g 21

<210> 642
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 642
augcaacuac aaugcactt 19

<210> 643
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 643
gugcauugua guugcauug 19

<210> 644
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 644
augcaacuac aaugcactt 19

<210> 645
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 645
gugcauugua guugcauug 19

<210> 646
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 646
augcaacuac aaugcactt 19

<210> 647
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 647
gugcauugua guugcauug 19

<210> 648
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 648
augcaacuac aaugcactt 19

<210> 649
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 649
gugcauugua guugcauug 19

<210> 650
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 650
augcaacuac aaugcactt 19

<210> 651
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 651
gugcauugua guugcauug 19

<210> 652
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 652
ccacacaacc uacuaccuca tt 22

<210> 653
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 653
ugagguagua gguugugugg uu 22

<210> 654
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 654
ccacacaacc uacuaccuca tt 22

<210> 655
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 655
ugagguagua gguugugugg uu 22

<210> 656
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 656
ccacacaacc uacuaccuca tt 22

<210> 657
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 657
ugagguagua gguugugugg uu 22

<210> 658
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 658

ccacacaacc uacuaccuca tt 22

<210> 659
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 659
ugagguagua gguugugugg uu 22

<210> 660
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 660
cauacuucuu uacauuccat t 21

<210> 661
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 661
uggaauguaa agaaguaugu a 21

<210> 662
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 662
cauacuucuu uacauuccat t 21

<210> 663
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 663
uggaauguaa agaaguaugu a 21

<210> 664
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 664
gcauucaccg cgugccuuaa tt 22

<210> 665
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 665
uuaaggcacg cggugaaugc ca 22

<210> 666
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 666
gcauucaccg cgugccuuaa tt 22

<210> 667
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 667
uuaaggcacg cggugaaugc ca 22

<210> 668
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 668
ccuuuuaaca uugcacugtt 20

<210> 669
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 669
cagugcaaug uuaaaagggc 20

<210> 670
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 670
ccuuuuaaca uugcacugtt 20

<210> 671
<211> 20
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 671
cagugcaaug uuaaaagggc 20

<210> 672
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 672
caaauucgga ucuacagggu att 23

<210> 673
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 673
uacccuguag auccgaauuu gug 23

<210> 674
<211> 23

<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 674
caaauucgga ucuacagggu att 23

<210> 675
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 675
uacccuguag auccgaauuu gug 23

<210> 676
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 676
uauacaagag augaaauccu c 21

<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

uaaaagguag auucuccuuc uaugaguaca uuauuuauga uuaaucauag aggaaaaucc 60
acguuuuc 68

<210> 679
<211> 69
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 679

uugagcagag guugcccuug gugaauucgc uuuauuuaug uugaaucaca caaaggcaac 60
uuuuguuug 69

<210> 680
<211> 66
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 680

agggcuccug acuccagguc cugugguuua 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 augcgcuauc ucugugucgu auguaauaug guccacaucu 60
u 61

<210> 683
<211> 75
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 683

uacuuaaagc gagguugccc uuuguauauu cgguuuauug 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
<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

uguuaaauca ggaauuuuaa acaauuccua gacaauaugu auaauguuca uaagucauuc 60
cuagaaauug uucauaaugc 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
<213> *Homo sapiens*

<400> 688

auaaaggaag uuaggcugag gggcagagag cgagacuuuu cuauuuucca aaagcucggu 60
cugaggcccc ucagucuugc uuccuaaccc gcgc 94

<210> 689
<211> 98
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 689

cgaggggaua cagcagcaau ucauguuuug aaguguucua aaugguucaa aacgugaggc 60
gcugcuauac ccccucgugg ggaagguaga aggugggg 98

<210> 690
<211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 690

gaaagcgcuu uggaaugaca cgaucacucc cguugagugg gcacccgaga agccaucggg 60
aaugucgugu ccgcccagug cucuuuc 87

<210> 691
<211> 111
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 691

gccgggaggu ugaacauccu gcauagugcu gccaggaaau cccuauuuca uauaagaggg 60
ggcuggcugg uugcauaugu aggauguccc aucucccagc ccacuucguc a 111

<210> 692
<211> 83

<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 692

cgccggccga ugggcgucuu accagacaug guuagaccug gcccucuguc uaauacuguc 60
ugguaaaacc guccauccgc ugc 83

<210> 693
<211> 91
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 693

cugugugaga ugagcuggca guguauuguu agcugguuga auaugugaau ggcaucggcu 60
aacaugcaac ugcugucuua uugcauauac a 91

<210> 694
<211> 91
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 694

aaacgauacu aaacuguuuu ugcgaugugu uccuaauaug cacuauaaau auauugggaa 60
cauuuugcau guauaguuuu guaucaauau a 91

<210> 695
<211> 85
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 695

aaagugcuuu ggaaugacac gaucacuccc guugaguggg cacccaagaa gccaucggga 60
augucguguc cgcccagugc ucuuu 85

<210> 696
<211> 112
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 696

acgaggaggu ugaacauccu gcauagugcu gccaggaaau cccuacuuca uacuaagagg 60
gggcuggcug guugcauaug uaggaugucc caucuccugg cccacuucgu ca 112

<210> 697
<211> 83
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 697

ccugcugaug gaugucuuac cagacauggu uagaucugga ugcaucuguc uaauacuguc 60
ugguaaugcc guccauccac ggc 83

<210> 698
<211> 91
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 698

cugugugcga uggcuuggca guguauuguu agcugguuga guaugugagc ggcaccagcu 60
aacaugcgac ugcucuccua uugcacacac a 91

<210> 699
<211> 91
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 699

gagagauacu gagcuguuuu ugcgaugugu uccuaauaug ugcuauaauu auauugggaa 60
cauuuugcau aaauagcuuu gugucaauac a 91

<210> 700
<211> 112
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 700

acggggaggu ugaacauccu gcauagugcu gccaggaaau cccuacuuca uacuaagagg 60
gggcuggcug guugcauaug uaggaugucc caucucccgg cccacuucgu ca 112

<210> 701
<211> 85
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 701

ugccugcuga uggaugucuu accagacaug guuagaucug gauguaucug ucuaauacug 60
ucugguaaug ccguccaucc auggc 85

<210> 702
<211> 91
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 702

cugugugcga uggguuggca guguauuguu agcugguuga guauguaaaa ggcaccagcu 60
aacaugcaac ugcucuccua uugcacauac a 91

<210> 703
<211> 91
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 703

gagagaugcg gagcuguuuu ugcgaugugu uccuaaugug ugcuacaauu auauugggaa 60
cauuuugcau aaauaguuuu acaucgacac a 91

<210> 704
<211> 100
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 704

ccaaagaaag augcuaaacu auuuuugcga uguguuccua auauguaaua uaaauguauu 60
ggggacauuu ugcauucaua guuuuguauc aauaauaugg 100

<210> 705
<211> 72
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 705

cuugggaaug gcaaggaaac cguuaccauu acugaguuua guaaugguaa ugguucucuu 60
gcuauaccca ga 72

<210> 706
<211> 85
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 706

gcuaagcacu uacaacuguu ugcagaggaa acugagacuu uguaacuaug ucucagucuc 60
aucugcaaag aaguaagugc uuugc 85

<210> 707
<211> 22
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 707
gagguugucc guggugaguu cg 22

<210> 708
<211> 96
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 708

ucccuggcgu gaggguaugu gccuuuggac uacaucgugg aagccagcac caugcagucc 60
augggcauau acacuugccu caaggccuau gucauc 96

<210> 709
<211> 76
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 709

gagggggaag acgggaggaa agaagggagu gguuccauca cgccuccuca cuccucuccu 60
cccgucuucu ccucuc 76

<210> 710
<211> 63
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 710

gucaggcuca gucccccucc gauaaacccc uaaauaggga cuuucccggg gggugacccu 60
ggc 63

<210> 711
<211> 73

<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 711

acuuggagag aggcuggccg ugaugaauuc gauucaucaa agcgagucau acacggcucu 60
ccucucuuuu agu 73

<210> 712
<211> 68
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 712

guauccugua cugagcugcc ccgagcuggg cagcaugaag ggccucgggg cagcucagua 60
caggaugc 68

<210> 713
<211> 80
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 713

gguacuugaa gagugguuau cccugcugug uucgcuuaau uuaugacgaa ucauacaggg 60
acauccaguu uuucaguauc 80

<210> 714
<211> 83
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 714

gagaaucauc ucucccagau aauggcacuc ucaaacaagu uuccaaauug uuugaaaggc 60
uauuucuugg ucagaugacu cuc 83

<210> 715
<211> 84
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 715

guggcagcuu gguggucgua ugugugacgc cauuuacuug aaccuuuagg agugacauca 60
cauauacggc agcuaaacug cuac 84

<210> 716
<211> 128
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 716

uggaggccuu gcugguuugg aaaguucauu guucgacacc auggaucucc agguggguca 60
aguuuagaga ugcaccaacc uggaggacuc caugcuguug agcuguucac aagcagcgga 120
cacuucca 128

<210> 717
<211> 84
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 717

uugacuuagc uggguagugg ggaacccuuc caugaggagu agaacacucc uuaugcaaga 60
uucccuucua ccuggcuggg uugg 84

<210> 718
<211> 116
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 718

caacuacagc cacuacuaca ggaccaucga ggaccugcgg gacaagauuc uuggugccac 60
cauugagaac gccaggauug uccugcagau caacaaugcu caacuggcug cagaug 116

<210> 719
<211> 89
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 719

cuggccucca gggcuuugua caugguaggc uuucauucau ucguuugcac auucggugaa 60
ggucuacugu gugccaggcc cugugccag 89

<210> 720
<211> 24
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 720
ugaaacauac acgggaaacc ucuu 24

<210> 721
<211> 82
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 721

ugguaccuga aaagaaguug cccauguuau uuucgcuuua uaugugacga aacaaacaug 60
gugcacuucu uuuucgguau ca 82

<210> 722
<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

aacccuccuu gggaagugaa gcucaggcug ugauuucaag ccaggggcg uuuuucuaua 60
acuggaugaa aagcaccucc agagcuugaa gcucacaguu ugagagcaau cgucuaagga 120
aguu 124

<210> 725
<211> 122
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 725

gcccuguccc cugugccuug ggcgggcggc uguuaagacu ugcagugaug uuuaacuccu 60
cuccacguga acaucacagc aagucugugc ugcuucccgu cccuacgcug ccugggcagg 120
gu 122

<210> 726
<211> 84
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 726

gcucccccuc ucuaauccuu gcuaccuggg ugagagugcu gucugaaugc aaugcaccug 60
ggcaaggauu cugagagcga gagc 84

<210> 727
<211> 84
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 727

gcucuuccuc ucuaauccuu ugucccuggg ugagagugcu uucugaaugc aaugcacccg 60
ggcaaggauu cugagagggu gagc 84

<210> 728
<211> 55
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 728
auccuugcua ucugggugcu agugcuggcu caaugcaaug caccugggca aggau 55

<210> 729
<211> 71
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 729

ugcccuagca gcgggaacag uucugcagug agcgaucggu gcucuggggu auuguuuccg 60
cugccagggu a 71

<210> 730
<211> 83
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 730

gcugcuguug ggagacccug gucugcacuc uaucuguauu cuuacugaag ggagugcagg 60
gcaggguuuc ccauacagag ggc 83

<210> 731
<211> 84
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 731

gaugcaccca gugggggagc caggaaguau ugauguuucu gccaguuuag cgucaacacu 60
ugcuggguuc cucucuggag cauc 84

<210> 732
<211> 124
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 732

gccaccacca ucagccauac uauguguagu gccuuauuca ggaagguguu acuuaauaga 60
uuaauauuug uaaggcaccc uucugaguag aguaaugugc aacauggaca acauuugugg 120
uggc 124

<210> 733
<211> 94
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 733

gugcugugug uagugcuuca cuucaagaag ugccaugcau gugucuagaa auauguuuug 60
caccuuuugg agugaaauaa ugcacaacag auac 94

<210> 734
<211> 115
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 734

ccaccuucag cugaguguag ugcccuacuc cagagggcgu cacucaugua aacuaaaaca 60
ugauuguagc cuuuuggagu agaguaauac acaucacgua acgcauauuu ggugg 115

<210> 735
<211> 94
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 735

caugcugugu gugguacccu acugcagaca guggcaauca uguauaauua aaaaugauug 60
guacgucugu ggguagagua cugcaugaca caug 94

<210> 736
<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*

<400> 737

caauagacac ccaucguguc uuuugcucug cagucaguaa auauuuuuuu gugaaugugu 60
agcaaaagac agaauggugg uccauug 87

<210> 738
<211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 738

caauagacac ccaucguguc uuuugcucug cagucaguaa auauuuuuuu gugaaugugu 60
agcaaaagac agaauggugg uccauug 87

<210> 739
<211> 84
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 739

ucucagucug uggcacucag ccuugagggc acuuucuggu gccagaauga aagugcuguc 60
auagcugagg uccaaugacu gagg 84

<210> 740
<211> 98
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 740

gguacuucuc agucuguggc acucagccuu gagggcacuu ucuggugcca gaaugaaagu 60
gcugucauag cugaggucca augacugagg cgagcacc 98

<210> 741
<211> 129
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 741

gggaugccac auucagccau ucagcguaca gugccuuuca cagggaggug ucauuuaugu 60
gaacuaaaau auaaauuuca ccuuucugag aaggguaaug uacagcaugc acugcauaug 120
uggugucccc 129

<210> 742
<211> 127
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 742

ggaugccaca uucagccauu cagugugcag ugccuuucac agggaggugu cauuuaugug 60
aacuaaaaua uaaauuucac cuuucugaga aggguaaugu acagcaugca cugcauaugu 120
ggugucc 127

<210> 743

<211> 58
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 743
cuacucugga gagugacaau cauguauaau uaaauuugau ugacacuucu gugaguag 58

<210> 744
<211> 58
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 744
cuacucugga gagugacaau cauguauaac uaaauuugau ugacacuucu gugaguag 58

<210> 745
<211> 58
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 745
cuacucugga gagugacaau cauguauaac uaaauuugau ugacacuucu gugaguag 58

<210> 746
<211> 83
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 746
ucucaugcag ucauucucca aaagaaagca cuuucuguug ucugaaagca gagugccuuc 60
uuuuggagcg uuacuguuug aga 83

<210> 747
<211> 83
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 747
ucucaugcag ucauucucca aaagaaagca cuuucuguug ucugaaagca gagugccuuc 60
uuuuggagcg uuacuguuug aga 83

<210> 748
<211> 90
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 748
ucucaggcug ugaccuucuc gaggaaagaa gcacuuucug uugucugaaa gaaaagaaag 60
ugcuuccuuu cagaggguua cgguuugaga 90

<210> 749
<211> 90
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 749
ucucagguug ugaccuucuc gaggaaagaa gcacuuucug uugucugaaa gaaaagaaag 60
ugcuuccuuu cagaggguua cgguuugaga 90

<210> 750

<211> 85
<212> ARN

<213> *Homo sapiens*
<400> 750

ucucaugaug ugaccaucug gagguaagaa gcacuuugug uuuugugaaa gaaagugcuu 60
ccuuucagag gguuacucuu ugaga 85

<210> 751
<211> 90
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 751

ucucaggcug ugaccaucug gagguaagaa gcacuuucug uuuugugaaa gaaaagaaag 60
ugcuuccuuu cagaggguua cucuuugaga 90

<210> 752
<211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 752

ucucaggcag ugacccucua gauggaagca cugucuguug uauaaaagaa aagaucgugc 60
aucccuuuag aguguuacug uuugaga 87

<210> 753
<211> 67
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 753

gugacccucu agauggaagc acugucuguu gucuaagaaa agaucgugca ucccuuuaga 60
guguuac 67

<210> 754
<211> 95
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 754

gaagaucuca ggcagugacc cucuagaugg aagcacuguc uguugucuaa gaaaagaucg 60
ugcauccuuu uagaguguua cuguuugaga aaauc 95

<210> 755
<211> 85
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 755

ucucaagcug ugacugcaaa gggaagcccu uucuguuguc ugaaagaaga gaaagcgcuu 60
cccuuugcug gauuacgguu ugaga 85

<210> 756
<211> 87
<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 756

ucucaagcug ugggucugca aagggaagcc cuuucuguug ucuaaaagaa gagaaagcgc 60
uucccuuugc uggauuacgg uuugaga 87

<210> 757
<211> 83
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 757

ucaugcugug gcccuccaga gggaagcgcu uucuguuguc ugaaagaaaa caaagcgcuc 60
cccuuuagag guuuacgguu uga 83

<210> 758
<211> 101
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 758

gcgagaagau cucaugcugu gacucucugg agggaagcac uuucuguugu cugaaagaaa 60
acaaagcgcu ucucuuuaga guguuacggu uugagaaaag c 101

<210> 759
<211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 759

ucccaugcug ugacccucua gagggaagca cuuucuguug ucugaaagaa accaaagcgc 60
uucccuuugg agcguuacgg uuugaga 87

<210> 760
<211> 88
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 760

ucucaggcug ugacccucua gagggaagcg cuuucuguug gcuaaaagaa aagaaagcgc 60
uucccuucag aguguuaacg cuuugaga 88

<210> 761
<211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 761

ucucaugcug ugacccucua gagggaagca cuuucucuug ucuaaaagaa aagaaagcgc 60
uucucuuuag aggauuacuc uuugaga 87

<210> 762
<211> 85
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 762

cucaggcugu gacacucuag agggaagcgc uuucuguugu cugaaagaaa ggaaagugca 60
uccuuuuaga guguuacugu uugag 85

<210> 763
<211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 763

ucucaggcug ugucccucua cagggaagcg cuuucuguug ucugaaagaa aggaaagugc 60
auccuuuuag aguguuacug uuugaga 87

<210> 764
<211> 81
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 764

caugcuguga cccucuagag ggaagcgcuu ucuguugucu gaaagaaaag aaagugcauc 60
cuuuuagagg uuuacuguuu g 81

<210> 765
<211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 765

ucucagccug ugacccucua gagggaagcg cuuucuguug ucugaaagaa aagaaagugc 60
aucuuuuuag aggauuacag uuugaga 87

<210> 766
<211> 88
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 766

ucccaugcug ugacccucca aagggaagcg cuuucuguuu guuuucucuu aaacaaagug 60
ccucccuuua gaguguuacc guuuggga 88

<210> 767
<211> 84
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 767

ucucaugcag ucauucucca aaagggagca cuuucuguuu gaaagaaaac aaagugccuc 60
cuuuuagagu guuacuguuu gaga 84

<210> 768
<211> 85
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 768

cucaggcugu gacccuccag agggaaguac uuucuguugu cugagagaaa agaaagugcu 60
ucccuuugga cuguuucggu uugag 85

<210> 769
<211> 61
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 769

cccucuacag ggaagcgcuu ucuguugucu gaaagaaaag aaagugcuuc cuuuuagagg 60
g 61

<210> 770
<211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 770

ucucaggcug ucguccucua gagggaagca cuuucuguug ucugaaagaa aagaaagugc 60
uuccuuuuag aggguuaccg uuugaga 87

<210> 771
<211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 771

ucucaagcug ugagucuaca aagggaagcc cuuucuguug ucuaaaagaa aagaaagugc 60
uucucuuugg uggguuacgg uuugaga 87

<210> 772
<211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 772

ucuccugcug ugacccucaa gauggaagca guuucuguug ucugaaagga aagaaagugc 60
uuccuuuuug aggguuacug uuugaga 87

<210> 773
<211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 773

ucucaggcug ugacccucua aagggaagcg cuuucugugg ucagaaagaa aagcaagugc 60
uuccuuuuag aggguuaccg uuuggga 87

<210> 774
<211> 90
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 774

ucccaugcug ugacccucua gaggaagcac uuucuguuug uugucugaga aaaaacaaag 60
ugcuucccuu uagaguguua ccguuuggga 90

<210> 775

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

<400> 775

ucccaugcug ugacccucua gaggaagcac uuucuguuug uugucugaga aaaaacaaag 60
ugcuucccuu uagaguuacu guuuggga 88

<210> 776
<211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 776

ucucaggcug ugacccucca aagggaagaa cuuucuguug ucuaaaagaa aagaacgcac 60
uucccuuuag aguguuaccg ugugaga 87

<210> 777
<211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 777

ucucgggcug ugacucucca aagggaagaa uuuucucuug ucuaaaagaa aagaacgcac 60
uucccuuuag aguguuaccg ugugaga 87

<210> 778
<211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 778

ucucaggcug ugucccucua gagggaagcg cuuucuguug ucugaaagaa aagaaaaugg 60
uucccuuuag aguguuacgc uuugaga 87

<210> 779
<211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 779

ucucaugcug ugacccucua gagggaagcg cuuucuguug ucugaaagaa aagaacgcgc 60
uucccuauag aggguuaccc uuugaga 87

<210> 780
<211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 780

ucucaugcug ugacccuaca aagggaagca cuuucucuug uccaaaggaa aagaaggcgc 60
uucccuuugg aguguuacgg uuugaga 87

<210> 781
<211> 85
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 781

cucaagcugu gacucuccag agggaugcac uuucucuuau gugaaaaaaa agaaggcgcu 60
ucccuuuaga gcguuacggu uuggg 85

<210> 782
<211> 85
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 782

cucaggcugu gacccucuag agggaagcac uuucuguugc uugaaagaag agaaagcgcu 60
uccuuuuaga ggauuacucu uugag 85

<210> 783
<211> 65
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 783

gugacccucu agagggaagc acuuucuguu gaaagaaaag aacaugcauc cuuucagagg 60
guuac 65

<210> 784
<211> 83
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 784

ucaggcugug acccucuuga gggaagcacu uucuguuguc ugaaagaaga gaaagugcuu 60
ccuuuuagag gcuuacuguc uga 83

<210> 785
<211> 85
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 785

ucucaagcug ugacugcaaa gggaagcccu uucuguuguc uaaaagaaaa gaaagugcuu 60
cccuuuggug aauuacgguu ugaga 85

<210> 786
<211> 72
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 786

cuugggaaug gcgaggaaac cguuaccauu acugaguuua guaaugguaa cgguucucuu 60
gcugcuccca ca 72

<210> 787
<211> 85
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 787

gcuaagcagu uacaacuguu ugcagaggaa acugagacuu uauaacuaug ucucagucuc 60
aucugcaaag agguaagugc uuugc 85

<210> 788
<211> 75
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 788

cuuuaccuaa uuuguugucc aucauguaaa acauaaauga ugauagacac cauauaaggu 60
agaggaaggu ucacu 75

<210> 789
<211> 71
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 789

accuuguuau gggggucugg gguaaggagu ggucaucagg ggguacuacc aaguuuauuc 60
ugugagauag a 71

<210> 790
<211> 74
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 790

gcccuauuua gaauggcacu gaugugauaa aauaaaaaau ugaucagggc cuuucuaagu 60
agaguaaggc uuac 74

<210> 791
<211> 73
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 791

uauauguguu uaugugugug uacauguaca uaugugaaua ugauauccau auacauacac 60
gcacacauaa gac 73

<210> 792
<211> 71
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 792

gugccugugu gcguaagugc cugcauguau augcguguau auuuuaugca uauacauaca 60
cacaccuaca c 71

<210> 793
<211> 78
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 793

auaagaaacu uggcgugucg ugacugaugu acugauaaga aacucagugu gauaugacug 60
augugcgugu gucugucu 78

<210> 794
<211> 74
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 794

cgcggugccu cuuucauuga ucuugguguc cucaaauuga aagccaagga agaggugggg 60
ggcgugguag ccuu 74

<210> 795
<211> 75
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 795

cagugcucuu cuuggacugg cacuggugag uuaaacuaaa uacaaccagu accuuucuga 60
gaagaguaaa gcuca 75

<210> 796
<211> 67
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 796

gugcuuuacg uaguauagug cuuuucacau uaaacaaaaa gugaaaggug ccauacuaug 60
uauagga 67

<210> 797
<211> 73
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 797

gaggggaag acgggagaag agaagggagu gguuuuuggg ugccucacuc cucccccucc 60
gucuuguucu cuc 73

<210> 798
<211> 58
<212> ARN

<213> *Mus musculus*

<400> 798
gucaggcuca gucccccucc gauaaaccuc aaaauagggu cuuaccuagg gggcuggc 58

<210> 799
<211> 73
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 799

acuuggagag aggcuggccg ugaugaauuc gauucaucua aacgagucau acacggcucu 60
ccucucuucu agu 73

<210> 800

<211> 65
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 800

gcauccugua cugagcugcc ccgagcugag cacagugaag gaccucgggg cagcucagua 60
cagga 65

<210> 801
<211> 72
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 801

uuugggaaug gcgaggaaac cguuaccauu acugaguuua guaaugguaa ugguucucuu 60
gcugcuccca ca 72

<210> 802
<211> 73
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 802

gaggggggaag acgggagaag agaagggagu gguuuuuggg ugccucacuc cucccccucc 60
gucuuguucu cuc 73

<210> 803
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 803
tcatcgtctc aaatgagtct 20

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico miARN sintético que comprende una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 80% con la secuencia del miR-126 maduro humano para su uso en la terapia de un cáncer.

2. Un ácido nucleico miARN sintético para su uso en una terapia de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 1 que además se define 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 idéntica en un 80% a un miARN maduro miR-126, y
- una región complementaria cuya secuencia de 5' a 3' es complementaria entre un 60% y el 100% a la región de miARN.

3. Un ácido nucleico 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 idéntica en al menos un 85% a una secuencia de miR-126 maduro.

4. Un ácido nucleico 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 idéntica en al menos un 90% a una secuencia de miR-126 maduro.

5. Un ácido nucleico 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-126 maduro.

6. Un ácido nucleico 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.

7. Un ácido nucleico miARN sintético para su uso en una terapia de un cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el ácido nucleico es una molécula en horquilla.

8. Un ácido nucleico miARN sintético para su uso en una terapia de un cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su administración a una célula o a un paciente que tiene la célula identificada como que necesita una terapia de un cáncer.

9. Un ácido nucleico 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 de tratamiento de un cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de tiroides, cáncer de próstata, cáncer de piel, o leucemia.

10. Un ácido nucleico miARN sintético de cadena doble de 17-30 nucleótidos de longitud que comprende un primer polinucleótido que tiene una secuencia con una identidad de secuencia de al menos un 80% con una secuencia de miR-126 maduro que comprende los nucleótidos 52-72 de la SEC ID Nº 86, y un segundo polinucleótido separado cuya secuencia de 5' a 3' es complementaria entre un 60% y el 100% con el primer polinucleótido, para su uso como un medicamento.

11. Un ácido nucleico miARN sintético para su uso como un medicamento de acuerdo con la reivindicación 10, **que se caracteriza porque** el ácido nucleico está definido además como en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7.

12. Un ácido nucleico miARN sintético para su uso como un medicamento de acuerdo con la reivindicación 10 u 11 que comprende además uno o más de los siguientes:

(i) un grupo de sustitución del fosfato o el hidroxilo del nucleótido en el extremo 5' de la cadena complementaria de la molécula de ARN;
(ii) una o más modificaciones en los azúcares de los primeros o últimos 1 a 6 restos de la región complementaria; o
(iii) una no complementariedad entre uno o más nucleótidos de los últimos 1 a 5 restos del extremo 3' de la región complementaria y los correspondientes nucleótidos de la región miARN.

13. Un ácido nucleico 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 OH 5' o fosfato en el extremo 5', en el que la modificación del al menos un nucleótido es un NH_2, biotina, un grupo amino, un grupo alquilamino inferior, un grupo acetilo o una modificación 2' oxígeno-metilo (2' O-Me), o ii) al menos una modificación de la ribosa seleccionada de entre 2'F, 2'NH_2, 2'N_3, 4'tio, o 2' O-CH_3.

14. Un ácido nucleico miARN sintético para su uso como un medicamento de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 13 que es un polinucleótido de cadena sencilla, o un polinucleótido de cadena doble.

15. El uso de un ácido nucleico miARN sintético como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para la reducción o el aumento de la viabilidad celular o la proliferación celular o la inhibición de la apoptosis, con la

condición de que se excluyan los procedimientos para el tratamiento del cuerpo humano o animal por medio de cirugía como terapia.

Fig. 1

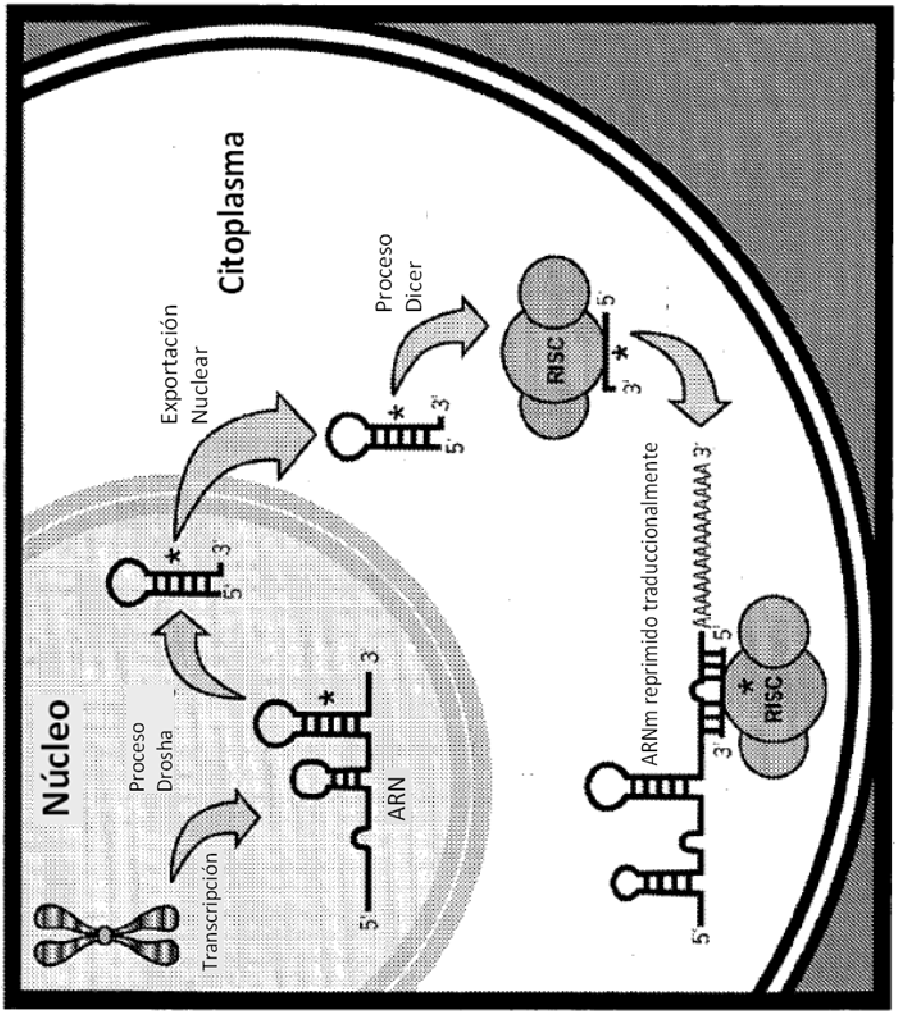

Núcleo
Citoplasma
Transcripción
Proceso Drosha
ARN
Exportación Nuclear
Proceso Dicer
RISC
ARNm reprimido traduccionalmente
AAAAAAAAAAAAA 3'
RISC

Fig. 2

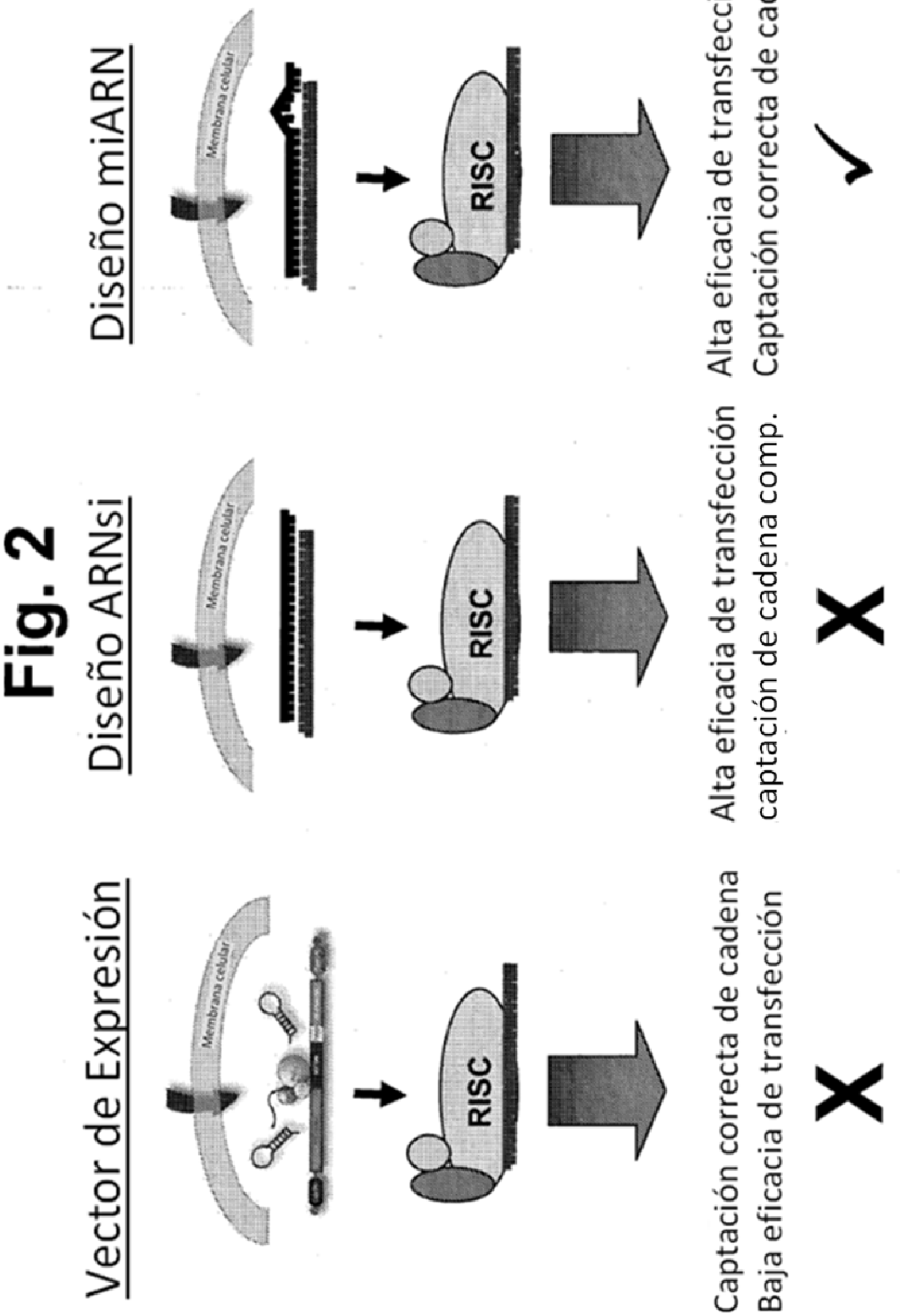

Vector de Expresión
Diseño ARNsi
Diseño miARN
Membrana celular
RISC
Captación correcta de cadena
Baja eficacia de transfección
Alta eficacia de transfección
captación de cadena comp.
Alta eficacia de transfección
Captación correcta de cadena

Fig. 3

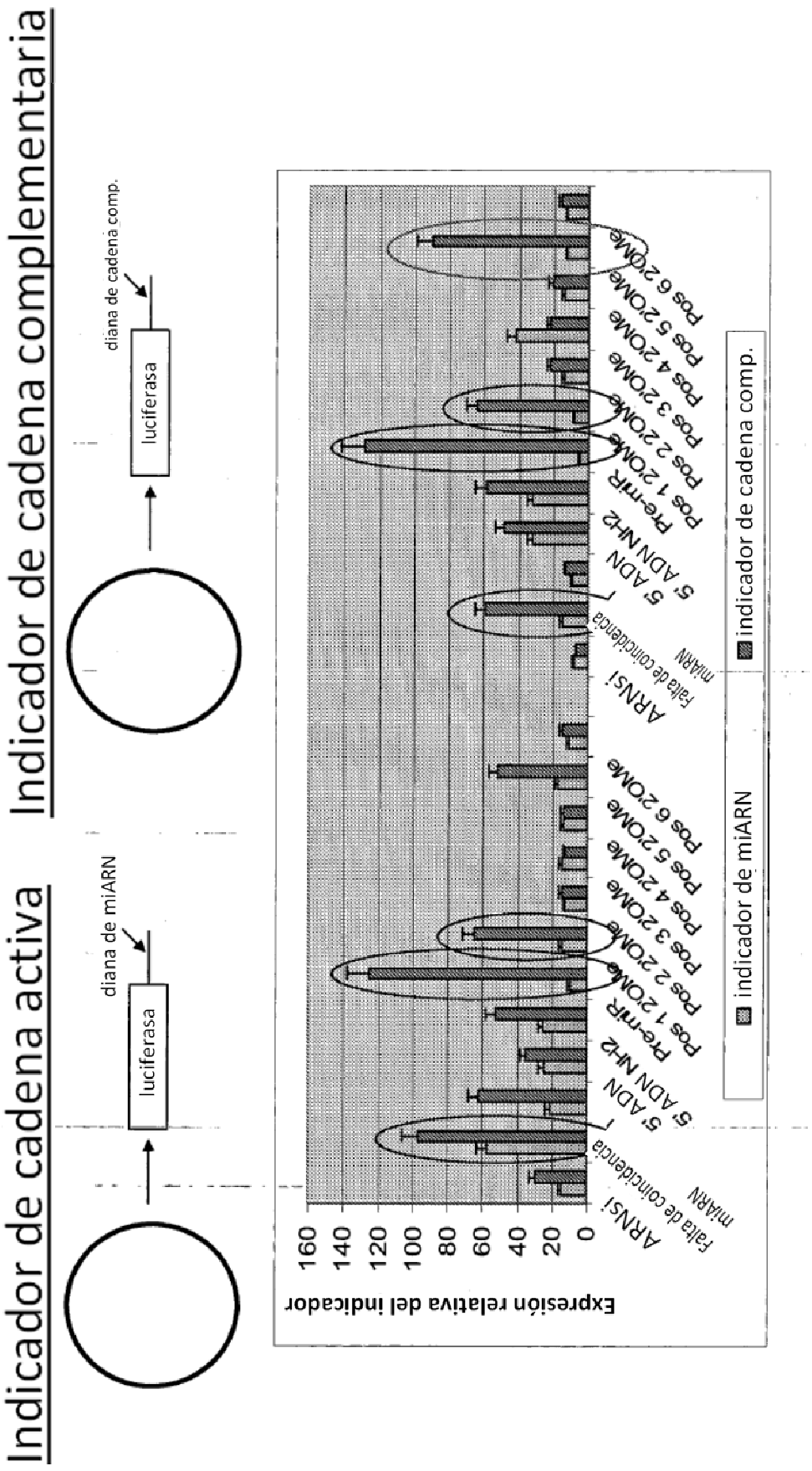

Indicador de cadena activa
diana de miARN
luciferasa
Indicador de cadena complementaria
diana de cadena comp.
luciferasa
Expresión relativa del indicador
0
20
40
60
80
100
120
140
160
ARNSi
falta de coincidencia
miARN
5' ADN
5' ADN NH2
Pre-miR
pos 1 2'OMe
pos 2 2'OMe
pos 3 2'OMe
pos 4 2'OMe
pos 5 2'OMe
pos 6 2'OMe
indicador de miARN
indicador de cadena comp.

Fig. 4

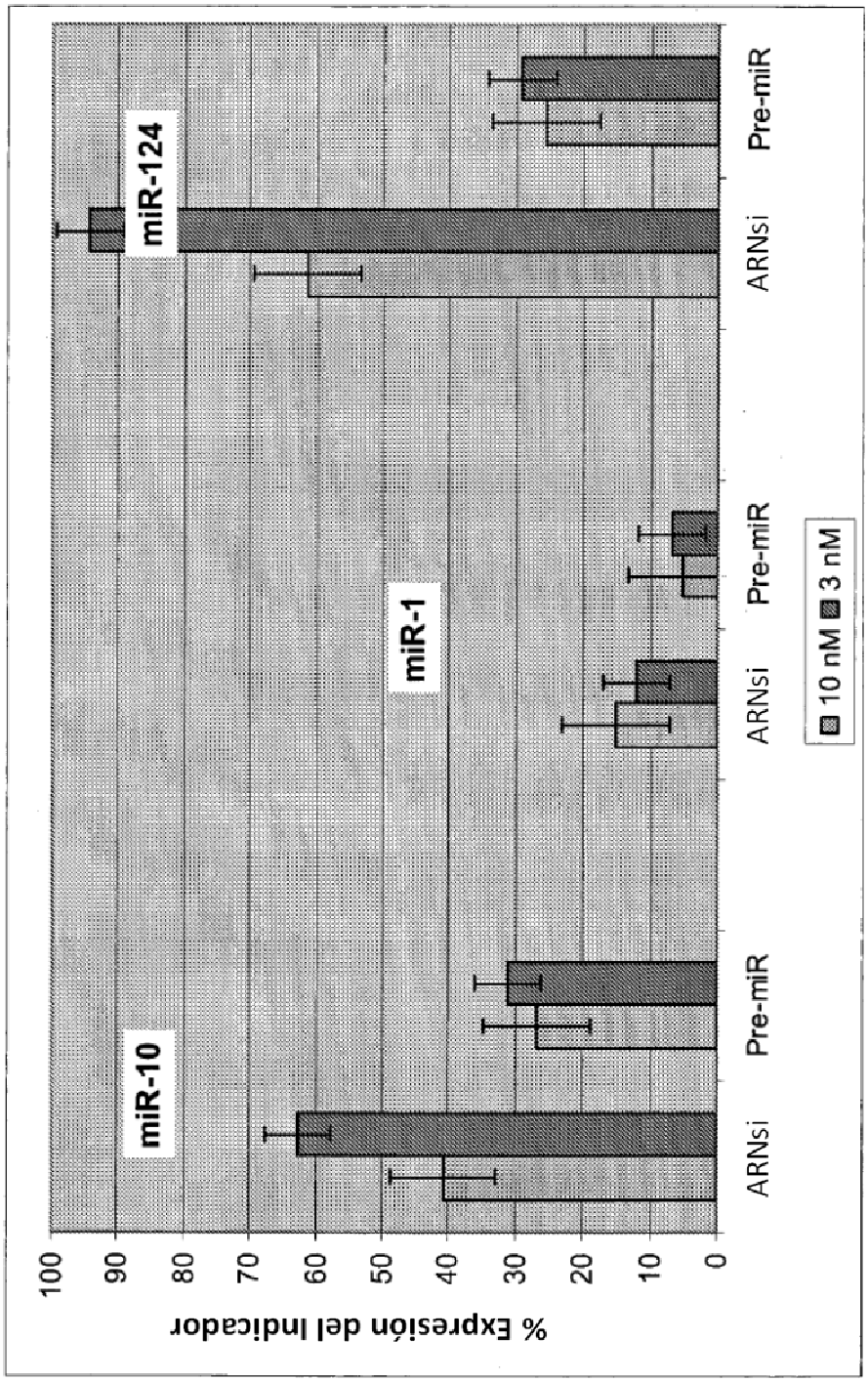

% Expresión del Indicador
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
miR-10
miR-1
miR-124
ARNsi
Pre-miR
ARNsi
Pre-miR
ARNsi
Pre-miR
10 nM
3 nM

Fig. 5

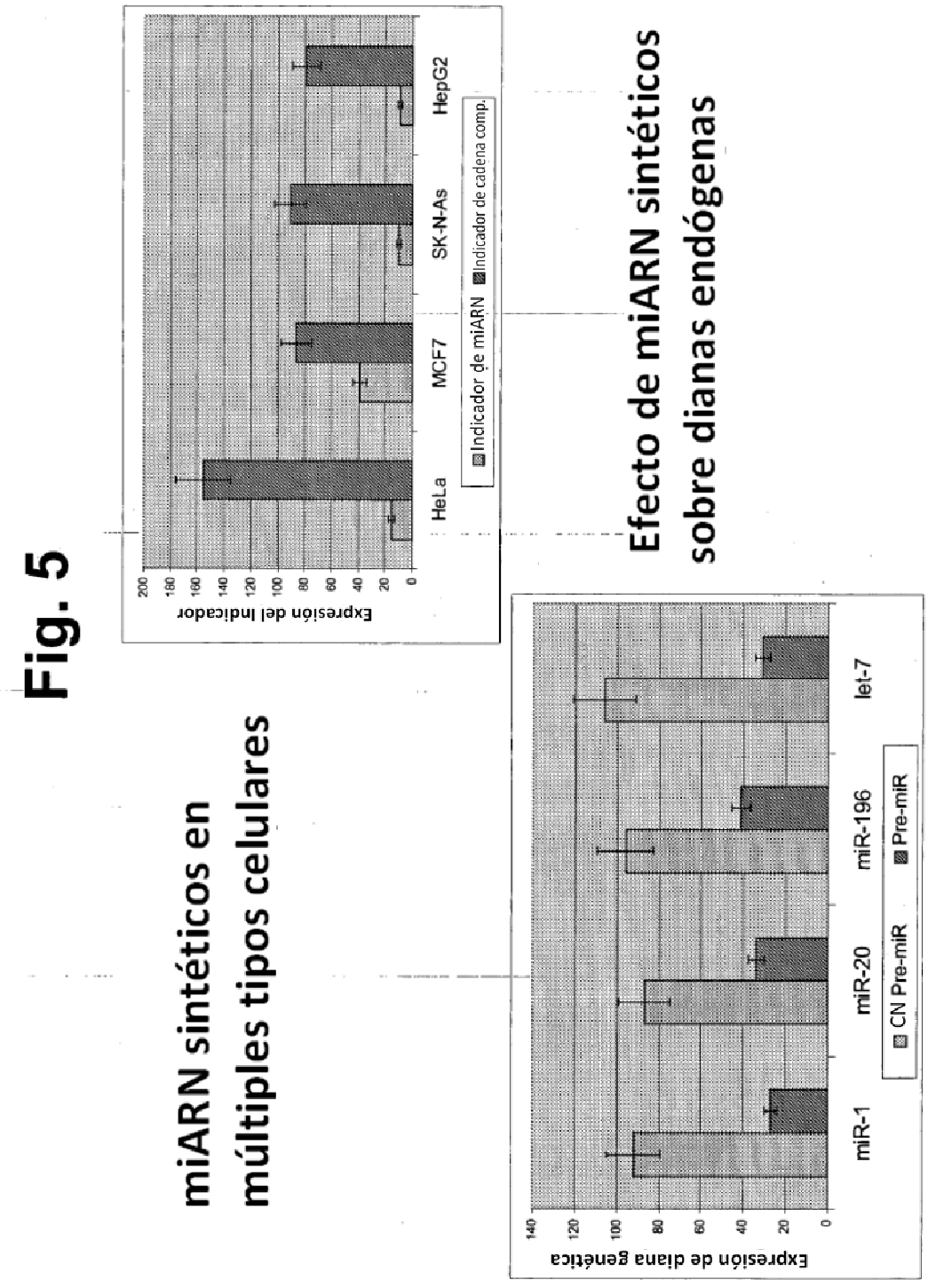

miARN sintéticos en múltiples tipos celulares
Expresión del indicador
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
HeLa
MCF7
SK-N-As
HepG2
Indicador de miARN
Indicador de cadena comp.
Efecto de miARN sintéticos sobre dianas endógenas
Expresión de diana genética
140
120
100
80
60
40
20
0
miR-1
miR-20
miR-196
let-7
CN Pre-miR
Pre-miR

Fig. 6

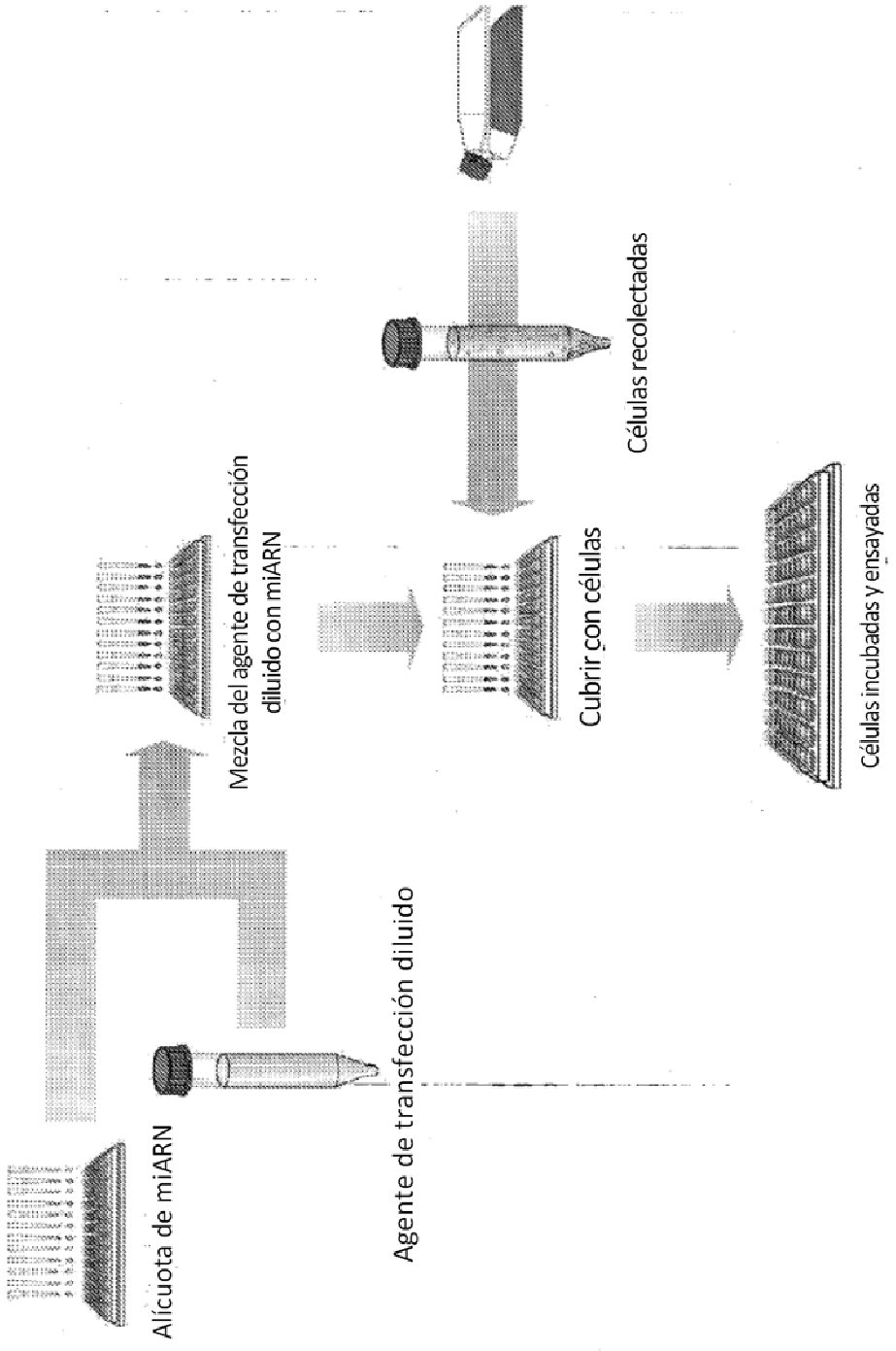

Alícuota de miARN
Agente de transfección diluido
Mezcla del agente de transfección diluido con miARN
Cubrir con células
Células recolectadas
Células incubadas y ensayadas

Fig. 7

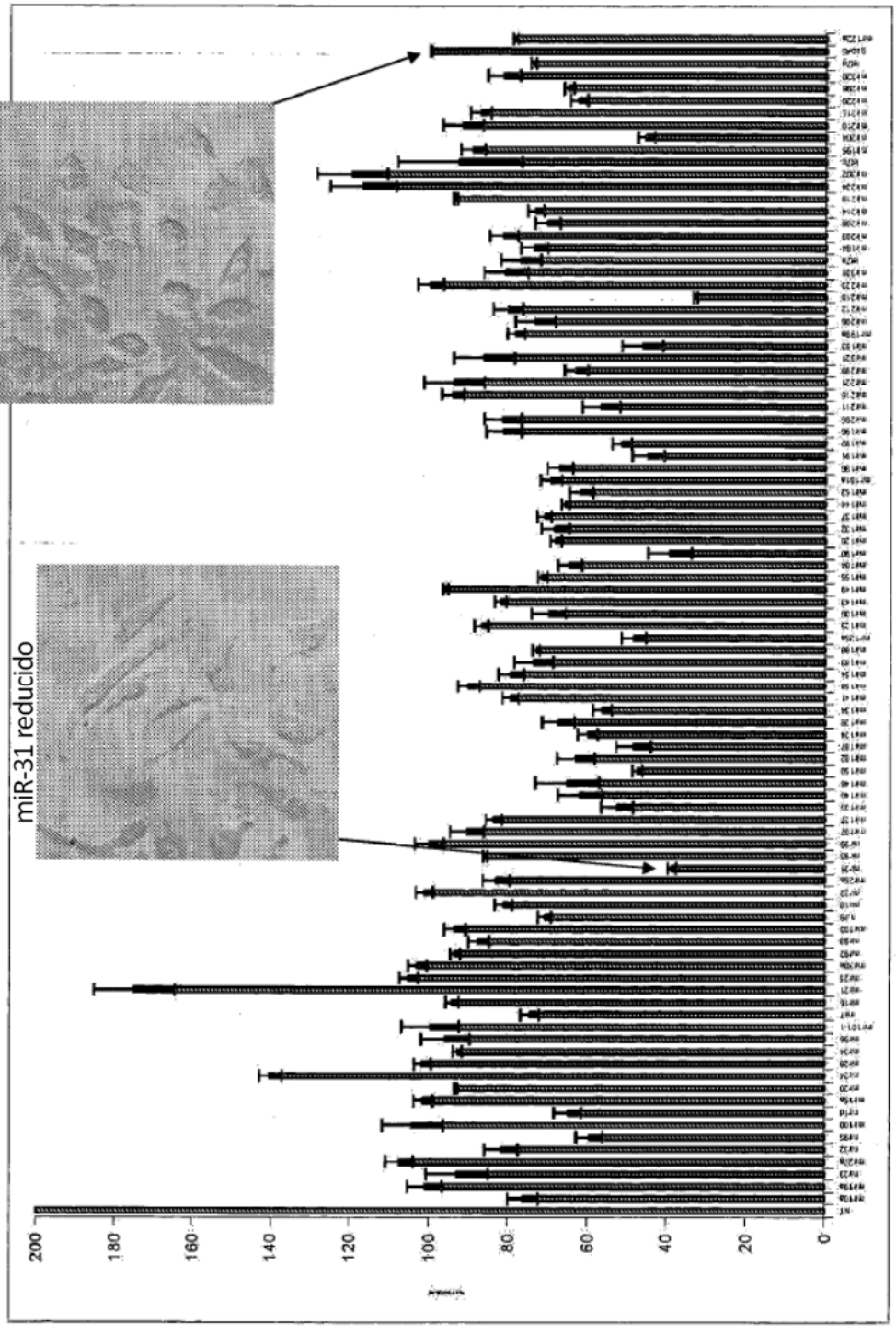

Control Negativo
miR-31 reducido
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0

Fig. 8

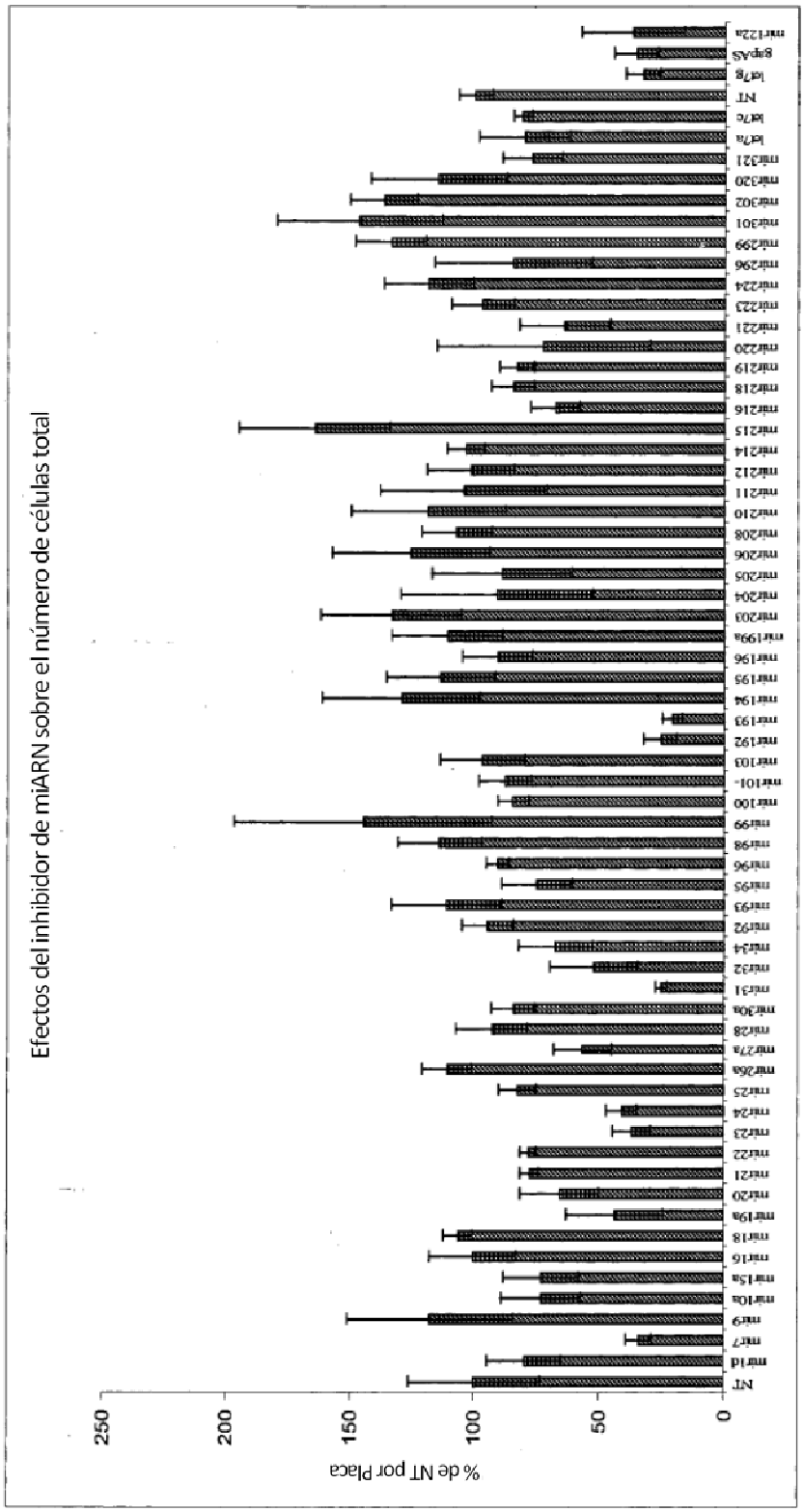
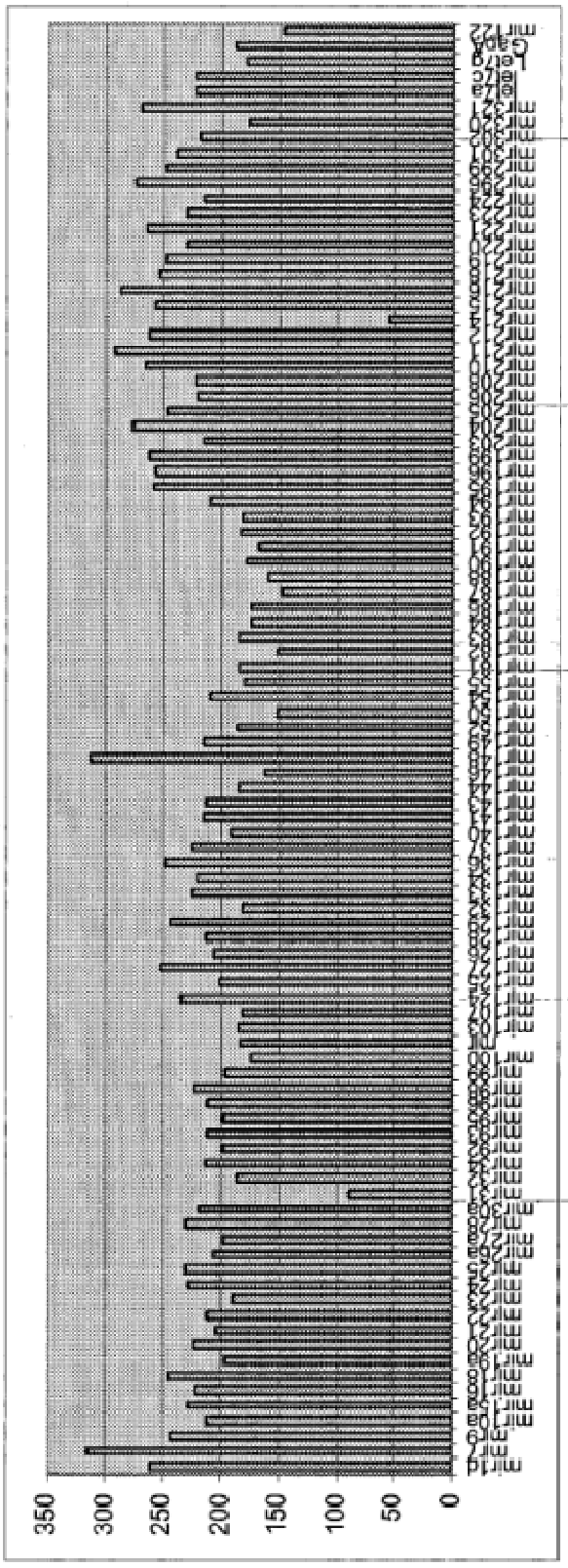
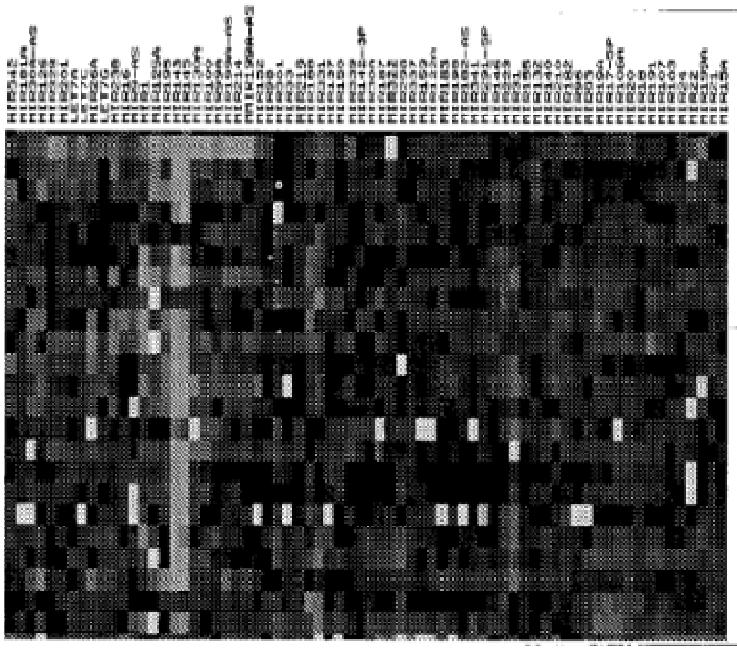

Efectos del inhibidor de miARN sobre el número de células total
% de NT por Placa
250
200
150
100
50
0
NT
miR1
miR7
miR9
miR10a
miR15a
miR16
miR18
miR19a
miR20
miR21
miR22
miR23
miR24
miR25
miR26a
miR27a
miR28
miR30a
miR31
miR32
miR34
miR92
miR93
miR95
miR96
miR98
miR99
miR100
miR101
miR103
miR192
miR193
miR194
miR195
miR196
miR199a
miR203
miR204
miR205
miR206
miR208
miR210
miR211
miR212
miR214
miR215
miR216
miR218
miR219
miR220
miR221
miR223
miR224
miR296
miR299
miR301
miR302
miR320
miR321
let7a
let7e
NT
let7g
siPAS
miR122a

Fig. 9





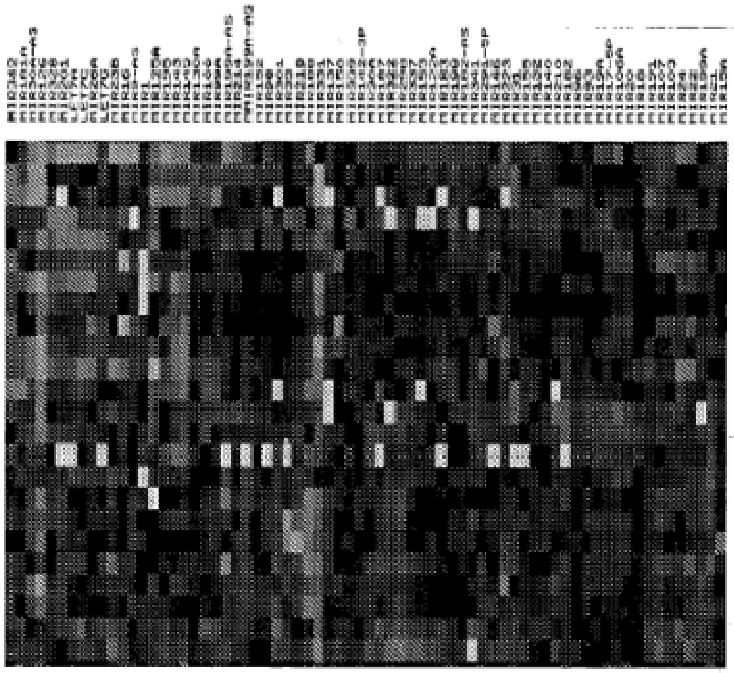


FIG. 10

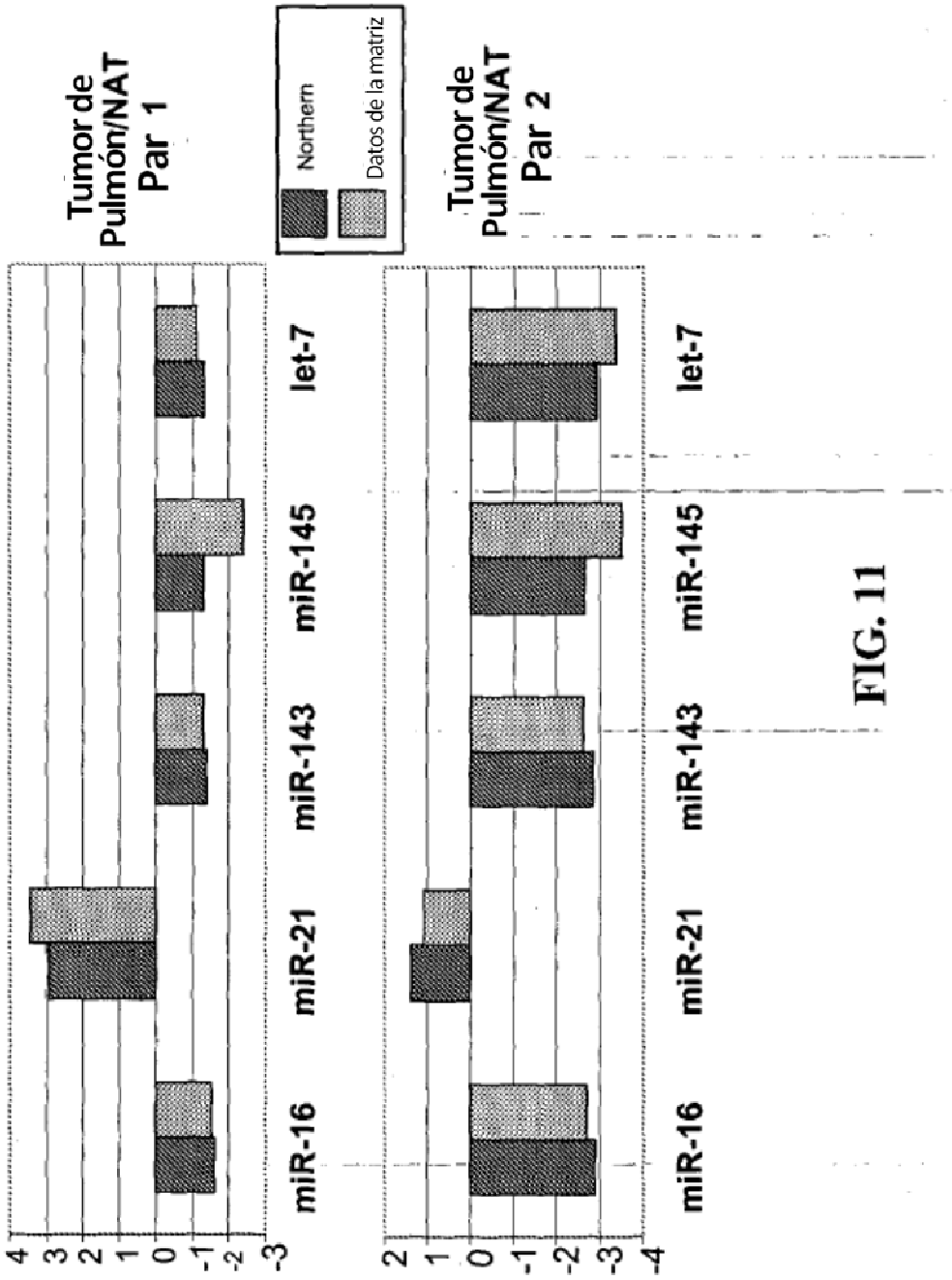

Tumor de Pulmón/NAT Par 1
Northern
Datos de la matriz
Tumor de Pulmón/NAT Par 2
4
3
2
1
0
-1
-2
-3
miR-16
miR-21
miR-143
miR-145
let-7
2
1
0
-1
-2
-3
-4
miR-16
miR-21
miR-143
miR-145
let-7

FIG. 11

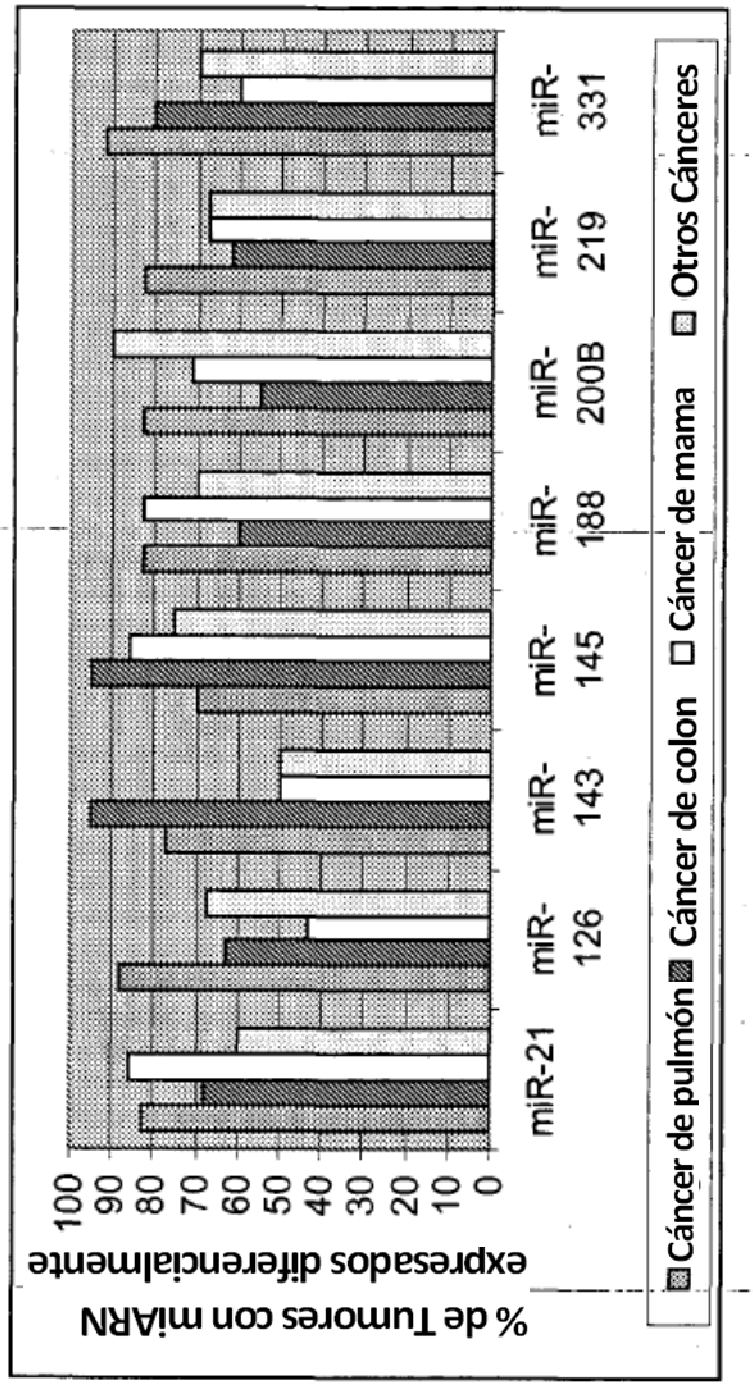

% de Tumores con miARN expresados diferencialmente
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
miR-21
miR-126
miR-143
miR-145
miR-188
miR-200B
miR-219
miR-331
Cáncer de pulmón
Cáncer de colon
Cáncer de mama
Otros Cánceres

FIG. 12

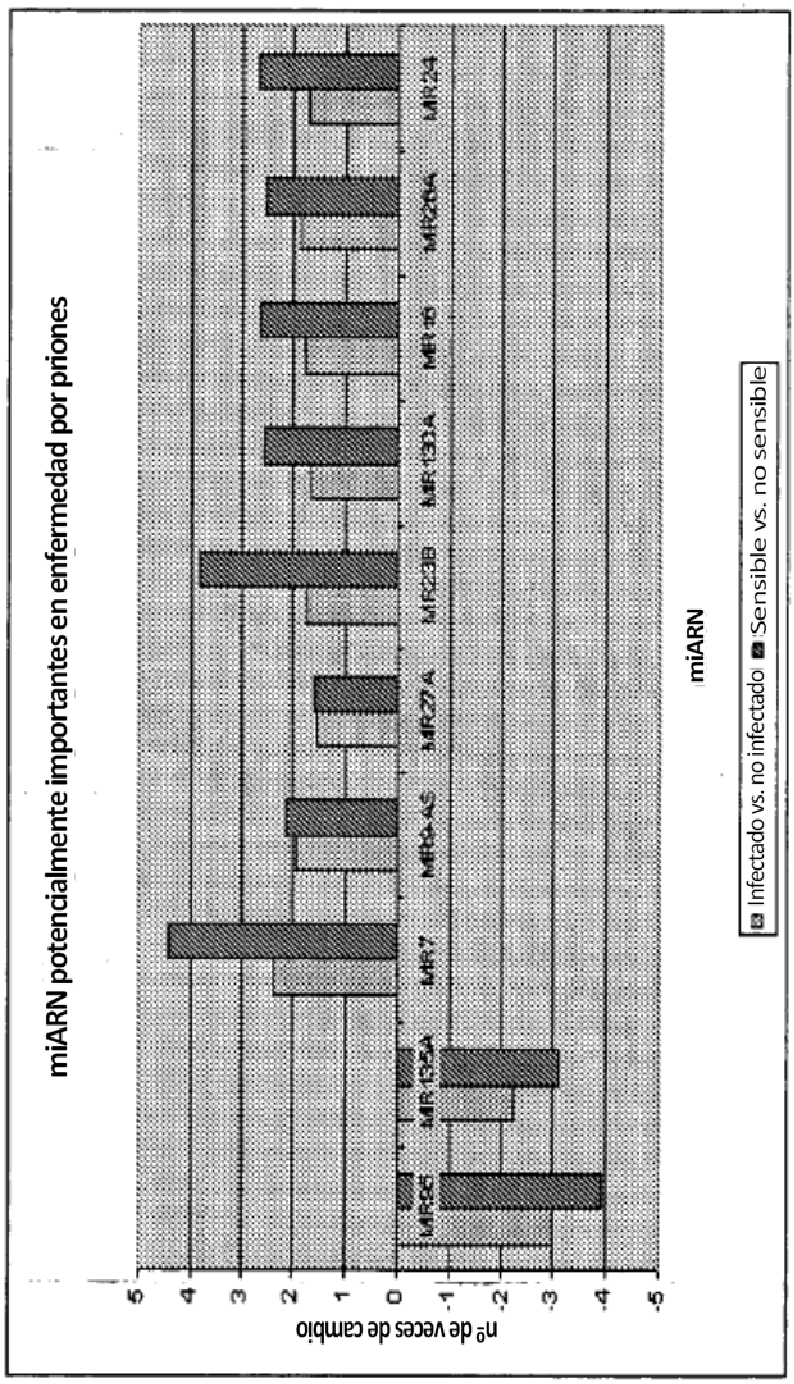

miARN potencialmente importantes en enfermedad por priones
nº de veces de cambio
5
4
3
2
1
0
-1
-2
-3
-4
-5
MR24
MR204
MR15
MR133A
MR223B
MR27A
MR26AS
MR7
MR125A
MR26
miARN
Infectado vs. no infectado
Sensible vs. no sensible

FIG. 13

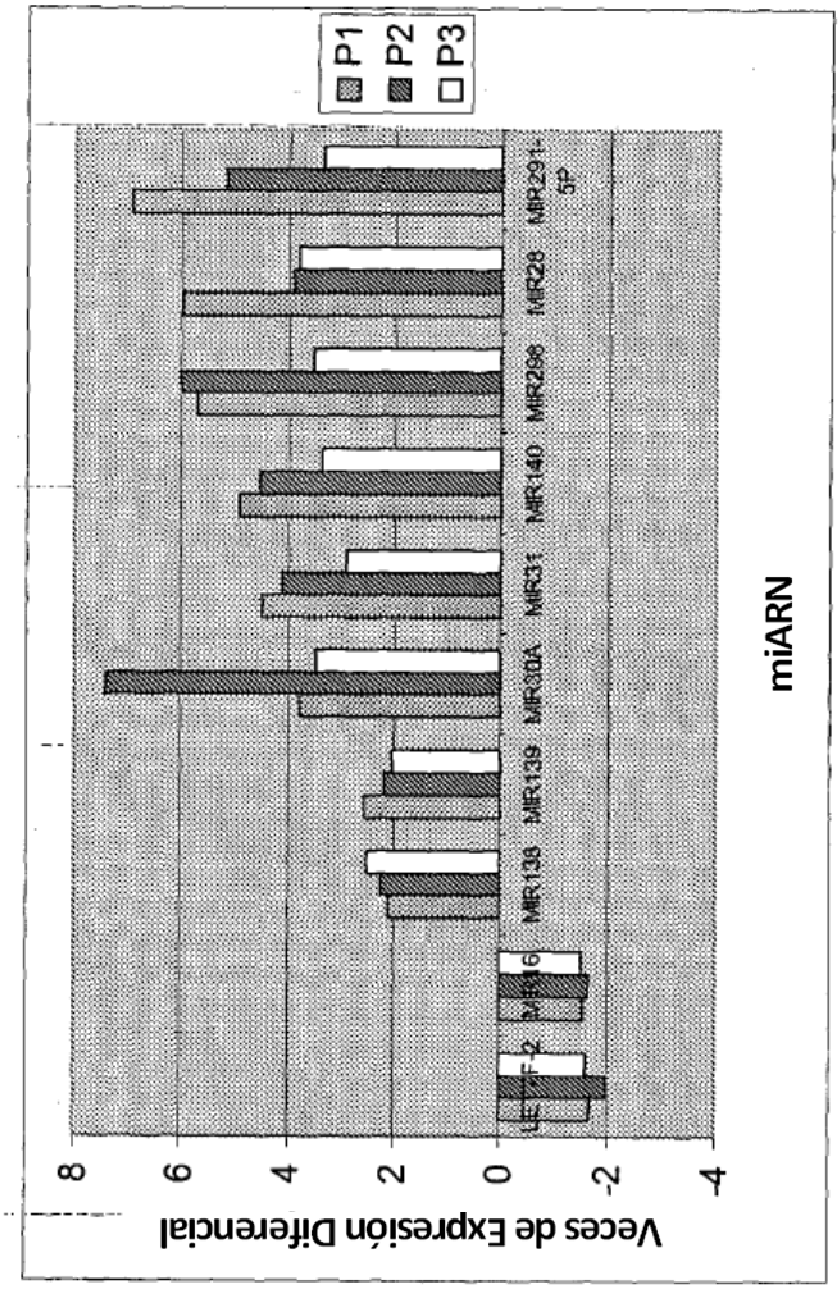

P1
P2
P3
Veces de Expresión Diferencial
8
6
4
2
0
-2
-4
MIR139
MIR30A
MIR31
MIR140
MIR296
MIR28
MIR291-5P
miARN

FIG. 14

Mama BT549			Mama MCF12A			Cuello uterino HeLa			Próstata 22 Rv1		
miARN	% de cont neg	Desv. Estánd	miARN	% de cont neg	Desv. Estánd	miARN	% de cont neg	Desv. Estánd	miARN	% de cont neg	Desv. Estánd
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

Piel TE354T			Piel TE353SK			Células BJ			Pulmón A549		
miARN	% de cont neg	Desv. Estánd	miARN	% de cont neg	Desv. Estánd	miARN	% de cont neg	Desv. Estánd	miARN	% de cont neg	Desv. Estánd
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	mi R-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	mi R-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-181 a	65	23				mir-28	61	0
mir-28	60	18	mir-20	47	41				mir-292-3p	62	0
			mir-206	67	15				mir-29a	67	1
			mir-215	68	11				mir-337	55	0
			mir-223	56	49				mir-344	63	0
			mir-302	63	1				mir-345	69	1
			mir-330	66	59				mir-34a	61	0
			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

Pulmón CRL5826			Pulmón HTB-57			Jurkats			Linfocitos T primarios		
miARN	% de CN	Desv. Estánd	miARN	% de CN	Desv. Estánd	miARN	% de cont neg	Desv. Estánd	miARN	% de cont neg	Desv. Estánd
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
mi r-105	74	11	mir-124	79		miR-101	69	30	miR-135	88	13
mi r-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	mi R-133a	73	18	miR-145	86	12
mir-128	71	13	mir-133A	77	7	miR-17-3p	63	16			
mi r-132	73	18	mi r-136	78	13	miR-29a	68	7			
mir-141	74	5	mir-147	72	4	miR-30a-3p	66	27			
mir-142	67	5	mir-151	67	10	miR-34a	67	21			
mir-147	75	7	mir-152	73	13						
mi r-149	71	9	mir-16	79	6						
mi r-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

Cuello uterino HeLa

miARN	% de cont neg	Desv. Estánd
Let-7a	119	15
Let-7b	124	12
Let-7c	114	21
Let-7d	113	29
Let-7g	114	27
mir-145	111	29
mi r-155	114	17
mir-181a	113	21
mir-186	111	29
mir-190	114	21
mir-191	116	22
mir-199	118	14
mir-9	112	27

Próstata 22 Rv1

miARN	% de cont neg	Desv. Estánd
Let-7a	124	6
Let-7b	127	27
mir-127	127	11
mir-154	123	10
mir-181a	124	11
mir-194	132	16
mir-198	126	10
mir-199	146	18
mir-201	125	24
mir-369	130	9
mir-93	129	16

Piel TE354T

miARN	% de cont neg	Desv. Estánd
mir-412	117	11
mir-141	120	52
mir-143	125	35
mir-145	156	71
mir-146	143	85
mir-188	117	37
mir-190	131	55
mir-198	119	3
mir-204	125	8
mir-410	133	3
mir-139	122	20
mir-412	117	11

Piel TE353SK

miARN	% de cont neg	Desv. Estánd
mir-138	126	7
mir-196	134	7
mir-197	135	8
mir-198	144	4
mir-199	135	9
mir-204	125	6
mir-216	136	13
mir-410	134	7

Células BJ

miARN	% de cont neg	Desv. Estánd
miR-26a	130	17
miR-128	131	24
miR-223	134	14
miR-188	139	19
miR-125a	140	10
miR-201	153	18
miR-291-3p	155	30
miR-145	161	2
miR-294	165	21
miR-150	171	7
miR-322	268	19,93
miR-295	215	40,78
miR-187	246	19
miR-373	212	41,39

Cáncer de Pulmón A549

miARN	% de cont neg	Desv. Estánd
mir-25	112	0
mir-294	112	1
mir-32	121	0
mir-92	122	0

Jurkats

miARN	% de cont neg	Desv. Estánd
miR-100	7	15
miR-125b	134	4
miR-126	132	19
miR-129	134	10
miR-140	150	4
miR-143	139	2
miR-155	162	23
miR-15a	146	12
miR-23b	146	4
miR-25	135	18
miR-26a	154	14

Linfocitos T primarios

miARN	% de cont neg	Desv. Estánd
let-7a	151	17
let-7b	150	14
let-7c	159	4
let-7d	142	10
let-7g	141	7
miR-10a	130	10
miR-10b	127	20
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
miR-7	126	1

CRL5826

miARN	% de CN	Desv. Estánd
mir-130a	126	27
mir-145	112	8
mir-30e-5p	122	11
mir-333	112	35
mir-335	114	33
mir-369	111	8
mir-350	111	5
mir-412	123	14

HTB-57

miARN	% de CN	Desv. Estánd
mir-135	121	8
mir-216	126	7
mir-293	121	4
mir-338	122	14
mir-341	118	22

FIG. 16

Próstata 22Rv1			Piel TE354T			Mama MCF12a			Pulmón A549		
miARN	% CN	Desv. Estánd	miARN	% CN	Desv. Estánd	miARN	% CN	Desv. Estánd.	miARN	% CN	Desv. Estánd.
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

Próstata 22Rv1			Piel TE354T			Mama MCF12a			Pulmón A549		
miARN	% CN	Desv. estánd.	miARN	% CN	Desv. estánd	miARN	% CN	Desv. estánd	miARN	% CN	Desv. estánd
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-206	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

Jurkat			Linfocitos T primarios			HeLa			A549		
Viabilidad celular			Viabilidad celular			Viabilidad celular			Viabilidad celular		
miARN	% CN	% DE	miARN	% CN	% DE	miARN	% CN	% DE	miARN	% CN	% DE
miARN que disminuyen la Viabilidad celular											
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
mi R-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			
miARN que aumentan la Viabilidad celular											
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						
			mi R-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

Próstata 22Rv1			Piel TE354T			Jurkat			HeLa		
miARN sintéticos que Aumentan la Apoptosis											
miARN	% CN	Desv Estánd	miARN	% CN	Desv. Estánd	miARN	% CN	Desv. Estánd	miARN	% CN	Desv. Estánd
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
									let-7b	317	63
									let-7g	607	150
									miR-1	355	47
									miR-10b	404	53
									miR-122	374	61
									miR-17-3p	443	101
									miR-19a	773	70
									miR-28	402	42
miARN sintéticos que Disminuyen 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 agente terapéutico									
miARN	% CN	miARN	% CN	miARN	% CN	miARN	% CN	miARN	% 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 agente 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

G1			S			G2/M			>2N		
miARN	%CN	%DE	miARN	%CN	%DE	miARN	%CN	%DE	miARN	%CN	%DE
let7a	90	22	mir128	46	7	mir128	69	4	mir125a	50	22
mir1	87	12	mir142	49	41	mir146	61	9	mir128	31	29
mir20	67	15	mir146	53	27	mir147	54	12	mir142	59	36
mir206	70	13	mir186	60	8	mir15a	71	20	mir146	40	45
mir21	57	8	mir187	60	15	mir195	62	7	mir16	49	21
mir26a	82	5	mir195	54	0	mir371	56	5	mir191	56	40
mir290	85	2	mir297	54	22				mir201	59	27
mir294	84	17	mir324-3p	60	13				mir224	53	17
mir373	76	8	mir337	54	17				mir324-3p	46	33
			mir376b	57	17				mir92	41	20
mir125a	120	3	let7a	117	14	mir145	145	10	mir1	171	9
mir128	150	2	mir15a	112	10	mir187	140	3	mir21	205	22
mir142	133	10	mir16	124	17	mir20	151	7	mir337	191	27
mir146	148	5	mir191	113	21	mir21	169	4	mir345	172	10
mir147	126	6	mir20	116	13	mir223	131	11	mir373	174	18
mir195	131	2	mir224	125	6	mir26a	138	4			
mir201	122	6	mir26a	113	6	mir294	135	13			
mir297	125	8	mir290	117	8	mir373	146	4			
mir320	124	2	mir345	119	32						
mir324-3p	130	4									
mir325	128	4									
mir371	135	2									
mir376b	133	2									
mir409	129	11									

HeLa Pre-miR

G1			S			G2/M		
miARN	%CN	%DE	miARN	%CN	%DE	miARN	%CN	%DE
mir-1	43,5	3,3	mir-108	76,6	1,1	mir-122	38,6	7,2
mir-192	44,1	1,4	mir-122	66,3	1,7	mir-124	58,4	10,4
mir-193	32,1	1,4	mir-129	75,3	0,6	mir-126	55,7	13,5
mir-206	27,4	2,6	mir-137	62,8	1,7	mir-129	66,0	4,9
mir-220	29,3	1 9	mir-147	76,8	3,3	mir-137	46,1	13,1
mir-329	38,0	0,5	mir-324-3p	71,7	0,4	mir-147	60,0	4,0
mir-371	47,0	3,6	mir-337	64,3	3,9	mir-18	62,5	12,2
mir-409	38,9	3,6				mir-219	64,2	1,9
mir-7d	57,0	0,5				mir-337	66,7	1,0
mir-108	143,9	07	mir-197	163,8	1,7	mir-1	161,2	1,9
mir-122	171,7	03	mir-205	163,7	0,9	mir-192	171,9	4,5
mir-124	150,0	02	mir-220	170,9	0,7	mir-193	185,3	5,9
mir-126	153 6	03	mir-290	167,2	1,4	mir-206	187,9	7,1
mir-129	145,1	03	mir-291	200,5	0,9	mir-215	147,5	2,7
mir-137	165,9	02	mir-294	164,6	1,1	mir-220	170,1	3,9
mir-147	150,1	04	mir-295	188,2	0,9	mir-329	171,5	1,2
mir-337	147,2	04	mir-302	214,6	1,7	mir-371	171,6	3,0
			mir-372	203,3	0,8	mir-409	169,7	7,6
			mir-411	168,8	0,9	mir-7a	154,6	4,7
						mir-7d	159,1	2,8
						mir-7g	160,8	3,0

FIG. 22

miARN	secuencia	Proliferación A549 (% NC)	Proliferación Jurkats (%CN)
let-7a	ugagguaguagguuguauaguu	119	21
let-7b	ugagguaguagguugugugguu	124	50
let-7c	ugagguaguagguuguaugguu	114	85
let-7d	agagguaguagguugcauagu	113	97
let-7g	ugagguaguaguuuguacagu	114	105

FIG. 23

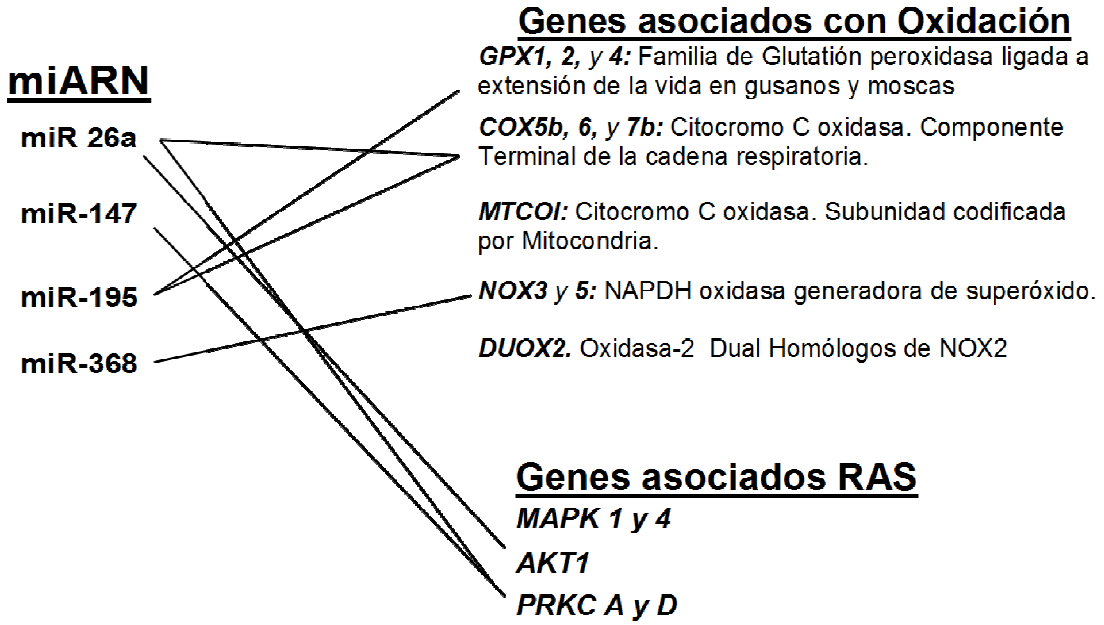

miARN
miR 26a
miR-147
miR-195
miR-368
Genes asociados con Oxidación
GPX1, 2, y 4: Familia de Glutatión peroxidasa ligada a extensión de la vida en gusanos y moscas
COX5b, 6, y 7b: Citocromo C oxidasa. Componente Terminal de la cadena respiratoria.
MTCOI: Citocromo C oxidasa. Subunidad codificada por Mitocondria.
NOX3 y 5: NAPDH oxidasa generadora de superóxido.
DUOX2. Oxidasa-2 Dual Homólogos de NOX2
Genes asociados RAS
MAPK 1 y 4
AKT1
PRKC A y D

FIG. 24