

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 507 544**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/11** (2006.01)

**C12N 15/113** (2010.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2005** **E 10183577 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.08.2014** **EP 2302055**

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:  
**15.10.2014**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 507 544 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

**Campo de la invención**

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

**Descripción de la técnica relacionada**

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

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

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

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

Hay unos pocos ejemplos de que los miARN tienen papeles críticos en la diferenciación celular, el desarrollo temprano, y los procesos celulares tales como apoptosis y metabolismo de las grasas. Tanto lin-4 como let-7 regulan el paso de un estado larvario a otro durante el desarrollo de *C. elegans* (Ambros, 2003). El miR-15 y bantam son los miARN de *Drosophila* que regulan la muerte celular, aparentemente regulando la expresión de los genes implicados en la apoptosis (Brennecke y col., 2003; Xu y col., 2003). El miR14 también se ha implicado en el metabolismo graso (Xu y col., 2003). El Lys-6 y miR-273 son miARN de *C. elegans* que regulan la asimetría en las neuronas quimiosensoriales (Chang y col., 2004). Otro miARN animal que regula la diferenciación celular es el miR-181, que dirige la diferenciación de células hematopoyéticas (Chen y col., 2004). Estas moléculas representan el intervalo total de miARN animales con funciones conocidas. Además, Kim y col., PNAS (2004) 101:360-365 desvela el miARN miR-34. La mejora del entendimiento de las funciones de los miARN sin duda revelará sistemas reguladores que contribuyen al desarrollo normal, diferenciación, comunicaciones inter e intra celulares, ciclo celular, angiogénesis, apoptosis, y muchos otros procesos celulares. Debido a sus importantes papeles en muchas funciones biológicas, es probable que los miARN ofrezcan puntos importantes para la intervención terapéutica o el análisis diagnóstico.

Caracterizar las funciones de biomoléculas como los miARN a menudo implica la introducción de las moléculas en las células o retirar las moléculas de las células y medir el resultado. Si se introduce un miARN en una célula y se produce apoptosis, entonces el miARN indudablemente participa en una ruta apoptótica. Los procedimientos para introducir y retirar miARN de las células se han descrito. Dos publicaciones recientes describen moléculas antisentido que se pueden utilizar para inhibir la actividad de miARN específicos (Meister y col., 2004; Hutvagner y col., 2004). Otra publicación describe el uso de plásmidos que se transcriben por ARN polimerasas y que producen miARN específicos cuando son transfectados en las células (Zeng y col., 2002). Estos dos grupos de reactivos se han utilizado para evaluar miARN sencillos.

Una limitación del sistema de expresión de miARN basado en plásmidos es que la eficacia de transfección de los plásmidos tiende a ser muy baja, con solo aproximadamente un 50% de células que expresan el ARN del plásmido

en las células que son fáciles de transfectar. La eficacia de transfección para los plásmidos en células primarias son mucho más bajas con poco más del 10% de las células típicamente que expresan el ARN deseado. Por lo tanto, existe una necesidad para composiciones alternativas y procedimientos para introducir moléculas de miARN en células de forma que se puedan caracterizar y estudiar.

## 5 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico miARN sintético que comprende una secuencia con al menos un 80% de identidad de secuencia con la secuencia del miR-34 a humano maduro para su uso en una terapia de un cáncer. También se proporciona un ácido nucleico miARN sintético de doble cadena de 17-30 nucleótidos de longitud que comprende un polinucleótido que tiene una secuencia con al menos un 80% de identidad de secuencia con una secuencia de miR-34 a maduro que comprende los nucleótidos 22-43 de las SEC ID N° 58, y un segundo polinucleótido separado cuya secuencia de 5' a 3' es complementaria entre un 60% y el 100% para su uso como un medicamento.

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

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

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

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

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

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

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

En ciertas realizaciones, el miARN sintético tiene a) una "región de miARN" cuya secuencia de 5' a 3' es idéntica a una secuencia de un miARN maduro, y b) una "región complementaria" cuya secuencia de 5' a 3' es entre un 60% y el 100% complementaria a la secuencia del miARN. En ciertas realizaciones, este miARN sintético también está aislado, como se ha definido anteriormente. La expresión "región de miARN" se refiere a una región del miARN sintético que es idéntica al menos en un 80% a la secuencia entera de una secuencia de miARN maduro de origen natural. En ciertas realizaciones, la región de miARN es o al menos es idéntica en un 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4, 99,5, 99,6, 99,7, 99,8, 99,9 o el 100% a la secuencia de miARN de origen natural.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- En otros procedimientos de la invención, se incluye una etapa de síntesis u obtención de la molécula de ARN sintético.

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

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

En ciertas realizaciones, los procedimientos incluyen proporcionar o introducir en una célula una molécula de ácido nucleico correspondiente con un miARN maduro en una cantidad eficaz para conseguir un resultado fisiológico

deseado. Tales procedimientos se desvelan en el presente documento.

En otras realizaciones, los procedimientos implican la reducción de la viabilidad celular, la inducción de apoptosis en una células, o la disminución de la proliferación células, con la condición de que se excluyan los procedimientos del tratamiento del cuerpo humano o animal por medio de terapia, que comprenden introducir o proporcionar a la células una cantidad eficaz de una molécula de miARN sintético que se corresponde con miR-34a. También se contemplan uno o más miARN humanos seleccionados de entre el grupo compuesto por let-7, miR-10a, miR-15a, miR-16, miR-17, miR-21, miR-22, miR-23, miR-24, miR-26a, miR-29b, miR-30a, miR-96, miR-101, miR-105, miR-106, miR-124, miR-125a, miR-126, miR-130, miR130a, miR-133, miR-142, miR-143, miR-144, miR-145, miR-147, miR-181a, miR-182, miR-183, miR-188, miR-189, miR-192, miR-194, miR-195, miR-199a, miR-200b, miR-201, miR-205, miR-219, miR-206, miR-215, miR-219, miR-223, miR-224, miR-321, miR-328, miR-331, miR-342, miR-219, y miR-346. Se contempla que se pueden utilizar 1, 2, 3, o más miARN para estas realizaciones. El cáncer incluye, pero no se limita a estos, cánceres malignos, tumores, cánceres metastáticos, cánceres inoperables, cánceres resistentes a quimioterapia y/o radiación, y cánceres terminales.

Se entenderá que se emplean notaciones abreviadas tal que una descripción genérica de un miARN se refiere a cualquier miembro de su familia de genes (distinguido por un número), a menos de que se indique otra cosa. Se entiende por los expertos en la técnica que una "familia de genes" se refiere a un grupo de genes que tienen la misma secuencia codificante miARN. Típicamente, los miembros de una familia de genes se identifican por un número seguido de la designación inicial. Por ejemplo, miR-16-1 y miR-16-2 son miembros de la familia miR-16 y "miR-7" se refiere a miR-7-1, miR-7-2 y miR-7-3. Además, a menos de que se indique otra cosa, una notación abreviada se refiere a los miARN relacionados (distinguidos por una letra). Así, "let-7", por ejemplo, se refiere a let7-a-2, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f-1, y let-7f-2. Las excepciones a estas notaciones abreviadas se identificarán de otra manera.

También se contempla el uso de ácidos nucleicos miARN sintéticos en la terapia del cáncer de pulmón como parte de la invención. La presente invención se refiere a un ácido nucleico miARN sintético para su uso en el tratamiento del cáncer de cuello uterino o la disminución de la proliferación celular de las células del cáncer de cuello uterino.

La presente invención se refiere a un ácido nucleico miARN sintético para su uso en el tratamiento del cáncer de próstata o la disminución de la proliferación celular de las células del cáncer de próstata. La presente invención se refiere a un ácido nucleico miARN sintético para su uso en el tratamiento del cáncer de piel o la disminución de la proliferación celular de las células del cáncer de piel. La presente invención se refiere a un ácido nucleico miARN sintético para su uso en el tratamiento de la leucemia o el descenso de la proliferación celular de los linfocitos T cancerosos (de leucemia).

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

La expresión "reducción de la viabilidad celular" significa la reducción del número de células vivas.

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

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

La presente invención también cubre un ácido nucleico miARN sintético para su uso en procedimientos de inhibición de la activación de ERK. Se contempla que una cantidad eficaz de un modulador de miARN puede ser por administración. En realizaciones particulares, hay un beneficio terapéutico conferido a la materia biológica, donde un "beneficio terapéutico" se refiere a una mejoría en una o más afecciones o síntomas asociados con una enfermedad o afección o una mejoría del pronóstico, duración o estado con respecto a la enfermedad. Se contempla que un beneficio terapéutico incluye, pero no se limita a estos, disminución del dolor, un descenso de la morbilidad, un descenso de un síntoma. Por ejemplo, con respecto al cáncer, se contempla que un beneficio terapéutico en el cáncer puede ser la inhibición del crecimiento tumoral, prevención de metástasis, reducción del número de

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

- 5 Además, se contempla que las composiciones de miARN se pueden proporcionar para su uso como parte de una terapia para un paciente, en conjunción con terapias tradicionales o agentes preventivos. Además, se contempla que cualquier procedimiento tratado en el contexto de la terapia se puede aplicar preventivamente, particularmente en un paciente identificado como que potencialmente necesita la terapia o en riesgo de la afección o la enfermedad para la que necesita terapia.
- 10 Las terapias del cáncer también incluyen una variedad de combinación de terapias con tratamientos tanto químicos como basados en radiación. La combinación de quimioterapias incluyen pero no están limitadas a estas, por ejemplo, bevacizumab, cisplatino (CDDP), carboplatino, inhibidores de EGFR (gefitinib y cetuximab), procarbazona, 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, receptor estrogénico agentes de unión, taxol, taxotere, gemcitabina, navelbina, inhibidores de farnesil-proteína transferasa, transplatino, 5-fluorouracilo, vincristina, vinblastina y metotrexato, o cualquier análogo o variante derivado de los anteriores.
- 15

- Generalmente, se pueden dar inhibidores de los miARN para conseguir el efecto contrario en comparación con cuando se dan las correspondientes moléculas de ácido nucleico miARN maduro. De manera similar, se pueden dar las moléculas correspondientes de ácido nucleico miARN maduro para conseguir el efecto contrario en comparación con cuando se dan los inhibidores de miARN. Por ejemplo, se pueden proporcionar a las células moléculas de miARN que aumentan la proliferación celular para aumentar la proliferación o se pueden proporcionar inhibidores de tales moléculas para disminuir la proliferación celular. A lo largo de la presente solicitud, el término “aproximadamente” se utiliza para indicar que un valor incluye la desviación estándar del error para el dispositivo o procedimiento que se emplea para determinar el valor.
- 20
- 25

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

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

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

- FIG. 1 Visión en conjunto de la expresión y activación de miARN.** Los miARN se transcriben como parte de moléculas de ARN más largas que pueden tener hasta cien nucleótidos (Lee, 2002). Los ARN se procesan en el núcleo en horquilla de 70-100 nucleótidos por la ribonucleasa Drosha específica de ARNs (Lee, 2003) (FIG. 1). Los ARN en horquilla se transportan al citoplasma y se digieren por una segunda ribonucleasa específica de doble cadena llamada Dicer. Los miARN resultantes de 19-23meros se unen a un complejo que es similar o idéntico al Complejo de Silenciamiento Inducido por ARN (RISC) que participa en la interferencia de ARN (Hutvagner, 2002). En el complejo de unión, el miARN de cadena sencilla se une a ARNm con secuencias que son significativamente, aunque no completamente, complementarias al miARN. Por un mecanismo que no se comprende del todo, pero que no implica degradación del ARNm, el ARNm unido no se traduce, dando como resultado la expresión reducida del gen correspondiente.
- 35
- 40

- FIG. 2. Procedimientos para introducir los miARN en las células.** Hay tres procedimientos básicos para introducir miARN en las células. En el primero, un ADN que tiene un promotor corriente arriba de una secuencia que codifica un miARN se introduce en las células donde se transcribe para producir una molécula de ARN que incluye el miARN maduro. El procesamiento y la captación por el complejo proteico para la regulación genética inducida por miARN dan como resultado la activación del miARN. Este procedimiento padece de introducción ineficaz de la construcción de ADN en las células. En el segundo procedimiento, una molécula de ARNs similar ARNs, que tiene una de las cadenas idénticas al miARN activo se introduce en las células donde es captada por el complejo proteico para la activación del miARN. Este procedimiento proporciona un suministro eficaz, pero a menudo la captación de molécula de ARN complementaria accidental. El tercer procedimiento, descrito en el presente documento, implica la modificación de la cadena complementaria de forma que favorezca la captación y activación de la cadena activa de la construcción de miARN sintético.
- 45
- 50

- FIG. 3. Captación preferencial de cadenas activas en los miARN sintéticos de la invención.** Vectores indicadores con luciferasa bajo el control de sitios diana para miR-33 o let-7 o las cadenas complementarias de los ARNs mencionados anteriormente. La co-transfección de miARN sintéticos y vectores indicadores seguida por un ensayo de luciferasa 24 horas post-transfección reveló los miARN activados tras la transfección.
- 55

- FIG. 4. Actividad de miARN sintético para varios miARN.** Se prepararon miARN con ARNs y diseño Pre-miR (5' amina) y se transfectaron en células HeLa con una concentración final de 3 y 10 nM. Los miARN sintéticos se co-transfectaron con vectores indicadores que llevaban sitios diana para los miARN maduros. La expresión del
- 60

indicador luciferasa en las células transfectadas se midió veinticuatro horas tras la transfección y se expresó en la figura como la expresión del indicador con respecto a las células co-transfectadas con miARN sintéticos controles negativos.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**FIG. 15A-C. miARN sintéticos que disminuyen la proliferación celular.** A. Se evaluaron las células BT549 y MCF 12 A (mama), HeLa (cuello uterino) y 22 Rv1 (próstata) en cuanto a su proliferación celular. B. Se examinaron las células TE354T y TE353SK (piel), BJ (piel), y A549 (pulmón) en cuanto a su proliferación celular. C. Se evaluaron CRL5826 y HTB-57 (pulmón), Jurkat (linfocitos T), y linfocitos T primarios en cuanto a su proliferación celular.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

### Descripción de las realizaciones ilustrativas

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

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

### **I. Moléculas de miARN**

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

El miARN procesado (también denominado "miARN maduro") forma parte de un gran complejo para regular negativamente un gen diana particular. Ejemplos de miARN animales incluyen los que se emparejan imperfectamente con las bases de la diana, lo que detiene la traducción (Olsen y col., 1999; Slegger y col., 2002). Las moléculas de ARNsi también las procesa la Dicer, pero a partir de una molécula de ARN larga, bicatenaria. Los ARNsi no se encuentran naturalmente en las células animales, pero pueden funcionar en tales células en un complejo silenciador inducido por ARN (RISC) para dirigir la escisión específica de secuencia de un ARNm diana (Denli y col, 2003).

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

### miARN sintéticos

Los miARN aparentemente son activos en la célula cuando el ARN maduro de una cadena se une a un complejo proteico que regula la traducción de ARNm que se hibrida con el miARN. La introducción de moléculas exógenas de ARN que afectan a las células de la misma manera que los miARN expresados endógenamente necesita que una molécula de ARN de una cadena con la misma secuencia que el miARN maduro endógeno pueda captarse por el complejo proteico que facilita el control traduccional. Se han evaluado una variedad de diseños de moléculas de ARN. Se han identificado tres diseños generales que maximizan la captación del miARN de cadena única deseado por la ruta de miARN. Una molécula de ARN con una secuencia de miARN que tiene al menos uno de los tres

diseños se denomina miARN sintético.

Los miARN sintéticos de la invención comprenden, en algunas realizaciones, dos moléculas de ARN en las que un ARN es idéntico a un miARN maduro de origen natural. La molécula de ARN que es idéntica a un miARN maduro se denomina la cadena activa. La segunda molécula de ARN, llamada cadena complementaria, es al menos parcialmente complementaria a la cadena activa. La cadena activa y la complementaria se hibridan para crear un ARN de doble cadena, llamado miARN sintético, que es similar al precursor de miARN de origen natural que se une al complejo proteico inmediatamente antes de la activación de miARN en la célula. Para maximizar la actividad del miARN sintético se necesita maximizar la captación de la cadena activa y minimizar la captación de la cadena complementaria por el complejo proteico de miARN que regula la expresión genética a nivel de la traducción. Los diseños moleculares que proporcionan la actividad de miARN óptima implican modificaciones de la cadena complementaria.

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

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

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

#### A. Ácidos nucleicos

Se describen moléculas de ácido nucleico que puede introducir o inhibir los miARN en células cultivadas. Los ácidos nucleicos pueden haberse producido en células o *in vitro* por enzimas purificadas aunque preferencialmente se producen por síntesis química. Pueden estar en bruto o purificadas. El término "miARN", a menos de que se indique otra cosa, se refiere al ARN procesado después de que se ha escindido de su precursor. La tabla 1 indica qué SEC ID N° se corresponde con la secuencia de un precursor de miARN particular y qué secuencias con la SEC ID N° se corresponde con la secuencia madura. El nombre de miARN a menudo está abreviado y se designa sin prefijo y se entenderá como tal dependiendo del contexto. A menos de que se indique otra cosa, los miARN a los que se refiere la solicitud son secuencias humanas identificadas como mir-X o let-X, donde X es un número y/o una letra.

Tabla 1

| Secuencias miARN Humano |              |                                           |
|-------------------------|--------------|-------------------------------------------|
| Nombre de miARN         | Precursor    | Secuencia Procesada Respecto al Precursor |
| hsa-mir-1-2             | SEC ID N° 1  | 53-73                                     |
| hsa-mir-1-1             | SEC ID N° 2  | 46-66                                     |
| hsa-let-7a-1            | SEC ID N° 3  | 6-27                                      |
| 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                                      |

(Continuación)

| <b>Secuencias miARN Humano</b> |                  |                                                  |
|--------------------------------|------------------|--------------------------------------------------|
| <b>Nombre de miARN</b>         | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada Respecto al Precursor</b> |
| 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                                             |
| has-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                                            |
| 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                                            |

(Continuación)

| <b>Secuencias miARN Humano</b> |                  |                                                      |
|--------------------------------|------------------|------------------------------------------------------|
| <b>Nombre de miARN</b>         | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada<br/>Respecto al Precursor</b> |
| 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                                                |
| 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                                                |

(Continuación)

| <b>Secuencias miARN Humano</b> |                  |                                                  |
|--------------------------------|------------------|--------------------------------------------------|
| <b>Nombre de miARN</b>         | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada Respecto al Precursor</b> |
| 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                                            |
| 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                                            |

(Continuación)

| <b>Secuencias miARN Humano</b> |                  |                                                      |
|--------------------------------|------------------|------------------------------------------------------|
| <b>Nombre de miARN</b>         | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada<br/>Respecto al Precursor</b> |
| 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                                                |
| 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                                                |

(Continuación)

| <b>Secuencias miARN Humano</b> |                  |                                                  |
|--------------------------------|------------------|--------------------------------------------------|
| <b>Nombre de miARN</b>         | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada Respecto al Precursor</b> |
| 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                                            |
| 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                                            |

(Continuación)

| <b>Secuencias miARN Humano</b> |                  |                                                  |
|--------------------------------|------------------|--------------------------------------------------|
| <b>Nombre de miARN</b>         | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada Respecto al Precursor</b> |
| 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                                            |
| 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                                            |

(Continuación)

| <b>Secuencias miARN Humano</b> |                  |                                                  |
|--------------------------------|------------------|--------------------------------------------------|
| <b>Nombre de miARN</b>         | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada Respecto al Precursor</b> |
| 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                                             |
| 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                                            |

(Continuación)

| <b>Secuencias miARN Humano</b> |                  |                                                      |
|--------------------------------|------------------|------------------------------------------------------|
| <b>Nombre de miARN</b>         | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada<br/>Respecto al Precursor</b> |
| 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                                                |
| 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                                                |

(Continuación)

| <b>Secuencias miARN Humano</b> |                  |                                                  |
|--------------------------------|------------------|--------------------------------------------------|
| <b>Nombre de miARN</b>         | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada Respecto al Precursor</b> |
| hsa-mir-520g                   | SEC ID N° 774    | 55-78                                            |
| hsa-mir-520h                   | SEC ID N° 775    | 55-76                                            |
| hsa-mir-521-1                  | SEC ID N° 776    | 54-75                                            |
| hsa-mir-521-2                  | SEC ID N° 777    | 54-75                                            |
| hsa-mir-522                    | SEC ID N° 778    | 16-39                                            |
| hsa-mir-523                    | SEC ID N° 779    | 16-39                                            |
| hsa-mir-524                    | SEC ID N° 780    | 16-37                                            |
| hsa-mir-525                    | SEC ID N° 781    | 15-35                                            |
| hsa-mir-526a-1                 | SEC ID N° 782    | 15-35                                            |
| hsa-mir-526a-2                 | SEC ID N° 783    | 7-27                                             |
| hsa-mir-526b                   | SEC ID N° 784    | 14-37                                            |
| hsa-mir-527                    | SEC ID N° 785    | 14-34                                            |
| ambi-mir-7100                  | SEC ID N° 803    |                                                  |
| mir-526b*                      | SEC ID N° 804    |                                                  |
| mir-520a*                      | SEC ID N° 805    |                                                  |

Tabla 2

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

(Continuación)

| <b>Secuencias de miARN de ratón</b> |                  |                                                  |
|-------------------------------------|------------------|--------------------------------------------------|
| <b>Nombre de miARN</b>              | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada Respecto al Precursor</b> |
| mmu-mir-9-2                         | SEC ID Nº 208    | 8-30 y/o 46-66                                   |
| mmu-mir-9-1                         | SEC ID Nº 209    | 16-38 y/o 56-76                                  |
| mmu-mir-9-3                         | SEC ID Nº 210    | 16-38 y/o 56-76                                  |
| mmu-mir-10b                         | SEC ID Nº 211    | 7-28                                             |
| mmu-mir-10a-1                       | SEC ID Nº 212    | 22-44                                            |
| mmu-mir-10a-2                       | SEC ID Nº 213    | 22-44                                            |
| mmu-mir-15b                         | SEC ID Nº 214    | 4-25                                             |
| mmu-mir-15a                         | SEC ID Nº 215    | 15-36                                            |
| mmu-mir-16-1                        | SEC ID Nº 216    | 16-37                                            |
| mmu-mir-16-2                        | SEC ID Nº 217    | 17-38                                            |
| mmu-mir-17                          | SEC ID Nº 218    | 14-37 y/o 51-70                                  |
| mmu-mir-18                          | SEC ID Nº 219    | 17-38                                            |
| mmu-mir-19b-2                       | SEC ID Nº 220    | 54-76                                            |
| mmu-mir-19a                         | SEC ID Nº 221    | 49-71                                            |
| mmu-mir-19b-1                       | SEC ID Nº 222    | 54-76                                            |
| mmu-mir-20                          | SEC ID Nº 223    | 27-49                                            |
| mmu-mir-21                          | SEC ID Nº 224    | 18-39                                            |
| mmu-mir-22                          | SEC ID Nº 225    | 57-78                                            |
| mmu-mir-23b                         | SEC ID Nº 226    | 46-68                                            |
| mmu-mir-23a                         | SEC ID Nº 227    | 46-66                                            |
| mmu-mir-24-1                        | SEC ID Nº 228    | 6-28 y/o 44-65                                   |
| mmu-mir-24-2                        | SEC ID Nº 229    | 61-82                                            |
| mmu-mir-25                          | SEC ID Nº 230    | 52-73                                            |
| mmu-mir-26a-1                       | SEC ID Nº 231    | 16-37                                            |
| mmu-mir-26b                         | SEC ID Nº 232    | 15-36                                            |
| mmu-mir-26a-2                       | SEC ID Nº 233    | 14-35                                            |
| mmu-mir-27b                         | SEC ID Nº 234    | 49-68                                            |
| mmu-mir-27a                         | SEC ID Nº 235    | 56-76                                            |
| mmu-mir-28                          | SEC ID Nº 236    | 14-35                                            |
| mmu-mir-29b-1                       | SEC ID Nº 237    | 47-68                                            |
| mmu-mir-29a                         | SEC ID Nº 238    | 53-74                                            |
| mmu-mir-29c                         | SEC ID Nº 239    | 54-75                                            |
| mmu-mir-29b-2                       | SEC ID Nº 240    | 52-73                                            |
| mmu-mir-30a                         | SEC ID Nº 241    | 47-68                                            |

(Continuación)

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

(Continuación)

| <b>Secuencias de miARN de ratón</b> |                  |                                                  |
|-------------------------------------|------------------|--------------------------------------------------|
| <b>Nombre de miARN</b>              | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada Respecto al Precursor</b> |
| mmu-mir-128a                        | SEC ID Nº 277    | 44-65                                            |
| mmu-mir-128b                        | SEC ID Nº 278    | 48-69                                            |
| mmu-mir-129-1                       | SEC ID Nº 279    | 6-27                                             |
| mmu-mir-129-2                       | SEC ID Nº 280    | 15-36                                            |
| mmu-mir-130a                        | SEC ID Nº 281    | 42-61                                            |
| mmu-mir-130b                        | SEC ID Nº 282    | 51-72                                            |
| mmu-mir-132                         | SEC ID Nº 283    | 42-63                                            |
| mmu-mir-133a-1                      | SEC ID Nº 284    | 44-65                                            |
| mmu-mir-133a-2                      | SEC ID Nº 285    | 60-81                                            |
| mmu-mir-133b                        | SEC ID Nº 286    | 67-87                                            |
| mmu-mir-134                         | SEC ID Nº 287    | 7-27                                             |
| mmu-mir-135a-1                      | SEC ID Nº 288    | 17-39                                            |
| mmu-mir-135b                        | SEC ID Nº 289    | 16-37                                            |
| mmu-mir-135a-2                      | SEC ID Nº 290    | 23-45                                            |
| mmu-mir-136                         | SEC ID Nº 291    | 5-27                                             |
| mmu-mir-137                         | SEC ID Nº 292    | 46-67                                            |
| mmu-mir-138-2                       | SEC ID Nº 293    | 2-18                                             |
| mmu-mir-138-1                       | SEC ID Nº 294    | 23-39                                            |
| mmu-mir-139                         | SEC ID Nº 295    | 7-24                                             |
| mmu-mir-140                         | SEC ID Nº 296    | 7-27                                             |
| mmu-mir-141                         | SEC ID Nº 297    | 49-69                                            |
| mmu-mir-142                         | SEC ID Nº 298    | 4-23 y/o 40-61                                   |
| mmu-mir-143                         | SEC ID Nº 299    | 40-61                                            |
| mmu-mir-144                         | SEC ID Nº 300    | 43-64                                            |
| mmu-mir-145                         | SEC ID Nº 301    | 7-30                                             |
| mmu-mir-146                         | SEC ID Nº 302    | 6-27                                             |
| 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                                             |

(Continuación)

| Secuencias de miARN de ratón |               |                                           |
|------------------------------|---------------|-------------------------------------------|
| Nombre de miARN              | Precursor     | Secuencia Procesada Respecto al Precursor |
| mmu-mir-181b-1               | SEC ID N° 312 | 12-35                                     |
| mmu-mir-181c                 | SEC ID N° 313 | 17-38                                     |
| mmu-mir-181b-2               | SEC ID N° 314 | 16-39                                     |
| mmu-mir-182                  | SEC ID N° 315 | 7-28                                      |
| mmu-mir-183                  | SEC ID N° 316 | 6-28                                      |
| mmu-mir-184                  | SEC ID N° 317 | 45-66                                     |
| mmu-mir-185                  | SEC ID N° 318 | 7-24                                      |
| mmu-mir-186                  | SEC ID N° 319 | 7-29                                      |
| mmu-mir-187                  | SEC ID N° 320 | 40-61                                     |
| mmu-mir-188                  | SEC ID N° 321 | 6-27                                      |
| mmu-mir-190                  | SEC ID N° 322 | 6-27                                      |
| mmu-mir-191                  | SEC ID N° 323 | 7-28                                      |
| mmu-mir-192                  | SEC ID N° 324 | 14-31                                     |
| mmu-mir-193                  | SEC ID N° 325 | 41-61                                     |
| mmu-mir-194-1                | SEC ID N° 326 | 7-28                                      |
| mmu-mir-194-2                | SEC ID N° 327 | 16-37                                     |
| mmu-mir-195                  | SEC ID N° 328 | 1-21                                      |
| mmu-mir-196-1                | SEC ID N° 329 | 24-44                                     |
| mmu-mir-196-2                | SEC ID N° 330 | 16-36                                     |
| mmu-mir-199a-1               | SEC ID N° 331 | 6-28 y/o 45-66                            |
| mmu-mir-199a-2               | SEC ID N° 332 | 31-53 y/o 69-90                           |
| mmu-mir-199b                 | SEC ID N° 333 | 26-48                                     |
| mmu-mir-200b                 | SEC ID N° 334 | 45-67                                     |
| mmu-mir-200a                 | SEC ID N° 335 | 54-75                                     |
| mmu-mir-200c                 | SEC ID N° 336 | 46-67                                     |
| mmu-mir-201                  | SEC ID N° 337 | 6-26                                      |
| mmu-mir-202                  | SEC ID N° 33  | 45-66                                     |
| mmu-mir-203                  | SEC ID N° 339 | 49-69                                     |
| mmu-mir-204                  | SEC ID N° 340 | 6-28                                      |
| mmu-mir-205                  | SEC ID N° 341 | 7-28                                      |
| mmu-mir-206                  | SEC ID N° 342 | 46-67                                     |
| mmu-mir-207                  | SEC ID N° 343 | 52-74                                     |
| mmu-mir-208                  | SEC ID N° 344 | 50-71                                     |
| mmu-mir-210                  | SEC ID N° 345 | 66-86                                     |
| mmu-mir-211                  | SEC ID N° 346 | 26-47                                     |

(Continuación)

| <b>Secuencias de miARN de ratón</b> |                  |                                                  |
|-------------------------------------|------------------|--------------------------------------------------|
| <b>Nombre de miARN</b>              | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada Respecto al Precursor</b> |
| mmu-mir-212                         | SEC ID Nº 347    | 56-76                                            |
| mmu-mir-213                         | SEC ID Nº 348    | 14-36 y/o 54-75                                  |
| mmu-mir-214                         | SEC ID Nº 349    | 71-91                                            |
| mmu-mir-215                         | SEC ID Nº 350    | 30-50                                            |
| mmu-mir-216                         | SEC ID Nº 351    | 7-27                                             |
| mmu-mir-217                         | SEC ID Nº 352    | 34-57                                            |
| mmu-mir-218-2                       | SEC ID Nº 353    | 25-45                                            |
| mmu-mir-219-1                       | SEC ID Nº 354    | 21-41                                            |
| mmu-mir-219-2                       | SEC ID Nº 355    | 19-39                                            |
| mmu-mir-221                         | SEC ID Nº 356    | 60-81                                            |
| mmu-mir-222                         | SEC ID Nº 357    | 49-71                                            |
| mmu-mir-223                         | SEC ID Nº 358    | 68-88                                            |
| mmu-mir-224                         | SEC ID Nº 359    | 8-30                                             |
| mu-miR-290                          | SEC ID Nº 360    | 15-37                                            |
| mmu-mir-291                         | SEC ID Nº 361    | 14-35 y/o 50-72                                  |
| mmu-mir-292                         | SEC ID Nº 362    | 12-33 y/o 51-73                                  |
| mmu-mir-293                         | SEC ID Nº 363    | 48-69                                            |
| mmu-mir-294                         | SEC ID Nº 364    | 51-72                                            |
| mmu-mir-295                         | SEC ID Nº 365    | 43-65                                            |
| mmu-mir-296                         | SEC ID Nº 366    | 13-33                                            |
| mmu-mir-297-1                       | SEC ID Nº 367    | 15-35                                            |
| mmu-mir-297-2                       | SEC ID Nº 368    | 36-56                                            |
| mmu-mir-298                         | SEC ID Nº 369    | 11-32                                            |
| mmu-mir-299                         | SEC ID Nº 370    | 7-28                                             |
| mmu-mir-300                         | SEC ID Nº 371    | 51-72                                            |
| mmu-mir-301                         | SEC ID Nº 372    | 51-73                                            |
| mmu-mir-302                         | SEC ID Nº 373    | 44-66                                            |
| mmu-mir-320                         | SEC ID Nº 374    | 48-70                                            |
| mmu-mir-321                         | SEC ID Nº 375    | 10-30                                            |
| mmu-mir-323                         | SEC ID Nº 376    | 50-71                                            |
| mmu-mir-324                         | SEC ID Nº 377    | 18-40 y/o 53-74                                  |
| mmu-mir-325                         | SEC ID Nº 378    | 16-38                                            |
| mmu-mir-326                         | SEC ID Nº 379    | 60-80                                            |
| mmu-mir-328                         | SEC ID Nº 380    | 61-82                                            |
| mmu-mir-329                         | SEC ID Nº 381    | 61-82                                            |

(Continuación)

| <b>Secuencias de miARN de ratón</b> |                  |                                                      |
|-------------------------------------|------------------|------------------------------------------------------|
| <b>Nombre de miARN</b>              | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada<br/>Respecto al Precursor</b> |
| mmu-mir-330                         | SEC ID Nº 382    | 61-83                                                |
| mmu-mir-331                         | SEC ID Nº 383    | 61-81                                                |
| mmu-mir-337                         | SEC ID Nº 384    | 61-83                                                |
| mmu-mir-338                         | SEC ID Nº 385    | 61-83                                                |
| mmu-mir-339                         | SEC ID Nº 386    | 16-36                                                |
| mmu-mir-340                         | SEC ID Nº 387    | 61-83                                                |
| mmu-mir-341                         | SEC ID Nº 388    | 61-81                                                |
| mmu-mir-342                         | SEC ID Nº 389    | 61-84                                                |
| mmu-mir-344                         | SEC ID Nº 390    | 61-83                                                |
| mmu-mir-345                         | SEC ID Nº 391    | 16-36                                                |
| mmu-mir-346                         | SEC ID Nº 392    | 16-38                                                |
| mmu-mir-350                         | SEC ID Nº 393    | 61-84                                                |
| mmu-mir-351                         | SEC ID Nº 583    | 16-39                                                |
| mmu-mir-370                         | SEC ID Nº 584    | 48-70                                                |
| mmu-mir-376a                        | SEC ID Nº 585    | 44-64                                                |
| mmu-mir-376b                        | SEC ID Nº 586    | 51-72                                                |
| mmu-mir-380                         | SEC ID Nº 587    | 40-61                                                |
| mmu-mir-409                         | SEC ID Nº 588    | 47-69                                                |
| mmu-mir-410                         | SEC ID Nº 589    | 50-71                                                |
| mmu-mir-411                         | SEC ID Nº 590    | 56-78                                                |
| mmu-mir-412                         | SEC ID Nº 591    | 50-72                                                |
| mmu-mir-425                         | SEC ID Nº 695    | 54-74                                                |
| mmu-mir-429                         | SEC ID Nº 696    | 51-72                                                |
| mmu-mir-448                         | SEC ID Nº 697    | 72-93                                                |
| mmu-mir-449                         | SEC ID Nº 698    | 16-37                                                |
| mmu-mir-450                         | SEC ID Nº 699    | 17-38                                                |
| mmu-mir-451                         | SEC ID Nº 786    | 17-38                                                |
| mmu-mir-452                         | SEC ID Nº 787    | 17-38                                                |
| mmu-mir-463                         | SEC ID Nº 788    | 4-24                                                 |
| mmu-mir-464                         | SEC ID Nº 789    | 47-69                                                |
| mmu-mir-465                         | SEC ID Nº 790    | 5-27                                                 |
| mmu-mir-466                         | SEC ID Nº 791    | 51-73                                                |
| mmu-mir-467                         | SEC ID Nº 792    | 50-71                                                |
| mmu-mir-468                         | SEC ID Nº 793    | 53-75                                                |
| mmu-mir-469                         | SEC ID Nº 794    | 6-31                                                 |

(Continuación)

| <b>Secuencias de miARN de ratón</b> |                  |                                                  |
|-------------------------------------|------------------|--------------------------------------------------|
| <b>Nombre de miARN</b>              | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada Respecto al Precursor</b> |
| 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                                             |
| mmu-mir-486                         | SEC ID N° 800    | 4-25                                             |

**Tabla 3**

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

(Continuación)

| <b>Secuencias de miARN de rata</b> |                  |                                                      |
|------------------------------------|------------------|------------------------------------------------------|
| <b>Nombre de miARN</b>             | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada<br/>Respecto al Precursor</b> |
| rno-mir-20                         | SEC ID N° 419    | 16-38 y/o 52-72                                      |
| 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                                                |
| rno-mir-96                         | SEC ID N° 451    | 24-46                                                |
| rno-mir-98                         | SEC ID N° 452    | 2-23                                                 |

(Continuación)

| <b>Secuencias de miARN de rata</b> |                  |                                                      |
|------------------------------------|------------------|------------------------------------------------------|
| <b>Nombre de miARN</b>             | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada<br/>Respecto al Precursor</b> |
| 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                                                |
| mo-mir-128a                        | SEC ID N° 471    | 50-71                                                |
| mo-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                                                |
| 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                                                 |
| mo-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                                      |

(Continuación)

| <b>Secuencias de miARN de rata</b> |                  |                                                      |
|------------------------------------|------------------|------------------------------------------------------|
| <b>Nombre de miARN</b>             | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada<br/>Respecto al Precursor</b> |
| 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                                                |
| 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                                                |

(Continuación)

| <b>Secuencias de miARN de rata</b> |                  |                                                      |
|------------------------------------|------------------|------------------------------------------------------|
| <b>Nombre de miARN</b>             | <b>Precursor</b> | <b>Secuencia Procesada<br/>Respecto al Precursor</b> |
| rno-mir-205                        | SEC ID Nº 523    | 33-54                                                |
| rno-mir-206                        | SEC ID Nº 524    | 51-72                                                |
| rno-mir-208                        | SEC ID Nº 525    | 50-71                                                |
| rno-mir-210                        | SEC ID Nº 526    | 66-86                                                |
| rno-mir-211                        | SEC ID Nº 527    | 26-47                                                |
| rno-mir-212                        | SEC ID Nº 528    | 72-92                                                |
| rno-mir-213                        | SEC ID Nº 529    | 55-76                                                |
| rno-mir-214                        | SEC ID Nº 530    | 71-91                                                |
| rno-mir-216                        | SEC ID Nº 531    | 19-39                                                |
| rno-mir-217                        | SEC ID Nº 532    | 32-55                                                |
| rno-mir-218-2                      | SEC ID Nº 533    | 25-45                                                |
| rno-mir-218-1                      | SEC ID Nº 534    | 25-45                                                |
| rno-mir-219-1                      | SEC ID Nº 535    | 21-41                                                |
| rno-mir-219-2                      | SEC ID Nº 536    | 19-39                                                |
| rno-mir-221                        | SEC ID Nº 537    | 65-87                                                |
| rno-mir-222                        | SEC ID Nº 538    | 62-85                                                |
| rno-mir-223                        | SEC ID Nº 539    | 68-88                                                |
| rno-mir-290                        | SEC ID Nº 540    | 14-36                                                |
| rno-mir-291                        | SEC ID Nº 541    | 14-35 y/o 50-72                                      |
| rno-mir-292                        | SEC ID Nº 542    | 12-33 y/o 51-73                                      |
| rno-mir-296                        | SEC ID Nº 543    | 13-33                                                |
| rno-mir-297                        | SEC ID Nº 544    | 26-48                                                |
| rno-mir-298                        | SEC ID Nº 545    | 11-32                                                |
| rno-mir-299                        | SEC ID Nº 546    | 7-28                                                 |
| rno-mir-300                        | SEC ID Nº 547    | 51-72                                                |
| rno-mir-301                        | SEC ID Nº 548    | 61-85                                                |
| rno-mir-320                        | SEC ID Nº 549    | 48-70                                                |
| rno-mir-321                        | SEC ID Nº 550    | 10-30                                                |
| rno-mir-322                        | SEC ID Nº 551    | 61-80                                                |
| rno-mir-323                        | SEC ID Nº 552    | 50-71                                                |
| rno-mir-324                        | SEC ID Nº 553    | 16-38 y/o 51-72                                      |
| rno-mir-325                        | SEC ID Nº 554    | 16-38                                                |
| rno-mir-326                        | SEC ID Nº 555    | 60-80                                                |
| rno-mir-328                        | SEC ID Nº 556    | 48-69                                                |
| rno-mir-329                        | SEC ID Nº 557    | 61-82                                                |

(Continuación)

| Secuencias de miARN de rata |               |                                              |
|-----------------------------|---------------|----------------------------------------------|
| Nombre de miARN             | Precursor     | Secuencia Procesada<br>Respecto al Precursor |
| 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                                        |
| rno-mir-429                 | SEC ID N° 700 | 53-74                                        |
| rno-mir-448                 | SEC ID N° 701 | 72-93                                        |
| rno-mir-449                 | SEC ID N° 702 | 16-37                                        |
| rno-mir-450                 | SEC ID N° 703 | 17-38                                        |
| rno-mir-451                 | SEC ID N° 801 | 17-38                                        |
| rno-mir-483                 | SEC ID N° 802 | 45-67                                        |

Se entiende que un miARN se deriva de secuencias genómicas de un gen. A este respecto, el término “gen” se utiliza por simplicidad para referirse a la secuencia genómica que codifica el precursor de miARN de un determinado miARN. Sin embargo, las realizaciones de la invención puede implicar secuencias genómicas de un miARN que está implicado en su expresión, tal como un promotor u otras secuencias reguladoras.

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

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

El término “miARN” generalmente se refiere a una molécula de una cadena, pero en realizaciones específicas, las moléculas implementadas en la invención también englobarán una región o una cadena adicional que es parcialmente (entre el 10 y el 50% complementaria a lo largo de la longitud de la cadena), sustancialmente (más del 50% pero menos del 100% complementaria a lo largo de la longitud de la cadena) o totalmente complementaria con

otra región de la misma molécula de la cadena única o con otro ácido nucleico. Por lo tanto, los ácidos nucleicos pueden englobar una molécula que comprende una o más cadenas complementarias o autocomplementarias o “complementos” de una secuencia particular que comprende una molécula. Por ejemplo, el precursor de miARN puede tener una región autocomplementaria que es complementaria hasta en el 100%.

- 5 Como se utiliza en el presente documento, “hibridación”, “se hibrida” o “capaz de hibridarse” se entiende que significa la formación de una molécula de doble o triple cadena o una molécula con naturaleza parcial de doble o triple cadena. El término “templarse” como se utiliza en el presente documento es sinónimo de “hibridarse”. El término “hibridación”, “se hibrida(n)” o “capaz de hibridarse” engloba los términos “condiciones rigurosas” o “alta rigurosidad” y los términos “baja rigurosidad” o “condiciones de baja rigurosidad”.
- 10 Los ácidos nucleicos sintéticos de la invención comprenderán, en algunas realizaciones la secuencia de miARN de cualquier miARN descrito en las SEC ID N<sup>os</sup> 1-805, y/o cualquier secuencia con el complemento de la misma. Se contempla que las secuencias de los ácidos nucleicos de la invención pueden tener, tener al menos, o tener como mucho 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150 nucleótidos contiguos de la SEC ID N<sup>os</sup> 1-805 (o cualquier intervalo derivado de las mismas), o es un complemento de las mismas. En otras realizaciones, los ácidos nucleicos son, son al menos, o son como mucho el 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% idénticos o complementarios a la secuencia de miARN de las SEC ID N<sup>os</sup> 1-805, o cualquier combinación o intervalo derivable de las mismas.

## 1. Bases nitrogenadas

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

- La(s) base(s) nitrogenada(s) “de purina” y/o “pirimidina” engloban las bases nitrogenadas purínicas y pirimidínicas de origen natural y también los derivados y análogos de las mismas, incluyendo pero sin limitarse a estas, las purinas o pirimidinas sustituidas por uno o más restos de entre un alquilo, carboxialquilo, amino, hidroxilo, halógeno (es decir, fluoro, cloro, bromo, o yodo), tiol o alquiltiol. Los restos alquilo preferidos (por ejemplo, alquilo, carboxialquilo, etc.) comprenden de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, a aproximadamente 6 átomos de carbono. Otros ejemplos de una purina o pirimidina incluye una deazapurina, una 2,6-diaminopurina, un 5-fluorouracilo, una xantina, una hipoxantina, una 8-bromoguanina, una 8-cloroguanina, una bromotimina, una 8-aminoguanina, una 8-hidroxiguanina, una 8-metilguanina, una 8-tioguanina, una azaguanina, una 2-aminopurina, una 5-etilcitosina, una 5-metilcitosina, una 5-bromouracilo, un 5-etiluracilo, un 5-yodouracilo, un 5-clorouracilo, un 5-propiluracilo, un tiouracilo, una 2-metiladenina, una metiltioadenina, una N,N-dimetiladenina, una azadenina, una 8-bromoadenina, una 8-hidroxiadenina, una 6-hidroxiaminopurina, una 6-tiopurina, una 4-(6-aminohexil/citosina), y similares. Otros ejemplos son conocidos por un experto en la técnica.

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

## 2. Nucleósidos

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

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

una pirimidina o una posición 1' de un azúcar de 5 carbonos (Komborg y Baker, 1992).

### 3. Nucleótidos

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

### 4. Análogos de ácido nucleico

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

Ejemplos no limitantes adicionales de nucleósidos, nucleótidos o ácidos nucleicos y/o derivados o análogos que comprenden un azúcar de 5 carbonos y/o un resto de estructura, incluyen los de: la Patente de EE. UU. N° 5.681.947, que describe oligonucleótidos que comprenden derivados de purina que forman hélices triples y/o evitan la expresión de ADNds; las Patentes de EE. UU. 5.652.099 y 5.763.167, que describen ácidos nucleicos que incorporan análogos de nucleósidos fluorescentes que se encuentran en ADN o ARN, particularmente para su uso como sondas de ácidos nucleicos fluorescentes; la Patente de EE. UU. 5.614.617, que describe análogos de oligonucleótidos con sustituciones en los anillos de pirimidina que poseen una estabilidad mejorada frente a nucleasas; las Patentes de EE. UU. 5.670.663, 5.872.232 y 5.859.221, que describen análogos de oligonucleótidos con azúcares de 5 carbonos modificados (es decir, restos de 2'-desoxifuransilo) que se utilizan en la detección de ácidos nucleicos; la Patente de EE. UU. 5.446.137, que describe oligonucleótidos que comprenden al menos un resto de azúcar de 5 carbonos sustituidos en la posición 4' con un sustituyente distinto de hidrógeno que se puede utilizar en ensayos de hibridación; la Patente de EE. UU. 5.886.165, que describe oligonucleótidos tanto desoxirribonucleótidos con uniones internucleótido 3'-5' como ribonucleótidos con uniones internucleótido 2'-5'; la Patente de EE. UU. 5.714.606, que describe una unión internucleótido modificada en la que un oxígeno en la posición 3' de la unión internucleótido se sustituye con un carbono para mejorar la resistencia a nucleasas de los ácidos nucleicos; la Patente de EE. UU. 5.672.697, que describe oligonucleótidos que contienen una o más uniones internucleótidos 5' metilen fosfonato que aumentan la resistencia a nucleasas; las Patentes de EE. UU. 5.466.786 y 5.792.847, que describen la unión de un resto sustituyente que puede comprender un fármaco o una marca en el carbono 2' de un oligonucleótido para proporcionar una mayor estabilidad frente a nucleasas y la capacidad de suministrar fármacos y restos de detección; la Patente de EE. UU. 5.223.618, que describe análogos de oligonucleótidos con 2 o 3 uniones de carbono estructurales unidas en la posición 4' y posición 3' adyacentes al resto de azúcar de 5 carbonos para mejorar la captación celular, la resistencia a las nucleasas y la hibridación con un ARN diana; la Patente de EE. UU. 5.470.967, que describe oligonucleótidos que comprenden al menos una unión internucleótido sulfamato o sulfamida que son útiles como sondas de hibridación de ácidos nucleicos: las Patentes de EE. UU. 5.378.825, 5.777.092, 5.623.070, 5.610.289 y 5.602.240, que describen oligonucleótidos con restos de engarce de tres o cuatro átomos que sustituyen el medio estructural de fosfodiéster utilizado para mejorar la resistencia a nucleasas, captación celular y regulación de la expresión de ARN; la Patente de EE. UU. 5.858.988, que describe un agente portador hidrofóbico unido en la posición 2'-O de los oligonucleótidos para mejorar su permeabilidad de membrana y la estabilidad; la Patente de EE. UU. 5.214.136, que describe oligonucleótidos conjugados con antraquinona en el extremo 5' que posee una hibridación al ADN, o ARN mejorada, estabilidad frente a nucleasas mejorada; la Patente de EE. UU. 5.700.922, que describe quimeras PAN-ADN-PAN en las que el ADN comprende 2'-desoxi-eritro-pentofuranosil nucleótidos para mejorar la resistencia a las nucleasas, afinidad de unión, y capacidad para activar la RNasa H; y la Patente de EE. UU. 5.708.154, que describe la unión de ARN a un ADN para formar un híbrido ADN-ARN; la Patente de EE. UU. 5.728.525, que describe el marcaje de análogos de nucleósidos con una marca fluorescente universal.

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

El uso de otros análogos se contempla específicamente para su uso en el contexto de la presente invención. Tales análogos se pueden utilizar en moléculas de ácido nucleico sintético de la invención, en toda la molécula o en los

nucleótidos seleccionados. Incluyen, pero no se limitan a estos, 1) modificaciones en la ribosa (tal como 2' F, 2' NH<sub>2</sub>, 2' N<sub>3</sub>, 4' tio, o 2' O-CH<sub>3</sub>) y 2) modificaciones fosfato (tales como los que se encuentran en los fosforotioatos, metil fosfonatos, y fosforoboratos). Tales análogos se han creado para conferir una estabilidad a los ARN reduciendo o eliminando su capacidad para ser escindido por ribonucleasas. Cuando estos análogos de nucleótidos están presentes en los ARN, puede tener efectos profundamente positivos en la estabilidad de ARN de animales. Se contempla que el uso de análogos de nucleótidos se pueden utilizar solos o en conjunción con cualquiera de las modificaciones de diseño de un miARN sintético para cualquier ácido nucleico de la invención.

## 5. Nucleótidos modificados

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

## B. Preparación de los ácidos nucleicos

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

La síntesis de ácido nucleico se lleva a cabo de acuerdo con los procedimientos de referencia. Véase, por ejemplo, Itakura y Riggs (1980). Adicionalmente, la Patente de EE. UU. 4.704.362, Patente de EE. UU. 5.221.619, y Patente de EE. UU. 5.583.013 describe cada una varios procedimientos para preparar ácidos nucleicos sintéticos. Ejemplos no limitantes de ácidos nucleicos sintéticos (por ejemplo, un oligonucleótido sintético), incluyen un ácido nucleico hecho por síntesis química *in vitro* utilizando química fosfotriéster, fosfita o fosforamidita y técnicas en fase sólida tales como las descritas en el documento EP 266.032, incorporado en el presente documento por referencia, o por medio de desoxinucleósidos H-fosfonato intermedios como se describe en Froehler y col., 1986 y Patente de EE. UU. Serie Nº 5.705.629. En los procedimientos de la presente invención, se pueden utilizar uno o más oligonucleótidos. Se han desvelado varios mecanismos diferentes de síntesis de oligonucleótidos en por ejemplo, Patentes de EE. UU. 4.659.774, 4.816.571, 5.141.813, 5.264.566, 4.959.463, 5.428.148, 5.554.744, 5.574.146, 5.602.244.

Un ejemplo no limitante de un ácido nucleico producido enzimáticamente incluye el producido por enzimas en reacciones de amplificación tales como PCR™ (véase por ejemplo, Patente de EE. UU. 4.683.202 y Patente de EE. UU. 4.682.195, incorporada cada una en el presente documento como referencia), o la síntesis de un oligonucleótido descrito en la Patente de EE. UU. Nº 5.645.897, incorporada en el presente documento por referencia.

La síntesis de oligonucleótidos se conoce bien por los expertos en la técnica. Se han desvelado varios mecanismos de síntesis de oligonucleótidos en por ejemplo las Patentes de EE. UU. 4.659.774, 4.816.571, 5.141.813, 5.264.566, 4.959.463, 5.428.148, 5.554.744, 5.574.146, 5.602.244.

Básicamente, la síntesis química se puede conseguir por el procedimiento diéster, el procedimiento triéster, el procedimiento de polinucleótido fosforilasa y por química en fase sólida. Estos procedimientos se tratan posteriormente.

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

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

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

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

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

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

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

### C. Diseño de miARN sintéticos

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

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

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

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

### E. Marcadores y marcas

Los miARN sintéticos se pueden marcar con un marcador o marca radioactiva, enzimática, colorimétrica, u otro marcador o marca con fines de detección o aislamiento. Los ácidos nucleicos pueden marcarse con fluorescencia en algunas realizaciones de la invención. Los marcadores fluorescentes que se contemplan para el uso como

conjugados incluyen ,pero no se limitan a estos, Alexa 350, Alexa 430, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, azul cascada, Cy3, Cy5, 6-FAM, Isotiocianato de fluoresceína, HEX, 6-JOE, Verde Oregón 488, verde Oregón 500, verde Oregón 514, Azul pacífico, REG, verde rodamina, Renografina, ROX, SYPRO, TAMRA, TET, Tetrametilrodamina, y/o Rojo Tejas.

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

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

## F. Procedimientos de suministro

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

- Las moléculas de ARN se pueden codificar por una molécula de ácido nucleico que está comprendido en un vector.
- 20 El término “vector” se utiliza para referirse a una molécula portadora de ácido nucleico en la que se puede insertar una molécula de ácido nucleico para su introducción en una célula donde pueda replicarse. Una secuencia de ácido nucleico puede ser “exógena”, que significa que es ajena a la célula en la que el vector se introduce o que la secuencia es homóloga a una secuencia de la célula pero en una posición en la que el ácido nucleico de la célula huésped no se encuentra normalmente. Los vectores incluyen plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófagos, virus
- 25 animales, y virus vegetales), y cromosomas artificiales (por ejemplo, YAC). Un experto en la técnica estaría bien equipado para construir un vector por medio de técnicas recombinantes de referencia, que se describen en Sambrook y col., 1989 y Ausubel y col., 1996. Además para codificar un polipéptido modificado tal como una gelonina modificada, un vector puede codificar secuencias de polipéptido no modificadas tales como un marcador o una molécula dirigida. Una molécula dirigida es la que dirige una molécula de ácido nucleico deseada a un órgano,
- 30 tejido, célula, u otra localización en particular del cuerpo de un sujeto.

- La expresión “vector de expresión” se refiere a un vector que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una parte de un producto génico capaz de ser transcrito. Los vectores de expresión pueden contener una variedad de “secuencias de control”, que se refiere a secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y posible traducción de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped en particular.
- 35 Además de las secuencias de control que gobiernan la transcripción y la traducción, los vectores y los vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que sirven también para otras funciones y que se han descrito.

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

- Los retrovirus son un grupo de ARN virus de cadena sencilla que se caracterizan por una capacidad para convertir su ARN en ADN de doble cadena en las células infectadas; también se pueden utilizar como vectores. Se pueden emplear otros vectores víricos como construcciones de expresión en la presente invención. Se pueden emplear vectores derivados de virus tales como los virus vacunales (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar y col., 1988), virus adenoasociados (AAV) (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Hermonat y Muzycska, 1984) y herpesvirus. Ofrecen varias características atractivas para varias células de mamífero (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar y col., 1988; Horwich y col., 1990).
- 55

Otros procedimientos adecuados para el suministro de ácidos nucleicos para efectuar la expresión de composiciones de la presente invención se cree que incluyen virtualmente cualquier procedimiento por los que un

ácido nucleico (por ejemplo, ADN, incluyendo vectores víricos y no víricos) se pueden introducir en un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo, como se describe en el presente documento o como podría conocer un experto en la técnica. Tales procedimientos incluyen, pero sin limitarse a estos, suministro directo de ADN tal como por inyección (Patentes de EE. UU. N<sup>os</sup> 5.994.624, 5.981.274, 5.945.100, 5.780.448, 5.736.524, 5.702.932, 5.656.610, 5.589.466 y 5.580.859), que incluye la microinyección (Harlan y Weintraub, 1985; Patente de EE. UU. N<sup>o</sup> 5.789.215); por electroporación (Patente de EE. UU. N<sup>o</sup> 5.384.253); por precipitación en fosfato cálcico (Graham y Van Der Eb, 1973; Chen y Okayama, 1987; Rippe y col., 1990); utilizando DEAE-dextrano y después polietilenglicol (Gopal, 1985); por carga sónica directa (Fechheimer y col., 1987); por transfección mediada por liposomas (Nicolau y Sene. 1982; Fraley y col., 1979; Nicolau y col., 1987; Wong y col., 1980; Kaneda y col., 1989; Kato y col., 1991); por bombardeo con microproyectiles (Solicitud PCT N<sup>os</sup> WO 94/09699 y 95/06128; Patentes de EE. UU. N<sup>os</sup> 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 EE. UU. N<sup>os</sup> 5.302.523 y 5.464.765); por transformación mediada por *Agrobacterium* (Patentes de EE. UU. N<sup>os</sup> 5.591.616 y 5.563.055); o por transformación mediada por PEG de protoplastos (Omirulleh y col., 1993; Patentes de EE. UU. Nos. 4.684.611 y 4.952.500); por captación de ADN mediado por inhibición/desecación (Potrykus y col., 1985). A través de la aplicación de técnicas tales como estas, se pueden transformar estable o transitoriamente orgánulos, células, tejidos u organismos.

## B. Suministro de miARN sintéticos

Se cree que los procedimientos adecuados para el suministro de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención incluyen virtualmente cualquiera de los procedimientos por los que un ácido nucleico (por ejemplo, ADN, ARN, incluyendo vectores víricos y no víricos) se puede introducir en un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo, como se describe en el presente documento o como sería conocido por un experto en la técnica. Tales procedimientos incluyen, aunque no se limita a estos, el suministro directo de ácidos nucleicos tales como por inyección (Patente de EE. UU. Nos 5.994.624, 5.981.274, 5.945.100, 5.780.448, 5.736.524, 5.702.932, 5.656.610, 5.589.466 y 5.580.859), que incluye la microinyección (Harlan y Weintraub, 1985; Patente de EE. UU. N<sup>o</sup> 5.789.215); por electroporación (Patente de EE. UU. N<sup>o</sup> 5.384.253); por precipitación en fosfato cálcico (Graham y Van Der Eb, 1973; Chen y Okayama, 1987; Rippe y col., 1990); utilizando DEAE-dextrano y después polietilenglicol (Gopal, 1985); por carga sónica directa (Fechheimer y col., 1987); por transfección mediada por liposomas (Nicolau y Sene. 1982; Fraley y col., 1979; Nicolau y col., 1987; Wong y col., 1980; Kaneda y col., 1989; Kato y col., 1991); por bombardeo con microproyectiles (Solicitud PCT N<sup>os</sup> WO 94/09699 y 95/06128; Patentes de EE. UU. N<sup>os</sup> 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 EE. UU. N<sup>os</sup> 5.302.523 y 5.464.765); por transformación mediada por *Agrobacterium* (Patentes de EE. UU. N<sup>os</sup> 5.591.616 y 5.563.055); o por transformación mediada por PEG de protoplastos (Omirulleh y col., 1993; Patentes de EE. UU. N<sup>os</sup> 4.684.611 y 4.952.500); por captación de ADN mediado por inhibición/desecación (Potrykus y col., 1985). A través de la aplicación de técnicas tales como estas, se pueden transformar estable o transitoriamente orgánulos, células, tejidos u organismos.

Se han fijado a los extremos de los oligonucleótidos una variedad de compuestos para facilitar su transporte a través de las membranas celulares. Se ha descubierto que los péptidos cortos de señal encontrados en el VIH, TAT, HSV VP22, *Drosophila antennapedia*, y otras proteínas son capaces de la rápida transferencia de biomoléculas a través de membranas (revisado por Schwarze 2000). Estos péptidos de señal, a los que se designan como Dominios de Transducción Proteica (DTP), se han fijado a los oligonucleótidos para facilitar su suministro en células cultivadas. Los colesterol se han conjugado a oligonucleótidos para mejorar su captación por las células animales (MacKellar 1992). Los grupos de colesterol en los extremos aparentemente interactúan con los receptores o lípidos de las superficies de las células y facilitan la internalización de oligonucleótidos modificados. Asimismo, la poli-1-lisina se ha conjugado con oligonucleótidos para disminuir la carga negativa neta y mejorar la captación por las células (Leonetti 1990).

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

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

Los ARN son moléculas hidrófilas gracias a su estructura de fosfato aniónico y azúcar. Aunque las bases nitrogenadas son hidrofóbicas, domina la hidrofilia debido a la unión extensa de hidrógeno que resulta de los restos de fosfato y azúcar. El carácter hidrófilo y la estructura aniónica reduce la penetración celular. La conjugación con grupos lipófilos como el colesterol (Manoharan, 2002) y los derivados del ácido láurico y litocólico con funcionalidad C32 ha demostrado que (Lorenz y col., 2004), mejoran la captación celular. Además la unión de oligonucleótidos

conjugados con esteroides a diferentes lipoproteínas en la corriente sanguínea, tales como el LDL, protegen su integridad y gobiernan su biodistribución (Rump y col., 2000). También se ha demostrado que el colesterol unido a moléculas antisentido (Bijsterbosch y col., 2001) y aptámeros (Rusconi y col., 2004) estabilizan oligonucleótidos permitiendo la unión con lipoproteínas. Se ha demostrado que el colesterol aumenta la captación y la estabilidad en el suero de los ARNs *in vitro* (Lorenz y col., 2004) e *in vivo* (Soutschek y col., 2004). Adicionalmente, varias moléculas pequeñas como SB-435495 (Blackie y col., (2002), Isradipina (Oravcova y col., 1994), amlodipina (Oravcova y col., 1994) y 2,2', 4,4', 5,5'-hexaclorobifenilo (Borlakoglu y col., 1990) podrían aumentar la captación celular, y mejorar la resistencia a las nucleasas favoreciendo la asociación con lipoproteínas.

## 1. Nucleótidos para marcado

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

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

## 2. Técnicas de marcado

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

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

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

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

Las enzimas capaces de añadir tales nucleótidos incluyen, pero sin limitarse a estas, polimerasa poli (A), transferasa terminal, y polinucleótido fosforilasa. En realizaciones específicas de la invención, se contempla que la ligasa NO

sea la enzima utilizada para añadir un marcador, y en vez de ello, se utiliza una enzima no ligasa.

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

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

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

### 3. Marcadores

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

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

- 20 Ejemplos específicos de colorantes incluyen, pero sin limitarse a estos, los que se han identificado anteriormente y los siguientes: Alexa Flúor 350, Alexa Flúor 405, Alexa Flúor 430, Alexa Flúor 488, Alexa Flúor 500. Alexa Flúor 514, Alexa Flúor 532, Alexa Flúor 546, Alexa Flúor 555, Alexa Flúor 568, Alexa Flúor 594, Alexa Flúor 610, Alexa Flúor 633, Alexa Flúor 647, Alexa Flúor 660, Alexa Flúor 680, Alexa Flúor 700, y, Alexa Flúor 750; colorantes amino-reactivos BODIPY, tales como BODIPY 493/503, BODIPY 530/550, BODIPY 558/568, BODIPY 564/570, BODIPY 576/589, BODIPY 581/591, BODIPY 630/650, BODIPY 650/655, BODIPY FL, BODIPY R6G, BODIPY TMR, y, BODIPY-TR; Cy3, Cy5, 6-FAM, Isotiocianato de Fluoresceína, HEX, 6-JOE, Verde Oregón 488, Verde Oregón 500, Verde Oregón 514, Azul pacífico, REG, Verde Rodamina, Rojo Rodamina, Renografina, ROX, SYPRO, TAMRA, 2',4',5',7'-Tetrabromosulfona Fluoresceína, y TET.

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

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

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

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

### 4. Técnicas de visualización

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

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

### III. Aplicaciones terapéuticas

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

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

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

#### A. Modos de administración y formulaciones

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

Para la administración tópica, las proteínas de la invención se pueden formular como soluciones, geles, ungüentos, cremas, suspensiones, etc. como se conocen bien en la técnica. Las formulaciones sistémicas incluyen las designadas para la administración por inyección, por ejemplo, inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratecal o intraperitoneal, así como aquellas designadas para la administración vía transdérmica, transmucosa, inhalatoria, oral o pulmonar. Para inyección, los ácidos nucleicos de la invención se pueden formular en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como la solución de Hank, solución de Ringer, o tampón salino fisiológico. La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. De manera alternativa, las moléculas de ácido nucleico pueden estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso. Para la administración transmucosa, en la formulación se utilizan penetrantes de barrera apropiados para que se absorban. Tales penetrantes generalmente se conocen en la técnica. Para la administración oral, los ácidos nucleicos se pueden formular fácilmente combinando las moléculas con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales vehículos capacitan a los ácidos nucleicos de la invención para formularse como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares. Para las formulaciones sólidas vía oral tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas y comprimidos, los excipientes adecuados incluyen cargas tales como azúcares, por ejemplo, lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; preparaciones de celulosa tales como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetil celulosa sódica, y/o polivinilpirrolidona (PVP); agentes granulantes; y agentes aglutinantes. Si se desea se pueden añadir agentes desintegrantes, tales como polivinilpirrolidona reticular, agar, o ácido alginico o una sal del mismo tal como alginato sódico. Si se desea, las formas de dosificación sólida pueden estar revestidas con azúcar o revestimiento entérico utilizando técnicas de referencia. Para las preparaciones líquidas por vía oral tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones, se pueden añadir, vehículos adecuados, excipientes o diluyentes incluyendo el agua, glicoles, aceites, alcoholes, etc. Adicionalmente se pueden añadir, agentes saborizantes, conservantes, agentes colorantes y similares. Para la administración bucal, las moléculas pueden tomar la forma de comprimidos, comprimidos para chupar, etc.

formulados de una manera convencional. Para la administración por inhalación, las moléculas para su uso de acuerdo con la presente invención se suministran convenientemente en forma de un pulverizador en aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorofluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluorometano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de gelatina para su uso en un inhalador o insuflador se pueden formular de forma que contenga una mezcla en polvo de ácidos nucleicos y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón. Las moléculas de ARN también se pueden formular en composiciones rectales o vaginales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contengan las bases para supositorios tales como la manteca de coco u otros glicéridos.

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

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

Un ácido nucleico de la invención se puede administrar en combinación con un vehículo o lípido para aumentar la captación celular. Por ejemplo, el oligonucleótido se puede administrar en combinación con un lípido catiónico. Ejemplos de lípidos catiónicos incluyen, pero sin limitarse a estos, lipofectina, DOTMA, DOPE, y DOTAP. La publicación WO0071096, por ejemplo, describe diferentes formulaciones, tales como DOTAP: formulación de colesterol o derivada de colesterol que se puede utilizar eficazmente para terapia genética. Otras divulgaciones también tratan diferentes formulaciones lipídicas o liposómicas incluyendo nanopartículas y procedimientos de administración; estas incluyen, pero no se limitan a, Publicaciones de Patentes de EE. UU. 20030203865, 20020150626, 20030032615, y 20040048787. Los procedimientos para formar partículas se desvelan también en las Pat. de EE. UU. N<sup>os</sup> 5.844.107, 5.877.302, 6.008.336, 6.077.835, 5.972.901, 6.200.801, y 5.972.900.

Los ácidos nucleicos se pueden administrar también en combinación con aminos catiónicos tales como la poli (L-lisina). Los ácidos nucleicos se pueden también conjugar con resto químico, tal como transferrina y colesterilos. Además, los oligonucleótidos se pueden dirigir a ciertos orgánulos por unión específica de grupos químicos específicos al oligonucleótido. Por ejemplo, uniendo el oligonucleótido a una matriz adecuada de restos de manosa dirigirá el oligonucleótido al hígado.

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

Los ácidos nucleicos se pueden incluir en cualquiera de las formulaciones descritas anteriormente como ácidos libres o bases o como sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables son las sales que mantienen sustancialmente la actividad biológica de las bases libres y que se preparan por reacción con ácidos inorgánicos. Las sales farmacéuticas tienden a ser más solubles en disolventes acuosos y otros disolventes próticos que las correspondientes formas de bases libres.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad eficaz de una o más moléculas de miARN sintéticos o inhibidores de miARN disueltos o dispersos en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las frases "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica o inadecuada cuando se administra a un animal, por ejemplo, un ser humano, como es apropiado. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos un polipéptido quimérico o un principio activo adicional será conocida por un experto en la técnica a la luz de la presente divulgación, como se ejemplifica en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>a</sup> Ed. Mack Printing Company, 1990. Además, para la administración a animales (por ejemplo, seres humanos), se entenderá que las preparaciones pueden que necesiten cumplir con las referencias de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza que requiere la oficina de Referencias Biológicas de la FDA.

Como se utiliza en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes de retraso de absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizadores de fármacos, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, colorantes, tales como materiales y combinaciones de las mismas,

como sería conocido por un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329). Excepto si no es cualquiera de los vehículos compatibles con el principio activo, su uso se contempla en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

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

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

En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente el 0,1% de un principio activo. En otras realizaciones, el principio activo puede estar comprendido entre aproximadamente un 2% a aproximadamente un 75% del peso de la unidad, o entre aproximadamente un 25% a aproximadamente un 60%, por ejemplo, y cualquier intervalo derivable del mismo. En otros ejemplos no limitantes, una dosis puede también comprender desde aproximadamente un microgramo/kg/peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 10 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 50 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 100 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 200 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 350 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 500 microgramos/kg de peso corporal, aproximadamente 1 miligramo/kg de peso corporal, aproximadamente 5 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 10 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 50 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 100 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 200 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 350 miligramos/kg de peso corporal, aproximadamente 500 miligramos/kg de peso corporal, a aproximadamente 10000 mg/kg de peso corporal o más por administración, y cualquier intervalo derivable del mismo. En ejemplo no limitantes de un intervalo derivable de los números listados aquí, se puede administrar un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg de peso corporal a aproximadamente 500 miligramos/kg de peso corporal, etc., basándose en los números descritos anteriormente.

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

Las moléculas se pueden formular en una composición en forma de bases libres, neutras o sales. Las sales farmacéuticamente aceptables, incluyen las sales por adición de ácidos, por ejemplo, las que se forman con los grupos amino libres de una composición proteinácea, o las que se forman con ácidos inorgánicos tales como por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como el acético, oxálico, tartárico o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar a partir de bases inorgánicas tales como por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férricos; o bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaína.

En realizaciones en las que la composición está en forma líquida, un vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión que comprende pero no se limita a agua, etanol, poliol, (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, etc.), lípidos (por ejemplo, triglicéridos, aceites vegetales, liposomas) y combinaciones de los mismos. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, por el uso de un revestimiento, tal como lecitina; por el mantenimiento del tamaño de partícula que se necesita por dispersión en vehículos tales como, por ejemplo poliol líquido o lípidos; por el uso de tensioactivos tales como, por ejemplo hidroxipropilcelulosa; o combinaciones de tales procedimientos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, tales como por ejemplo, azúcares, cloruro sódico o combinaciones de los mismos.

En otras realizaciones, se pueden utilizar gotas oftálmicas, soluciones nasales o pulverizadores, aerosoles o inhalantes en la presente invención. Tales composiciones se diseñan generalmente para ser compatibles con el tipo de tejido diana. En un ejemplo no limitante, las soluciones nasales habitualmente son soluciones acuosas diseñadas para administrarse en los conductos nasales en gotas o pulverizadores. Las soluciones nasales se preparan de forma que son similares en muchos aspectos a las secreciones nasales, de forma que se mantenga la acción ciliar normal. Por lo tanto, en realizaciones preferidas las soluciones nasales acuosas son habitualmente isotónicas o

ligeramente tamponadas para mantener un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5. Además, se pueden incluir en la formulación conservantes antimicrobianos, similares a los que se utilizan en preparaciones oftálmicas, fármacos, o estabilizantes de fármacos apropiados, si es necesario. Por ejemplo, se conocen varias preparaciones nasales comerciales e incluyen fármacos tales como antibióticos o antihistamínicos.

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

En ciertas realizaciones preferidas una composición oral puede comprender uno o más aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes saborizantes y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, una composición puede comprender uno o más de los siguientes: un aglutinante, tal como, por ejemplo, goma de tragacanto, goma arábica, almidón de maíz, gelatina, o combinaciones de los mismos, un excipiente, tal como, por ejemplo, fosfato dicálcico, manitol, lactosa, almidón, estearato magnésico, sacarina sódica, celulosa, carbonato magnésico o combinaciones de los mismos; un agente disgregante, tal como, por ejemplo,  
20 almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico o combinaciones de los mismos; un lubricante, tal como, por ejemplo, estearato magnésico; un agente edulcorante, tal como, por ejemplo, sacarosa, lactosa, sacarina o combinaciones de las mismas; un agente saborizante, tal como, por ejemplo menta, aceite de gaulteria, saborizante de cereza, saborizante de naranja, etc.; o combinaciones de los anteriores. Cuando la forma de dosificación unitaria es una cápsula, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, vehículos tales como un vehículo líquido. Otros varios materiales pueden estar presentes como revestimientos o de otra manera que modifiquen la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras, o cápsulas se pueden cubrir con goma laca, azúcar o ambas.

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

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

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

## **B. Dosificaciones eficaces**

Las moléculas de la invención se utilizarán generalmente en una cantidad eficaz para alcanzar el fin que se pretende. Para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer, las moléculas de la invención, o las composiciones farmacéuticas de las mismas, se administran o aplican en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad eficaz para mejorar o prevenir los síntomas, o prolongar la supervivencia de los pacientes que se tratan. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento.

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

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

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

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

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

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

### C. Toxicidad

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

- 15 La toxicidad de las moléculas descritas en el presente documento se puede determinar por procedimientos farmacéuticos de referencia en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo determinando la  $DL_{50}$  (la dosis letal para el 50% de la población) o la  $DL_{100}$  (la dosis letal para el 100% de la población). La dosis de la relación entre los efectos tóxico y terapéutico es el índice terapéutico. Se prefieren las proteínas que muestran altos índices terapéuticos. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivo celular y estudios con animales se pueden utilizar en la formulación de un intervalo de dosificación que no sea tóxico para su uso en seres humanos. La dosificación de las proteínas descrita en el presente documento se basa preferentemente en un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen dosis eficaces con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar en este intervalo de concentraciones circulantes dependiendo de la forma de dosificación empleada y la vía de administración utilizada. La formulación, vía de administración y dosificación exactas la puede elegir el médico individual en vista de la afección del paciente, (Véase, por ejemplo, Fingl y col., 1975, En: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Cap.1, p.1).

### D. Grupos laterales

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

### 35 Ejemplos

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

#### Ejemplo 1:

#### Ensayo para medir la actividad de miARN precursores (indicadores)

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

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

## Ejemplo 2

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

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

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

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

## Ejemplo 3

### Efectividad de miARN parcialmente complementarios

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

### miR-1-2

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

diseño miARN = CAUACUUCUUUAUAUGCCCAUA (SEC ID N° 594) + UGGA AUGUAAAGAAGUAUGUA (SEC ID N° 595)

diseño sin coincidencia = CAUACUUCUUUACAUUCUGTT (SEC ID N° 596) + UGGA AUGUAAAGAAGUAUGUA (SEC ID N° 597)

diseño ARNsi = CAUACUUCUUUACAUUCCATT (SEC ID N° 598) + UGGA AUGUAAAGAAGUAUGUA (SEC ID N° 599)

**mir-124a-1**

*secuencia miR-124 maduro* - UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA (52-73 of SEC ID N° 80)

diseño miARN = GUGUUCACAGCGGACCUUGAUU (SEC ID N° 600) + UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA (SEC ID N° 601)

5 diseño sin coincidencia = GCAUUCACCGCGUGCCUUGGTT (SEC ID N° 602) + UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA (SEC ID N° 603)

diseño ARNsi = GCAUUCACCGCGUGCCUUAATT (SEC ID N° 604) + UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA (SEC ID N° 605)

**miR-130a**

10 *secuencia miR-130 maduro* - CAGUGCAAUGUAAAAAGGGC (55-74 of SEC ID N° 91)

diseño miARN = UCUUUUCACAUUGUGCUAC (SEC ID N° 606) + CAGUGCAAUGUAAAAAGGGC (SEC ID N° 607)

diseño sin coincidencia = UAUUUUAACAUUGCACUGTT (SEC ID N° 608) + CAGUGCAAUGUAAAAAGGGC (SEC ID N° 609)

15 diseño ARNsi = CCUUUUAAACAUUGCACUGTT (SEC ID N° 610) + CAGUGCAAUGUAAAAAGGGC (SEC ID N° 611)

**miR-19a**

*secuencia miR-19a maduro* - UGUGCAAUUCUAUGCAAAACUGA (49-71 of SEC ID N° 28)

20 diseño miARN = AGUUUUGCAUAGUUGCACUA (SEC ID N° 612) + UGUGCAAUUCUAUGCAAAACUGA (SEC ID N° 613)

diseño sin coincidencia = ACAUUUGCAUAGAUUUGCACATT (SEC ID N° 614) + UGUGCAAUUCUAUGCAAAACUGA (SEC ID N° 615)

diseño ARNsi = AGUUUUGCAUAGAUUUGCACATT (SEC ID N° 616) + UGUGCAAUUCUAUGCAAAACUGA (SEC ID N° 617)

**mmu-miR-10a-1 (ratón)**

*secuencia miR-10 maduro* - UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUG (22-44 of SEC ID N° 212)

diseño miARN = CAAAUUCGUAUCUAGGGGAAUA (SEC ID N° 618) + UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUG (SEC ID N° 619)

30 diseño sin coincidencia = AGAAUUCGGAUCUACAGGGUATT (SEC ID N° 620) + UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUG (SEC ID N° 621)

diseño ARNsi = CAAAUUCGGAUCUACAGGGUATT (SEC ID N° 622) + UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUG (SEC ID N° 623)

**miR-33**

*secuencia miR-33 maduro* - GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (6-24 of SEC ID N° 57)

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

diseño sin coincidencia = GUCCAACUACAAUGCACTT (SEC ID N° 626) + GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (SEC ID N° 627)

diseño ARNsi = AUGCAACUACAAUGCACTT (SEC ID N° 628) + GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (SEC ID N° 629)

**let-7b**

*secuencia let-7b maduro* - UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (6-27 of SEC ID N° 6)

diseño miARN = CUAUACAACCUACUGCCUUC (SEC ID N° 630) + UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (SEC ID N° 631)

45 diseño sin coincidencia = CCACACAACCUACUACUUAATT (SEC ID N° 632) + UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (SEC ID N° 633)

diseño ARNsi = CCACACAACCUACUACCUCATT (SEC ID N° 634) + UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (SEC ID N° 635)

**miR-196-2**

*secuencia miR-196 maduro* - UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGG (7-27 of SEC ID N° 143)

50 diseño ARNsi = AACACAUGAAACUACCUATT (SEC ID N° 636) + UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGG (SEC ID N° 637)

diseño miARN = CAAAUUCGUAUCUAGGGGAAUA (SEC ID N° 638) + UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGG (SEC ID N° 639)

55 diseño sin coincidencia = AAUAACAUGAAACUACCUATT (SEC ID N° 640) + UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGG (SEC ID N° 641)

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

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

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

#### Ejemplo 4

##### Eficacia de miARN sintéticos modificados químicamente en el extremo 5'

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

##### miR-33

- 30 *secuencia miR-33 maduro* - GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (6-24 de SEC ID N° 57)  
 diseño ARNSi = AUGCAACUACAAUGCACTT (SEC ID N° 642) + GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (SEC ID N° 643)  
 diseño 5' amino = (NH<sub>2</sub>) AUGCAACUACAAUGCACTT (SEC ID N° 644) + GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (SEC ID N° 645)  
 35 diseño 5' acetilo = (CH<sub>3</sub>OCNH) AUGCAACUACAAUGCACTT (SEC ID N° 646) + GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (SEC ID N° 647)  
 diseño 5' DNA = dAdUdGdCAACUACAAUGCACTT (SEC ID N° 648) + GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (SEC ID N° 649)  
 diseño 5' amino DNA = (NH<sub>2</sub>) dAdUdGdCAACUACAAUGCACTT (SEC ID N° 650) + GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (SEC ID N° 651)

##### let-7b

- secuencia let-7b maduro* - UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (6-27 de SEC ID N° 6)  
 diseño ARNSi = CCACACAACCUACUACCUCATT (SEC ID N° 652) + UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (SEC ID N° 653)  
 45 diseño 5' amino = NH<sub>2</sub> CCACACAACCUACUACCUCATT (SEC ID N° 654) + UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (SEC ID N° 655)  
 diseño 5' DNA = dCdCdAdCACAACCUACUACCUCATT (SEC ID N° 656) + UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (SEC ID N° 657)  
 diseño 5' amino DNA = NH<sub>2</sub> dCdCdAdCACAACCUACUACCUCATT (SEC ID N° 658) + UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (SEC ID N° 659)

##### miR-1-2

- secuencia miR-1-2 maduro* - UGGA AUGUAAAGAAGUAUGUA (53-73 of SEC ID N° 1)  
 diseño ARNSi = CAUACUUCUUUACAUUCCATT (SEC ID N° 660) + UGGA AUGUAAAGAAGUAUGUA (SEC ID N° 661)  
 55 diseño 5' amino = NH<sub>2</sub> CAUACUUCUUUACAUUCCATT (SEC ID N° 662) + UGGA AUGUAAAGAAGUAUGUA (SEC ID N° 663)

#### **miR-124a-1**

*secuencia miR-124 maduro* - UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA (52-73 of SEC ID N° 80)

diseño ARNsi = GCAUUCACCGCGUGCCUUAATT (SEC ID N° 664) + UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA (SEC ID N° 665)

diseño 5' amino = NH<sub>2</sub> GCAUUCACCGCGUGCCUUAATT (SEC ID N° 666) + UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA (SEC ID N° 667)

#### **miR-130a**

*secuencia miR-130 maduro* - CAGUGCAAUGUAAAAGGGC (55-74 of SEC ID N° 91)

diseño ARNsi = CCUUUUAACAUUGCACUGTT (SEC ID N° 668) + CAGUGCAAUGUAAAAGGGC (SEC ID N° 669)

diseño 5' amino = NH<sub>2</sub> CCUUUUAACAUUGCACUGTT (SEC ID N° 670) + CAGUGCAAUGUAAAAGGGC (SEC ID N° 671)

#### **miR-10a-1**

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

diseño ARNsi = CAAAUUCGGAUCUACAGGGUATT (SEC ID N° 672) + UACCCUGUAGAUCGGAUUUGUG (SEC ID N° 673)

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

Los miARN sintéticos miR-33 y let-7b se co-transfectaron en células HeLa y HepG2, respectivamente, con vectores indicadores que tenían sitios diana para las cadenas activa y complementaria de miR-33 y let-7b como se describe en el Ejemplo 1. La expresión de luciferasa de los vectores indicadores específicos de cadena complementaria y activa se midieron según el protocolo del fabricante (Promega). Como se muestra en la FIG.3, los diseños miARN sintéticos con el 5' NH<sub>2</sub> y 5' NHCOCH<sub>3</sub> proporcionaban una actividad mayor de la cadena activa y reducía significativamente la actividad de la cadena complementaria con respecto a los miARN sintéticos sin modificar. Esto es ideal para los miARN sintéticos puesto que los efectos que se ven después de la transfección serán específicos de la actividad de la cadena activa del miARN sintético. Además, la alta eficacia de los diseños modificados en 5' permitirá que se utilicen menores concentraciones en las transfecciones y se reduce la toxicidad que se observa a menudo cuando se transfectan las células con cantidades mayores de ácido nucleico.

Para confirmar que la modificación 5' amino es superior a los diseños ARNsi de referencia en un amplio grupo de miARN, se midió la eficacia de ambos diseños de miARN sintético en células co-transfectadas con vectores indicadores con sitios diana de miARN. Como se aprecia en la FIG. 4, el 5' NH<sub>2</sub> es superior de manera reproducible al diseño sin modificar de ARNsi.

#### **Ejemplo 5**

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

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

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

#### **Ejemplo 6**

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

Una característica distintiva del cáncer es la proliferación celular incontrolada. Los investigadores utilizan habitualmente ensayos de proliferación para estudiar la influencia de los genes en la oncogénesis. Se utilizó un

ensayo de proliferación en conjunción con la biblioteca de miARN inhibidor para identificar los miARN que tenían influencia en la proliferación celular.

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

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

**Tabla 4. miARN que afectan la proliferación celular**

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

#### Ejemplo 7

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

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

Se utilizó una biblioteca de dieciocho miARN sintéticos para transfectar por triplicado células A549 (8.000 células por pocillo de una placa de 96 pocillos) utilizando siPORT™ NeoF<sub>x</sub>™ (Ambion). El medio se cambió tras 24 h y se inspeccionaron visualmente las células bajo un microscopio para inspeccionar cualitativamente la muerte celular 72 h tras la transfección. Las células se midieron para valorar la apoptosis calculando actividad de la caspasa 3 de la siguiente manera: 1) Se lavaron las células una vez con PBS y se congelaron a -80 °C. 2) Se lisaron las células añadiendo 40 µl de tampón de lisado frío (HEPES 50 mM pH 7,2, NaCl 40 mM, NP40 0,5%, EDTA 0,5 mM) en los pocillos y se incubó durante 20 min a 4 °C. 3) Se añadió 160 µl de tampón ICE (HEPES 50 mM pH 7,4, CHAPS al 0,1%, EDTA 0,1 mM, un 10% de sacarosa) + DTT 5 mM que contiene sustrato DEVDafc 20 µM. 4) Se midió el aumento de fluorescencia en una hora a 400 ex, 505 em.

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

#### Ejemplo 8

##### Selección de miARN que tienen influencia en la viabilidad celular

Los inhibidores de miARN también se utilizaron para identificar los miARN que tenían influencia en la viabilidad celular. Una biblioteca de unos 90 inhibidores de miARN se utilizó para transfectar por triplicado células A549 (8.000 células/pocillo de placas de 96 pocillos) utilizando siPORT™ NeoF<sub>x</sub>™ (Ambion). El medio se cambió tras 24 h y las células se inspeccionaron visualmente bajo un microscopio para inspeccionar cualitativamente la muerte celular 72 horas después de la transfección. Las células se tripsinizaron y se tiñeron con el Reactivo ViaCount Flex, que distingue entre células viables y no viables basándose en la permeabilidad de ADN que se une a los colorantes del reactivo. Las células se analizaron utilizando PCA-96 Guava (Análisis Celular Personal).

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

**Tabla 5. miARN que afectan la viabilidad celular**

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

## **Ejemplo 9**

### **Selección de miARN que tienen influencia sobre la apoptosis**

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

Utilizando una biblioteca de unos 90 inhibidores de miARN, los inventores seleccionaron los miARN que afectaban a la apoptosis. Se transfectaron por triplicado células HeLa (8.000 células/pocillo de placas de 96 pocillos) con inhibidores de miARN (5 pmoles) utilizando siPORT™ NeoF<sub>x</sub>™. El medio se cambió 24 h después de la transfección y las células se procesaron 72 horas después de la transfección. Se calculó la apoptosis de las células midiendo la actividad de la caspasa 3 de la siguiente manera: 1) Se lavaron las células una vez con PBS y se congelaron a -80 °C. 2) Se lisaron las células añadiendo 40 µl de tampón de lisado frío (HEPES 50 mM pH 7,2, NaCl 40 mM, NP40 0,5%, EDTA 0,5 mM) en los pocillos y se incubó durante 20 min a 4 °C. 3) Se añadió 160 µl de tampón ICE (HEPES 50 mM pH 7,4, CHAPS al 0,1%, EDTA 0,1 mM, un 10% de sacarosa) + DTT 5 mM que contiene sustrato DEVDafc 20 µM. 4) Se midió el aumento de fluorescencia en una hora a 400 ex, 505 em.

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

fluorescencia durante 30 min a 37 °C (ex = 488, em = 529). La pendiente de fluorescencia aumenta en el tiempo en función del número de células en la placa.

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

5

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

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

#### **Ejemplo 10**

##### **Análisis de expresión utilizando ARN sintéticos**

Además del uso de los ensayos fenotípicos para identificar los miARN que tienen influencia sobre los procesos celulares importantes o rutas celulares, se pueden utilizar colecciones de miARN sintéticos y/o inhibidores de miARN para identificar los miARN que regulan directamente la expresión de un gen. Se creó un plásmido que tenía un gen de luciferasa inmediatamente corriente arriba del UTR 3' del gen G6PD. Se co-transfectaron células A549 con el vector reportador y 18 miARN sintéticos diferentes. Veinticuatro horas después de la transfección se midió la actividad luciferasa. En las diversas poblaciones de luciferasa resultó interesante que miR-1-2 redujo de forma significativa la expresión del gen de luciferasa, indicando que esta familia de miARN regula la expresión del gen G6PD. Se utilizaron experimentos similares para identificar los miARN que regulan la expresión de genes importantes tales como p53, BRCA1 y BRCA2, RAS, MYC, BCL-2, y otros.

#### **Ejemplo 11**

##### **Expresión diferencial de miARN oncogénicos y regulación en el cáncer**

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

##### **Expresión de miARN en cáncer de pulmón**

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

##### **Expresión de miARN en cáncer de colon**

Se analizaron veinticinco muestras de tumores y TNA de pacientes de cáncer de colon utilizando el proceso de matrices de miARN de la invención. Como en las comparaciones en el cáncer de pulmón, se agruparon distintos miARN basándose en su expresión relativa en los tumores en los diferentes pacientes de cáncer de colon (FIG. 14).

Se expresaban cinco miARN (miR-143, 145, 195, 130a, y miR-331) a niveles significativamente más bajos en los tumores de más del 70% de los pacientes. Se expresaban cinco miARN (miR-223, 21, 31, 17, y 106) a niveles significativamente más altos en los tumores de más del 70% de los pacientes.

#### *miARN como marcadores de cáncer*

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

#### 10 *miARN como reguladores de la expresión de oncogenes*

Para abordar si miARN específicos pueden ser partícipes en el cáncer por medio de la mala regulación de los oncogenes, se exploraron regiones 3' sin traducir (UTR) de 150 oncogenes bien conocidos para hallar secuencias con una homología significativa con los miARN identificados en el análisis de micromatrices de la invención. Se seleccionaron los sitios diana potenciales basándose en dos criterios:

- 15 (1) Complementariedad perfecta entre las posiciones 2-9 del miARN y el oncogén. Esta secuencia central de miARN se ha identificado como crítica para las actividades de los miARN y los sitios diana de miARN tienen esencialmente un 100% de complementariedad en este sitio (Doench y col., 2004).  
 (2) Interacción total de Tm del miARN/ARNm. Además de la secuencia central, la estabilidad total de unión entre los miARN y los ARNm ha demostrado ser un indicador importante de la actividad del miARN (Doench y col.,  
 20 2004).

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

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

| <b>miARN</b> | <b>Diana genética prevista</b>                                                 |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------|
| let-7        | RAS                                                                            |
| let-7        | C-MYC                                                                          |
| miR-21       | Homólogo 2 mutS (MSH2)                                                         |
| miR-21       | Homólogo del oncogén vírico v-ski sarcoma (aviar) (SKI)                        |
| miR-143      | Región de punto de rotura del grupo (BCR)                                      |
| miR-143      | Secuencia transformante derivada de la línea celular MCF.2 (MCF2)              |
| miR-143      | Supresor tumoral de von Hippel-Lindau (VHL)                                    |
| miR-143      | homólogo del oncogén vírico del sarcoma 2 de la rata Kirsten v-Ki-ras2 (KRAS2) |
| miR-143      | homólogo del oncogén vírico del sarcoma 2 de la rata Kirsten v-Ki-ras2 (KRAS2) |
| miR-143      | Secuencia transformante retrovímica ecotrópica (murina) Cas-Br-M (CBL)         |
| miR-143      | Secuencia transformante retrovímica ecotrópica (murina) Cas-Br-M (CBL)         |
| miR-145      | Oncogén vírico relacionado con la mielocitomatosis v-myc (MYCN)                |
| miR-145      | Receptor 2 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR2)                   |
| miR-145      | Secuencia transformante retrovímica ecotrópica Cas-Br-M (murina) (CBL)         |
| miR-188      | Homólogo 1 del oncogén vírico de la mielocitomatosis (MYCL1)                   |
| miR-200b     | Cadherina 13 (CDH13)                                                           |
| miR-200b     | Homólogo del oncogén vírico Hardy-Zuckerman 4 del sarcoma felino v-kit (KIT)   |
| miR-219      | Homólogo 1 del oncogén vírico de la mielocitomatosis (MYCL1)                   |
| miR-219      | CLL de linfocitos B /linfoma 2 (BCL2)                                          |
| miR-219      | Cadherina 1, tipo 1, E-cadherina (epitelial) (CDH1)                            |
| miR-331      | Oncogén vav 1 (VAV1)                                                           |
| miR-331      | Receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR1)                   |
| miR-331      | Antagonista BCL2/citolítico 1 (BAK1)                                           |

miR-331 Receptor del ácido retinoico, alfa (RARA)

miR-331 Homólogo del oncogén vírico del sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) v-src (SRC)

## Ejemplo 12

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

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

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

## Ejemplo 13

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

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

Las células HeLa (cáncer ovárico humano) y A549 (cáncer de pulmón humano) se transfectaron por triplicado con 150 miARN sintéticos utilizando siPORT *NeoFx* (Ambion) según las instrucciones del fabricante. Los 150 son los siguientes: let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7g, miR-1, miR-7, miR-9, miR-10a, miR-10b, miR-15a, miR-16, miR-18, miR-19a, miR-17-3p, miR-20, miR-21, miR-22, miR-23a, miR-23b, miR-24, miR-25, miR-26a, miR-27a, miR-28, miR-29a, miR-31, miR-32, miR-30a-3p, miR-34a, miR-92, miR-95, miR-96, miR-98, miR-99a, miR-100, miR-101, miR-103, miR-105, miR-107, miR-108, miR-122, miR-124, miR-125a, miR-125b, miR-126, miR-128, miR-129, miR-132, miR-133A, miR-133B, miR-134, miR-135, miR-136, miR-137, miR-139, miR-140, miR-141, miR-142, miR-143, miR-144, miR-145, miR-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-92-3p, mu-miR-293, mu-miR-294, mu-miR-295, mu-miR-297, mu-miR-298, mu-miR-329, mu-miR-341, mu-miR-344, mu-miR-351, mu-miR-376b, mu-miR-380-3p, mu-miR-409, mu-miR-411, mu-miR-412.

Los miARN sintéticos eran moléculas de ácido nucleico de cadena doble, compuestos por una cadena activa y una cadena complementaria. La cadena activa contenía una secuencia que era idéntica al correspondiente miARN maduro. La cadena complementaria contenía una secuencia que era un 100% complementaria con la región relevante de la secuencia de miARN maduro, pero 1) carecía de dos nucleótidos en su extremo 3' que fueran complementarios con la secuencia de miARN maduro (en el extremo 5' de la cadena activa) y 2) tenía un dinucleótido protuberante en su extremo 5' con respecto a la cadena activa. En otras palabras, las dos cadenas eran

completamente complementarias entre sus secuencias excepto en que cada cadena tenía un dinucleótido 5' protuberante con respecto a la otra cadena. Se utilizó el mismo tipo de miARN para los siguientes Ejemplo(s) también. Se describen posteriormente algunas excepciones. Los miARN indicados en las tablas identifican el miARN que se corresponde con la secuencia sintética proporcionada.

- 5 Se electroporaron linfocitos Jurkat (células de leucemia humana) y linfocitos T primarios humanos por triplicado con el mismo grupo de miARN sintéticos utilizando siPorter-96 (Ambion) según las instrucciones del fabricante. Se analizaron todas las células para hallar las células viables y no viables 72 horas después de la transfección utilizando PCA-96 (Guava) con el Ensayo Viacount. El número de células viables es el número de células vivas en un pocillo en el momento del ensayo. Los números proporcionados en las tablas posteriores son iguales al número medio de células viables en los pocillos transfectados con un miARN en particular dividido por el número de células viables en los pocillos transfectados con miARN sintéticos negativos de control multiplicado por 100 para dar lugar al % de Viabilidad Celular de las células transfectadas con miARN con respecto a las células transfectadas con el control negativo.

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

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

TABLA 9

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

|                | <b>% de Viabilidad</b> | <b>desv. estándar.</b> |
|----------------|------------------------|------------------------|
| miR-345        | 75                     | 5,9                    |
| miR-346        | 77,8                   | 8,2                    |
| miR-193        | 79,6                   | 14,7                   |
| miR-206        | 79,6                   | 6,5                    |
| miR-337        | 80,8                   | 3,1                    |
| mmu-miR-293    | 82,6                   | 1,7                    |
| miR-299        | 84,0                   | 4,0                    |
| mmu-miR-329    | 84,5                   | 4,5                    |
| mmu-miR-409    | 86                     | 2,8                    |
| mmu-miR-292-3p | 86,2                   | 2,8                    |
| miR-210        | 86,4                   | 5,1                    |
| mmu-miR-344    | 86,4                   | 5,3                    |
| mmu-miR-298    | 86,7                   | 4,2                    |
| miR-208        | 87,4                   | 4,5                    |
| miR-197        | 87,6                   | 7,5                    |
| miR-217        | 87,9                   | 3,5                    |
| miR-1          | 88,2                   | 9,0                    |
| miR-124        | 88,8                   | 4,2                    |

20

TABLA 10

**miARN que reducen el número de células viables de células HeLa**

|         | <b>Células Totales</b> | <b>desv. estándar.</b> |
|---------|------------------------|------------------------|
| 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                    |

**miARN que reducen el número de células viables de células HeLa**

|             | <b>Células Totales</b> | <b>desv. estándar.</b> |
|-------------|------------------------|------------------------|
| 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                    |

(Continuación)

**miARN que reducen el número de células viables de células HeLa**

|             | <b>Células Totales</b> | <b>desv. estándar.</b> |
|-------------|------------------------|------------------------|
| miR-101     | 43,4                   | 6,4                    |
| miR-210     | 47,1                   | 8,4                    |
| miR-147     | 47,7                   | 8,2                    |
| miR-98      | 50,6                   | 2,6                    |
| miR-345     | 51,8                   | 6,8                    |
| miR-92      | 52,4                   | 6,8                    |
| miR-96      | 53,2                   | 0,9                    |
| miR-7       | 54,0                   | 5,3                    |
| miR-133b    | 55,9                   | 3,1                    |
| miR-206     | 56,0                   | 12,4                   |
| mmu-miR-297 | 56,0                   | 5,7                    |
| miR-19a     | 57,2                   | 20,6                   |
| mmu-miR-344 | 57,5                   | 14,1                   |
| miR-205     | 58,9                   | 18,7                   |
| miR-208     | 60,5                   | 11,1                   |

**TABLA 11****miARN que aumentan significativamente el número de células de células HeLa**

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

**TABLA 12****miARN que reducen significativamente la viabilidad celular de células A549**

|             | <b>% de Viabilidad</b> | <b>desv. Estánd.</b> |
|-------------|------------------------|----------------------|
| miR-193     | 92,4                   | 2,5                  |
| miR-224     | 92,5                   | 1,4                  |
| miR-96      | 92,6                   | 0,1                  |
| miR-346     | 93,9                   | 1,6                  |
| mmu-miR-293 | 94,9                   | 0,7                  |
| miR-34a     | 95                     | 0,2                  |

(Continuación)

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

|             | <b>% de Viabilidad</b> | <b>desv. Estánd.</b> |
|-------------|------------------------|----------------------|
| miR-216     | 95,1                   | 1,0                  |
| mmu-miR-380 | 95,2                   | 0,8                  |
| miR-182     | 95,6                   | 0,8                  |
| miR-301     | 95,6                   | 1,0                  |
| mmu-miR-344 | 95,8                   | 0,2                  |
| mmu-miR-409 | 95,8                   | 0,6                  |
| miR-369     | 95,9                   | 0,7                  |

**TABLA 13****miARN que reducen significativamente el número de células viables en células A549**

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

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

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

**TABLA 15**

**miARN que reducen significativamente la viabilidad celular de los linfocitos Jurkat**

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

**TABLA 16**

**miARN que aumentan significativamente la viabilidad celular de linfocitos Jurkat**

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

5

**TABLA 17**

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

|         | <b>% de Viabilidad</b> | <b>desv. estándar.</b> |
|---------|------------------------|------------------------|
| miR-184 | 61,04                  | 12,16                  |
| miR-145 | 68,98                  | 11,23                  |
| miR-186 | 69,64                  | 6,99                   |
| miR-139 | 69,85                  | 0,29                   |
| miR-134 | 71,90                  | 22,42                  |
| miR-190 | 75,59                  | 2,43                   |
| miR-144 | 77,13                  | 4,18                   |

(Continuación)

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

|         | <b>% de Viabilidad</b> | <b>desv. estándar.</b> |
|---------|------------------------|------------------------|
| 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**

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

- 5 Resulta interesante señalar que los miARN que afectan un tipo celular a menudo no afectan otros tipos celulares. Esto se debe probablemente al hecho de que los procesos celulares que están activos varían entre los distintos tipos celulares. Esto puede ser vitalmente importante cuando se considera el potencial de las terapias basadas en miARN. Las células anormales (enfermas) son diferentes de las células normales debido al hecho de que están activos procesos celulares diferentes en los dos tipos de células. Sería ideal identificar los miARN que tienen efectos
- 10 diferenciales sobre las células normales y anormales ya que podrían suministrarse globalmente y se esperaría que solamente tengan un efecto sobre células enfermas. Cuando se compararon los datos de viabilidad celular de las células de leucemia (linfocitos T cancerosos) y los linfocitos T primarios, se notó que let-7a, let-7b, y miR-10b, reducían significativamente el porcentaje de células viables en las células de leucemia, mientras que no tenían esencialmente ningún efecto en los correspondientes linfocitos T normales. Estos miARN eran candidatos a
- 15 fármacos para la leucemia.

**Ejemplo 14****Selección de miARN que tienen influencia en la apoptosis**

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

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

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

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

TABLA 20

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

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

TABLA 21

**miARN que disminuyen significativamente el porcentaje de células apoptóticas**

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

**Ejemplo 15****Selección de miARN de la biblioteca de miARN sintéticos que tienen influencia en el ciclo celular**

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

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

Let-7a  
 Let-7a  
 miR-1  
 miR-1  
 miR-105  
 miR-125a  
 miR-128  
 miR-142  
 miR-145  
 miR-146  
 miR-147  
 miR-150  
 miR-15a  
 miR-16  
 miR-186  
 miR-187  
 miR-188  
 miR-191  
 miR-195  
 miR-20  
 miR-206  
 miR-21  
 miR-211  
 miR-223  
 miR-224  
 miR-26a  
 miR-320  
 miR-324-3p  
 miR-325  
 miR-335  
 miR-337  
 miR-338  
 miR-345  
 miR-371  
 miR-373  
 miR-92  
 mmu-miR-201  
 mmu-miR-207  
 mmu-miR-290  
 mmu-miR-291-3p  
 mmu-miR-294  
 mmu-miR-295  
 mmu-miR-297  
 mmu-miR-322  
 mmu-miR-376b  
 mmu-miR-409

5 A las 24 horas post-transfección, la mitad de las células BJ de cada pocillo se trasladaron a un medio reciente. A las 72 horas post-transfección, las células se fijaron con de paraformaldehído al 4% con una concentración final del 2%. Las células fijadas se tiñeron con yoduro de propidio (protocolo de TTP LabTech) y se evaluaron utilizando el escáner celular TTP LabTech. El yoduro de propidio tiñe el ADN y el contenido relacionado con ADN en una célula corresponde con su posición en el ciclo celular. El escáner celular medía la tinción de yoduro de propidio en cada

célula y asignaba su posición en el ciclo celular. El porcentaje de células en cada estado del ciclo celular se calculó y se comparó con las células transfectadas con los miARN sintéticos de control negativo. El cambio relativo en las células en cada estado se calculó para cada miARN que se utilizó. Los miARN sintéticos que inducían un cambio significativo hacia o en contra de un estado específico del ciclo celular se enumeran a continuación. Estos representan los miARN que regulan puntos clave en el ciclo celular y ofrecen puntos clave de intervención para el desarrollo de terapias relacionadas con el cáncer.

**TABLA 23**

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

| <b>miARN</b> | <b>% Dif de Células en G1</b> | <b>desv. estándar.</b> |
|--------------|-------------------------------|------------------------|
| 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**

| <b>miARN</b>    | <b>% Dif de Células en G1</b> | <b>desv. estándar.</b> |
|-----------------|-------------------------------|------------------------|
| rno-miR-miR-325 | 121,7                         | 5,3                    |
| mmu-409         | 123,2                         | 13,7                   |
| miR-miR-324     | 123,7                         | 4,9                    |
| miR-miR-195     | 125,1                         | 2,5                    |
| mmu-376b        | 126,5                         | 3,1                    |
| miR-miR-142     | 127,0                         | 13,0                   |
| miR-miR-371     | 128,9                         | 2,8                    |
| let-7a          | 131,5                         | 4,5                    |
| miR-miR-146     | 141,5                         | 7,7                    |
| miR-miR-128     | 143,0                         | 2,4                    |

**TABLA 25**

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

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

TABLA 26

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

| <b>miARN</b> | <b>% Dif de Células en G1</b> | <b>desv. estándar.</b> |
|--------------|-------------------------------|------------------------|
| miR-miR-92   | 132,0                         | 14,7                   |
| miR-miR-15a  | 134,8                         | 13,9                   |
| miR-miR-191  | 135,9                         | 29,1                   |
| miR-miR-26a  | 136,0                         | 7,6                    |
| miR-miR-20   | 139,7                         | 17,6                   |
| mmu-290      | 141,0                         | 11,7                   |
| let-7a       | 141,1                         | 19,9                   |
| miR-miR-345  | 143,3                         | 45,8                   |
| miR-miR-16   | 150,1                         | 24,8                   |
| miR-miR-224  | 150,6                         | 9,8                    |

TABLA 26

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

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

5

TABLA 27

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

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

TABLA 28

**miARN que aumentan significativamente el porcentaje de células BJ con una cantidad mayor de 2x de ADN**

| <b>miARN</b> | <b>% Dif células c/&gt;2x DNA</b> | <b>desv. estándar.</b> |
|--------------|-----------------------------------|------------------------|
| miR-miR-20   | 157,9                             | 23,4                   |
| miR-miR-1    | 161,9                             | 13,6                   |
| miR-miR- 345 | 176,1                             | 17,4                   |
| miR-miR-373  | 177,9                             | 32,7                   |
| miR-miR-337  | 195,0                             | 52,1                   |
| miR-miR-21   | 209,4                             | 45,7                   |

**Ejemplo 16****Selección de miARN en la biblioteca de miARN sintéticos que tienen influencia en la proliferación celular**

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

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

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

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

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

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

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

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

**TABLA 29****miARN Anti-Proliferación Comunes**

| miARN   | nº de Positivos |
|---------|-----------------|
| miR-124 | 7               |
| miR-16  | 6               |
| miR-101 | 6               |
| miR-126 | 6               |
| miR-147 | 6               |
| miR-15a | 5               |
| miR-96  | 5               |
| miR-105 | 5               |
| miR-142 | 5               |
| miR-215 | 5               |
| miR-346 | 4               |
| miR-206 | 4               |
| miR-192 | 4               |
| miR-194 | 4               |

Entre las células que se utilizaron para la selección en la biblioteca de miARN sintéticos se hicieron parejas de células cancerosas y no cancerosas de mama, piel y linfocitos T. Era interesante, que muchos miARN sintéticos afectaban de manera distinta la proliferación de las parejas de células (véase la tabla a continuación).

Tabla 30

|                     |                   |                   |                      |                   |
|---------------------|-------------------|-------------------|----------------------|-------------------|
| <b>Mama</b>         |                   |                   |                      |                   |
|                     | <b>Cancerosas</b> |                   | <b>No Cancerosas</b> |                   |
| <u>miARN</u>        | %CN               | % desv. estándar. | %CN                  | % desv. estándar. |
| miR-201             | 79                | 14                | 103                  | 17                |
| miR-192             | 81                | 3                 | 95                   | 17                |
| miR-92              | 85                | 11                | 104                  | 24                |
| <b>Piel</b>         |                   |                   |                      |                   |
|                     | <b>Cancerosas</b> |                   | <b>Normales</b>      |                   |
| pre-MIR             | % CN              | % desv. estándar. | % CN                 | % desv. estándar. |
| 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                |
| <b>Linfocitos T</b> |                   |                   |                      |                   |
|                     | <b>Leucemia</b>   |                   | <b>Normales</b>      |                   |
|                     | %CN               | % desv. estándar. | %CN                  | % desv. estándar. |
| 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                 |

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

## 5 Ejemplo 17

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

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

Se transfectaron por triplicado las células de mama (MCF12A), próstata (22Rv1), pulmón (A549), y piel (TE354T) con cada uno de los más de 150 inhibidores de miARN de la biblioteca de los inventores. Cada tipo celular se transfectó con 10 picomoles de cada uno de los inhibidores de miARN de la biblioteca utilizando siPORT™ NeoFx™ (Ambion) con una densidad en la placa de aproximadamente 8.000 células/pocillo de una placa de 96 pocillos. Se estimó el número de células a las 72 h post-transfección por uno de tres métodos:

- (1) Se añadió Azul Alamar a cada pocillo y las placas de 96 pocillos se analizaron utilizando un lector de placas. El azul Alamar es un sustrato para una enzima metabólica de las células y el producto de la reacción es fluorescente. La fluorescencia en cada pocillo se correlaciona con el número total de células en cada pocillo.
- (2) Se añadió a cada pocillo Reactivo Flex ViaCount (Guava), un colorante que es fluorescente cuando interactúa con DNA, y se cuantificó la fluorescencia utilizando el Guava PCA-96 según las instrucciones del fabricante.
- (3) Se añadió a cada pocillo yoduro de propidio, un colorante que es fluorescente cuando interactúa con ADN, y se estimó el número total de células en el pocillo por recuento de los sitios únicos de ADN teñido utilizando el

Escáner Celular TTP LabTech según las instrucciones del fabricante.

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

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

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

### Ejemplo 18

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

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

- 20 Se transfectaron por triplicado células del cuello uterino (HeLa), de pulmón (A549), y linfocitos T (Jurkat y normales primarios) con cada uno de los más de 150 miARN de la biblioteca de los inventores. Con las excepciones de los linfocitos Jurkat y linfocitos T primarios, cada tipo celular se transfectó con 5 picomoles de cada uno de los miARN de la biblioteca de miARN sintéticos utilizando siPORT™ NeoFx™ (Ambion) con una densidad en las placas de aproximadamente 8.000 células/pocillo de placas de 96 pocillos. Los linfocitos Jurkat y los linfocitos T primarios se mezclaron a una tasa de aproximadamente 50.000 células/pocillo con 500 picomoles de cada uno de los miARN sintéticos. Para las células HeLa y A549, se cambió el medio a las 24 h tras la transfección. Se estimó la viabilidad celular 72 horas post-transfección por uno de dos procedimientos:

- 25 (1) Se añadió a cada pocillo Reactivo ViaCount Flex (Guava), que incluye un colorante que solamente penetra en células muertas y que es fluorescente cuando interactúa con ADN, y se cuantificó la fluorescencia utilizando el Guava PCA-96 según las instrucciones del fabricante. El porcentaje de células viables se halló dividiendo el número de células no muertas y no apoptóticas en la muestra por el número total de células en el pocillo y multiplicándolo por 100.
- 30 (2) Se añadió a cada pocillo yoduro de propidio, un colorante que es fluorescente cuando interactúa con ADN. Cada célula se analizó utilizando el Escáner Celular TTP LabTech según las instrucciones del fabricante para detectar células con patrones de tinción que concuerdan con muerte celular o apoptosis. El porcentaje de células viables se midió dividiendo el número de células no muertas y no apoptóticas en la muestra por el número total de células en el pocillo y multiplicando por 100.
- 35 En la FIG. 19 se presentan miARN sintéticos que disminuyen o aumentan significativamente la viabilidad en los varios tipos celulares que se analizaron. En una comparación de la viabilidad entre linfocitos Jurkat y linfocitos T primarios, que representan las formas leucemia y normal de los linfocitos T, let-7, miR-10, miR-101, miR-17-3p, miR-19, y miR-34a reducían mucho la viabilidad de las células de leucemia sin afectar a los linfocitos T normales.

### Ejemplo 19

- 40 **Selección de miARN en la biblioteca de miARN sintéticos que tienen influencia en la apoptosis**

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

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

TrisCl pH 7,5, 20 mM NaCl, 0,5% NP-40, concentración final 0,02 mg/ml). Se añadieron 40 µl de tampón (40 mM TrisCl pH 7,5, 0,5% NP-40) a cada pocillo de muestra. Las muestras se incubaron 10 min en hielo. Se añadieron 160 µl de sustrato FDA diluido a cada pocillo. Se midió la fluorescencia durante 30 minutos a 37 grados (ex = 488, em = 529). La pendiente del aumento de fluorescencia en el tiempo es una función del número de células en la placa.

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

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

10

### Ejemplo 20

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

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

15

20

25

30

Se transfectaron por duplicado aproximadamente 8.000 células NIH3T3 con cada uno de los más de 150 miARN sintéticos de la biblioteca de los inventores utilizando siPORT™ NeoFx™ (Ambion). El medio se cambió a las 24 h y las células se transfirieron a placas de 24 pocillos que contenían agar blando. El agar blando limita la movilidad y asegura que las células hermanas permanezcan en contacto a continuación de la división celular. El contacto íntimo con otras células induce típicamente a las células NIH3T3 que paren de dividirse. El número total de las células de cada pocillo se midió tomando una lectura de la absorbancia a 495 nm. La lectura de la absorbancia para cada pocillo se dividía por la lectura media de absorbancia de las células transfectadas con el miARN control negativo y se multiplicó por 100 para obtener el porcentaje de cambio en la transformación. Una selección inicial revelaba que miR-10, miR-23, miR-24, miR-198, miR-192, y miR-199 eran miARN que aumentaban la transformación con respecto a las células transfectadas con el control negativo. Una repetición del experimento con los candidatos iniciales arrojó el siguiente resultado que se muestra a continuación:

Tabla 31

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

### Ejemplo 21

#### miARN que afectan la eficacia de compuestos terapéuticos

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

35

40

45

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

50

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

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

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

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

## Ejemplo 22

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

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

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

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

## Ejemplo 23

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

La telomerasa es un complejo de proteínas y ARN que mantiene los extremos de los cromosomas agregando telómeros. Con raras excepciones, las células diferenciadas terminalmente carecen de telomerasa activa. Una de las excepciones son las células cancerosas. Más del 90% de las muestras humanas de cáncer tienen telomerasa activa (revisado en Dong y col., 2005). El gen hTert codifica el dominio catalítico de telomerasa. La expresión de hTert se

correlaciona con la actividad de la telomerasa en las células lo que le hace un buen sustituto de la actividad telomerasa. Los inventores han desarrollado y utilizado un ensayo basado en RT-PCR para controlar la expresión de ARNm hTert en células negativas a telomerasa para identificar los miARN que participan en la regulación de la telomerasa. Los miARN que regulan la actividad telomerasa representan puntos de intervención para terapias contra el cáncer.

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

Se ensamblaron reacciones PCR en tiempo real para cuantificar el ARNm hTert y el ARNr 18S en cada una de las muestras. Se colocaron en un tubo de PCR: Agua libre de nucleasa, 10x tampón completo de PCR/SYBR, MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 2,5 mM de dNTPs, 50x de ROX, cebadores específicos de 18S o hTert (mezcla de directos e inversos 3 µM), el ADNc de la distintas muestras, y polimerasa Súper taq. Se calentó la reacción a 95 °C durante 5 minutos y luego se sometió a 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 30 segundos. Los productos de amplificación se controlaron utilizando ABI 7600 (Applied Biosystems). Las células BJ normalmente no producen productos de amplificación con los cebadores de hTert. También se analizaron las muestras transfectadas con miARN que daban lugar a productos de PCR hTert para hallar niveles de ARNr 18S para asegurar de que no hubiera significativamente más células en las muestras que pudieran haber contribuido a la cantidad de hTert en las muestras.

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

Tabla 33

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

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

Tabla 34

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

**Ejemplo 24****Efecto de la secuencia primaria de miARN sobre la función**

- 5 Parece que muchos miARN están estrechamente relacionados unos con otros basándose en sus secuencias primarias. Por ejemplo, let-7a es un miembro de la familia genética let-7, que incluye 7 genes únicos en el genoma humano. Los genes let-7 codifican miARN que varían por tan poco como un único nucleótido y como mucho en cuatro nucleótidos. En las bibliotecas de miARN sintéticos e inhibidores de miARN, los inventores tienen cinco miARN let-7 humanos diferentes. Estos miARN se han utilizado en muchos tipos celulares diferentes en selecciones
- 10 diseñadas para identificar los miARN implicados en una variedad de distintos procesos celulares. En muchas de las selecciones, los distintos miARN let-7 generan fenotipos similares. La FIG. 23 proporciona dos ejemplos en los que todos los miembros de la familia let-7 dan lugar a respuestas similares. Por el contrario, hay algunas selecciones en las que los distintos miARN de la familia let-7 dan lugar a resultados significativamente diferentes (FIG. 23).

**Referencias**

- 15 Agrawal y Zamecnik, Nucleic Acids Research, 18(18):5419-5423,1990.  
 Allen y col., Biochemistry, 28:4601-4607, 1989.  
 Ambros, Cell, 107(7):823-826,2001.  
 Baglioni y Nilson, Interferon, 5:23-42, 1983.  
 Bayer y Wilchek, Methods of Biochemical Analysis, 26:1-45, 1980.
- 20 Bayer y col, Analytical Biochemistry, 149:529-536, 1985.  
 Beaucage, y Lyer, Tetrahedron, 48:2223-2311, 1992.  
 Bernstein y col, Nature, 409: 363-366, 2001.  
 Bijsterbosch y col, Biochem. Pharmacol., 62(5):627-633, 2001.  
 Blackie y col., Bioorg. Med Chem. Lett., 12(18):2603-2606, 2002.
- 25 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.  
 Boshier y Labouesse, Nat. Cell Biol., 2:E31-E36, 2000.  
 Brennecke y col., Cell, 113:25-36, 2003.
- 30 Brumbaugh y col., Proc Natl Acad-Sci USA, 85(15):5610-5614,1988.  
 Brummelkamp y col., Science, 296(5567):550-553, 2002

- Calin y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:15524-15529, 2002.  
 Caplen y col., Proc Natl Acad Sci. USA, 98: 9742-9747, 2001.  
 Cardullo y col., Proc Natl Acad Sci USA, 85(23):8790-8794,1988  
 Carrington y col., Science, 301(5631):336-338, 2003.  
 5 Chang y col., Nature, 430(7001):785-789, 2004.  
 Chen y Okayama, Mol. Cell BioL, 7(8):2745-2752, 1987.  
 Chen y col., Science, 303(5654):83-86, 2004.  
 Cogoni, C., y Macino, Science, 286:342-2344,1999.  
 Cogoni y Macino, Nature, 399:166-169,1999.  
 10 Conway y zap, Nucleic Acids Res Symposium Series, 21:43-44, 1989.  
 Crooke, En: Antisense Drug Technology, Marcel Dekker and Co, Basel, Switzerland, Capítulo 6, 2001.  
 Cummins y col., En: IRT: Nucleosides and nucleosides, La Jolla CA, 72, 1996.  
 Dalmay y col. EMBO J, 20:2069-2078, 2001.  
 Dalmay y col., Cell, 101:543-553, 2000.  
 15 Denli y col., Trends Biochem. Sci., 28:196, 2003.  
 Dewanjee y col., Biotechniques, 5: 844-846,1994.  
 Didenko, Biotechniques, 31(5):1106-16,1118, 1120-1, 2001.  
 Doench y col., Genes & Dev., 17: 438-442, 2003.  
 Doench y col., Genes Dev., 18(5):504-11, 2004.  
 20 Dong y col., Crit Rev Oncol Hematol. 54(2):85-93, 2005.  
 Dostie y col., RNA, 9:180-186, 2003.  
 Draper y Gold, Biochemistry, 19:1774-1781, 1980.  
 Elbashir y col., Nature, 411:494-498, 2001.  
 Emptage y col.: Neuron, 2001 Ene; 29(1):197-208, 2001.  
 25 Fechheimer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:8463-8467, 1987.  
 Fire y col., Nature, 391:806-811, 1998.  
 Forster y col., Nucleic Acids Res., 13(3):745-761,1985.  
 Fraley y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:3348-3352, 1979.  
 Froehler y col., Nucleic Acids Res., 14(13):5399-5407, 1986.  
 30 Gillam y col., J. Biol. Chem., 253:2532, 1978.  
 Gillam y col., Nucleic Acids Res., 6:2973,1979.  
 Gopal, Mol. Cell BioL, 5:1188-1190,1985.  
 Graham y Van Der Eb, Virology, 52:456-467, 1973.  
 Griffey y col., J Mass Spectrom, 32(3):305-13, 1997.  
 35 Grishok y col, Cell, 106: 23-34, 2001.  
 Ha y col., Genes Dev., 10, 3041-3050, 1996.  
 Hamilton y Baulcombe, Science, 286:950-952,1999.  
 Hammond y col., Nat. Rev. Genet., 2(2):110-9, 2001.  
 Haralambidis y col., Nucleic Acids Res., 18(3):493-9,1990.  
 40 Harland y Weintraub, J. Cell Biol., 101:1094-1099,1985.  
 Holtke y Kessler, Nucleic Acids Res., 18(19):5843-51,1990.  
 Hutvagner y Zamore, Science, 297(5589):2056-2060, 2002.  
 Hutvagner y col., PLoS Biol. 2(4):E98, 2004.  
 Hutvagner y col., Science, 293:834-838, 2001.  
 45 Itakura y Riggs, Science, 209:1401-1405, 1980.  
 Itakura y col., J. Biol. Chem., 250:4592, 1975.  
 Jablonski y col., Nucleic Acids Res., 14(15):6115-6128, 1986.  
 Kaeppler y col., Plant Cell Reports, 9: 415-418,1990.  
 Kaneda y col., Science, 243:375-378, 1989.  
 50 Kato y col., J. Biol. Chem., 266:3361-3364, 1991.  
 Keller y col., Analytical Biochemistry, 170:441-450, 1988.  
 Ketting y col., Cell, 99:133-141,1999.  
 Khorana, Science, 203, 614 1979.  
 Kimura y col., Cancer Research, 55:1379-1384,1995.  
 55 Kiriakidou y col, Genes Dev. 18(10):1165-78, 2004.  
 Kitagawa y col., Brain Res., 561:203-11, 1991.  
 Klostermeier y Millar, Biopolymers, 61(3):159-79, 2001-2002  
 Knight y col., Science, 2:2, 2001.  
 Kornberg y Baker, En: DNA Replication, 2d Ed., Freeman, San Francisco, 1992.  
 60 Kuhnast y col., Bioconjug Chem, 5:627-636, 2000.  
 Lagos-Quintana y col., Science, 294(5543):853-858, 2001.  
 Langer y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78(11):663-6637,1981.  
 Lau y col., Science, 294(5543):858-862, 2001.  
 Lee y Ambros, Science, 294(5543):862-864, 2001.  
 65 Lee y col., Nature, 425(6956):415-419 2003.  
 Lee, EMBO J., 21(17):4663-4670 2002.

- Leonetti y col., *Bioconjugate Chem.*, 1:149-153, 1990.  
 Lewis, *Cell*, 115(7):787-798 2003.  
 Lin y Avery, *Nature*, 402:128-129,1999.  
 Liu y col., *Anal. Biochem.*, 289:239-245, 2001.  
 5 Lorenz y col., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14(19):4975-4977, 2004.  
 MacKellar y col., *Nucl. Acids Res.*, 20:3411-3417,1992.  
 Manoharan, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 12(2):103-128, 2002.  
 Martin y col., *RNA*, 4(2):226-20, 1998.  
 10 Meijer y col., *Progress in Cell cycle research*, Vol 5, 219-224. (Meijer, L., Jezequel, A., y Roberge, M. eds),  
 Capítulo 22.  
 Meister y col., *RNA*, 10(3):544-50, 2004.  
 Montgomery y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:155-2-15507,1998.  
 Mourrain y col., *Cell*, 101:533, 2000.  
 Nicolau y Sene, *Biochim. Biophys. Acta*, 721:185-190, 1982.  
 15 Nicolau y col., *Methods Enzymol.*, 149:157-176, 1987.  
 Nykanen y col., *Cell*, 107(3):309-321, 2001.  
 Olsen y col., *Dev. Biol.*, 216:671, 1999.  
 Omirulleh y col., *Plant Mol. Biol.*, 21(3):415-428, 1993.  
 Oravcova y col., *Blood Press Suppl.*, 1:61-64, 1994.  
 20 Pasquinelli y Ruvkun, *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, 18:495-513, 2002.  
 Piutlle y col., *Gene*, 112(1):101-5, 1992.  
 Plasterk y Ketting, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 10:562-567,2000.  
 Potrykus y col., *Mol. Gen. Genet.*, 199(2):169-77, 1985.  
 Regnier y Preat, *Pharm Res*, 10:1596-602, 1998.  
 25 Reinhart y col., *Nature*, 403:901-906, 2000.  
 Reisfeld y col., *Biochem. Biophysics Res. Comm.*, 142(2):519-526, 1987.  
 Richardson y Gumpert, *Nucleic Acids Res.*, 11(18):6167-84, 1983.  
 Richardson y Macy, *Biochemistry*, 20(5):1133-9, 1981.  
 Rippe y col., *Mol. Cell Biol.*, 10:689-695,1990.  
 30 Roychoudhury y Kossel, *Eur. J. Biochem.*, 22(3):310-20, 1971.  
 Rump y col., *Biochem Pharmacol*, 59(11): 1407-16, 2000.  
 Rusckowski y col., *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 5:333-345, 2000.  
 Rusconi y col., *Nat. Biotechnol.*, 22(11):1423-1428, 2004.  
 Saiki y col., *Science*, 230:1350-1354,1985  
 35 Sambrook y col., *En: DNA microarrays: a molecular cloning manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold  
 Spring Harbor, NY, 2003.  
 Sambrook y col., *En: Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold  
 Spring Harbor, NY, 1989.  
 Sambrook y col., *En: Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold  
 40 Spring Harbor, NY, 2001.  
 Scheit, *en: Synthesis and Biological Function*, Wiley-Interscience, New York, 171-172, 1980.  
 Schwarze y col., *Trends in Cell Biol.*, 10:290-295, 2000.  
 Sedelnikova y col., *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 6:443-452, 2000.  
 Seggerson y col., *Dev. Biol.*, 243:215, 2002.  
 45 Sharp y Zamore, *Science*, 287:2431-2433, 2000.  
 Smardon y col., *Curr. Biol.*, 10:169-178, 2000.  
 Sodja y col., *Nucleic Acids Res.*, 5(2):385-401,1978.  
 Soutschek y col., *Nature*, 432(7014):173-178, 2004.  
 Sproat y col., *Nucleic Acids Res.*, 17(9):3373-3386, 1989.  
 50 Stalnacke y col., *Eur. J. Nucl. Med*, 5:166-170,1985.  
 Sui y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(8):5515-5520, 2002.  
 Tabara y col., *Cell*, 99:123-132, 1999.  
 Takeda e Ikeda, *Nucl. Acids Res.*, 15:101-104,1984.  
 Tuschl, *Chembiochem*, 2:239-245,2001.  
 55 Uhlenbeck y col., *Nucleic Acids Res.*, 10(11):3341-52,1982.  
 Urdea y col., *Clinical Chemistry*, 35(8):1571-1575,1989.  
 Vella y col., *Genes Dev.*, 18(2):132-7, 2004.  
 Viscidi y col., *J. Clinical Microbiology*, 23(2):311-317, 1986.  
 Vyas y col., *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 18:1-76, 2001.  
 60 Waterhouse y col., *Nature*, 411:834-842, 2001.  
 Weeks y col., *Clin. Chem.*, 29(8):1474-1479,1983.  
 Williams y col., *Int. J. Dev. Biol.*, 41(2):359-364, 1997.  
 Winter y Brownlee, *Nucleic Acids Res.*, 5(9):3129-39, 1978.  
 Wong y col., *Gene*, 10:87-94, 1980.  
 65 Wu et al., *Eur. J. Pharm. Sci.*, 3:179-186,2000.  
 Wu-Scharf y col., *Science*, 290:1159-1162, 2000.

Xu y col., Curr. Biol., 13:790-795, 2003.  
 Yoo y col., Nucleic Acids Res., 21:4225-4231, 2000.  
 Zamore y col., Cell, 101:25-33, 2000.  
 Zamore, Nat. Struct. Biol., 8:746-750, 2001.  
 5 Zeng y col., Mol. Cell, 9, 1327-33, 2002.  
 Zeng y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 100: 9779-9784, 2003.  
 Zhang y col., Eur. J. Nucl. Med., 11:1700-1707, 2000.  
 Zhang y col., J. Mol. Neurosci., 1:13-28, 1996.  
 Zhang y col., J. Nucl. Med., 11:1660-1669,2001.  
 10 Ziauddin y Sabatini, Nature, 411(6833):107-110, 2001.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> ASURAGEN, INC.  
 <120> PROCEDIMIENTOS Y COMPOSICIONES QUE IMPLICAN MOLÉCULA DE MIARN MODIFICADAS Y  
 MOLÉCULAS INHIBIDORAS DE MIARN  
 <130> R 57134  
 20 <140> DESCONOCIDO  
 <141> 14-11-2005  
 <150> 60/683.736  
 25 <151> 23-05-2005  
 <150> 60/649.634  
 <151> 03-02-2005  
 30 <150> 60/627.171  
 <151> 12-11-2004  
 <160> 803  
 35 <170> PatentIn Ver. 2.1  
 <210> 1  
 <211> 85  
 <212> ARN  
 40 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 1  
 accuacucag aguacauacu ucuuuaugua cccaauugaa cauacaaugc uauggaagu 60  
 aaagaaguau guauuuuugg uaggc 85  
 45 <210> 2  
 <211> 71  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 50 <400> 2  
 ugaggaaacau acuucuuuuau augcccauau ggaccugcua agcuauaggaa uguaaagaag 60  
 uauguaucuc a 71  
 55 <210> 3  
 <211> 80  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 60 <400> 3  
 ugaggauagg uaguagguug uauaguuuua gggucacacc caccacuggg agauaacuau 60  
 acaaucuacu gucuuuuccua 80

<210> 4  
 <211> 72  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 4  
 agguugaggu aguagguugu auaguuuaga auuacaucaa gggagauaac uguacagccu 60  
 ccuagcuuuc cu 72  
 10  
 <210> 5  
 <211> 74  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 15  
 <400> 5  
 gggugaggua guagguugua uaguuuaggg cucugcccug cuaugggaua acuaauacaau 60  
 cuacugucuu uccu 74  
 20  
 <210> 6  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25  
 <400> 6  
 cggggugagg uaguagguug ugugguuua gggcagugau guugccccuc ggaagauaac 60  
 uauacaaccu acugccuucc cug 83  
 30  
 <210> 7  
 <211> 84  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 7  
 gcauccgggu ugagguagua gguuguauug uuuagaguua caccugggga guuaacugua 60  
 caaccuucua gcuuuccuug gagc 84  
 35  
 <210> 8  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 40  
 <400> 8  
 ccuaggaaga gguaguaggu ugcuauguuu uagggcaggg auuuugccca caaggaggua 60  
 acuaauacgac cugcugccuu ucuuagg 87  
 45  
 <210> 9  
 <211> 79  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 50  
 <400> 9  
 cccgggcuga gguaggaggu uguauaguug aggaggacac ccaaggagau cacuaauacgg 60  
 ccuccuagcu uuccccagg 79  
 55  
 <210> 10  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

# ES 2 507 544 T3

<400> 10

ucagagugag guaguagauu guauaguugu gggguaguga uuuuaccug uucaggagau 60  
aacuauacaa ucuauugccu ucccuga 87

5 <210> 11  
<211> 83  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 11

ugugggauga gguaguagau uguauaguuu uagggucaua ccccaucug gagauaacua 60  
uacagucuac ugucuuucc acg 83

15 <210> 12  
<211> 110  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 12

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

25 <210> 13  
<211> 110  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 13

30 cuggauacag aguggaccgg cuggccccc au cuggaagacu agugauuuug uuguugucu 60  
acugcgcuca acaacaaauc ccagucuaacc uauggugucc agccaucgca 110

35 <210> 14  
<211> 110  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 14

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

45 <210> 15  
<211> 84  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 15

aggcugaggu aguaguuuugu acaguuugag ggucuaugau accacccggu acaggagaua 60  
acuguacagg ccacugccuu gcca 84

50 <210> 16  
<211> 84  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

55 <400> 16

cuggcugagg uaguaguuuug ugcuguuggu cggguuguga cauugcccgc uguggagaua 60  
acugcgcaag cuacugccuu gcua 84

# ES 2 507 544 T3

<210> 17  
 <211> 89  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 17  
 cggggguuggu uguuauuuuu gguuauuuag cuguauugagu gguguggagu cuucauaaag 60  
 cuagauaacc gaaaguaaaa auaacccca 89  
 10  
 <210> 18  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 15  
 <400> 18  
 ggaagcgagu uguuauuuuu gguuauuuag cuguauugagu guauuggucu ucauaaagcu 60  
 agauaaccga aaguaaaaac uccuuc 87  
 20  
 <210> 19  
 <211> 90  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25  
 <400> 19  
 ggaggcccg uucucucuuu gguuauuuag cuguauugagu gccacagagc cgucuaaag 60  
 cuagauaacc gaaaguagaa augauucua 90  
 30  
 <210> 20  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 20  
 35  
 gaucugucug ucuucuguau auaccugua gaucgaaau uguguaagga auuuuguggu 60  
 caaaaauucg uaucuagggg aauauguagu ugacuaaac acuccgcucu 110  
 40  
 <210> 21  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 21  
 45  
 ccagagguug uaacguuguc uauauauacc cuguagaacc gaauuugugu gguauccgua 60  
 uagucacaga uucgauucua ggggaauaua uggucgaugc aaaaacuuc 110  
 50  
 <210> 22  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 22  
 55  
 ccuuggagua aaguagcagc acauaauggu uuguggauuu ugaaaaggug caggccauau 60  
 ugugcugccu caaaaauaca agg 83  
 <210> 23  
 <211> 98  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 23

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

5 <210> 24  
<211> 89  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 24

gucagcagug ccuuagcagc acguaaaauu uggcguaaag auucuaaaaau uaucuccagu 60  
auuaacugug cugcugaagu aagguugac 89

15 <210> 25  
<211> 81  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 25

guuccacucu agcagcacgu aaauauuggc guagugaaaau auauauuaaa caccaauuuu 60  
acugugcugc uuuguguga c 81

25 <210> 26  
<211> 84  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 26

30 gucagaauaa ugucaaagug cuuacagugc agguagugau augugcaucu acugcaguga 60  
aggcacuugu agcauuuagg ugac 84

35 <210> 27  
<211> 71  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 27

40 uguucuaagg ugcaucuagu gcagauagug aaguagauua gcaucuacug cccuaagugc 60  
uccuucuggc a 71

45 <210> 28  
<211> 82  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 28

50 gcaguccucu guuaguuuug cauaguugca cuacaagaag aauguaguug ugcaaaucua 60  
ugcaaaacug augguggccu gc 82

55 <210> 29  
<211> 87  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 29

cacuguucua ugguuaguuu ugcagguuug cauccagcug ugugauauuc ugcugugcaa 60  
auccaugcaa aacugacugu gguagug 87

<210> 30  
 <211> 96  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 30  
 acauugcuac uuacaauuag uuuugcaggu uugcauuuca gcguauauau guauaugugg 60  
 cugugcaaa ccaugcaaaa cugauuguga uaaugu 96  
 10  
 <210> 31  
 <211> 71  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 15  
 <400> 31  
 guagcacuaa agugcuuaua gugcagguag uguuuaguua ucuacugcau uaugagcacu 60  
 uaaaguacug c 71  
 20  
 <210> 32  
 <211> 72  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25  
 <400> 32  
 ugucggguag cuuauacagac ugauguugac uguugaauuc cauggcaaca ccagucgaug 60  
 ggcugucuga ca 72  
 30  
 <210> 33  
 <211> 85  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 33  
 35  
 ggcugagccg caguaguucu ucaguggcaa gcuuuauuguc cugacccagc uaaagcugcc 60  
 aguugaagaa cuguugcccu cugcc 85  
 40  
 <210> 34  
 <211> 73  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 34  
 45  
 ggccggcugg gguuccuggg gaugggauuu gcuuccuguc aaaaucaca uugccaggga 60  
 uuuccaaccg acc 73  
 50  
 <210> 35  
 <211> 97  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 35  
 55  
 cucaggugcu cuggcugcuu gguuuccugg caugcugauu ugugacuuaa gauuaaauc 60  
 acauugccag ggauuaccac gcaaccacga ccuuggc 97  
 60  
 <210> 36  
 <211> 68  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 36

cuccggugcc uacugagcug auaucaguuc ucauuuuaca cacuggcuca guucagcagg 60  
aacaggag 68

5 <210> 37  
<211> 73  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 37

cucugccucc cgugccuacu gagcugaaac acaguugguu uguguacacu ggcucaguuc 60  
agcaggaaca ggg 73

15 <210> 38  
<211> 84  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 38

ggccaguguu gagaggcgga gacuugggca auugcuggac gcugcccugg gcauugcacu 60  
ugucucgguc ugacagugcc ggcc 84

25 <210> 39  
<211> 77  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 39

30 guggccucgu ucaaguaauc caggauaggc ugugcagguc ccaaugggcc uauucuuggu 60  
uacuugcacg gggacgc 77

35 <210> 40  
<211> 77  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 40

40 ccgggaccca guucaaguaa uucaggauag guugugugcu guccagccug uucuccauua 60  
cuuggcucgg ggaccgg 77

45 <210> 41  
<211> 84  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 41

50 ggcuguggcu ggauucaagu aauccaggau aggcuguuuc caucugugag gccuauucuu 60  
gauuacuugu uucuggaggc agcu 84

55 <210> 42  
<211> 78  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 42

cugaggagca gggcuuagcu gcuugugagc aggguccaca ccaagucgug uucacagugg 60  
cuaaguuccg ccccccag 78

# ES 2 507 544 T3

<210> 43  
 <211> 97  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 43  
 accucucuaa caaggugcag agcuuagcug auuggugaac agugauuggu uuccgcuuug 60  
 uucacagugg cuaaguucug caccugaaga gaaggug 97  
 10  
 <210> 44  
 <211> 86  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 15  
 <400> 44  
 gguccuugcc cucaaggagc ucacagucua uugaguuaac uuucugacuu ucccacuaga 60  
 uugugagcuc cuggagggca ggcacu 86  
 20  
 <210> 45  
 <211> 64  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25  
 <400> 45  
 augacugauu ucuuuuggug uucagaguca auauauuuuu cuagcaccau cugaaaucgg 60  
 uuau 64  
 30  
 <210> 46  
 <211> 81  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 35  
 <400> 46  
 cuucaggaag cugguuucau auggugguuu agauuuuuuu agugauuguc uagcaccauu 60  
 ugaaaucagu guucuuuggg g 81  
 40  
 <210> 47  
 <211> 81  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 45  
 <400> 47  
 cuucuggaag cugguuucac augguggcuu agauuuuuucc aucuuuguau cuagcaccau 60  
 uugaaaucag uguuuuagga g 81  
 50  
 <210> 48  
 <211> 88  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 55  
 <400> 48  
 aucucuuaa caggcugacc gauuucuccu gguguucaga gucuguuuuu gucuagcacc 60  
 auuugaaauc gguuaugaug uaggggga 88  
 60  
 <210> 49  
 <211> 71  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

# ES 2 507 544 T3

<400> 49

gcgacuguaa acauccucga cuggaagcug ugaagccaca gaugggcuuu cagucggaug 60  
uuugcagcug c 71

5 <210> 50  
<211> 72  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 50

agauacugua aacauccuac acucucagcu guggaaagua agaaagcugg gagaaggcug 60  
uuuacucuuu cu 72

15 <210> 51  
<211> 70  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 51

guuguuguaa acauucccga cuggaagcug uaagacacag cuaagcuuuc agucagaugu 60  
uugcugcuac 70

25 <210> 52  
<211> 88  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 52

30 accaaguuuu aguucaugua aacauccuac acucagcugu aauacaugga uuggcuggga 60  
gguggauguu uacuucagcu gacuugga 88

35 <210> 53  
<211> 89  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 53

40 accaugcugu agugugugua aacauccuac acucucagcu gugagcucaa gguggcuggg 60  
agagguugu uuacuccuuc ugccaugga 89

45 <210> 54  
<211> 64  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 54

cuguaaaca ccuugacugg aagcuguaag guguucagag gagcuuucag ucggauguuu 60  
acag 64

50 <210> 55  
<211> 71  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

55 <400> 55

ggagaggagg caagaugcug gcauagcugu ugaacuggga accugcuauug ccaacauuuu 60  
gccaucuuuc c 71

# ES 2 507 544 T3

<210> 56  
 <211> 70  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 56  
 ggagauauug cacauuacua aguugcaugu ugucacggcc ucaaugcaau uuagugugug 60  
 ugauauuuuc 70  
 10  
 <210> 57  
 <211> 69  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 15  
 <400> 57  
 cuguggugca uuguaguugc auugcauguu cuggugguac ccaugcaaug uuuccacagu 60  
 gcaucacag 69  
 20  
 <210> 58  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25  
 <400> 58  
 ggccagcugu gaguguuucu uuggcagugu cuuagcuggu uguugugagc aauaguaagg 60  
 aagcaaucag caaguauacu gcccuagaag ugcugcacgu uguggggcc 110  
 30  
 <210> 59  
 <211> 84  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 59  
 35  
 gugcucgguu uguaggcagu gucauuagcu gauuguacug uggugguuac aaucacuaac 60  
 uccacugcca ucaaaaacaag gcac 84  
 40  
 <210> 60  
 <211> 77  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 60  
 45  
 agucuaguua cuaggcagug uaguuagcug auugcuaaua guaccaauca cuaaccacac 60  
 ggccagguaa aaagauu 77  
 50  
 <210> 61  
 <211> 78  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 61  
 55  
 cuuucuaacac agguugggau cgguugcaau gcuguguuuc uguaugguau ugcacuuguc 60  
 ccggccuguu gaguuugg 78  
 60  
 <210> 62  
 <211> 75  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 62

ucauuccugg guggggauuu guugcauuac uuguguucua uauaaaguau ugcacuuguc 60  
ccggccugug gaaga 75

5 <210> 63  
<211> 80  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 63

cuggggguc caaagugcug uucgugcagg uagugugauu acccaaccua cugcugagcu 60  
agcacuuccc gagcccccg 80

15 <210> 64  
<211> 81  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 64

aacacagugg gcacucaaua aaugucuguu gaauugaaau gcguuacauu caacggguau 60  
uuauugagca cccacucugu g 81

25 <210> 65  
<211> 78  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 65

30 uggccgauuu uggcacuagc acauuuuugc uugugucucu ccgcucugag caaucaugug 60  
cagugccaau augggaaa 78

35 <210> 66  
<211> 80  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 66

40 gugagguagu aaguuguauu guuguggggg agggauauua ggccccauu agaagauaac 60  
uauacaacuu acuacuuucc 80

45 <210> 67  
<211> 81  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 67

ccc auuggca uaaacccgua gaucggaucu uguggugaag uggaccgcac aagcucgcuu 60  
cuauugggucu gugucagugu g 81

50 <210> 68  
<211> 70  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

55 <400> 68

ggcaccacc cguagaaccg accuugcggg gccuucgccg cacacaagcu cgugucugug 60  
gguccguguc 70

<210> 69  
 <211> 80  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 69  
 ccuguugcca caaaccgua gauccgaacu ugugguauua guccgcacaa gcuuguaucu 60  
 auagguaugu gucuguuagg 80  
 10  
 <210> 70  
 <211> 75  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 15  
 <400> 70  
 ugcccuggcu caguuaucac agugcugaug cugucuauuc uaaagguaca guacugugau 60  
 aacugaagga uggca 75  
 20  
 <210> 71  
 <211> 79  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25  
 <400> 71  
 acuguccuuu uucgguuauc augguaccga ugcuguauau cugaaaggua caguacugug 60  
 auaacugaag aaugguggu 79  
 30  
 <210> 72  
 <211> 78  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 72  
 35  
 uugugcuuuc agcuucuuua cagugcugcc uuguagcauu caggucaagc agcauuguac 60  
 agggcuauga aagaacca 78  
 40  
 <210> 73  
 <211> 78  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 73  
 45  
 uacugcccuc ggcuucuuua cagugcugcc uuguugcaua uggaucaagc agcauuguac 60  
 agggcuauga aggcauug 78  
 50  
 <210> 74  
 <211> 81  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 74  
 55  
 ugugcaucgu ggucaaaugc ucagacuccu gugguggcug cucaugcacc acggauguuu 60  
 gagcaugugc uacggugucu a 81  
 <210> 75  
 <211> 81  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 75

ugugcaucgu ggucaaaugc ucagacuccu gugguggcug cuuaugcacc acggauguuu 60  
gagcaugugc uauuggugucu a 81

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

10 <400> 76

ccuuggccau guaaaagugc uuacagugca gguagcuuuu ugagaucuaac ugcaauguaa 60  
gcacuucuaa cauuaccaug g 81

15 <210> 77  
<211> 82  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 77

ccugccgggg cuaaagugcu gacagugcag auaguggucc ucuccgugcu accgcacugu 60  
ggguacuugc ugcuccagca gg 82

25 <210> 78  
<211> 81  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 78

30 cucucugcuu ucagcuucuu uacaguguug ccuuguggca uggaguuaa gcagcauugu 60  
acagggcuau caaagcacag a 81

35 <210> 79  
<211> 85  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 79

40 ccuuaagcaga gcuguggagu gugacaaugg uguuuguguc uaaacuauc aacgccauua 60  
ucacacuaaa uagcuacugc uaggc 85

45 <210> 80  
<211> 85  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 80

aggccucucu cuccguguuc acagcggacc uugauuuaaa uguccauaca auuaaggcac 60  
gcggugaaug ccaagaauagg ggcug 85

50 <210> 81  
<211> 109  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

55 <400> 81

aucaagauua gaggcucugc ucuccguguu cacagcggac cuugauuuua ugucauaaca 60  
uuaggcacg cggugaaugc caagagcgga gccuacggcu gcacuugaa 109

<210> 82  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 82  
 ugagggcccc ucugcguguu cacagcggac cuugauuuuaa ugucuauaca auuaaggcac 60  
 gcggugaaug ccaagagagg cgccucc 87  
 10  
 <210> 83  
 <211> 88  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 15  
 <400> 83  
 ugcgcuccuc ucagucccug agaccuaac uugugauguu uaccguuuuaa auccacgggu 60  
 uaggcucuug ggagcugcga gucgugcu 88  
 20  
 <210> 84  
 <211> 86  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25  
 <400> 84  
 ugccagucuc uagguccug agaccuuua accugugagg acauccaggg ucacagguga 60  
 gguucuuggg agccuggcgu cuggcc 86  
 30  
 <210> 85  
 <211> 89  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 35  
 <400> 85  
 accagacuuu uccuaguccc ugagaccua acuugugagg uauuuuagua acaucacaag 60  
 ucaggcucu ugggaccuagg cggagggga 89  
 40  
 <210> 86  
 <211> 85  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 45  
 <400> 86  
 cgcuggcgac gggacauuau uacuuuuggu acgcgcugug acacuucaaa cucguaccgu 60  
 gaguaauaau gcgccgucca cggca 85  
 50  
 <210> 87  
 <211> 97  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 55  
 <400> 87  
 ugugaucacu gucuccagcc ugcugaagcu cagagggcuc ugauucagaa agaucaucgg 60  
 auccgucuga gcuuggcugg ucggaagucu caucauc 97  
 55  
 <210> 88  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 88  
 ugagcuguug gauucggggc cguagcacug ucugagaggu uuacauuucu cacagugaac 60  
 cggucucuuu uucagcugcu uc 82

5 <210> 89  
 <211> 84  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 89  
 ugugcagugg gaaggggggc cgauacacug uacgagagug aguagcaggu cucacaguga 60  
 accggucucu uucccuacug uguc 84

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

20 <400> 90  
 ugcccuucgc gaauuuuuu gcgguucugg cuugcuguac auaacucaau agccggaagc 60  
 ccuuacccca aaaagcauuu gcggaaggcg 90

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

<400> 91  
 ugcugcuggc cagagcucuu uucacauugu gcuacugucu gcaccuguca cuagcagugc 60  
 aauguuaaaa gggcauuggc cguguagug 89

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

35 <400> 92  
 ggccugcccg acacucuuuc ccuguugcac uacuauaggc cgcugggaag cagugcaaug 60  
 augaaagggc aucggucagg uc 82

40 <210> 93  
 <211> 101  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 93  
 ccgccccgc gucuccaggg caaccguggc uuucgauugu uacuguggga acuggaggua 60  
 acagucuaca gccauggucg ccccgagca cgcccacgcg c 101

50 <210> 94  
 <211> 88  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

55 <400> 94  
 acaaugcuuu gcuagagcug guaaaaugga accaaaucgc cucuucuaug gauuuggucc 60  
 ccuucaccca gcuguagcua ugcauuga 88

<210> 95  
 <211> 102  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 95  
 gggagccaaa ugcuuugcua gagcugguua aauggaacca aaucgacugu ccaauggauu 60  
 ugguccccuu caaccagcug uagcugugca uugauggcgc cg 102  
 10  
 <210> 96  
 <211> 119  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 15  
 <400> 96  
 ccucagaaga aagaugcccc cugcucuggc uggucaaaacg gaaccaaguc cgucuuccug 60  
 agagguuugg ucccccuaaa ccagcuacag cagggcuggc aaugcccagu ccuuggaga 119  
 20  
 <210> 97  
 <211> 73  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25  
 <400> 97  
 cagggugugu gacugguuga ccagaggggc augcacugug uucaccugug gggccaccua 60  
 gucaccaacc cuc 73  
 30  
 <210> 98  
 <211> 90  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 98  
 35  
 aggccucgcu guucucuaug gcuuuuuuuu ccuaugugau ucuacugcuc acucauauag 60  
 ggauuggagc cguggcgcac ggcggggaca 90  
 40  
 <210> 99  
 <211> 100  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 99  
 45  
 agauaaaauuc acucuagugc uuuauaggcuu uuauuuccua ugugauagua auaaagucuc 60  
 auguagggau ggaagccaug aaauacauug ugaaaaauca 100  
 50  
 <210> 100  
 <211> 97  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 100  
 55  
 cacucugcug uggccuaugg cuuuucauuc cuaugugauu gcugucccaa acucauguag 60  
 ggcuaaaaagc caugggcuac agugaggggc gagcucc 97  
 <210> 101  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 101

ugagcccucg gaggacucca uuuguuuuga ugauggauuc uuaugcucca ucaucgucuc 60  
aaaugagucu ucagaggguu cu 82

5 <210> 102  
<211> 102  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 102

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

15 <210> 103  
<211> 84  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 103

cguugcugca gcugguguug ugaauacggc cgacgagcag cgcauccucu uacccggcua 60  
uuucacgaca ccaggguugc auca 84

25 <210> 104  
<211> 99  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 104

30 cccuggcaug gugugguggg gcagcuggug uugugaauc ggccguugcc aaucagagaa 60  
cggcuacuuc acaacaccag ggccacacca cacuacagg 99

35 <210> 105  
<211> 68  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 105

40 guguaauua cagugcacgu gucuccagug uggcucggag gcuggagacg cggcccuguu 60  
ggaguaac 68

45 <210> 106  
<211> 100  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 106

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

50 <210> 107  
<211> 95  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

55 <400> 107

cggccggccc uggguccauc uuccaguaca guguggaug gucuauugu gaagcuccua 60  
acacugucug guaaagaugg cucccgggug gguuc 95

<210> 108  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5 <400> 108  
 gacagugcag ucacccauaa aguagaaagc acuacuaaca gcacuggagg gugugaguu 60  
 uccuacuuua uggaugagug uacugug 87  
 10 <210> 109  
 <211> 106  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 15 <400> 109  
 gcgcagcgcc cugucuccca gccugaggug cagugcugca ucucugguca guugggaguc 60  
 ugagaugaag cacuguagcu caggaagaga gaaguuguuc ugcagc 106  
 20 <210> 110  
 <211> 86  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25 <400> 110  
 uggggcccg gcugggauau caucauauac uguaaguug cgaugagaca cuacaguaua 60  
 gaugauguac uaguccgggc accccc 86  
 30 <210> 111  
 <211> 88  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 111  
 35 caccuugucc ucacggucca guuuucccag gaaucccuua gaugcuaaga uggggauucc 60  
 uggaauacu guucuugagg ucaugguu 88  
 40 <210> 112  
 <211> 99  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 112  
 45 ccgaugugua uccucagcuu ugagaacuga auuccauggg uugugucagu gucagaccuc 60  
 ugaaaauucag uucuucagcu gggauaucuc ugucaucgu 99  
 50 <210> 113  
 <211> 72  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 113  
 55 aaucuaaaga caacauuucu gcacacacac cagacuauagg aagccagugu guggaaaugc 60  
 uucugcuaga uu 72

<400> 114

gaggcaaagu ucugagacac uccgacucug aguaugauag aagucagugc acuacagaac 60  
uuugucuc 68

5 <210> 115  
<211> 99  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 115

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

15 <210> 116  
<211> 89  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 116

gccggcgccc gagcucuggc uccgugucuu cacucccgug cuuguccgag gagggagggg 60  
gggacggggg cugugcuggg gcagcugga 89

25 <210> 117  
<211> 84  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 117

30 cuccccaugg cccugucucc caaccuuugu accagugcug ggcucagacc cugguacagg 60  
ccuggggggac agggaccugg ggac 84

35 <210> 118  
<211> 90  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 118

40 uuuccugccc ucgaggagcu cacagucuag uaugucucau ccccuacuag acugaagcuc 60  
cuugaggaca gggauugguca uacucaccuc 90

45 <210> 119  
<211> 87  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 119

ugucuuuuuu ggcccagguu cugugauaca cuccgacucg ggcucuggag cagucagugc 60  
augacagaac uugggcccgg aaggacc 87

50 <210> 120  
<211> 90  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

55 <400> 120

cucacagcug ccagugucau uuuuugauuc ugcagcuagu auucucacuc caguugcaua 60  
gucacaaaag ugaucuuugg cagguguggc 90

<210> 121  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 121  
 agcgguggcc agugucuuu uugugauguu gcagcuagua auaugagccc aguugcauag 60  
 ucacaaaagu gaucauugga aacugug 87  
 10  
 <210> 122  
 <211> 84  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 15  
 <400> 122  
 gugguacuug aagauagguu auccguguug ccuucgcuuu auuugugacg aaucauacac 60  
 gguugaccua uuuuucagua ccaa 84  
 20  
 <210> 123  
 <211> 65  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25  
 <400> 123  
 cuguuaauggc uaaucgugau agggguuuuu gccuccaacu gacuccuaca uauuagcauu 60  
 aacag 65  
 30  
 <210> 124  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 124  
 35  
 agaagggcua ucaggccagc cuucagagga cuccaaggaa cauucaacgc ugucggugag 60  
 uuugggauuu gaaaaaacca cugaccguug acuguaccuu gggguccuuu 110  
 40  
 <210> 125  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 125  
 45  
 ccugugcaga gauuauuuuu uaaaaggguca caaucaacau ucauugcugu cgguggguug 60  
 aacugugugg acaagcucac ugaacaauga augcaacugu ggccccgcuu 110  
 50  
 <210> 126  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 126  
 55  
 cggaauuuu gccaaagguu ugggggaaca uucaaccugu cggugaguuu gggcagcuca 60  
 ggcaaaccau cgaccguuga guggaccug aggccuggaa uugccaucuu 110  
 <210> 127  
 <211> 89  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

# ES 2 507 544 T3

<400> 127

cugauggcug cacucaacau ucauugcugu cgguggguuu gagucugaau caacucacug 60  
aucaaugaau gcaaacugcg gaccaaaca 89

5 <210> 128  
<211> 110  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 128

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

15 <210> 129  
<211> 110  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 129

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

25 <210> 130  
<211> 84  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 130

30 ccagucacgu ccccuuauca cuuuuccagc ccagcuuugu gacuguaagu guuggacgga 60  
gaacugauaa ggguaagguga uuga 84

35 <210> 131  
<211> 82  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 131

40 agggggcgag ggauuggaga gaaaggcagu uccugauggu cccuCCCCca ggggcuggcu 60  
uuccucuggu ccuucccucc ca 82

45 <210> 132  
<211> 86  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 132

50 ugcuuuaac uuuccaaaga auucuccuuu ugggcuuucu gguuuuuuuu uaagcccaaa 60  
ggugaauuuu uugggaaguu ugagcu 86

55 <210> 133  
<211> 109  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 133

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

# ES 2 507 544 T3

<210> 134  
 <211> 86  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 134  
 ugcucccucu cucacauccc uugcauggug gagggugagc uuucugaaaa ccccucccac 60  
 augcagggguu ugcaggaugg cgagcc 86  
 10  
 <210> 135  
 <211> 85  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 15  
 <400> 135  
 ugcaggccuc ugugugauau guuugauaua uuagguuguu auuuaucca acuaauauac 60  
 aaacauauuc cuacaguguc uugcc 85  
 20  
 <210> 136  
 <211> 92  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25  
 <400> 136  
 cggcuggaca gcgggcaacg gaaucccaa agcagcuguu gucuccagag cauuccagcu 60  
 gcgcuuggau uucgucccu gcucuccugc cu 92  
 30  
 <210> 137  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 137  
 gccgagaccg agugcacagg gcucugaccu augaaugac agccagugcu cucgucuccc 60  
 cucuggcugc caauuccaau ggucacaggu auguucgccu caaugccagc 110  
 35  
 <210> 138  
 <211> 88  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 40  
 <400> 138  
 cgaggauagg agcugagggc ugggucuuug cgggcgagau gagggugucg gaucaacugg 60  
 ccuacaaagu cccaguucuc ggcccccg 88  
 45  
 <210> 139  
 <211> 85  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 50  
 <400> 139  
 augguguuau caaguguaac agcaacucca uguggacugu guaccaauuu ccaguggaga 60  
 ugcuguuacu uuugaugguu accaa 85  
 55  
 <210> 140  
 <211> 85  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

# ES 2 507 544 T3

<400> 140

ugguucccg cccuguaac agcaacucca uguggaagug cccacugguu ccaguggggc 60  
 ugcuguuau c uggggcgagg gccag 85

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

10 <400> 141

agcuucccg gcucuagcag cacagaaaua uggcacagg gaagcgaguc ugccaauau 60  
 ggcugugcug cuccaggcag gguggug 87

15 <210> 142  
 <211> 70  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 142

gugaauuagg uaguuucaug uuguugggcc uggguuucug aacacaaca cauuuacaa 60  
 cccgauucac 70

25 <210> 143  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 143

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

35 <210> 144  
 <211> 75  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 144

40 ggcugugccg gguagagagg gcagugggag guaagagcuc uucacccuuc accaccuuc 60  
 ccacccagca uggcc 75

45 <210> 145  
 <211> 62  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 145

50 ucauuggucc agaggggaga uagguuccug ugauuuuucc uucuuucua uagaauaaa 60  
 ga 62

55 <210> 146  
 <211> 71  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 146

gccaacccag uguucagacu accuguucag gaggcucua auguguacag uagucugcac 60  
 auugguuagg c 71

# ES 2 507 544 T3

<210> 147  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 147  
 aggaagcuuc uggagauccu gcuccgucgc cccaguguuc agacuaccug uucaggacaa 60  
 ugccguugua caguagucug cacauugguu agacugggca agggagagca 110  
 10  
 <210> 148  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 15  
 <400> 148  
 ccagaggaca ccuccacucc gucuaccag uguuuagacu aucuguucag gacucccaaa 60  
 uuguacagua gucugcacau ugguuaggcu ggcugggguu agaccucgg 110  
 20  
 <210> 149  
 <211> 95  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25  
 <400> 149  
 ccagcucggg cagccguggc caucuacug ggcagcauug gauggaguca ggucucuaau 60  
 acugccuggu aaugaugacg gcggagcccu gcacg 95  
 30  
 <210> 150  
 <211> 68  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 35  
 <400> 150  
 cccucgucuu acccagcagu guuugggugc gguugggagu cucuaauacu gccggguaau 60  
 gauggagg 68  
 40  
 <210> 151  
 <211> 90  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 45  
 <400> 151  
 ccgggccccu gugagcaucu uaccggacag ugcuggauuu cccagcuuga cucuaacacu 60  
 gucugguaac gauguucaa ggugacccgc 90  
 50  
 <210> 152  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 55  
 <400> 152  
 guguuuuuuu cucgcgcgcg gguuccagug guucuuaaca guucaacagu ucuguagcgc 60  
 aaauuguaaa uguuuaggac cacuagaccc ggcgggcgcg gcgacagcga 110  
 <210> 153  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

# ES 2 507 544 T3

<400> 153

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

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

10           <400> 154

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

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

20           <400> 155

          ugcuucccgga ggccacaugc uucuuuauau ccccauaugg auuacuuugc uauggaaugu 60  
          aaggaagugu gugguuucgg caagug 86

25           <210> 156  
          <211> 71  
          <212> ARN  
          <213> *Homo sapiens*

30           <400> 156

          ugacggggcga gcuuuuggcc cggguuauac cugaugcuca cguauaagac gagcaaaaag 60  
          cuuguugguc a 71

35           <210> 157  
          <211> 110  
          <212> ARN  
          <213> *Homo sapiens*

          <400> 157

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

45           <210> 158  
          <211> 110  
          <212> ARN  
          <213> *Homo sapiens*

          <400> 158

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

55           <210> 159  
          <211> 110  
          <212> ARN  
          <213> *Homo sapiens*

          <400> 159

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

# ES 2 507 544 T3

<210> 160  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 160  
 ugaguuuuga gguugcuuca gugaacauuc aacgcugucg gugaguuugg aaauaaaauc 60  
 aaaaccaucg accguugauu guacccuauug gcuaaccauc aucuacucca 110  
 10  
 <210> 161  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 15  
 <400> 161  
 ggccuggcug gacagaguug ucaugugucu gccugucuac acuugcugug cagaacauc 60  
 gcucaccugu acagcaggca cagacaggca gucacaugac aaccagccu 110  
 20  
 <210> 162  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25  
 <400> 162  
 aucauucaga aaugguauac aggaaaauga ccuaugaaau gacagacaau auagcugagu 60  
 uugucuguca uuucuuuagg ccaauauucu guaugacugu gcuacuucua 110  
 30  
 <210> 163  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 35  
 <400> 163  
 gauggcugug aguuggcuua aucucagcug gcaacuguga gauguucaua caaucccuca 60  
 caguggucuc uggaauuauug cuaaacagag caauuuccua gcccucacga 110  
 40  
 <210> 164  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 164  
 45  
 aguauaaaua uuacauaguu uuugaugucg cagauacugc aucaggaacu gauuggauaa 60  
 gaaucaguca ccaucaguuc cuaaugcauu gccuucagca ucuaaacaag 110  
 50  
 <210> 165  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 165  
 55  
 gugauaauug agcgagauuu ucuguugucg ugaucuaac caugugguug cgagguauga 60  
 guaaaaacug guuccgucaa gcaccaugga acgucacgca gcuuuuacaa 110  
 <210> 166  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 166

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

5 <210> 167  
<211> 110  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 167

ccgccccggg ccgcgggcucc ugauugucca aacgcaauuc ucgagucuaa ggcuccggcc 60  
gagaguugag ucuggacguc ccgagccgcc gcccccacac cucgagcggg 110

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

20 <400> 168

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

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

<400> 169

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

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

<400> 170

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

45 <210> 171  
<211> 110  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 171

50 gcugcuggaa gguguaggua cccucaaugg cucaguagcc aguguagauc cugucuuucg 60  
uaaucagcag cuacaucugc cuacuggguc ucugauggca ucuucucagc 110

55 <210> 172  
<211> 110  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 172

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

# ES 2 507 544 T3

<210> 173  
 <211> 81  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5 <400> 173  
 gggcuucaa gucacuagug guuccguua guagaugauu gugcauuguu ucaaaauggu 60  
 gcccuaguga cuacaaagcc c 81  
 10 <210> 174  
 <211> 80  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 15 <400> 174  
 aggacccuuc cagagggccc ccccucaauc cuguugugcc uauuucagag gguugggugg 60  
 aggcucuccu gaagggcucu 80  
 20 <210> 175  
 <211> 63  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25 <400> 175  
 aagaaauggu uuaccguccc acauacauuu ugaauaugua ugugggaugg uaaaccgcuu 60  
 cuu 63  
 30 <210> 176  
 <211> 86  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 176  
 35 acugcuaacg aaugcucuga cuuuauugca cuacuguacu uuacagcuag cagugcaaua 60  
 guauugucaa agcaucugaa agcagg 86  
 40 <210> 177  
 <211> 69  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 177  
 45 ccaccacuua aacguggaug uacuugcuuu gaaacuaaag aaguaagugc uucauguuu 60  
 uggugaugg 69  
 50 <210> 178  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 178  
 55 gcuucgcucc ccuccgccuu cucuucccg g uucuuucccg agucgggaaa agcuggguug 60  
 agagggcgaa aaaggaugag gu 82  
 <210> 179  
 <211> 59  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

# ES 2 507 544 T3

<400> 179  
 uuggccuccu aagccaggga uugugggguuc gagucccacc cgggguaaag aaaggccga 59

5 <210> 180  
 <211> 86  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 180  
 uugguacuug gagagaggug guccguggcg cguucgcuuu auuuauaggcg cacauuacac 60  
 ggucgaccuc uuugcaguau cuaauc 86

15 <210> 181  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 181  
 cugacuauugc cuccccgc au ccccuagggc auugguguaa agcuggagac ccacugcccc 60  
 agguugcugcu gggggguugua guc 83

25 <210> 182  
 <211> 95  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 182  
 cucaucuguc uguuugggcug gaggcagggc cuuugugaag gcggguggug cucagaucgc 60  
 cucuggggccc uuccuccagc cccgaggcg auuca 95

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

40 <400> 183  
 uggagugggg gggcaggagg ggcucaggga gaaagugcau acagccccug gccucucug 60  
 ccuuuccguc cccug 75

45 <210> 184  
 <211> 94  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 184  
 cuuuggcgau cacugccucu cugggccugu gucuuaggcu cugcaagauc aaccgagcaa 60  
 agcacacggc cugcagagag gcagcgucu gccc 94

55 <210> 185  
 <211> 94  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

60 <400> 185  
 gaguuugguu uuguuugggu uuguucuagg uauuggucca gggaucccag aucaaaccag 60  
 gccccugggc cuauccuaga accaaccuaa gcuc 94

<210> 186

<211> 94  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5 <400> 186  
 uguuuugagc gggggucaag agcaauaacg aaaaauguuu gucauaaacc guuuuucauu 60  
 auugcuccug accuccucuc auuugcuaua uuca 94  
 <210> 187  
 10 <211> 93  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 187  
 15 guagucagua guuggggggu gggaacggcu ucauacagga guugaugcac aguuauccag 60  
 cuccuauaug augccuuucu ucauccccuu caa 93  
 <210> 188  
 <211> 67  
 20 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 188  
 25 ucuccaaca uauccuggug cugagugaug acucaggcga cuccagcauc agugauuuug 60  
 uugaaga 67  
 <210> 189  
 <211> 94  
 <212> ARN  
 30 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 189  
 cggggcgggc gcucucccug uccuccagga gcucacgugu gccugccugu gagcgccucg 60  
 acgacagagc cggcgccugc cccagugucu gcgc 94  
 35 <210> 190  
 <211> 95  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 40 <400> 190  
 uuguaccugg ugugauuaua aagcaaugag acugauuguc auaugucguu ugugggaucc 60  
 gucucaguua cuuuauagcc auaccuggua ucuua 95  
 45 <210> 191  
 <211> 99  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 50 <400> 191  
 gaaacugggc ucaaggugag gggugcuauc ugugauugag ggacaugguu aauggaauug 60  
 ucucacacag aaaucgaccc cgucaccuug gccuacuua 99  
 55 <210> 192  
 <211> 77  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 192

gcuugggaca cauacuucuu uauaugccca uaugaaccug cuaagcuaug gaauguaaag 60  
aaguauguau uucaggc 77

<210> 193  
<211> 72  
5 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 193

10 ucagagcaca uacuucuuua uguacccaaua ugaacauuca gugcuaugga auguaaagaa 60  
guauguauuu ug 72

<210> 194  
<211> 88  
15 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 194

20 ccaggcugag guaguaguuu guacaguuuug agggucuaug auaccacccg guacaggaga 60  
uaacuguaca ggccacugcc uugccagg 88

<210> 195  
<211> 85  
25 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 195

30 cuggcugagg uaguaguuuug ugcuguuggu cggguuguga cauugcccg uguggagaua 60  
acugcgcaag cuacugccuu gcuag 85

<210> 196  
<211> 103  
35 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 196

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

<210> 197  
<211> 94  
45 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 197

50 uucacugugg gaugagguag uagguuguau aguuuuaggg ucacaccac cacugggaga 60  
uaacuauaca aucuacuguc uuuccuaagg ugau 94

<210> 198  
<211> 96  
55 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 198

55 cugcauguuc ccagguugag guaguagguu guauaguuuu gaguuacauc aaggagagau 60  
acuguacagc cuccuagcuu uccuugggac uugcac 96

<210> 199

<211> 85  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5 <400> 199  
 gcagggugag guaguagguu gugugguuuc agggcaguga uguugcccu ccgaagauaa 60  
 cuauacaacc uacugccuuc ccuga 85  
 <210> 200  
 10 <211> 94  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 200  
 15 ugugugcauc cggguugagg uaguagguug uauuuuuag aguacaccc ugggaguuaa 60  
 cuguacaacc uucuagcuu ccuuggagca cacu 94  
 <210> 201  
 <211> 95  
 20 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 201  
 acggccuuug gggugaggua guagguugua ugguuuuggg cucugcccg cucugcggua 60  
 25 acuauacaau cuacugucu uccugaagug gccgc 95  
 <210> 202  
 <211> 93  
 <212> ARN  
 30 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 202  
 cgcgccccc gggcugaggu aggagguugu auaguugagg aagacacccg aggagauac 60  
 35 uauacggccu ccuagcuuuc cccaggcugc gcc 93  
 <210> 203  
 <211> 89  
 <212> ARN  
 40 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 203  
 aucagaguga gguaguagau uguauaguug uggguuagug auuuuacccu guuuaggaga 60  
 45 uaacuauaca aucuauugcc uucccugag 89  
 <210> 204  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 50 <400> 204  
 ugugggauga gguaguagau uguauaguuu uagggucaua ccccaucuug gagauaacua 60  
 uacagucuac ugucuuccc acg 83  
 <210> 205  
 55 <211> 108  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 205

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

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

<400> 206

ggucggggcca gccccguuug gaagacuagu gaaaauguug uugugucucu guauccaaca 60  
acaaguccca gucugccaca uggugcuggu cauuuca 97

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

<400> 207

aggagcggag uacgugagcc agugcuauu ggaagacuug ugauuuuguu guucugauau 60  
gauaugacaa caagucacag ccagccucau agcguggacu ccuaucccu u 111

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

<400> 208

guuguuauucu uugguuauucu agcuguauga guguaauuggu cuucauaaag cuagauaacc 60  
gaaaguaaaa ac 72

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

<400> 209

cgggguuggu uguuauuuu gguuauucuag cuguaugagu gguguggagu cuucauaaag 60  
cuagauaacc gaaaguaaaa auaacccca 89

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

<400> 210

ggaggcccggu uucucucuuu gguuauucuag cuguaugagu gccacagagc cgucauaaag 60  
cuagauaacc gaaaguagaa augacucuca 90

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

<400> 211

uauauacccu guagaaccga auuugugugg uaccacaua gucacagauu cgauucuagg 60  
ggaauaua 68

<210> 212

# ES 2 507 544 T3

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

5      <400> 212

gaucugucug ucuucuguau auacccugua gauccgaauu uguguaagga auuuuguggu 60  
 caaaaauucg uaucuagggg aaauuguagu ugacauaaac acuccgcuca 110

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

10

<400> 213

15

gaccugucug ucuucuguau auacccugua gauccgaauu uguguaagga auuuuguggu 60  
 caaaaauucg uaucuagggg aaauuguagu ugacauaaac acuccgcuca 110

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

20

<400> 214

cuguagcagc acaucauggu uuacauacua cagucaagau gcgaaucauu auuugcugcu 60  
 cuag 64

25

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

30

<400> 215

cccuuggagu aaaguagcag cacauaaugg uuuguggaug uugaaaaggu gcaggccaua 60  
 cugugcugcc ucaaaauaca agga 84

35

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

40

<400> 216

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

45

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

50

<400> 217

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

55

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

<400> 218

gucagaauaa ugucaaagug cuuacagugc agguagugau gugugcaucu acugcaguga 60  
gggcacuugu agcauuauugc ugac 84

5 <210> 219  
<211> 96  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 219

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

15 <210> 220  
<211> 84  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 220

acuuacgauu aguuuugcag auuugcaguu cagcguauau gugaauauau ggcugugcaa 60  
auccaugcaa aacugauugu ggga 84

25 <210> 221  
<211> 82  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 221

30 gcagcccucu guuaguuuug cauaguugca cuacaagaag aauguaguug ugcaaaucua 60  
ugcaaaacug augguggccu gc 82

35 <210> 222  
<211> 87  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 222

40 cacuggucua ugguuaguuu ugcagguuug cauccagcug uauaaauuuc ugcugugcaa 60  
auccaugcaa aacugacugu gguggug 87

45 <210> 223  
<211> 107  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 223

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

50 <210> 224  
<211> 92  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

55 <400> 224

uguaccaccu ugucggauag cuuacagac ugauguugac uguugaauuc cauggcaaca 60  
gcagucgaug ggcugucuga cauuuuggua uc 92

# ES 2 507 544 T3

<210> 225  
 <211> 95  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 225  
 accugggcuga gccgcaguag uucuucagug gcaagcuuuu uguccugacc cagcuaaagc 60  
 ugccaguuga agaacuguug cccucugccc cuggc 95  
 10  
 <210> 226  
 <211> 74  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 15  
 <400> 226  
 ggcugcuugg guuccuggca ugcugauuug ugacuugaga uuaaaucac auugccaggg 60  
 auuaccacgc aacc 74  
 20  
 <210> 227  
 <211> 75  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25  
 <400> 227  
 cggacggcug ggguuuccugg ggaugggauu ugaugccagu caaaaucac auugccaggg 60  
 auuuccaacu gaccc 75  
 30  
 <210> 228  
 <211> 68  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 35  
 <400> 228  
 cuccggugcc uacugagcug auaucaguuc ucauuucaca cacuggcuca guucagcagg 60  
 aacaggag 68  
 40  
 <210> 229  
 <211> 107  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 229  
 gccucucucc gggcuccgcc ucccuguccu acugagcuga aacaguugau uccagugcac 60  
 45  
 uggcucaguu cagcaggaac aggaguccag cccccuagga gcuggca 107  
 50  
 <210> 230  
 <211> 84  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 230  
 ggccaguguu gagaggcgga gacuugggca auugcuggac gcugcccugg gcauugcacu 60  
 55  
 ugucucgguc ugacagugcc ggcc 84  
 <210> 231  
 <211> 90  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 231

aaggccgugg ccucguuca gaaauccagg auaggcugug caggucccaa ggggccuauu 60  
cuugguuacu ugcacgggga cgcgggccug 90

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

10 <400> 232

ugccccgggac ccaguucaag uaaauccagga uagguugugg ugcugaccag ccuguucucc 60  
auuacuuggc ucggggggccg gugcc 85

15 <210> 233  
<211> 84  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 233

ggcugcgguu ggauucaagu aauccaggau aggcuguguc cguccaugag gccuguucuu 60  
gauuacuugu uucuggaggc agcg 84

25 <210> 234  
<211> 73  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 234

30 aggugcagag cuuagcugau uggugaacag ugauugguuu ccgcuuuguu cacaguggcu 60  
aaguucugca ccu 73

35 <210> 235  
<211> 87  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 235

40 uggccugagg agcaggggcuu agcugcuugu gagcaagguc cacagcaaag ucguguucac 60  
aguggcuaag uuccgcccc uggaccc 87

45 <210> 236  
<211> 86  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 236

ggucccuacc uucaaggagc ucacagucua uugaguugcc uuucugauuc ucccacuaga 60  
uugugagcug cuggaggga ggcacu 86

50 <210> 237  
<211> 71  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

55 <400> 237

aggaagcugg uuucauauug ugguuuagau uaaaauagug auugucuagc accauuugaa 60  
aucaguguuc u 71

# ES 2 507 544 T3

<210> 238  
 <211> 88  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5 <400> 238  
 accccuuaga ggaugacuga uuucuuuugg uguucagagu caauagaauu uucuaagcacc 60  
 aucugaaauc gguuaauaug auugggga 88  
 10 <210> 239  
 <211> 88  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 15 <400> 239  
 aucucuuaa caggcugacc gauuucuccu gguguucaga gucuguuuuu gucuagcacc 60  
 auuugaaauc gguuaugaug uaggggga 88  
 20 <210> 240  
 <211> 81  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25 <400> 240  
 cuucuggaag cugguuucac augguggcuu agauuuuucc aucuuuguau cuagcacc 60  
 uugaaaucag uguuuuagga g 81  
 30 <210> 241  
 <211> 71  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 35 <400> 241  
 gcgacuguaa acauccucga cuggaagcug ugaagccaca aaugggcuuu cagucggau 60  
 uuugcagcug c 71  
 40 <210> 242  
 <211> 60  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 242  
 auguaaaca cuacacuca gcugucauac augcguuggc uggaugugg auguuuacgu 60  
 45 <210> 243  
 <211> 64  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 50 <400> 243  
 cuguaaaca ccuugacugg aagcuguaag guguuagag gagcuuucag ucggauguuu 60  
 acag 64  
 55 <210> 244  
 <211> 89  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 60 <400> 244

accauguugu agugugugua aacauccuac acucucagcu gugagcucaa gguggcuggg 60  
 agagggguugu uuacuccuuc ugccaugga 89

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

5

gagugacaga uauuguaaac auccuacacu cucagcugug aaaaguaaga aagcugggag 60  
 aaggcuguuu acucucucug ccuu 84

10

<210> 246  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 246

15

aagucugugu cuguaaacau ccccgacugg aagcuguaag ccacagccaa gcuuucaguc 60  
 agauguuugc ugcucacuggc uc 82

20

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

25

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

30

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

35

ggagauauug cacauuacua aguugcaugu ugucacggcc ucaaugcaau uuagugugug 60  
 ugauauuuuc 70

40

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

45

cuguggugca uuguaguugc auugcauguu cuggcaauac cugugcaaug uuuccacagu 60  
 gcaucacgg 69

50

<210> 250  
 <211> 77  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 250

55

agucuaguua cuaggcagug uaguuagcug auugcuaaua guaccaauca cuaaccacac 60  
 agccagguaa aaagacu 77

<210> 251

# ES 2 507 544 T3

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

5 <400> 251

gugcucgguu uguaggcagu gaaauuagcu gauuguagug cggugcugac aaucacuaac 60  
 uccacugcca ucaaaaacaag gcac 84

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

10

<400> 252

15

ccagcuguga gaaauucuuu ggcagugucu uagcugguug uugugaguau uagcuaagga 60  
 agcaaucagc aaguauacug ccuagaagu gcugcacauu gu 102

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

20

<400> 253

ugcccauuc uccacaggug gggauuggug gcauuacuug uguuagauau aaaguauugc 60  
 acuugucccg gccugaggaa gaaagaggg u 91

25

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

30

<400> 254

cuuucuaac agguugggau uugucgcau gcuguguuuc ucugauggu auugcacuug 60  
 ucccggccug uugaguugg 80

35

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

40

<400> 255

agucaugggg gcuccaaagu gcuguucgug cagguagugu aaauaccuga ccuacugcug 60  
 agcuagcacu ucccagagccc ccaggaca 88

45

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

50

<400> 256

ccaguacc au cugcuuggcc gaaauuggca cuagcacauu uuugcuugug ucucuccgcu 60  
 gugagcauc auguguagug ccaauauggg aaaagcgggc ugcugc 106

55

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

<400> 257

gugagguagu aaguuguauu guuguggguu agggauuuua ggccccagua agaagauaac 60  
uauacaacuu acuacuuucc 80

5

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

10

<400> 258

cauaaaccg uagauccgau cuugugguga aguggaccgc gcaagcucgu uucuaugggu 60  
cugug 65

15

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

20

<400> 259

ggcaccacc cguagaaccg accuugcggg gccuucgccg cacacaagcu cgugucugug 60  
gguccguguc 70

25

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

30

<400> 260

ccuguugcca caaaccgua gauccgaacu ugugcugauu cugcacacaa gcuugugucu 60  
auagguaugu gucuguuagg 80

35

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

40

<400> 261  
ucaguuauc cagugcugau gcuguccauu cuaaagguac aguacuguga uacuga 57

45

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

<400> 262

aucugagacu gaacugcccu uuuucggua ucaugguacc gaugcuguag cucugaaagg 60  
uacaguacug ugauagcuga agauggcgg ugccauc 97

50

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

55

<400> 263

uucuuacugc ccucggcuuc uuuacagugc ugccuuguug cauauggauc aagcagcauu 60  
guacagggcu augaaggcau ugagac 86

<210> 264

# ES 2 507 544 T3

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

5      <400> 264

        gucuucgugc uuucagcuuc uuucacagugc ugccuuguag cauucagguc aagcagcauu 60  
         guacagggcu augaaagaac caagaa 86

10      <210> 265  
 <211> 65  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

15      <400> 265

        augucaaaagu gcuaacagug cagguagcuu uuugaguucu acugcagugc cagcacuucu 60  
         uacau 65

20      <210> 266  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

25      <400> 266

        ccugcuggga cuaaagugcu gacagugcag auaguggucc ucucugugcu accgcacugu 60  
         ggguacuugc ugcuccagca gg 82

30      <210> 267  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

35      <400> 267

        uucucugugc uuucagcuuc uuucacagugu ugccuugugg cauggaguuc aagcagcauu 60  
         guacagggcu aucaaagcac agagagc 87

40      <210> 268  
 <211> 66  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

45      <400> 268

        agcuguggag ugugacaau guguuugugu ccaaaccauc aaacgccauu auctacacuaa 60  
         auagcu 66

50      <210> 269  
 <211> 68  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

55      <400> 269

        cucugcgugu ucacagcgga ccuugauuuu augucuauac aaauaaggca cgcggugaau 60  
         gccaaagag 68

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

<400> 270

aggccucucu cuccguguuc acagcggacc uugauuuaaa uguccauaca auuaaggcac 60  
gcggugaaug ccaagaauagg ggcug 85

5 <210> 271  
<211> 109  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 271

aucaagauca gagacucugc ucuccguguu cacagcggac cuugauuuuaa ugucauacaa 60  
uuuaggcacg cggugaaugc caagagcgga gccuacggcu gcacuugaa 109

15 <210> 272  
<211> 68  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 272

cugggucccu gagacccuuu aaccugugag gacguccagg gucacaggug agguucuugg 60  
gagccugg 68

25 <210> 273  
<211> 71  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 273

30 gccuaguccc ugagaccua acugugagg uuuuuuagua acaucacaag ucagguucuu 60  
gggaccuagg c 71

35 <210> 274  
<211> 77  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 274

40 ugcgcucucc ucagucccug agaccuaac uugugauguu uaccguuuua auccacgggu 60  
uaggcucuug ggagcug 77

45 <210> 275  
<211> 73  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 275

50 ugacagcaca uuauuacuuu ugguacgcgc ugugacacuu caaacucgua ccgugaguua 60  
uaaUGCgcgg uca 73

55 <210> 276  
<211> 70  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 276

ccagccugcu gaagcucaga gggcucugau ucagaaagau caucggaucc gucugagcuu 60  
ggcuggucgg 70

<210> 277  
 <211> 70  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5 <400> 277  
 guuggauucg gggccguagc acugucugag agguuuacau uucucacagu gaaccggucu 60  
 cuuuuucagc 70  
 10 <210> 278  
 <211> 76  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 15 <400> 278  
 cagugggaag gggggccgau gcacuguaag agagugagua gcaggucuca cagugaaccg 60  
 gucucuuuucc cuacug 76  
 20 <210> 279  
 <211> 73  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25 <400> 279  
 uggaucuuuu ugcggucugg gcuugcuguu cucucgacag uagucaggaa gcccuuaccc 60  
 caaaaaguau cua 73  
 30 <210> 280  
 <211> 90  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 280  
 35 ugccuuucgc gaauuuuuu gcggucuggg cuugcuguac auaacucaau agccggaagc 60  
 ccuuacccca aaaagcauuc gcggagggcg 90  
 40 <210> 281  
 <211> 64  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 281  
 45 gagcucuuiu cacauugugc uacugucuaa cguguaccga gcagugcaau guaaaaaggg 60  
 cauc 64  
 50 <210> 282  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 282  
 55 ggcuuguugg acacucuuc ccuguugcac uacugugggc cucugggaag cagugcaaug 60  
 augaaagggc aucugucggg cc 82  
 <210> 283  
 <211> 66  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 283

gggcaaccgu ggcuuucgau uguuacugug ggaaccggag gaaacagucu acagccaugg 60  
ucgccc 66

5 <210> 284  
<211> 68  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 284

gcuaaagcug guaaaaugga accaaaucgc cucuucaaug gauuuggucc ccuucaccca 60  
gcuguagc 68

15 <210> 285  
<211> 104  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 285

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

25 <210> 286  
<211> 119  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 286

30 ccuccaaaagg gaguggcccc cugcucuggc uggucaaaacg gaaccaaguc cgucuuccug 60  
agagguuugg ucccccuaaa ccagcuacag cagggcuggc aaagcucaau auuuggaga 119

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

35 <400> 287

aggguugug acugguugac cagaggggagc ugcacucugu ucacccugug ggccaccuag 60  
ucaccaaccc u 71

40 <210> 288  
<211> 90  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 288

aggccucacu guucucuaug gcuuuuuuuu ccuaugugau ucuauugcuc gcucauauag 60  
ggauuggagc cguggcguac ggugaggaua 90

50 <210> 289  
<211> 97  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

55 <400> 289

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

# ES 2 507 544 T3

<210> 290  
 <211> 100  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 290  
 agauaaaauuc acucuagugc uuuauaggcuu uuuaauuccua ugugaucgua auaaagucuc 60  
 auguagggau ggaagccaug aaauacauug ugaaaaauca 100  
 10  
 <210> 291  
 <211> 62  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 15  
 <400> 291  
 gaggacucca uuuguuuuga ugauggauuc uuaagcucca ucaucgucuc aaaugagucu 60  
 uc 62  
 20  
 <210> 292  
 <211> 73  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25  
 <400> 292  
 cuucggugac ggguaauucuu ggguggauaa uacggauuac guuguuauug cuuaagaaua 60  
 cgcguagucg agg 73  
 30  
 <210> 293  
 <211> 71  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 293  
 cagcuggugu ugugaauca gcccagcagc agcgcauccu cuuacccggc uauuucacga 60  
 caccaggguu g 71  
 35  
 <210> 294  
 <211> 99  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 40  
 <400> 294  
 cucuagcaug guguuuggg acagcuggug uugugaauca ggccguugcc aaucagagaa 60  
 cggcuacuu acaacaccag ggccacacug cacugcaag 99  
 45  
 <210> 295  
 <211> 68  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 50  
 <400> 295  
 guguaauuca cagugcacgu gucuaccagug uggcucggag gcuggagacg cggcccuguu 60  
 ggaguaac 68  
 55  
 <210> 296  
 <211> 70  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 296  
ccugccagug guuuuacccu augguagguu acgucaugcu guucuaccac aggguagaac 60  
cacggacagg 70

5 <210> 297  
<211> 72  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 297  
ggguccaucu uccagugcag uguuggaugg uugaaguaug aagcuccuaa cacugucugg 60  
uaaagauggc cc 72

15 <210> 298  
<211> 64  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 298  
acccaauaaag uagaaagcac uacuaacagc acuggaggggu guaguguuuc cuacuuuug 60  
gaug 64

25 <210> 299  
<211> 63  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 299  
ccugaggugc agugcugcau cucuggucag uugggagucu gagaugaagc acuguagcuc 60  
agg 63

30 <210> 300  
<211> 66  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

35 <400> 300  
ggcuggggaua ucaucauaua cuguaaguuu gugaugagac acuacaguau agaugaugua 60  
cuaguc 66

40 <210> 301  
<211> 70  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 301  
cucacggucc aguuuuucca ggaaucccuu ggaugcuaag auggggauuc cuggaaauac 60  
uguucuugag 70

50 <210> 302  
<211> 65  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

55 <400> 302  
agcucugaga acugaauucc auggguuaua ucaaugucag accugugaaa uucaguucuu 60  
cagcu 65

<210> 303  
 <211> 99  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 303  
 agccaguug gucuuugag acaaaguucu gagacacucc gacucugagu augauagaag 60  
 ucagugcacu acagaacuuu gucucuagag gcugugguc 99  
 10  
 <210> 304  
 <211> 66  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 15  
 <400> 304  
 ggucucuggcu ccgugucuuc acucccgugu uuguccgagg agggagggag ggacgggggc 60  
 ggugcu 66  
 20  
 <210> 305  
 <211> 65  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25  
 <400> 305  
 cccugucucc caacccuugu accagugcug ugccucagac ccugguacag gccuggggga 60  
 uaggg 65  
 30  
 <210> 306  
 <211> 68  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 306  
 ccugcccucg aggagcucac agucuaguau gucuccuccc uacuagacug aggcuccuug 60  
 aggacagg 68  
 35  
 <210> 307  
 <211> 73  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 40  
 <400> 307  
 ccggggccuag guucugugau acacuccgac ucgggcucug gagcagucag ugcaugacag 60  
 aacuugggcc cgg 73  
 45  
 <210> 308  
 <211> 69  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 50  
 <400> 308  
 cggugucauu uuugugacgu ugcagcuagu aaauagagcc caguugcaua gucacaaaag 60  
 ugaucuuug 69  
 55  
 <210> 309  
 <211> 66  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 309  
gaagauaggu uauccguguu gccuucgcuu uauucgugac gaaucauaca cgguugaccu 60  
auuuuu 66

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

10 <400> 310  
cuguuaaugc uaaauugugau agggguuuug gccucugacu gacuccuacc uguuagcauu 60  
aacag 65

15 <210> 311  
<211> 76  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 311  
ccauggaaca uucaacgcug ucggugaguu ugggauucaa aaacaaaaaa accaccgacc 60  
guugacugua ccuugg 76

25 <210> 312  
<211> 80  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 312  
aggucacaau caacauucau ugcugucggu gggugaacu guguaaaaa gcucacugaa 60  
caaugaaugc aacuguggcc 80

35 <210> 313  
<211> 89  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

40 <400> 313  
gccaaagguu ugagggaaca uucaaccugu cggugaguuu gggcagcuca gacaaaccu 60  
cgaccguuga guggaccccg aggcugga 89

45 <210> 314  
<211> 89  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

50 <400> 314  
uugauggcug cacucaacau ucauugcugu cgguggguuu gaauucaac caacucacug 60  
aucaaugaau gcaaacugcg ggccaaaa 89

55 <210> 315  
<211> 75  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

60 <400> 315  
accauuuuug gcaauuguag aacucacacc gguaagguaa uggaacccgg ugguucuaga 60  
cuugccaacu auggu 75

<210> 316  
 <211> 70  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5 <400> 316  
 cuguguaugg cacugguaga auucacugug aacagucuca gucagugaau uaccgaaggg 60  
 ccauaaacag 70  
 10 <210> 317  
 <211> 69  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 15 <400> 317  
 ccuuuccuua ucacuuuuucc agccagcuuu gugacucuaa guguuggacg gagaacugau 60  
 aagguuagg 69  
 20 <210> 318  
 <211> 65  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25 <400> 318  
 agggauugga gagaaaggca guuccugaug guccccuccc aggggcuggc uuuccucugg 60  
 uccuu 65  
 30 <210> 319  
 <211> 71  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 319  
 35 acuuuccaaa gaauucuccu uuugggcuuu cucauuuuau uuaagcccu aaggugaauu 60  
 uuugggaag u 71  
 40 <210> 320  
 <211> 61  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 320  
 45 ucaggcuaca acacaggacc cgggcgcugc ucugaccccu cgugucuugu guugcagccg 60  
 g 61  
 50 <210> 321  
 <211> 68  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 321  
 55 ucucacaucc cuugcauggu ggagggugag cucucugaaa accccuccca caugcagggg 60  
 uugcagga 68  
 <210> 322  
 <211> 67  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 322  
cugugugaua uguuugauau auuagguugu uauuuaucc aacuaauau caagcauau 60  
ccuacag 67

5 <210> 323  
<211> 74  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 323  
agcgggcaac ggaauccaa aagcagcugu ugucuccaga gcauuccagc ugcacuugga 60  
uuucguuucc ugc 74

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

20 <400> 324  
cgugcacagg gcucugaccu augaaugac agccaguacu cuuuucucuc cucuggcugc 60  
caauuccaua ggucacaggu auguucacc 89

25 <210> 325  
<211> 66  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 325  
gagagcuggg ucuuugcggg caagaugaga gugucaguuc aacuggccua caaagucca 60  
guccuc 66

35 <210> 326  
<211> 67  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

40 <400> 326  
aucgggugua acagcaacuc cauguggacu gugcucggau uccaguggag cugcuguuac 60  
uucugau 67

45 <210> 327  
<211> 86  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

50 <400> 327  
guggcuccca cccucuguaa cagcaacucc auguggaagu gccacuggu uccagugggg 60  
cugcuguuau cugggguggc ggcua 86

55 <210> 328  
<211> 58  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 328  
uagcagaca gaaauuugg cauggggaag ugagucugcc aaauuuggcu gugcugcu 58

# ES 2 507 544 T3

<210> 329  
 <211> 102  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 329  
 ugagccggga cuguugagug aaguagguag uucauguug uugggccugg cuucugaac 60  
 acaacgacau caaaccaccu gauucauggc aguacugcu uc 102  
 10  
 <210> 330  
 <211> 85  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 15  
 <400> 330  
 agcugaucug uggcuuaggu aguuucaugu uguugggauu gaguuuugaa cucggcaaca 60  
 agaaacugcc ugaguuacau caguc 85  
 20  
 <210> 331  
 <211> 70  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25  
 <400> 331  
 gccaucccag uguucagacu accuguucag gaggcuggga cauguacagu agucugcaca 60  
 uugguuaggc 70  
 30  
 <210> 332  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 35  
 <400> 332  
 uggaagcuuc aggagauccu gcuccgucgc cccaguguuc agacuaccug uucaggacaa 60  
 ugccguugua caguagucug cacauugguu agacugggca agggccagca 110  
 40  
 <210> 333  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 45  
 <400> 333  
 ccagaggaua ccuccacucc gucuaccag uguuuagacu accuguucag gacucccaaa 60  
 uuguacagua gucugcacau ugguuaggcu gggcuggguu agaccucgg 110  
 50  
 <210> 334  
 <211> 70  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 55  
 <400> 334  
 gccguggcca ucuuacuggg cagcauugga uagugucuga ucucuaauac ugccugguaa 60  
 ugaugacggc 70  
 55  
 <210> 335  
 <211> 90  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 335

cugggccucu gugggcaucu uaccggacag ugcuggauuu cuuggcuuga cucuaacacu 60  
gucugguaac gauguucaaa ggugaccac 90

5 <210> 336  
<211> 69  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 336

cccucgucuu acccagcagu guuugggugc ugguugggag ucucuaauac ugccggguaa 60  
ugauggagg 69

15 <210> 337  
<211> 66  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 337

uaccuuacuc aguaaggcau uguucuucua uauuaauaaa ugaacagugc cuuucugugu 60  
agggua 66

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

<400> 338

30 guuccuuuuu ccuaugcaua uacuucuuug uggaucuggu cuaaagaggu auagcgcaug 60  
ggaagaugga gc 72

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

<400> 339

40 gccuggucca gugguucuug acaguucaac aguucuguag cacaauugug aaauuuuag 60  
gaccacuaga cccggc 76

45 <210> 340  
<211> 68  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 340

uggacuuccc uuugucaucc uaugccugag aaauaauaagaa ggaggcuggg aaggcaaagg 60  
gacguuca 68

50 <210> 341  
<211> 68  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

55 <400> 341

cucuuguccu ucauuccacc ggagucuguc uuaugccaac cagauuucag uggagugaag 60  
cucaggag 68

# ES 2 507 544 T3

<210> 342  
 <211> 73  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 342  
 ccaggccaca ugcuuuuua uauccucaua gauaucucag cacuauggaa uguaaggaag 60  
 ugugugguuu ugg 73  
 10  
 <210> 343  
 <211> 79  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 15  
 <400> 343  
 aaggcagggg ugaggggcug cgggaggagc cgggcggagg cugcggcuug cgcuuuccu 60  
 ggcucuccuc ccucucuuu 79  
 20  
 <210> 344  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25  
 <400> 344  
 uuccuuugac gggugagcuu uuggccccggg uuauaccuga cacucacgua uaagacgagc 60  
 aaaaagcuug uugguacagag gag 83  
 30  
 <210> 345  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 345  
 35  
 ccggggcagu ccuuccaggc ucaggacagc cacugcccac cgcacacugc guugcuccgg 60  
 acccacugug cgugugacag cggcugaucu gucccugggc agcgcgaacc 110  
 40  
 <210> 346  
 <211> 106  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 346  
 45  
 cugcuuggac cugugaccug ugggcuuccc uuugucaucc uuugccuagg ccucugagug 60  
 aggcaaggac agcaaagggg ggcucagugg ucaccucuac ugcaga 106  
 50  
 <210> 347  
 <211> 91  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 347  
 55  
 gggcagcgcg ccggcaccuu ggcucuagac ugcuuacugc ccggggccgcc uucaguaaca 60  
 gucuccaguc acggccaccg acgccuggcc c 91  
 <210> 348  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 348

gguugcuuca gugaacauuc aacgcugucg gugaguuugg aaaucaaaau aaaaccaucg 60  
accguugauu guacccuaua gcuaacc 87

5 <210> 349  
<211> 110  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 349

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

15 <210> 350  
<211> 112  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 350

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

25 <210> 351  
<211> 72  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 351

30 uugguuuauu cucagcuggc aacugugaga ugucccuauc auuccucaca guggucucug 60  
ggauuaugcu aa 72

35 <210> 352  
<211> 108  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 352

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

40 <210> 353  
<211> 110  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 353

gaccaguugc cgcggggcuu uccuuugugc ugaucuaac cauguggugg aacgauggaa 60  
acggaacaug guucugucua gcaccgcgga aagcaucgu cucuccugca 110

50 <210> 354  
<211> 110  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

55 <400> 354

ccgucccggg ccgcgggcucc uguuugucca aacgcaauuc ucgagucucu ggcuccggcc 60  
gagaguugcg ucuggacguc ccgagccgcc gccccaaac cucgaggggg 110

<210> 355  
 <211> 97  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 355  
 acucaggggc uucgccacug auuguccaaa cgcaauucuu guacgagucu gcggccaacc 60  
 gagaauugug gcuggacauc ugugguugag cuccggg 97  
 10  
 <210> 356  
 <211> 95  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 15  
 <400> 356  
 auccagggucu ggggcaugaa ccuggcauac aauguagauu ucuguguuug uuaggcaaca 60  
 gcuacauugu cugcuggguu ucaggcuacc uggaa 95  
 20  
 <210> 357  
 <211> 79  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25  
 <400> 357  
 cccucagugg cucaguagcc aguguagauc cugucuuugg uaaucagcag cuacaucugg 60  
 cuacuggguc ucugguggc 79  
 30  
 <210> 358  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 358  
 35  
 ucuggccauc ugcaguguca cgcuccgugu auuugacaag cugaguugga cacucugugu 60  
 gguagagugu caguuuugca aaauacccaa guguggcuca ugccuauacag 110  
 40  
 <210> 359  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 359  
 45  
 gggcuuuuaa gucacuagug guuccguua guagaugguu ugugcauugu uucaaaaugg 60  
 ugcccuagug acuacaaagc cc 82  
 50  
 <210> 360  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 360  
 55  
 cucaucuugc gguacucaaa cuaugggggc acuuuuuuuu uucuuuuaaa agugccgccu 60  
 aguuuuaagc cccgccgguu gag 83  
 <210> 361  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 361

ccuauguagc ggccaucaaa guggaggccc ucucuugagc cugaaugaga aagugcuucc 60  
acuuguugug ccacugcaug gg 82

5 <210> 362  
<211> 82  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 362

cagccuguga uacucaaaacu gggggcucuu uuggauuuuc aucggaagaa aagugccgcc 60  
agguuuugag ugucaccggu ug 82

15 <210> 363  
<211> 80  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 363

uucaaucugu gguacucaaa cugugugaca uuuuguucuu uguaagaagu gccgcagagu 60  
uuguaguguu gccgauugag 80

25 <210> 364  
<211> 84  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 364

30 uuccauauag ccuacucaaa aauggaggcc cuaucuaagc uuuuaagugg aaagugcuuc 60  
ccuuuugugu guugccaugu ggag 84

35 <210> 365  
<211> 69  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 365

ggugagacuc aaauuguggg cacacuucug gacuguacau agaaagugcu acuacuuuug 60  
agucucucc 69

40 <210> 366  
<211> 79  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 366

gggccuuucu ggagggcccc ccucuaaucc uguugugcuc gcuucagagg guugggugga 60  
ggcucuccug aaggugucc 79

50 <210> 367  
<211> 76  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

55 <400> 367

auauguangu auguanguau gugugcaugu gcaugugcau guaугcauau uгуаугuаuа 60  
uauuаугcau асаугu 76

<210> 368  
 <211> 64  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5 <400> 368  
 uguaugugca ugcauauugug cucaugugug uguacaugua ugugugcaug ugcauguaua 60  
 uaug 64  
 10 <210> 369  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 15 <400> 369  
 ccaggccuuu ggcagaggag ggcuguucuu cccuugaguu uuaugacugg gaggaacuag 60  
 ccuucucuca gcuuaggagu gg 82  
 20 <210> 370  
 <211> 63  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25 <400> 370  
 aagaaauggu uuaccguccc acauacauuu ugaguaugua ugugggacgg uaaaccgcuu 60  
 cuu 63  
 30 <210> 371  
 <211> 79  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 371  
 35 gcuacuugaa gagagguuau cccuugugug uuugcuuuac gcgaaaugaa uaugcaaggg 60  
 caagcucucu ucgaggagc 79  
 40 <210> 372  
 <211> 86  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 372  
 45 ccugcuaacg gcugcucuga cuuuauugca cuacuguacu uuacagcgag cagugcaaua 60  
 guauuguaa agcauccgcg agcagg 86  
 50 <210> 373  
 <211> 69  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 373  
 55 ccaccacuua aacgugguug uacuugcuuu agaccuaaga aaguaagugc uuccauguuu 60  
 uggugaugg 69  
 <210> 374  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 374

gccucgccgc ccuccgccuu cucuucccg g uucuucccg agucgggaaa agcuggguug 60  
agagggcgaa aaaggauug gg 82

5 <210> 375  
<211> 59  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 375  
uuggccuccu aagccaggga uuguggguuc gagucccacc cgggguaaug agguguuuu 59

<210> 376  
<211> 86  
15 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 376

20 uugguacuug gagagaggug guccguggcg cguucgcuuc auuuauaggcg cacauuacac 60  
ggucgaccuc uuugcgguau cuaauc 86

<210> 377  
<211> 89  
25 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 377

30 aacugacuau gccuccucgc aucccuagg gcauuggugu aaagcuggag acccacugcc 60  
ccaggugcug cuggggguug uagucugac 89

<210> 378  
<211> 98  
35 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 378

40 auauagugcu ugguuccuag uaggugcuca guaaguguuu gugacauaau ucguuuauug 60  
agcaccuccu aucaaucaag cacugugcua ggcucugg 98

<210> 379  
<211> 95  
45 <212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 379

cucaucuguc uguugggcug ggggcagggc cuuugugaag gcggguuauug cucagaucgc 60  
cucuggggccc uuccuccagu cccgaggcag auuuu 95

<210> 380  
50 <211> 97  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 380

55 cugucucgga gccuggggca ggggggcagg aggggcucag ggagaaagua ucuacagccc 60  
cuggggccucu cugcccuucc gucccccuguc cccaagu 97

<210> 381

<211> 97  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5 <400> 381  
 uguucgcuuc ugguaccgga agagagguuu ucugggucuc uguuucuuug augagaauga 60  
 aacacaccca gcuaaccuuu uuuucaguau caaaucc 97  
 <210> 382  
 10 <211> 98  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 382  
 15 gacccuuugg cgaucucugc cucucugggc cugugucuua ggcucucaa gauccaacga 60  
 gcaaagcaca gggccugcag agagguagcg cucugcuc 98  
 <210> 383  
 <211> 96  
 20 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 383  
 25 gagucugguu uuguuugggu uuguucuagg uaugguccca gggaucccag aucaaaccag 60  
 gccccugggc cuauccuaga accaaccuaa acccgu 96  
 <210> 384  
 <211> 97  
 30 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 384  
 35 caguguagug agaaguuggg gggugggaac ggcgucaugc aggaguugau ugcacagcca 60  
 uucagcuccu auaugaugcc uuucuucacc cccuua 97  
 <210> 385  
 <211> 98  
 40 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 385  
 45 caacgcugca caggccgucc uccccaacaa uauccuggug cugagugggu gcacagugac 60  
 uccagcauca gugauuuugu ugaagagggc agcugcca 98  
 <210> 386  
 <211> 96  
 50 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 386  
 55 acgggguggc cacuaucuu guccuccagg agcucacgua ugccugccug ugagcgccuc 60  
 ggcgacagag ccggugucca cccugcacu guccac 96  
 <210> 387  
 <211> 98  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 387

caauuguacu uggugugauu auaaagcaau gagacugauu gucauauguc guuuguggga 60  
uccgucucag uuacuuuaua gccauaccug guaucuua 98

5 <210> 388  
<211> 96  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 388

aaaaugauga ugucaguugg ccggucggcc gaucgcucgg ucugucaguc agucggucgg 60  
ucgaucgguc ggucggucag ucggcuuccu gucuuc 96

15 <210> 389  
<211> 99  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 389

gaaaaugggc ucaaggugag gggugcuauc ugugauugag ggacaugguc aauggaaug 60  
ucucacacag aaaucgcacc cgucaccuug gccucguga 99

25 <210> 390  
<211> 95  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 390

30 cugcagccag gguuuuuacc agucaggcuc cuggcuagau uccagguacc agcugguacc 60  
ugaucuagcc aaagccugac uguaagcccu gaaca 95

35 <210> 391  
<211> 96  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 391

40 acccaagucc aggccugcug accccuaguc cagugcuugu gguggcuacu gggcccugaa 60  
cuaggggucu ggagaccugg guuugaucuc cacagg 96

45 <210> 392  
<211> 98  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 392

ucuguguugg gcgucugucu gcccagaguc cugccucucu guugcucuga aggaggcagg 60  
ggcuggggccu gcagcugccu gggcagagcu gcuccuuc 98

50 <210> 393  
<211> 99  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

55 <400> 393

agaugccuug cuccuacaag aguaaagugc augcgcuuug ggacagugag gaaaauaaug 60  
uucacaaagc ccauacacuu ucacccuuua ggagaguug 99

<210> 394  
 <211> 98  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 5  
 <400> 394  
 ugggcuccua ggaagaggua guagguugca uaguuuuagg gcagagauuu ugcccacaag 60  
 gaguuaacua uacgaccugc ugccuuucuu agggccuu 98  
 10  
 <210> 395  
 <211> 97  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 15  
 <400> 395  
 uguuggccua guucugugug gaagacuagu gauuuuuguug uuuuuagaua acuaagacga 60  
 caacaaaauca cagucugcca uauggcacag gccaccu 97  
 20  
 <210> 396  
 <211> 94  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 25  
 <400> 396  
 uucacugugg gaugagguag uagguuguau aguuuuaggg ucacaccac cacugggaga 60  
 uaacuaauaca aucuacuguc uuuccuaagg ugau 94  
 30  
 <210> 397  
 <211> 96  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 397  
 35  
 cggcaugcuc ccaggcugag guaguagguu guauaguuuu gaguuaacaac aaggagaua 60  
 acuguacagc cuccuagcuu uccuugggac uugcac 96  
 40  
 <210> 398  
 <211> 85  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 398  
 45  
 gcggggugag guaguagguu gugugguuuc agggcaguga ugucgccccu ccgaagauaa 60  
 cuauacaacc uacugccuuc ccuga 85  
 50  
 <210> 399  
 <211> 94  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 399  
 55  
 ugugugcauc cgguugagg uaguagguug uauugguuuag aguacaccc ugaggauaa 60  
 cuguacaacc uucuaagcuu ccuuggagca cacu 94  
 <210> 400  
 <211> 95  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 400

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

5 <210> 401  
<211> 93  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

10 <400> 401

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

15 <210> 402  
<211> 89  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

20 <400> 402

aucagaguga gguaguagau uguauaguug ugggguagug auuuuacccu guuuaggaga 60  
uaacuaauaca aucuaauugc uucccugag 89

25 <210> 403  
<211> 83  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 403

30 ugugggauga gguaguagau uguauaguuu uagggucaua ccccaucuug gagauaacua 60  
uacagucuac ugucuuuucc acg 83

35 <210> 404  
<211> 85  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 404

40 cuggcugagg uaguaguuuug ugcuguuggu cggguuguga cauugccccg uguggagaua 60  
acugcgcaag cuacugccu gcuag 85

45 <210> 405  
<211> 95  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 405

ggacagacca gcccugucug gaagacuagu gauuuuguug uugugucugu guccaacaac 60  
aagucccagu cugccacaug gugugguca cauca 95

50 <210> 406  
<211> 110  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

55 <400> 406

aggccagaac acaugagcca augcuauug gaagacuugu gauuuuguug uucugauaug 60  
auaugacaac aagucacagc cagccucaua gaguggacuc ccaucacccu 110

<210> 407  
 <211> 89  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 5  
 <400> 407  
 cggggguuggu uguuauuuu gguuauuuu cuguaugagu gguguggagu cuucauaaaag 60  
 cuagauaacc gaaaguaaaa auaacccca 89  
 10  
 <210> 408  
 <211> 90  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 15  
 <400> 408  
 ggaggcccggu uucucuuuu gguuauuuu cuguaugagu gccacagagc cgucuaaaag 60  
 cuagauaacc gaaaguagaa augacucuaa 90  
 20  
 <210> 409  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 25  
 <400> 409  
 ggaagcgagu uguuauuuu gguuauuuu cuguaugagu guauuggucu ucauaaaagcu 60  
 agauaaccga aaguaaaaac uccuua 87  
 30  
 <210> 410  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 35  
 <400> 410  
 gaccugucug ucuucuguau auaccugua gaucgaaau uguguaagga auuuuguggu 60  
 caaaauucg uaucuagggg aaauuguagu ugacuaaaac acuccgcua 110  
 40  
 <210> 411  
 <211> 109  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 45  
 <400> 411  
 ccaaaguugu aacguugucu auauauaccg uguagaaccg auuuugugug guaccacau 60  
 agucacagau ucgauucuag gggauauau ggucgaugca aaaacuua 109  
 50  
 <210> 412  
 <211> 98  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 55  
 <400> 412  
 uuggaaccuu aaaguacugu agcagcaca caugguuuac auacuacagu caagaugcga 60  
 aucauuuuu gcugcucuag aaauuuuag aaauucau 98  
 55  
 <210> 413  
 <211> 95  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 413

cauacuuguu ccgcucuagc agcacguaaa uauuggcgua gugaaauaaa uauuaaacac 60  
caauauuuuu gugcugcuuu agugugacag ggaua 95

5 <210> 414  
<211> 84  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

10 <400> 414

gucaggauaa ugucaaagug cuuacagugc agguaguggu gugugcaucu acugcaguga 60  
aggcacuugu ggcauugugc ugac 84

15 <210> 415  
<211> 96  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

20 <400> 415

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

25 <210> 416  
<211> 87  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 416

30 cacuggucua ugguuaguuu ugcagguuug cauccagcug uauaaauuuc ugcugugcaa 60  
auccaugcaa aacugacugu gguggug 87

35 <210> 417  
<211> 96  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 417

40 acauugcuac uuacgguuag uuuugcagau uugcaguuca gcguauaugu ggauauaugg 60  
cugugcaaa ccaugcaaaa cugauuguga ugaugu 96

45 <210> 418  
<211> 82  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 418

gcagcccucu guucguuuug cauaguugca cuacaagaag aauguaguug ugcaaaucua 60  
ugcaaaacug augguggccu gc 82

50 <210> 419  
<211> 85  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

55 <400> 419

cagcuucugu agcacuaaag ugcuuauagu gcagguagug ugucgucauc uacugcauuu 60  
cgagcacuuu caguacugcc agcug 85

<210> 420  
 <211> 92  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 5  
 <400> 420  
 uguaccaccu ugucggguag cuuauacagac ugauguugac uguugaauuc cauggcaaca 60  
 gcagucgaug ggcugucuga cauuuuggua uc 92  
 10  
 <210> 421  
 <211> 95  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 15  
 <400> 421  
 accugggcuga gccgcaguag uucuucagug gcaagcuuuu uguccugacc cagcuaaaagc 60  
 ugccaguuga agaacuguug ccucugcca cuggc 95  
 20  
 <210> 422  
 <211> 75  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 25  
 <400> 422  
 cggccggcug ggguuuccugg ggaugggauu ugaugccagu cacaaauac auugccaggg 60  
 auuuccaacu gaccc 75  
 30  
 <210> 423  
 <211> 97  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 423  
 35  
 cucaccugcu cuggcugcuu ggguuuccugg caugcugauu ugugacuuga gauuaaaauc 60  
 acauugccag ggauuaccac gcaaccauga ccuuggc 97  
 40  
 <210> 424  
 <211> 68  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 424  
 45  
 cuccggugcc uacugagcug auauacaguuc ucauuucaca cacuggcuca guucagcagg 60  
 aacaggag 68  
 50  
 <210> 425  
 <211> 108  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 425  
 gccucuccu gggcuccgcc uccugugccu acugagcuga aacaguugau uccagugcac 60  
 uggcucaguu cagcaggaac aggaguacc ccccauagg agcuggca 108  
 55  
 <210> 426  
 <211> 84  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 426

ggccaguguu gagaggcgga gacacgggca auugcuggac gcugcccugg gcauugcacu 60  
 ugucucgguc ugacagugcc ggcc 84

5 <210> 427  
 <211> 90  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

10 <400> 427

aaggccgugg ccuuguucaa guaauccagg auaggcugug caggucccaa gggggccuauu 60  
 cuugguuacu ugacagggga cgcggggccug 90

15 <210> 428  
 <211> 85  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

20 <400> 428

ugcccgggac ccaguucaag uaaauccagga uagguugugg ugcuggccag ccuguucucc 60  
 auuacuuggc ucgggggccc gugcc 85

25 <210> 429  
 <211> 97  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 429

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

35 <210> 430  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 430

40 uggccugugg agcagggcuu agcugcuugu gagcaagguc uacagcaaag ucguguucac 60  
 aguggcuaag uuccgccccc uggaccc 87

45 <210> 431  
 <211> 86  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 431

50 ggucccuacc cgcaaggagc ucacagucua uugaguuccu uuucugauuc ucccacuaga 60  
 uuugagagcuc cuggagggca ggcacu 86

55 <210> 432  
 <211> 81  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 432

cuucuggaag cugguuucac augguggcuu agauuuuucc aucuuuguau cuagcaccau 60  
 uugaaucag uguuuuagga g 81

<210> 433  
 <211> 88  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 5  
 <400> 433  
 accccuuaga ggauacuga uuucuuuugg uguucagagu caauagaauu uucuaacacc 60  
 aucugaaauc gguuaauaug auugggga 88  
 10  
 <210> 434  
 <211> 81  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 15  
 <400> 434  
 cuucaggaag cugguuucau augguguuu agauuuuuuu agugauuguc uagcaccuu 60  
 ugaaaucagu guucuuuggug g 81  
 20  
 <210> 435  
 <211> 88  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 25  
 <400> 435  
 aucucuuaa caggcugacc gauuucuccu gguguucaga gucuguuuuu gucuagcacc 60  
 auuugaaauc gguuaugaug uaggggga 88  
 30  
 <210> 436  
 <211> 89  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 35  
 <400> 436  
 accauguugu agugugugua aacauccuac acucucagcu gugagcucaa gguggcuggg 60  
 agagggguugu uuacuccuuc ugccaugga 89  
 40  
 <210> 437  
 <211> 64  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 45  
 <400> 437  
 cuguaaaacau ccuugacugg aagcuguaag guguuagag gagcuuucag ucggauuuuu 60  
 acag 64  
 50  
 <210> 438  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 55  
 <400> 438  
 ccgaguuuca guucauguaa acauccuaca cucagcuguc auacaugagu uggcugggau 60  
 guggauuuu acgucagcug ucuugga 87  
 60  
 <210> 439  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 439

aagucugugu cuguaaacau ccccgacugg aagcuguaag ccacagccaa gcuuucaguc 60  
agauguuugc ugcuaucuggc uc 82

5 <210> 440  
<211> 71  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

10 <400> 440

gcaacuguaa acauccucga cuggaagcug ugaagccaca aaugggcuuu cagucggaug 60  
uuugcagcug c 71

15 <210> 441  
<211> 84  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

20 <400> 441

gagugacaga uacuguaaac auccuacacu cucagcugug aaaaguaaga aagcugggag 60  
aaggcuguuu acucucucug ccuu 84

25 <210> 442  
<211> 106  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 442

30 ugcuccugaa acuuggaacu ggagaggagg caagaugcug gcavagcugu ugaacugaga 60  
accugcuau gccaacauuu gccaucuuuc cugucugaca gcagcu 106

35 <210> 443  
<211> 70  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 443

40 ggggauauug cacauuacua aguugcaugu ugucacggcc ucaaugcaau uuagugugug 60  
ugauauucuc 70

45 <210> 444  
<211> 69  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 444

50 ccguggugca uuguaguugc auugcauguu cuggcaguac cugugcaaug uuuccacagu 60  
gcaucacgg 69

55 <210> 445  
<211> 84  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 445

gugcucgguu uguaggcagu guaaauagcu gauuguagug cggugcugac aaucacuaac 60  
uccacugcca ucaaaacaag gcac 84

<210> 446  
 <211> 77  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 5  
 <400> 446  
 agucuaguua cuaggcagug uaguuagcug auugcuaaua guaccaauca cuaaccacac 60  
 agccagguaa aaagacu 77  
 10  
 <210> 447  
 <211> 102  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 15  
 <400> 447  
 ccggcuguga guaaauuuu ggcagugucu uagcugguug uugugaguau uagcuaagga 60  
 agcaaucagc aaguauacug ccuagaagu gcugcacguu gu 102  
 20  
 <210> 448  
 <211> 78  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 25  
 <400> 448  
 cuuucuacac agguugggau uugucgcaau gcuguguuuc uguauaguau ugcacuuguc 60  
 ccggccguu gaguuugg 78  
 30  
 <210> 449  
 <211> 92  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 449  
 35  
 ugccccauca uccacaggug gggauuagug ccuuuacuug uguuagauaa aaaguauugc 60  
 acuugucccg gccugaggaa gaaaagaggg uu 92  
 40  
 <210> 450  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 450  
 45  
 agucaugggg gcuccaaagu gcuguucgug cagguagugc auugccugac cuacugcuga 60  
 gcuagcacuu cccgagcccc caggaca 87  
 50  
 <210> 451  
 <211> 106  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 451  
 55  
 ccaguaccan cugcuuggcc gauuuuggca cuagcacauu uuugcuugug ucucuccgcu 60  
 cugagcauc augugcagug ccaauauggg aaaagcgggc ugcugc 106  
 60  
 <210> 452  
 <211> 80  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 452

gugagguagu aaguuguauu guuguggggu agggauuuua ggccccaaua agaagauaac 60  
uauacaacuu acuacuuuucc 80

5 <210> 453  
<211> 81  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

10 <400> 453

cccauuggca uaaacccgua gauccgaucu uguggugaag uggaccgcac aagcucguuu 60  
cuauugggucu guggcagugu g 81

15 <210> 454  
<211> 70  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

20 <400> 454

ggcaccacc cguagaaccg accuugcggg gccuucgccg cacacaagcu cgugucugug 60  
gguccguguc 70

25 <210> 455  
<211> 80  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 455

30 ccguugcca caaacccgua gauccgaacu ugugcugacc augcacacaa gcuugugucu 60  
auagguaugu gucuguuagg 80

35 <210> 456  
<211> 97  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 456

40 aucugagacu gaacuguccu uuuucggua ucaugguacc gaugcuguag aucugaaagg 60  
uacaguacug ugauagcuga agaauaggug ugccauc 97

45 <210> 457  
<211> 75  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 457

ugcccuggcu caguuaucac agugcugaug cuguccauuc uaaagguaca guacugugau 60  
aacugaagga uggca 75

50 <210> 458  
<211> 86  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

55 <400> 458

gucuucgugc uuucagcuuc uuucagugc ugccuuguag cauucagguc aagcagcauu 60  
guacagggcu augaaagaac caagaa 86

<210> 459  
 <211> 86  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 5  
 <400> 459  
 uucuuacugc ccucggcuuc uuacagugc ugccuuguug cauauggauc aagcagcauu 60  
 guacagggcu augaaggcau ugagac 86  
 10  
 <210> 460  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 15  
 <400> 460  
 ccugcuggga cuaaagugcu gacagugcag auaguggucc ucucugugcu accgcacugu 60  
 gguacuugc ugcuccagca gg 82  
 20  
 <210> 461  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 25  
 <400> 461  
 uucucucugc uuuaagcuuc uuacagugu ugccuugugg cauggaguuc aagcagcauu 60  
 guacagggcu aucaaagcac agagagc 87  
 30  
 <210> 462  
 <211> 85  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 462  
 ccuuagcaga gcucuggagu gugacaaugg uguuuguguc caaaacauca aacgccauca 60  
 ucacacuaaa cagcuacugc uaggc 85  
 35  
 <210> 463  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 40  
 <400> 463  
 ugagggcccc ucugcguguu cacagcggac cuugauuuuaa ugucuauaca auuaaggcac 60  
 gcggugaaug ccaagagagg cgccucc 87  
 45  
 <210> 464  
 <211> 85  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 50  
 <400> 464  
 aggccucucu cuccguguuc acagcggacc uugauuuuaa uguccauaca auuaaggcac 60  
 gcggugaaug ccaagaagg ggcug 85  
 55  
 <210> 465  
 <211> 109  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 465

aucaagauca gagacucugc ucuccguguu cacagcggac cuugauuuuaa ugucauacaa 60  
 uuaaggcacg cggugaaugc caagagcggga gccuacggcu gcacuugaa 109

5 <210> 466  
 <211> 85  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

10 <400> 466

ugccggccuc ugggucccug agaccuuua accugugagg acguccaggg ucacagguga 60  
 gguuccuugg agccuggcgc cuggc 85

15 <210> 467  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

20 <400> 467

ugcgcucucc ucagucccug agaccuaac uugugauguu uaccguuuua auccacgggu 60  
 uaggcucuug ggagcugcga gucuguc 87

25 <210> 468  
 <211> 88  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 468

30 accagacuuu uccuaguccc ugagaccua acuugugagg uauuuuagua acaucacaag 60  
 ucaggcucu uggaccuagg cggagagg 88

35 <210> 469  
 <211> 73  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 469

40 ugacagcaca uauuuacuuu ugguacgcgc ugugacacuu caaacucgua ccgugaguaa 60  
 uaaugcgugg uca 73

45 <210> 470  
 <211> 97  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 470

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

50 <210> 471  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

55 <400> 471

ugagcuguug gauucggggc cguagcacug ucugagaggu uuacauuucu cacagugaac 60  
 cggucucu uucagcugcu uc 82

<210> 472  
 <211> 84  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 5  
 <400> 472  
 ugugcagugg gaaggggggc cgaugcacug uaagagagug aguagcaggu cucacaguga 60  
 accggucucu uucccuacug uguc 84  
 10  
 <210> 473  
 <211> 97  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 15  
 <400> 473  
 agacugcccu ucgcgaauuc uuuugcgguc ugggcuugcu guacauaacu caauagccgg 60  
 aagcccuuac cccaaaaagc auucgcggag ggcgcgc 97  
 20  
 <210> 474  
 <211> 72  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 25  
 <400> 474  
 ugugucuuuu ugcggucugg gcuugcuguu cucuccacag uagucaggaa gcccuuaccc 60  
 caaaaaguau cu 72  
 30  
 <210> 475  
 <211> 88  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 475  
 35  
 ugucugcuggc cggagcucuu uucacauugu gcuacugucu acacguguac cgagcagugc 60  
 aauguuaaaa gggcaucggc cuuguagu 88  
 40  
 <210> 476  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 476  
 45  
 ggcuugcugg acacucuuuc ccuguugcac uacugugggc cucugggaag cagugcaaug 60  
 augaaagggc auccgucagg cc 82  
 50  
 <210> 477  
 <211> 101  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 477  
 55  
 ccgccccgc gucuccaggg caaccguggc uuucgauugu uacuguggga accggaggua 60  
 acagucuaca gccauggucg ccccgagca cgcccacgc c 101

<400> 478

caaugcuuug cuaaagcugg uaaaauggaa ccaaauccgcc ucuucaaugg auuugguccc 60  
cuucaaccag cuguagcuau gcauuga 87

5 <210> 479  
<211> 73  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

10 <400> 479

cagggugugu gacugguuga ccagaggggc gugcacuuug uucaccugug gggccaccua 60  
gucaccaacc cuc 73

15 <210> 480  
<211> 97  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

20 <400> 480

cgucucugcug uggccuaugg cuuuucauuc cuaugugauu gcuguuccga acucauguag 60  
ggcuaaaaagc caugggcuac agugaggggc aagcucc 97

25 <210> 481  
<211> 100  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 481

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

35 <210> 482  
<211> 82  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 482

40 ugagcccucg gaggacucca uuuguuuuga ugauuggauuc uuaagcucca ucaucgucuc 60  
aaaugagucu ucagaggguu cu 82

45 <210> 483  
<211> 102  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 483

50 ggcccucuga cucucuucgg ugacggguau ucuugggugg auaaauacgga uuacguuguu 60  
auugcuuaag aaucacgcuu gucgaggaga guaccagcgg ca 102

55 <210> 484  
<211> 82  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 484

guugcugcag cugguguugu gaucaggcc gacgagcaac gcauccucuu acccgguuau 60  
uucacgacac caggguugca cc 82

<210> 485  
 <211> 99  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 5  
 <400> 485  
 cucuggcaug guguguggg acagcuggug uugugaauc ggcgguugcc aaucagagaa 60  
 cggcuacuuc acaacaccag ggucucacug cacugcagg 99  
 10  
 <210> 486  
 <211> 68  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 15  
 <400> 486  
 guguaauucua cagugcacgu gucuccagug uggcucggag gcuggagacg cggcccuguu 60  
 ggaguaac 68  
 20  
 <210> 487  
 <211> 99  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 25  
 <400> 487  
 gugucucucu cuguguccug ccagugguuu uacccuauug uagguuacau caugcuguuc 60  
 uaccacaggg uagaaccacg gacaggauac uggagcacc 99  
 30  
 <210> 488  
 <211> 94  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 35  
 <400> 488  
 ggcugacucu gaguccaucu uccagugcag uguuggaugg uugaaguacg aagcuccuaa 60  
 cacugucugg uaaagauggc ccccggguca guuc 94  
 40  
 <210> 489  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 45  
 <400> 489  
 gacagugcag ucacccauaa aguagaaagc acuacuaaca gcacuggagg guguauguu 60  
 uccuacuuua uggauagagug uacugug 87  
 50  
 <210> 490  
 <211> 105  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 55  
 <400> 490  
 gcggagcgcc ugucucccag ccugaggugc agugcugcau cucuggucag uugggagucu 60  
 gagaugaagc acuguagcuc aggaagggag aagauguucu gcagc 105  
 60  
 <210> 491  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 491

gggccuuggc ugggauauca ucauauacug uaaguuugug augagacacu acaguauaga 60  
ugauguacua gucugggguac ccc 83

5 <210> 492  
<211> 88  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

10 <400> 492

caccuugucc ucacggucca guuuucccag gaaucccuug gaugcuaaga uggggauucc 60  
uggaaauacu guucuugagg ucauggcu 88

15 <210> 493  
<211> 95  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

20 <400> 493

uguguauccu cagcucugag aacugaauuc cauggguuau agcaauguca gaccugugaa 60  
guucaguucu uuagcuggga uagcucuauc gucau 95

25 <210> 494  
<211> 97  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 494

30 caggcacucu uagcauuuga ggugaaguuc uguuauacac ucaggcugug gcucugaaag 60  
ucagugcauc acagaacuuu gucucgaaag cuuucua 97

35 <210> 495  
<211> 85  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 495

40 cuucucaagg ccuugucucc caaccuuugu accagugcug ugccucagac ccugguacag 60  
gccuggggga cagggaauug gggac 85

45 <210> 496  
<211> 97  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 496

agcgcuuucc ugcccucgag gagcucacag ucuaguaugu cuccuccua cuagacugag 60  
gcuccuugag gacagggauc gucauacua ccucccg 97

50 <210> 497  
<211> 85  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

55 <400> 497

uguuucccg gcccagguuc ugugauacac uccgacucgg gcucuggagc agucagugca 60  
ugacagaacu ugggcccggg aggac 85

<210> 498  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 5  
 <400> 498  
 agcgguggcc agugucuuu uugugauguu gcagcuagua auaugagccc aguugcauag 60  
 ucacaaaagu gaucuuugga aacugug 87  
 10  
 <210> 499  
 <211> 84  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 15  
 <400> 499  
 gcggugcuug aagauagguu auccguguug ccuucgcuuu auucgugacg aaucuuacac 60  
 gguugaccua uuuuuucagua ccaa 84  
 20  
 <210> 500  
 <211> 106  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 25  
 <400> 500  
 agaacuugcc aaggguuugg gggaacauuc aaccugucgg ugaguuuggg cagcucagac 60  
 aaaccaucga ccguugagug gaccccgagg ccuggaacug ccaccc 106  
 30  
 <210> 501  
 <211> 117  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 501  
 35  
 agaugggcaa ccaaggcagc cuuaagagga cuccauggaa cauucaacgc ugucggugag 60  
 uuugggauuc aaaaacaaaa aaaaccacca accguugacu guaccuuggg auucuua 117  
 40  
 <210> 502  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 502  
 45  
 ccugugcaga gaugauguuu acaaagguca caaucaacau ucauugcugu cgguggguug 60  
 aacuguguag aaaagcucac ugaacaauga augcaacugu ggccccgcuu 110  
 50  
 <210> 503  
 <211> 88  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 503  
 55  
 ugauggcugc acucaacauu cauugcuguc gguggguuug aaugucaacc aacucacug 60  
 ucaaugaaug caaacugcgg gccaaaaa 88  
 60  
 <210> 504  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 504

ccagagagug ugacuccugu ccuguguaug gcacugguag aaucacugu gaacagucuc 60  
ggucagugaa uuaccgaagg gccauaaaca gagcagagac agauccgcga 110

5 <210> 505  
<211> 77  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

10 <400> 505

cacuuucccu uaucaguuuu ccagccagcu uugugacugu aauguugga cggagaacug 60  
auaaggguaa gugacug 77

15 <210> 506  
<211> 80  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

20 <400> 506

gggggugagg gauuggagag aaaggcaguu ccugaugguc cccucccagg ggcuggcuuu 60  
ccucuggucc uucucuccca 80

25 <210> 507  
<211> 86  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 507

30 ugcuuacaac uuuccaaaga auucuccuuu ugggcuuuu cauuaauuu uaagcccaa 60  
ggugaauuuu uugggaaguu ugagcu 86

35 <210> 508  
<211> 104  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 508

40 gggcucacag gacacaaugc ggauccucag gcuacaacac aggacccggg cgcugcucug 60  
acccucugug ucuuguguug cagccggagg gacgcagguc ugca 104

<210> 509  
<211> 85  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

45 <400> 509

ugcaggccuc ugugugauau guuugauaua uuagguuguu auuaaucca acuaauauuc 60  
aagcauauuc cuacaguguc uugcc 85

50 <210> 510  
<211> 91  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

55 <400> 510

ggcuggacag cgggcaacgg aaucacaaa gcagcuguug ucuccagagc auuccagcug 60  
cacuuggauu ucguucccug cucuccugcc u 91

<210> 511  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 5  
 <400> 511  
 gucaagaugg agugcacagg gcucugaccu augaaugac agccaguacu cugaucucgc 60  
 cucuggcugc caguuccaau ggucacaggu auguucgccu caaugccagc 110  
 10  
 <210> 512  
 <211> 86  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 15  
 <400> 512  
 gcggaacggga gcugagagcu gggucuuugc gggcaaugaug agggugucag uucaacuggc 60  
 cuacaaaguc ccaguccucg gcuccc 86  
 20  
 <210> 513  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 25  
 <400> 513  
 auggagucan caccuguaac agcaacucca uguggacugu gcacagauc caguggagcu 60  
 gcuguuacuu uugauggccu cca 83  
 30  
 <210> 514  
 <211> 85  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 35  
 <400> 514  
 uggcucccac cccucguaac agcaacucca uguggaagug cccacugauu ccaguggggc 60  
 ugcuguuau cugggguggag gcugg 85  
 40  
 <210> 515  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 45  
 <400> 515  
 aacucuccug gcucuagcag cacagaaaua uuggcacggg uaagugaguc ugccaauau 60  
 ggcugugcug cuccaggcag gguggug 87  
 50  
 <210> 516  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 55  
 <400> 516  
 uguuugcuca gcugaucugu ggcuuaggua guuucanguu guugggauug aguuuugaac 60  
 ucggcaacaa gaaacugccu gaguuacau agucgguuuu cgucgagggc 110  
 55  
 <210> 517  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 517

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

5 <210> 518  
<211> 69  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

10 <400> 518

cccucgucuu acccagcagu guuugggugc uggguugggag ucucuaauac ugccggguaa 60  
ugauggagg 69

15 <210> 519  
<211> 89  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

20 <400> 519

cuggggccucu gugggcaucu uaccggacag ugcuggauuu cuuggcuuga cucuaacacu 60  
gucugguaac gauguucaa ggugaccca 89

25 <210> 520  
<211> 95  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 520

30 ccaacuuggg cagccguggc caucuacug ggcagcauug gauagugucu gaucucuaau 60  
acugccuggu aaugaugacg gcggagcccu gcacg 95

<210> 521  
<211> 97  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

35 <400> 521

gcgcgccugg uccagugguu cuuaacaguu caacaguucu guagcgcaau ugugaaaugu 60  
uuaggaccac uagacccggc gcgcacggca gcggcgga 97

40 <210> 522  
<211> 110  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

45 <400> 522

ggcuacagcc cuucuucaug ugacucgugg acuucccuuu gucauccuau gccugagaau 60  
auaugaagga ggcugggaag gcaaagggac guucaauugu caucacuggc 110

50 <210> 523  
<211> 108  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

55 <400> 523

aaacagcccc agacaaucca uggguccucc uguccuucuu uccaccggag ucugucuau 60  
gccaaccaga uuucagugga gugaagcuca ggaggcaugg agcugcca 108

<210> 524  
 <211> 84  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 5  
 <400> 524  
 cuuccccagg ccacaugcuu cuuuauaucc ucauagauau cacugcgcua uggaauguaa 60  
 ggaagugugu gguuuuggca agug 84  
 10  
 <210> 525  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 15  
 <400> 525  
 uuccuuugac gggugagcuu uuggcccggg uuauaccuga cucucacgua uaagacgagc 60  
 aaaaagcuug uuggucagag gag 83  
 20  
 <210> 526  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 25  
 <400> 526  
 ccggggcagu ccuccaggc ucaggacagc cacugcccac agcacacugc guugcuccgg 60  
 acccacugug cgugugacag cggcugaucu gucccugggc agcgcgaacc 110  
 30  
 <210> 527  
 <211> 106  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 527  
 35  
 cagcuuggac cugugaccuc ugggcuuccc uuugucaucc uuugccuagg ccucugagug 60  
 gggcaaggac agcaaagggg ggcucagugg ucaccucuac ugcaga 106  
 40  
 <210> 528  
 <211> 111  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 528  
 45  
 cgggauaucc ccgcccgggc agcgcgccgg caccuuggcu cuagacugcu uacugcccgg 60  
 gccgcccua guaacagucu ccagucacgg ccaccgacgc cuggccccgc c 111  
 50  
 <210> 529  
 <211> 100  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 529  
 55  
 agguugcuuc agugaacauu caacgcuguc ggugaguug gaauucaaau aaaaaccauc 60  
 gaccguugau uguacccuau agcuaaccu uaucuacucc 100  
 60  
 <210> 530  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 530

guccuggaug gacagaguug ucaugugucu gccugucuac acuugcugug cagaacaucc 60  
gcucaccugu acagcaggca cagacaggca gucacaugac aaccagccu 110

5 <210> 531  
<211> 106  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

10 <400> 531

guuagcuau aguuaguua aucucagcug gcaacuguga gauguccua ucauuccua 60  
caguggucuc uggaauaug cuaaacagag cauuuccuu gaccuc 106

15 <210> 532  
<211> 105  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

20 <400> 532

accacaguca uuguaguuuu gaugucgcag auacugcauc aggaacugac uggauaagac 60  
ucagucacca ucaguuccua augcauugcc uucagcaucu aaaca 105

25 <210> 533  
<211> 110  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 533

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

35 <210> 534  
<211> 110  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 534

40 gugauaacgu agcgagauuu ucuguugugc uugaucuaac caugugcuug cgagguauga 60  
guaaaacaug guuccgucaa gcaccaugga acgucacgca gcuuucuaca 110

45 <210> 535  
<211> 110  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 535

cugucccggg ccgcgggcucc ugauugucca aacgcaauuc ucgagucucu ggcuccggcc 60  
gagaguugcg ucuggacguc ccgagccgcc gcccccaaac cucgaggggg 110

50 <210> 536  
<211> 96  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

55 <400> 536

acucaggggc uucaccacug auuguccaaa cgcaauucuu guacgagucu gcggccaacc 60  
gagaauugug gcuggacauc ugugguugag cuccgg 96

<210> 537  
 <211> 109  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 5  
 <400> 537  
 ugaauaucca ggucuggggc augaaccugg cauacaaugu agauuucugu guuuguuagg 60  
 caacagcuac auugucugcu ggguuucagg cuaccuggaa gcauuucuc 109  
 10  
 <210> 538  
 <211> 103  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 15  
 <400> 538  
 aaggauuagg gugcccucag uggcucagua gccaguguag auccugucuu ugguaaucag 60  
 cagcuacauc uggcuacugg gucucugaug gcaucaucua gcu 103  
 20  
 <210> 539  
 <211> 110  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 539  
 25  
 ucuggccuuc ugcaguguua cgcuccgugu auuugacaag cugaguugga cacucugugu 60  
 gguagagugu caguuguca aaauaccccaa guguggcuca ugcuuauacag 110  
 30  
 <210> 540  
 <211> 81  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 540  
 35  
 ucaucuugcg guucucaaaac uaugggggca cuuuuuuuuu cuuuaaaaag ugccgccagg 60  
 uuuuagggcc ugccgguuga g 81  
 40  
 <210> 541  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 541  
 45  
 ccgguguagu agccaucaaa guggaggccc ucucuugggc ccgagcuaga aagugcuucc 60  
 acuuugugug ccacugcaug gg 82  
 50  
 <210> 542  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 542  
 55  
 caaccuguga uacucaaaacu ggggggcucuu uuggguuuuc uuuggaagaa aagugccgcc 60  
 agguuuugag uguuaccgau ug 82  
 55  
 <210> 543  
 <211> 78  
 <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*

10 <400> 544

uauguaugua uguauguaug uaugcaugua ugugugcaug uaugcaugca ugcauguaug 60  
uauguaug 68

15 <210> 545  
<211> 82  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

20 <400> 545

ccaggccuuc ggcagaggag ggcuguucuu cccuuggguu uuaugacugg gaggaacuag 60  
ccuucucucu gcuuaggagu gg 82

25 <210> 546  
<211> 63  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 546

30 aagaaauggu uuaccguccc acauacauuu ugaguaugua ugugggacgg uaaaccgcuu 60  
cuu 63

35 <210> 547  
<211> 79  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 547

40 gcuacuugaa gagagguuau ccuugugug uuugcuuuac gcgaaugaa uaugcaaggg 60  
caagcucucu ucgaggagc 79

45 <210> 548  
<211> 100  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 548

50 ccugcuggcu acugcugacg acugcucuga cuuuauugca cuacuguacu guacagcuag 60  
cagugcaaua guauugucua agcauccggg agcaggcuac 100

55 <210> 549  
<211> 82  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 549

gccucgcugu ccuccgccuu cucuucccg uucuucccg agucgggaaa agcuggguug 60  
agagggcgaa aaaggauaug gg 82

<210> 550  
 <211> 59  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 5  
 <400> 550  
 uuggccuccu aagccaggga uuguggguuc gagucccacc cgggguaaga gguuguguu 59  
 10  
 <210> 551  
 <211> 95  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 15  
 <400> 551  
 ccucgcugac uccgaagggg ugcagcagca auucauguuu uggaguauug ccaagguuca 60  
 aaacaugaag cgcugcaaca ccccuucgug ggaaa 95  
 20  
 <210> 552  
 <211> 86  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 25  
 <400> 552  
 uugguacuug gagagaggug guccguggcg cguucgcuuc auuuauaggcg cacauuacac 60  
 ggucgaccuc uuugcgguau cuaauc 86  
 30  
 <210> 553  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 553  
 35  
 cugacuauugc cuccucgcau ccccuagggc auugguguaa agcuggagac ccacugcccc 60  
 aggugcugcu ggggguugua guc 83  
 40  
 <210> 554  
 <211> 98  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 554  
 45  
 auauagugcu ugguuccuag uaggugcuca guaaguguuu gugacauau ucguuuauug 60  
 agcaccuccu aucaaucaag cacugugcua ggcucugg 98  
 50  
 <210> 555  
 <211> 95  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 555  
 55  
 cucaucuguc uguggggcg ggggcagggc cuuugugaag gcggguuauug cucagaucgc 60  
 cucuggggccc uuuccuccagu cccgaggcag auuuu 95  
 60  
 <210> 556  
 <211> 84  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

# ES 2 507 544 T3

<400> 556

uggggagggg gggcaggagg ggcucagggg gaaagcaucu acagccccug gccucucug 60  
cccuuccguc ccugucccc aaau 84

5 <210> 557  
<211> 97  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

10 <400> 557

uguucgcuuc ugguaccgga agagagguuu ucugggucuc uguuucuuug augagaauga 60  
aacacaccca gcuaaccuuu uuuucaguau caaaucc 97

15 <210> 558  
<211> 97  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

20 <400> 558

accuuuggc gaucucugcc ucucugggcc ugugucuuaug gcucuuaag aucuaacgag 60  
caaagcacag ggccugcaga gagguagcgc ucugcuc 97

25 <210> 559  
<211> 96  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 559

30 gagucugguc uuguuugggu uuguucuagg uaugguccca gggaucccag aucaaaccag 60  
gccccugggc cuauccuaga accaaccuaa acccau 96

35 <210> 560  
<211> 95  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 560

40 ccccgguuga accacguggu gugcuaguua cuuuugggcu ggagagacgg cucagggguu 60  
aagagcacag acugcucuuc cagagguccu gaguu 95

45 <210> 561  
<211> 96  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 561

augugaccgu gccucucacc cuuccauauc uagucucuga gaaaaaugaa gacuggauuc 60  
caugaagggg ugugaggccu ggaaacugga gcuuuu 96

50 <210> 562  
<211> 97  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

55 <400> 562

aguguaguga gaaguugggg ggugggaacg gcgucaugca ggaguugauu gcacagccau 60  
ucagcuccua uaugaugccu uucuuacccc ccuucaa 97

<210> 563  
 <211> 66  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 5  
 <400> 563  
 uccccaacaa uauccuggug cugagugggu gcacagugac uccagcauca gugauuuugu 60  
 ugaaga 66  
 10  
 <210> 564  
 <211> 96  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 15  
 <400> 564  
 acggggugga caccgucccu guccuccagg agcucacgua ugccugccug ugagcgccuc 60  
 gacgacagag ccagaguca cccugcacu gcccaa 96  
 20  
 <210> 565  
 <211> 96  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 25  
 <400> 565  
 aaaaugauga ugucaguugg ccggucggcc gaucgcucgg ucugucaguc agucggucgg 60  
 ucgaucgguc ggucggucag ucggcuuccu gucuuc 96  
 30  
 <210> 566  
 <211> 99  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 566  
 35  
 gaaaaugggc ucaaggugag gggugcuauuc ugugauugag ggacaugguc aauggaauug 60  
 ucucacacag aaaucgcacc cgucaccuug gccucguga 99  
 40  
 <210> 567  
 <211> 98  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 567  
 45  
 cugcagccag aguuiuuuacc agucaggcuc cuggcuagau uccagguacc aacugguacc 60  
 ugaucuagcc aaagccugac cguaagcugc aaaagaaa 98  
 50  
 <210> 568  
 <211> 96  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 568  
 55  
 acccaagucc aggccugcug accccuaguc cagugcuugu gguggcuacu gggcccugaa 60  
 cuaggggucu ggagaccugg guuugaucuc cacagg 96  
 60  
 <210> 569  
 <211> 98  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 569

ucuguguugg gcaucugucu gccugagugc cugccucucu guugcucuga aggaggcagg 60  
ggcuggggccu gcagcugccu gggcagagcu gcuccuuc 98

5 <210> 570  
<211> 97  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

10 <400> 570

gaagacucua gcauguaagg uugggggagg gggcuguguc uagcaagucu ucuuccccca 60  
cagcccugcu gucuuaaccu cuagguguuc cggcucc 97

15 <210> 571  
<211> 99  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

20 <400> 571

agaugccuug cuccuacaag aguaaagugc acgugcuuug ggacagugag gaaaauaauug 60  
uucacaaaagc ccauacacuu 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 ccauuucccu gaggagcccu uugagccuga ggugaaaaaa aaacagguca 60  
agaggcgccu gggaacugga g 81

35 <210> 573  
<211> 98  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

40 <400> 573

acccaaaccc uaggucugcu gacuccuagu ccagggcucg ugauggcugg ugggcccuga 60  
acgagggguc uggaggccug gguuugaaua ucgacagc 98

45 <210> 574  
<211> 86  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

50 <400> 574

gucugucugc ccgcaugccu gccucucugu ugcucugaag gaggcagggg cugggcccugc 60  
agcugccugg gcagagcggc uccugc 86

55 <210> 575  
<211> 68  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 575

ccaauacugu ugcuaauaug caacucuguu gaauauaaa uggauugca cuuagcaau 60  
ggugaugg 68

5 <210> 576  
<211> 66  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 576

10 aaaaggugga uauuccuucu auguuuangu uauuuuggu uaaacauaga ggaaauucca 60  
cguuuu 66

15 <210> 577  
<211> 70  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 577

20 uugaagggag aucgaccgug uuauauucgc uuauuugacu ucgaauaaua caugguugau 60  
cuuuucucag 70

25 <210> 578  
<211> 75  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 578

30 agacagagaa gccaggucac gucucugcag uuacacagcu cacgagugcc ugcuggggug 60  
gaaccugguc ugucu 75

35 <210> 579  
<211> 67  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 579

40 guggcacuca aacugugggg gcacuuucug cucucuggug aaagugccgc caucuuuuga 60  
guguuac 67

45 <210> 580  
<211> 67  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 580

50 guggggccuca aauguggagc acuaauucuga uguccaagug gaaagugcug cgacauuuga 60  
gcgucac 67

55 <210> 581  
<211> 69  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*  
<400> 581

60 gggauacuca aaaugggggc gcuuuccuuu uugucuguac ugggaagugc uucgauuuug 60  
ggguguccc 69

<210> 582  
<211> 72

## ES 2 507 544 T3

<212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 582  
 5  
 uacaucggcc auuauaaauac aaccugauaa guguuauagc acuuauacaga uuguauugua 60  
 auugucugug ua 72  
 <210> 583  
 <211> 99  
 <212> ARN  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 583  
 15  
 cauggcaccu ccguuuuccu gaggagcccu uugagccugg agugaaaaaa aaaaacaggu 60  
 caagaggcgc cugggaacug gagaagagug uuaaacuuc 99  
 <210> 584  
 <211> 79  
 <212> ARN  
 <213> *Mus musculus*  
 20  
 agacggagag accaggucac gucucugcag uuacacagcu caugagugcc ugcuggggug 60  
 gaaccugguu ugucugucu 79  
 <210> 585  
 <211> 68  
 <212> ARN  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 585  
 30  
 uaaaagguag auucuccuuc uaugaguaca auauuaauga cuaaucguag aggaaaaucc 60  
 acguuuuc 68  
 <210> 586  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 586  
 35  
 ugguauuuuaa aagguggaua uuuccuucua uuguuacgugc uuccuggaua aucauagagg 60  
 aacauccacu uuucagau ca 82  
 <210> 587  
 <211> 61  
 <212> ARN  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 587  
 45  
 aagaugguug accauagaac augcgcua cuugugugcu auguaguaug guccacaucu 60  
 u 61  
 <210> 588  
 <211> 79  
 <212> ARN  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 588  
 55

ugguacucgg agagagguua cccgagcaac uuugcaucug gaggacgaau guugcucggu 60  
 gaaccccuuu ucgguauca 79

<210> 589  
 <211> 81  
 <212> ARN  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 589

5

gggua cuuga ggagagguug ucugugauga guucgcuuu uuaaugacga auauaacaca 60  
 gauggccugu uuucaauacc a 81

10

<210> 590  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 590

15

ugguacuugg agagauagua gaccguauag cguacgcuuu aucugugacg uauguaacac 60  
 gguccacuaa cccucagau ca 82

20

<210> 591  
 <211> 80  
 <212> ARN  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 591

25

ggguauggga cggauggucg accagcugga aaguaauugu uucuaaugua cuucaccugg 60  
 uccacuagcc gucggugccc 80

30

<210> 592  
 <211> 96  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <400> 592

35

guacauaugu ugaagauuau uaauauauag aguggguguu guggugguag uaugauaugu 60  
 agaguaguag guugcauagu acgauguagu guauga 96

40

<210> 593  
 <211> 79  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 <220>  
 <223> Descripción de molécula de ADN/ARN combinada:c  
 <400> 593

45

cacacuguag gccucauuua auguuuguug aaugaaaaaa ugaaucauca acagacauua 60  
 auugggcgcc ugcucugug 79

50

<210> 594  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 <400> 594

55

|    |                                                                               |    |
|----|-------------------------------------------------------------------------------|----|
|    | cauacuucuu uauaugccca ua                                                      | 22 |
| 5  | <210> 595<br><211> 21<br><212> ARN<br><213> Secuencia artificial<br><br><220> |    |
| 10 | <220><br><223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético      |    |
| 15 | <400> 595<br>uggaauguaa agaaguaugu a                                          | 21 |
| 20 | <210> 596<br><211> 21<br><212> ARN<br><213> Secuencia artificial<br><br><220> |    |
| 25 | <220><br><223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético      |    |
| 30 | <400> 596<br>cauacuucuu uacauucugt t                                          | 21 |
| 35 | <210> 597<br><211> 21<br><212> ARN<br><213> Secuencia artificial<br><br><220> |    |
| 40 | <220><br><223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético      |    |
| 45 | <400> 597<br>uggaauguaa agaaguaugu a                                          | 21 |
| 50 | <210> 598<br><211> 21<br><212> ARN<br><213> Secuencia artificial<br><br><220> |    |
| 55 | <220><br><223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético      |    |
| 60 | <400> 598<br>cauacuucuu uacauuccat t                                          | 21 |
| 65 | <210> 599<br><211> 21<br><212> ARN<br><213> Secuencia artificial<br><br><220> |    |
|    | <220><br><223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético      |    |
|    | <400> 599<br>uggaauguaa agaaguaugu a                                          | 21 |

5 <210> 600  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <220>  
 10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 <400> 600  
 guguucacag cggaccuuga uu 22  
 15 <210> 601  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 <400> 601  
 25 uuaaggcacg cggugaaugc ca 22  
 <210> 602  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 30 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <220>  
 35 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 <400> 602  
 gcauucaccg cgugccuugg tt 22  
 40 <210> 603  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 50 <400> 603  
 uuaaggcacg cggugaaugc ca 22  
 <210> 604  
 <211> 22  
 55 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 60 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 <400> 604  
 65 gcauucaccg cgugccuuaa tt 22  
 <210> 605

<211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 10 <400> 605  
 uuaaggcacg cggugaaugc ca 22  
 <210> 606  
 <211> 19  
 15 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 <400> 606  
 25 ucuuuucaca uugugcuac 19  
 <210> 607  
 <211> 20  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 35 <400> 607  
 cagugcaaug uuaaaagggc 20  
 <210> 608  
 40 <211> 20  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 45 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 <400> 608  
 50 uaauuuuaca uugcacugtt 20  
 <210> 609  
 <211> 20  
 <212> ARN  
 55 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <220>  
 60 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 <400> 609  
 cagugcaaug uuaaaagggc 20  
 65 <210> 610  
 <211> 20

|    |                                                                 |    |
|----|-----------------------------------------------------------------|----|
|    | <212> ARN                                                       |    |
|    | <213> Secuencia artificial                                      |    |
| 5  | <220>                                                           |    |
|    | <220>                                                           |    |
|    | <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético |    |
| 10 | <400> 610<br>ccuuuuuaca uugcacugtt                              | 20 |
|    | <210> 611                                                       |    |
|    | <211> 20                                                        |    |
| 15 | <212> ARN                                                       |    |
|    | <213> Secuencia artificial                                      |    |
|    | <220>                                                           |    |
| 20 | <220>                                                           |    |
|    | <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético |    |
|    | <400> 611<br>cagugcaaug uuaaaagggc                              | 20 |
| 25 | <210> 612                                                       |    |
|    | <211> 20                                                        |    |
|    | <212> ARN                                                       |    |
|    | <213> Secuencia artificial                                      |    |
| 30 | <220>                                                           |    |
|    | <220>                                                           |    |
|    | <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético |    |
| 35 | <400> 612<br>aguuuugcau aguugcacua                              | 20 |
|    | <210> 613                                                       |    |
| 40 | <211> 23                                                        |    |
|    | <212> ARN                                                       |    |
|    | <213> Secuencia artificial                                      |    |
|    | <220>                                                           |    |
| 45 | <220>                                                           |    |
|    | <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético |    |
|    | <400> 613<br>ugugcaaauc uaugcaaaac uga                          | 23 |
| 50 | <210> 614                                                       |    |
|    | <211> 23                                                        |    |
|    | <212> ARN                                                       |    |
|    | <213> Secuencia artificial                                      |    |
| 55 | <220>                                                           |    |
|    | <220>                                                           |    |
| 60 | <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético |    |
|    | <400> 614<br>acauuugcau agauuugcac att                          | 23 |
|    | <210> 615                                                       |    |
| 65 | <211> 23                                                        |    |
|    | <212> ARN                                                       |    |

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 615  
ugugcaaauc uaugcaaaac uga 23

10 <210> 616  
<211> 23  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

20 <400> 616  
aguuuugcau agauuugcac att 23

25 <210> 617  
<211> 23  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

35 <400> 617  
ugugcaaauc uaugcaaaac uga 23

<210> 618  
<211> 22  
<212> ARN

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

45 <400> 618  
caaaauucgua ucuaggggaa ua 22

50 <210> 619  
<211> 23  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

55 <220>

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

60 <400> 619  
uaccguguag auccgaauuu gug 23

<210> 620  
<211> 23  
<212> ARN

65 <213> Secuencia artificial

<220>

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

5

<400> 620  
agaauucgga ucuacaggu att 23

10

<210> 621  
<211> 23  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

15

<220>

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

20

<400> 621  
uaccuguag auccgaauuu gug 23

25

<210> 622  
<211> 23  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

30

<220>

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

35

<400> 622  
caaauucgga ucuacaggu att 23

40

<210> 623  
<211> 23  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

45

<220>

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

50

<400> 623  
uaccuguag auccgaauuu gug 23

55

<210> 624  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

60

<220>

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

65

<400> 624  
auguuuccac agugcauca 19

<210> 625  
<211> 19  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

5      <400> 625  
 gugcauugua guugcauug                      19

10      <210> 626  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

15      <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

20      <400> 626  
 guccaacuac aaugcactt                      19

25      <210> 627  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

30      <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

35      <400> 627  
 gugcauugua guugcauug                      19

40      <210> 628  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

45      <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

50      <400> 628  
 augcaacuac aaugcactt                      19

55      <210> 629  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

60      <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

65      <400> 629  
 gugcauugua guugcauug                      19

65      <210> 630  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

65      <220>

|    |                                                                  |    |  |
|----|------------------------------------------------------------------|----|--|
|    | <220>                                                            |    |  |
|    | <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  |    |  |
| 5  | <400> 630<br>cuauacaacc uacugccuuc c                             | 21 |  |
|    | <210> 631<br><211> 22<br><212> ARN<br><213> Secuencia artificial |    |  |
| 10 | <220>                                                            |    |  |
|    | <220>                                                            |    |  |
| 15 | <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  |    |  |
|    | <400> 631<br>ugagguagua gguugugugg uu                            | 22 |  |
| 20 | <210> 632<br><211> 22<br><212> ARN<br><213> Secuencia artificial |    |  |
| 25 | <220>                                                            |    |  |
|    | <220>                                                            |    |  |
|    | <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  |    |  |
| 30 | <400> 632<br>ccacacaacc uacuaucua tt                             | 22 |  |
|    | <210> 633<br><211> 22<br><212> ARN<br><213> Secuencia artificial |    |  |
| 35 | <220>                                                            |    |  |
|    | <220>                                                            |    |  |
| 40 | <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  |    |  |
|    | <400> 633<br>ugagguagua gguugugugg uu                            | 22 |  |
| 45 | <210> 634<br><211> 22<br><212> ARN<br><213> Secuencia artificial |    |  |
| 50 | <220>                                                            |    |  |
|    | <220>                                                            |    |  |
|    | <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  |    |  |
| 55 | <400> 634<br>ccacacaacc uacuaccua tt                             | 22 |  |
|    | <210> 635<br><211> 22<br><212> ARN<br><213> Secuencia artificial |    |  |
| 60 | <220>                                                            |    |  |
| 65 | <220>                                                            |    |  |

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 <400> 635  
 ugagguagua gguugugugg uu 22  
 <210> 636  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 10 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 15 <400> 636  
 aacaacauga aacuaccuat t 21  
 <210> 637  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 25 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 30 <400> 637  
 uagguaguuu cauguuguug g 21  
 <210> 638  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 35 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <220>  
 40 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 <400> 638  
 caaaucgua ucuaggggaa ua 22  
 45 <210> 639  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 50 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 55 <400> 639  
 uagguaguuu cauguuguug g 21  
 <210> 640  
 <211> 21  
 60 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 65 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

|    |                                                                                       |    |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
|    | <400> 640<br>aauaacauga aacuaccuat t                                                  | 21 |
| 5  | <210> 641<br><211> 21<br><212> ARN<br><213> Secuencia artificial                      |    |
| 10 | <220><br><br><220><br><223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético |    |
| 15 | <400> 641<br>uagguaguuu cauguuguug g                                                  | 21 |
| 20 | <210> 642<br><211> 19<br><212> ARN<br><213> Secuencia artificial                      |    |
| 25 | <220><br><br><220><br><223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético |    |
| 30 | <400> 642<br>augcaacuac aaugcactt                                                     | 19 |
| 35 | <210> 643<br><211> 19<br><212> ARN<br><213> Secuencia artificial                      |    |
| 40 | <220><br><br><220><br><223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético |    |
| 45 | <400> 643<br>gugcauugua guugcauug                                                     | 19 |
| 50 | <210> 644<br><211> 19<br><212> ARN<br><213> Secuencia artificial                      |    |
| 55 | <220><br><br><220><br><223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético |    |
| 60 | <400> 644<br>augcaacuac aaugcactt                                                     | 19 |
| 65 | <210> 645<br><211> 19<br><212> ARN<br><213> Secuencia artificial                      |    |
|    | <220><br><br><220><br><223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético |    |
|    | <400> 645                                                                             |    |

|    |                                                                          |    |
|----|--------------------------------------------------------------------------|----|
|    | gugcauugua guugcauug                                                     | 19 |
| 5  | <210> 646<br><211> 19<br><212> ARN<br><213> Secuencia artificial         |    |
|    | <220>                                                                    |    |
| 10 | <220><br><223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético |    |
| 15 | <400> 646<br>augcaacuac aaugcactt                                        | 19 |
| 20 | <210> 647<br><211> 19<br><212> ARN<br><213> Secuencia artificial         |    |
|    | <220>                                                                    |    |
| 25 | <220><br><223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético |    |
| 30 | <400> 647<br>gugcauugua guugcauug                                        | 19 |
| 35 | <210> 648<br><211> 19<br><212> ARN<br><213> Secuencia artificial         |    |
|    | <220>                                                                    |    |
| 40 | <220><br><223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético |    |
| 45 | <400> 648<br>augcaacuac aaugcactt                                        | 19 |
| 50 | <210> 649<br><211> 19<br><212> ARN<br><213> Secuencia artificial         |    |
|    | <220>                                                                    |    |
| 55 | <220><br><223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético |    |
| 60 | <400> 649<br>gugcauugua guugcauug                                        | 19 |
| 65 | <210> 650<br><211> 19<br><212> ARN<br><213> Secuencia artificial         |    |
|    | <220>                                                                    |    |
|    | <220><br><223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético |    |
|    | <400> 650<br>augcaacuac aaugcactt                                        | 19 |

5 <210> 651  
 <211> 19  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 10 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 <400> 651  
 gugcauugua guugcauug 19  
 15 <210> 652  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 25 <400> 652  
 ccacacaacc uacuaccuca tt 22  
 <210> 653  
 <211> 22  
 30 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 35 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 <400> 653  
 ugagguagua gguugugugg uu 22  
 40 <210> 654  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 50 <400> 654  
 ccacacaacc uacuaccuca tt 22  
 <210> 655  
 <211> 22  
 55 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 60 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 <400> 655  
 65 ugagguagua gguugugugg uu 22

5  
 <210> 656  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 10  
 <400> 656  
 ccacacaacc uacuaccuca tt 22  
 <210> 657  
 15  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 <400> 657  
 25  
 ugagguagua gguugugugg uu 22  
 <210> 658  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 30  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <220>  
 35  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 <400> 658  
 ccacacaacc uacuaccuca tt 22  
 40  
 <210> 659  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 45  
 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 50  
 <400> 659  
 ugagguagua gguugugugg uu 22  
 <210> 660  
 <211> 21  
 55  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 60  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 <400> 660  
 cauacuucuu uacauccat t 21  
 65  
 <210> 661

<211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 10 <400> 661  
 uggauguaa agaaguaugu a 21  
 <210> 662  
 <211> 21  
 15 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 <400> 662  
 25 cauacuucuu uacauccat t 21  
 <210> 663  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 35 <400> 663  
 uggauguaa agaaguaugu a 21  
 <210> 664  
 40 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 45 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 <400> 664  
 50 gcauucaccg cgugccuuaa tt 22  
 <210> 665  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 55 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <220>  
 60 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 <400> 665  
 uuaaggcacg cggugaaugc ca 22  
 65 <210> 666  
 <211> 22

<212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 5  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 <400> 666  
 10 gcauucaccg cgugccuuaa tt 22  
 <210> 667  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 15 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <220>  
 20 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 <400> 667  
 uuaaggcacg cggugaaugc ca 22  
 25 <210> 668  
 <211> 20  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 35 <400> 668  
 ccuuuuuaca uugcacugtt 20  
 <210> 669  
 <211> 20  
 40 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 45 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 <400> 669  
 50 cagugcaaug uuaaaagggc 20  
 <210> 670  
 <211> 20  
 <212> ARN  
 55 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <220>  
 60 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético  
 <400> 670  
 ccuuuuuaca uugcacugtt 20  
 <210> 671  
 65 <211> 20  
 <212> ARN

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 671  
cagugcaaug uuaaaagggc 20

10 <210> 672  
<211> 23  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

20 <400> 672  
caaaauucgga ucuacaggu att 23

25 <210> 673  
<211> 23  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

30 <220>

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

35 <400> 673  
uaccuguag auccgaauuu gug 23

40 <210> 674  
<211> 23  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

45 <400> 674  
caaaauucgga ucuacaggu att 23

50 <210> 675  
<211> 23  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

55 <220>

<220>  
<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

60 <400> 675  
uaccuguag auccgaauuu gug 23

<210> 676  
<211> 21  
<212> ARN  
<213> Secuencia artificial

65

<220>

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

5

<400> 676  
uauacaagag augaaauccu c 21

10

<210> 677  
<211> 64  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 677  
ccccgcgacg agccccucgc acaaaccgga ccugagcguu uuguucguuc ggcucgcgug 60  
aggc 64

20

<210> 678  
<211> 68  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

25

<400> 678  
uaaaagguag auucuccuuc uaugaguaca uuauuuuuga uuaaucuag aggaaaaucc 60  
acguuuuc 68

30

<210> 679  
<211> 69  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

35

<400> 679  
uugagcagag guugcccuug gugaauucgc uuauuuuug uugaaucaca caaaggcaac 60  
uuuuguuug 69

40

<210> 680  
<211> 66  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

45

<400> 680  
agggcuccug acuccagguc cuguguguua ccuagaaaua gcacuggacu uggagucaga 60  
aggccu 66

50

<210> 681  
<211> 67  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

55

<400> 681  
agagauggua gacuauggaa cguaggcguu augauuucug accuauguua caugguccac 60  
uaacucu 67

<210> 682  
<211> 61  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 682

aagaugguug accauagaac augcgcuauuc ucugugucgu auguaauaug guccacaucu 60  
u 61

5 <210> 683  
<211> 75  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 683

uacuuaaagc gagguugccc uuuguauauu cgguuuauug acauggaaua uacaagggca 60  
agcucucugu gagua 75

15 <210> 684  
<211> 76  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 684

uacuugaaga gaaguuguuc gugguggauu cgcuuuacuu augacgaauc auucacggac 60  
aacacuuuuu ucagua 76

25 <210> 685  
<211> 73  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 685

30 cuccucagau cagaagguga uuguggcuuu ggguggauau uaucagcca cagcacugcc 60  
uggucagaaa gag 73

35 <210> 686  
<211> 88  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 686

40 uguuaaaauca ggaauuuuaa acaauuccua gacaauaugu auaauguua uaagucuuuc 60  
cuagaaaauug uucauaaugc cuguaaca 88

45 <210> 687  
<211> 90  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 687

gagagaagca cuggacuuag ggucagaagg ccugagucuc ucugcugcag augggcucuc 60  
ugucccugag ccaagcuuug uccucccugg 90

50 <210> 688  
<211> 94  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

55 <400> 688

auaaaggaag uuaggcugag gggcagagag cgagacuuuu cuauuuucca aaagcucggg 60  
cugaggcccc ucagucuuug uuccuaaccc gcgc 94

<210> 689  
 <211> 98  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 689  
 cgagggggaau cagcagcaau ucauguuuug aaguguucua aaugguuca aacgugaggc 60  
 gcugcuauac cccucgugg ggaagguaga aggugggg 98  
 10  
 <210> 690  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 15  
 <400> 690  
 gaaagcgcuu uggaaugaca cgaucacucc cguugagugg gcacccgaga agccaucggg 60  
 aaugucgugu ccgccagug cucuuuc 87  
 20  
 <210> 691  
 <211> 111  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25  
 <400> 691  
 gccgggaggu ugaacauccu gcuaugugcu gccaggaaau cccuauuuca uauaagaggg 60  
 ggcuggcugg uugcauauu aggauguccc aucucccagc ccacuucguc a 111  
 30  
 <210> 692  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 692  
 35  
 cgccggccga ugggcgucuu accagacaug guuagaccug gccucuguc uauuacuguc 60  
 ugguaaaacc guccauccgc ugc 83  
 40  
 <210> 693  
 <211> 91  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 693  
 45  
 cuguguguga ugagcuggca guguauguu agcugguuga auaugugaau ggcaucggcu 60  
 aacaugcaac ugcugucuua uugcauauac a 91  
 50  
 <210> 694  
 <211> 91  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 694  
 55  
 aaacgauacu aaacuguuuu ugcgaugugu uccuaauaug cacuaauaa uauuugggaa 60  
 cauuuugcau guauaguuuu guaucaauu a 91  
 <210> 695  
 <211> 85  
 <212> ARN  
 <213> *Mus musculus*

<400> 695

aaagugcuuu ggaaugacac gaucacuccc guugaguggg cacccaagaa gccaucggga 60  
augucguguc cgcccagugc ucuuu 85

5 <210> 696  
<211> 112  
<212> ARN  
<213> *Mus musculus*

10 <400> 696

acgaggaggu ugaacaucuu gcuaugugcu gccaggaaau cccuacuua uacuaagagg 60  
gggcuggcug guugcauau uaggauugucc caucuccugg cccacuucgu ca 112

15 <210> 697  
<211> 83  
<212> ARN  
<213> *Mus musculus*

20 <400> 697

ccugcugaug gaugucuua cagacauggu ugaucugga ugcaucuguc uauuacuguc 60  
ugguaaugcc guccauccac ggc 83

25 <210> 698  
<211> 91  
<212> ARN  
<213> *Mus musculus*

<400> 698

30 cuguguguga uggcuuggca guguauguu agcugguuga guauggagc ggcaccagcu 60  
aacaugcgac ugcucuccua uugcacacac a 91

<210> 699  
<211> 91  
<212> ARN  
<213> *Mus musculus*

35 <400> 699

gagagauacu gagcuguuuu ugcaugugu uccuaauaug ugcuaauuu auauugggaa 60  
cauuuugcau aaauagcuu gugucaauac a 91

40 <210> 700  
<211> 112  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

45 <400> 700

acggggaggu ugaacaucuu gcuaugugcu gccaggaaau cccuacuua uacuaagagg 60  
gggcuggcug guugcauau uaggauugucc caucucccg cccacuucgu ca 112

50 <210> 701  
<211> 85  
<212> ARN  
<213> *Rattus norvegicus*

55 <400> 701

ugccugcuga uggaugucuu accagacaug guuagaucug gaugauucug ucuaauacug 60  
ucugguaaug ccguccaucc auggc 85

<210> 702  
 <211> 91  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 5  
 <400> 702  
 cugugugcga uggguuggca guguauguu agcugguuga guaanguaaa ggcaccagcu 60  
 aacaugcaac ugcucuccua ugcacauac a 91  
 10  
 <210> 703  
 <211> 91  
 <212> ARN  
 <213> *Rattus norvegicus*  
 15  
 <400> 703  
 gagagaugcg gagcuguuuu ugcgaugugu uccuaaugug ugcuaacauu auauugggaa 60  
 cauuuugcau aaauaguuu acaucgacac a 91  
 20  
 <210> 704  
 <211> 100  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25  
 <400> 704  
 ccaaagaaag augcuaaacu auuuuugcga uguguuccua auauguaaua uaaauguauu 60  
 ggggacauuu ugcauucuaa guuuuguauc aauaauaugg 100  
 30  
 <210> 705  
 <211> 72  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 705  
 cuugggaaug gcaaggaaac cguuaccauu acugaguuuu guaauagguaa ugguucucuu 60  
 gcuauaccga ga 72  
 35  
 <210> 706  
 <211> 85  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 40  
 <400> 706  
 gcuaagcacu uacaacuguu ugcagaggaa acugagacuu uguaacuaug ucucagucuc 60  
 aucugcaaag aaguaagugc uuugc 85  
 45  
 <210> 707  
 <211> 22  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 50  
 <400> 707  
 gagguugucc guggugaguu cg 22  
 55  
 <210> 708  
 <211> 96  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 60

<400> 708

ucccuggcggu gaggguaugu gccuuuggac uacaucgugg aagccagcac caugcagucc 60  
augggcgauau acacuugccu caaggccuau gucauc 96

5 <210> 709  
<211> 76  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 709

gaggggggaag acgggaggaa agaagggagu gguuccauca cgccuccuca cuccucuccu 60  
cccguuucu ccucuc 76

15 <210> 710  
<211> 63  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 710

gucaggcuca guccccuccc gauaaacccc uaaauaggga cuuucccgagg gggugacccu 60  
ggc 63

25 <210> 711  
<211> 73  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 711

30 acuuggagag aggcuggccg ugaugaauc gauucauca agcgagucac acacggcucu 60  
ccucucuuuu agu 73

35 <210> 712  
<211> 68  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 712

40 guauccugua cugagcugcc ccgagcuggg cagcaugaag ggccucgggg cagcucagua 60  
caggaugc 68

45 <210> 713  
<211> 80  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 713

gguacuugaa gagugguuau ccugcugug uucgcuuau uuaugacgaa ucauacaggg 60  
acauccaguu uuucaguauc 80

50 <210> 714  
<211> 83  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

55 <400> 714

gagaaucauc ucucccagau aauggcacuc ucaaacaagu uucaaaauug uuugaaaggc 60  
uaauucuuug ucagaugacu cuc 83

<210> 715  
 <211> 84  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 715  
 guggcagcuu gguggucgua ugugugacgc cauuuacuug aaccuuuagg agugacauca 60  
 cauauacggc agcuaaacug cuac 84  
 10  
 <210> 716  
 <211> 128  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 15  
 <400> 716  
 uggaggccuu gcugguuugg aaaguucuu guucgacacc auggaucucc agggugguca 60  
 aguuuagaga ugcaccaacc uggaggacuc caugcuguug agcuguucac aagcagcgga 120  
 cacuucca 128  
 20  
 <210> 717  
 <211> 84  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25  
 <400> 717  
 uugacuuagc uggguagugg ggaacccuuc caugaggagu agaacacucc uuaucaaga 60  
 uucccuucua ccuggcuggg uugg 84  
 30  
 <210> 718  
 <211> 116  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 718  
 35  
 caacuacagc cacuacuaca ggaccaucga ggaccugcgg gacaagauuc uggugccac 60  
 cauugagaac gccaggauug uccugcagau caacaugcu caacuggcug cagaug 116  
 40  
 <210> 719  
 <211> 89  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 719  
 45  
 cuggccucca gggcuuugua caugguaggc uuucuuuau ucguuugcac auucggugaa 60  
 ggucuacugu gugccaggcc cugugccag 89  
 50  
 <210> 720  
 <211> 24  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 720  
 ugaaacauac acgggaaacc ucuu 24  
 55  
 <210> 721  
 <211> 82  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 721

ugguaccuga aaagaaguug cccauguuau uuucgcuua uaugugacga aacaaacaug 60  
gugcacuucu uuucgguau ca 82

5 <210> 722  
<211> 17  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 722  
auuacauggc caaucuc 17

<210> 723  
<211> 21  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

15

<400> 723  
cagcagcaca cugugguuug u 21

20

<210> 724  
<211> 124  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

25

<400> 724

aaccuccuu gggaagugaa gcucaggcug ugauuuaag ccagggggcg uuuuucuaua 60  
acuggaugaa aagcaccucc agagcuugaa gcucacaguu ugagagcaau cgucuaagga 120  
agu 124

30 <210> 725  
<211> 122  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

35 <400> 725

gcccuguccc cugugccuug ggcggggcggc uguuaagacu ugcagugaug uuuuacuccu 60  
cuccacguga acaucacagc aagucugugc ugcuucccgu cccuacgcug ccugggcagg 120  
gu 122

40 <210> 726  
<211> 84  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 726

45 gcucucccuc ucuaauccuu gcuaccuggg ugagagugcu gucugaaugc aaugcaccug 60  
ggcaaggauu cugagagcga gagc 84

<210> 727  
<211> 84  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

50

<400> 727

55 gcucuuccuc ucuaauccuu ugucccuggg ugagagugcu uucugaaugc aaugcaccgg 60  
ggcaaggauu cugagagggu gagc 84

<210> 728  
<211> 55

<212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 <400> 728  
 5 auccuugcua ucugggugcu agugcuggcu caaugcaug caccugggca aggau 55  
  
 <210> 729  
 <211> 71  
 <212> ARN  
 10 <213> *Homo sapiens*  
  
 <400> 729  
  
 ugcccuagca gcgggaacag uucugcagug agcgauccgu gcucugggggu auuguuuccg 60  
 cugccaggggu a 71  
 15  
 <210> 730  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 20  
 <400> 730  
  
 gcugcuguug ggagaccug gucugcacuc uaucuguauu cuuacugaag ggagugcagg 60  
 gcagggguuuc ccuacagag ggc 83  
 25  
 <210> 731  
 <211> 84  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 30  
 <400> 731  
  
 gaugcaccca gugggggagc caggaaguau ugauguuucu gccaguuuag cgucaacacu 60  
 ugcugguuuc cucucuggag cauc 84  
 35  
 <210> 732  
 <211> 124  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 40  
 <400> 732  
  
 gccaccacca ucagccauac uauguguagu gccuuauca ggaagguguu acuuauuaga 60  
 uuaauuuug uaaggcacc uucugaguag aguaaugugc aacauggaca acuuuugugg 120  
 uggc 124  
 45  
 <210> 733  
 <211> 94  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 733  
  
 gugcugugug uagugcuca cuucaagaag ugccaugcau gugucuagaa auauguuuug 60  
 caccuuuugg agugaaauaa ugcacaacag auac 94  
 50  
 <210> 734  
 <211> 115  
 <212> ARN  
 55 <213> *Homo sapiens*

<400> 734

ccaccuucag cugaguguag ugcccuacuc cagagggcgu cacucaugua aacuaaaaca 60  
 uguauuguagc cuuuuggagu agaguaauac acaucacgua acgcauauuu ggugg 115

5 <210> 735  
 <211> 94  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 735

caugcugugu gugguacccu acugcagaca guggcaauca uguauaaaua aaaaugauug 60  
 guacgucugu gguagagua cugcaugaca caug 94

15 <210> 736  
 <211> 74  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 736

gugguguccu acucaggaga guggcaauca cauguaauua ggugugauug aaaccucuaa 60  
 gaguggagua acac 74

25 <210> 737  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 737

30 caauagacac ccaucguguc uuuugcucug cagucaguaa auauuuuuuu gugaauugu 60  
 agcaaaagac agaauuggug uccaug 87

35 <210> 738  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 738

40 caauagacac ccaucguguc uuuugcucug cagucaguaa auauuuuuuu gugaauugu 60  
 agcaaaagac agaauuggug uccaug 87

45 <210> 739  
 <211> 84  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 739

ucucagucug uggcacucag ccuugagggc acuuucuggu gccagaauga aagugcuguc 60  
 auagcugagg uccaauagacu gagg 84

50 <210> 740  
 <211> 98  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

55 <400> 740

gguacuucuc agucuguggc acucagccuu gagggcacuu ucuggugcca gaaugaaagu 60  
 gcugucauag cugaggucca augacugagg cgagcacc 98

<210> 741  
 <211> 129  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 741  
 gggauGCCac auucagccau ucagcguaca gugccuuca cagggaggug ucauuuauug 60  
 gaacuaaaau auaaaauuca ccuuucugag aaggguaaug uacagcaugc acugcauauug 120  
 ugguguccc 129  
 10  
 <210> 742  
 <211> 127  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 15  
 <400> 742  
 ggaugccaca uucagccauu cagugugcag ugccuuucac agggaggugu cauuuauug 60  
 aacuaaaaua uaaauuucac cuuucugaga aggguaauug acagcaugca cugcauauug 120  
 ggugucc 127  
 20  
 <210> 743  
 <211> 58  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25  
 <400> 743  
 cuacucugga gagugacaau cauguauaau uaaauuugau ugacacuucu gugaguag 58  
 30  
 <210> 744  
 <211> 58  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 744  
 cuacucugga gagugacaau cauguauaac uaaauuugau ugacacuucu gugaguag 58  
 35  
 <210> 745  
 <211> 58  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 40  
 <400> 745  
 cuacucugga gagugacaau cauguauaac uaaauuugau ugacacuucu gugaguag 58  
 45  
 <210> 746  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 746  
 ucucaugcag ucauucucca aaagaaagca cuuucuguug ucugaaagca gagugccuuc 60  
 uuuuggagcg uuacuguuug aga 83  
 50  
 <210> 747  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 55  
 <400> 747  
 ucucaugcag ucauucucca aaagaaagca cuuucuguug ucugaaagca gagugccuuc 60  
 uuuuggagcg uuacuguuug aga 83

<210> 748  
 <211> 90  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 748  
 ucucagggcug ugaccuucuc gaggaaagaa gcacuuucug uugucugaaa gaaaagaaag 60  
 ugcuuccuuu cagagggguu cgguuugaga 90  
 10  
 <210> 749  
 <211> 90  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 15  
 <400> 749  
 ucucagguug ugaccuucuc gaggaaagaa gcacuuucug uugucugaaa gaaaagaaag 60  
 ugcuuccuuu cagagggguu cgguuugaga 90  
 20  
 <210> 750  
 <211> 85  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25  
 <400> 750  
 ucucaugaug ugaccaucug gagguaagaa gcacuuugug uuuugugaaa gaaagugcuu 60  
 ccuuucagag gguuacucuu ugaga 85  
 30  
 <210> 751  
 <211> 90  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 751  
 35  
 ucucagggcug ugaccaucug gagguaagaa gcacuuucug uuuugugaaa gaaaagaaag 60  
 ugcuuccuuu cagagggguu cucuuugaga 90  
 40  
 <210> 752  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 752  
 45  
 ucucagggcag ugaccucua gauggaagca cugucuguug uauaaaagaa aagaucgugc 60  
 auccuuuuag aguguuacug uuugaga 87  
 50  
 <210> 753  
 <211> 67  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 753  
 55  
 gugaccucuu agauggaagc acugucuguu gucuaagaaa agaucgugca uccuuuuaga 60  
 guguuac 67  
 <210> 754  
 <211> 95  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 754

gaagaucuca ggcagugacc cucuagaugg aagcacuguc uguugucuaa gaaaagaucg 60  
 ugaucuuuu uagaguguua cuguuugaga aaauC 95

5 <210> 755  
 <211> 85  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 755

ucucaagcug ugacugcaaa gggaagcccu uucuguuguc ugaaagaaga gaaagcgcuu 60  
 cccuuugcug gauuacgguu ugaga 85

15 <210> 756  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 756

ucucaagcug ugggucugca aagggaagcc cuuucuguug ucuaaaagaa gagaaagcgc 60  
 uuuccuuugc uggauuacgg uuugaga 87

25 <210> 757  
 <211> 83  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 757

ucaugcugug gccuccaga gggaagcgc uucuguuguc ugaaagaaaa caaagcgcuc 60  
 cccuuuagag guuuacgguu uga 83

35 <210> 758  
 <211> 101  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 758

gcgagaagau cucaugcugu gacucucugg agggaagcac uuucuguugu cugaaagaaa 60  
 acaaagcgc ucucuuuaga guguuacgg uuagaaaaag c 101

45 <210> 759  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 759

ucccaugcug ugaccucua gagggaagca cuuucuguug ucugaaagaa accaaagcgc 60  
 uuuccuuugg agcguuacgg uuugaga 87

55 <210> 760  
 <211> 88  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

60 <400> 760

ucucaggcug ugaccucua gagggaagcg cuuucuguug gcuaaaagaa aagaaagcgc 60  
 uuuccuuag aguguuaacg cuuugaga 88

<210> 761  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 761  
 ucucaugcug ugacccucua gagggaagca cuuucucuug ucuaaaagaa aagaaagcgc 60  
 uucucuuuag aggauuacuc uuugaga 87  
 10  
 <210> 762  
 <211> 85  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 15  
 <400> 762  
 cucagggcugu gacacucuag agggaagcgc uuucuguugu cugaaagaaa ggaaagugca 60  
 uccuuuuuaga guguuacugu uuugag 85  
 20  
 <210> 763  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25  
 <400> 763  
 ucucagggcug uguccucua caggggaagcg cuuucuguug ucugaaagaa aggaaagugc 60  
 auccuuuuag aguguuacug uuugaga 87  
 30  
 <210> 764  
 <211> 81  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 764  
 35  
 caugcuguga cccucuagag ggaagcgcuu ucuguugucu gaaagaaaag aaagugcauc 60  
 cuuuuagagg uuucacuguu g 81  
 40  
 <210> 765  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 765  
 45  
 ucucagccug ugacccucua gagggaagcg cuuucuguug ucugaaagaa aagaaagugc 60  
 aucuuuuuag aggauuacag uuugaga 87  
 50  
 <210> 766  
 <211> 88  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 766  
 55  
 ucccaugcug ugacccucca aagggaagcg cuuucuguuu guuuucucu aaacaaagug 60  
 ccucccuua gaguguuacc guuugga 88  
 <210> 767  
 <211> 84  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 767

ucucaugcag ucauucucca aaagggagca cuuucuguuu gaaagaaaac aaagugccuc 60  
 cuuuuagagu guuacuguuu gaga 84

5 <210> 768  
 <211> 85  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 768

cucagggcugu gaccuccag aggggaaguac uuucuguugu cugagagaaa agaaagugcu 60  
 ucccuuugga cuguuucggu uuagag 85

15 <210> 769  
 <211> 61  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 769

cccucuacag ggaagcgcuu ucuguugucu gaaagaaaag aaagugcuuc cuuuuagagg 60  
 g 61

25 <210> 770  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 770

30 ucucagggcug ucguccucua gaggggaagca cuuucuguug ucugaaagaa aagaaagugc 60  
 uuccuuuuag aggguuaccg uuugaga 87

35 <210> 771  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 771

40 ucucaagcug ugagucuaca aaggggaagcc cuuucuguug ucuaaaagaa aagaaagugc 60  
 uuucuuuugg uggguuaccg uuugaga 87

45 <210> 772  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 772

50 ucuccugcug ugacccucaa gauggaagca guuucuguug ucugaaagga aagaaagugc 60  
 uuccuuuuug aggguuacug uuugaga 87

55 <210> 773  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 773

ucucagggcug ugacccucua aaggggaagcg cuuucugugg ucagaaagaa aagcaagugc 60  
 uuccuuuuag aggguuaccg uuuggga 87

<210> 774  
 <211> 90  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 5  
 <400> 774  
 ucccaugcug ugacccucua gaggaagcac uuucuguuug uugucugaga aaaaacaaag 60  
 ugcuucccuu uagaguguua ccguuuggga 90  
 10  
 <210> 775  
 <211> 88  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 15  
 <400> 775  
 ucccaugcug ugacccucua gaggaagcac uuucuguuug uugucugaga aaaaacaaag 60  
 ugcuucccuu uagaguuacu guuuggga 88  
 20  
 <210> 776  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 25  
 <400> 776  
 ucucagggcug ugacccucca aaggggaagaa cuuucuguug ucuaaaagaa aagaacgcac 60  
 uucccuuuag aguguuaccg ugugaga 87  
 30  
 <210> 777  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 35  
 <400> 777  
 ucucgggcug ugacucucca aaggggaagaa uuuucucuug ucuaaaagaa aagaacgcac 60  
 uucccuuuag aguguuaccg ugugaga 87  
 40  
 <210> 778  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 45  
 <400> 778  
 ucucagggcug uguccucua gaggggaagcg cuuucuguug ucugaaagaa aagaaaaugg 60  
 uucccuuuag aguguuaccg uuugaga 87  
 50  
 <210> 779  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*  
 55  
 <400> 779  
 ucucaugcug ugacccucua gaggggaagcg cuuucuguug ucugaaagaa aagaacgcgc 60  
 uucccuauag aggguuaccc uuugaga 87  
 60  
 <210> 780  
 <211> 87  
 <212> ARN  
 <213> *Homo sapiens*

# ES 2 507 544 T3

<400> 780

ucucaugcug ugacccuaca aagggaagca cuuucucuug uccaaaggaa agaaggcgc 60  
uucccuuugg aguguuacgg uuugaga 87

5 <210> 781  
<211> 85  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 781

cucaagcugu gacucuccag agggaugcac uuucucuau gugaaaaaa agaaggcgc 60  
ucccuuuaga gcguuacgg uuugg 85

15 <210> 782  
<211> 85  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 782

cucaggcugu gaccucuag agggaagcac uuucuguugc uugaaagaag agaaagcgc 60  
uccuuuuaga ggauuacucu uugag 85

25 <210> 783  
<211> 65  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 783

30 gugaccucu agagggaagc acuuucuguu gaaagaaaag acaugcauc cuuucagagg 60  
guuac 65

35 <210> 784  
<211> 83  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 784

40 ucaggcugug acccucuuga gggaagcacu uucuguuguc ugaaagaaga gaaagugcuu 60  
ccuuuuagag gcuuacuguc uga 83

45 <210> 785  
<211> 85  
<212> ARN  
<213> *Homo sapiens*

<400> 785

50 ucucaagcug ugacugcaaa gggaagcccu uucuguuguc uaaaagaaaa gaaagugcuu 60  
cccuuuggug aaauacgguu ugaga 85

55 <210> 786  
<211> 72  
<212> ARN  
<213> *Mus musculus*

<400> 786

cuugggaug gcgaggaaac cguuaccau acugaguuaa guaaugguua cgguucucu 60  
gcugcuccca ca 72

<210> 787  
 <211> 85  
 <212> ARN  
 <213> *Mus musculus*  
 5  
 <400> 787  
 gcuaagcagu uacaacuguu ugcagaggaa acugagacuu uauaacuaug ucucagucuc 60  
 aucugcaaag agguaagugc uuugc 85  
 10  
 <210> 788  
 <211> 75  
 <212> ARN  
 <213> *Mus musculus*  
 15  
 <400> 788  
 cuuuaccuaa uuuguugucc aucauguaaa acauaaauga ugauagacac cauauaaggu 60  
 agaggaaggu ucacu 75  
 20  
 <210> 789  
 <211> 71  
 <212> ARN  
 <213> *Mus musculus*  
 25  
 <400> 789  
 accuuguuuau gggggucugg gguaaggagu ggucaucagg ggguaacuacc aaguuuuauuc 60  
 ugugagauag a 71  
 30  
 <210> 790  
 <211> 74  
 <212> ARN  
 <213> *Mus musculus*  
 35  
 <400> 790  
 gcccuauuuu gaauggcacu gaugugauaa aauaaaaau ugaucagggc cuuucuaagu 60  
 agaguaaggc uuac 74  
 40  
 <210> 791  
 <211> 73  
 <212> ARN  
 <213> *Mus musculus*  
 45  
 <400> 791  
 uauauguguu uaugugugug uacauguaca uaugugaaua ugauauccau auacauacac 60  
 gcacacauaa gac 73  
 50  
 <210> 792  
 <211> 71  
 <212> ARN  
 <213> *Mus musculus*  
 55  
 <400> 792  
 gugccugugu gcguaagugc cugcauguau augcguguau auuuuauugca uauacauaca 60  
 cacaccuaca c 71  
 60  
 <210> 793  
 <211> 78  
 <212> ARN  
 <213> *Mus musculus*

<400> 793

    auaagaaacu uggcgugucg ugacugaugu acugauaaga aacucagugu gauaugacug 60  
    augugcgugu gucugucu 78

5     <210> 794  
    <211> 74  
    <212> ARN  
    <213> *Mus musculus*

10    <400> 794

    cgcggugccu cuuucuuuga ucuugguguc cucaauuuga aagccaagga agaggugggg 60  
    ggcgugguag ccuu 74

15    <210> 795  
    <211> 75  
    <212> ARN  
    <213> *Mus musculus*

20    <400> 795

    cagugcucuu cuuggacugg cacuggugag uuaaacuaaa uacaaccagu accuuucuga 60  
    gaagaguaaa gcuca 75

25    <210> 796  
    <211> 67  
    <212> ARN  
    <213> *Mus musculus*

30    <400> 796

    gugcuuuacg uaguauagug cuuuucacau uaaacaaaaa gugaaaggug ccuacuaug 60  
    uauagga 67

35    <210> 797  
    <211> 73  
    <212> ARN  
    <213> *Mus musculus*

40    <400> 797

    gagggggaag acgggagaag agaagggagu gguuuuuggg ugccucacuc cucccccucc 60  
    gucuuguucu cuc 73

45    <210> 798  
    <211> 58  
    <212> ARN  
    <213> *Mus musculus*

50    <400> 798

    gucaggcuca gucccccucc gauaaccuc aaaauagggg cuuaccuagg gggcuggc 58

55    <210> 799  
    <211> 73  
    <212> ARN  
    <213> *Mus musculus*

    <400> 799

    acuuggagag aggcuggccg ugaugaauc gauucaucua aacgagucan acacggcucu 60  
    ccucucuucu agu 73

    <210> 800  
    <211> 65

ES 2 507 544 T3

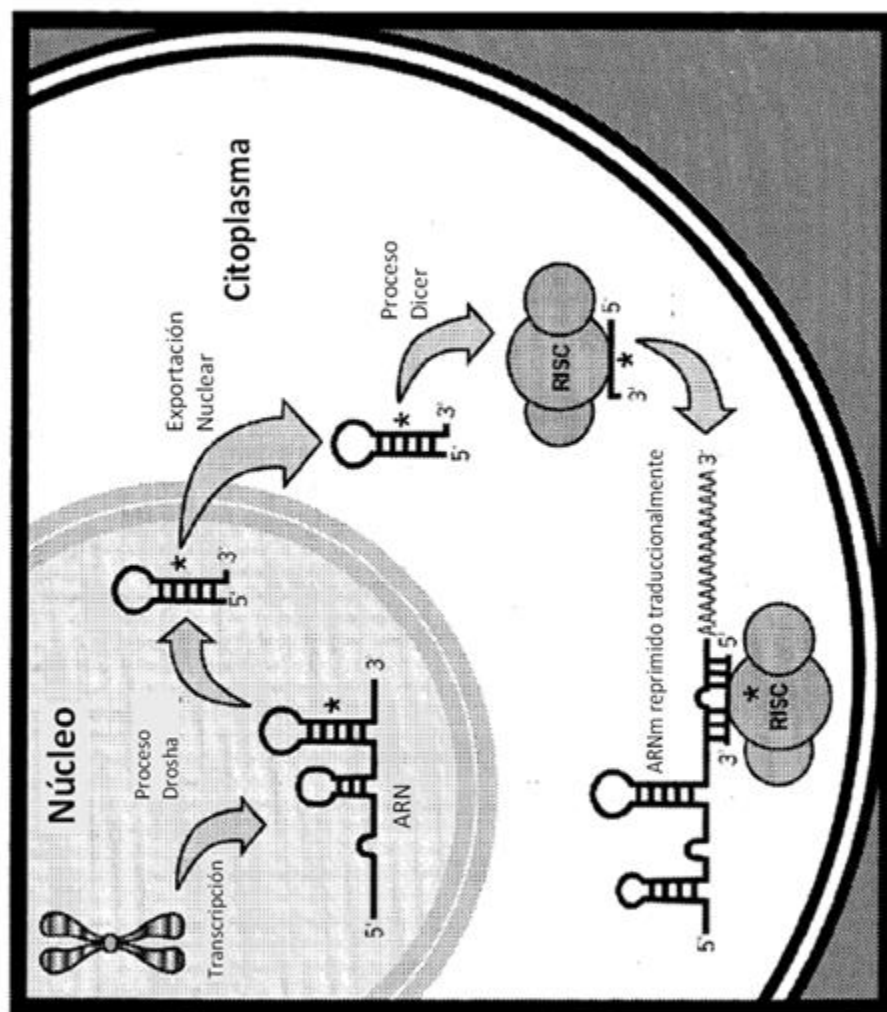
|    |                                                                                     |          |
|----|-------------------------------------------------------------------------------------|----------|
|    | <212> ARN                                                                           |          |
|    | <213> <i>Mus musculus</i>                                                           |          |
|    | <400> 800                                                                           |          |
| 5  | gcauccugua cugagcugcc ccgagcugag cacagugaag gaccucgggg cagcucagua<br>cagga          | 60<br>65 |
|    | <210> 801                                                                           |          |
|    | <211> 72                                                                            |          |
| 10 | <212> ARN                                                                           |          |
|    | <213> <i>Rattus norvegicus</i>                                                      |          |
|    | <400> 801                                                                           |          |
| 15 | uuugggaaug gcgaggaaac cguuaccuu acugaguuaa guaaugguaa ugguucucuu<br>gcugcuccca ca   | 60<br>72 |
|    | <210> 802                                                                           |          |
|    | <211> 73                                                                            |          |
|    | <212> ARN                                                                           |          |
| 20 | <213> <i>Rattus norvegicus</i>                                                      |          |
|    | <400> 802                                                                           |          |
| 25 | gagggggaag acgggagaag agaagggagu gguuuuuggg ugccucacuc cuccccuccc<br>gucuuguuuc cuc | 60<br>73 |
|    | <210> 803                                                                           |          |
|    | <211> 20                                                                            |          |
|    | <212> ADN                                                                           |          |
| 30 | <213> Secuencia artificial                                                          |          |
|    | <220>                                                                               |          |
|    | <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético                     |          |
| 35 | <400> 803                                                                           |          |
|    | tcatcgtctc aaatgagtct                                                               | 20       |

## REIVINDICACIONES

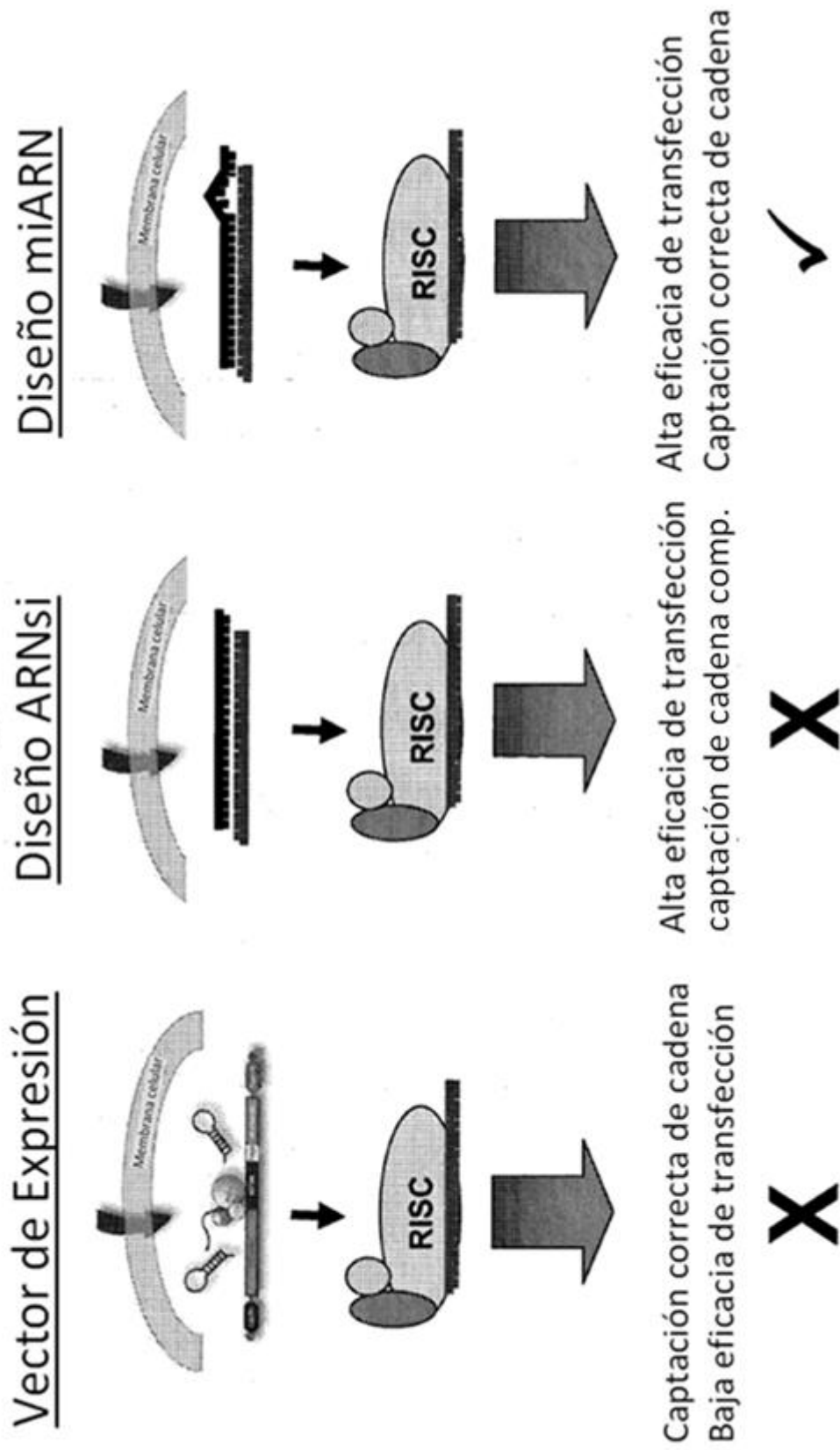
1. Una molécula de ácido nucleico miARN sintético que comprende una secuencia con una identidad de secuencia de al menos el 80% con la secuencia del miR-34a maduro humano para su uso en la terapia de un cáncer.
- 5 2. Un ácido nucleico miARN sintético para su uso en una terapia de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 1 definido además como una molécula de ácido nucleico de entre 17 y 125 restos de longitud, que comprende
  - una región de miARN cuya secuencia de 5' a 3' es al menos idéntica en un 80% a un miARN maduro miR-34a, y
  - una región complementaria cuya secuencia de 5' a 3' es complementaria entre un 60% y el 100% a la región de miARN.
- 10 3. Un ácido nucleico miARN sintético para su uso en una terapia de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende una región de miARN cuya secuencia de 5' a 3' es idéntica en al menos un 85% a una secuencia de miR-34a maduro.
4. Un ácido nucleico miARN sintético para su uso en una terapia de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende una región de miARN cuya secuencia de 5' a 3' es idéntica en al menos un 90% a una secuencia de miR-34a maduro.
- 15 5. Un ácido nucleico miARN sintético para su uso en una terapia de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, que comprende una región de miARN cuya secuencia de 5' a 3' es idéntica a una secuencia de miR-34a, miR-34b o miR-34c maduro.
6. Un ácido nucleico miARN sintético para su uso en una terapia de un cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el ácido nucleico está comprendido por dos polinucleótidos separados.
- 20 7. Un ácido nucleico miARN sintético para su uso en una terapia de un cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el ácido nucleico es una molécula en horquilla.
8. Un ácido nucleico miARN sintético para su uso en una terapia de un cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su administración a una célula o a un paciente que tiene la célula identificada como que necesita una terapia de un cáncer.
- 25 9. Un ácido nucleico miARN sintético para su uso en una terapia de un cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en una terapia de tratamiento de un cáncer de pulmón, cáncer de cuello de útero, cáncer de próstata, cáncer de piel, o leucemia.
10. Un ácido nucleico miARN sintético de cadena doble de 17-30 nucleótidos de longitud que comprende un primer polinucleótido que tiene una secuencia con una identidad de secuencia de al menos un 80% con una secuencia de miR-34a maduro que comprende los nucleótidos 22-43 de la SEC ID N° 58, y un segundo polinucleótido separado cuya secuencia de 5' a 3' es complementaria entre un 60% y el 100% con el primer polinucleótido, para su uso como un medicamento.
- 30 11. Un miARN sintético para su uso como un medicamento de acuerdo con la reivindicación 10, **que se caracteriza porque** el ácido nucleico está definido además como en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7.
- 35 12. Un ácido nucleico miARN sintético para su uso como un medicamento de acuerdo con la reivindicación 10 u 11 que comprende además uno o más de los siguientes:
  - i) un grupo de sustitución del fosfato o el hidroxilo del nucleótido en el extremo 5' de la cadena complementaria de la molécula de ARN;
  - 40 ii) una o más modificaciones en los azúcares de los primeros o últimos 1 a 6 restos de la región complementaria; o
  - iii) una no complementariedad entre uno o más nucleótidos de los últimos 1 a 5 restos del extremo 3' de la región complementaria y los correspondientes nucleótidos de la región miARN.
13. Un ácido nucleico miARN sintético para su uso como un medicamento de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, que comprende i) al menos un nucleótido modificado que bloquea el OH 5' o fosfato en el extremo 5', en el que la modificación del al menos un nucleótido es un NH<sub>2</sub>, biotina, un grupo amino, un grupo alquilamino inferior, un grupo acetilo o una modificación 2' oxígeno-metilo (2' O-Me), o ii) al menos una modificación de la ribosa seleccionada de entre 2'F, 2'NH<sub>2</sub>, 2'N<sub>3</sub>, 4'tio, o 2' O-CH<sub>3</sub>.
- 45 14. Un ácido nucleico miARN sintético para su uso como un medicamento de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 13 que es un polinucleótido de cadena sencilla, o un polinucleótido de cadena doble.
- 50 15. El uso de un ácido nucleico miARN sintético como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para la reducción de la viabilidad celular o la disminución de la proliferación celular o la inducción o inhibición de la

apoptosis, con la condición de que se excluyan los procedimientos para el tratamiento del cuerpo humano o animal por medio de cirugía o terapia.

**Fig. 1**



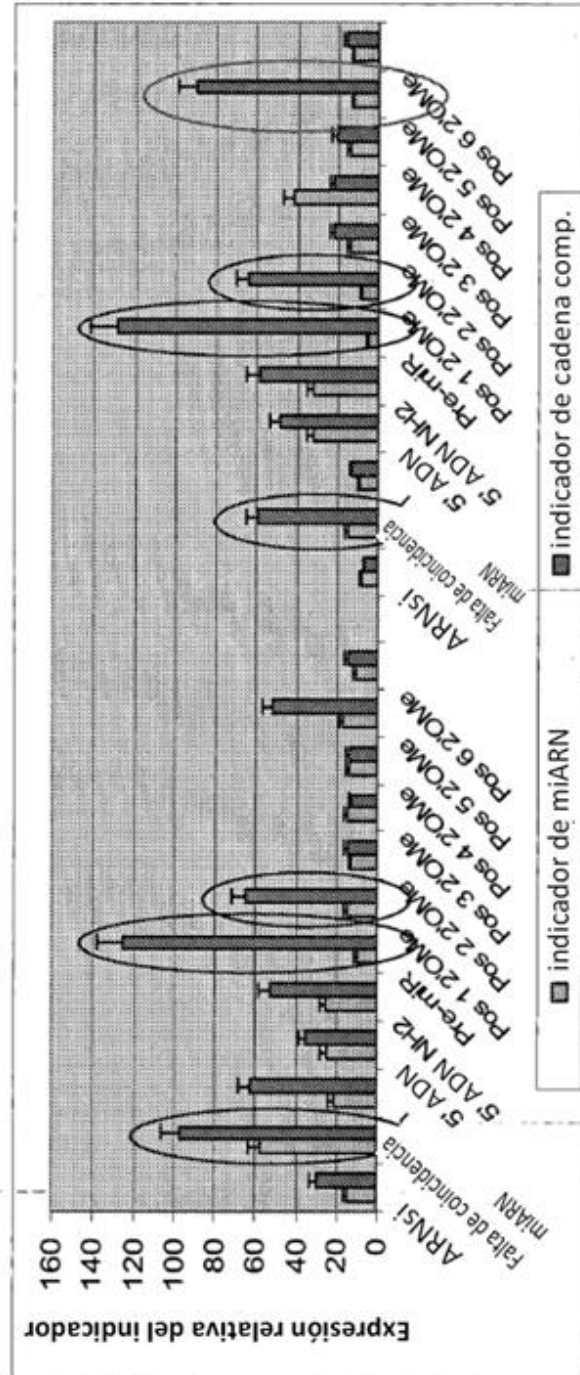
**Fig. 2**

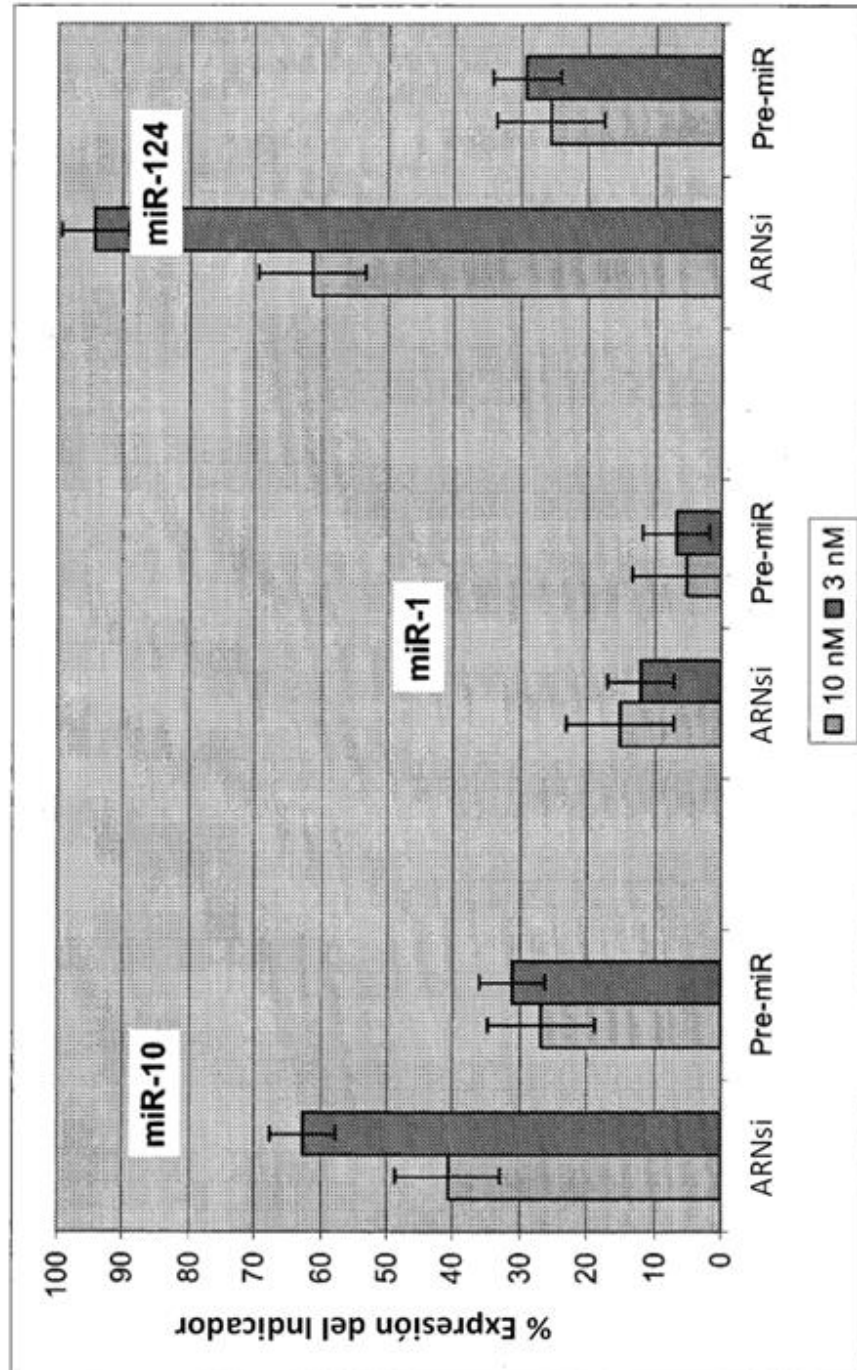


**Fig. 3**

Indicador de cadena activa

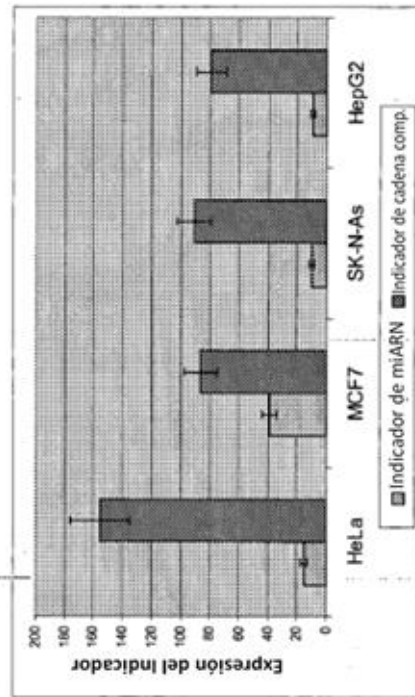
Indicador de cadena complementaria



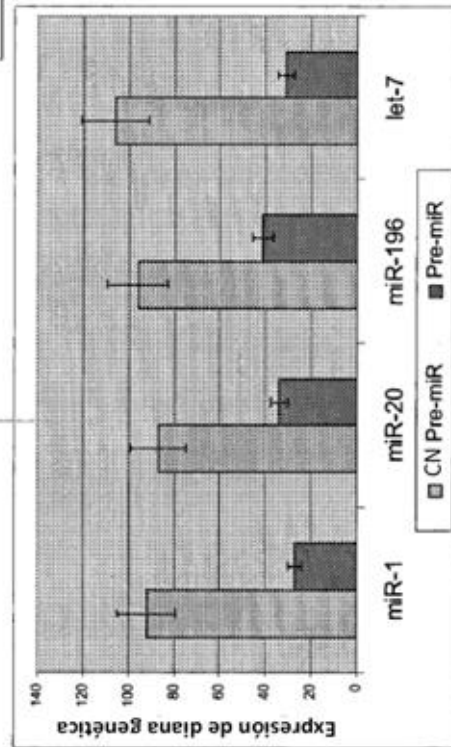
**Fig. 4**

**Fig. 5**

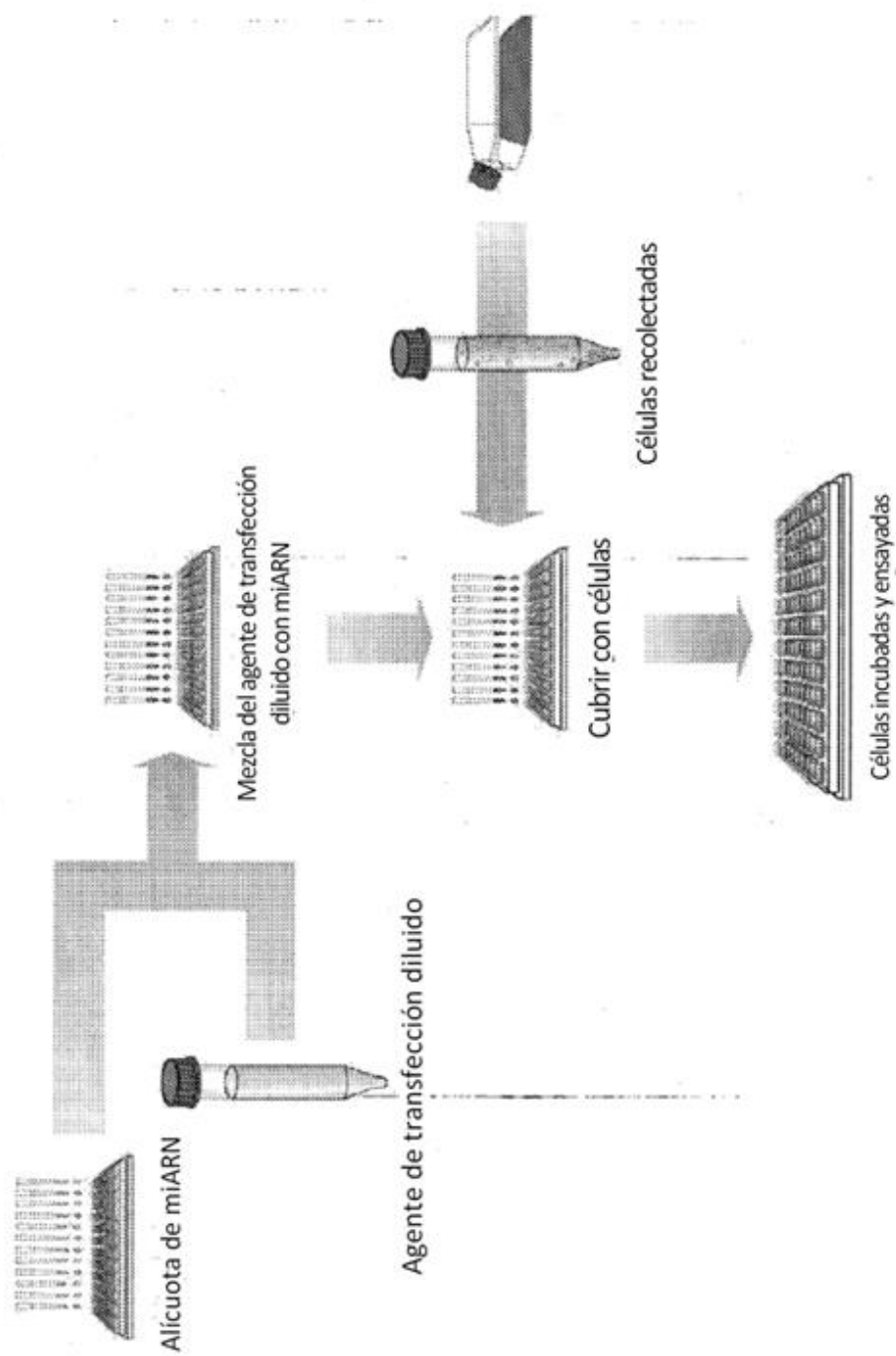
**miARN sintéticos en  
múltiples tipos celulares**



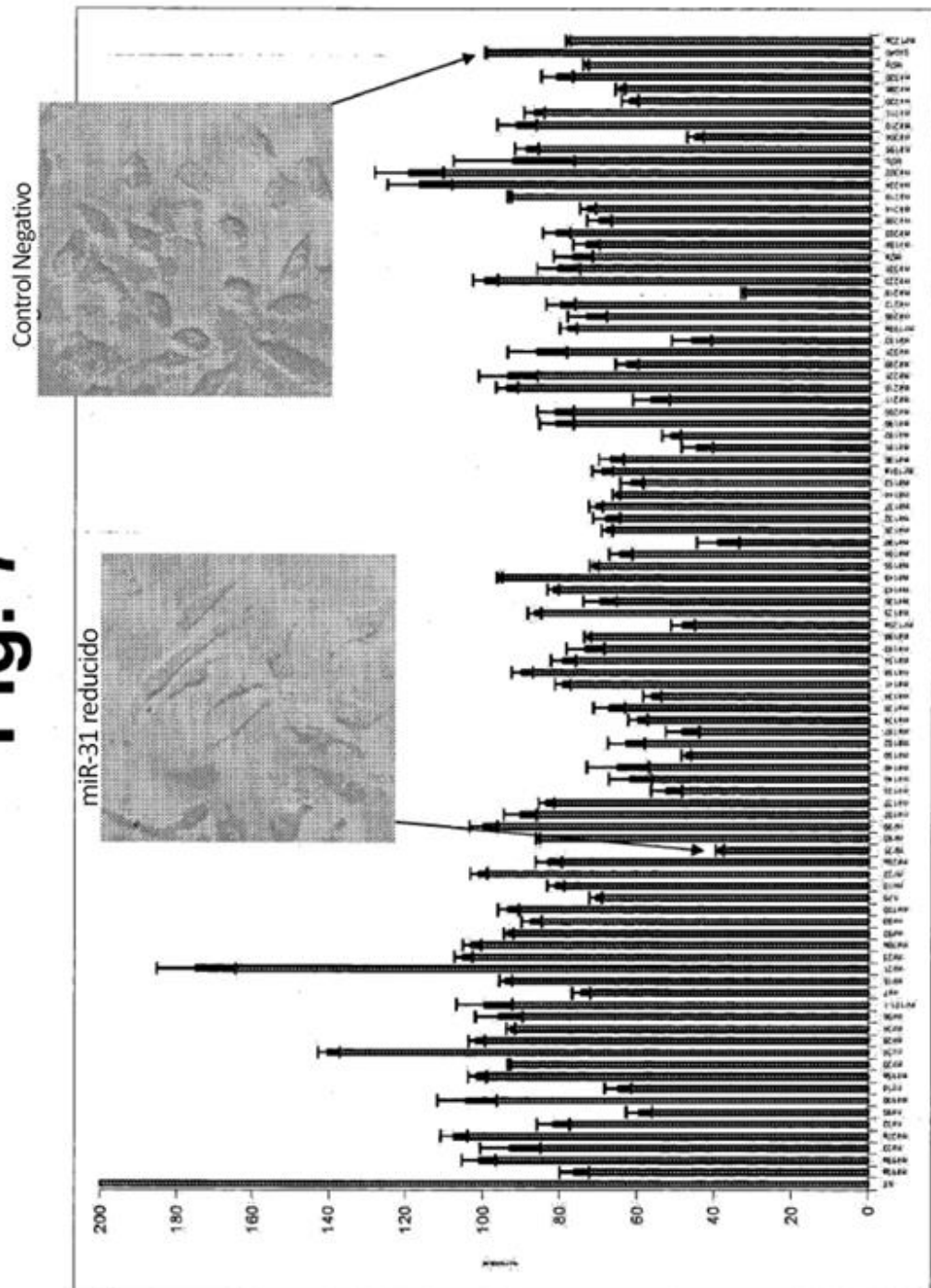
**Efecto de miARN sintéticos  
sobre dianas endógenas**



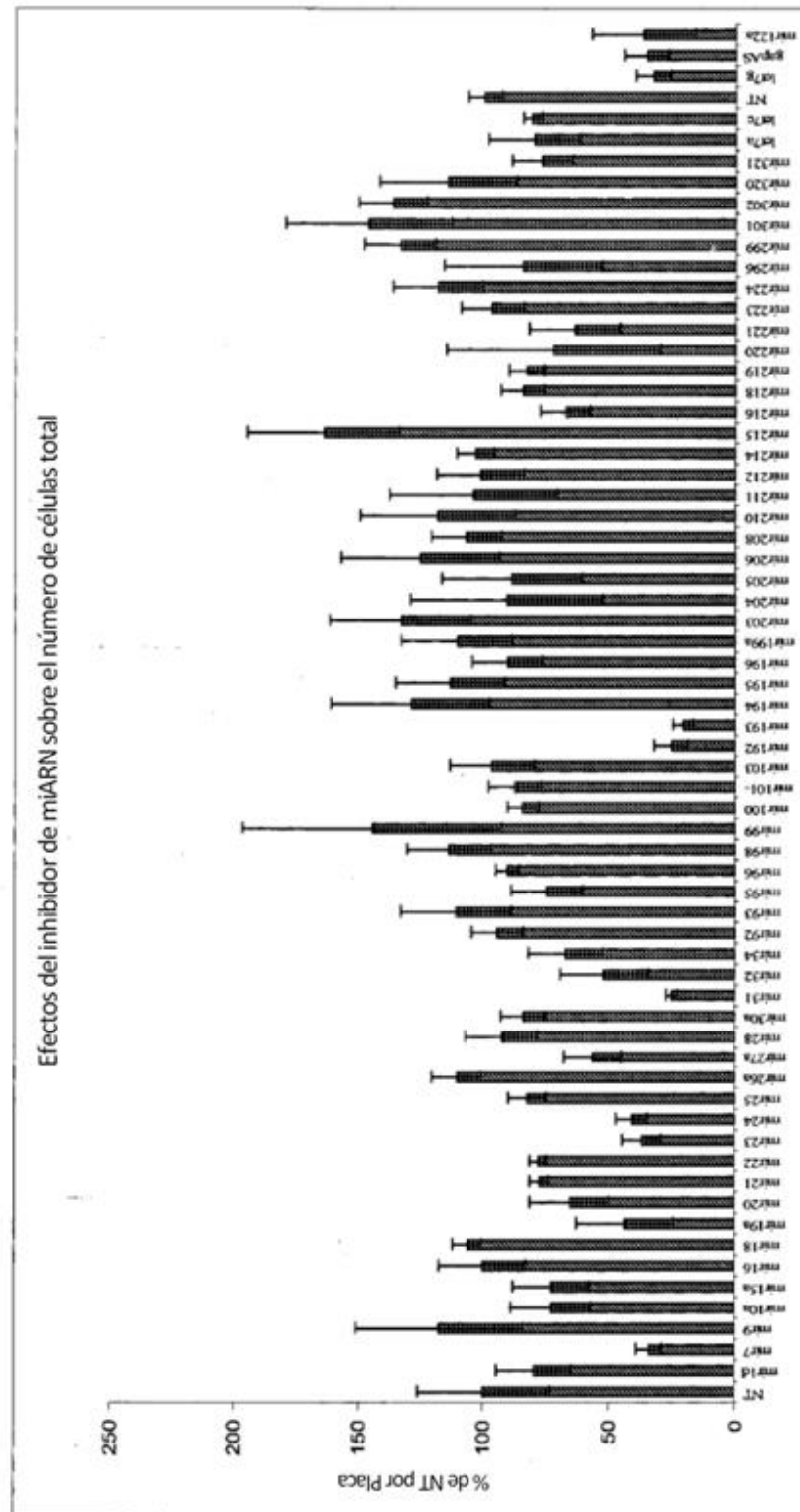
**Fig. 6**



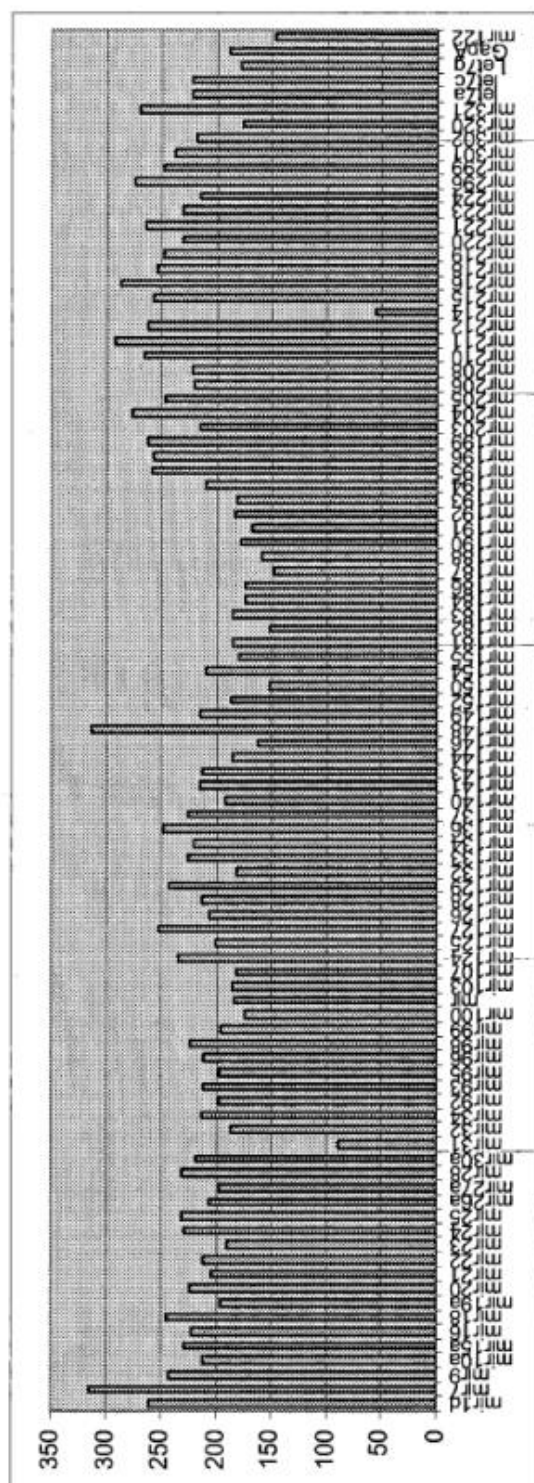
**Fig. 7**



**Fig. 8**



**Fig. 9**



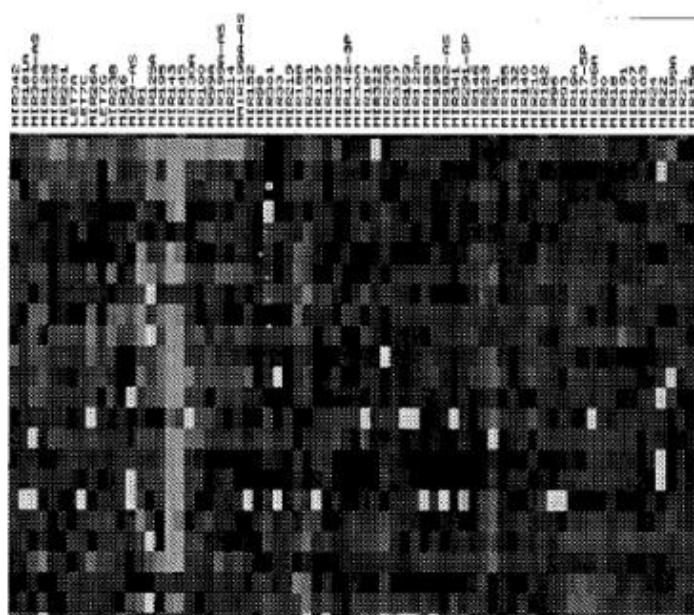
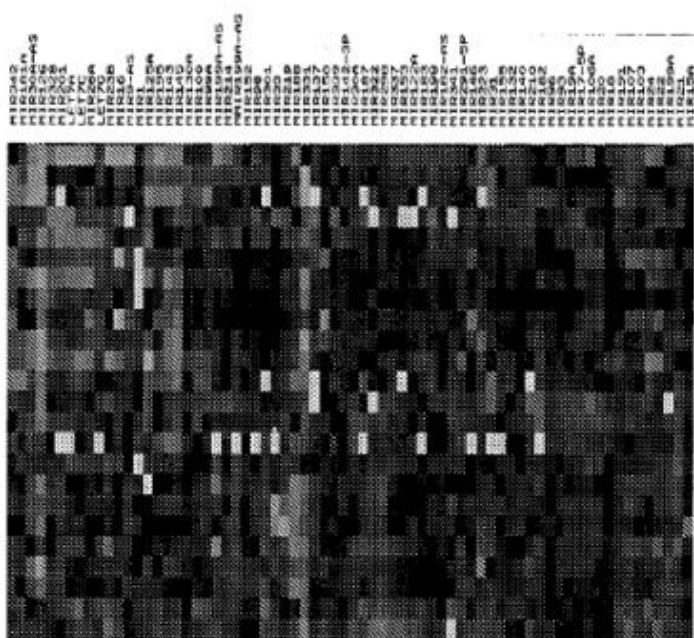


FIG. 10



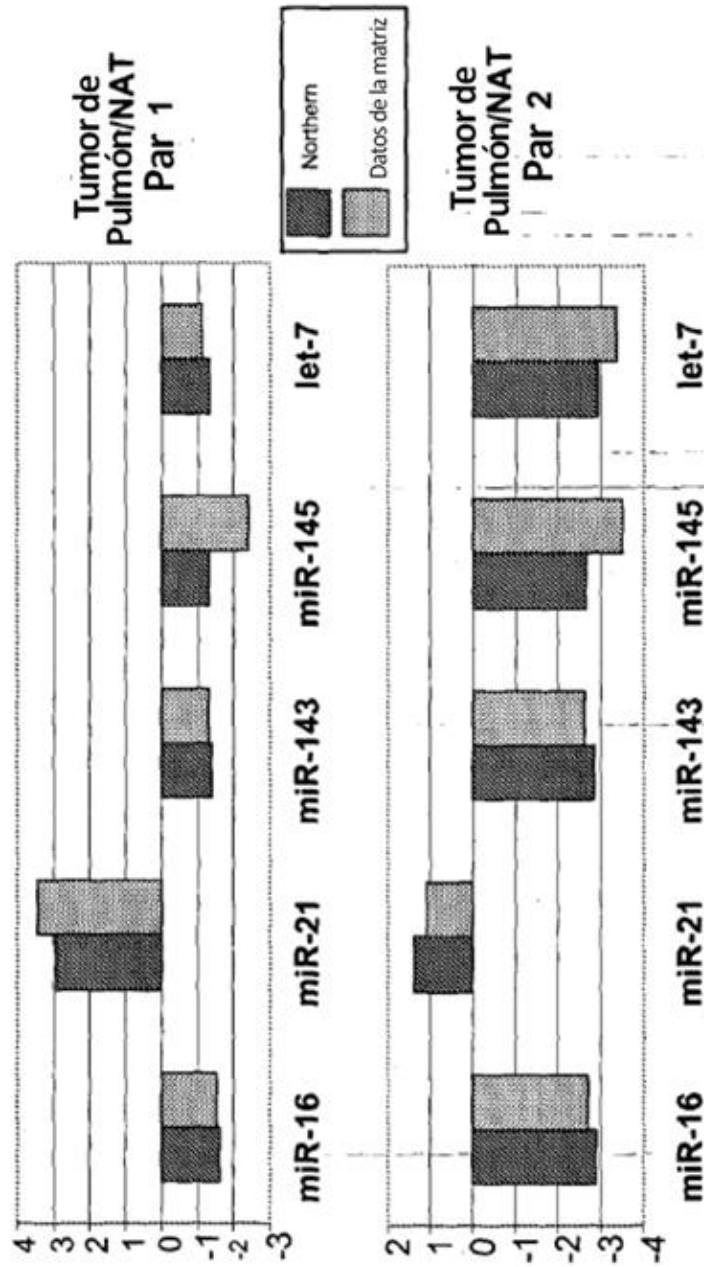


FIG. 11

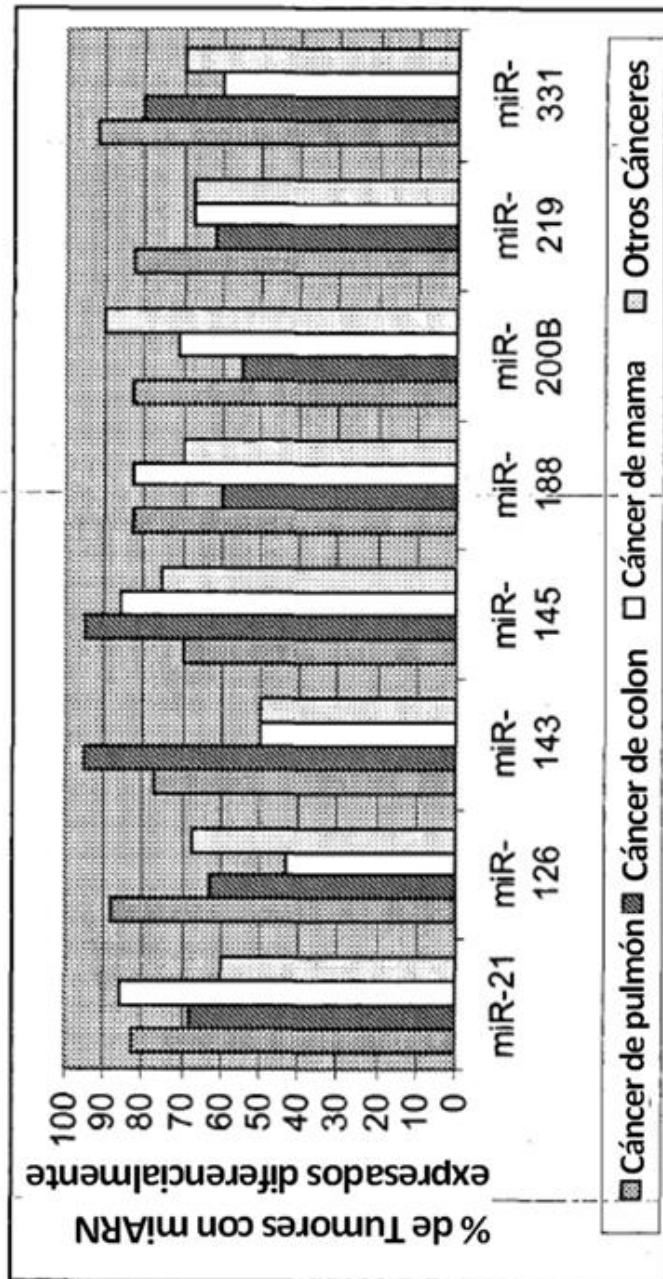


FIG. 12

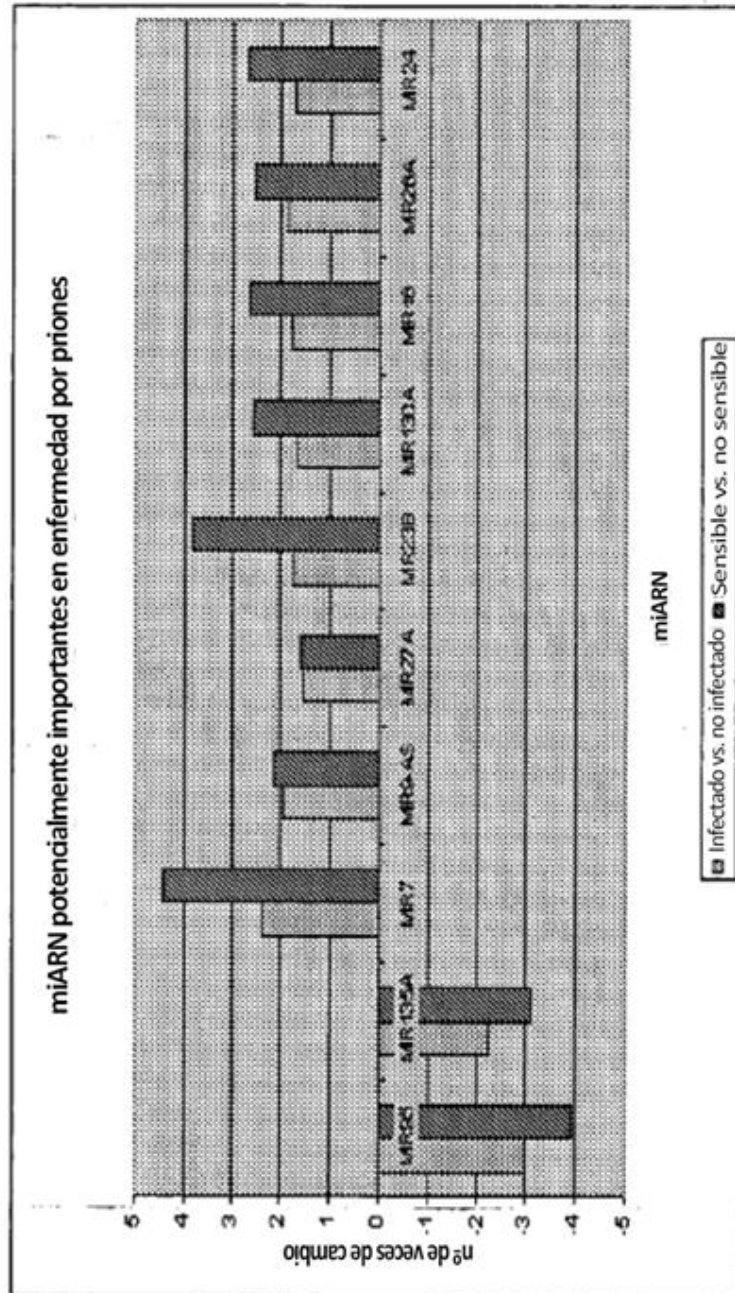


FIG. 13

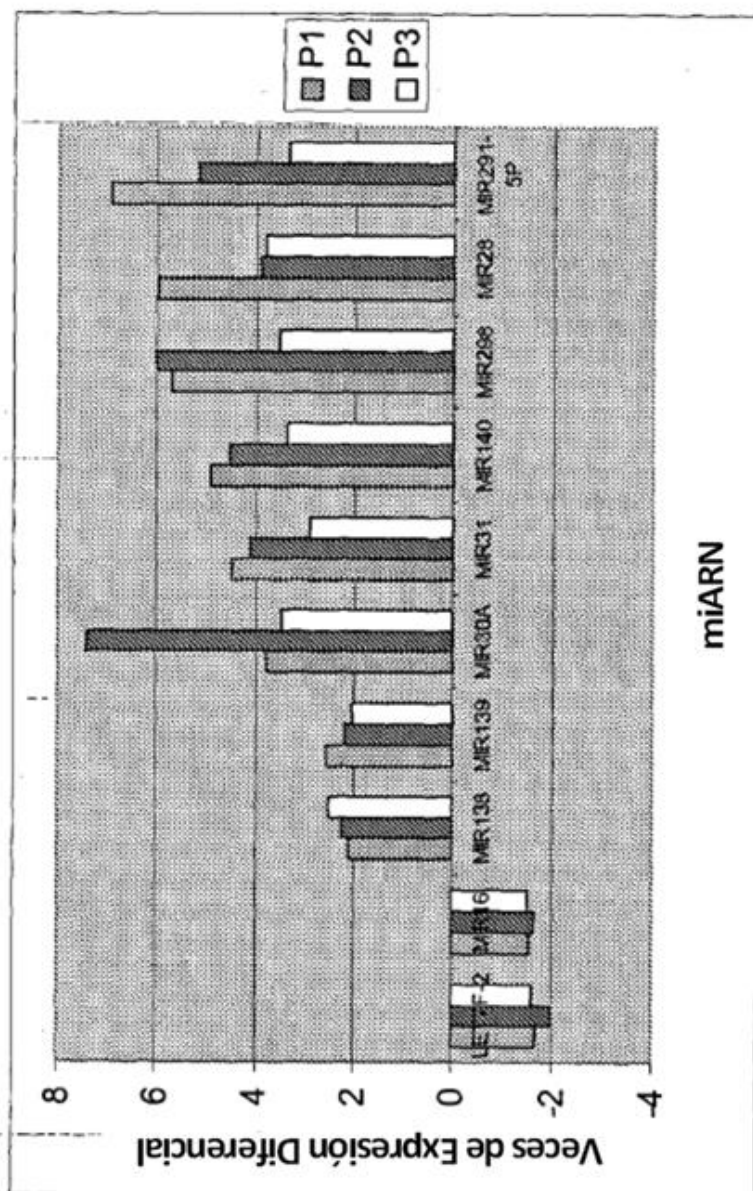


FIG. 14

| Mama BT549 |                        |                 | Mama MCF12A |                        |                 | Cuello uterino HeLa |                        |                 | Próstata 22 Rv1 |                        |                 |
|------------|------------------------|-----------------|-------------|------------------------|-----------------|---------------------|------------------------|-----------------|-----------------|------------------------|-----------------|
| miARN      | %<br>de<br>cont<br>neg | Desv.<br>Estánd | miARN       | %<br>de<br>cont<br>neg | Desv.<br>Estánd | miARN               | %<br>de<br>cont<br>neg | Desv.<br>Estánd | miARN           | %<br>de<br>cont<br>neg | Desv.<br>Estánd |
| mir-101    | 87                     | 3               | mir-126     | 88                     | 32              | mir-1               | 20                     | 2               | mir-126         | 63                     | 3               |
| mir-105    | 88                     | 2               | mir-142     | 87                     | 27              | mir-101             | 12                     | 2               | mir-101         | 77                     | 9               |
| mir-124    | 88                     | 5               | mir-147     | 87                     | 33              | mir-124             | 16                     | 4               | mir-103         | 75                     | 10              |
| mir-126    | 82                     | 2               | mir-206     | 86                     | 12              | mir-192             | 13                     | 3               | mir-105         | 75                     | 12              |
| mir-129    | 85                     | 1               | mir-208     | 87                     | 12              | mir-193             | 5                      | 2               | mir-107         | 84                     | 22              |
| mir-132    | 87                     | 4               | mir-210     | 86                     | 11              | mir-195             | 21                     | 7               | mir-124         | 77                     | 6               |
| mir-142    | 87                     | 4               | mir-211     | 83                     | 7               | mir-201             | 26                     | 7               | mir-128         | 81                     | 4               |
| mir-192    | 81                     | 3               | mir-214     | 85                     | 19              | mir-206             | 12                     | 6               | mir-129         | 81                     | 4               |
| mir-201    | 79                     | 14              | mir-215     | 70                     | 10              | mir-208             | 21                     | 12              | mir-132         | 84                     | 10              |
| mir-215    | 82                     | 1               | mir-219     | 88                     | 10              | mir-210             | 23                     | 4               | mir-135         | 79                     | 4               |
| mir-27a    | 87                     | 4               | mir-220     | 85                     | 7               | mir-215             | 33                     | 21              | mir-137         | 81                     | 4               |
| mir-346    | 88                     | 1               | mir-221     | 88                     | 7               | mir-299             | 20                     | 18              | mir-141         | 85                     | 2               |
| mir-92     | 85                     | 11              | mir-223     | 87                     | 10              | mir-337             | 18                     | 3               | mir-142         | 69                     | 4               |
| mir-96     | 87                     | 9               | mir-331     | 88                     | 12              | mir-339             | 31                     | 2               | mir-147         | 66                     | 4               |
| mir-98     | 87                     | 1               | mir-345     | 88                     | 10              | mir-340             | 31                     | 7               | mir-15a         | 85                     | 9               |
| mir-99a    | 88                     | 1               | mir-346     | 82                     | 12              | mir-345             | 31                     | 21              | mir-16          | 74                     | 6               |
|            |                        |                 | mir-297     | 78                     | 15              | mir-34a             | 35                     | 7               | mir-27a         | 83                     | 7               |
|            |                        |                 | mir-329     | 82                     | 17              | mir-367             | 31                     | 12              | mir-28          | 82                     | 9               |
|            |                        |                 | mir-409     | 86                     | 11              | mir-292-3p          | 29                     | 21              | mir-30a-3p      | 80                     | 8               |
|            |                        |                 | mir-411     | 86                     | 7               | mir-293             | 26                     | 30              | mir-34a         | 72                     | 8               |
|            |                        |                 |             |                        |                 | mir-297             | 19                     | 16              | mir-297         | 84                     | 5               |
|            |                        |                 |             |                        |                 | mir-344             | 32                     | 1               |                 |                        |                 |
|            |                        |                 |             |                        |                 | mir-409             | 30                     | 16              |                 |                        |                 |

FIG.15A

| Piel TE354T |                        |                 | Piel TE353SK |                        |                 | Células BJ |                        |                 | Pulmón A549 |                        |                 |
|-------------|------------------------|-----------------|--------------|------------------------|-----------------|------------|------------------------|-----------------|-------------|------------------------|-----------------|
| miARN       | %<br>de<br>cont<br>neg | Desv.<br>Estánd | miARN        | %<br>de<br>cont<br>neg | Desv.<br>Estánd | miARN      | %<br>de<br>cont<br>neg | Desv.<br>Estánd | miARN       | %<br>de<br>cont<br>neg | Desv.<br>Estánd |
| mir-1       | 53                     | 7               | mir-101      | 63                     | 11              | miR-206    | 19                     | 7               | mir-124     | 44                     | 0               |
| mir-101     | 49                     | 6               | mir-105      | 42                     | 40              | let7a      | 69                     | 10              | Let-7b      | 70                     | 0               |
| mir-124     | 64                     | 10              | mir-124      | 70                     | 8               | mir1       | 38                     | 2,65            | Let-7d      | 71                     | 0               |
| mir-136     | 59                     | 4               | mir-126      | 56                     | 8               | mi R-105   | 65                     | 5               | Let-7g      | 62                     | 1               |
| mir-154     | 51                     | 5               | mir-128      | 53                     | 46              | miR-147    | 35                     | 7               | mir-126     | 68                     | 0               |
| mir-15a     | 63                     | 4               | mir-132      | 66                     | 8               | mi R-15a   | 43                     | 8               | mir-129     | 67                     | 1               |
| mir-16      | 58                     | 5               | mir-133A     | 56                     | 49              | miR-16     | 51                     | 4               | mir-137     | 64                     | 0               |
| mir-192     | 62                     | 7               | mir-136      | 27                     | 24              | miR-195    | 48                     | 10              | mir-147     | 65                     | 0               |
| mir-193     | 69                     | 4               | mir-137      | 55                     | 13              | miR-297    | 46                     | 6,85            | mir-15a     | 61                     | 0               |
| mir-195     | 58                     | 3               | mir-141      | 62                     | 23              | miR-324-3p | 68                     | 8,84            | mir-16      | 53                     | 1               |
| mir-201     | 67                     | 8               | mir-142      | 60                     | 19              | miR-337    | 27                     | 7,26            | mir-192     | 70                     | 2               |
| mir-206     | 51                     | 4               | mir-144      | 65                     | 22              | miR-376b   | 63                     | 6,53            | mir-193     | 64                     | 3               |
| mir-215     | 59                     | 6               | mir-15a      | 57                     | 20              |            |                        |                 | mir-195     | 59                     | 0               |
| mir-221     | 62                     | 8               | mir-16       | 59                     | 9               |            |                        |                 | mir-22      | 68                     | 1               |
| mir-26a     | 69                     | 12              | mir-181 a    | 65                     | 23              |            |                        |                 | mir-28      | 61                     | 0               |
| mir-28      | 60                     | 18              | mir-20       | 47                     | 41              |            |                        |                 | mir-292-3p  | 62                     | 0               |
|             |                        |                 | mir-206      | 67                     | 15              |            |                        |                 | mir-29a     | 67                     | 1               |
|             |                        |                 | mir-215      | 68                     | 11              |            |                        |                 | mir-337     | 55                     | 0               |
|             |                        |                 | mir-223      | 56                     | 49              |            |                        |                 | mir-344     | 63                     | 0               |
|             |                        |                 | mir-302      | 63                     | 1               |            |                        |                 | mir-345     | 69                     | 1               |
|             |                        |                 | mir-330      | 66                     | 59              |            |                        |                 | mir-34a     | 61                     | 0               |
|             |                        |                 | mir-346      | 59                     | 52              |            |                        |                 | mir-7       | 63                     | 1               |
|             |                        |                 | mir-373      | 66                     | 7               |            |                        |                 |             |                        |                 |
|             |                        |                 | mir-96       | 65                     | 16              |            |                        |                 |             |                        |                 |
|             |                        |                 | mir-291      | 48                     | 17              |            |                        |                 |             |                        |                 |
|             |                        |                 | mir-329      | 68                     | 62              |            |                        |                 |             |                        |                 |
|             |                        |                 | mir-380-3p   | 64                     | 55              |            |                        |                 |             |                        |                 |
|             |                        |                 | mir-411      | 54                     | 47              |            |                        |                 |             |                        |                 |

FIG.15B

| Pulmón CRL5826 |         |              | Pulmón HTB-57 |         |              | Jurkats    |               |              | Linfocitos T primarios |               |              |
|----------------|---------|--------------|---------------|---------|--------------|------------|---------------|--------------|------------------------|---------------|--------------|
| miARN          | % de CN | Desv. Estánd | miARN         | % de CN | Desv. Estánd | miARN      | % de cont neg | Desv. Estánd | miARN                  | % de cont neg | Desv. Estánd |
| ambi-mir7100   | 63      | 21           | mir-108       | 79      |              | let-7a     | 21            | 1            | miR-107                | 89            | 15           |
| mir-101        | 70      | 20           | mir-122       | 79      |              | let-7b     | 50            | 5            | miR-134                | 75            | 23           |
| mi r-105       | 74      | 11           | mir-124       | 79      |              | miR-101    | 69            | 30           | miR-135                | 88            | 13           |
| mi r-124       | 63      | 8            | mir-125a      | 77      | 11           | miR-10b    | 37            | 3            | miR-139                | 87            | 0            |
| mir-125b       | 74      | 11           | mir-126       | 78      | 2            | miR-122    | 67            | 18           | miR-141                | 89            | 1            |
| mir-126        | 61      | 3            | mir-132       | 59      | 7            | mi R-133a  | 73            | 18           | miR-145                | 86            | 12           |
| mir-128        | 71      | 13           | mir-133A      | 77      | 7            | miR-17-3p  | 63            | 16           |                        |               |              |
| mi r-132       | 73      | 18           | mi r-136      | 78      | 13           | miR-29a    | 68            | 7            |                        |               |              |
| mir-141        | 74      | 5            | mir-147       | 72      | 4            | miR-30a-3p | 66            | 27           |                        |               |              |
| mir-142        | 67      | 5            | mir-151       | 67      | 10           | miR-34a    | 67            | 21           |                        |               |              |
| mir-147        | 75      | 7            | mir-152       | 73      | 13           |            |               |              |                        |               |              |
| mi r-149       | 71      | 9            | mir-16        | 79      | 6            |            |               |              |                        |               |              |
| mi r-188       | 67      | 11           | mir-182       | 63      | 9            |            |               |              |                        |               |              |
| mir-223        | 68      | 14           | mir-183       | 72      | 9            |            |               |              |                        |               |              |
| mir-28         | 74      | 19           | mir-186       | 69      | 17           |            |               |              |                        |               |              |
| mir-29a        | 74      | 14           | mir-188       | 67      | 20           |            |               |              |                        |               |              |
| mir-337        | 74      | 17           | mir-28        | 79      | 16           |            |               |              |                        |               |              |
| mir-346        | 72      | 13           | mir-377       | 79      | 3            |            |               |              |                        |               |              |
| mir-96         | 74      | 6            | mir-526b*     | 79      | 0            |            |               |              |                        |               |              |
|                |         |              | mir-96        | 76      | 10           |            |               |              |                        |               |              |

FIG.15C

| Cuello uterino HeLa |               |              | Próstata 22 Rv1 |               |              | Piel TE354T |               |              | Piel TE353SK |               |              |
|---------------------|---------------|--------------|-----------------|---------------|--------------|-------------|---------------|--------------|--------------|---------------|--------------|
| miARN               | % de cont neg | Desv. Estánd | miARN           | % de cont neg | Desv. Estánd | miARN       | % de cont neg | Desv. Estánd | miARN        | % de cont neg | Desv. Estánd |
| Let-7a              | 119           | 15           | Let-7a          | 124           | 6            | mir-412     | 117           | 11           | 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     | 125           | 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           | 18           | 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-139     | 122           | 20           |              |               |              |
| mir-199             | 118           | 14           |                 |               |              | mir-412     | 117           | 11           |              |               |              |
| mir-9               | 112           | 27           |                 |               |              |             |               |              |              |               |              |

| Células BJ |               |              | Cáncer de Pulmón A549 |               |              | Jurkats  |               |              | Linfocitos T primarios |               |              |
|------------|---------------|--------------|-----------------------|---------------|--------------|----------|---------------|--------------|------------------------|---------------|--------------|
| miARN      | % de cont neg | Desv. Estánd | miARN                 | % de cont neg | Desv. Estánd | miARN    | % de cont neg | Desv. Estánd | miARN                  | % de cont neg | Desv. Estánd |
| miR-26a    | 130           | 17           | mir-25                | 112           | 0            | miR-100  | 7             | 15           | let-7a                 | 151           | 17           |
| miR-128    | 131           | 24           | mir-294               | 112           | 1            | miR-125b | 134           | 4            | let-7b                 | 150           | 14           |
| miR-223    | 134           | 14           | mir-32                | 121           | 0            | miR-126  | 132           | 19           | let-7c                 | 159           | 4            |
| miR-188    | 139           | 19           | mir-92                | 122           | 0            | miR-129  | 134           | 10           | let-7d                 | 142           | 10           |
| miR-125a   | 140           | 10           |                       |               |              | miR-140  | 150           | 4            | let-7g                 | 141           | 7            |
| miR-201    | 153           | 18           |                       |               |              | miR-143  | 139           | 2            | miR-10a                | 130           | 10           |
| miR-291-3p | 155           | 30           |                       |               |              | miR-155  | 162           | 23           | miR-10b                | 127           | 20           |
| miR-145    | 161           | 2            |                       |               |              | miR-15a  | 146           | 12           | miR-125a               | 131           | 5            |
| miR-294    | 165           | 21           |                       |               |              | miR-23b  | 146           | 4            | miR-126                | 126           | 42           |
| miR-150    | 171           | 7            |                       |               |              | miR-25   | 135           | 18           | miR-15a                | 135           | 11           |
| miR-322    | 268           | 19,93        |                       |               |              | miR-26a  | 154           | 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    | 212           | 41,39        |                       |               |              |          |               |              | miR-19a                | 126           | 5            |
|            |               |              |                       |               |              |          |               |              | miR-20                 | 130           | 14           |
|            |               |              |                       |               |              |          |               |              | miR-7                  | 126           | 1            |

| CRL5826    |         |              | HTB-57  |         |              |
|------------|---------|--------------|---------|---------|--------------|
| miARN      | % de CN | Desv. Estánd | miARN   | % de CN | Desv. Estánd |
| 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

| Próstata 22Rv1 |         |                  | Piel TE354T |         |                  | Mama MCF12a |         |                  | Pulmón A549 |         |                  |
|----------------|---------|------------------|-------------|---------|------------------|-------------|---------|------------------|-------------|---------|------------------|
| miARN          | %<br>CN | Desv.<br>Estánd. | miARN       | %<br>CN | Desv.<br>Estánd. | miARN       | %<br>CN | Desv.<br>Estánd. | miARN       | %<br>CN | Desv.<br>Estánd. |
| mir-100        | 59      | 26               | mir-210     | 67      | 13               | mir-216     | 92      | 9                | mir-129     | 90      | 5                |
| mir-130a       | 58      | 16               | mir-216     | 53      | 1                | mir-217     | 95      | 14               | mir-326     | 88      | 2                |
| mir-211        | 54      | 7                |             |         |                  | mir-294     | 93      | 23               | mir-331     | 92      | 2                |
| mir-212        | 58      | 1                |             |         |                  |             |         |                  | mir-338     | 91      | 2                |
| mir-213        | 57      | 11               |             |         |                  |             |         |                  | mir-341     | 89      | 5                |
| mir-215        | 59      | 8                |             |         |                  |             |         |                  | mir-370     | 91      | 0                |
| mir-224        | 49      | 30               |             |         |                  |             |         |                  | mir-92      | 88      | 0                |
| mir-292        | 59      | 4                |             |         |                  |             |         |                  |             |         |                  |
| mir-320        | 58      | 6                |             |         |                  |             |         |                  |             |         |                  |
| mir-324        | 55      | 6                |             |         |                  |             |         |                  |             |         |                  |
| mir-325        | 59      | 10               |             |         |                  |             |         |                  |             |         |                  |
| mir-330        | 58      | 28               |             |         |                  |             |         |                  |             |         |                  |
| mir-338        | 55      | 10               |             |         |                  |             |         |                  |             |         |                  |
| mir-369        | 57      | 6                |             |         |                  |             |         |                  |             |         |                  |
| mir-370        | 54      | 16               |             |         |                  |             |         |                  |             |         |                  |
| mir-99a        | 58      | 15               |             |         |                  |             |         |                  |             |         |                  |

FIG. 17

| Próstata 22Rv1 |         |                  | Piel TE354T |         |                  | Mama MCF12a |         |                  | Pulmón A549 |         |                  |
|----------------|---------|------------------|-------------|---------|------------------|-------------|---------|------------------|-------------|---------|------------------|
| miARN          | %<br>CN | Desv.<br>estánd. | miARN       | %<br>CN | Desv.<br>estánd. | miARN       | %<br>CN | Desv.<br>estánd. | miARN       | %<br>CN | Desv.<br>estánd. |
| mir-10b        | 104     | 27               | Let-7a      | 139     | 9                | let7a       | 180     | 35               | let7a-1     | 116     | 5                |
| mir-152        | 111     | 20               | Let-7b      | 148     | 8                | let7b-1     | 176     | 36               | mir-133a-2  | 126     | 2                |
|                |         |                  | Let-7g      | 133     | 8                | let7c       | 177     | 21               | mir-142     | 112     | 4                |
|                |         |                  | mir-10a     | 135     | 10               | let7d       | 172     | 37               | mir-187     | 110     | 6                |
|                |         |                  | mir-10b     | 140     | 10               | mir-10a     | 178     | 22               | mir-199a-1  | 111     | 4                |
|                |         |                  | mir-133B    | 135     | 8                | mir-10b     | 190     | 18               | mir-206     | 110     | 4                |
|                |         |                  | mir-155     | 138     | 3                | mir-133a    | 182     | 33               | mir-211     | 110     | 6                |
|                |         |                  | mir-15a     | 142     | 12               | mir-152     | 175     | 33               | mir-222     | 111     | 2                |
|                |         |                  | mir-16      | 134     | 8                | mir-153     | 178     | 27               | mir-223     | 112     | 2                |
|                |         |                  | mir-181a    | 138     | 6                | mir-155     | 186     | 24               | mir-23b     | 118     | 6                |
|                |         |                  | mir-182     | 133     | 9                | mir-16      | 174     | 30               | mir-298     | 111     | 1                |
|                |         |                  | mir-193     | 134     | 12               | mir-181a    | 172     | 26               | mir-328     | 115     | 1                |
|                |         |                  | mir-194     | 137     | 28               | mir-183     | 184     | 15               | mir-342     | 118     | 0                |
|                |         |                  | mir-196     | 133     | 6                | mir-184     | 177     | 14               | mir-371     | 122     | 2                |
|                |         |                  | mir-204     | 135     | 9                | mir-186     | 176     | 16               |             |         |                  |
|                |         |                  | mir-23a     | 133     | 16               | mir-191     | 174     | 11               |             |         |                  |
|                |         |                  | mir-24      | 132     | 11               | mir-200b    | 179     | 8                |             |         |                  |
|                |         |                  | mir-25      | 142     | 13               | mir-412     | 174     | 24               |             |         |                  |
|                |         |                  | mir-92      | 132     | 11               | mir-9       | 178     | 24               |             |         |                  |
|                |         |                  | mir-95      | 137     | 5                |             |         |                  |             |         |                  |

FIG.18

| Jurkat                                            |      |      | Linfocitos T primarios |      |      | HeLa               |      |      | A549               |      |      |
|---------------------------------------------------|------|------|------------------------|------|------|--------------------|------|------|--------------------|------|------|
| Viabilidad celular                                |      |      | Viabilidad celular     |      |      | Viabilidad celular |      |      | Viabilidad celular |      |      |
| miARN                                             | % CN | % DE | miARN                  | % CN | % DE | miARN              | % CN | % DE | miARN              | % CN | % DE |
| <b>miARN que disminuyen la Viabilidad celular</b> |      |      |                        |      |      |                    |      |      |                    |      |      |
| let-7a                                            | 21   | 1    | miR-107                | 89   | 15   | mir-1              | 20   | 2    | mir-193            | 80   | 15   |
| let-7b                                            | 50   | 5    | miR-134                | 75   | 23   | mir-101            | 12   | 2    | mir-206            | 80   | 7    |
| miR-101                                           | 69   | 30   | miR-135                | 88   | 13   | mir-124            | 16   | 4    | mir-210            | 86   | 5    |
| miR-108                                           | 75   | 18   | miR-139                | 87   | 0    | mir-192            | 13   | 3    | mir-292-3p         | 86   | 3    |
| miR-10b                                           | 37   | 3    | miR-141                | 89   | 1    | mir-193            | 5    | 2    | mir-293            | 83   | 2    |
| miR-122                                           | 67   | 18   | miR-145                | 86   | 12   | mir-195            | 21   | 7    | mir-299            | 84   | 4    |
| miR-133a                                          | 73   | 18   |                        |      |      | mir-206            | 12   | 6    | mir-329            | 85   | 5    |
| miR-17-3p                                         | 63   | 16   |                        |      |      | mir-208            | 21   | 12   | mir-337            | 81   | 3    |
| mi R-19a                                          | 73   | 24   |                        |      |      | mir-210            | 23   | 4    | mir-345            | 75   | 6    |
| miR-29a                                           | 68   | 7    |                        |      |      | mir-297            | 19   | 16   | mir-346            | 78   | 8    |
| miR-30a-3p                                        | 66   | 27   |                        |      |      | mir-299            | 20   | 18   | mir-409            | 86   | 3    |
| miR-34a                                           | 67   | 21   |                        |      |      | mir-337            | 18   | 3    |                    |      |      |
| <b>miARN que aumentan la Viabilidad celular</b>   |      |      |                        |      |      |                    |      |      |                    |      |      |
| miR-129                                           | 150  | 10   | let-7a                 | 151  | 17   | mir-128            | 128  | 18   |                    |      |      |
| miR-143                                           | 162  | 2    | let-7b                 | 150  | 14   | mir-139            | 133  | 12   |                    |      |      |
| miR-155                                           | 146  | 23   | let-7c                 | 159  | 4    | mir-23a            | 159  | 13   |                    |      |      |
| miR-15a                                           | 146  | 12   | let-7d                 | 142  | 10   | mir-23b            | 155  | 12   |                    |      |      |
| miR-25                                            | 154  | 18   | let-7g                 | 141  | 7    | mir-24             | 132  | 20   |                    |      |      |
| miR-26a                                           | 170  | 14   | miR-10a                | 130  | 10   | mir-32             | 133  | 20   |                    |      |      |
|                                                   |      |      | miR-10b                | 127  | 20   | mir-331            | 128  | 13   |                    |      |      |
|                                                   |      |      | miR-125a               | 131  | 5    |                    |      |      |                    |      |      |
|                                                   |      |      | miR-126                | 126  | 42   |                    |      |      |                    |      |      |
|                                                   |      |      | mi R-15a               | 135  | 11   |                    |      |      |                    |      |      |
|                                                   |      |      | miR-17-3p              | 128  | 4    |                    |      |      |                    |      |      |
|                                                   |      |      | miR-18                 | 138  | 2    |                    |      |      |                    |      |      |
|                                                   |      |      | miR-182                | 126  | 18   |                    |      |      |                    |      |      |
|                                                   |      |      | miR-19a                | 126  | 5    |                    |      |      |                    |      |      |
|                                                   |      |      | miR-20                 | 130  | 14   |                    |      |      |                    |      |      |

FIG.19

| Próstata 22Rv1                               |      |             | Piel TE354T |      |             | Jurkat    |      |             | HeLa       |      |             |
|----------------------------------------------|------|-------------|-------------|------|-------------|-----------|------|-------------|------------|------|-------------|
| miARN sintéticos que Aumentan la Apoptosis   |      |             |             |      |             |           |      |             |            |      |             |
| miARN                                        | % CN | Desv Estánd | miARN       | % CN | Desv Estánd | miARN     | % CN | Desv Estánd | miARN      | % CN | Desv Estánd |
| Let-7g                                       | 164  | 17          | mir-149     | 179  | 22          | let-7b    | 201  | 41          | let-7b     | 369  | 89          |
| mir-1                                        | 192  | 20          | mir-154     | 252  | 15          | let-7g    | 152  | 19          | let-7g     | 594  | 260         |
| mir-10a                                      | 205  | 15          | mir-195     | 174  | 16          | miR-1     | 170  | 11          | miR-1      | 410  | 65          |
| mir-149                                      | 169  | 14          | mir-208     | 189  | 18          | miR-10b   | 198  | 24          | miR-10b    | 378  | 28          |
| mir-184                                      | 166  | 19          | mir-214     | 187  | 14          | miR-122   | 154  | 29          | miR-122    | 303  | 44          |
| mir-186                                      | 166  | 23          | mir-217     | 177  | 21          | miR-17-3p | 171  | 12          | miR-17-3p  | 346  | 68          |
| mir-188                                      | 197  | 12          | mir-293     | 234  | 19          | miR-19a   | 153  | 6           | miR-19a    | 312  | 7           |
| mir-192                                      | 182  | 26          | mir-299     | 193  | 12          | miR-28    | 154  | 20          | miR-28     | 347  | 56          |
|                                              |      |             | mir-328     | 198  | 17          | miR-29a   | 155  | 15          | miR-29a    | 439  | 63          |
|                                              |      |             | mir-344     | 204  | 8           | miR-32    | 156  | 30          | miR-32     | 473  | 209         |
|                                              |      |             |             |      |             | miR-34a   | 181  | 39          | miR-34a    | 361  | 82          |
|                                              |      |             |             |      |             |           |      |             | let-7b     | 317  | 63          |
|                                              |      |             |             |      |             |           |      |             | let-7g     | 607  | 150         |
|                                              |      |             |             |      |             |           |      |             | miR-1      | 355  | 47          |
|                                              |      |             |             |      |             |           |      |             | miR-10b    | 404  | 53          |
|                                              |      |             |             |      |             |           |      |             | miR-122    | 374  | 61          |
|                                              |      |             |             |      |             |           |      |             | miR-17-3p  | 443  | 101         |
|                                              |      |             |             |      |             |           |      |             | miR-19a    | 773  | 70          |
|                                              |      |             |             |      |             |           |      |             | miR-28     | 402  | 42          |
| miARN sintéticos que Disminuyen la Apoptosis |      |             |             |      |             |           |      |             |            |      |             |
| mir-128                                      | 54   | 27          | Let-7b      | 56   | 10          | miR-125b  | 75   | 2           | miR-32     | 8    | 7           |
| mir-21                                       | 47   | 23          | mir-100     | 55   | 11          | miR-126   | 66   | 11          | mir-105    | 40   | 9           |
| mir-216                                      | 48   | 37          | mir-101     | 44   | 9           | miR-143   | 68   | 3           | mir-108    | 39   | 12          |
| mir-223                                      | 54   | 36          | mir-126     | 38   | 11          | miR-155   | 67   | 22          | mir-126    | 29   | 4           |
| mir-23b                                      | 46   | 44          | mir-207     | 59   | 8           | miR-23b   | 70   | 14          | mir-137    | 13   | 12          |
| mir-328                                      | 22   | 29          | mir-25      | 59   | 9           | miR-26a   | 68   | 11          | mir-292-3p | 31   | 4           |
| mir-335                                      | 40   | 26          | mir-28      | 41   | 7           | miR-98    | 74   | 27          | mir-34a    | 38   | 8           |
| mir-340                                      | 51   | 11          | mir-29a     | 39   | 8           |           |      |             | mir-96     | 32   | 13          |
| mir-367                                      | 37   | 34          | mir-30a-3p  | 30   | 6           |           |      |             |            |      |             |
| mir-368                                      | 53   | 36          |             |      |             |           |      |             |            |      |             |
| mir-380-3p                                   | 30   | 42          |             |      |             |           |      |             |            |      |             |
| mir-410                                      | 50   | 47          |             |      |             |           |      |             |            |      |             |
| mir-341                                      | 53   | 0           |             |      |             |           |      |             |            |      |             |

FIG. 20

| A549 +/- TRAIL                                                                 |      | A549 +/- etopósido |      | HTB-57 +/- etopósido |      | CRL-5826 +/- etopósido |      | HeLa +/- etopósido |      |
|--------------------------------------------------------------------------------|------|--------------------|------|----------------------|------|------------------------|------|--------------------|------|
| miARN que reducen la viabilidad celular en presencia de un agente terapéutico  |      |                    |      |                      |      |                        |      |                    |      |
| miARN                                                                          | % CN | miARN              | % CN | miARN                | % CN | miARN                  | % CN | miARN              | % CN |
| mir-101                                                                        | 135  | mir-28             | 319  | mir-126              | 171  | mir-132                | 142  | mir-124            | 162  |
| mir-124                                                                        | 158  | mir-124            | 139  | mir-132              | 201  | mir-182                | 134  | mir-126            | 161  |
| mir-125a                                                                       | 134  | mir-126            | 141  | mir-28               | 176  | mir-28                 | 154  | mir-132            | 170  |
| mir-132                                                                        | 147  | mir-147            | 120  | mir-337              | 217  | mir-292-3p             | 212  | mir-147            | 171  |
| mir-136                                                                        | 178  | mir-216            | 108  | mir-292-3p           | 268  |                        |      | mir-216            | 199  |
| mir-155                                                                        | 181  | mir-292-3p         | 489  | miR-7100             | 227  |                        |      | mir-28             | 169  |
| mir-182                                                                        | 153  | mir-337            | 251  |                      |      |                        |      | mir-292-3p         | 208  |
| mir-186                                                                        | 176  |                    |      |                      |      |                        |      | mir-337            | 285  |
| mir-202                                                                        | 152  |                    |      |                      |      |                        |      |                    |      |
| mir-206                                                                        | 138  |                    |      |                      |      |                        |      |                    |      |
| mir-221                                                                        | 143  |                    |      |                      |      |                        |      |                    |      |
| mir-224                                                                        | 129  |                    |      |                      |      |                        |      |                    |      |
| mir-28                                                                         | 136  |                    |      |                      |      |                        |      |                    |      |
| mir-291                                                                        | 145  |                    |      |                      |      |                        |      |                    |      |
| mir-292-3p                                                                     | 169  |                    |      |                      |      |                        |      |                    |      |
| mir-297                                                                        | 140  |                    |      |                      |      |                        |      |                    |      |
| mir-302                                                                        | 134  |                    |      |                      |      |                        |      |                    |      |
| mir-372                                                                        | 125  |                    |      |                      |      |                        |      |                    |      |
| mir-373                                                                        | 169  |                    |      |                      |      |                        |      |                    |      |
| mir-376b                                                                       | 145  |                    |      |                      |      |                        |      |                    |      |
| miARN que aumentan la viabilidad celular en presencia de un agente terapéutico |      |                    |      |                      |      |                        |      |                    |      |
| mir-125b                                                                       | 83   |                    |      |                      |      |                        |      |                    |      |
| mir-152                                                                        | 73   |                    |      |                      |      |                        |      |                    |      |
| mir-16                                                                         | 90   |                    |      |                      |      |                        |      |                    |      |
| mir-194                                                                        | 78   |                    |      |                      |      |                        |      |                    |      |
| mir-197                                                                        | 82   |                    |      |                      |      |                        |      |                    |      |
| mir-214                                                                        | 82   |                    |      |                      |      |                        |      |                    |      |
| mir-24                                                                         | 87   |                    |      |                      |      |                        |      |                    |      |
| mir-30a-3p                                                                     | 63   |                    |      |                      |      |                        |      |                    |      |
| mir-331                                                                        | 73   |                    |      |                      |      |                        |      |                    |      |

**FIG. 21**



| miARN  | secuencia              | Proliferación A549<br>(% NC) | Proliferación Jurkats<br>(%CN) |
|--------|------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| let-7a | ugagguaguagguuguauaguu | 119                          | 21                             |
| let-7b | ugagguaguagguugugugguu | 124                          | 50                             |
| let-7c | ugagguaguagguuguaugguu | 114                          | 85                             |
| let-7d | agagguaguagguugcauagu  | 113                          | 97                             |
| let-7g | ugagguaguaguuuuguacagu | 114                          | 105                            |

**FIG. 23**

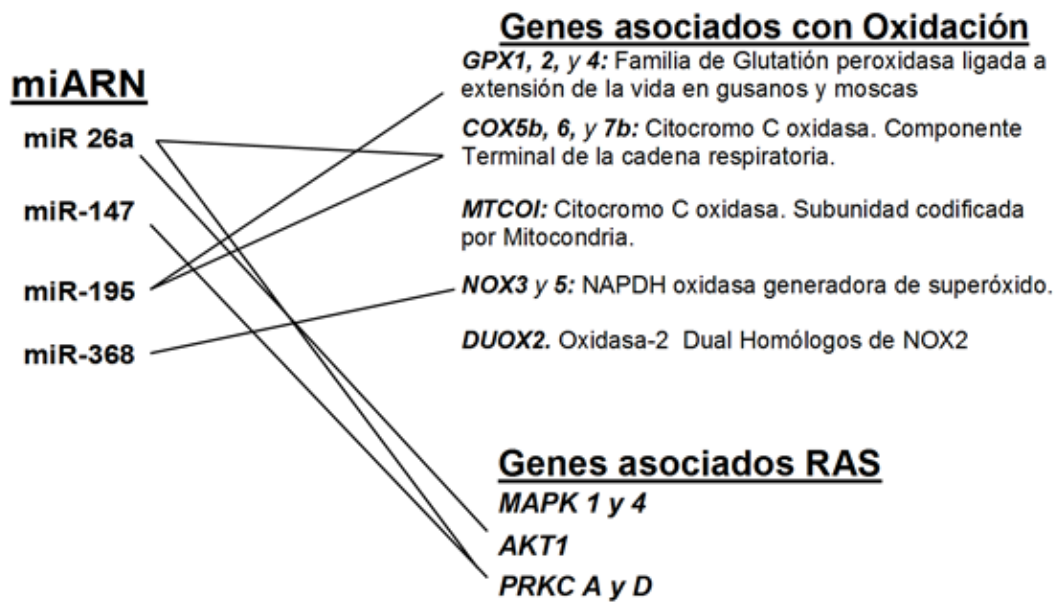


FIG. 24