

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 304**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/11 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2005 E 10183596 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2302056**

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

30 Prioridad:

12.11.2004 US 627171 P

03.02.2005 US 649634 P

23.05.2005 US 683736 P

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

21.04.2015

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 534 304 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos y composiciones que implican miARN y moléculas inhibidoras de miARN

1. Campo de la invención

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

2. Descripción de la técnica relacionada

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

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

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

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

Hay algunos ejemplos de miARN que desempeñan papeles críticos en la diferenciación celular, desarrollo temprano y procesos celulares como apoptosis y metabolismo de grasas. *lin-4* y *let-7* regulan ambos el paso de un estado larvario a otro durante el desarrollo de *C. elegans* (Ambros, 2003). *Mir-14* y *bantam* son miARN de *Drosophila* que regulan la muerte celular, aparentemente regulando la expresión de genes implicados en la apoptosis (Brennecke y col., 2003; Xu y col., 2003). El miR14 también se ha implicado en el metabolismo de grasas (Xu y col., 2003). *Lsy-6* y *miR-273* son miARN de *C. elegans* que regulan la simetría en neuronas quimiosensoriales (Chang y col., 2004). Otro miARN animal que regula la diferenciación celular es miR-181, que guía la diferenciación de células hematopoyéticas (Chen y col., 2004). Estas moléculas representan la serie completa de miARN animales con funciones conocidas. Además, Lagos-Quintana y col. Science (2001) 294:853-858 desvela el miARN miR-29. El entendimiento potenciado de las funciones de miARN revelará sin duda redes reguladoras que contribuyan al desarrollo normal, diferenciación, comunicación inter e intracelular, ciclo celular, angiogénesis, apoptosis y muchos otros procesos celulares. Dados sus papeles importantes en muchas funciones biológicas, es probable que los miARN ofrezcan puntos importantes para intervención terapéutica o análisis de diagnóstico.

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

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

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

5 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico de miARN sintética que comprende una secuencia con al menos 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de miR-29 humana madura para su uso como un medicamento, incluyendo para usos en una terapia de un cáncer. También se proporciona un ácido nucleico de miARN sintético bicatenario de 17-30 nucleótidos de longitud que comprende un polinucleótido que tiene una secuencia con al menos 80 % de identidad de secuencia con una secuencia de miR-34a madura que comprende los nucleótidos 41-62 de SEC ID N°: 45, nucleótidos 51-70 de SEC ID N°:46, nucleótidos 52-71 de SEC ID N°:47 y nucleótidos 54-75 y SEC ID N°:48 y un segundo polinucleótido separado cuya secuencia de 5' a 3' es entre 60 % y 100 % complementaria del primer polinucleótido para su uso como un medicamento.

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

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

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

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

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

identificado en el apéndice que se dirige al miARN particular (o conjunto de miARN) que puede usarse con esa secuencia sonda.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Los procedimientos incluyen identificar una célula o un paciente que necesite la inducción de esas características celulares. Además, se entenderá que una cantidad de un ácido nucleico sintético que se proporciona a una célula u

organismo es una “cantidad eficaz”, lo que se refiere a una cantidad necesaria para conseguir un objetivo deseado, tal como inducir una característica o características celulares particulares.

En ciertas realizaciones, los procedimientos incluyen proporcionar o introducir a una célula una molécula de ácido nucleico correspondiente a un miARN maduro en la célula en una cantidad eficaz para conseguir un resultado fisiológico deseado. Dichos procedimientos se desvelan en el presente documento. En estos procedimientos diferentes, el miARN correspondiente implicado en el procedimiento puede ser uno o más de al menos los siguientes: miR-29a y miR-29b.

En otras realizaciones, los procedimientos implican reducir la viabilidad celular, inducir la apoptosis en una célula, o reducir la proliferación celular, a condición de que se excluyan los procedimientos para el tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia, que comprende introducir en o proporcionar a la célula una cantidad eficaz de una molécula de miARN sintética que corresponde a miR-29a. La presente invención también se refiere a un procedimiento para inducir la apoptosis en una célula, a condición de que el procedimiento para el tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia se excluyan, que comprende introducir en o proporcionar a la célula una cantidad eficaz de una molécula de miARN sintético miR-29a. La presente invención también se refiere a usar composiciones de miARN que implican miR-29b para su uso en el tratamiento de cáncer, incluyendo cáncer de tiroides, pulmón, o leucemia. También se contemplan uno o más miARN humanos adicionales seleccionados del grupo que consiste en let-7, miR-10a, miR-15a, miR-16, miR-17, miR-21, miR-22, miR-23, miR-24, miR-26a, miR-30a, miR-96, miR-101, miR-105, miR-106, miR-124, miR-125a, miR-126, miR-130, miR-130a, miR-133, miR-142, miR-143, miR-144, miR-145, miR-147, miR-181a, miR-182, miR-183, miR-188, miR-189, miR-192, miR-194, miR-195, miR-199a, miR-200b, miR-201, miR-205, miR-219, 206, miR-215, miR-219, miR-223, miR-224, miR-321, miR-328, miR-331, miR-342, miR-219 y miR-346. Se contempla que 1, 2, 3 o más miARN pueden usarse para estas realizaciones. El cáncer incluye, pero sin limitación, cánceres malignos, tumores, cánceres metastásicos, cánceres no resecables, cánceres resistentes a quimioterapia y/o radiación, y cánceres terminales.

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

La presente invención se refiere a un ácido nucleico de miARN sintético para su uso en el tratamiento de la leucemia o reducción de la proliferación celular de linfocitos T cancerosos (leucemia) lo que implica, por ejemplo, proporcionar una cantidad eficaz de miR-29a.

En ciertos experimentos, un miARN en el que las cadenas tanto con sentido como antisentido derivan de un único miARN precursor en procedimientos y composiciones de la invención. Estos se designan frecuentemente con un sufijo “P” en el que “5P” indica que el miARN maduro deriva del extremo 5’ del precursor y un “3P” correspondiente indica que deriva del extremo 3’ del precursor, como se describe en la web en sanger.ac.uk/cgi-bin/lfam/miARN. Además, en algunas realizaciones, se evaluó un miARN que no corresponde a un miARN humano conocido. Se contempla que estos miARN no humanos pueden usarse en realizaciones de la invención o que puede existir un miARN humano que sea homólogo del miARN no humano.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Breve descripción de los dibujos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Descripción de realizaciones ilustrativas

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

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

I. Moléculas de miARN

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

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

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

miARN sintéticos

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

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

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

Dos diseños incorporan modificaciones químicas en la cadena complementaria. La primera modificación implica crear un ARN complementario con un grupo químico distinto de un fosfato o hidroxilo en su extremo 5' terminal. La presencia de la modificación 5' elimina aparentemente la captación de la cadena complementaria y favorece posteriormente la captación de la cadena activa por el complejo proteico de miARN. La modificación 5' puede ser cualquiera de una diversidad de moléculas incluyendo NH₂, NHCOCH₃, biotina y otras.

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

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

A. Ácidos nucleicos

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

Tabla 1

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

(continuación)

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

(continuación)

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

(continuación)

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

ES 2 534 304 T3

(continuación)

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

ES 2 534 304 T3

(continuación)

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

ES 2 534 304 T3

(continuación)

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

ES 2 534 304 T3

(continuación)

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

ES 2 534 304 T3

(continuación)

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

(continuación)

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

(continuación)

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

Tabla 2

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

(continuación)

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

(continuación)

Secuencias de miARN de ratón		
Nombre del miARN	Precursor	Secuencia Procesada en Relación con el Precursor
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

(continuación)

Secuencias de miARN de ratón		
Nombre del miARN	Precursor	Secuencia Procesada en Relación con el Precursor
mmu-mir-107	SEC ID Nº: 267	52-74
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

(continuación)

Secuencias de miARN de ratón		
Nombre del miARN	Precursor	Secuencia Procesada en Relación con el Precursor
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
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

(continuación)

Secuencias de miARN de ratón		
Nombre del miARN	Precursor	Secuencia Procesada en Relación con el Precursor
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
mmu-mir-202	SEC ID Nº: 338	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

(continuación)

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

(continuación)

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

(continuación)

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

Tabla 3

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

(continuación)

Secuencias de miARN de rata		
Nombre del miARN	Precursor	Secuencia Procesada en Relación con el Precursor
rno-mir-21	SEC ID N°: 420	18-39
rno-mir-22	SEC ID N°: 421	57-78
rno-mir-23a	SEC ID N°: 422	46-66
rno-mir-23b	SEC ID N°: 423	58-80
rno-mir-24-1	SEC ID N°: 424	44-65
rno-mir-24-2	SEC ID N°: 425	61-82
rno-mir-25	SEC ID N°: 426	52-73
rno-mir-26a	SEC ID N°: 427	16-37
rno-mir-26b	SEC ID N°: 428	15-36
rno-mir-27b	SEC ID N°: 429	61-80
rno-mir-27a	SEC ID N°: 430	56-76
rno-mir-28	SEC ID N°: 431	14-35
rno-mir-29b-2	SEC ID N°: 432	52-73
rno-mir-29a	SEC ID N°: 433	53-74
rno-mir-29b-1	SEC ID N°: 434	51-72
rno-mir-29c	SEC ID N°: 435	54-75
rno-mir-30c-1	SEC ID N°: 436	17-39
rno-mir-30e	SEC ID N°: 437	2-21
rno-mir-30b	SEC ID N°: 438	16-36
rno-mir-30d	SEC ID N°: 439	12-33
rno-mir-30a	SEC ID N°: 440	47-68
rno-mir-30c-2	SEC ID N°: 441	14-36
rno-mir-31	SEC ID N°: 442	28-49
rno-mir-32	SEC ID N°: 443	6-26
rno-mir-33	SEC ID N°: 444	6-24
rno-mir-34b	SEC ID N°: 445	13-35
rno-mir-34c	SEC ID N°: 446	13-35
rno-mir-34a	SEC ID N°: 447	20-42
rno-mir-92-1	SEC ID N°: 448	48-68
rno-mir-92-2	SEC ID N°: 449	55-75
rno-mir-93	SEC ID N°: 450	15-37

(continuación)

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

(continuación)

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

(continuación)

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

(continuación)

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

(continuación)

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

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

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

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

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

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

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

1. Bases nitrogenadas

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

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

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

2. Nucleósidos

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

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

3. Nucleótidos

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

4. Análogos de ácido nucleico

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

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

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

El uso de otros análogos se contempla específicamente para su uso en el contexto de la presente invención. Dichos análogos pueden usarse en moléculas de ácido nucleico sintéticas de la invención, tanto mediante la molécula como en nucleótidos seleccionados. Incluyen, pero sin limitación, 1) modificaciones de ribosa (tales como 2'F, 2'NH₂, 2'N₃, 4'tio o 2' O-CH₃) y 2) modificaciones de fosfato (tales como las halladas en fosforotioatos, metil fosfonatos, y fosforoboratos). Dichos análogos se han creado para conferir estabilidad en ARN reduciendo o eliminando su capacidad para escindirse por ribonucleasas. Cuando estos análogos de nucleótidos están presentes en ARN, pueden tener efectos profundamente positivos en la estabilidad de los ARN en animales. Se contempla que el uso de análogos de nucleótidos puede usarse solo o junto con cualquiera de las modificaciones de diseño de un miARN sintético de cualquier ácido nucleico de la invención.

50 **5. Nucleótidos modificados**

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

60

B. Preparación de ácidos nucleicos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

C. Diseño de miARN sintéticos

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

Agente de bloqueo 5'. La introducción de un resto estable distinto de fosfato o hidroxilo en el extremo 5' de la cadena complementaria altera su actividad en la ruta de miARN. Esto asegura que solamente la cadena activa del miARN sintético se usará para regular la traducción en la célula. Las modificaciones 5' incluyen, pero sin limitación, NH₂, biotina, un grupo amina, un grupo alquilamina inferior, un grupo acetilo, 2'-O-Me, DMTO, fluoresceína, un tiol o acridina o cualquier otro grupo con este tipo de funcionalidad.

Otras modificaciones de cadena con sentido. La introducción de modificaciones de nucleótidos como 2'-OMe, NH₂, biotina, un grupo amina, 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 potenciar la captación de la cadena activa del miARN.

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

E. Marcadores y etiquetas

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

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

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

F. Procedimientos de suministro

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

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

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

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

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

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

B. Suministro de miARN sintéticos

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

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

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

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

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

1. Nucleótidos para marcar

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

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

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

2. Técnicas de marcaje

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

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

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

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

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

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

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

3. Marcadores

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

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

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

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

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

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

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

4. Técnicas de visualización

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

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

III. Aplicaciones terapéuticas

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

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

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

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

A. Modos de administración y formulaciones

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

B. Dosificaciones eficaces

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

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

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

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

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

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

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

C. Toxicidad

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

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

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

D. Grupos colgantes

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

Ejemplos

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

Ejemplo 1:

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

Se creó una serie de vectores indicadores de luciferasa para medir las actividades de miARN sintéticos en células. Los vectores indicadores se basaron en plásmidos que se habían usado para controlar la actividad de miARN endógenos (artículo de Tuschl). Brevemente, se creó un vector de expresión de mamífero con el gen de luciferasa bajo el control del promotor temprano del CMV. Cadena abajo de la secuencia codificante de luciferasa, en la 3' UTR del gen, se añadieron secuencias complementarias de miR-1-2, miR-10, miR-124, miR-19a y miR-130 maduros. Los
 25 vectores indicadores se cotransfectaron a células HeLa junto con miARN sintéticos diseñados para introducir uno de los cinco miARN enumerados anteriormente. Las transfecciones implicaron mezclar 200 ng de vector indicador con 0,3, 1 y 3 pmoles de cada miARN sintético correspondiente. La mezcla de indicador/miARN se mezcló con 0,3 µl de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) y se incubó durante 5-15 minutos. Se añadieron aproximadamente 8.000 células a cada complejo de miARN/indicador/reactivo de transfección en pocillos individuales de una placa de 96 pocillos. Se
 30 cultivaron células HeLa en D-MEM (GIBCO) complementado con suero bovino fetal al 10 % (GIBCO) a 37 °C y CO₂ al 5 %. 24-48 h después de la transfección, las células se recogieron y se ensayaron usando el ensayo de Luciferasa como se ha descrito por el fabricante (Promega). El nivel de la expresión de luciferasa en las poblaciones celulares se comparó con células transfectadas con el mismo indicador pero un miARN sintético con una secuencia que no
 35 corresponde al vector. Este miARN no de dirección se denominó el miARN de control negativo.

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

45 **Ejemplo 2:**

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

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

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

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

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

15 **Ejemplo 3:**

Eficacia de miARN parcialmente complementarios

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

miR-1-2

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

35 **mir-124a-1**

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

miR-130a

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

miR-19a

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

UGUGCAAUCUAUGCAAACUGA

(SEC ID N°: 615)

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

5 **mmu-miR-10a-1 (ratón)**

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

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

UACCCUGUAGAUCGAAUUUGUG (SEC ID N°: 619)

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

UACCCUGUAGAUCGAAUUUGUG (SEC ID N°: 621)

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

UACCCUGUAGAUCGAAUUUGUG (SEC ID N°: 623)

miR-33

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

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

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

GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (SEC ID N°: 627)

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

20 **let-7b**

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

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

UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (SEC ID N°: 631)

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

UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (SEC ID N°: 633)

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

UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (SEC ID N°: 635)

miR-196-2

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

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

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

UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGG (SEC ID N°: 639)

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

UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGG (SEC ID N°: 641)

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

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

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

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

Aunque el diseño del ARNip demostró ser problemático porque mostraba una alta tasa de captación de cadena complementaria por la ruta del miARN, tenía la ventaja de que era fácil de hibridar y fácil de suministrar a las células. Por estas razones, se exploraron maneras de superar los problemas con la captación de cadena complementaria. Se usó el diseño de ARNip para ensayar los efectos de modificaciones químicas de los extremos 5' de los miARN sintéticos. Para estos estudios, se sintetizaron varias cadenas complementarias diferentes con extremos 5' únicos. Una presentaba cuatro nucleótidos de desoxirribosa en el extremo 5'; una era una combinación de cuatro nucleótidos de desoxirribosa en el extremo 5' y un 5'NH₂; una tenía un 5'NH₂; una tenía un 5'NHCOCH₃ (véase posteriormente).

miR-33

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

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

diseño de amino 5' = (NH₂)AUGCAACUACAAUGCACTT (SEC ID N°: 644) + GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (SEC ID N°: 645)

diseño de acetilo 5' = (CH₃OCNH)AUGCAACUACAAUGCACTT (SEC ID N°: 646) + GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (SEC ID N°: 647)

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

diseño de ADN de amino 5' = (NH₂)dAdUdGdCAACUACAAUGCACTT (SEC ID N°: 650) + GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (SEC ID N°: 651)

let-7b

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

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

diseño de amino 5' = NH₂CCACACAACCUACUACCUCATT (SEC ID N°: 654) + UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (SEC ID N°: 655)

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

diseño de ADN de amino 5' = NH₂dCdCdAdCACAACCUACUACCUCATT (SEC ID N°: 658) + UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (SEC ID N°: 659)

miR-1-2

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

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

diseño de amino 5' = NH₂CAUACUUCUUUACAUUCCATT (SEC ID N°: 662) + UGGA AUGUAAAGAAGUAUGUA (SEC ID N°: 663)

miR-124a-1

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

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

diseño de amino 5' = NH₂GCAUUCACCGCGUGCCUUAATT (SEC ID N°: 666) + UUAAGGCACGCGUGAAUGCCA (SEC ID N°: 667)

miR-130a

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

diseño de ARNip = CCUUUUACA AUUGCACUGTT (SEC ID N°: 668) + CAGUGCAAUGUAAAAGGGC (SEC ID N°: 669)

diseño de amino 5' = NH₂ CCUUUUACA AUUGCACUGTT (SEC ID N°: 670) + CAGUGCAAUGUAAAAGGGC (SEC ID N°: 671)

miR-10a-I

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

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

diseño de amino 5' = NH₂CAAAUUCGGAUCUACAGGGUATT (SEC ID N°: 674) + UACCCUGUAGAUCGAAUUUGUG (SEC ID N°: 675)

Los miARN sintéticos miR-33 y let-7b se co-transfectaron en células HeLa y HepG2, respectivamente, con vectores indicadores que portaban sitios diana para las cadenas activa y complementaria de miR-33 y let-7b como se describe en el Ejemplo 1. La expresión de luciferasa de los vectores indicadores específicos de cadena activa y complementaria se midió de acuerdo con el protocolo del fabricante (Promega). Como se muestra en la Figura 3, los diseños de miARN sintético con el 5'NH₂ y 5'NHCOCH₃ proporcionaron actividad de cadena activa mayor y actividad de cadena complementaria significativamente reducida a los miARN sintéticos, no modificados. Esto es ideal para miARN sintéticos ya que los efectos vistos después de la transfección serán específicos de la actividad de la cadena activa del miARN sintético. Además, la alta eficacia de los diseños modificados en 5' permitirá usar menores concentraciones para transfecciones y reducir la toxicidad que se observa con frecuencia cuando se transfectan células con cantidades mayor de ácido nucleico.

Para confirmar que la modificación amino 5' es superior al diseño de ARNip convencional para un amplio conjunto de miARN sintéticos, se midió la eficacia de ambos diseños de miARN sintéticos en células co-transfectadas con vectores indicadores con sitios diana de miARN. Como se ve en la FIG. 4, el 5' NH₂ es reproduciblemente superior al diseño de ARNip no modificado.

Ejemplo 5:

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

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

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

Ejemplo 6:

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

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

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

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

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

5

Tabla 4. MiARN que afectan a la proliferación celular

miARN	Impacto relativo en 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

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

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

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

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

Ejemplo 8

Criba con respecto a miARN que influye en la viabilidad celular

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

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

Tabla 5. MiARN que afectan a la viabilidad celular

miARN	Impacto relativo en la viabilidad celular
miR-7	Reducción
miR-19a	Reducción
miR-23	Reducción
miR-24	Reducción

40

(continuación)

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

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

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

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

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

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

Tabla 6. MiARN que afectan a la apoptosis

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

(continuación)

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

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

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

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

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

Expresión de miARN en el cáncer de pulmón

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

Expresión de miARN en cáncer de colon

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

miARN como marcadores de cáncer

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

miARN como reguladores de la expresión oncogénica

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

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

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

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

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

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

Ejemplo 12

Medición del efecto de los miARN en la expresión oncogénica

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

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

con el modelo de que el miARN regula la expresión de los dos oncogenes. Estos datos sugieren que la desregulación de un miARN clave podría participar en la progresión del cáncer no consiguiendo regular la expresión de uno o más oncogenes.

Ejemplo 13:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(continuación)

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

	Células Totales	Desv. típica
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. típica
miR-193	92,4	2,5
miR-224	92,5	1,4
miR-96	92,6	0,1
miR-346	93,9	1,6
mmu-miR-293	94,9	0,7
miR-34a	95	0,2
miR-216	95,1	1,0
mmu-miR-380	95,2	0,8
miR-182	95,6	0,8
miR-301	95,6	1,0
mmu-miR-344	95,8	0,2
mmu-miR-409	95,8	0,6
miR-369	95,9	0,7

TABLA13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(continuación)

miARN que reducen significativamente la viabilidad celular en linfocitos

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

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

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

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

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

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

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

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

TABLA 20
miARN que aumentan significativamente el porcentaje de células apoptóticas

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

5

TABLA 21
miARN que reducen significativamente el porcentaje de células apoptóticas

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

Ejemplo 15:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(continuación)

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

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

TABLA 25

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

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

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

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

Ejemplo 16:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tabla 29
miARN comunes y de proliferación

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

(continuación)

miARN	n° de positivos
miR-96	5
miR-105	5
miR-142	5
miR-215	5
miR-346	4
miR-206	4
miR-192	4
miR-194	4

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

Tabla 30

Mama

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

Piel

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

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

Ejemplo 17:**10 Cribas de biblioteca de inhibidores de miARN identifican miARN que influyen en la proliferación celular**

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

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

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

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

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

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

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

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

Ejemplo 18:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tabla 31

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ejemplo 23:

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

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

Las células BJ son fibroblastos de prepucio normales que carecen de ARNm de hTert y actividad telomerasa. Las células BJ se tripsinizaron y se diluyeron a 13.000 células/ml en medio de crecimiento normal. Se diluyeron 0,3 µl de agente lipofectamine 2000 en 40 µl de OPTIMEM y se incubaron durante cinco minutos. El reactivo de transfección diluido se añadió a los pocillos de placas de 96 pocillos que contenían 151 miARN sintéticos así como dos miARN sintéticos de control negativo diferentes. Cada pocillo albergaba un miARN sintético diferente. Los miARN sintéticos y agentes de transfección se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y después se añadieron 200 µl (2.600 células) sobre el complejo de lípido/miARN. Las células se colocaron en un incubador y el ARN se aisló 72 horas después. El ARN se aisló de las células en cada pocillo usando el protocolo convencional del kit de Aislamiento de ARN Total RNAqueous™-MagMAX96 (Cat nº 1830) (lisado de células en pocillos). Se realizó transcripción inversa usando la reacción RETROscript añadiendo 11 µl de ARN total (20-100 ng/µl) a 1 µl de decámeros aleatorios y se incubó en un baño de agua a 70 °C durante 3 minutos, después se colocó en hielo. A continuación 8 µl del cóctel que contenía 3,8 µl de agua sin Nuc, 2,0 µl de tampón de Transcripción Inversa 10X, 2,0 µl de dNTP 2,5 mM, Proteína Inhibidora de RNasa (40 U/µl), 0,1 µl de MMLV-RT (100 U/µl) y se incubó a 42 °C durante 1 hora, después 92 °C durante 10 minutos.

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

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

Tabla 33
Activadores de miARN de hTert

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

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

Tabla 34
Activadores del gen de hTert

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

Ejemplo 24:

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

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

REFERENCIAS

- Agrawal y Zamecnik, *Nucleic Acids Research*, 18(18): 5419-5423, 1990.
- Allen y col., *Biochemistry*, 28: 4601-4607, 1989.
- 5 Ambros, *Cell*, 107(7): 823-826, 2001.
- Baglioni y Nilson, *Interferon*, 5: 23-42, 1983.
- Bayer y Wilchek, *Methods of Biochemical Analysis*, 26: 1-45, 1980.
- Bayer y col., *Analytical Biochemistry*, 149: 529-536, 1985.
- Beaucage, y Lyer, *Tetrahedron*, 48: 2223-2311, 1992.
- Bernstein y col., *Nature*, 409: 363-366, 2001.
- 10 Bijsterbosch y col., *Biochem. Pharmacol*, 62(5): 627-633, 2001.
- Blaekie y col., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 12(18): 2603-2606, 2002.
- Bobo y col., *En: Diagnosis of Chlamydia trachomatis Cervical Infection by Detection of Amplified DNA with an Enzyme Immunoassay*, 1990.
- Borlakoglu y col., *Biochem. Pharmacol*, 40(2): 265-272, 1990.
- 15 Boshier 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. Act. USA*, 99: 15524-15529, 2002.
- 20 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.
- 25 Chen y col., *Science*, 303(5654): 83-86, 2004.
- Cogoni, C., y Macino, *Science*, 286: 342-2344, 1999.
- Cogoni. y Macino, *Nature* 399: 166-169, 1999.
- Conway y col., *Nucleic Acids Res. Symposium Series*, 21: 43-44, 1989.
- Crooke, *En: Antisense Drug Technology*, Marcel Dekker y Co, Basilea, Suiza, Capítulo 6, 2001.
- 30 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.
- 35 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.
- 40 Draper y Gold, *Biochemistry*, 19: 1774-1781, 1980.
- Elbashir y col., *Nature*, 411: 494-498, 2001.
- Emptage y col.: *Neuron*, ene 2001; 29(1): 197-208, 2001.
- Fechheimer y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 8463-8467, 1987.
- 45 Fire y col., *Nature*, 391: 806-811, 1998.
- Forster y col., *Nucleic Acids Res.*, 13(3): 745-761, 1985.
- Fraley y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 3348-3352, 1979.
- Froehler y col., *Nucleic Acids Res.*, 14(13): 5399-5407, 1986.
- Gillam y col., *J. Biol. Chem.*, 253: 2532, 1978.
- Gillam y col., *Nucleic Acids Res.*, 6: 2973, 1979.
- 50 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.
- 55 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.
- 60 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.
- 65 Jablonski y col., *Nucleic Acids Res.*, 14(15): 6115-6128, 1986.

- Kaeppeler 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.
 5 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.
 10 Klostermeier y Millar, *Biopolymers*, 61(3): 159-79, 2001-2002
 Knight y col., *Science*, 2: 2, 2001.
 Kornberg y Baker, En: *DNA Replication*, 2ª Ed., Freeman, San Francisco, 1992.
 Kuhnast y col., *Bioconjug Chem*, 5: 627-636, 2000.
 Lagos-Quintana y col., *Science*, 294(5543): 853-858, 2001.
 15 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.
 20 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.
 25 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.
 30 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.
 35 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.
 40 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.
 45 Reisfeld y col., *Biochem. Biophysics Res. Comm.*, 142(2): 519-526, 1987.
 Richardson y Gumpert, *Nucleic Acids Res.*, 11(18): 6167-84, 1983.
 Richardson y Macy, *Biochemistry*, 20(5): 1133-9, 1981.
 Rippe y col., *Mol. Cell Biol.*, 10: 689-695, 1990.
 Roychoudhury y Kossel, *Eur. J. Biochem.*, 22(3): 310-20, 1971.
 50 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
 55 Spring Harbor, NY, 2003.
 Sambrook y col., En: *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold
 Spring Harbor, NY, 1989.
 Sambrook y col., En: *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold
 Spring Harbor, NY, 2001.
 60 Scheit, En: *Synthesis and Biological Function*, Wiley-Interscience, Nueva York, 171-172, 1980.
 Schwarze y col., *Trends in Cell Biol.*, 10: 290-295, 2000.
 Sedelnikova y col., *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 6: 443-452, 2000.
 Seggerson y col., *Dev. Biol.*, 243: 215, 2002.
 Sharp y Zamore, *Science*, 287: 2431-2433, 2000.
 65 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.
 5 Tabara y col., Cell, 99: 123-132, 1999.
 Takeda y 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.
 10 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.
 15 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 y col., Eur. J. Pharm. Sci., 3: 179-186, 2000.
 Wu-Scharf y col., Science, 290: 1159-1162, 2000.
 20 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.
 25 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.
- 30 LISTADO DE SECUENCIAS
- <110> ASURAGEN, INC.
- <120> PROCEDIEMIENTOS Y COMPOSICIONES QUE IMPLICAN MOLÉCULAS DE MIARN MODIFICADAS Y
 MOLÉCULAS INHIBIDORAS DE MIARN
- <130> R57215
- 35 <140> DESCONOCIDO
 <141> 14-11-2005
- <150> 60/683.736
 <151> 23-05-2005
- 40 <150> 60/649.634
 <151> 03-02-2005
- <150> 60/627.171
 45 <151> 12-11-2004
- <160> 803
- <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
 50 <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
5 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

ugggaaacau acuucuuuau augcccauau ggaccugcua agcuauaggaa uguaaagaag 60
uauguaucuc a 71

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

<400> 3

ugggaaugagg uaguagguug uauaguuuua gggucacacc caccacuggg agauaacuau 60
acaaucuacu gucuuuuccua 80

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

<400> 4

agguugaggu aguagguugu auaguuuuga auuacaucaa gggagauaac uguacagccu 60
ccuagcuuc cu 72

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

<400> 5

gggugaggua guagguugua uaguuuuggg cucugcccug cuauaggaua acuauacaau 60
cuacugucuu uccu 74

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

30 <400>6

cggggugagg uaguagguug ugugguuua gggcagugau guugcccuc ggaagauaac 60
uauacaaccu acugccuucc cug 83

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

<400> 7

gcauccgggu ugagguagua gguuguauugg uuuagaguua cacccuggga guuaacugua 60
 caaccuucua gcuuuccuug gagc 84

- <210>8
- <211> 87
- <212> ARN
- 5 <213> *Homo sapiens*
- <400> 8

ccuaggaaga gguaguaggu ugcauaguuu uagggcaggg auuuugccca caaggaggua 60
 acuaaacgac cugcugccuu ucuuagg 87

- <210>9
- <211> 79
- 10 <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 9

cccgggcuga gguaggaggu uguauaguug aggaggacac ccaaggagau cacuaucgg 60
 ccuccuagcu uccccagg 79

- <210> 10
- 15 <211> 87
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 10

ucagagugag guaguagau uguauaguugu gggguaguga uuuuaccug uucaggagau 60
 aacuaaaca ucuaaugccu ucccuga 87

- <210> 11
- 20 <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*
- 30 <400> 12

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

- <210> 13
- <211> 110
- <212> ARN
- 35 <213> *Homo sapiens*
- <400> 13

ES 2 534 304 T3

cuggauacag aguggaccgg cuggccccaau cuggaagacu agugauuuug uuguugucuu 60
acugcgcuca acaacaaauc ccagucuaacc uaauggugcc agccaucgca 110

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

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

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

aggcugaggu aguaguuuugu acaguuuugag ggucuaugau accacccggg acaggagaua 60
acuguacagg ccacugccuu gccca 84

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

cuggcugagg uaguaguuuug ugcuguuggu cggguuguga cauugcccgc uguggagaua 60
acugcgcgaag cuacugccuu gcuca 84

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

cggggguuggu uguuauuuuu gguuaucuag cuguauagagu gguguggagu cuucauaaaag 60
cuagauaacc gaaaguaaaa auaacccca 89

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

ggaagcgagu uguuauuuuu gguuaucuag cuguauagagu guauuggucu ucauaaaagcu 60
agauaaccga aaguaaaaac uccuuca 87

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

ES 2 534 304 T3

ggaggcccgu uucucucuuu gguuaucua^g cuguau^gagu gccacagagc cguc^{au}aaaag 60
cuag^{au}aaacc gaa^{ag}uagaa aug^{au}ucua 90

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

gaucugucug ucuucuguau auacc^cugua gauc^cg^{au}uu ug^ug^{ua}agga auuu^ug^uggu 60
caca^{au}uu^cg uauc^uag^gggg aau^{ag}u^gagu ug^{ac}au^{aa}aac ac^ucc^gc^ucu 110

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

ccag^{ag}guug uaac^gu^guc uau^{au}au^{ac} cugu^{ag}a^{ac} gaau^ug^ugu g^gua^ucc^gua 60
uag^uc^{ac}aga uuc^gau^ucua ggg^gaa^uaua ugg^uc^gaugc aaaa^{ac}u^uca 110

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

ccu^gg^gagua aag^uag^cagc aca^uaa^ug^gu uug^gg^{au}uu ug^{aa}aa^gg^ug cag^gcc^{au}au 60
ug^ug^cug^{cc}u caaaa^uaca ag^g 83

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

uug^{ag}g^{cc}uu aa^{ag}u^{ac}ugu ag^cag^caca^u ca^ugg^{uu}u^{ac} au^gcu^{ac}agu ca^{ag}au^gc^ga 60
au^{ca}uu^{uu}u g^cu^gc^ucu^{ag} aa^{uu}uu^{aa}g^g aa^{uu}ca^u 98

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

guc^{ag}c^{ag}ug cc^uag^cagc ac^gua^{aa}uu^u ug^gc^guu^{aa}g au^uc^uaaa^{au} uau^cucc^{ag}u 60
au^{aa}ac^ug^ug c^ug^cu^gaa^gu aag^gu^gac 89

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

guuccacucu agcagcacgu aaauauuggc guagugaaau auauauuaaa caccaauauu 60
 acugugcugc uuuguguga c 81

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

gucagaauaa ugucaaagug cuuacagugc agguagugau augugcaucu acugcaguga 60
 aggcacuugu agcauuauugg ugac 84

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

uguucuaagg ugcaucuagu gcagauagug aaguagauua gcaucuacug cccuaagugc 60
 uccuucuggc a 71

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

gcaguccucu guuaguuuug cauaguugca cuacaagaag aauguaguug ugcaaaucua 60
 ugcaaaacug augguggccu gc 82

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

25 cacuguucua ugguuaguuu ugcagguuug cauccagcug ugugauauuc ugcugugcaa 60
 auccaugcaa aacugacugu gguagug 87

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

acauugcuac uuacaauuag uuugcaggu uugcauuuca gcguauauau guauaugugg 60
 cugugcaaa ccaugcaaaa cugauuguga uaugu 96

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

guagcacuaa agugcuuuaa gugcagguag uguuuaguua ucuacugcau uaugagcacu 60
 uaaaguacug c 71

ES 2 534 304 T3

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

5 <400> 32

ugucggguag cuuaucaaac ugauguugac uguugaauuc cauggcaaca ccagucgaug 60
ggcugucuga ca 72

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

10 <400> 33

<400> 33

ggcugagccg caguaguuc ucaguggcaa gcuuuuguc cugaccagc uaaagcugcc 60
aguugaaga cugugcccu cugcc 85

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

15 <400> 34

<400> 34

ggccggcugg gguuccugg gaugggauuu gcuuccuguc acaaaucaca uugccagga 60
uuuccaaccg acc 73

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

20 <400> 35

<400> 35

cucaggugcu cuggcugcu gguuccugg caugcugauu ugugacuuaa gauuaaauc 60
acaugccag ggauuaccac gcaaccacga ccuuggc 97

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

25 <400> 36

<400> 36

cuccggugcc uacugagcug auaucaguuc ucauuuaca cacuggcuca guucagcagg 60
aacaggag 68

30 <400> 37

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

35 <400> 37

cucugccucc cgugccuacu gagcugaaac acaguugguu uguguacacu ggcucaguuc 60
agcaggaaca ggg 73

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

<213> *Homo sapiens*

<400> 38

ggccaguguu gagaggcga gacuugggca auugcuggac gcugcccug gcauugcacu 60
ugucucgguc ugacagugcc ggcc 84

5 <210> 39
 <211> 77
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 39

guggccucgu ucaaguaauc caggauaggc ugugcagguc ccaaugggcc uauucuuugu 60
uacuugcacg gggaccg 77

10 <210> 40
 <211> 77
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 40

ccgggaccca guucaaguaa uucaggauag guugugugcu guccagccug uucuccauua 60
cuuggcucgg ggaccgg 77

15 <210>41
 <211> 84
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 20 <400> 41

ggcuguggcu ggauucaagu aauccaggau aggcuguuuc caucugugag gccuauucuu 60
gauuacuugu uucuggaggc agcu 84

25 <210> 42
 <211> 78
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 42

cugaggagca gggcuuagcu gcuugugagc aggguccaca ccaagucgug uucacagugg 60
cuaaguuccg cccccag 78

30 <210> 43
 <211> 97
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 43

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

35 <210> 44
 <211> 86
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 534 304 T3

<400> 44

gguccuugcc cucaaggagc ucacagucua uugaguuacc uuucugacuu ucccacuaga 60
uugugagcuc cuggagggca ggcacu 86

<210> 45

<211> 64

5 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 45

augacugauu uuuuuuggug uucagaguca auauuuuuu cuagcaccuu cugaaucgg 60
uuau 64

<210> 46

10 <211>81

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 46

cuucaggaag cugguuucau auggugguuu agauuuuuuu agugauuguc uagcaccuu 60
ugaaucagu guucuuggg g 81

15 <210> 47

<211>81

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 47

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

<210> 48

<211> 88

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

25 <400>48

aucucuuaa caggcugacc gauuuuccu gguguucaga gucuguuuuu gucuagcacc 60
auuugaaauc gguaugaug uaggggga 88

<210> 49

<211>71

<212> ARN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 49

gcgacuguaa acauccucga cuggaagcug ugaagccaca gaugggcuuu cagucggaug 60
uuugcagcug c 71

<210> 50

<211> 72

35 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 50

agauacugua acauccuac acucucagcu guggaaagua agaaagcugg gagaagcug 60
uuuacucuuu cu 72

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

5 <400> 51

guuguuguaa acauCCCCga cuggaagcug uaagacacag cuaagcuuuc agucagaugu 60
uugcugcuac 70

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

10 <400> 52

accaaguuuC aguUCAguA aacaucCUac acucagcugu aauacaugga uuggcuggga 60
gguggauguu uacuucagcu gacuugga 88

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

15 <400> 53

accaugcugu agugugugua aacaucCUac acucucagcu gugagcucaa gguggcuggg 60
agaggguuuu uuacuCCUuc ugccaugga 89

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

20 <400> 54

cuguaaaCaU ccuugacugg aagcuguaag guguuCagag gagcuuucag ucggauguuu 60
acag 64

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

25 <400> 55

ggagaggagg caagaugcug gcauagcugu ugaacuggga accugcuauG ccaacauuu 60
gccauCUuuc c 71

30 <400> 56

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

35 <400> 56

ggagauuuG cacauuacua aguugcaugu ugucacggcc ucaaugcaau uuagugugug 60
ugauuuuuuc 70

<210> 57
 <211> 69

<212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 57

cuguggugca uuguaguugc auugcauguu cuggugguac ccaugcaaug uuuccacagu 60
gcaucacag 69

5 <210> 58
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 58

ggccagcugu gaguguuucu uuggcagugu cuuagcuggu uguugugagc aauguaagg 60
aagcaaucag caaguauacu gcccuaagaag ugcugcacgu uguggggccc 110

10 <210> 59
 <211> 84
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 59

gugcucgguu uguaggcagu gucauuagcu gauuguacug uggugguuac 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

20 <210> 61
 <211> 78
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 61

cuuucuaacac agguugggau cgguugcaau gcuguguuuc uguauugguau ugcacuuguc 60
ccggccuguu gaguuugg 78

25 <210> 62
 <211> 75
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 62

ucaucccugg guggggauuu guugcauuac uuguguucua uauaaaguau ugcacuuguc 60
ccggccugug gaaga 75

30 <210> 63
 <211> 80
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 534 304 T3

<400> 63

cugggggcuc caaagugcug uucgugcagg uagugugauu acccaaccua cugcugagcu 60
agcacuuccc gagcccccg 80

<210> 64

<211> 81

5 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 64

aacacagugg gcacucaaua aaugucuguu gaauugaaau gcguuacauu caacggguau 60
uuauugagca cccacucugu g 81

<210> 65

10 <211> 78

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 65

uggccgauuu uggcacuagc acauuuuugc uugugucucu ccgcucugag caaucaugug 60
cagugccaau augggaaa 78

<210> 66

15 <211> 80

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 66

gugagguagu aaguuguauu guuguggggg agggauauua ggcccccauu agaagauaac 60
uauacaacuu acuacuuucc 80

<210> 67

<211> 81

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 67

cccuuuggca uaaacccgua gauccgaucu uguggugaag uggaccgcac aagcucgcu 60
cuauuggucu gugucagugu g 81

<210> 68

<211> 70

<212> ARN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 68

ggcaccacc cguagaaccg accuugcggg gccuucgccg cacacaagcu cgugucugug 60
gguccguguc 70

<210> 69

<211> 80

35 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 69

ccuguugcca caaacccgua gauccgaacu ugugguauua guccgcacaa gcuuguaucu 60
 auagguaugu gucuguuagg 80

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

ugcccuggcu caguuaucac agugcugaug cugucuauuc uaaagguaca guacugugau 60
 aacugaagga uggca 75

- <210>71
- <211> 79
- 10 <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 71

acuguccuuu uucgguuuuc augguaccga ugcuguaauu cugaaaggua caguacugug 60
 auaacugaag aaugguggu 79

- <210> 72
- 15 <211> 78
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 72

uugugcuuuc agcuucuuua cagugcugcc uuguagcauu caggucaagc agcauuguac 60
 agggcuauga aagaacca 78

- <210> 73
- 20 <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*
- 25 <400> 74

ugugcaucgu ggucaaaugc ucagacuccu gugguggcug cucaugcacc acggauguuu 60
 gagcaugugc uacggugucu a 81

- <210> 75
- <211>81
- <212> ARN
- 35 <213> *Homo sapiens*
- <400> 75

ugugcaucgu ggucaaaugc ucagacuccu gugguggcug cuvaugcacc acggauguu 60
gagcaugugc uauggugucu a 81

5 <210> 76
<211> 81
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 76

ccuuggccau guaaaugugc uuacagugca gguagcuuuu ugagaucuac ugcaauguaa 60
gcacuuuuu cauuaccaug g 81

10 <210> 77
<211> 82
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 77

ccugccgggg cuaaagugcu gacagugcag auaguggucc ucuccgugcu accgcacugu 60
ggguacuugc ugcuccagca gg 82

15 <210> 78
<211> 81
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 78

cucucugcuu ucagcuucu uacaguguug ccuuguggca uggaguuaa gcagcaugu 60
acagggcuau caaagcacag a 81

20 <210> 79
<211> 85
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 79

25 ccuuagcaga gcuguggagu gugacaaugg uguuugugc uaaacuauc aacgccauua 60
ucacacuaaa uagcuacugc uaggc 85

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

30 <400>

80

agggcucucu cuccguguuc acagcggacc uugauuuaaa uguccauaca auuaaggcac 60
gcggugaaug ccaagaauug ggcu g 85

35 <210> 81
<211> 109
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 81

ES 2 534 304 T3

aUCAAGAUUA gAgGCUCUGc UCUCcGUGUu cAcAgcGgAc CUUGAUUUAA uGUCAUACA 60
UUAAGGCACg cGgUGAAUGc CAAGAgCGGA gCCUACGGcU gCACUUGAA 109

<210> 82
<211> 87
<212> ARN
5 <213> *Homo sapiens*
<400> 82

UGAgGGCCCC UCUGCGUGUu cAcAgcGgAc CUUGAUUUAA uGUCAUACA AUUAAGGCAC 60
gCGGUGAAUG cCAAGAgAGg cGCCUCC 87

<210> 83
<211> 88
10 <212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 83

UGCGUCCUC UCAGUCCCUG agACCCUAAC uUGUGAugUu uACCgUUUAA AUCCACGGGU 60
uAGGCUCUUG gGAGCUGCGa gUCGUGcU 88

<210> 84
<211> 86
15 <212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 84

UGCCAGUCUC uAGGUCCCUG agACCCUUAA ACCUGUGAGg ACAUCCAGgG UCACAGGUGA 60
gGUUCUUGgG agCCUGGCGU cUGGcC 86

<210> 85
<211> 89
20 <212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 85

ACCAGACUUU UCCUAGUCCC uGAGACCCUA ACUUGUGAGg UAUUUUAGUA ACAUCACAAG 60
UCAGGCUCUU gGGACCUAGg cGgAgGGGA 89

<210> 86
<211> 85
25 <212> ARN
<213> *Homo sapiens*
30 <400> 86

cGcUGGCGAc gGGACAUUau uACUUUUGGU acGCGcUGUG ACACUUCAAA cUCGUACCgU 60
gAGUAUAUau gCGCCGUCCA cGgCA 85

<210> 87
<211> 97
<212> ARN
35 <213> *Homo sapiens*
<400> 87

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

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

ugagcuguug gauucggggc cguagcacug ucugagaggu uuacauuucu cacagugaac 60
 cggucucuuu uucagcugcu uc 82

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

ugugcagugg gaaggggggc cgauacacug uacgagagug aguagcaggu cucacaguga 60
 accgguccu uucccuacug uguc 84

- <210> 90
- 15 <211> 90
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 90

ugcccuucgc gaauuuuuu gcgguccugg cuugcuguac auaacucaau agccggaagc 60
 ccuuacccca aaaagcauuu gcggaaggcg 90

- <210> 91
- 20 <211> 89
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 91

ugcugcuggc cagagcucuu uucacauugu gcuacugucu gcaccuguca cuagcagugc 60
 aauguuaaaa gggcauuggc cguguagug 89

- <210> 92
- 25 <211> 82
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- 30 <400> 92

ggccugcccg acacucuuuc ccuguugcac uacuauaggc cgcugggaag cagugcaaug 60
 augaaagggc auctgucagg uc 82

- <210> 93
- <211> 101
- <212> ARN
- 35 <213> *Homo sapiens*

ES 2 534 304 T3

<400> 93

ccgccccgc gucuccaggg caaccguggc uuucgauugu uacuguggga acuggaggua 60
acagucuaca gccaugguccg ccccgagca cgcccacgcg c 101

<210> 94

<211> 88

5 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 94

acaaugcuuu gcuagagcug guaaaaugga accaaaucgc cucuucraag gauuuggucc 60
ccuucacca gcuguagcua ugcauuga 88

<210> 95

10 <211> 102

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 95

gggagccaaa ugcuuugcua gaggcuggua aauggaacca aaucgacugu ccauggauu 60
ugguuccuu caaccagcug uagcugugca uugauggcgc cg 102

<210> 96

15 <211> 119

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 96

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

<210> 97

<211> 73

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 97

cagggugugu gacugguuga ccagaggggc augcacugug uucacccugu gggccaccua 60
gucaccaacc cuc 73

<210> 98

<211> 90

<212> ARN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 98

aggccucgcu guucucuauug gcuuuuuuuu ccuaugugau ucuacugcuc acucauuuag 60
ggauuggagc cguggcgcac ggcggggaca 90

<210> 99

<211> 100

35 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

ES 2 534 304 T3

<400> 99

agauaaaauuc acucuagugc uuuauggcuu uuuaauuccua ugugauagua auaaagucuc 60
auguagggau ggaagccaug aaauacaug ugaaaaauca 100

<210> 100

<211> 97

5 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 100

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

<210> 101

10 <211> 82

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 101

ugagcccucg gaggacucca uuuguuuuga ugauggauuc uuaugcucca ucaucgucuc 60
aaauagagucu ucagaggguu cu 82

<210> 102

15 <211> 102

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 102

gguccucuga cucucuucgg ugacggguau ucuugggugg auaaucgga uuacguuguu 60
auugcuuaag aaucgcgua gucgaggaga guaccagcgg ca 102

<210> 103

<211> 84

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 103

cguugcugca gcugguguug ugaauccaggc cgacgagcag cgcauccucu uaccggcua 60
uuucacgaca ccaggguugc auca 84

<210> 104

<211> 99

<212> ARN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 104

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

<210> 105

<211> 68

35 <212> ARN

ES 2 534 304 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 105

guguauucua cagugcacgu gucuccagug uggcucggag gcuggagacg cggcccuguu 60
ggaguaac 68

<210> 106

5 <211> 100

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 106

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

10 <210> 107

<211> 95

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 107

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

15 <210> 108

<211> 87

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 108

gacagugcag ucacccauaa aguagaaagc acuacuaaca gcacuggagg guguaguguu 60
uccuacuuua uggauagug uacugug 87

<210> 109

<211> 106

<212> ARN

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 109

gcgcagcgc cugucucca gccugaggug cagugcugca ucucugguca guugggaguc 60
ugagaugaag cacuguagcu caggaagaga gaaguuguuc ugcagc 106

<210> 110

<211> 86

30 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 110

uggggcccug gcugggauau caucuuuac uguaaguuuug cgaugagaca cuacaguaua 60
gaugauguac uaguccgggc accccc 86

35 <210> 111

<211> 88

<212> ARN

ES 2 534 304 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 111

caCCUUGUCC ucacggucca guuuucccag gaaucccuua gaugcuaaga uggggauucc 60
uggaaauacu guucuugagg ucaugguu 88

<210> 112

5 <211> 99

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 112

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

10 <210> 113

<211> 72

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 113

aaucuaaaga caacauuucu gcacacacac cagacuaugg aagccagugu guggaaaugc 60
uucugcuaga uu 72

15

<210> 114

<211> 68

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 114

gaggcaaagu ucugagacac uccgacucug aguaugauag aagucagugc acuacagaac 60
uuugucuc 68

<210> 115

<211> 99

<212> ARN

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 115

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

<210> 116

<211> 89

30 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 116

gccggcgccc gagcucuggc uccgugucuu cacucccgug cuuguccgag gaggagggga 60
gggacggggg cugugcuggg gcagcugga 89

35 <210> 117

<211> 84

<212> ARN

ES 2 534 304 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 117

CUCCCCAUGG CCCUGUCUCC CAACCCUUGU ACCAGUGCUG GGCUCAGACC CUGGUACAGG 60
CCUGGGGGAC AGGGACCUGG GGAC 84

<210> 118

5 <211> 90

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 118

UUUCCUGCCC UCGAGGAGCU CACAGUCUAG UAugUCUCAU CCCCUACUAG ACUGAAGCUC 60
CUUGAGGACA GGGaugGUCA UACUCACCUC 90

10 <210> 119

<211> 87

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 119

UGUCCCCCCC GGCCcAGGUU CUGUGAUACA CUCCGACUCG GGCUCUGGAG CAGUCAGUGC 60
AUGACAGAAC UUGGGCCCgG AAGGACC 87

15 <210> 120

<211> 90

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 120

CUCACAGCUG CCAGUGUCAU UUUUGUGAUC UGCAGCUAGU AUUCUCACUC CAGUUGCAUA 60
UCACAAAAG UGAUCAUUGG CAGGUGGGC 90

<210> 121

<211> 87

<212> ARN

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 121

AGCGGUGGCC AGUGUCAUUU UUGUGAUGUU GCAGCUAGUA AUaugAGCCC AGUUGCAUAG 60
UCACAAAAGU GAUCAUUGG AAcUGUG 87

<210> 122

<211> 84

30 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 122

gUGGUACUUG AAGAUAGGUU AUCCGUGUUG CCUUCGCUUU AUUUGUGACG AAUCAUACAC 60
GGUUGACCUA UUUUUCAGUA CCAa 84

35 <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
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 124

agaagggcua ucaggccagc cuucagagga cuccaaggaa cauuccaacgc ugucggugag 60
uuugggauuu gaaaaaacca cugaccguug acuguaccuu gggguccua 110

<210> 125
 <211> 110
 10 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 125

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

<210> 126
 <211> 110
 15 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 126

cggaaaauuu gccaaagguu ugggggaaca uucaaccugu cggugaguuu gggcagcuca 60
ggcaaaccu cgaccguuga guggaccug aggccuggaa uugccauccu 110

<210> 127
 <211> 89
 20 <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*

30 <400> 128

gagcugcuug ccuc(cccccg) uuuuuggcaa ugguagaacu cacacuggug agguaacagg 60
auccgguggu ucuagacuug ccaacuauug ggcgaggacu cagccggcac 110

<210> 129
 <211> 110
 <212> ARN
 35 <213> *Homo sapiens*
 <400> 129

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

<210> 130
 <211> 84
 <212> ARN
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 130

ccagucacgu ccccuuauca cuuuuccagc ccagcuuugu gacuguaagu guuggacgga 60
 gaacugauaa gguagguga uuga 84

<210> 131
 <211> 82
 10 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 131

agggggcgag ggauuggaga gaaaggcagu uccugauggu cccucccca ggggcuggcu 60
 uuccucuggu ccuucccucc ca 82

<210> 132
 15 <211> 86
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 132

ugcuuguaac uuuccaaaga auucuccuuu ugggcuuucu gguuuuuuu uaagcccaa 60
 ggugaauuuu ugggaaguu ugagcu 86

<210> 133
 20 <211> 109
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 133

ggucgggcuc accaugacac agugugagac cucgggcuac aacacaggac ccgggcgcug 60
 cucugaccc ucgugucuug uguugcagcc ggaggacgc agguccgca 109

<210> 134
 <211> 86
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 134

ugcucccucu cucatauccc uugcauggug gagggugagc uuucugaaaa cccuccccac 60
 augcaggguu ugcaggaug cgagcc 86

<210> 135
 <211> 85
 <212> ARN
 35 <213> *Homo sapiens*
 <400> 135

ES 2 534 304 T3

ugcaggccuc ugugugauau guuugauaua uuagguuguu auuuauuca acuauauuc 60
aaacauauuc cuacaguguc uugcc 85

<210> 136
<211> 92
<212> ARN
5 <213> *Homo sapiens*
<400> 136

cggcuggaca gcgggcaacg gaauccaaa agcagcuguu gucuccagag cauuccagcu 60
gcgcuuggau uuuguccccu gcucuccugc cu 92

<210> 137
<211> 110
10 <212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 137

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

<210> 138
15 <211> 88
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 138

cgaggauagg agcugagggc ugggucuuug cgggagagau gagggugucg gaucaacugg 60
ccuacaaagu cccaguucuc ggcccccg 88

<210> 139
20 <211> 85
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 139

augguguuau caaguguaac agcaacuca uguggacugu guaccaauuu ccaguggaga 60
ugcuguuacu uuugaugguu accaa 85

<210> 140
25 <211> 85
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 140

ugguucccgc cccuguaac agcaacuca uguggaagug cccacugguu ccaguggggc 60
ugcuguuauc uggggcgagg gccag 85

<210> 141
<211> 87
35 <212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 141

ES 2 534 304 T3

agcuucccug gcucuagcag cacagaaaau uuggcacagg gaagcgaguc ugccaauauu 60
ggcugugcug cuccaggcag gguggug 87

<210> 142
<211> 70
<212> ARN
5 <213> *Homo sapiens*
<400> 142

gugaauuagg uaguuucaug uuguugggcc ugguuuucug aacacaacaa cauuaaacca 60
cccgaauac 70

<210> 143
<211> 110
10 <212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 143

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

<210> 144
15 <211> 75
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 144

ggcugugccg gguagagagg gcagugggag guaagagcuc uucacccuuc accaccuucu 60
ccacccagca uggcc 75

<210> 145
20 <211> 62
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 145

ucauuggucc agaggggaga uagguuccug ugauuuuucc uucuucucua uagaauaaau 60
ga 62

<210> 146
25 <211> 71
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 146

gccaacccag uguucagacu accuguucag gaggcucuca auguguacag uagucugcac 60
auugguuagg c 71

<210> 147
<211> 110
35 <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
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 148

ccagaggaca ccuccacuuc gucuaccag uguuuagacu aucuguucag gacucccaaa 60
 uuguacagua gucugcacau ugguuaggcu gggcuggguu agaccucgg 110

<210> 149
 <211> 95
 10 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 149

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

<210> 150
 <211> 68
 15 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 150

cccucgucu acccagcagu guuugggugc gguugggagu cucuaauacu gccggguaau 60
 gauggagg 68

<210> 151
 <211> 90
 20 <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*

30 <400> 152

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

<210> 153
 <211> 110
 <212> ARN
 35 <213> *Homo sapiens*
 <400> 153

ggcuacaguc uuucucaug ugacucgugg acuucccuu gucauccuau gccugagaau 60
 aaaugaagga ggcugggaag gcaaaggac guucaauugu caucacuggc 110

<210> 154
 <211> 110
 <212> ARN
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 154

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

<210> 155
 <211> 86
 10 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 155

ugcuuuccga ggccacaugc uucuuuauau ccccauauagg auuacuugc uauggaaugu 60
 aaggaagugu gugguuucgg caagug 86

<210> 156
 <211> 71
 15 <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 agcgcgacc 110

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

30 <400> 158

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

<210> 159
 <211> 110
 <212> ARN
 35 <213> *Homo sapiens*
 <400> 159

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

<210> 160
 <211> 110
 <212> ARN
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 160

ugaguuuuga gguugcuuca gugaacauuc aacgcugucg gugaguuugg aaauaaaauc 60
 aaaaccaucg accguugauu guacccuauug gcuaaccauc aucuacucca 110

<210> 161
 <211> 110
 10 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 161

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

<210> 162
 15 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 162

aucauucaga aaugguauac aggaaaauga ccuaugaaau gacagacaau auagcugagu 60
 uugcuguca uuucuuuagg ccaauauucu guaugacugu gcuacuuca 110

<210> 163
 20 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 163

gauggcugug aguuggcuua aucucagcug gcaacuguga gauguucaua caaucccuca 60
 25 caguggucuc ugggauuauug cuaaacagag cauuuuccua gccucacga 110

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

30 <400> 164

aguauaaaua uuacauaguu uuugaugucg cagauacugc aucaggaacu gauuggauaa 60
 gaucaguca ccaucaguuc cuaaugcau gccuucagca ucuaaacaag 110

<210> 165
 <211> 110
 <212> ARN
 35 <213> *Homo sapiens*

<400> 165

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

<210> 166
 <211> 110
 <212> ARN
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 166

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

<210> 167
 <211> 110
 10 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 167

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

<210> 168
 15 <211> 97
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 168

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

<210> 169
 20 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 169

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

<210> 170
 25 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 170

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

<210> 171
 <211> 110
 <212> ARN
 35 <213> *Homo sapiens*
 <400> 171

gcugcuggaa gguguaggua cccucaauagg cucaguagcc aguguagauc cugucuuuug 60
uaaucagcag cuacaucugg cuacuggguc ucugauggca ucuucuagcu 110

5 <210> 172
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 172

ccuggccucc ugcagugcca cgcuccgugu auuugacaag cugaguugga cacuccaugu 60
gguaagagugu caguuuuguca aauaccccaa gugcggcaca ugcuuaccag 110

10 <210> 173
 <211> 81
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 173

gggcuuucaa gucacuagug guuccguuuu guagaugauu gugcauuguu ucaaaauggu 60
gcccuaugua cuacaaagcc C 81

15 <210> 174
 <211> 80
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 174

aggacccuuc cagagggccc ccccucaauc cuguugugcc uaaucagag gguugggugg 60
aggcucuccu gaagggcucu 80

20 <210> 175
 <211> 63
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 175

aagaaauggu uuaccgucce acauacauuu ugaauaugua ugugggaugg uaaaccgcuu 60
cuu 83

25 <210> 176
 <211> 86
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 176

acugcuaacg aaugcucuga cuuuauugca cuacuguacu uuacagcuag cagugcaaua 60
guauugucaa agcaucugaa agcagg 86

35 <210> 177
 <211> 69
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 177

ES 2 534 304 T3

ccaccacuaa aacguggaug uacuugcuuu gaaacuaaag aaguaagugc uuccauguuu 60
uggugaugg 69

- <210> 178
- <211> 82
- <212> ARN
- 5 <213> *Homo sapiens*
- <400> 178

gcuucgcucc ccuccgccuu cucuucccgg uucuucccgg agucgggaaa agcuggguug 60
agaggcgaa aaaggaugag gu 82

- <210> 179
- <211> 59
- 10 <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 179

uuggccuccu aagccaggga uuguggguuc gagucccacc cgggguaaag aaaggcga 59

- <210> 180
- 15 <211> 86
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 180

uugguacuuu gagagaggug guccguggcg cguucgcuuu auuuauaggcg cacauuacac 60
ggucgaccuc uuugcaguau cuaauc 86

- 20 <210> 181
- <211> 83
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 181

cugacuauug cuccccgcuu ccccuagggc auugguguaa agcuggagac ccacugcccc 60
aggugcugcu ggggguuuaa guc 83

- <210> 182
- <211> 95
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- 30 <400> 182

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

- <210> 183
- <211> 75
- <212> ARN
- 35 <213> *Homo sapiens*
- <400> 183

uggagugggg gggcaggagg ggcucagggg gaaagugcau acagccccug gccucucug 60
cccuuccguc ccucg 75

- <210> 184
- <211> 94
- <212> ARN
- 5 <213> *Homo sapiens*
- <400> 184

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

- <210> 185
- <211> 94
- 10 <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 185

gaguugguu uuguugggu uuguucuagg uaugguccca gggaucccag aucaaaccag 60
gccccugggc cuauccuaga accaaccuaa gcuc 94

- <210> 186
- 15 <211> 94
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 186

uguuuugagc gggggucaag agcaauaacg aaaauguuu gucauaaac guuuuucauu 60
auugcuccug accuccucuc auuugcuaua uuca 94

- <210> 187
- 20 <211> 93
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 187

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

- <210> 188
- <211> 67
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- 25 <400> 188

ucuccaacia uauccuggug cugagugaug acucagggca cuccagcauc agugauuuug 60
uugaaga 67

- <210> 189
- <211> 94
- <212> ARN
- 35 <213> *Homo sapiens*
- <400> 189

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

<210> 190
<211> 95
<212> ARN
5 <213> *Homo sapiens*

<400> 190

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

<210> 191
<211> 99
10 <212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 191

gaaacugggc ucaaggugag gggugcuauc ugugauugag ggacaugguu aauggaaug 60
ucucacacag aaauccgacc cgucaccuug gccuacuua 99

<210> 192
<211> 77
15 <212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 192

gcuugggaca cauacuucu uauaugccca uaugaaccug cuaagcuug gaauguaaag 60
aaguauguau uucaggc 77

<210> 193
<211> 72
20 <212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 193

ucagagcaca uacuucuuu uguaccuaua ugaacauuca gugcuauuga auguaaagaa 60
guauguauuu ug 72

<210> 194
<211> 88
25 <212> ARN
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 194

ccaggcugag guaguauuu guacaguuuaggguuauug auaccacccg guacaggaga 60
uaacuguaca ggccacugcc uugccagg 88

<210> 195
<211> 85
<212> ARN
35 <213> *Homo sapiens*

<400> 195

cuggcugagg uaguaguuug ugcuguuggu cggguuguga cauugccccgc uguggagaua 60
acugcgcaag cuacugccuu gcuag 85

- <210> 196
- <211> 103
- <212> ARN
- 5 <213> *Homo sapiens*
- <400> 196

aauggguucc uaggaagagg uaguaguuug cauaguuuuu gggcagagau uuugcccaca 60
aggaguuaac uauacgaccu gcugccuuuc uuagggccuu auu 103

- <210> 197
- <211> 94
- 10 <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 197

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

- <210> 198
- 15 <211> 96
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 198

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

- 20 <210> 199
- <211> 85
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 199

gcagggugag guaguagguu gugugguuuc agggcaguga uguugcccuu ccgaagauaa 60
cuauacaacc uacugccuuc ccuga 85

- 25 <210> 200
- <211> 94
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- 30 <400> 200

ugugugcauc cggguugagg uaguagguug uagguuuag aguuacacc ugaggauaa 60
cuguacaacc uucuaagcuu ccuuggagca cacu 94

- <210> 201
- <211> 95
- 35 <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 201

ES 2 534 304 T3

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

<210> 202
 <211> 93
 <212> ARN
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 202

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

<210> 203
 <211> 89
 10 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 203

aucagaguga gguaguagau uguauaguug ugggguagug auuuuacccu guuuaggaga 60
 uaacuauaca aucuauugcc uucccugag 89

<210> 204
 <211> 83
 15 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 204

ugugggauga gguaguagau uguauaguuu uagggucaua ccccaucuug gagauaacua 60
 uacagucuaac ugucuuuucc acg 83

<210> 205
 <211> 108
 20 <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*
 30 <400> 206

ggucgggcca gccccguuug gaagacuagu gauuuuguug uugugucucu guauccaaca 60
 acaaguccca gucugccaca uggugcuggu cauuuca 97

<210> 207
 <211> 111
 <212> ARN
 35 <213> *Homo sapiens*
 <400> 207

ES 2 534 304 T3

aggagcggag uacgugagcc agugcuaugu ggaagacuug ugauuuuguu guucugauau 60
gaaugacaa caagucacag ccagccucau agcguaggacu ccuauccacu u 111

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

<400> 208

guuguuauuu uugguuauuu agcuguauga guguaauuggu cuucauaaaag cuagauaacc 60
gaaaguaaaa ac 72

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

<400> 209

cgggguuuggu uguuauuuuu gguuauuuag cuguauugau gguguggagu cuucauaaaag 60
cuagauaacc gaaaguaaaa auaacccca 89

<210> 210
15 <211> 90
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 210

ggaggcccgu uucucucuuu gguuauuuag cuguauugau gccacagagc cgucuaaaag 60
cuagauaacc gaaaguagaa augacucuca 90

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

<400> 211

uauuuacccu guagaaccga auuugugugg uaccacaua gucacagauu cgauucuagg 60
ggaauuaa 68

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

<400> 212

gaucugucug ucuucuguau auaccugua gaucggaauu uguguaagga auuuuguggu 60
cacaauuucg uaucuagggg aauauguagu ugacauaaac acuccgcuca 110

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

<400> 213

gaccugucug ucuucuguau auaccugua gaucggaauu uguguaagga auuuuguggu 60
cacaauuucg uaucuagggg aauauguagu ugacauaaac acuccgcuca 110

ES 2 534 304 T3

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

5 <400> 214

cuguagcagc acaucauggu uuacauacua cagucaagau gcgaaucauu auuugcugcu 60
cuag 64

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

10 <400> 215

cccuuggagu aaaguagcag cacauaaugg uuuguggaug uugaaaaggu gcaggccaua 60
cugugcugcc ucaaaaauaca agga 84

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

15 <400> 216

augucagcgg ugccuuagca gcacguaaa auuggcgua agauucugaa auuaccucca 60
gaaugacug ugcugcugaa gaaagguugg caa 93

<210> 217
 <211> 95
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 217

caugcuuguu ccacucuagc agcacguaaa uauuggcgua gugaaaauaa uauuaaacac 60
caauuuuuuu gugcugcuuu agugugacag ggaua 95

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

25 <400> 218

gucagaauaa ugucaaagug cuuacagugc agguagugau gugugcaucu acugcaguga 60
gggcacuugu agcauuuugc ugac 84

30 <400> 219

<210> 219
 <211> 96
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 219

ugcugcuuu uuguucuaag gugcaucuag ugcagauagu gaaguagacu agcaucuacu 60
gcccuuagug cuccuucugg cauaagaagu uauguc 96

<210> 220
 <211> 84

<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 220

acuuacgauu aguuuugcag auuugcaguu cagcguauau gugaauauau ggcugugcaa 60
auccaugcaa aacugauugu gggga 84

5 <210> 221
<211> 82
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 221

gcagcccucu guuaguuuug cauaguugca cuacaagaag aauguaguug ugcaaauca 60
ugcaaaacug augguggccu gc 82

10 <210> 222
<211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 222

cacuggucua ugguuaguuu ugcagguuug cauccagcug uauaauauuc ugcugugcaa 60
auccaugcaa aacugacugu gguggug 87

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

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

25 <210> 224
<211> 92
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 224

uguaccaccu ugucggauag cuuauacagac ugauguugac uguugaauuc cauggcaaca 60
gcagucgauug ggcugucuga cauuuuggua uc 92

30 <210> 225
<211> 95
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 225

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

35 <210> 226
<211> 74
<212> ARN

ES 2 534 304 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 226

ggcugcuugg guuccuggca ugcugauuug ugacuugaga uuaaaaucac auugccaggg 60
 auuaccacgc aacc 74

5 <210> 227
 <211> 75
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 227

cgagcggcug ggguuuccugg ggaugggauu ugaugccagu cacaaaucac auugccaggg 60
 auuuccaacu gacc 75

10 <210> 228
 <211> 68
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 228

cuccggugcc uacugagcug auaucaguuc ucauuucaca cacuggcuca guucagcagg 60
 aacaggag 68

15 <210> 229
 <211> 107
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 229

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

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

ggccaguguu gagagggcga gacuugggca auugcuggac gcugcccugg gcuuugcacu 60
 ugucucgguc ugacagugcc ggcc 84

30 <210> 231
 <211> 90
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 231

aaggccgugg ccucguuca gaaauccagg auaggcugug caggucccaa ggggccuauu 60
 cuugguuacu ugcacgggga cgcgggcccug 90

35 <210> 232
 <211> 85

ES 2 534 304 T3

<212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 232

ugccccgggac ccaguucaag uaaauucagga uagguugugg ugcugaccag ccuguucucc 60
 auuacuuggc ucgggggccc gugcc 85

5 <210> 233
 <211> 84
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 233

ggcugcggcu ggauucaagu aauccaggau aggcuguguc cguccaugag gccuguucuu 60
 gauuacuugu uucuggaggc agcg 84

10 <210> 234
 <211> 73
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 234

aggugcagag cuuagcugau uggugaacag ugauugguuu ccgcuuuguu cacaguggcu 60
 aaguucugca ccu 73

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

uggccugagg agcagggcuu agcugcuugu gagcaagguc cacagcaaag ucguguucac 60
 aguggcuaag uuccgcccc uggaccc 87

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

ggucccuacc uucaaggagc ucacagucua uugaguugcc uuucugauuc ucccacuaga 60
 uugugagcug cuggagggca ggcacu 86

<210> 237
 <211> 71
 30 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 237

aggaagcugg uucauauagg ugguuuagau uuaaaauagug auugucuagc accauuugaa 60
 aucaguguuc u 71

35 <210> 238
 <211> 88

<212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 238

acccuuaga ggaugacuga uuucuuugg uguucagagu caauagaauu uucuaqcacc 60
 aucugaaauc gguuauaug auugggga 88

5 <210> 239
 <211> 88
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 239

10 aucucuaca caggcugacc gauuucuccu gguguucaga gucuguuuuu gucuagcacc 60
 auuugaaauc gguuauaug uaggggga 88

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

cuucuggaag cugguuucac augguggcuu agauuuuucc aucuuuguau cuagcaccau 60
 uuuaaaucag uguuuuagga g 81

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

gcgacuguaa acauccucga cuggaagcug ugaagccaca aaugggcuuu cagucggauq 60
 uuugcagcug c 71

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

auguaaacau ccuacacuca gcugucuuac augccuuggc ugqgaugugg auguuuacgu 60

<210> 243
 <211> 64
 30 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 243

cuguaaacau ccuugacugg aagcuguaag guguugagag gagcuuucag ucggauquu 60

acag 64

35 <210> 244
 <211> 89

<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 244

accauguugu agugugugua aacauccuac acucucagcu gugagcucaa gguggcuggg 60
agagguugu uuacuccuuc ugccaugga 89

5 <210> 245
<211> 84
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 245

gagugacaga uauuguaaac auccuacacu cucagcugug aaaaguaaga aagcuggggag 60
aaggcuguuu acucucucug ccuu 84

10 <210> 246
<211> 82
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

15 <400> 246

aagucugugu cuguaaacau ccccgacugg aagcuguaag ccacagccaa gcuuucaguc 60
agauguuugc ugcvacuggc uc 82

20 <210> 247
<211> 106
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 247

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

25 <210> 248
<211> 70
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 248

ggagauauug cacauuacua aguugcaugu ugucacggcc ucaaugcaau uuagugugug 60
ugauuuuuc 70

30 <210> 249
<211> 69
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 249

cuguggugca uuguaguugc auugcauguu cuggcaauac cugugcaaug uuuccacagu 60
gcaucacgg 69

35 <210> 250
<211> 77
<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 250

agucuaguua cuaggcagug uaguuagcug auugcuaaua guaccaauca cuaaccacac 60

agccagguaa aaagacu 77

5 <210> 251
 <211> 84
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 251

gugcucgguu uguaggcagu gaaauagcu gauuguagug cggugcugac aaucacuaac 60
 uccacugcca ucaaaacaag gcac 84

10 <210> 252
 <211> 102
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 252

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

15 <210> 253
 <211> 91
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 20 <400> 253

ugcccauua uccacaggug gggauuggug gcauuacuug uguuagauau aaaguauugc 60
 acuugucccg gccugaggaa gaaagaggu u 91

25 <210> 254
 <211> 80
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 254

cuuuuacac agguugggau uugucgcaau gcuguguuuc ucuguauugu auugcacuug 60
 ucccggccug uuaguuugg 80

30 <210> 255
 <211> 88
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 255

agucaugggg gcuccaaagu gcuguucgug cagguagugu aauuaccuga ccuacugcug 60
 agcuagcacu ucccagagccc ccaggaca 88

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

5 <400> 256

ccaguaccau cugcuuggcc gauuuuggca cuagcacau uuugcuugug ucucuccgc 60
gugagcauc auguguagug ccaauauggg aaaagcgggc ugcugc 106

<210> 257
 <211> 80
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 257

gugagguagu aaguuguauu guuguggggu agggauuuua ggccccagua agaagauaac 60

uauacaacuu acuacuuucc 80

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

15 <400> 258

cauaaacccg uagauccgau cuugugguga aguggaccgc gcaagcucgu uucuaugggu 60
cugug 65

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

20 <400> 259

ggcaccccacc cguagaaccg accuugcggg gccuucgccc cacacaagcu cgugucugug 60
gguccguguc 70

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

25 <400> 260

ccuguugcca caaacccgua gauccgaacu ugugcugauu cugcacacaa gcuugugucu 60
auagguaugu gucuguuagg 80

30 <400> 261

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

35 <400> 261

ucaguuauca cagugcugau gcuguccauu cuaaagguac aguacuguga uaacuga 57

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

5 <400> 262

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

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

10 <400> 263

uucuuacugc ccucggcuuc uuuacagugc ugccuuguug cauauuggauc aagcagcauu 60
guacagggcu augaaggcau ugagac 86

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

15 <400> 264

gucuuugugc uuucagcuuc uuuacagugc ugccuuguag cauucagguc aagcagcauu 60
guacagggcu augaaagaac caagaa 86

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

20 <400> 265

augucaaaagu gcuaacagug cagguagcuu uuugaguucu acugcagugc cagcacuucu 60
uacau 65

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

25 <400> 266

ccugcuggga cuaaagugc gacagugcag auaguggucc ucucugugc accgcacugu 60
ggguacuugc ugcuccagca gg 82

30 <400> 267

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

35 <400> 267

uucucugugc uuucagcuuc uuuacagugu ugccuugugg cauggaguuc aagcagcauu 60
guacagggcu aucaaagcac agagagc 87

ES 2 534 304 T3

<210> 268
<211> 66
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

5 <400> 268

agcuguggag ugugacaaug guguuugugu ccaaaccauc aaacgccauu aucacacuaa 60
auagcu 66

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

10 <400> 269

<400> 269

cucugcgugu ucacagcggg ccuugauuuu augucuauac aaauaaggca cgcggugaau 60
gccaagag 68

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

15 <400> 270

<400> 270

aggccucucu cuccguguuc acagcggacc uugauuuuuu uguccauaca auuaaggcac 60
gcbggugaau ccaagaauug ggcug 85

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

20 <400> 271

<400> 271

aucaagauca gagacucugc ucuccguguu cacagcggac cuugauuuuu ugucauacaa 60
uuuaggcacg cggugaauug caagagcggg gccuacggcu gcacuugaa 109

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

25 <400> 272

<400> 272

cugggucccu gagaccuuu aaccugugag gacguccagg gucacaggug agguuccuugg 60
gagccugg 68

30 <210> 273
<211> 71
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

35 <400> 273

gccuaguccc ugagaccua acuugugagg uauuuuagua acaucacaag ucagguucuu 60
gggaccuagg c 71

5 <210> 274
 <211> 77
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 274

ugcgcucccc ucagucccug agaccuaac uugugauguu uaccguuuua auccacgggu 60
uaggcucuug ggagcug 77

10 <210> 275
 <211> 73
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 275

ugacagcaca uuauuacuuu ugguacgcgc ugugacacuu caaacucgua ccgugagua 60
uaaugcgcgg uca 73

15 <210> 276
 <211> 70
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 276

ccagccugcu gaagcucaga gggcucugau ucagaaagau caucggaucc gucugagcuu 60
ggcuggucgg 70

20 <210> 277
 <211> 70
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 277

guuggauucg gggccguagc acugucugag agguuuacau uucucacagu gaaccggucu 60
cuuuuucagc 70

25 <210> 278
 <211> 76
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 278

cagugggaag gggggccgau gcacuguaag agagugagua gcaggucuca cagugaaccg 60
gucucuuuucc cuacug 76

35 <210> 279
 <211> 73
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 279

uggaucuuuu ugcgucugg gcuugcuguu cucucgacag uagucaggaa gccuuaccc 60
caaaaaguau cua 73

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

ugccuuucgc gaaucuuuuu gcgucuggg cuugcuguac auaacucaau agccggaagc 60
ccuuacccca aaaagcauuc gcggaggcg 90

- <210> 281
- <211> 64
- 10 <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 281

gagcucuuuu cacauugugc uacugucuaa cguguaccga gcagugcaau guuaaaaggg 60
cauc 64

- <210> 282
- <211> 82
- 15 <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 282

ggcuuguugg acacucuuuc ccuguugcac uacugugggc cucugggaag cagugcaaug 60
augaaagggc aucugucggg cc 82

- <210> 283
- <211> 66
- 20 <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 283

gggcaaccgu ggcuuucgau uguuacugug ggaaccggag gaaacagucu acagccaugg 60
ucgccc 66

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

gcuaaagcug guaaaaugga accaaaucgc cucuuccaug gauuuggucc ccuucacca 60
gcuguagc 68

- <210> 285
- <211> 104
- <212> ARN
- 35 <213> *Homo sapiens*
- <400> 285

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

- <210> 286
- <211> 119
- <212> ARN
- 5 <213> *Homo sapiens*
- <400> 286

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

- <210> 287
- <211> 71
- 10 <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 287

aggguugugug acugguugac cagaggggcg ugcacucugu ucaccugug ggccaccuag 60
ucaccaaccc u 71

- <210> 288
- <211> 90
- 15 <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 288

aggccucacu guucucuauug gcuuuuuauu ccuaugugau ucuaauugcuc gcucauauag 60
ggauuggagc cguggcguac ggugaggaua 90

- <210> 289
- <211> 97
- 20 <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 289

cgucucugcug uggccuauug cuuuucauuc cuaugugauu gcugcuccga acucauguag 60
ggcuaaaaagc caugggcuac agugaggggc aagcucc 97

- <210> 290
- <211> 100
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- 30 <400> 290

agauaaaauuc acucuagugc uuuauuggcuu uuuauuccua ugugaucgua auaaagucuc 60
auguagggau ggaagccaug aaauacauug ugaaaauua 100

- <210> 291
- <211> 62
- <212> ARN
- 35 <213> *Homo sapiens*
- <400> 291

gaggacucca uuuguuuuga ugauggauuc uuaagcucca ucaucgucuc aaaugagucu 60
uc 62

- <210> 292
- <211> 73
- <212> ARN
- 5 <213> *Homo sapiens*
- <400> 292

cuucggugac ggguaucuu ggguggauaa uacggauuac guuguuauug cuuaagaaua 60
cgcgugucg agg 73

- <210> 293
- <211> 71
- 10 <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 293

cagcuggugu ugugaaucag gccgacgagc agcgcauccu cuuacccggc uauuucacga 60
caccagguu g 71

- <210> 294
- 15 <211> 99
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 294

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

- <210> 295
- 20 <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*
- 30 <400> 296

ccugccagug guuuuacccu augguagguu acgucaugcu guucuaccac aggguagaac 60
cacggacagg 70

- <210> 297
- <211> 72
- <212> ARN
- 35 <213> *Homo sapiens*
- <400> 297

ggguccaūcu uccagugcag uguuggaugg uugaaguaug aagcuccuaa cacugucugg 60
 uaaagauggc cc 72

- <210> 298
- <211> 64
- <212> ARN
- 5 <213> *Homo sapiens*
- <400> 298

acccauaaaag uagaaagcac uacuaacagc acuggaggggu guaguguuuc cuacuuuaug 60
 gaug 64

- <210> 299
- <211> 63
- 10 <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 299

ccugaggugc agugcugcau cucuggucag uugggagucu gagaugaagc acuguagcuc 60
 agg 63

- <210> 300
- <211> 66
- 15 <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 300

ggcugggaua ucaucauaa cuguaaguuu gugaugagac acuacaguau agaugaugua 60
 cuaguc 66

- <210> 301
- <211> 70
- 20 <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 301

cucacggucc aguuuuccca ggaaucccuu ggauhcuaag auggggauuc cuggaaauac 60
 uguuccuugag 70

- <210> 302
- <211> 65
- 25 <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- 30 <400> 302

agcucugaga acugaauucc auggguuuaa ucaaugucag accugugaaa uucaguucuu 60
 cagcu 65

- <210> 303
- <211> 99
- <212> ARN
- 35 <213> *Homo sapiens*
- <400> 303

ES 2 534 304 T3

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

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

ggcucuggcu ccgugucuuc acucccgugu uuguccgagg agggagggag ggacgggggc 60
ggugcu 66

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

cccugucucc caacccuugu accagugcug ugccucagac ccugguacag gccuggggga 60
uaggg 65

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

ccugccucg aggagcucac agucuaguau gucuccucc uacuagacug aggcuccuug 60
aggacagg 68

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

ccgggccuag guucugugau acacuccgac ucgggcucug gagcagucag ugcaugacag 60
aacuugggcc cgg 73

- <210> 308
- 25 <211> 69
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- 30 <400> 308

cggugucauu uuugugacgu ugcagcuagu aauaugagcc caguugcaua gucacaaaag 60
ugaucauug 69

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

gaagauaggu uauccguguu gccuucgcuu uauucgugac gaaucauaca cgguugaccu 60
auuuuu 66

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

cuguuaaugc uauuugugau agggguuuug gccucugacu gacuccuacc uguuagcauu 60
aaCag 65

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

ccauggaaca uucaacgcug ucggugaguu uggaaucaaa aaacaaaaaa accaccgacc 60
guugacugua ccuugg 76

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

aggucacaau caacauucau ugcugucggu gguugaacu guguaaaaa gcucacugaa 60
caaugaaugc aacuguggc 80

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

gccaaagguu uggaagaaca uucaaccugu cggugaguuu gggcagcuca gacaaaccau 60
cgaccguuga guggaCCCCg aggcugga 89

- <210> 314
- <211> 89
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- 30 <400> 314

uugauggcug cacucaacau ucauugcugu cgguggguuu gaangucaac caacucacug 60
aucaaugaau gcaaacugcg ggccaaaaa 89

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

accuuuuug gcaaugguag aacucacacc gguaagguaa ugggacccgg ugguucuaga 60
cuugccaacu auggu 75

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

cuguguaugg cacugguaga auucacugug aacagucuca gucagugaau uaccgaaggg 60
ccauaaacag 70

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

ccuuuccuua ucacuuuucc agccagcuuu gugacucuaa guguuggacg gagaacugau 60
aagguag 69

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

agggauugga gagaaaggca guuccugaug guccccuccc aggggcuggc uuuccucugg 60
uccuu 65

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

acuuuccaaa gaauucuccu uuugggcuuu cucuuuuau uuuuagcccu aaggugaauu 60
uuuugggaag u 71

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

ucagguaca acacaggacc cgggcgcugc ucugaccccu cgugucuugu guugcagccg 60
g 61

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

ucucacaucc cuugcauggu ggagggugag cucucugaaa accccuccca caugcagggu 60
uugcagga 68

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

cugugugaua uguuugauau auuagguugu uuuuuaucc aacuaauau caagcauau 60
ccuacag 67

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

agcgggcaac ggaaucccaa aagcagcugu ugucuccaga gcauuccagc ugcacuugga 60
uuucguuucc ugcu 74

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

cgugcacagg gcucugaccu augaauugac agccaguacu cuuuucucuc cucuggcugc 60
caauuccaua ggucacaggu auguucacc 89

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

gagagcuggg ucuuugcggg caagaugaga gugucaguuc aacuggccua caaaguucca 60
guccuc 66

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

aucgggugua acagcaacuc cauguggacu gugcucggau uccaguggag cugcuguuac 60
uucugau 67

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

ES 2 534 304 T3

guggcuccca cccucuguaa cagcaacucc auguggaagu gcccacuggu uccagugggg 60
cugcuguuau cugggguggc ggcuaag 86

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

uagcagcaca gaaauuugg cauggggaag ugagucugcc aauauuggcu gugcugcu 58

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

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

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

agcugaucug uggcuuaggu aguuucaugu uguugggauu gaguuuugaa cucggcaaca 60
agaaacugcc ugaguuacau caguc 85

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

gccaucccag uguucagacu accuguucag gaggcuggga cauguacagu agucugcaca 60
uugguuaggc 70

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

30 <400> 332

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

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

<400> 333

ccagaggaua ccuccacucc gucuaccag uguuuagacu accuguucag gacuccaaa 60
 uuguacagua gucugcacau ugguuagguu gggcuggguu agaccucgg 110

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

gccguggcca ucuuacuggg cagcauugga uagugucuga ucucuaauac ugccugguaa 60
 ugaugacggc 70

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

cugggccucu gugggcaucu uaccggacag ugcuggauuu cuuggcuuga cucuaacacu 60
 gucugguaac gauguucaa ggugaccac 90

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

cccucgucuu acccagcagu guuugggugc ugguugggag ucucuaauac ugccggguaa 60
 ugauggagg 69

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

uaccuuacuc aguaaggcau uguucuucua uauuaauaaa ugaacagugc cuuucugugu 60
 aggua 66

<210> 338
 <211> 72
 25 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 338

guuccuuuuu ccuaugcaua uacuucuuug uggaucuggu cuaaagaggu auagcgaug 60
 ggaagaugga gc 72

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

ES 2 534 304 T3

<400> 339

gccuggucca gugguucuu acaguucaac aguucuguag cacaaugug aaauguuuag 60
gaccacuaga cccggc 76

<210> 340

<211> 68

5 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 340

uggacuuccc uuugucaucc uaugccugag aauauugaa ggagggcuggg aaggcaaagg 60
gacguuca 68

<210> 341

10 <211> 68

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 341

cucuuguccu ucauuccacc ggagucuguc uuauugccaac cagauuucag uggagugaag 60
cucaggag 68

15 <210> 342

<211> 73

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 342

ccaggccaca ugcuucuuua uauccucaua gauaucucag cacuauggaa uguaaggaag 60
ugugugguuu ugg 73

20 <210> 343

<211> 79

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 343

aaggcagggg ugaggggucug cgggaggagc cgggcggagg cugcggcuug cgcuuuccu 60
ggcucuccuc ccucucuuu 79

<210> 344

<211> 83

<212> ARN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 344

uuuccuuugac gggugagcuu uuggccccggg uuauaccuga cacucacgua uaagacgagc 60
aaaaagcuug uuggucagag gag 83

<210> 345

<211> 110

35 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

ES 2 534 304 T3

<400> 345

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

<210> 346

<211> 106

5 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 346

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

<210> 347

10 <211>91

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 347

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

15 <210> 348

<211> 87

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 348

gguugcuuca gugaacauuc aacgcugucg gugaguugg aauucaaaau aaaaccaucg 60
 accguugauu guaccuaua gcuaacc 87

20

<210> 349

<211> 110

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 349

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

<210> 350

<211> 112

<212> ARN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 350

agcucucagc aucaacggug uacaggagaa ugaccuauga uuugacagac cgugcagcug 60
 uguaugucug ucauucugua ggccaauauu cuguanguca cugcuacuaa aa 112

<210> 351

<211> 72

<212> ARN

35 <213> *Homo sapiens*

<400> 351

uugguuuauu cucagcuggc aacugugaga ugucccuauc auuccucaca guggucucug 60
 ggauuauvcu aa 72

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

5

<400> 352

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

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

10

<400> 353

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

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

15

<400> 354

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

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

20

<400> 355

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

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

30

<400> 356

auccaggucu ggggcaugaa ccuggcauac aauguagauu ucuguguuug uuaggcaaca 60
 gcuaauugu cugcuggguu ucagggcuacc uggaa 95

<210> 357
 <211> 79
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

35

ES 2 534 304 T3

<400> 357

ccccagugg cucaguagcc aguguagauc cugucuugg uaaucagcag cuacaucugg 60
cuacuggguc ucugguggc 79

<210> 358

<211> 110

5 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 358

ucuggccauc ugcaguguca cgcuccgugu auuugacaag cugaguugga cacucugugu 60
gguagagugu caguuuguca aaaucccca aagugguca ugccuauag 110

<210> 359

10 <211> 82

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 359

gggcuuuuaa gucacuagug guuccguuaa guagaugguu ugugcauugu uucaaaaugg 60
ugcccuagug acuacaaagc cc 82

15 <210> 360

<211> 83

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 360

20 cucaucuugc gguacucaaa cuaugggggc acuuuuuuuu uucuuuaaaa agugccgccu 60
aguuuuaagc cccgccgguu gag 83

<210> 361

<211> 82

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 361

ccuauugagc ggccaucaaa guggaggccc ucucuugagc cugaaugaga aagugcuucc 60
acuuugugug ccacugcaug gg 82

<210> 362

<211> 82

<212> ARN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 362

cagccuguga uacucaaaacu gggggcucuu uuggauuuuc aucggaagaa aagugccgcc 60
agguuuugag ugucaccggg ug 82

<210> 363

<211> 80

35 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

ES 2 534 304 T3

<400> 363

uucaaucugu gguacucaaa cugugugaca uuuuguucuu uguaagaagu gccgcagagu 60
uuguaguguu gccgauugag 80

<210> 364

<211> 84

5 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 364

uuccauauag ccauacucaa aauggaggcc cuaucuaagc uuuuaagugg aaagugcuuc 60
ccuuuugugu guugccaugu ggag 84

<210> 365

10 <211> 69

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 365

ggugagacuc aaaugugggg cacacuucug gacuguacau agaaagugcu acuacuuuug 60
agucucucc 69

15 <210> 366

<211> 79

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 366

gggccuuucu ggagggcccc cccucaaucc uguugugcuc gcuucagagg guugggugga 60
ggcucuccug aaggugucc 79

20

<210> 367

<211> 76

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 367

auauguangu auguanguau gugugcaugu gcaugugcau guaugcauau uguanguaua 60
uauuauagcau acaugu 76

<210> 368

<211> 64

<212> ARN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 368

uguauuguca ugcauauugug cucaugugug uguacaugua ugugugcaug ugcauguaa 60
uaug 64

<210> 369

<211> 82

<212> ARN

35 <213> *Homo sapiens*

ES 2 534 304 T3

<400> 369

ccaggccuuu ggcagaggag ggcuguuuuu cccuugaguu uuaugacugg gaggaacuag 60
ccuucucuca gcuuaggagu gg 82

<210> 370

<211> 63

5 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 370

aagaaauggu uuaccguccc acauacauuu ugaguaugua ugugggacgg uaaaccgcuu 60
cuu 63

<210> 371

10 <211> 79

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 371

gcuacuugaa gagagguuau cccuugugug uuugcuuuac gcgaaaugaa uaugcaaggg 60
caagcucucu ucgaggagc 79

<210> 372

<211> 86

15 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 372

ccugcuaacg gcugcucuga cuuuauugca cuacuguacu uuacagcgag cagugcaaua 60
guuuuguaa agcauccgag agcagg 86

20

<210> 373

<211> 69

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 373

ccaccacuuu aacgugguug uacuugcuuu agaccuaaga aaguaagugc uucauguuu 60
uggugaugg 69

<210> 374

<211> 82

<212> ARN

30 <213> *Homo sapiens*

<400> 374

gccucgccgc ccuccgccuu cucuucccgg uucuuuccgg agucgggaaa agcuggguug 60
agagggcgaa aaaggaugug gg 82

<210> 375

<211> 59

35 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 375

ES 2 534 304 T3

uuggccuccu aagccaggga uuguggguuc gaguccacc cgggguaaug agguguuuu 59

<210> 376
 <211> 86
 <212> ARN
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 376

uugguacuug gagagaggug guccguggcg cguucgcuuc auuuauaggcg cacauacac 60
 ggucgaccuc uuugcgguau cuaauc 86

<210> 377
 <211> 89
 10 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 377

aacugacuau gccuccucgc aucccuagg gcauuggugu aaagcuggag acccacugcc 60
 ccaggugcug cuggggguug uagucugac 89

<210> 378
 <211> 98
 15 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 378

auauagugcu ugguuccuag uaggugcuca gaaaguguuu gugacauau ucguuuauug 60
 agcaccuccu aucaaucaag cacugugcua ggcucugg 98

<210> 379
 <211> 95
 20 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 379

cucaucuguc uguugggucg ggggcaggc cuuugugaag gcggguuauug cucagaucgc 60
 cucugggccc uuccuccagu cccgaggcag auuuu 95

<210> 380
 <211> 97
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 380

cugucucgga gccuggggca ggggggcagg aggggcucag ggagaaagua ucuacagccc 60
 cuggccucu cugcccuucc gucccccugc cccaagu 97

<210> 381
 <211> 97
 <212> ARN
 35 <213> *Homo sapiens*
 <400> 381

uguucgcuuc ugguaccgga agagagguuu ucugggucuc uguuucuug augagaauga 60
aacacaccca gcuaaccuuu uuucaguuu caaaucc 97

<210> 382
<211> 98
<212> ARN
5 <213> *Homo sapiens*
<400> 382

gaccuuugg cgauucugc cucucugggc cugugucua ggcucucaa gauccaacga 60
gcaaagcaca gggccugcag agagguagcg cucugcuc 98

<210> 383
<211> 96
10 <212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 383

gagucugguu uuguuugggu uuguucuagg uaugguccca gggauccag aucaaaccag 60
gcccugggc cuauccuaga accaaccuaa acccgu 96

<210> 384
15 <211> 97
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 384

caguguagug agaaguuggg ggguggaac ggcguaucg aggaguugau ugcacagcca 60
uucagcuccu auauaugcc uuucucacc cccuua 97

<210> 385
20 <211> 98
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 385

caacgugca caggccgucc ucccacaaca uaucuggug cugagugggu gcacagugac 60
uccagcauca gugauuuugu ugaagagggc agcugcca 98

<210> 386
25 <211> 96
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
30 <400> 386

acgggguggc cacuaaccu guccuccagg agcucacgua ugccugccug ugagcgccuc 60
ggcgacagag ccggugucca cccugcacu guccac 96

<210> 387
35 <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
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 388

aaaauauga ugucaguugg ccggucggcc gaucgucgg ucugucaguc agucggucgg 60
 ucgaucgguc ggucggucag ucggcuuccu gucuuc 96

<210> 389
 <211> 99
 10 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 389

gaaaaugggc ucaaggugag gggugcuauc ugugauugag ggacaugguc aauggaaug 60
 ucucacacag aaaucgcacc cgucaccuug gccucguga 99

<210> 390
 15 <211> 95
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 390

cugcagccag gguuuuuacc agucaggcuc cuggcuagau uccagguacc agcugguacc 60
 ugaucuagcc aaagccugac uguaagcccu gaaca 95

<210> 391
 20 <211> 96
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 391

acccaagucc aggccugcug accccuaguc cagugcuugu gguggcuacu gggcccugaa 60
 cuagggguc ggagaccugg guuugaucuc cacagg 96

<210> 392
 25 <211> 98
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 392

ucuguguugg gcgucugucu gcccgaguc cugccucucu guugcucuga aggaggcagg 60
 ggcugggccu gcagcugccu gggcagagcu gcuccuuc 98

<210> 393
 35 <211> 99
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 393

agaugccuug cuccuacaag aguaaagugc augcgcuug ggacagugag gaaaauaag 60
uucacaaagc ccuacacuu ucacccuuu ggagaguug 99

<210> 394
 <211> 98
 <212> ARN
 5 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 394

ugggcuccua ggaagaggua guagguugca uaguuuagg gcagagauuu ugcccacaag 60
gaguuuacua uacgaccugc ugccuuucuu agggccuu 98

<210> 395
 <211> 97
 10 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 395

uguuggccua guucugugug gaagacuagu gauuuuguug uuuuuagaua acuaagacga 60
caacaaauca cagucugcca uauggcacag gccaccu 97

<210> 396
 <211> 94
 15 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 396

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

<210> 397
 <211> 96
 20 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 397

cggcaugcuc ccaggcugag guaguagguu guauaguua gaguacaac aaggagaua 60
acuguacagc cuccuagcuu uccuugggac uugcac 96

<210> 398
 <211> 85
 25 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 30 <400> 398

gcggggugag guaguagguu gugugguuuc agggcaguga ugucgccccu ccgaagauaa 60
cuauacaacc uacugccuuc ccuga 85

<210> 399
 <211> 94
 35 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 399

ES 2 534 304 T3

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

<210> 400
<211> 95
<212> ARN
5 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 400

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

<210> 401
<211> 93
10 <212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 401

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

<210> 402
15 <211> 89
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 402

aucagaguga gguaguagau uguauaguug uggguagug auuuuacccu guuuaggaga 60
uaacuauaca aucuauugcc uccccugag 89

<210> 403
20 <211> 83
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 403

uguggauga gguaguagau uguauaguuu uagggucaua ccccaucuug gagauaacua 60
uacagucuaC ugucuuucc acg 83

<210> 404
25 <211> 85
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 404

cuggcugagg uaguaguug ugcuguuggu cggguuguga cauugccccg uguggagaua 60
acugcgcaag cuacugccuu gcuag 85

<210> 405
35 <211> 95
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

ES 2 534 304 T3

<400> 405

ggacagacca gcccgucug gaagacuagu gaaaauguug uugugucugu guccaacaac 60
aaguccagu cugccacaug guguugguca cauca 95

<210> 406

<211> 110

5 <212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 406

aggccagaac acaugagcca augcuauug gaagacuugu gaaaauguug uucugauaug 60
auaugacaac aagucacagc cagccucaua gaguggacuc ccaucaccuu 110

<210> 407

10 <211> 89

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 407

cgggguuggu uguuauuuu gguuaucuag cuguauugagu gguguggagu cuucauaaag 60
cuagauaacc gaaaguaaa auaacccca 89

15 <210> 408

<211> 90

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 408

ggaggcccgu uucucucuuu gguuaucuag cuguauugagu gccacagagc cgucauaaag 60
cuagauaacc gaaaguagaa augacucuaa 90

20 <210> 409

<211> 87

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

25 <400> 409

ggaagcgagu uguuauuuu gguuaucuag cuguauugagu guauuggucu ucauaaagcu 60
agauaaccca aaguaaaaac uccuuca 87

<210> 410

<211> 110

<212> ARN

30 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 410

gaccugucug ucuucuguau auaccugua gauccgaauu uguguaagga auuuuguggu 60
caciaauucg uaucuagggg aauauguagu ugacauaaac acuccgcuca 110

<210> 411

<211> 109

35 <212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 411

ccaaaguugu aacguugucu auauauacc uguagaaccg aauugugug guaccacau 60
agucacagau ucgauucuag gggauauau ggucgaugca aaaacuua 109

<210> 412

<211> 98

5 <212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 412

uuggaacuu aaaguacugu agcagcacau caugguuuac auacuacagu caagaugcga 60
aucuuuuuu gcugcucuag aaauuaag aaauucau 98

<210> 413

10 <211> 95

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 413

cauacuuguu ccgcucuagc agcacguaaa uauuggcgua gugaaauaaa uauuaaacac 60
cauuuuuuu gugcugcuuu agugugacag ggaua 95

15 <210> 414

<211> 84

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 414

gucaggauaa ugucaaagug cuuacagugc agguaguggu gugugcaucu acugcaguga 60
aggcacuugu ggcauugugc ugac 84

20 <210> 415

<211> 96

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

25 <400> 415

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

<210> 416

<211> 87

<212> ARN

30 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 416

cacuggucua ugguuaguuu ugcagguuug cauccagcug uauaaauuc ugcugugcaa 60
aucaugcaa aacugacugu gguggug 87

35 <210> 417

<211> 96

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 417

ES 2 534 304 T3

acauugcuac uuacgguuag uuuugcagau uugcaguuca gcguauaugu ggauauaugg 60
cugugcaaa u ccaugcaaaa cugauuguga ugaugu 96

<210> 418
<211> 82
<212> ARN

5 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 418

gcagcccucu guucguuuug cauaguugca cuacaagaag aauguaguug ugcaaaucua 60
ugcaaaacug augguggccu gc 82

<210> 419
<211> 85
<212> ARN

10 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 419

cagcuucugu agcacuaaag ugcuuauagu gcagguagug ugucgucauc uacugcauuu 60
cgagcacuuu caguacugcc agcug 85

<210> 420
<211> 92
<212> ARN

15 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 420

uguaccaccu ugucggguag cuuaucagac ugauguugac uguugaauuc cauggcaaca 60
gcagucgaur ggcugucuga cauuuuggua uc 92

<210> 421
<211> 95
<212> ARN

20 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 421

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

<210> 422
<211> 75
<212> ARN

25 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 422

cggccggcug ggguuuccug ggauugggauu ugaugccagu cacaaaucau auugccaggg 60
auuuccaacu gaccc 75

<210> 423
<211> 97
<212> ARN

35 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 423

cucaccugcu cuggcugcuu ggguuuccugg caugcugauu ugugacuuga gauuaaaauc 60
 acauugccag ggauuaccac gcaaccauga ccuuggc 97

<210> 424
 <211> 68
 <212> ARN
 5 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 424

cuccggugcc uacugagcug auaucaguuc ucauuucaca cacuggcuca guucagcagg 60
 aacaggag 68

<210> 425
 <211> 108
 10 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 425

gccucuccu gggcuccgcc uccugugccu acugagcuga aacaguugau uccagugcac 60
 uggcucaguu cagcaggaac aggaguccag ccccauagg agcuggca 108

<210> 426
 <211> 84
 15 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 426

ggccaguguu gagagggcga gacacgggca auugcuggac gcugcccugg gcauugcacu 60
 ugucucgguc ugacagugcc ggcc 84

<210> 427
 <211> 90
 20 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 427

aaggccgugg ccuuguucaa gaaauccagg auaggcugug cagguccaa ggggccuauu 60
 cuugguuacu ugcacgggga cgcgggcccug 90

<210> 428
 <211> 85
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 30 <400> 428

ugcccgggac ccaguucaag uaaucagga uagguugugg ugcuggccag ccuguucucc 60
 auuacuuggc ucgggggccc gugcc 85

<210> 429
 <211> 97
 <212> ARN
 35 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 429

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

- <210> 430
- <211> 87
- <212> ARN
- 5 <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 430

uggccugugg agcagggcuu agcugcuugu gagcaagguc uacagcaaag ucguguucac 60
 aguggcuaag uuccgcccc uggaccc 87

- <210> 431
- <211> 86
- 10 <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 431

ggucccuacc cgcaaggagc ucacagucua uugaguuccu uuucugauuc ucccacuaga 60
 uugugagcuc cuggagggca ggcacu 86

- <210> 432
- 15 <211> 81
- <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 432

cuucuggaag cugguuucac augguggcuu agauuuuucc aucuuuguau cuagcaccau 60
 uugaaaucag uguuuuagga g 81

- <210> 433
- 20 <211> 88
- <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 433

accccuuaga ggaugacuga uuucuuuugg uguucagagu caauagaauu uucugacacc 60
 aucugaaauc gguuauaaug auugggga 88

- <210> 434
- 25 <211> 81
- <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- 30 <400> 434

cuucaggaag cugguuucan auggugguuu agauuuuuu agugauuguc uagcaccan 60
 ugaaaucagu guucuuuggug g 81

- <210> 435
- <211> 88
- <212> ARN
- 35 <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 435

aucucuuaaca caggcugacc gauuucuccu gguguucaga gucuguuuuu gucuagcacc 60
 auuugaaauc gguuaugaug uaggggga 88

- <210> 436
- <211> 89
- <212> ARN
- 5 <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 436

accauguugu agugugugua aacauccuac acucucagcu gugagcucaa gguggcuggg 60
 agagggguugu uuacuuccuuc ugccaugga 89

- <210> 437
- <211> 64
- 10 <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 437

cuguaaacau ccuugacugg aagcuguaag guguugagag gagcuuucag ucggauguuu 60
 acag 64

- <210> 438
- 15 <211> 87
- <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 438

ccgaguuuca guucauguaa acauccuaca cucagcuguc auacaugagu uggcugggau 60
 guggauguuu acgucagcug ucuugga 87

- <210> 439
- 20 <211> 82
- <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 439

aagucugugu cuguaaacau ccccgacugg aagcuguaag ccacagccaa gcuuucaguc 60
 agauguuugc ugcuaucuggc uc 82

- <210> 440
- <211> 71
- 25 <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- 30 <400> 440

gcaacuguaa acauccucga cuggaagcug ugaagccaca aaugggcuuu cagucggau 60
 uuugcagcug c 71

- <210> 441
- <211> 84
- <212> ARN
- 35 <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 441

gagugacaga uacuguaaac auccuacacu cucagcugug aaaaguaaga aagcugggag 60
aaggcuguuu acucucucug ccuu 84

<210> 442
 <211> 106
 <212> ARN
 5 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 442

ugcuccugaa acuuggaacu ggagaggagg caaugcug gcauagcugu ugaacugaga 60
accugcuang ccaacauuu gccaucuuuc cugucugaca gcagcu 106

<210> 443
 <211> 70
 10 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 443

ggggauauug cacauacua aguugcaugu ugucacggcc ucaaugcaau uuagugugug 60
ugauauucuc 70

<210> 444
 15 <211> 69
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 444

ccguggugca uuguaguugc auugcauguu cuggcaguac cugugcaaug uuuccacagu 60
gcaucacgg 69

<210> 445
 20 <211> 84
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 445

gugcucgguu uguaggcagu guaaauagcu gauuguagug cggugcugac aaucacuaac 60
uccacugcca ucaaaaacaag gcac 84

<210> 446
 <211> 77
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 30 <400> 446

agucuaguua cuaggcagug uaguuagcug auugcuaaua guaccaauca cuaaccacac 60
agccagguaa aaagacu 77

<210> 447
 <211> 102
 <212> ARN
 35 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 447

ccggcuguga gaaauucuuu ggcagugucu uagcugguug uuugaguau uagcuaagga 60
agcaaucagc aaguauacug ccuagaagu gcugcacguu gu 102

<210> 448
<211> 78
<212> ARN
5 <213> *Rattus norvegicus*
<400> 448

cuuucuaacac agguugggau uugucgcaau gcuguguuuc uguauaguau ugcacuuguc 60
ccggccuguu gaguuugg 78

<210> 449
<211> 92
10 <212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*
<400> 449

ugcccauucca uccacaggug gggauuagug ccauuacuug uguuagauaa aaaguauugc 60
acuugucccg gccugaggaa gaaaagaggg uu 92

<210> 450
15 <211> 87
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*
<400> 450

agucaugggg gcuccaaagu gcuguucgug cagguagugc auugccugac cuacugcuga 60
gcuagcacuu cccgagcccc caggaca 87

<210> 451
20 <211> 106
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*
<400> 451

ccaguaccuu cugcuuggcc gauuuuggca cuagcacuu uuugcuugug ucucuccgcu 60
cugagcaauc augugcagug ccaauauggg aaaagcgggc ugcugc 106

<210> 452
25 <211> 80
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*
30 <400> 452

gugagguagu aaguuguauu guugugggu agggauuuua ggcccaaua agaagauaac 60
uaaacaacuu acuaCuuuCC 80

<210> 453
<211> 81
35 <212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*
<400> 453

cccauggca uaaacccgua gauccgaucu uguggugaag uggaccgcac aagcucguuu 60
 cuagggucu guggcagugu g 81

- <210> 454
- <211> 70
- <212> ARN
- 5 <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 454

ggacccacc cguagaaccg accuugcggg gccuucgccc cacacaagcu cgugucugug 60
 gguccguguc 70

- <210> 455
- <211> 80
- 10 <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 455

ccugugcca caaacccgua gauccgaacu ugugcgugacc augcacacaa gcuugugucu 60
 auagguaugu gucuguuagg 80

- <210> 456
- <211> 97
- 15 <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 456

aucugagacu gaacuguccu uuuccgguua ucaugguacc gaugcuguag aucugaaagg 60
 uacuguacug ugauagcuga agauggugg ugccauc 97

- <210> 457
- <211> 75
- 20 <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 457

ugcccuggc caguaucac agugcgugaug cuguccauuc uaaagguaca guacugugau 60
 aacugaagga uggca 75

- <210> 458
- <211> 86
- <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- 25
- 30 <400> 458

guucgugc uuucagcuuc uuacagugc ugccuguag cauucagguc aagcagcauu 60
 guacagggcu augaaagaac caagaa 86

- <210> 459
- <211> 86
- <212> ARN
- 35 <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 459

uuuuuacugc ccucggcuuc uuuacagugc ugccuuguug cauauuggauc aagcagcauu 60
guacagggcu augaaggcau ugagac 86

- <210> 460
- <211> 82
- <212> ARN
- 5 <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 460

ccugcuggga cuaaagugcu gacagugcag auaguggucc ucucugugcu accgcacugu 60
ggguacuugc ugcuccagca gg 82

- <210> 461
- <211> 87
- 10 <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 461

uucucucugc uuuuagcuuc uuuacagugu ugccuugugg cauggaguuc aagcagcauu 60
guacagggcu aucaaagcac agagagc 87

- <210> 462
- 15 <211> 85
- <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 462

ccuuagcaga gcucuggagu gugacaaugg uguuuguguc caaaacauca aacgccauca 60
ucacacuaaa cagcuacugc uaggc 85

- <210> 463
- 20 <211> 87
- <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 463

ugagggcccc ucugcguguu cacagcggac cuugauuuuaa ugucuauaca auuaaggcac 60
gCGGUGAAUG ccaagagagg cgccucc 87

- <210> 464
- <211> 85
- <212> ARN
- 25 <213> *Rattus norvegicus*

- 30 <400> 464

aggccucucu cuccguguuc acagcggacc uugauuuuaa uguccauaca auuaaggcac 60
gCGGUGAAUG ccaagaugg ggcug 85

- <210> 465
- <211> 109
- 35 <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 465

ES 2 534 304 T3

aucaagauca gagacucugc ucuccguguu cacagcggac cuugauuuuaa ugucauacaa 60
 uuaaggcacg cggugaaugc caagagcggg gccuacggcu gcacuugaa 109

<210> 466
 <211> 85
 <212> ARN
 5 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 466

ugccggccuc uggguccug agaccuuua accugugagg acguccaggg ucacagguga 60
 gguuccuuggg agccuggcgc cuggc 85

<210> 467
 <211> 87
 10 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 467

ugcgcucucc ucaguccug agaccuaac uugugauguu uaccguuuua auccacgggu 60
 uaggcucuug ggagcugcga gucgugc 87

<210> 468
 <211> 88
 15 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 468

accagacuuu uccuagucc ugagaccua acuugugagg uauuuuagua acaucacaag 60
 ucaggcucuu gggaccuagg cggagagg 88

<210> 469
 <211> 73
 20 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 469

ugacagcaca uuauuacuu ugguacgcdc ugugacacuu caaacucgua ccgugagua 60
 uaaugcgugg uca 73

<210> 470
 <211> 97
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 30 <400> 470

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

<210> 471
 <211> 82
 <212> ARN
 35 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 471

ugagcuguug gauucggggc cguagcacug ucugagaggu uuacauuucu cacagugaac 60
cggucucuuu uucagcugcu uc 82

<210> 472

<211> 84

<212> ARN

5 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 472

ugugcagugg gaaggggggc cgaugcacug uaagagagug aguagcaggu cucacaguga 60
accggucucu uucccuacug uguc 84

<210> 473

<211> 97

10 <212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 473

agacugcccu ucgcgaaucu uuuugcgguc ugggcuugcu guacauaacu caauagccgg 60
aagcccuuac cccaaaaagc auucgcggag ggcgcgc 97

<210> 474

15 <211> 72

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 474

ugggucuuuu ugcggucugg gcuugcuguu cucuccacag uagucaggaa gcccuuacc 60
caaaaaguau cu 72

20 <210> 475

<211> 88

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 475

ugcugcuggc cggagcucu uucacauugu gcuacugucu acacguguac cgagcagugc 60
aauguuaaaa gggcaucggc cuuguagu 88

25 <210> 476

<211> 82

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

30 <400> 476

ggcuugcugg acacucuuuc ccuguugcac uacugugggc cucugggaag cagugcaaug 60
augaaagggc auccgucagg cc 82

<210> 477

<211> 101

<212> ARN

35 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 477

ccgccccgc gucuccagg caaccgugg uuucgauugu uacuguggga accggaggua 60
 acagucuaca gccauggucg ccccgcagca cgcccacgcu c 101

<210> 478
 <211> 87
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

5

<400> 478

caaugcuug cuaaagcugg uaaauggaa ccaaauccg ucuucaaug auuuggucc 60
 cuucaaccag cuguagcuau gcauuga 87

<210> 479
 <211> 73
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

10

<400> 479

cagggugugu gacugguuga ccagaggggc gugcacuug uucaccuugu gggccaccua 60
 gucaccaacc cuc 73

<210> 480
 <211> 97
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

15

<400> 480

cgucucgucg uggccuagg cuuuucauuc cuaugugauu gcuguuccga acucauguag 60
 ggcuaaaagc caugggcuaac agugaggggc aagcucc 97

<210> 481
 <211> 100
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

20

<400> 481

agauaaaauuc acucuagugc uuuauggcuu uuuaauccua ugugaucgua auaaagucuc 60
 auguagggau ggaagccaug aaauacauug ugaaaauua 100

25

<210> 482
 <211> 82
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

30

<400> 482

ugagcccucg gaggacucca uuuguuuuga ugauggauuc uuaagcucca ucaucgucuc 60
 aaauagucuc ucagaggguu cu 82

<210> 483
 <211> 102
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

35

<400> 483

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

<210> 484
 <211> 82
 <212> ARN
 5 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 484

guugcugcag cugguguugu gaucaggcc gacgagcaac gcauccucuu acccggcuau 60
 uucacgacac cagggguugca cc 82

<210> 485
 <211> 99
 10 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 485

cucuggcaug guguguggg acagcuggug uugugaauc ggccguugcc aaucagagaa 60
 cggcuacuuc acaacaccag ggucucacug cacugcagg 99

<210> 486
 <211> 68
 15 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 486

guguauucua cagugcacgu gucuccagug uggcucggag gcuggagacg cggcccuguu 60
 ggaguaac 68

<210> 487
 <211> 99
 20 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 487

gugucucucu cuguguccug ccagugguuu uaccuauagg uagguuacau caugcuguuc 60
 uaccacaggg uagaaccacg gacaggauac uggagcacc 99

<210> 488
 <211> 94
 25 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 30 <400> 488

ggcugacucu gaguccaucu uccagugcag uguuggaugg uugaaguacg aagcuccuaa 60
 cacugucugg uaaagauggc ccccggguca guuc 94

<210> 489
 <211> 87
 <212> ARN
 35 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 489

gacagugcag ucacccauaa aguagaaagc acuacuaaca gcacuggagg guguguguu 60
uccuacuuua uggaugagug uacugug 87

<210> 490
 <211> 105
 <212> ARN
 5 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 490

gCGGAGCGCC uGUCUCCcag ccugaggugc agugcugcau cucuggucag uugggagucu 60
gagaugaagc acuguagcuc aggaagggag aagauguucu gcagc 105

<210> 491
 <211> 83
 10 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 491

gggCCUggc ugggauauca ucauauacug uaaguugug augagacacu acaguauaga 60
ugauguacua gucuggguac ccc 83

<210> 492
 15 <211> 88
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 492

caccuugucc ucacggucca guuuucccag gaaucccuug gaugcuaaga uggggauucc 60
uggaaaauacu guucuuugagg ucauggcu 88

<210> 493
 20 <211> 95
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 493

uguguauccu cagcucugag aacugaauuc cauggguuuu agcaauguca gaccugugaa 60
guucaguucu uuagcuggga uagcucuauc gucau 95

<210> 494
 <211> 97
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 25 <400> 494

caggcacucu uagcauuuga ggugaaguuc uguuauacac ucaggcugug gcucugaaag 60
ucagugcauc acagaaauuu gucucgaaag cuuucua 97

<210> 495
 <211> 85
 <212> ARN
 35 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 495

cuucucaagg cccugucucc caacccuugu accagugcug ugccucagac ccugguacag 60
gccuggggga cagggacuug gggac 85

<210> 496
 <211> 97
 <212> ARN
 5 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 496

agcgcuuucc ugcccucgag gaggcucacag ucuaguaugu cuccuccua cuagacugag 60
gcuccuugag gacagggau c gUCAUACUcA ccucccg 97

<210> 497
 <211> 85
 10 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 497

uguuCCCCgg gccagguuc ugugauacac uccgacucgg gcucuggagc agucagugca 60
ugacagaacu ugggcccggg aggac 85

<210> 498
 <211> 87
 15 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 498

agcgguggcc agugucuuu uugugaugu gcagcuagua auaugagccc aguugcauag 60
ucacaaaagu gaucauugga aacugug 87

<210> 499
 <211> 84
 20 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 499

gCGGUGCUUG aagauagguu auccgugug ccuucgcuuu auucgugacg aaucuuacac 60
gguugaccua uuuuucagua ccaA 84

<210> 500
 <211> 106
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 25
 30 <400> 500

agaacuugcc aaggguuugg gggaacauuc aaccugucgg ugaguuuugg cagcucagac 60
aaaccaucga ccguugagug gaccccagag ccuggaacug ccaccc 106

<210> 501
 <211> 117
 <212> ARN
 35 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 501

agaugggcaa ccaaggcagc cuuaagagga cuccauggaa cauucaacgc ugucggugag 60
uuuggggauc aaaaacaaaa aaaaccacca accguugacu guaccuuggg auucuua 117

- <210> 502
- <211> 110
- <212> ARN
- 5 <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 502

ccugugcaga gaugauguuu acaaagguca caucaacau ucauugcugu cgguggguug 60
aacuguguag aaaagcucac ugaacaauga augcaacugu ggccccgcuu 110

- <210> 503
- <211> 88
- 10 <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 503

ugauggcugc acucaacauu cauugcugc gguggguuug aaugucaacc aacucacugg 60
ucaaugaaug caaacugcgg gccaaaaa 88

- <210> 504
- 15 <211> 110
- <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 504

ccagagagug ugacuccugu ccuguguauug gcacugguag aaucacugu gaacagucuc 60
ggucagugaa uuaccgaagg gccauaaaca gagcagagac agauccgcga 110

- <210> 505
- 20 <211> 77
- <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 505

cauuuuccu uaucaguuuu ccagccagcu uugugacugu aauguugga cggagaacug 60
auaaggguaa gugacug 77

- <210> 506
- <211> 80
- <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- 30 <400> 506

gggggugagg gauuggagag aaaggcaguu ccugaugguc cccucccagg ggcuggcuuu 60
ccucuggucc uucucucca 80

- <210> 507
- <211> 86
- <212> ARN
- 35 <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 507

ugcuuacaac uuuccaaaga auucuccuuu ugggcuuucu cauuuuuuu uaagcccaa 60
ggugaauuuu uugggaagu ugagcu 86

- <210> 508
- <211> 104
- <212> ARN
- 5 <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 508

gggcucacag gacacaugc ggauccucag gcuacaacac aggacccggg cgcugcucug 60
accccucgug ucuuguguug cagccggagg gacgcagguc ugca 104

- <210> 509
- <211> 85
- 10 <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 509

ugcaggccuc ugugugauau guuugauua uuagguuguu auuuaucca acuauauauc 60
aagcauauuc cuacaguguc uugcc 85

- <210> 510
- 15 <211> 91
- <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 510

ggcuggacag cgggcaacgg aaucacaaa gcagcuguug ucuccagagc auuccagcug 60
cacuuggauu ucguucccug cucuccugcc u 91

- <210> 511
- 20 <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*
- 30 <400> 512

gcggacggga gcugagagcu gggucuuugc gggcaagaug agggugucag uucaacuggc 60
cuacaaaguc ccaguuccug gcuccc 86

- <210> 513
- <211> 83
- <212> ARN
- 35 <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 513

auggagucau cacguguaac agcaacucca uguggacug gcacagaucc caguggagcu 60
 gcuguuacu ugauggccu cca 83

- <210> 514
- <211> 85
- <212> ARN
- 5 <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 514

uggcucccac ccccuguaac agcaacucca uguggaagug cccacugauu ccaguggggc 60
 ugcuguuauc ugggguggag gcugg 85

- <210> 515
- <211> 87
- 10 <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 515

aacucuccug gcucuagcag cacagaaaua uuggcacggg uaagugaguc ugccaauauu 60
 ggcugugcug cuccaggcag gguggug 87

- <210> 516
- <211> 110
- 15 <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 516

uguuugcuca gcugaucugu ggcuuaggua guucaugu gugggaug aguuugaac 60
 ucggcaacaa gaaacugccu gaguuacauc agucgguuuu cgucgggggc 110

- <210> 517
- <211> 110
- 20 <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 517

uggaagcuuc uggagauccu gcuccgucggc cccaguguuc agacuaccug uucaggacaa 60
 ugccguugua caguagucug cacauugguu agacuggggca agggccagca 110

- <210> 518
- <211> 69
- <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- 25 <400> 518

cccucgucuu acccagcagu guuugggugc uggugggag ucucuaauac ugccggguaa 60
 ugauggagg 69

- <210> 519
- <211> 89
- <212> ARN
- 35 <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 519

cugggccucu gugggcaucu uaccggacag ugcuggauuu cuuggcuuga cucuaacacu 60
gucugguaac gauguucaa ggugacca 89

- <210> 520
- <211> 95
- <212> ARN
- 5 <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 520

ccaacuuggg cagccguggc caucuacug ggcagcauug gauagugucu gaucucuaau 60
acugccuggu aaugaugacg gcggagcccu gcacg 95

- <210> 521
- <211> 97
- 10 <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 521

gcgcgccugg uccagugguu cuuaacaguu caacaguucu guagcgcaau ugugaaaugu 60
uuaggaccac uagaccggc gcgcacggca gcggcga 97

- <210> 522
- 15 <211> 110
- <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 522

ggcuacagcc cuucucaug ugacucgugg acuuccuuu gucauccuau gccugagaau 60
auaugaagga ggcugggaag gcaaaggac guucaauugu caucacuggc 110

- <210> 523
- 20 <211> 108
- <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 523

aaacagcccc agacaaucca uggguccucc uguccuucan uccaccggag ucugucuau 60
gccaaccaga uuucagugga gugaagcuca ggaggcaugg agcugcca 108

- <210> 524
- <211> 84
- <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- 30 <400> 524

uuccccagg ccacaugcuu cuuuauaucc ucauagauau cacugcgua uggaauguaa 60
ggaagugugu gguuuuggca agug 84

- <210> 525
- <211> 83
- <212> ARN
- 35 <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 525

ES 2 534 304 T3

uuccuuugac gggugagcuu uuggccccggg uuauaccuga cucucacgua uaagacgagc 60
 aaaaagcuug uggucagag gag 83

- <210> 526
- <211> 110
- <212> ARN
- 5 <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 526

ccggggcagu ccuuccaggc ucaggacagc cacugcccac agcacacugc guugcuccgg 60
 acccaacugug cgugugacag cggcugaucu gucccugggc agcgcgaacc 110

- <210> 527
- <211> 106
- 10 <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 527

cagcuuggac cugugaccuc ugggcuuccc uuugucaucc uuugccuagg ccucugagug 60
 gggcaaggac agcaaagggg ggcucagugg ucaccucuac ugcaga 106

- <210> 528
- 15 <211> 111
- <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 528

cgggauaucc ccgccccggc agcgcgccgg caccuuggcu cuagacugcu uacugccccg 60
 gccgcccua gaaacagucu ccagucacgg ccaccgacgc cuggccccgc c 111

- <210> 529
- 20 <211> 100
- <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- <400> 529

agguugcuuc agugaacauu caacgcuguc ggugaguuuug gaauucaaau aaaaaccauc 60
 gaccguugau uguaccuau agcuuaccuau uaucuacucc 100

- <210> 530
- 25 <211> 110
- <212> ARN
- <213> *Rattus norvegicus*
- 30 <400> 530

guccuggaug gacagaguug ucaugugucu gccugucuac acuugcugug cagaacauc 60
 gcucaccugu acagcaggca cagacaggca gucacaugac aaccagccu 110

- <210> 531
- <211> 106
- <212> ARN
- 35 <213> *Rattus norvegicus*

ES 2 534 304 T3

<400> 531

guuagcuaug aguuaguuua aucucagcug gcaacuguga gauguccua ucauuccua 60
caguggucuc uggauuaug cuaaacagag caauuuccuu gaccuc 106

<210> 532

<211> 105

5 <212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 532

accacaguca uuguaguuuu gaugucgcag auacugcauc aggaacugac uggauaagac 60
ucagucacca ucaguuccua augcauugcc uucagcaucu aaaca 105

<210> 533

10 <211> 110

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 533

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

15 <210> 534

<211> 110

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 534

20 gugauaacgu agcgagauuu ucuguugugc uugaucuaac caugugcuug cgagguauga 60
guaaaacaug guuccgucaa gcaccaugga acgucacgca gcuuucuaca 110

<210> 535

<211> 110

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

25 <400> 535

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

<210> 536

<211> 96

<212> ARN

30 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 536

acucaggggc uucaccacug auuguccaaa cgcaauucuu guacgagucu gcggccaacc 60
gagaauugug gcuggacauc ugugguugag cuccgg 96

<210> 537

<211> 109

35 <212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

ES 2 534 304 T3

<400> 537

ugaauaucca ggucuggggc augaaccugg cauacaagu agauuucugu guuuguuagg 60
caacagcuac auugucugcu ggguuucagg cuaccuggaa gcauuucuc 109

<210> 538

<211> 103

5 <212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 538

aaggauuagg gugcccucag uggcucagua gccaguguag auccugucuu ugguaaucag 60
cagcuacauc uggcuacugg gvcucugaug gcaucaucua gcu 103

<210> 539

10 <211> 110

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 539

ucuggccuuc ugcaguguua cgcuccgugu auuugacaag cugaguugga cacucugugu 60
gguagagugu caguuuugca aaauaccccaa guguggcuca ugcuuaucag 110

15 <210> 540

<211> 81

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 540

ucauucucg guucuaaac uaugggggca cuuuuuuuuu cuuuuuuuuu ugcggccagg 60
uuuuagggcc ugccgguuga g 81

20

<210> 541

<211> 82

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

25 <400> 541

ccgguguagu agccaucaaa guggaggccc ucucuugggc ccgagcuaga aagugcuucc 60
acuuugugug ccacugcaug gg 82

<210> 542

<211> 82

<212> ARN

30 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 542

caaccuguga uacucuaacu gggggcucuu uuggguuuuc uuuggaagaa aagugccgcc 60
agguuuugag uguuaccgau ug 82

<210> 543

<211> 78

35 <212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 543

ggaccuuucu ggagggcccc ccucaaucc uguugugcuc gcuucagagg guugggugga 60
ggcucuccug aagguguc 78

5 <210> 544
<211> 68
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*
<400> 544

uauuguauua uguauuguau uaugcaugua ugugugcaug uaugcaugca ugcauguau 60
uauuguau 68

10 <210> 545
<211> 82
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*
<400> 545

ccaggccuuc ggcagaggag ggcuguucu cccuuggguu uauugacugg gaggaacuag 60
ccuucucucu gcuuaggagu gg 82

15 <210> 546
<211> 63
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

20 <400> 546

aagaaauggu uuaccgucce acauacauuu ugaguauua ugugggacgg uaaaccgcuu 60
cuu 63

25 <210> 547
<211> 79
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*
<400> 547

gcuacuugaa gagagguuau ccuuugugug uuugcuuac gcgaaaugaa uaugcaaggg 60
caagcucucu ucgaggagc 79

30 <210> 548
<211> 100
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*
<400> 548

ccugcuggcu acugcugacg acugcucuga cuuuauugca cuacuguacu guacagcuag 60
cagugcaaua guauuguaa agcauccggg agcaggcuac 100

35 <210> 549
<211> 82
<212> ARN

ES 2 534 304 T3

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 449

gccucgcugu ccuccgccuu cucuucccgg uucuucccgg agucgggaaa agcuggguug 60
agagggcgaa aaaggauaug gg 82

<210> 550

5 <211> 59

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 550

uuggccuccu aagccagga uuguggguuc gagucccacc cgggguaaga gguuguguu 59

<210> 551

10 <211> 95
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 551

ccucgcugac uccgaagga ugcagcagca auucauguuu uggaguauug ccaagguuca 60
aaacaugaag cgcugcaaca ccccuucgug ggaaa 95

15 <210> 552
<211> 86
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

20 <400> 552

uugguacuug gagagaggug guccguggcg cguucgcuuc auuuauggcg cacauuacac 60
ggucgaccuc uuugcgguau cuaauc 86

25 <210> 553
<211> 83
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*
<400> 553

cugacuauug cuccucgcau ccccuagggc auugguguaa agcuggagac ccacugcccc 60
aggugcugcu gggguugua guc 83

30 <210> 554
<211> 98
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*
<400> 554

auauagugcu ugguuccuag uaggugcuca guaaguguuu gugacauau ucguuuauug 60
agcaccuccu aucaaucaag cacugugcua ggcucugg 98

35 <210> 555
<211> 95
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

ES 2 534 304 T3

<400> 555

cucaucuguc ugugggguc ggggcagggc cuuugugaag gcggguuaug cucagaucgc 60
 cucugggccc uuccuccagu cccgaggcag auuuu 95

<210> 556

<211> 84

5 <212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 556

uggggcaggg gggcaggagg ggcucagggg gaaagcaucu acagccccug gccucucug 60
 cccuuccguc cccugucucc aaau 84

<210> 557

10 <211> 97

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 557

uguucgcuuc ugguaccgga agagagguuu ucugggucuc uguuucuuug augagaauga 60
 aacacacca gcuaaccuuu uuuucaguau caaucc 97

<210> 558

15 <211> 97

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 558

accuuuggc gaucucugcc ucucugggcc ugugucuuag gcucuuaag aucuaaccgag 60
 caaagcacag ggccugcaga gagguagcgc ucugcuc 97

20

<210> 559

<211> 96

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

25 <400> 559

gagucugguc uuguuvggu uuguucuagg uauggucca gggauccag aucaaaccgag 60
 gccccugggc cuauccuaga accaaccuaa acccau 96

<210> 560

<211> 95

<212> ARN

30 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 560

ccccggugga accacguggu gugcuaguua cuuuugggcu ggagagacgg cucagggguu 60
 aagagcacag acugcucuuc cagagguccu gaguu 95

<210> 561

<211> 96

<212> ARN

35 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 561

augugaccgu gccucacacc cuuccauauc uagucucuga gaaaaaugaa gacuggauuc 60
caugaagga ugugaggccu ggaaacugga gcuuaa 96

<210> 562
<211> 97
<212> ARN
5 <213> *Rattus norvegicus*
<400> 562

aguguaguga gaaguugggg ggugggaacg gcgucaugca ggaguugauu gcacagccau 60
ucaguccua uaugaugccu uucuuacacc ccuuaa 97

<210> 563
<211> 66
10 <212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*
<400> 563

uccccaacaa uauccuggug cugagugggu gcacagugac uccagcauca gugauuuugu 60
ugaaga 66

<210> 564
15 <211> 96
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*
<400> 564

acggggugga caccgucccu guccuccagg agcucacgua ugccugccug ugagcggcuc 60
gacgacagag ccagagucca cccugcacu gcccaa 96

<210> 565
20 <211> 96
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*
<400> 565

aaaaugauga ugucaguugg ccggucggcc gaucgcucgg ucugucaguc agucggucgg 60
ucgaucgguc ggucggucag ucggcuuccu gucuuc 96

<210> 566
25 <211> 99
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*
30 <400> 566

gaaaaugggc ucaaggugag gggugcuauc ugugauugag ggacaugguc aauggaaauug 60
ucucacacag aaaucgcacc cgucaccuug gccucuga 99

<210> 567
35 <211> 98
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*
<400> 567

cugcagccag aguuuuuacc agucaggcuc cuggcuagau uccagguacc aacugguacc 60
ugaucuagcc aaagccugac cguagcugc aaaagaaa 98

5 <210> 568
 <211> 96
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 568

acccaagucc aggccugcug accccuaguc cagugcuugu gguggcuacu gggcccugaa 60
cuaggggucu ggagaccugg guuugaucuc cacagg 96

10 <210> 569
 <211> 98
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 569

ucuguguugg gcaucugucu gccugagugc cugccucucu guugcucuga aggaggcagg 60
ggcugggccu gcagcugccu gggcagagcu gcuccuuc 98

15 <210> 570
 <211> 97
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 570

gaagacucua gcauguaagg uugggggagg gggcuguguc uagcaagucu ucuuuuuuuu 60
cagcccugcu gucuuaaccu cuagguguuc cggcucc 97

20 <210> 571
 <211> 99
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 571

agaugccuug cuccuacaag aguuaagugc acgugcuuug ggacagugag gaaaauaaug 60
uuacacaaag ccuuaacuu ucacccuuua ggagaguug 99

25 <210> 572
 <211> 81
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

30 <220>
 <223> Descripción de Molécula de ADN/ARN Combinada:c
 <400> 572

cauggcaccu ccuuuuuccu gaggagcccu uugagccuga ggugaaaaaa aaacagguca 60
agaggcgccu gggaacugga g 81

35 <210> 573
 <211> 98
 <212> ARN

ES 2 534 304 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 573

acc¹caa²acc³ uaggucugcu gacuccuagu ccagggcucg ugauggcugg ugggccuga 60
acgagggguc uggaggccug gguuugaaua ucgacagc 98

5 <210> 574
<211> 86
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 574

gucugucugc ccgcaugccu gccucucugu ugcucugaag gaggcagggg cugggccugc 60
agcugccugg gcagagcggc uccugc 86

10 <210> 575
<211> 68
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 575

ccauuacugu ugcuaauaug caacucuguu gaauauaaau uggaauugca cuuuagcaau 60
ggugaugg 68

15 <210> 576
<211> 66
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
20 <400> 576

aaaaggugga uauuccuucu auguuuangu uauuuuggu uaaacauaga ggaaauucca 60
cguuuu 66

25 <210> 577
<211> 70
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 577

uugaaggagg aucgaccgug uuauauucgc uuuauugacu ucgaauaaua caugguugau 60
cuuuucucag 70

30 <210> 578
<211> 75
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 578

agacagagaa gccaggucac gucucugcag uuacacagcu cacgagugcc ugcuggggug 60
gaaccugguc ugucu 75

35 <210> 579
<211> 67
<212> ARN

ES 2 534 304 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 579

guggcacuca aacugugggg gcacuuucug cucucuggug aaagugccgc caucuuuuga 60
guguuac 67

<210> 580

5 <211> 67

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 580

gugggccuca aauguggagc acuuuucuga uguccaagug gaaagugcug cgacuuuuga 60
gcgucac 67

10 <210> 581

<211> 69

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 581

gggauacuca aaaugggggc gcuuuccuuu uugucuguac ugggaagugc uucgauuuug 60
ggguguccc 69

15

<210> 582

<211> 72

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

20 <400> 582

uacaucggcc auuauauac aaccugauaa guguuauagc acuuaucaga uuguauugua 60
auugucugug ua 72

<210> 583

<211> 99

<212> ARN

25 <213> *Mus musculus*

<400> 583

cauggcaccu ccguuuccu gaggagcccu uugagccugg agugaaaaa aaaaacaggu 60
caagaggcgc cugggaacug gagaagagug uaaaacuuc 99

<210> 584

<211> 79

30 <212> ARN

<213> *Mus musculus*

<400> 584

agacggagag accaggucac gucucugcag uuacacagcu caugagugcc ugcuggggug 60
gaaccugguu ugucugucu 79

35 <210> 585

<211> 68

ES 2 534 304 T3

<212> ARN
<213> *Mus musculus*
<400> 585

uaaaagguag auucuccuuc uaugaguaca auuuuauga cuaaucguag aggaaaaucc 60
acguuuuc 68

5 <210> 586
<211> 82
<212> ARN
<213> *Mus musculus*
<400> 586

ugguauuuuaa aagguggaua uuccuucuau gguuacgugc uuccuggaua aucauagagg 60
aacauccacu uuucaguau ca 82

10 <210> 587
<211> 61
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

15 <400> 587

aagaugguug accauagaac augcgcvacu ucugugucgu auguaguaug guccacaucu 60
u 61

<210> 588
<211> 79
<212> ARN
20 <213> *Mus musculus*
<400> 588

ugguacucgg agagagguua cccgagcaac uuugcaucug gaggacgaau guugcucggu 60
gaacccuuu ucgguauca 79

<210> 589
<211> 81
25 <212> ARN
<213> *Mus musculus*
<400> 589

ggguacuuga ggagagguug ucugugauga guucgcuuua uuaaugacga auuaaacaca 60
gauggccugu uucaauacc a 81

<210> 590
<211> 82
30 <212> ARN
<213> *Mus musculus*
<400> 590

ugguacuugg agagauagua gaccguauag cguacgcuuu aucugugacg uauguaacac 60
gguccacuaa cccucaguau ca 82

35 <210> 591

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 596
 cauacuucuu uacauucgt t 21

5 <210> 597
 <211>21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 597
 uggaauguaa agaaguaugu a 21

15 <210> 598
 <211>21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 598
 cauacuucuu uacauucatt t 21

25 <210> 599
 <211>21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 599
 uggaauguaa agaaguaugu a 21

35 <210> 600
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 600
 guguucacag cggaccuuga uu 22

<210> 601
 <211> 22
 <212> ARN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

5 <400> 601
 uuaaggcacg cggugaaugc ca 22
 <210> 602
 <211> 22
 <212> ARN

10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 602

15 gcauucaccg cgugccuugg tt 22
 <210> 603
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 603
 uuaaggcacg cggugaaugc ca 22

25 <210> 604
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 604
 gcauucaccg cgugccuuaa tt 22

35 <210> 605
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

40 <400> 605
 uuaaggcacg cggugaaugc ca 22
 <210> 606
 <211> 19

<212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <220>
 5 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 606
 ucuuuucaca uugugcuac 19

 <210> 607
 <211> 20
 10 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 15 <400> 607
 cagugcaaug uuaaaagggc 20

 <210> 608
 <211> 20
 <212> ARN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 608
 25 uuuuuaaca uugcacugtt 20

 <210> 609
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 609
 cagugcaaug uuaaaagggc 20

 35 <210> 610
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 610
 ccuuuaaca uugcacugtt 20

<210> 611
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 611
 cagugcaaug uaaaaagggc 20
 10 <210> 612
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 15 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 612
 aguuuugcau aguugcacua 20
 20 <210> 613
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <220>
 25 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 613
 ugugcaaauc uaugcaaac uga 23
 30 <210> 614
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 35 <400> 614
 acauuugcau agauuugcac att 23
 40 <210> 615
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 615

ugugcaaauc uaugcaaaac uga 23

<210> 616
<211> 23
<212> ARN
5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 616

10 aguuuugcau agauuugcac att 23

<210> 617
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 617

ugugcaaauc uaugcaaaac uga 23

20 <210> 618
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 618

caaaauugua ucuaggggaa ua 22

30 <210> 619
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<220>
35 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 619

uaccugugag auccgaauuu gug 23

40 <210> 620
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia Artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 620
 agaauucgga ucuacaggu att 23

<210> 621
 <211> 23
 5 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

10 <400> 621
 uaccuguag auccgaauuu gug 23

<210> 622
 <211> 23
 <212> ARN
 15 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 622
 20 caaaucgga ucuacaggu att 23

<210> 623
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 623
 uaccuguag auccgaauuu gug 23

30 <210> 624
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

35 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 624
 auguuuccac agugcauca 19

<210> 625
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 625
 gugcauugua guugcauug 19

5 <210> 626
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

10 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 626
 guccaacuac aaugcactt 19

15 <210> 627
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 627
 gugcauugua guugcauug 19

25 <210> 628
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 628
 augcaacuac aaugcactt 19

35 <210> 629
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>

40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 629
 gugcauugua guugcauug 19

<210> 630
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 630

5 cuauacaacc uacugccuuc c 21

<210> 631
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 631

 ugagguagua gguugugugg uu 22

15 <210> 632
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 632

 ccacacaacc uacuaucuuu tt 22

25 <210> 633
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 633

 ugagguagua gguugugugg uu 22

35 <210> 634
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

40 <400> 634

 ccacacaacc uacuaccuca tt 22

- <210> 635
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 635
 ugagguagua gguugugugg uu 22
- 10 <210> 636
 <211>21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 15 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 636
 aacaacauga aacuaccuat t 21
- 20 <210> 637
 <211>21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
- 25 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 637
 uagguaguuu cauguuguug g 21
- 30 <210> 638
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
- 35 <400> 638
 caaauucgua ucuaggggaa ua 22
- 40 <210> 639
 <211>21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 639

uagguaguuu cauguuguug g 21

5 <210> 640
 <211>21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 640

10 aauaacauga aacuaccuat t 21

<210> 641
 <211>21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 641

uagguaguuu cauguuguug g 21

20 <210> 642
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

25 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 642

augcaacuac aaugcactt 19

30 <210> 643
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

35 <400> 643

gugcauugua guugcauug 19

40 <210> 644
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 644
 augcaacuac aaugcactt 19

<210> 645
 <211> 19
 5 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

10 <400> 645
 gugcauugua guugcauug 19

<210> 646
 <211> 19
 <212> ARN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 646
 20 augcaacuac aaugcactt 19

<210> 647
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 647
 gugcauugua guugcauug 19

30 <210> 648
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 648
 augcaacuac aaugcactt 19

40 <210> 649
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 649
 gugcauugua guugcauug 19
 <210> 650
 5 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <220>
 10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 650
 augcaacuac aaugcactt 19
 <210> 651
 <211> 19
 15 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 20 <400> 651
 gugcauugua guugcauug 19
 <210> 652
 <211> 22
 <212> ARN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 652
 30 ccacacaacc uacuaccuca tt 22
 <210> 653
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 653
 ugagguagua gguugugugg uu 22
 40 <210> 654
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 654
 5 ccacacaacc uacuaccuca tt 22
 <210> 655
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 655
 ugagguagua gguugugugg uu 22
 15 <210> 656
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 656
 ccacacaacc uacuaccuca tt 22
 <210> 657
 25 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <220>
 30 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 657
 ugagguagua gguugugugg uu 22
 <210> 658
 <211> 22
 35 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 40 <400> 658
 ccacacaacc uacuaccuca tt 22
 <210> 659
 <211> 22

<212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <220>
 5 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 659
 ugagguagua gguugugugg uu 22
 <210> 660
 <211>21
 10 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 15 <400> 660
 cauacuucuu uacauccat t 21
 <210> 661
 <211>21
 <212> ARN
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 661
 25 uggaauguaa agaaguaugu a 21
 <210> 662
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 30 <220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 662
 cauacuucuu uacauccat t 21
 35 <210> 663
 <211>21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 663
 uggaauguaa agaaguaugu a 21

<210> 664
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

5 <220>

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético
 <400> 664

gcauucaccg cgugccuuaa tt 22

10 <210> 665
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

15 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 665

uuaaggcacg cggugaaugc ca 22

20 <210> 666
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<220>

25 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 666

gcauucaccg cgugccuuaa tt 22

30 <210> 667
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

35 <400> 667

uuaaggcacg cggugaaugc ca 22

40 <210> 668
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 668

ccuuuaaca uugcacugt 20

<210> 669
 <211> 20
 <212> ARN
 5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 669

10 cagugcaaug uuaaaagggc 20

<210> 670
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 670

ccuuuaaca uugcacugt 20

20 <210> 671
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

25 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 671

cagugcaaug uuaaaagggc 20

30 <210> 672
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<220>
 35 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 672

caauucgga ucuacaggu att 23

40 <210> 673
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 673
 uaccuguag auccgaauuu gug 23

<210> 674
 <211> 23
 5 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

10 <400> 674
 caaaauccgga ucuacaggu att 23

<210> 675
 <211> 23
 <212> ARN
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 675

20 uaccuguag auccgaauuu gug 23

<210> 676
 <211>21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

<400> 676
 uauacaagag augaaauccu c 21

30 <210> 677
 <211> 64
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 677

35 ccccgcgacg agccccucgc acaaaccgga ccugagcguu uuguucguuc ggcucgcgug 60
 aggc 64

<210> 678
 <211> 68
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 678
 uaaaagguag auucuccuuc uaugaguaca uuauuuuga uuaucavag aggaaaaucc 60
 acguuuuc 68

<210> 679
 <211> 69
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 679

uugagcagag guugcccuug gugaauucgc uuuuuuuug uugaaucaca caaaggcaac 60
 uuuuuuuug 69

<210> 680
 <211> 66
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 680

agggcuccug acuccagguc cuguguguaa ccuagaaaua gcacuggacu uggagucaga 60
 aggccu 66

<210> 681
 <211> 67
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 681

agagauggua gacuauggaa cguaggcguu augauuucug accuauguaa caugguccac 60
 uaacucu 67

<210> 682
 <211> 61
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

20

<400> 682

aagaugguug accauagaac augcgcuauc ucugugucgu auguaauaug guccacauc 60
 u 61

<210> 683
 <211> 75
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 683

uacuuaaagc gagguugccc uuuguauauu cgguuuuuug acauggaaua uacaagggca 60
 agcucucugu gagua 75

30

<210> 684
 <211> 76
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 684

uacuugaaga gaaguuguuc gugguggauu cgcuuuacuu augacgaauc auucacggac 60
 aacacuuuuu ucagua 76

<210> 685

ES 2 534 304 T3

<211> 73
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 685

cuccucagau cagaagguga uuguggcuuu ggguggauau uaucagcca cagcacugcc 60
uggucagaaa gag 73

5

<210> 686
<211> 88
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 686

uguuaaauc ggaauuuua acaauuccua gacaauaugu auaauguua uaagucuuuc 60
cuagaaaug uucaaaugc cuguaaca 88

<210> 687
<211> 90
<212> ARN
15 <213> *Homo sapiens*
<400> 687

gagagaagca cuggacuuag ggucagaagg ccugagucuc ucugcugcag augggcucuc 60
ugucccugag ccaagcuug uccucccugg 90

<210> 688
<211> 94
20 <212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 688

auaaaggaag uuaggcugag gggcagagag cgagacuuuu cuuuuuuca aaagcucggu 60
cugaggcccc ucagucuugc uuccuaaccc gcgc 94

<210> 689
25 <211> 98
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 689

cgaggggaa cagcagcaau ucauguuuug aaguguucua aaugguuca aacgugaggc 60
gcugcuauac cccucgugg ggaagguaga agguuggg 88

<210> 690
30 <211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 690

gaaagcgcuu uggaaugaca cgaucacucc cguugagugg gcacccgaga agccaucggg 60
aaugucgugu ccgccagug cucuuuc 87

35

<210> 691
 <211> 111
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 691

gccgggaggu ugaacauccu gcauagugcu gccaggaaau cccuauuuc auaagaggg 60
ggcuggcugg uugcauauu aggauguccc aucucccagc ccacuucguc a 111

<210> 692
 <211> 83
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 692

cgccggccga ugggcgucuu accagacaug guuagaccug gccucuguc uauuacuguc 60
ugguaaaacc guccaucgc ugc 83

<210> 693
 <211> 91
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 693

cuguguguga ugagcuggca guguauguu agcugguuga auaugugaau ggcaucggcu 60
aacaugcaac ugcugucuua uugcauauac a 91

<210> 694
 <211> 91
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 694

aaacgauacu aaacuguuuu ugcgaugugu uccuaauaug cacuaauaa auauugggaa 60
cauuuugcau guauaguuuu guaucaauau a 91

25 <400> 695

<210> 695
 <211> 85
 <212> ARN
 <213> *Mus musculus*

30 <400> 695

aaagugcuuu ggaugacac gaucacuccc guugaguggg cacccaagaa gccaucggga 60
augucguguc cgcccagugc ucuuu 85

<210> 696
 <211> 112
 <212> ARN
 <213> *Mus musculus*

35 <400> 696

acgaggaggu ugaacauccu gcauagugcu gccaggaaau cccuacuuc aacuaagagg 60
gggcuggcug guugcauau uaggaugucc caucuccugg cccacuucgu ca 112

<210> 697
 <211> 83

<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 697

ccugcugaug gaugucuuac cagacauggu uagaucugga ugcaucuguc uaaucuguc 60
ugguaaugcc guccauccac ggc 83

5 <210> 698
<211>91
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 698

cuguguguga uggcuuggca guguauguu agcugguuga guaugugagc ggcaccagcu 60
aaacaugcgaac ugcucuccua uugcacacac a 91

10

<210> 699
<211>91
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

15 <400> 699

gagagauacu gagcuguuuu ugcgaugugu uccuaauaug ugcuauaaau auauugggaa 60
cauuuugcau aaavagcuuu gugucaauac a 91

<210> 700
<211> 112
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

20

<400> 700

acggggagggu ugaacauccu gcauagugcu gccaggaaau cccuacuuca uacuaagagg 60
gggcuggcug guugcauauug uaggauugcc caucucccg cccacuucgu ca 112

<210> 701
<211> 85
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

25

<400> 701

ugccugcuga uggauugcuu accagacaug guuagaucug gauguaucug ucuaauacug 60
ucugguaaug ccguccaucc auggc 85

<210> 702
<211>91
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

30

<400> 702

cugugugcga uggguuggca guguauguu agcugguuga guauguaaaa ggcaccagcu 60
aaacaugcaac ugcucuccua uugcacauac a 91

35 <210> 703
<211>91

<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 703

gagagaugcg gagcuguuuu ugcgaugugu uccuaaugug ugcuaacaau auauugggaa 60
cauuuugcau aaauaguuuu acaucgacac a 91

5 <210> 704
<211> 100
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 704

10 **ccaagaag augcuaaacu auuuuugcga uguguuccua auauguaau uaaauguau 60**
ggggacauuu ugcauucaua guuuuguauc auaauaugg 100

<210> 705
<211> 72
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
15 <400> 705

cuugggaug gcaaggaaac cguuaccuu acugaguuua guaauguaa ugguucucu 60
gcuaaaccca ga 72

<210> 706
<211> 85
<212> ARN
20 <213> *Homo sapiens*
<400> 706

gcuaagcacu uacaacuguu ugcagaggaa acugagacuu uguaacuaug ucucagucuc 60
aucugcaaag aaguaagugc uuugc 85

<210> 707
<211> 22
25 <212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 707

gagguuguccguggugagu cg 22

30 <210> 708
<211> 96
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 708

uccuuggcgu gaggguaugu gccuuuggac uacaucguyy aagccagcac caugcayucc 60
augggcauuu acacuugccu caaggccuuu gucauc 96

35 <210> 709
<211> 76
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
<400> 709

ES 2 534 304 T3

gagggggaag acgggaggaa agaagggagu gguuccauca cgccuccuca cuccucuccu 60
cccguccuuc ccucuc 76

- <210> 710
- <211> 63
- <212> ARN
- 5 <213> *Homo sapiens*
- <400> 710

gucaggcuca guccccuccc gauaaacccc uaaauagggga cuuucccggg gggugacccu 60
ggc 63

- <210> 711
- <211> 73
- 10 <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 711

acuuggagag aggcuggccg ugaugaauuc gauucaucaa agcgagucav acacggcucu 60
ccucucuuuu agu 73

- <210> 712
- 15 <211> 68
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 712

guauccugua cugagcugcc ccgagcuggg cagcaugaag ggccucgggg cagcucagua 60
caggaugc 68

- <210> 713
- 20 <211> 80
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 713

gguacuugaa gagugguuau cccugcugug uucgcuuau uuaugacgaa ucauacaggg 60
acauccagu uucaguau c 80

- <210> 714
- <211> 83
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- 30 <400> 714

gagaaucauc ucucccagau aauggcacuc ucaaacaagu uuccaaauug uuugaaaggc 60
uauuucuuug ucagaugacu cuc 83

- <210> 715
- <211> 84
- <212> ARN
- 35 <213> *Homo sapiens*
- <400> 715

guggcagcuu gguggucgua ugugugacgc cauuuacuug aaccuuuagg agugacauca 60
cauauacggc agcuaaacug cuac 84

- <210> 716
- <211> 128
- <212> ARN
- 5 <213> *Homo sapiens*
- <400> 716

uggaggccuu gcugguuugg aaaguucuu guucgacacc auggaucucc agggugguca 60
aguuuagaga ugcaccaacc uggaggacuc caugcuguug agcuguucac aagcagcga 120
cacuucca 128

- <210> 717
- <211> 84
- 10 <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 717

uugacuuagc uggguagugg ggaacccuuc caugaggagu agaacacucc uuaugcaaga 60
uucccuucua ccuggcuggg uugg 84

- <210> 718
- 15 <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
- 20 <211> 89
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 719

cuggccucca gggcuuugua caugguaggc uucauucuu ucguuugcac auucggugaa 60
ggucuacugu gugccaggcc cugugccag 89

- <210> 720
- <211> 24
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*

- 30 <400> 720

ugaaacauac acgggaaacc ucuu 24

- <210> 721
- <211> 82
- <212> ARN
- 35 <213> *Homo sapiens*
- <400> 721

ugguaccuga aaagaaguug cccauguuau uuucgcuua uaugugacga aacaaacaug 60
gugcacuucu uuuucgguau ca 82

<210> 722
 <211> 17
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 722
 auuacauggc caaucuc 17

<210> 723
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 723
 cagcagcaca cugugguuug u 21

<210> 724
 <211> 124
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 724

aaccuccuu gggagugaa gcucaggcug ugauuucag ccagggggcg uuuuucuaa 60
acuggaugaa aagcaccucc agagcuugaa gcucacaguu ugagagcaau cgucuaagga 120
agu 124

20

<210> 725
 <211> 122
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 725

gcccuguccc cugugccuug ggcggggcggc uguuaagacu ugcagugaug uuuuacuccu 60
cuccacguga acaucacagc aagucugugc ugcuucccgu ccuacgcug ccugggcagg 120
gu 122

25

<210> 726
 <211> 84
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

30

<400> 726

gcucuccuc ucuaauccuu gcuaccuggg ugagagugcu gucugaaugc aaugcaccug 60
ggcaaggauu cugagagcga gagc 84

<210> 727
 <211> 84
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

35

<400> 727

ES 2 534 304 T3

gcucuuuccuc ucuaauccuu ugucccuggg ugagagugcu uucugaaugc aaugcacccg 60
ggcaaggauu cugagagggg gagc 84

- <210> 728
- <211> 55
- <212> ARN
- 5 <213> *Homo sapiens*
- <400> 728

auccuugcua ucugggugcu agugcuggcu caaugcaaug caccugggca aggau 55

- <210> 729
- 10 <211> 71
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 729

ugcccuagca gcggaacag uucugcagug agcgauccgu gcucuggggg auuguuuccg 60
cugccagggg a 71

- 15 <210> 730
- <211> 83
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 730

gcugcuguug ggagaccug gucugcacuc uaucuguauu cuuacugaag ggagugcagg 60
gcagggguuc ccuacagag ggc 83

- 20 <210> 731
- <211> 84
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- 25 <400> 731

gaugcaccca gugggggagc caggaaguau ugauguuucu gccaguuuag cgucaacacu 60
ugcugguuuc cucucuggag cauc 84

- 30 <210> 732
- <211> 124
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 732

gccaccacca ucagccauac uauguguagu gccuuuuca ggaagguguu acuuuuuaga 60
uuuuuuuuug uaaggcacc uucugaguag aguaaugugc aacauggaca acuuuugugg 120
uggc 124

- 35 <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
- 5 <213> *Homo sapiens*
- <400> 734

ccaccuucag cugaguguag ugcccuacuc cagagggcgu cacucaugua aacuaaaaca 60
ugauuguagc cuuuuggagu agaguaauac acaucacgua acgcauauuu ggugg 115

- <210> 735
- <211> 94
- 10 <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 735

caugcugugu gugguacccu acugcagaca guggcaauca uguauaauua aaaaugauug 60
guacgcuguc gguagagua cugcaugaca caug 94

- <210> 736
- 15 <211> 74
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 736

gugguguccu acucaggaga guggcaauca cauguaauua ggugugauug aaaccucuaa 60
gaguggagua acac 74

- <210> 737
- 20 <211> 87
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 737

caauagacac ccaucguguc uuuugcucug cagucaguaa auauuuuuuu gugaaugugu 60
agcaaaagac agaauuggugg uccaauug 87

- <210> 738
- 25 <211> 87
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- 30 <400> 738

caauagacac ccaucguguc uuuugcucug cagucaguaa auauuuuuuu gugaaugugu 60
agcaaaagac agaauuggugg uccaauug 87

- <210> 739
- 35 <211> 84
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 739

ES 2 534 304 T3

ucucagucug uggcacucag ccuugagggc acuuucuggu gccagaauga aagugcuguc 60
 auagcugagg uccaaugacu gagg 84

- <210> 740
- <211> 98
- <212> ARN
- 5 <213> *Homo sapiens*
- <400> 740

gguacuucuc agucuguggc acucagccuu gagggcacuu ucuggugcca gaugaaagu 60
 gcugucauag cugaggucca augacugagg cgagcacc 98

- <210> 741
- <211> 129
- 10 <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 741

gggaugccac auucagccau ucagcguaca gugccuuuca cagggaggug ucauuuangu 60
 gaacuaaaau auaaauuuca ccuuucugag aaggguaaug uacagcaugc acugcauag 120
 uggugucc 129

- <210> 742
- 15 <211> 127
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 742

ggaugccaca uucagccau cagugucag ugccuuucac agggaggugu cauuuangu 60
 aacuaaaau uaaauuucac cuuucugaga aggguaaugu acagcaugca cugcauangu 120
 ggugucc 127

- <210> 743
- 20 <211> 58
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 743

cuacucugga gagugacaau cauguauaau uaaauuugau ugacacuucu gugaguag 58

- 25 <210> 744
- <211> 58
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*

- 30 <400> 744

cuacucugga gagugacaau cauguauaac uaaauuugau ugacacuucu gugaguag 58

- <210> 745
- <211> 58
- <212> ARN
- 35 <213> *Homo sapiens*
- <400> 745

ES 2 534 304 T3

cuacucugga gagugacaau cauguauaac uaaauuugau ugacacuucu gugaguag 58

<210> 746
 <211> 83
 <212> ARN
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 746

ucucaugcag ucauucucca aaagaaagca cuuucuguug ucugaaagca gagugccuuc 60
 uuuuggagcg uuacuguuug aga 83

<210> 747
 <211> 83
 10 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 747

ucucaugcag ucauucucca aaagaaagca cuuucuguug ucugaaagca gagugccuuc 60
 uuuuggagcg uuacuguuug aga 83

<210> 748
 <211> 90
 15 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 748

ucucaggcug ugaccuucuc gaggaaagaa gcacuuucug uugucugaaa gaaaagaaag 60
 ugcuuccuuu cagaggguaa cgguuugaga 90

<210> 749
 <211> 90
 20 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 749

ucucagguug ugaccuucuc gaggaaagaa gcacuuucug uugucugaaa gaaaagaaag 60
 ugcuuccuuu cagaggguaa cgguuugaga 90

<210> 750
 <211> 85
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 750

ucucaugaug ugaccaucug gagguaagaa gcacuuugug uuuugugaaa gaaagugcuu 60
 ccuuucagag gguuacucuu ugaga 85

<210> 751
 <211> 90
 <212> ARN
 35 <213> *Homo sapiens*
 <400> 751

ucucagggcug ugaccaucug gagguaagaa gcacuuucug uuuugugaaa gaaaagaaag 60
 ugcuuccuuu cagaggguaa cucuuugaga 90

<210> 752
 <211> 87
 <212> ARN
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 752

ucucagggcag ugacccucua gauggaagca cugucuguug uauaaaagaa aagaucgugc 60
 aucccuuuag aguguuacug uuugaga 87

<210> 753
 <211> 67
 10 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 753

gugacccucu agauggaagc acugucuguu gucuaagaaa agaucgugca ucccuuuaga 60
 guguuac 67

<210> 754
 15 <211> 95
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 754

gaagaucuca ggcagugacc cucuagaugg aagcacuguc uguugucuaa gaaaagaucg 60
 ugcauccuuu uagaguguua cuguuuugaga aauc 95

<210> 755
 20 <211> 85
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 755

ucucaagcug ugacugcaaa ggggaagccu uucuguuguc ugaaagaaga gaaagcgcuu 60
 cccuuugcug gauuacgguu ugaga 85

<210> 756
 <211> 87
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 756

ucucaagcug ugggucugca aagggaagcc cuuucuguug ucuaaaaagaa gagaaagcgc 60
 uucccuuugc uggauuacgg uuugaga 87

<210> 757
 <211> 83
 <212> ARN
 35 <213> *Homo sapiens*
 <400> 757

ucaugcugug gccuccaga ggggaagcgc uucuguuguc ugaaagaaa caaagcgc 60
 ccuuuagag guuuacggu uga 83

<210> 758
 <211> 101
 <212> ARN
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 758

gcgagaagau cucaugcugu gacucucugg agggaagcac uuucuguugu cugaaagaaa 60
 acaaagcgc ucucuuuaga guguuacggu uugagaaaag c 101

<210> 759
 <211> 87
 10 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 759

ucccaugcug ugaccucua gagggaagca cuucuguug ucugaaagaa accaaagcgc 60
 uuccuuuug agcguuacgg uuugaga 87

<210> 760
 15 <211> 88
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 760

ucucaggcug ugaccucua gagggaagcg cuucuguug gcuaaaagaa aagaaagcgc 60
 uuccuuucag aguguuaacg cuuugaga 88

<210> 761
 20 <211> 87
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 761

ucucaugcug ugaccucua gagggaagca cuucucuuug ucuaaaagaa aagaaagcgc 60
 uuucuuuag aggauuacuc uuugaga 87

<210> 762
 25 <211> 85
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 762

cucaggcugu gacacucua agggaagcgc uuucuguugu cugaaagaaa gaaagugca 60
 uccuuuuaga guguuacugu uugag 85

<210> 763
 <211> 87
 35 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 763

ucucagggcug ugucccucua caggggaagcg cuuucuguug ucugaaagaa aggaaagugc 60
auccuuuuag aguguuacug uuugaga 87

- <210> 764
- <211> 81
- <212> ARN
- 5 <213> *Homo sapiens*
- <400> 764

caugcuguga cccucuagag ggaagcgcuu ucuguugucu gaaagaaaag aaagugcauc 60
cuuuuagagg uuucuguuu g 81

- <210> 765
- <211> 87
- 10 <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 765

ucucagccug ugaccucua gaggggaagcg cuuucuguug ucugaaagaa aagaaagugc 60
aucuuuuuag aggauuacag uuugaga 87

- <210> 766
- 15 <211> 88
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 766

ucccaugcug ugaccucua aaggggaagcg cuuucuguuu guuuucucu aaacaaagug 60
ccuccuuua gaguguuacc guuuggga 88

- <210> 767
- 20 <211> 84
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 767

ucucaugcag ucauucucca aaagggagca cuuucuguuu gaaagaaaac aaagugccuc 60
cuuuuagagu guuucuguuu gaga 84

- <210> 768
- <211> 85
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- 30 <400> 768

cucagggcugu gaccucuccag aggggaaguac uuucuguugu cugagagaaa agaaagugcu 60
ucccuugga cuguuucggu uuugag 85

- <210> 769
- <211> 61
- <212> ARN
- 35 <213> *Homo sapiens*
- <400> 769

cccucua**cag ggaagcgcuu ucuguugucu gaaagaaaag aaagugcuuc cuuuuagagg** 60
g 61

- <210> 770
- <211> 87
- <212> ARN
- 5 <213> *Homo sapiens*
- <400> 770

uc**ucaggcug ucguccucua gagggaagca cuuucuguug ucugaaagaa aagaaagugc** 60
uuccuuuuag aggguuaccg uuugaga 87

- <210> 771
- <211> 87
- 10 <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 771

uc**ucaagcug ugagucuaca aaggggaagcc cuuucuguug ucuaaaagaa aagaaagugc** 60
uuucuuuug uggguuaccg uuugaga 87

- <210> 772
- 15 <211> 87
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 772

uc**uccugcug ugaccucua gauggaagca guuucuguug ucugaaagga aagaaagugc** 60
uuccuuuuug aggguuacug uuugaga 87

- 20 <210> 773
- <211> 87
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 773

uc**ucaggcug ugaccucua aaggggaagcg cuuucugugg ucagaaagaa aagcaagugc** 60
uuccuuuuag aggguuaccg uuuggga 87

- 25 <210> 774
- <211> 90
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- 30 <400> 774

uc**ccaugcug ugaccucua gaggaagcac uuucuguuug uugucugaga aaaaacaaag** 60
ugcuucccuu uagagugua ccguuuggga 90

- <210> 775
- <211> 88
- <212> ARN
- 35 <213> *Homo sapiens*
- <400> 775

ucccaugcug ugacccucua gaggaagcac uuucuguug uugucugaga aaaaacaaag 60
ugcuucccu uagaguuacu guuugga 88

<210> 776
 <211> 87
 <212> ARN
 5 <213> *Homo sapiens*
 <400> 776

ucucaggcug ugacccucca aaggaagaa cuucuguug ucuaaaagaa aagaacgcac 60
uucccuuuag aguguuaccg ugugaga 87

<210> 777
 <211> 87
 10 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 777

ucucgggcug ugacucucca aaggaagaa uuucucuug ucuaaaagaa aagaacgcac 60
uucccuuuag aguguuaccg ugugaga 87

<210> 778
 <211> 87
 15 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 778

ucucaggcug ugucccucua gaggaagcg cuucuguug ucugaaagaa aagaaaugg 60
uucccuuuag aguguuaccg uuugaga 87

<210> 779
 <211> 87
 20 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 779

ucucaugcug ugacccucua gaggaagcg cuucuguug ucugaaagaa aagaacgcgc 60
uucccuuuag agguuaccg uuugaga 87

<210> 780
 <211> 87
 <212> ARN
 25 <213> *Homo sapiens*
 30 <400> 780

ucucaugcug ugacccuaca aaggaagca cuucucuug uccaaaggaa aagaaggcgc 60
uucccuuug aguguuaccg uuugaga 87

<210> 781
 <211> 85
 <212> ARN
 35 <213> *Homo sapiens*
 <400> 781

cucaagcugu gacucuccag agggaugcac uuucucuau gugaaaaaa agaaggcgcu 60
uccuuuuga gcguuacggu uuggg 85

- <210> 782
- <211> 85
- <212> ARN
- 5 <213> *Homo sapiens*
- <400> 782

cucaggcugu gaccucuag agggaugcac uuucuguugc uugaaagaag agaaagcgcu 60
uccuuuuga ggauuacucu uugag 85

- <210> 783
- <211> 65
- 10 <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 783

gugaccucu agaggaagc acuuucuguu gaaagaaaag acaugcauc cuucagagg 60
guuac 65

- <210> 784
- 15 <211> 83
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 784

ucaggcugug acccucuuga ggaagcacu uucuguuguc ugaaagaaga gaaagugcu 60
ccuuuagag gcuuacuguc uga 83

- <210> 785
- 20 <211> 85
- <212> ARN
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 785

25 ucucaagcug ugacugcaaa ggaagcccu uucuguuguc uaaaagaaa gaaagugcu 60
ccuuuggug aauuacgguu ugaga 85

- <210> 786
- <211> 72
- <212> ARN
- 30 <213> *Mus musculus*
- <400> 786

cuugggaug gcgaggaaac cguuaccuu acugaguuaa guaaugguaa cguucucu 60
gcugcucca ca 72

- <210> 787
- <211> 85
- 35 <212> ARN
- <213> *Mus musculus*
- <400> 787

gcuaagcagu uacaacuguu ugcagaggaa acugagacuu uauaacuaug ucucagucuc 60
aucugcaaag agguaagugc uuugc 85

5 <210> 788
<211> 75
<212> ARN
<213> *Mus musculus*
<400> 788

cuuuaccuaa uuuguuugucc aucauguaaa acauaaauga ugauagacac cauauaaggu 60
agaggaaggu ucacu 75

10 <210> 789
<211> 71
<212> ARN
<213> *Mus musculus*
<400> 789

accuuguuau gggggucugg gguaaggagu ggucaucagg ggguaacuacc aaguuuauuc 60
ugugagauag a 71

15 <210> 790
<211> 74
<212> ARN
<213> *Mus musculus*
<400> 790

gcccuauuua gaugggcacu gaugugauaa aauaaaaau ugaucagggc cuuucuaagu 60
agaguaaggc uuac 74

20 <210> 791
<211> 73
<212> ARN
<213> *Mus musculus*
<400> 791

25 uauauguguu uaugugugug uacauguaca uaugugaaua ugauauccau auacauacac 60
gcacacauaa gac 73

30 <210> 792
<211> 71
<212> ARN
<213> *Mus musculus*
<400> 792

gugccugugu gcguaagugc cugcauguau augcguguau auuuuaugca uauacauaca 60
cacaccuaca c 71

35 <210> 793
<211> 78
<212> ARN
<213> *Mus musculus*
<400> 793

aaaagaaacu uggcgugucg ugacugaugu acugauaaga aacucagugu gauaugacug 60
 augugcgugu gucugucu 78

5 <210> 794
 <211> 74
 <212> ARN
 <213> *Mus musculus*
 <400> 794

cgcgugccu cuuucuuuga ucuugguguc cucaauuga aagccaagga agaggugggg 60
 ggcgugguag ccuu 74

10 <210> 795
 <211> 75
 <212> ARN
 <213> *Mus musculus*
 <400> 795

cagugcucuu cuuggacugg cacuggugag uaaaacuaaa uacaaccagu accuuucuga 60
 gaagaguaaa gcuca 75

15 <210> 796
 <211> 67
 <212> ARN
 <213> *Mus musculus*
 <400> 796

gugcuuuacg uaguauagug cuuuucacau uaaacaaaaa gugaaaggug ccuauacuaug 60
 uauagga 67

20 <210> 797
 <211> 73
 <212> ARN
 <213> *Mus musculus*
 <400> 797

gagggggaag acgggagaag agaagggagu gguuuuuggg ugccucacuc cuccccuccc 60
 gucuuguucu cuc 73

25 <210> 798
 <211> 58
 <212> ARN
 <213> *Mus musculus*
 30 <400> 798

gucaggcuca guccccuccc gauaaaaccuc aaaauagggg cuuaccuagg gggcuggc 58

35 <210> 799
 <211> 73
 <212> ARN
 <213> *Mus musculus*
 <400> 799

acuuggagag aggcuggccg ugaugaauuc gauucaucua aacgagucan acacggcucu 60
 ccucucucuu agu 73

ES 2 534 304 T3

<210> 800
<211> 65
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

5 <400> 800

gcauccugua cugagcugcc ccgagcugag cacagugaag gaccucgggg cagcucagua 60
cagga 65

<210> 801
<211> 72
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

10

<400> 801

uuugggaaug gcgaggaaac cguuaccuu acugaguua gaaugguaa ugguucucu 60
gcuguccca ca 72

<210> 802
<211> 73
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

15

<400> 802

gagggggaag acgggagaag agaagggagu gguuuuggg ugccucacuc cucccuccc 60
gucuuuuucu cuc 73

<210> 803
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia Artificial

20

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Cebador Sintético

25 <400> 803
tcatcgtctc aatgagtct 20

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico de miARN sintético que comprende una secuencia con al menos 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de miR-29 humana madura para su uso como un medicamento.
- 5 2. Una molécula de ácido nucleico de miARN sintético que comprende una secuencia con al menos 80 % de identidad de secuencia con la secuencia de miR-29 humana madura para su uso en una terapia de un cáncer.
3. Ácido nucleico de miARN sintético para su uso como un medicamento o en una terapia de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 definido además como una molécula de ácido nucleico de entre 17 y 125 restos de longitud, que comprende:
- 10
 - una región de miARN cuya secuencia de 5' a 3' es al menos 80 % idéntica a un miARN maduro de miR-29, y
 - una región complementaria cuya secuencia de 5' a 3' es entre 60 % y 100 % complementaria de la región de miARN.
4. Ácido nucleico de miARN sintético para su uso como un medicamento o en una terapia de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 3, que comprende una región de miARN cuya secuencia de 5' a 3' es al menos 85 % idéntica a una secuencia de miR-29 madura.
- 15 5. Ácido nucleico de miARN sintético para su uso como un medicamento o en una terapia de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende una región de miARN cuya secuencia de 5' a 3' es al menos 90 % idéntica a una secuencia de miR-29 madura.
6. Ácido nucleico de miARN sintético para su uso como un medicamento o en una terapia de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, que comprende una región de miARN cuya secuencia de 5' a 3' es idéntica a una secuencia de miR-29 madura, preferentemente miR-29a o miR-29b.
- 20 7. Ácido nucleico de miARN sintético para su uso como un medicamento o en una terapia de un cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el ácido nucleico está comprendido por dos polinucleótidos separados.
8. Ácido nucleico de miARN sintético para su uso como un medicamento o en una terapia de un cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el ácido nucleico es una molécula en horquilla.
- 25 9. Ácido nucleico de miARN sintético para su uso como un medicamento o en una terapia de un cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para administración a una célula o un paciente que tiene la célula identificada como que necesita una terapia de un cáncer.
10. Ácido nucleico de miARN sintético para su uso como un medicamento o en una terapia de un cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en una terapia para tratar cáncer de tiroides, cáncer de pulmón o leucemia.
- 30 11. Un ácido nucleico de miARN sintético bicatenario de 17-30 nucleótidos de longitud que comprende un primer polinucleótido que tiene una secuencia con al menos 80 % de identidad de secuencia con una secuencia de miR-29 madura que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en los nucleótidos 41-62 de SEC ID N°: 45, nucleótidos 51-70 de SEC ID N°:46, nucleótidos 52-71 de SEC ID N°:47 y nucleótidos 54-75 y SEC ID N°:48, y un segundo polinucleótido separado cuya secuencia de 5' a 3' es entre 60 % y 100 % complementaria del primer polinucleótido para su uso como un medicamento.
- 35 12. Ácido nucleico de miARN sintético para su uso como un medicamento de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado porque** el ácido nucleico se define adicionalmente como en una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8.
- 40 13. Ácido nucleico de miARN sintético para su uso como un medicamento de acuerdo con las reivindicaciones 11 o 12 que comprende además uno o más de los siguientes:
- 45
 - i) un grupo de reemplazo para fosfato o hidroxilo del nucleótido en el extremo 5' de la cadena complementaria de la molécula de ARN;
 - ii) una o más modificaciones de azúcares en los primeros o últimos 1 a 6 restos de la región complementaria; o
 - iii) no complementariedad entre uno o más nucleótidos en los últimos 1 a 5 restos en el extremo 3' de la región complementaria y los nucleótidos correspondientes de la región de miARN.
- 50 14. Ácido nucleico de miARN sintético para su uso como un medicamento de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, que comprende i) al menos un nucleótido modificado que bloquea el 5' OH o fosfato en el extremo 5', en el que la al menos una modificación de un nucleótido es una modificación de NH₂, biotina, un grupo amina, un grupo de alquilamina inferior, un grupo acetilo o 2'oxígeno-metilo(2'O-Me) o ii) al menos una modificación de ribosa seleccionada de 2'F, 2' NH₂, 2'N₃, 4'tio o 2' O-CH₃.

15. Ácido nucleico de miARN sintético para su uso como un medicamento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14 que es un polinucleótido bicatenario.

5 16. Uso de un ácido nucleico de miARN sintético como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para reducir la viabilidad celular, o disminuir la proliferación celular, o inducir o inhibir la apoptosis, con la condición de que los procedimientos para el tratamiento del cuerpo humano o animal por cirugía o terapia estén excluidos.

Fig. 1

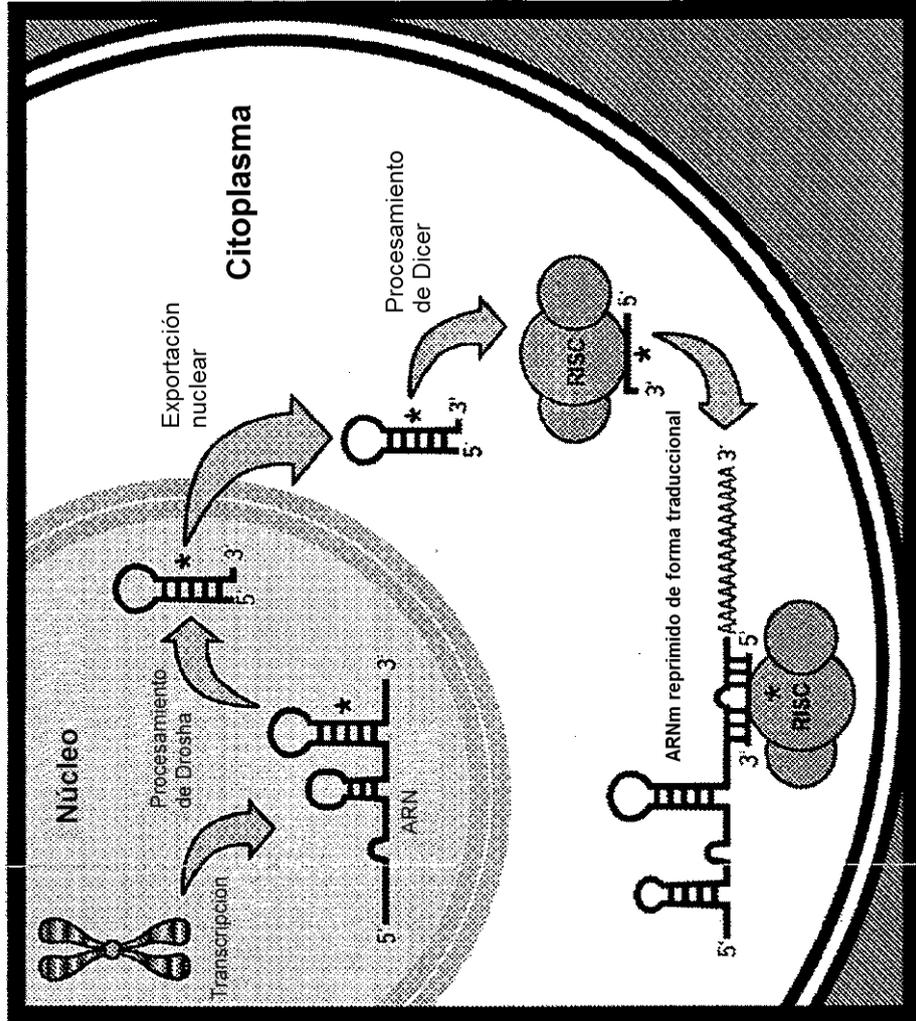


Fig. 2

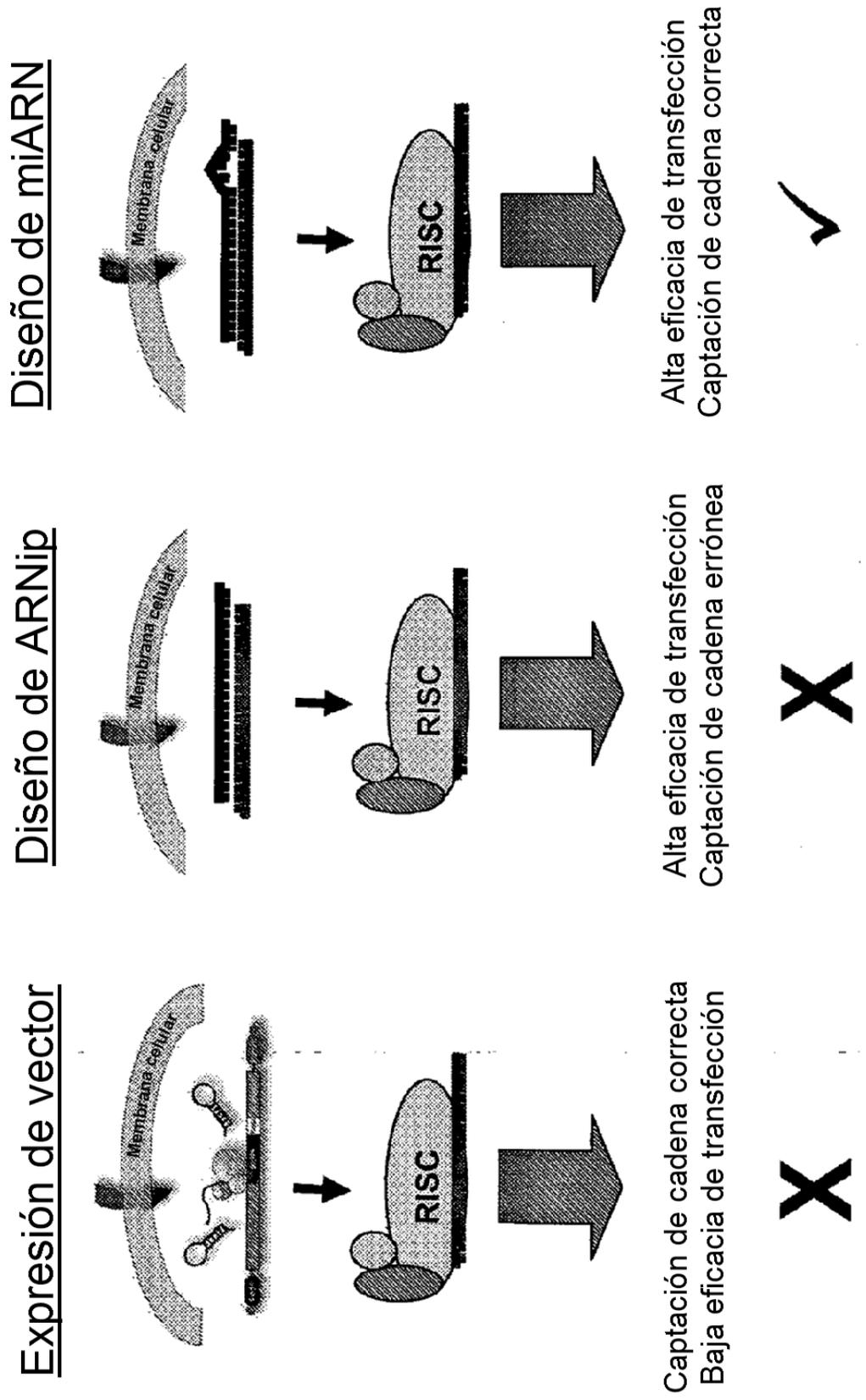


Fig. 3

Indicador de cadena complementaria



Indicador de cadena activa

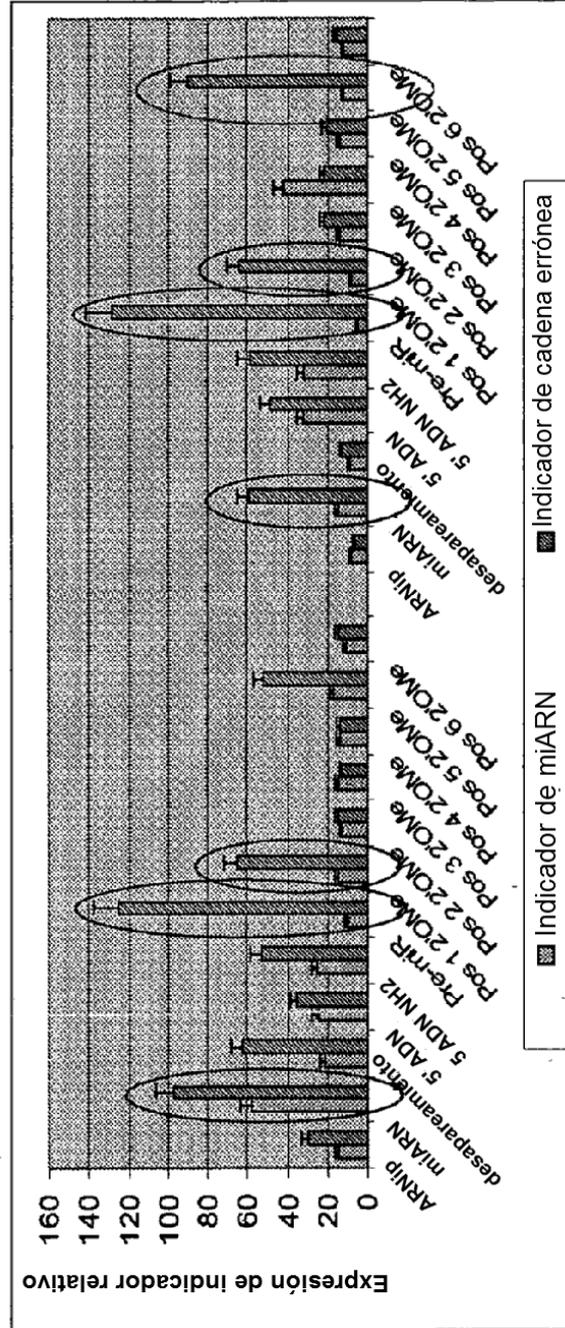
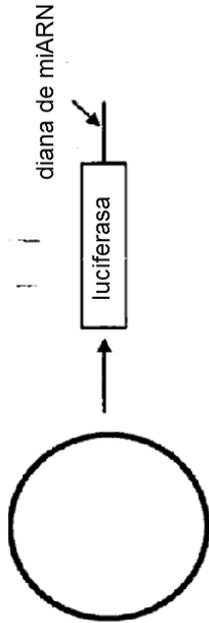


Fig. 4

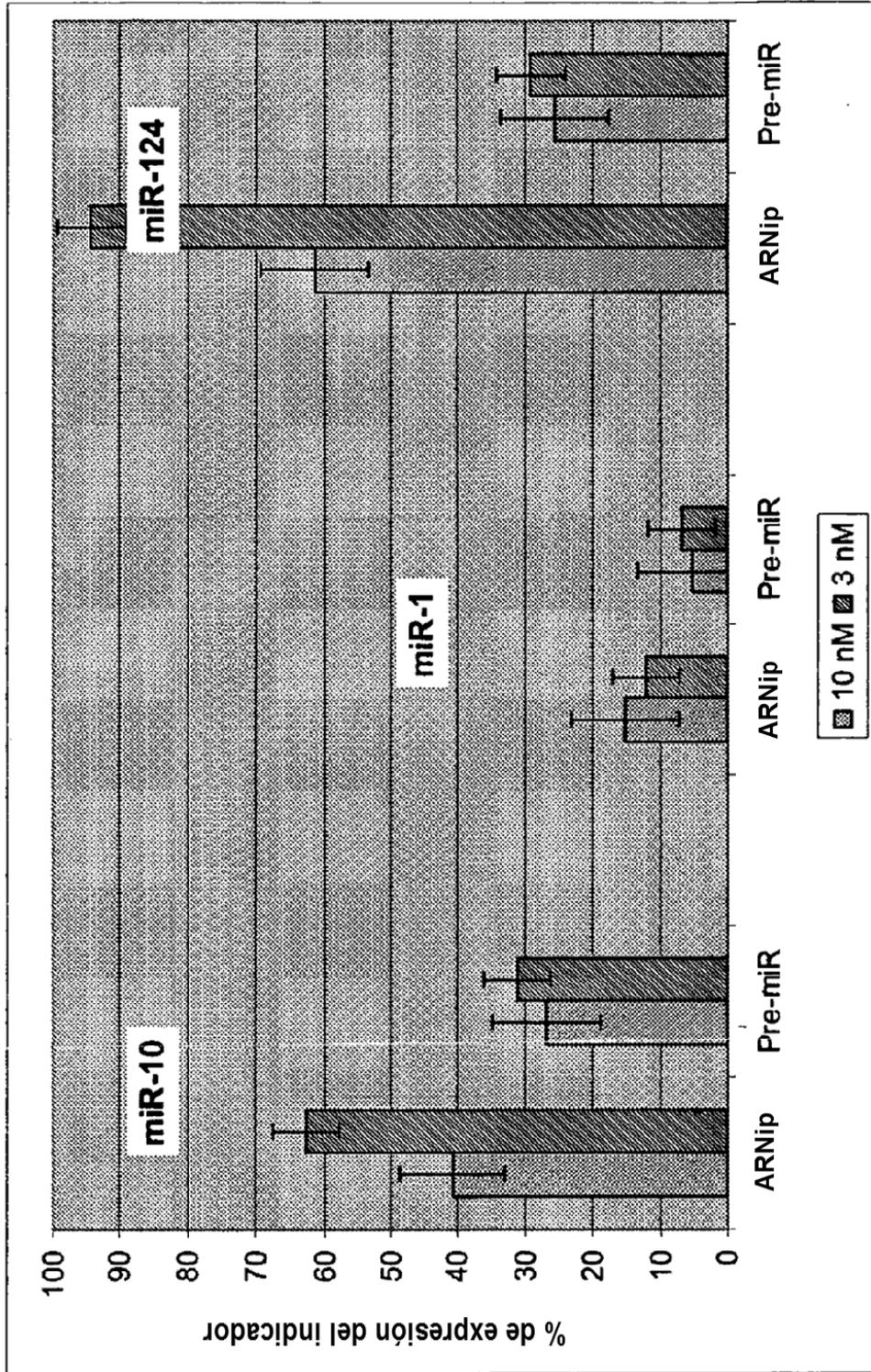
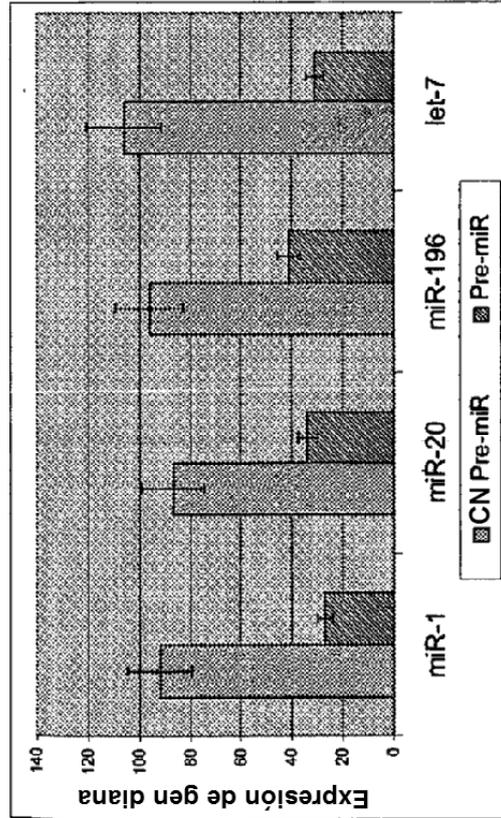
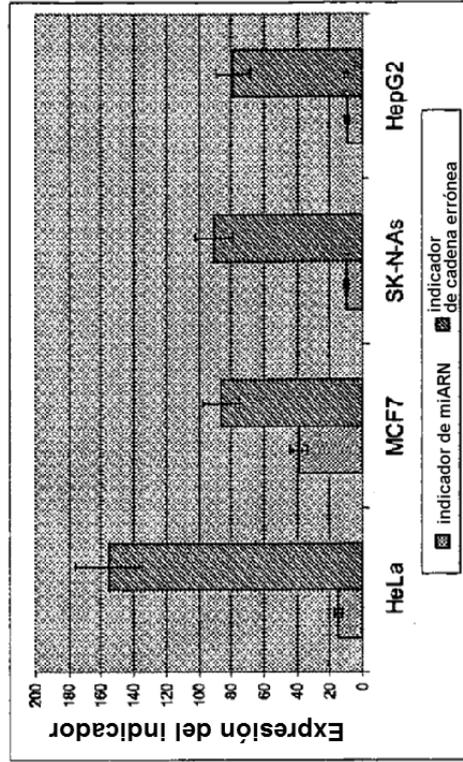


Fig. 5

miARN sintéticos
en múltiples tipos celulares



Efecto de los miARN sintéticos
en dianas endógenas

Fig. 6

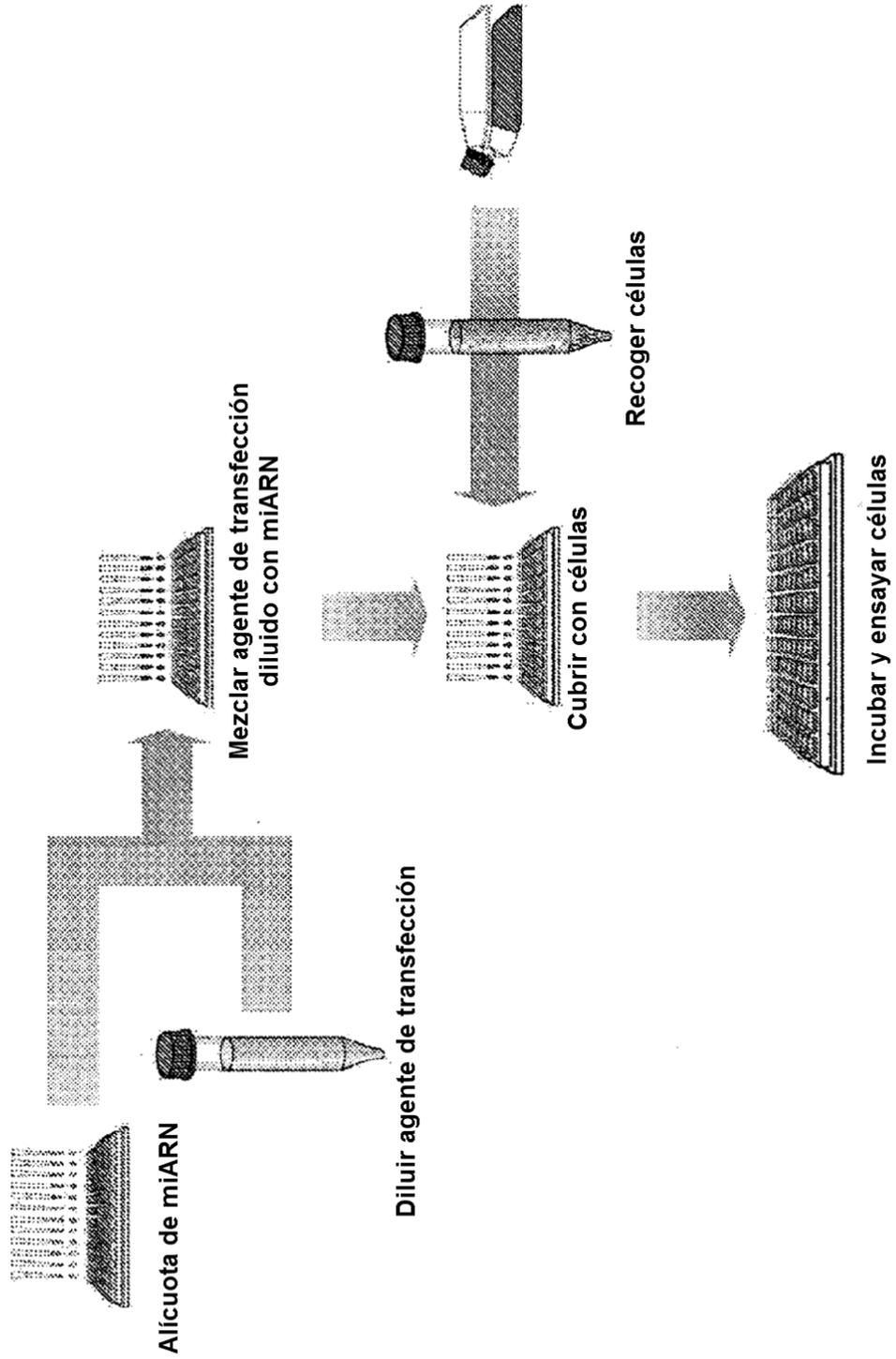


Fig. 7

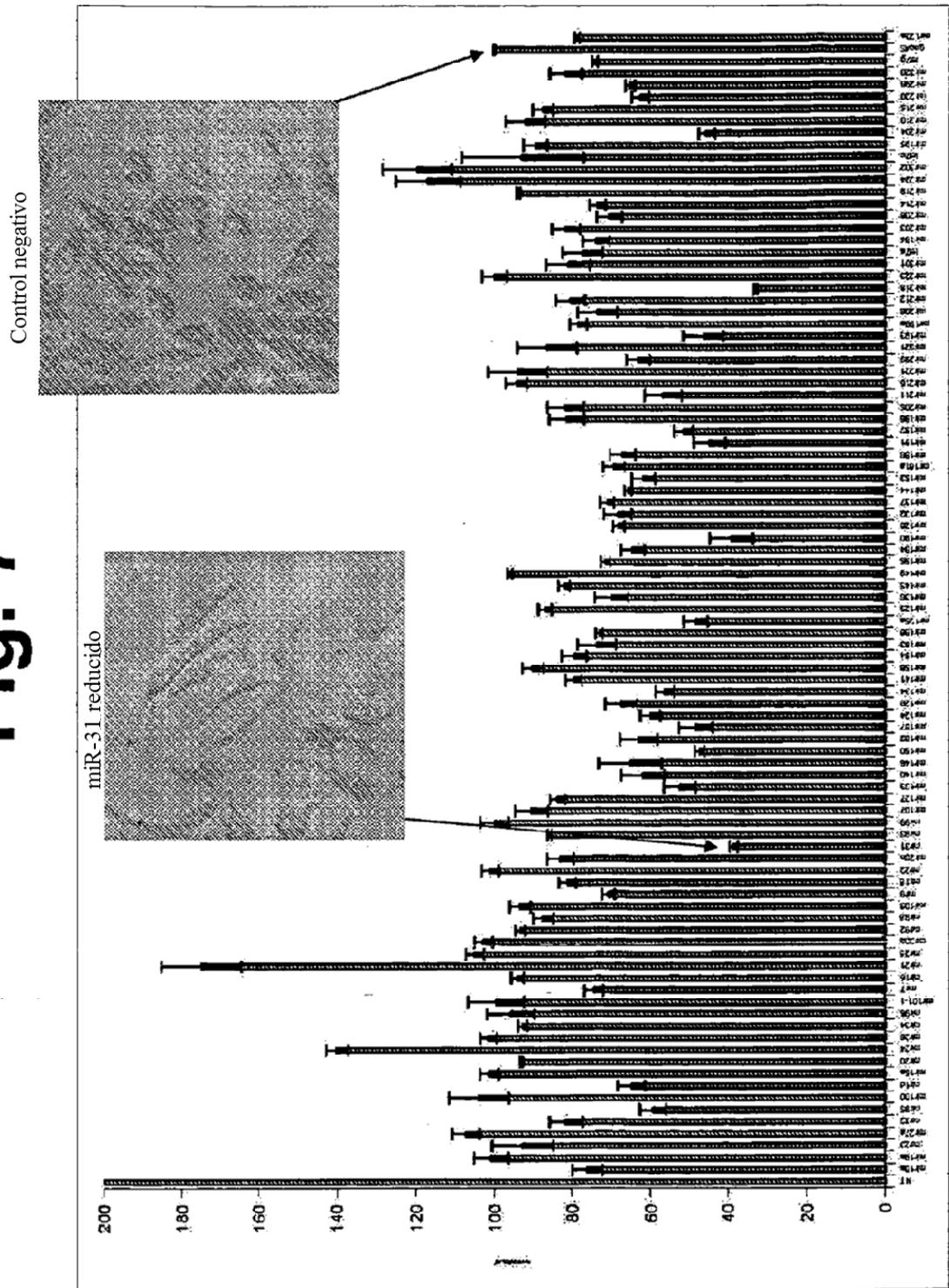


Fig. 8

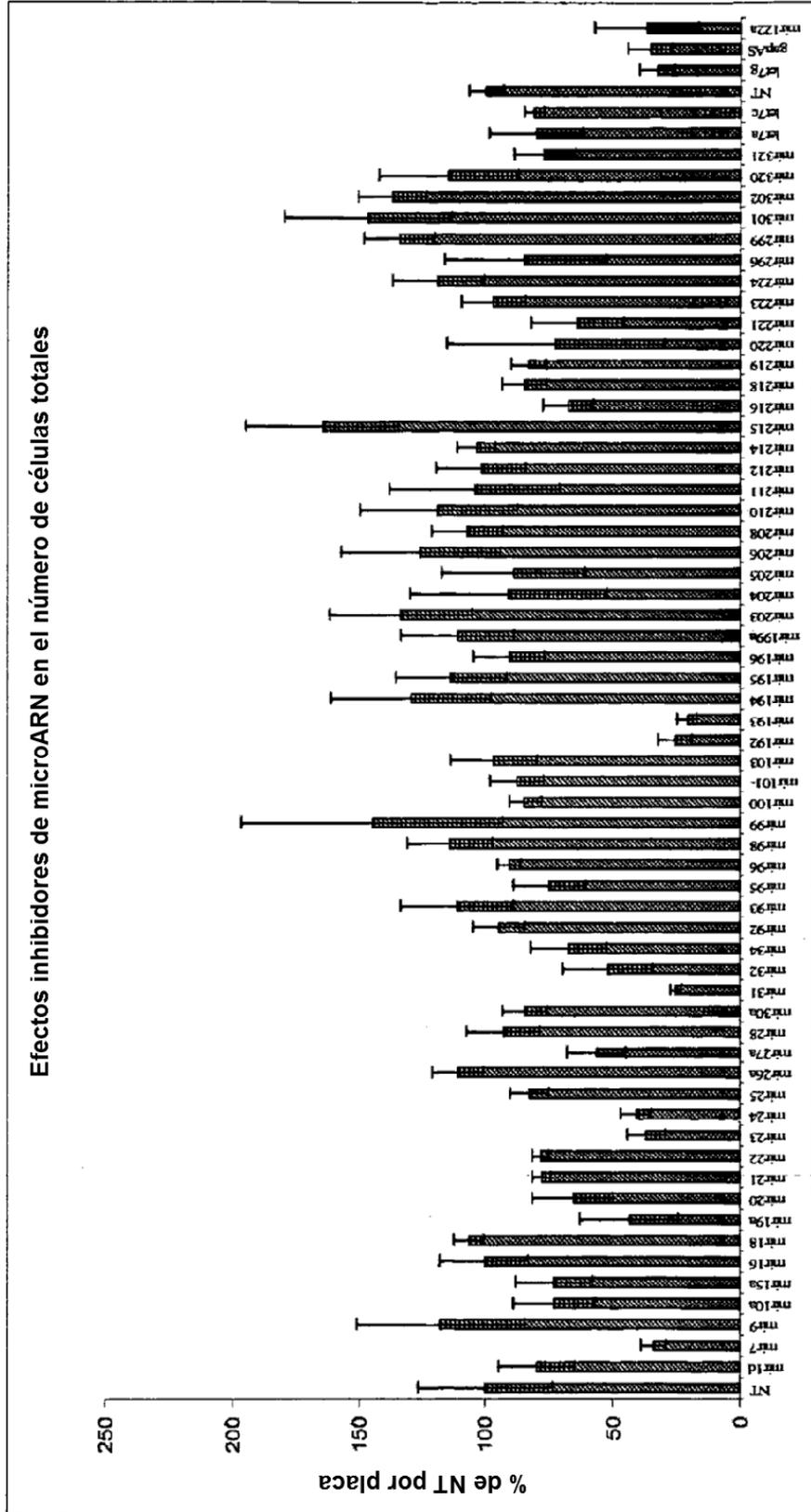
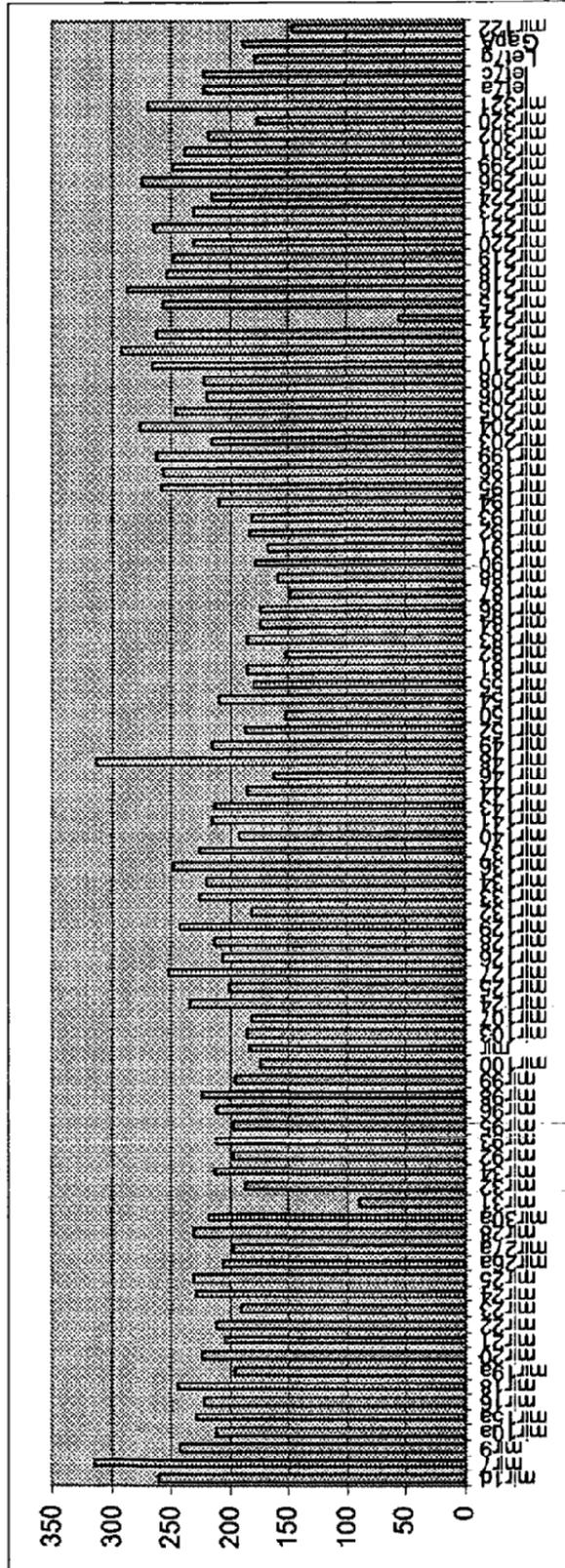


Fig. 9



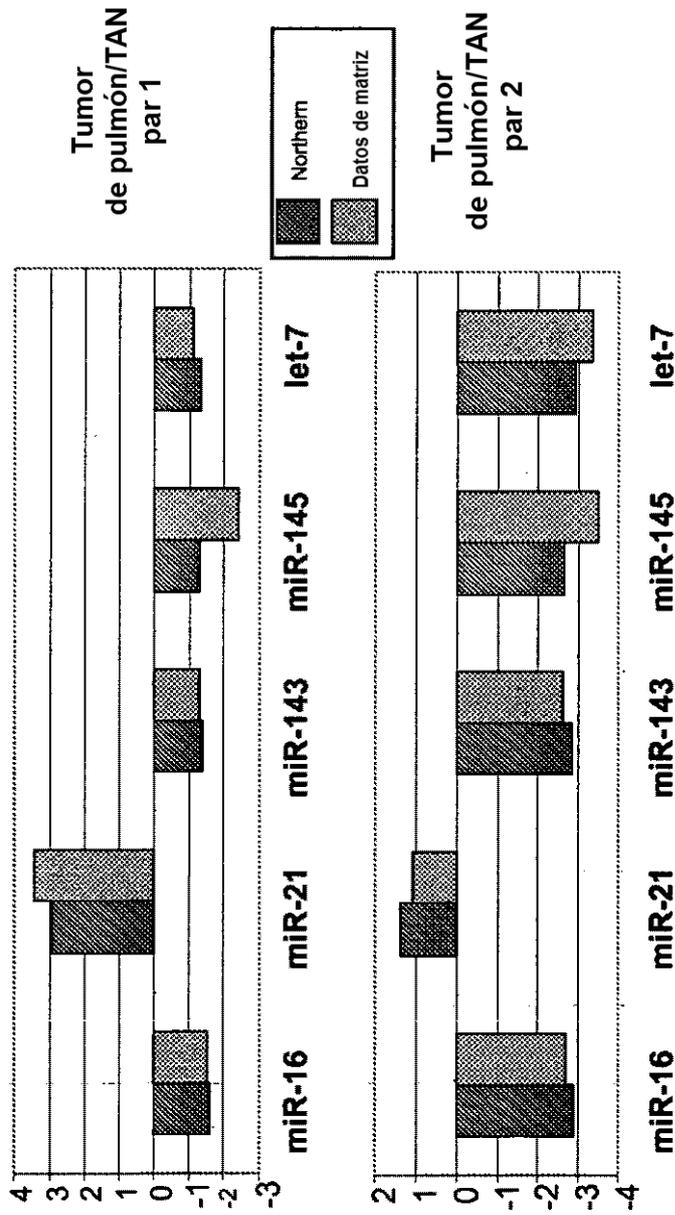


FIG. 11

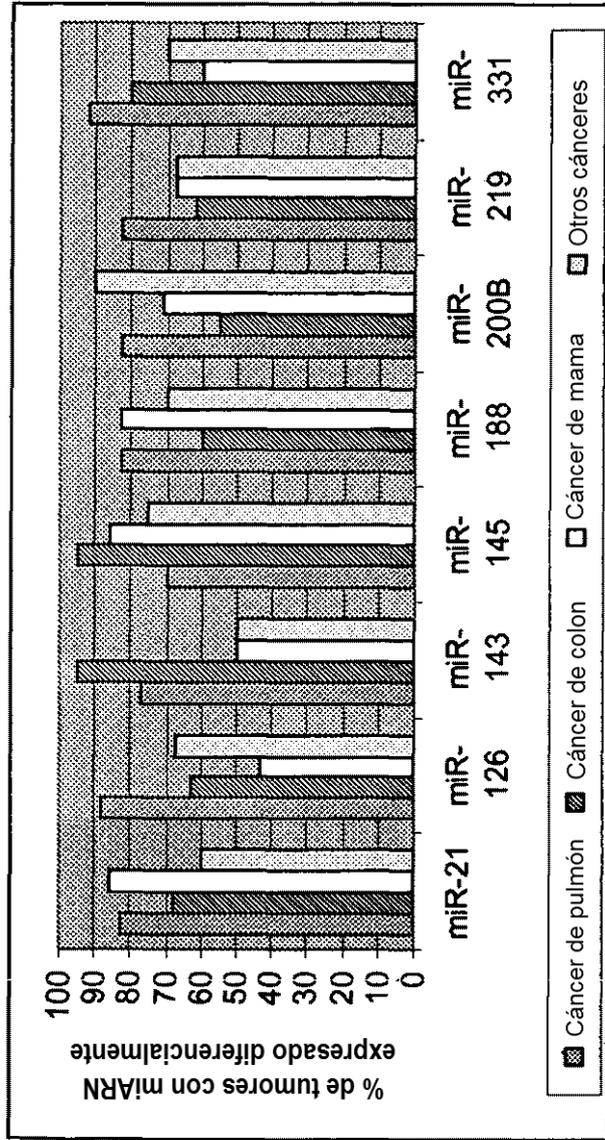


FIG. 12

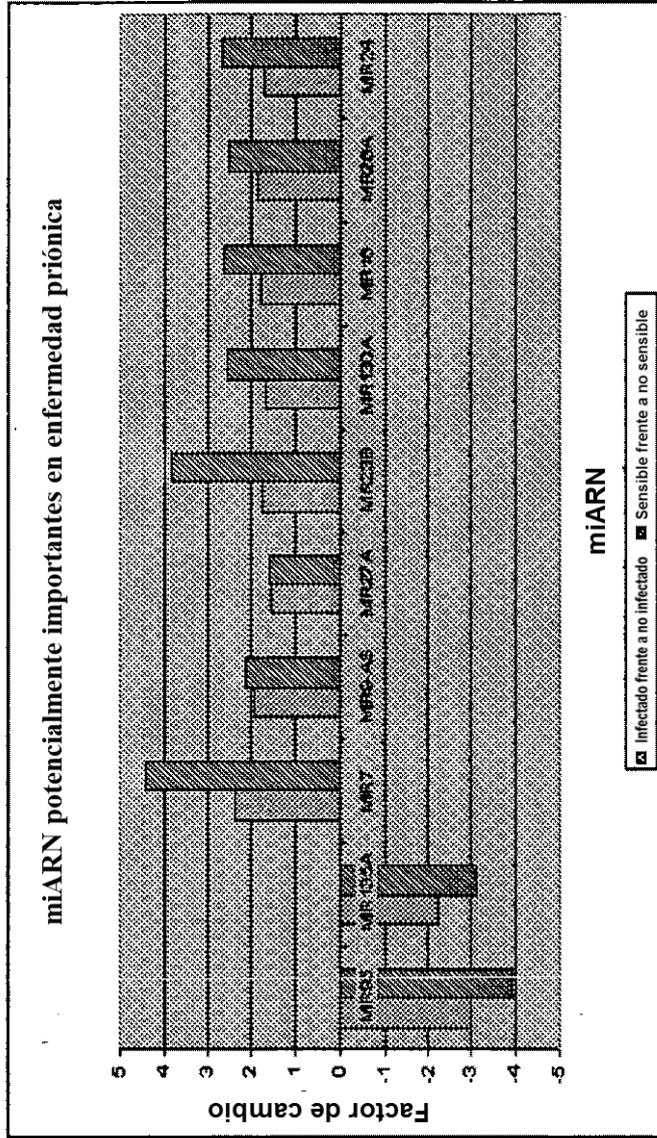


FIG. 13

BT549 de mama			MCF12A de mama			HeLa de cuello uterino			22 Rv1 de próstata		
miARN	% de cont neg	DT	miARN	% de cont neg	DT	miARN	% de cont neg	DT	miARN	% de cont neg	DT
mir-101	87	3	mir-126	88	32	mir-1	20	2	mir-126	63	3
mir-105	88	2	mir-142	87	27	mir-101	12	2	mir-101	77	9
mir-124	88	5	mir-147	87	33	mir-124	16	4	mir-103	75	10
mir-126	82	2	mir-206	86	12	mir-192	13	3	mir-105	75	12
mir-129	85	1	mir-208	87	12	mir-193	5	2	mir-107	84	22
mir-132	87	4	mir-210	86	11	mir-195	21	7	mir-124	77	6
mir-142	87	4	mir-211	83	7	mir-201	26	7	mir-128	81	4
mir-192	81	3	mir-214	85	19	mir-206	12	6	mir-129	81	4
mir-201	79	14	mir-215	70	10	mir-208	21	12	mir-132	84	10
mir-215	82	1	mir-219	88	10	mir-210	23	4	mir-135	79	4
mir-27a	87	4	mir-220	85	7	mir-215	33	21	mir-137	81	4
mir-346	88	1	mir-221	88	7	mir-299	20	18	mir-141	85	2
mir-92	85	11	mir-223	87	10	mir-337	18	3	mir-142	69	4
mir-96	87	9	mir-331	88	12	mir-339	31	2	mir-147	66	4
mir-98	87	1	mir-345	88	10	mir-340	31	7	mir-15a	85	9
mir-99a	88	1	mir-346	82	12	mir-345	31	21	mir-16	74	6
			mir-297	78	15	mir-34a	35	7	mir-27a	83	7
			mir-329	82	17	mir-367	31	12	mir-28	82	9
			mir-409	86	11	mir-292-3p	29	21	mir-30a-3p	80	8
			mir-411	86	7	mir-293	26	30	mir-34a	72	8
						mir-297	19	16	mir-297	84	5
						mir-344	32	1			
						mir-409	30	16			

FIG. 15A

TE354T de piel			TE353SK de piel			Células BJ			A549 de pulmón		
miARN	% de cont neg	DT	miARN	% de cont neg	DT	miARN	% de cont neg	DT	miARN	% de cont neg	DT
mir-1	53	7	mir-101	63	11	miR-206	19	7	mir-124	44	0
mir-101	49	6	mir-105	42	40	let7a	69	10	Let-7b	70	0
mir-124	64	10	mir-124	70	8	mir1	38	2,65	Let-7d	71	0
mir-136	59	4	mir-126	56	8	miR-105	65	5	Let-7g	62	1
mir-154	51	5	mir-128	53	46	miR-147	35	7	mir-126	68	0
mir-15a	63	4	mir-132	66	8	miR-15a	43	8	mir-129	67	1
mir-16	58	5	mir-133A	56	49	miR-16	51	4	mir-137	64	0
mir-192	62	7	mir-136	27	24	miR-195	48	10	mir-147	65	0
mir-193	69	4	mir-137	55	13	miR-297	46	6,85	mir-15a	61	0
mir-195	58	3	mir-141	62	23	miR-324-3p	68	8,84	mir-16	53	1
mir-201	67	8	mir-142	60	19	miR-337	27	7,26	mir-192	70	2
mir-206	51	4	mir-144	65	22	miR-376b	63	6,53	mir-193	64	3
mir-215	59	6	mir-15a	57	20				mir-195	59	0
mir-221	62	8	mir-16	59	9				mir-22	68	1
mir-26a	69	12	mir-181a	65	23				mir-28	61	0
mir-28	60	18	mir-20	47	41				mir-292-3p	62	0
mir-346	67	6	mir-206	67	15				mir-29a	67	1
mir-34a	65	5	mir-215	68	11				mir-337	55	0
mir-7	63	1	mir-223	56	49				mir-344	63	0
mir-96	60	8	mir-302	63	1				mir-345	69	1
mir-329	60	4	mir-330	66	59				mir-34a	61	0
mir-376b	65	3	mir-346	59	52				mir-7	63	1
			mir-373	66	7						
			mir-96	65	16						
			mir-291	48	17						
			mir-329	68	62						
			mir-380-3p	64	55						
			mir-411	54	47						

FIG. 15B

CRL5826 de pulmón			HTB-57 de pulmón			Jurkats			Linfocitos T primarios		
miARN	% de CN	DT	miARN	% de CN	DT	miARN	% de cont neg	DT	miARN	% de cont neg	DT
ambi-mir7100	63	21	mir-108	79		let-7a	21	1	miR-107	89	15
mir-101	70	20	mir-122	79		let-7b	50	5	miR-134	75	23
mir-105	74	11	mir-124	79		miR-101	69	30	miR-135	88	13
mir-124	63	8	mir-125a	77	11	miR-10b	37	3	miR-139	87	0
mir-125b	74	11	mir-126	78	2	miR-122	67	18	miR-141	89	1
mir-126	61	3	mir-132	59	7	miR-133a	73	18	miR-145	86	12
mir-128	71	13	mir-133A	77	7	miR-17-3p	63	16			
mir-132	73	18	mir-136	78	13	miR-29a	68	7			
mir-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						
mir-149	71	9	mir-16	79	6						
mir-188	67	11	mir-182	63	9						
mir-223	68	14	mir-183	72	9						
mir-28	74	19	mir-186	69	17						
mir-29a	74	14	mir-188	67	20						
mir-337	74	17	mir-28	79	16						
mir-346	72	13	mir-377	79	3						
mir-96	74	6	mir-526b*	79	0						
			mir-96	76	10						

FIG. 15C

HeLa de cuello uterino			22 Rv1 de próstata			TE354T de piel			TE353SK de piel		
miARN	% de cont neg	DT	miARN	% de cont neg	DT	miARN	% de cont neg	DT	miARN	% de cont neg	DT
Let-7a	119	15	Let-7a	124	6	mir-139	117	20	mir-138	126	7
Let-7b	124	12	Let-7b	127	27	mir-141	120	52	mir-196	134	7
Let-7c	114	21	mir-127	127	11	mir-143	122	35	mir-197	135	8
Let-7d	113	29	mir-154	123	10	mir-145	156	71	mir-198	144	4
Let-7g	114	27	mir-181a	124	11	mir-146	143	85	mir-199	135	9
mir-145	111	29	mir-194	132	16	mir-188	117	37	mir-204	125	6
mir-155	114	17	mir-198	126	10	mir-190	131	55	mir-216	136	13
mir-181a	113	21	mir-199	146	16	mir-198	119	3	mir-410	134	7
mir-186	111	29	mir-201	125	24	mir-204	125	8			
mir-190	114	21	mir-369	130	9	mir-410	133	3			
mir-191	116	22	mir-93	129	16	mir-412	125	11			
mir-199	118	14									
mir-9	112	27									

Células BJ			A549 de cáncer de pulmón			Jurkats			Linfocitos T primarios		
miARN	% de cont neg	DT	miARN	% de cont neg	DT	miARN	% de cont neg	DT	miARN	% de cont neg	DT
miR-26a	130	17	mir-25	112	0	miR-100	134	15	let-7a	151	17
miR-128	131	24	mir-294	112	1	miR-125b	132	4	let-7b	150	14
miR-223	134	14	mir-32	121	0	miR-126	134	19	let-7c	159	4
miR-188	139	19	mir-92	122	0	miR-129	150	10	let-7d	142	10
miR-125a	140	10				miR-140	139	4	let-7g	141	7
miR-201	153	18				miR-143	162	2	miR-10a	130	10
miR-291-3p	155	30				miR-155	146	23	miR-10b	127	20
miR-145	161	2				miR-15a	146	12	miR-125a	131	5
miR-294	165	21				miR-23b	135	4	miR-126	126	42
miR-150	171	7				miR-25	154	18	miR-15a	135	11
miR-322	212	19,93				miR-26a	170	14	miR-17-3p	128	4
miR-295	215	40,78							miR-18	138	2
miR-187	246	19							miR-182	126	18
miR-373	266	41,39							miR-19a	126	5
									miR-20	130	14
									miR-7	126	1

CRL5826			HTB-57		
miARN	% de CN	DT	miARN	% de CN	DT
mir-130a	126	27	mir-135	121	8
mir-145	112	8	mir-216	126	7
mir-30e-5p	122	11	mir-293	121	4
mir-333	112	35	mir-338	122	14
mir-335	114	33	mir-341	118	22
mir-369	111	8			
mir-350	111	5			
mir-412	123	14			

FIG. 16

22Rv1 de próstata			TE354T de piel			MCF12a de mama			A549 de pulmón		
miARN	% de CN	DT	miARN	% de CN	DT	miARN	% de CN	DT	miARN	% de CN	DT
mir-100	59	26	mir-210	67	13	mir-216	92	9	mir-129	90	5
mir-130a	58	16	mir-216	53	1	mir-217	95	14	mir-326	88	2
mir-211	54	7				mir-294	93	23	mir-331	92	2
mir-212	58	1							mir-338	91	2
mir-213	57	11							mir-341	89	5
mir-215	59	8							mir-370	91	0
mir-224	49	30							mir-92	88	0
mir-292	59	4									
mir-320	58	6									
mir-324	55	6									
mir-325	59	10									
mir-330	58	28									
mir-338	55	10									
mir-369	57	6									
mir-370	54	16									
mir-99a	58	15									

FIG. 17

22Rv1 de próstata			TE354T de piel			MCF12a de mama			A549 de pulmón		
miARN	% de CN	DT	miARN	% de CN	DT	miARN	% de CN	DT	miARN	% de CN	DT
mir-10b	104	27	Let-7a	139	9	let7a	180	35	let7a-1	116	5
mir-152	111	20	Let-7b	148	8	let7b-1	176	36	mir-133a-2	126	2
			Let-7g	133	8	let7c	177	21	mir-142	112	4
			mir-10a	135	10	let7d	172	37	mir-187	110	6
			mir-10b	140	10	mir-10a	178	22	mir-199a-1	111	4
			mir-133B	135	8	mir-10b	190	18	mir-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	% de CN	% de DT	miARN	% de CN	% de DT	miARN	% de CN	% de DT	miARN	% de CN	% de DT
miARN que reduce 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
miR-19a	73	24				mir-210	23	4	mir-345	75	6
miR-29a	68	7				mir-297	19	16	mir-346	78	8
miR-30a-3p	66	27				mir-299	20	18	mir-409	86	3
miR-34a	67	21				mir-337	18	3			
miARN que aumenta 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						
			miR-15a	135	11						
			miR-17-3p	128	4						
			miR-18	138	2						
			miR-182	126	18						
			miR-19a	126	5						
			miR-20	130	14						

FIG. 19

22Rv1 de próstata			TE354T de piel			Jurkat			HeLa		
miARN sintéticos que aumentan la apoptosis											
miARN	% de CN	DT	miARN	% de CN	DT	miARN	% de CN	DT	miARN	% de CN	DT
Let-7g	164	17	mir-149	179	22	let-7b	201	41	let-7b	369	89
mir-1	192	20	mir-154	252	15	let-7g	152	19	let-7g	594	260
mir-10a	205	15	mir-195	174	16	miR-1	170	11	miR-1	410	65
mir-149	169	14	mir-208	189	18	miR-10b	198	24	miR-10b	378	28
mir-184	166	19	mir-214	187	14	miR-122	154	29	miR-122	303	44
mir-186	166	23	mir-217	177	21	miR-17-3p	171	12	miR-17-3p	346	68
mir-188	197	12	mir-293	234	19	miR-19a	153	6	miR-19a	312	7
mir-192	182	26	mir-299	193	12	miR-28	154	20	miR-28	347	56
			mir-328	198	17	miR-29a	155	15	miR-29a	439	63
			mir-344	204	8	miR-32	156	30	miR-32	473	209
						miR-34a	181	39	miR-34a	361	82
									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 reducen la apoptosis											
mir-128	54	27	Let-7b	56	10	miR-125b	75	2	miR-32	8	7
mir-21	47	23	mir-100	55	11	miR-126	66	11	mir-105	40	9
mir-216	48	37	mir-101	44	9	miR-143	68	3	mir-108	39	12
mir-223	54	36	mir-126	38	11	miR-155	67	22	mir-126	29	4
mir-23b	46	44	mir-207	59	8	miR-23b	70	14	mir-137	13	12
mir-328	22	29	mir-25	59	9	miR-26a	68	11	mir-292-3p	31	4
mir-335	40	26	mir-28	41	7	miR-98	74	27	mir-34a	38	8
mir-340	51	11	mir-29a	39	8				mir-96	32	13
mir-367	37	34	mir-30a-3p	30	6						
mir-368	53	36									
mir-360-3p	30	42									
mir-410	50	47									
mir-341	53	0									

FIG. 20

A549 +/- TRAIL		A549 +/- etopósido		HTB-57 +/- etopósido		CRL-5826 +/- etopósido		HeLa +/- etopósido	
miARN que reducen la viabilidad celular en presencia de un producto terapéutico									
miARN	% de CN	miARN	% de CN	miARN	% de CN	miARN	% de CN	miARN	% de CN
mir-101	135	mir-28	319	mir-126	171	mir-132	142	mir-124	162
mir-124	158	mir-124	139	mir-132	201	mir-182	134	mir-126	161
mir-125a	134	mir-126	141	mir-28	176	mir-28	154	mir-132	170
mir-132	147	mir-147	120	mir-337	217	mir-292-3p	212	mir-147	171
mir-136	178	mir-216	108	mir-292-3p	268			mir-216	199
mir-155	181	mir-292-3p	489	miR-7100	227			mir-28	169
mir-182	153	mir-337	251					mir-292-3p	208
mir-186	176							mir-337	285
mir-202	152								
mir-206	138								
mir-221	143								
mir-224	129								
mir-28	136								
mir-291	145								
mir-292-3p	169								
mir-297	140								
mir-302	134								
mir-372	125								
mir-373	169								
mir-376b	145								
miARN que aumentan la viabilidad celular en presencia de un producto terapéutico									
mir-125b	83								
mir-152	73								
mir-16	90								
mir-194	78								
mir-197	82								
mir-214	82								
mir-24	87								
mir-30a-3p	63								
mir-331	73								

FIG. 21

miARN	secuencia	Proliferación de A549 (% de CN)	Proliferación de Jurkats (% de CN)
let-7a	ugagguaguagguuguauaguu	119	21
let-7b	ugagguaguagguuguguguu	124	50
let-7c	ugagguaguagguuguauuguu	114	85
let-7d	agagguaguagguugcauagu	113	97
let-7g	ugagguaguaguuguacagu	114	105

FIG. 23

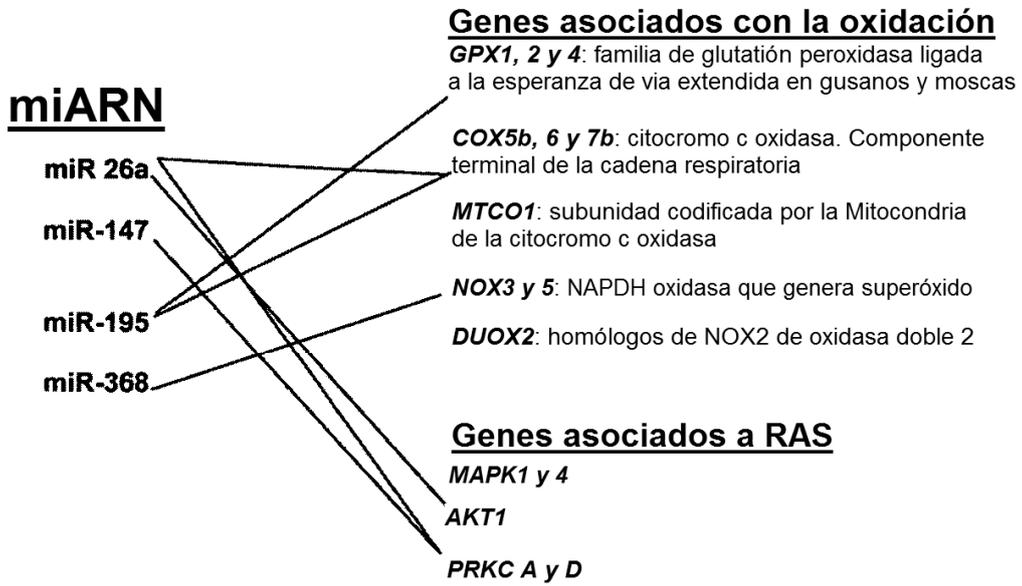


FIG. 24