



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 308 575**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05815224 .0**

96 Fecha de presentación : **03.11.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1807536**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.07.2007**

54 Título: **Identificación y utilización de los miARN implicados en la diferenciación de células procedentes de una leucemia mieloide.**

30 Prioridad: **03.11.2004 FR 04 11725**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.12.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.12.2008

73 Titular/es: **CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS)
3, rue Michel-Ange
75794 Paris Cédex 16, FR**

72 Inventor/es: **Voinnet, Olivier;
Lecellier, Charles-Henri;
Saumet, Anne y
Lanotte, Michel**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 308 575 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

Identificación y utilización de los miARN implicados en la diferenciación de células procedentes de una leucemia mieloide.

La presente invención se refiere a un procedimiento para identificar agentes terapéuticos para el tratamiento de la leucemia mieloide, a un procedimiento para identificar los miARN implicados en la diferenciación de células leucémicas mieloides y a la utilización de miARN o de secuencias complementarias a los miARN para fabricar un medicamento destinado al tratamiento de la leucemia mieloide.

El término “silenciamiento por ARN” se refiere a los mecanismos de represión de la expresión de un gen mediados por un ARN y que utilizan interacciones específicas de secuencia. En las plantas y los animales, existen principalmente dos vías distintas de regulación post-transcripcional de la expresión génica que utilizan dos tipos diferentes de ARN pequeños.

Por una parte, están los siARN (ARN de interferencia cortos) que son ARN pequeños de doble hebra (ARNdb) de 21 a 26 nucleótidos (nt) de longitud y que actúan como mediadores específicos de secuencia para la degradación de ARNm durante el mecanismo de ARN de interferencia (iARN). En la *Drosophila*, estos siARN se obtienen de ARNdb por la acción de una enzima de tipo ARNasa III denominada DICER. Los siARN formados se asocian entonces al complejo proteico RISC (Complejo Silenciador Inducido por ARN) que posee una actividad endonucleasa. El complejo RISC/siARN formado puede cortar de forma específica las moléculas de ARN citoplasmático que presentan una identidad de secuencia con el siARN presente en el complejo. En las plantas y los animales, este mecanismo juega un papel defensivo importante. Este mecanismo, mediante la represión de la proliferación de los elementos transponibles, está implicado igualmente en el mantenimiento de la integridad del genoma.

Por otra parte, están igualmente los miARN (micro ARN) que son ARN pequeños con una hebra extremadamente conservados durante la evolución y que tienen una longitud de aproximadamente 20 nucleótidos. Los miARN se generan como los siARN, a saber, a partir de un precursor de doble hebra madurado por la enzima DICER. Un mismo ARN precursor codifica varios miARN. Así, los miARN miR-19b, miR-92, miR-17, miR-18, miR-19a, miR-19b, miR-20 y miR-91 están codificados por el mismo ARN precursor. Asimismo, los miARN miR-23, miR-24 y miR-27 están igualmente codificados por un mismo ARN precursor. Sin embargo, los miARN presentan no obstante un determinado número de diferencias con los siARN. Así, los miARN son moléculas con una hebra mientras que los siARN son moléculas de doble hebra. Aunque el miARN miR-196 sea capaz de escindir el ARNm Hox8 (YEKTA *et al.*, Science, vol. 304, p: 594-596, 2004; MANSFIELD, Nat. Genet., vol. 36(10), p: 1079-83, 2004), la mayor parte de los miARN animales no inducen la escisión endonucleótica de los ARN diana. Por el contrario, los miARN animales inhiben en general la traducción de los ARN diana hibridando con su secuencia 3'UTR (región no traducida) mediante un mecanismo todavía desconocido (para una revisión, véase BARTEL D.P., Cell, vol. 116, p: 281-297, 2004). Por ello, los miARN animales, a diferencia de los miARN vegetales, presentan una homología de secuencia parcial con sus dianas que podría justificar las diferencias de su modo de acción. Finalmente, a diferencia de los siARN, los miARN no parecen estar implicados en los mecanismos de defensa sino más bien de desarrollo y, más particularmente, de diferenciación. En efecto, la expresión de un miARN específico (miR-181) en las células madre hematopoyéticas en cultivo e *in vivo* aumenta la fracción de los linfocitos B, lo que sugiere una implicación de este miARN en la diferenciación de las células hematopoyéticas en linfocito B (CHEN *et al.*, Science, vol. 303 (5654p, p: 83-6). Una indicación indirecta de la importancia de los miARN en los procesos de desarrollo en los animales lo proporciona una parada de la embriogénesis, asociada a defectos precoces de los procesos de diferenciación, en ratones en los que se ha mutado el gen que codifica DICER (BERSTEIN *et al.*, Nat. Genet., vol. 35, p: 215-7, 2003). A partir de estas diferentes observaciones, se ha propuesto un modelo del mecanismo de desarrollo en el que, para cada tipo celular particular y en un estadio de desarrollo determinado, un conjunto de miARN específicos influye en la expresión de una fracción determinada del transcriptoma (BARTEL D.P., 2004, citado anteriormente).

Debido al vínculo entre la expresión de los miARN y los procesos de diferenciación, el perfil de expresión de los miARN durante la cancerogénesis suscita actualmente un interés creciente. Así, se ha demostrado que el miARN let-7 está subexpresado en los cánceres de pulmón humanos y su sobreexpresión en una línea celular de adenocarcinoma de pulmón inhibe el crecimiento celular *in vitro* (TAKAMIZAWA *et al.*, Cancer Res., vol. 64, p: 3753-3756, 2004).

La leucemia está calificada como cáncer de la sangre y se caracteriza por una proliferación de los leucocitos. La leucemia puede ser aguda y conllevar la muerte del paciente en algunas semanas o algunos meses. Esta enfermedad puede evolucionar en una forma linfocitaria o en una forma mieloide según el origen de las células. La forma linfocitaria resulta de una hiperproliferación de los progenitores implicados en la vía de diferenciación linfocitaria, mientras que la forma mieloide resulta de una hiperproliferación de los progenitores implicados en la vía de diferenciación mieloide. En lo que se refiere más particularmente a las leucemias mieloides, éstas se tratan con una combinación de diversos agentes farmacológicos que permiten la diferenciación y la apoptosis consecutiva de las células cancerosas. Sin embargo, aparecen frecuentemente fenómenos de resistencia al tratamiento que disminuyen otro tanto las oportunidades de curación del paciente.

La leucemia aguda mieloide de tipo 3 (LAM3) o también leucemia aguda promielocitaria (LAP) representa cerca del 10% de los casos de leucemia aguda mielocitaria. Las células cancerosas procedentes de LAM3 se caracterizan por un bloqueo de la granulopoyesis (vía de diferenciación de los granulocitos) en el estadio promielocito (DE THE

y CHELBIALIX, Oncogene, vol. 20, p: 7136-9, 2001). Las células bloqueadas en un estadio precoz de diferenciación continúan proliferando y se acumulan en la médula ósea. A veces, esta acumulación de células se extiende a la circulación sanguínea periférica provocando la mayoría de las veces la muerte de los pacientes por coagulación intravascular diseminada. A nivel molecular, la translocación cromosómica t(15;17) está asociada específicamente a este tipo de leucemia y conduce a la síntesis de una proteína de fusión entre el receptor α del ácido retinoico (RAR α) y la proteína PML. Esta proteína de fusión, denominada PML-RAR α , interfiere negativamente con el RAR α . Esta interferencia conlleva un bloqueo de la diferenciación de las células en el estadio promielocito. El tratamiento clínico de esta leucemia utiliza agentes que inducen la diferenciación celular (BENOIT *et al.*, Oncogene, vol. 20, p: 7161-7177, 2001). Uno de los agentes terapéuticos anticancerosos más utilizados para el tratamiento de la LAM3 es el ácido retinoico *todo trans* o ATRA. El ATRA permite la remisión de la enfermedad restaurando la diferenciación de las células leucémicas y conlleva de forma consecutiva su muerte por apoptosis. Sin embargo, como para las demás leucemias mieloides, aparecen fenómenos de resistencia que muestran los límites de la utilización de ATRA solo en la terapia anticancerosa. Actualmente, se están estudiando diferentes combinaciones para desarrollar protocolos más eficaces.

Consecuentemente, existe una necesidad urgente de identificar nuevas moléculas que presentan una acción terapéutica frente a las leucemias mieloides, de nuevos protocolos de tratamiento eficaces y además de evaluar la eficacia de un tratamiento en un paciente que padece leucemia mieloide.

De forma inesperada, los inventores han podido demostrar que la diferenciación de células cancerosas procedentes de una leucemia mieloide está acompañada de una modificación de la expresión de los miARN y, en particular, que la diferenciación de células cancerosas procedentes de una leucemia mieloide aguda de tipo 3 (LAM3) está acompañada de una modificación de la expresión de los miARN miR23a (SEQ ID NO: 9, AUCACAUUGCCAGGGGAUUUCCA), miR27a (SEQ ID NO: 11, UUCACAGUGGCUAAGUUCGC) y miR24-2 (SEQ ID NO: 12, TGGCTCAGTTTCAG CAGGAAC) codificados por un mismo ARN precursor (véase la figura 1) de secuencia SEQ ID NO: 13 (figura 2).

Respecto a la implicación de los miARN en los procesos de diferenciación durante la embriogénesis, la correlación existente entre la expresión de los miARN y la diferenciación de las células derivadas de la leucemia mieloide sugiere que los miARN están implicados igualmente en el mecanismo de diferenciación de las células derivadas de la leucemia mieloide.

Los inventores han podido confirmar esta implicación de los miARN en el mecanismo de diferenciación de las células derivadas de la leucemia mieloide y ponen de manifiesto la inhibición de esta diferenciación en respuesta a una sobreexpresión del ARN precursor de secuencia SEQ ID NO: 13.

Consecuentemente, la presente invención tiene por objeto un procedimiento *in vitro* para identificar agentes terapéuticos o combinaciones de agentes terapéuticos eficaces para inducir la diferenciación de células leucémicas mieloides, caracterizado porque comprende las etapas de:

i) poner en cultivo células procedentes de una leucemia mieloide,

ii) adición de al menos un compuesto al medio de cultivo de dicha línea celular,

iii) análisis de la evolución del nivel de expresión de al menos un miARN codificado por el ARN precursor de secuencia SEQ ID NO: 13 entre las etapas (i) y (ii),

iv) identificación de los compuestos o combinaciones de compuestos que conllevan una modificación del nivel de expresión de dicho miARN entre las etapas (i) y (ii).

La etapa (i) de poner en cultivo células procedentes de una leucemia mieloide puede efectuarse según las técnicas muy conocidas por el experto en la técnica. Los protocolos para poner el cultivo que se pueden utilizar en el procedimiento según la invención están descritos principalmente en BENOIT *et al.* (2001, citado anteriormente).

Según un modo de realización preferido, el procedimiento según la invención permite identificar agentes terapéuticos o combinaciones de agentes terapéuticos eficaces para tratar una leucemia mieloide asociada a un bloqueo de la granulopoyesis y, particularmente, para tratar una leucemia mieloide asociada a un bloqueo en el estadio promielocito tal como la LAM3. Las células utilizadas en el procedimiento de la invención pueden obtenerse de una leucemia mieloide aguda asociada a un bloqueo de la granulopoyesis y, particularmente, de una leucemia mieloide asociada a un bloqueo de las células en el estadio promielocito tal como la LAM3.

Ventajosamente, las células utilizadas pueden ser las células de la línea celular NB4 o una línea celular derivada de ésta última, pudiendo elegirse dicha línea derivada entre las líneas celulares NB4-LR1 y NB4-LR2 (RUCHAUD *et al.*, 1994, citado anteriormente). Un protocolo para poner en cultivo la línea celular NB4 o sus líneas derivadas se describe principalmente en BENOIT *et al.* (2001, citado anteriormente).

ES 2 308 575 T3

La línea promielocitaria humana NB4 se ha aislado a partir de una extracción de médula ósea de una paciente que padece una leucemia aguda promielocitaria (BENOIT *et al.*, 2001, citado anteriormente). Estas células portan la translocación t(15;17) y tienen la capacidad de diferenciarse en granulocitos neutrófilos bajo el efecto de ATRA.

5 Las líneas NB4-LR1 y NB4-LR2, que se derivan de la línea NB4, presentan una resistencia a la diferenciación inducida por ATRA. Para la línea NB4-LR1, si la respuesta transcripcional de ATRA se mantiene, su diferenciación necesita un tratamiento conjunto ATRA/AMPC. El estudio de este mecanismo de resistencia ha permitido identificar una alteración de las vías de señalización de membrana en esta línea que conlleva un bloqueo de los procesos de maduración engranados normalmente por ATRA. Para la línea celular NB4-LR2, sus células expresan una proteína
10 PML-RAR α que está truncada en su parte RAR α . Esta mutación que está localizada en el dominio de unión al ácido retinoico de PML-RAR α hace que estas células sean insensibles a ATRA y a una mezcla ATRA/AMPC. La restauración de la diferenciación necesita la cooperación entre las vías de señalización de los retinoides, tal como F R 11237 o B M S 749 (agonistas estrictos de RXR (receptor nuclear del retinoide X) y AMPC. Como el RAR α no es funcional, es igualmente posible utilizar el ácido retinoico 9-cis, agonista a la vez de RAR y de RXR, para inducir diferenciación
15 dependiente de RXR.

Ventajosamente además, las células que se ponen en cultivo en la etapa i) pueden proceder de una extracción, principalmente de una extracción sanguínea, de una persona que padece leucemia mieloide. Los protocolos para poner en cultivo dichas células son muy conocidos por el experto en la técnica y se describen principalmente en LANOTTE
20 *et al.* (Blood, vol. 77, p: 1080-1086, 1991).

Según un modo de realización preferido de la invención, el o los compuestos que pueden utilizarse en la etapa (ii) del procedimiento según la invención pueden ser de cualquier naturaleza, principalmente proteica, glucídica o lipídica. El experto en la técnica puede así ensayar sencillamente y rápidamente en el procedimiento según la invención los
25 compuestos que él considera que podrían presentar un efecto sobre la diferenciación de las células procedentes de una leucemia mieloide.

Según otro modo de realización preferido de la invención, el o los compuestos utilizados en la etapa (ii) del procedimiento según la invención pueden ser agentes terapéuticos utilizados en el tratamiento de otras enfermedades y, más particularmente, en el tratamiento de otros cánceres. El experto en la técnica puede así ensayar sencillamente y rápidamente en el procedimiento según la invención los agentes terapéuticos conocidos en el tratamiento de otras patologías y que él considera que podrían presentar un efecto sobre la diferenciación de las células procedentes de una
30 leucemia mieloide.

Según otro modo de realización preferido de la invención, el o los compuestos utilizados en la etapa (ii) del procedimiento según la invención pueden ser agentes terapéuticos utilizados en el tratamiento de la leucemia mieloide. El procedimiento según la invención permite determinar las dosis y/o las combinaciones óptimas de agentes terapéuticos para obtener una diferenciación de las células. Como ejemplo de dichos agentes terapéuticos, se pueden citar principalmente AMPC, arsénico, interferones, TNF, ácido retinoico y los derivados de los retinoides, tal como ATRA y los
40 retinoides.

El compuesto añadido en la etapa (ii) del procedimiento según la invención puede añadirse directamente al medio de cultivo celular a una concentración que puede estar comprendida entre 1 pM y 1 M, preferentemente entre 1 nM y 100 mM y de manera particularmente preferida entre 100 nM y 1 mM.
45

La etapa (iii) puede efectuarse según las técnicas de análisis conocidas por el experto en la técnica. Por ejemplo, esta etapa puede utilizar la técnica de transferencia northern, de protección con RNasa, de RT-PCR cuantitativa o utilizar microchips de ADN que integran los oligonucleótidos complementarios a los miARN. Preferentemente, esta etapa de análisis puede utilizar la técnica de transferencia northern según el protocolo descrito en LLAVE *et al.*
50 (Plant Cell., vol. 14, p: 1605-1619, 2002). Para aplicar dicho análisis, los ARN de las células que se ponen en cultivo en la etapa (i), antes y después de la adición de un agente terapéutico en la etapa (ii), pueden extraerse según las técnicas de extracción conocidas por el experto en la técnica. En particular, las tomas de células pueden efectuarse diariamente. Los ARN purificados pueden depositarse en un gel de electroforesis. Después de la migración del gel de electroforesis y de la transferencia de los ARN a una membrana, la membrana puede hibridarse con una sonda marcada, fría (biotina, etc.) o radiactiva (P³², P³³, etc.), que presenta una secuencia complementaria en todo o en parte con el ARN precursor de secuencia SEQ ID NO: 13 o con al menos un miARN codificado por este precursor. La secuencia de la sonda presenta una longitud superior o igual a 10 nucleótidos, preferentemente a 15 nucleótidos y de manera particularmente preferida a 20 nucleótidos. La secuencia de la sonda es complementaria en todo o en parte a la secuencia del ARN precursor SEQ ID NO: 13, preferentemente a la secuencia de al menos un miARN codificado
60 por este precursor y de manera particularmente preferida a al menos un miARN elegido entre miR23a (SEQ ID NO: 9), miR27a (SEQ ID NO: 11) y miR24-2 (SEQ ID NO: 12). Después de la hibridación y lavado de la membrana, la señal de hibridación correspondiente al miARN analizado puede cuantificarse según las técnicas muy conocidas por el experto en la técnica, principalmente utilizando un phosphoimager[®]. La señal de hibridación obtenida con una sonda complementaria a este miARN puede normalizarse con la señal de hibridación obtenida con una sonda
65 complementaria a un transcrito expresado de forma constitutiva en las células, tal como el ARN 28S. El valor normalizado obtenido para cada extracción corresponde al nivel de expresión del miARN en las células para cada condición ensayada.

Según un modo de realización particular del procedimiento según la invención, las células utilizadas en la etapa (i) pueden transfectarse previamente utilizando las técnicas conocidas por el experto en la técnica con una construcción que contiene un gen informador, tal como el gen de la GFP y potencialmente un gen de resistencia, tal como un gen de resistencia a la higromicina o a la neomicina. El gen informador contiene además al menos una secuencia complementaria en todo o en parte a la secuencia del ARN precursor SEQ ID NO: 13, preferentemente a al menos una secuencia de un miARN codificado por este precursor y, de manera particularmente preferida, a al menos un miARN elegido entre miR23a (SEQ ID NO: 9), miR27a (SEQ ID NO: 11) y miR24-2 (SEQ ID NO: 12). Ventajosamente, dichas secuencias complementarias tienen una longitud comprendida entre 10 y 100 nucleótidos, preferentemente entre 15 y 50 nucleótidos y, de manera particularmente preferida, entre 18 y 25 nucleótidos. Los protocolos que permiten la obtención de dicha construcción son conocidos por el experto en la técnica; un protocolo como éste está descrito principalmente para los siARN en MANSFIELD *et al.* (2004, citado anteriormente). La utilización de dicha construcción permite simplificar considerablemente el análisis del nivel de expresión de los diferentes miARN ya que no necesita la extracción de los ARN. En efecto, se ha demostrado que un miARN animal es capaz de inducir la escisión de un ARN cuando éste último presenta una secuencia perfectamente complementaria al miARN. La expresión del gen informador, principalmente GFP, está condicionada a la expresión del miARN del que está presente una secuencia complementaria en la secuencia que codifica el gen informador. Así, según si el agente terapéutico induce una disminución o un aumento del ARN precursor o de al menos un miARN codificado por éste, se observará un aumento o una disminución de la expresión del gen informador, respectivamente. El seguimiento de la expresión del gen informador podrá hacerse según las técnicas conocidas por el experto en la técnica y principalmente en el caso de GFP siguiendo la emisión de fluorescencia de las células transfectadas.

La etapa (iv) consiste en la identificación de los compuestos o de las combinaciones de compuestos que conllevan un aumento y/o una disminución del nivel de expresión del ARN precursor SEQ ID NO: 13 o de al menos un miARN codificado por este precursor, preferentemente de un miARN elegido entre miR23a (SEQ ID NO: 9), miR27a (SEQ ID NO: 11) y miR24-2 (SEQ ID NO: 12).

Según un modo de realización particular de la invención, la etapa (iv) consiste en la identificación de los compuestos o de las combinaciones de compuestos que conllevan una disminución del nivel de expresión de al menos uno de dichos miARN. En este modo de realización, la disminución del nivel de expresión de al menos uno de dichos miARN puede aparecer entre el día siguiente a la adición del agente terapéutico (D1) y el cuarto día de tratamiento (D4).

Un segundo procedimiento descrito más adelante se refiere a un procedimiento *in vitro* para identificar los miARN asociados a la diferenciación de las células derivadas de una leucemia mieloide, caracterizado porque comprende las etapas de:

- i) poner en cultivo una línea celular procedente de una leucemia mieloide,
- ii) adición, en el medio de cultivo, de al menos un compuesto que induce la diferenciación de dicha línea celular,
- iii) análisis de la evolución del nivel de expresión de al menos un miARN o de un precursor de miARN entre las etapas (i) y (ii),
- iv) identificación de los miARN que presentan una variación de su perfil de expresión durante la diferenciación.

La etapa de poner en cultivo (i) las células procedentes de una leucemia mieloide puede efectuarse como se ha descrito anteriormente.

El procedimiento descrito permite identificar los miARN cuya expresión está asociada a la diferenciación de células derivadas de una leucemia mieloide asociada a un bloqueo de la granulopoyesis de dichas células, preferentemente asociada a un bloqueo en el estadio promielocito tal como la LAM3.

Ventajosamente, la línea celular procedente de una leucemia mieloide asociada a un bloqueo de la granulopoyesis puede ser la línea celular NB4 o las líneas derivadas de ésta, principalmente las líneas NB4-LR1 y NB4-LR2 descritas anteriormente. La puesta en cultivo de dichas líneas celulares puede efectuarse como se describe en BENOIT *et al.* (2001, citado anteriormente).

La etapa (ii) de adición de compuestos que inducen la diferenciación puede utilizar agentes terapéuticos que se utilizan actualmente en el tratamiento del cáncer y, preferentemente, en el tratamiento de la leucemia mieloide. Como ejemplo de agentes terapéuticos que pueden utilizarse en la etapa (ii) del procedimiento según la invención, se pueden citar principalmente AMPc, arsénico, interferones, TNF, ácido retinoico y los derivados de los retinoides, tal como ATRA, rexinoides. El agente terapéutico utilizado puede añadirse directamente al medio de cultivo celular a una concentración comprendida entre 1 pM y 1 M, preferentemente entre 1 nM y 100 mM y, de manera particularmente preferida, entre 100 nM y 1 mM.

Los compuestos inductores de la diferenciación para la línea NB4 pueden elegirse entre ATRA y una mezcla ATRA/AMPc. Para obtener una diferenciación de dichas células, la concentración de ATRA utilizada puede estar comprendida entre 1 nM y 1 mM, preferentemente entre 10 nM y 100 μ M, de manera particularmente preferida entre 100 nM y 10 μ M. El ATRA también puede utilizarse en combinación con AMPc presente a una concentración

ES 2 308 575 T3

comprendida entre 100 nM y 100 mM, preferentemente 1 μ M y 10 mM, de manera particularmente preferida entre 10 μ M y 1 mM.

Según un segundo modo de realización preferido de la invención, un compuesto inductor de la diferenciación para la línea NB4-LR1 puede ser una mezcla ATRA/AMPc. Las concentraciones preferidas para estos agentes terapéuticos son las mismas que las descritas anteriormente.

Un compuesto inductor de la diferenciación para la línea NB4-LR2 puede ser una mezcla AMPc/rexinoides, tal como una mezcla AMPc/F R 11237 o AMPc/B M S 749 o una mezcla AMPc/ácido retinoico 9-cis. Para obtener una diferenciación de dichas células, la concentración de rexinoides, tal como F R 11237 o AMPc/B M S 749 o de ácido retinoico 9-cis puede estar comprendida entre 1 nM y 1 mM, preferentemente entre 10 nM y 100 μ M, de manera particularmente preferida entre 100 nM y 10 μ M. Las concentraciones preferidas para el AMPc son las mismas que las descritas anteriormente.

La etapa (iii) de análisis puede efectuarse como se ha descrito anteriormente, pero utilizando como sonda las secuencias complementarias a la secuencia de al menos un miARN. Las secuencias de los miARN se describen principalmente en la solicitud WO 03/029459 o en el sitio de internet <http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna/index.shtml>.

Como control interno, se podrá utilizar una sonda complementaria en todo o en parte a la secuencia del ARN precursor SEQ ID NO: 7 (véase la figura 3), preferentemente a al menos un miARN codificado por este precursor y, de manera particularmente preferida, a al menos un miARN elegido entre miR-17 (SEQ ID NO: 1), miR-18 (SEQ ID NO: 2), miR-19a (SEQ ID NO: 3), miR-19b (SEQ ID NO: 4), miR-20 (SEQ ID NO: 5), miR-91 (SEQ ID NO: 8) y miR-92 (SEQ ID NO: 6).

La etapa (iv) consiste en la identificación de los miARN que presentan una variación de su perfil de expresión durante la diferenciación de la línea celular utilizada.

Según un modo de realización preferido, la etapa (iv) consiste en la identificación de los miARN que presentan un perfil de expresión idéntico o similar a al menos un miARN codificado por el ARN precursor SEQ ID NO: 7, preferentemente a al menos un miARN elegido entre miR-17 (SEQ ID NO: 1), miR-18 (SEQ ID NO: 2), miR-19a (SEQ ID NO: 3), miR-19b (SEQ ID NO: 4), miR-20 (SEQ ID NO: 5), miR-91 (SEQ ID NO: 8) y miR-92 (SEQ ID NO: 6).

Por miARN que presenta un perfil de expresión idéntico al de al menos un miARN codificado por el ARN precursor SEQ ID NO: 7, se entiende un miARN en el que las variaciones del nivel de expresión siguen la misma cinética y con la misma amplitud que las de al menos un miARN codificado por el ARN precursor SEQ ID NO: 7 durante la diferenciación de las células de la línea celular utilizada y principalmente de las células de la línea celular NB4 o de una línea celular derivada de ésta.

Por miARN que presenta un perfil de expresión similar al de al menos un miARN codificado por el ARN precursor SEQ ID NO: 7, se entiende un miARN en el que las variaciones del nivel de expresión siguen una cinética desfasada algunos días, típicamente un día o dos, y/o con una amplitud superior o inferior a las variaciones del nivel de expresión de al menos un miARN codificado por el ARN precursor SEQ ID NO: 7 durante la diferenciación de las células de la línea celular NB4 o de una línea celular derivada.

Según un modo de realización preferido del procedimiento descrito, los miARN identificados presentan un aumento de su nivel de expresión en respuesta a la adición de un agente terapéutico inductor de la diferenciación, tal como ATRA o una mezcla ATRA/AMPc, entre el día del tratamiento (D0) y el cuarto día de tratamiento (D4), preferentemente entre el primer y el tercer día de tratamiento con dicho agente terapéutico.

Los miARN identificados presentan una disminución de su nivel de expresión en respuesta a la adición de un agente terapéutico inductor de la diferenciación, tal como ATRA, entre el segundo (D2) y el cuarto día de tratamiento (D4) con dicho agente terapéutico.

Otro objeto de la presente invención se refiere a la utilización, para fabricar un medicamento destinado al tratamiento de la leucemia mieloide, de una molécula de ácidos nucleicos elegida entre el ARN precursor miR23a/24-2 (SEQ ID NO: 13), una secuencia derivada de dicho ARN, una secuencia complementaria a dicho ARN y una secuencia derivada de dicha secuencia complementaria.

Ventajosamente, dicho medicamento es una molécula de ácidos nucleicos elegida entre una secuencia complementaria del ARN precursor miR23a/24-2 (SEQ ID NO: 13) y una secuencia derivada de dicha secuencia complementaria.

Según otro modo de realización preferido de la invención, la invención tiene por objeto la utilización, para fabricar un medicamento destinado al tratamiento de la leucemia mieloide, de al menos una molécula de ácidos nucleicos que presenta una secuencia elegida entre:

i) la secuencia de miR23a (SEQ ID NO: 9), una secuencia derivada de miR23a, la secuencia complementaria de miR23a, una secuencia derivada de dicha secuencia complementaria,

ES 2 308 575 T3

ii) la secuencia de miR27a (SEQ ID NO: 11), una secuencia derivada de miR27a, la secuencia complementaria de miR27a, una secuencia derivada de dicha secuencia complementaria,

5 iii) la secuencia de miR24-2 (SEQ ID NO: 12), una secuencia derivada de miR24-2, la secuencia complementaria de miR24-2 y una secuencia derivada de dicha secuencia complementaria.

Ventajosamente, dicho medicamento comprende una molécula de ácidos nucleicos elegida entre una secuencia complementaria de miR23a (SEQ ID NO: 9), de miR27a (SEQ ID NO: 11) y de miR24-2 (SEQ ID NO: 12) y las secuencias derivadas de dichas secuencias complementarias.

Preferentemente, la invención tiene por objeto la utilización de al menos una de dichas moléculas de ácidos nucleicos, para fabricar un medicamento destinado al tratamiento de una leucemia mieloide asociada a un bloqueo de la granulopoyesis, y de manera particularmente preferida a un bloqueo en el estadio promielocitos, tal como la LM3.

15 Las moléculas de ácidos nucleicos pueden utilizarse en forma de una hebra o de doble hebra, preferentemente en forma de una hebra. Los ácidos nucleicos pueden seleccionarse entre ADN, ARN o los ácidos nucleicos modificados tales como los ribonucleótidos o los desoxirribonucleótidos que presentan un grupo azúcar o un grupo carbonado modificado.

20 Las moléculas de ARN o de ADN utilizadas en la presente invención pueden contener igualmente uno o varios nucleótidos modificados, es decir, un ribonucleótido o desoxirribonucleótido natural sustituido por un análogo sintético de un nucleótido. Dichos análogos de nucleótidos pueden estar localizados, por ejemplo, en el extremo 3' ó 5' de la molécula de ácido nucleico.

25 Los análogos sintéticos de los nucleótidos preferidos se seleccionan entre los ribonucleótidos que presentan un grupo azúcar o grupo carbonado modificado. Preferentemente, los ribonucleótidos que presentan un grupo azúcar modificado presentan un grupo 2'-OH reemplazado por un grupo seleccionado entre un átomo de hidrógeno, un halógeno, un grupo OR, R, SH, SR, NH₂, NHR, NR₂ o CN, en el que R es un grupo alquilo, alqueno, o alquino de 1 a 6 carbonos y el halógeno es flúor, cloro, bromo o yodo. Preferentemente, los ribonucleótidos que presentan un grupo carbonado modificado tienen su grupo fosfoéster unido al ribonucleótido adyacente que está reemplazado por un grupo modificado tal como un grupo fosfotioato. Sin embargo, es posible igualmente utilizar los ribonucleótidos que presentan un núcleo purina o pirimidina modificado. Como ejemplos de dichos núcleos modificados, se citarán principalmente las uridinas o las citidinas modificadas en la posición 5, tales como 5-(2-amino)propil uridina y 5-bromo uridina, las adenosinas y guanosinas modificadas en la posición 8, tal como 8-bromo guanosina, los nucleótidos desnitrógenados, tal como 7-deaza-adenosina, los nucleótidos N y O-alquilados, tal como N6-metil adenosina. Igualmente, estas diferentes modificaciones pueden combinarse.

40 Las moléculas de ácido nucleico utilizadas en la presente invención pueden obtenerse por métodos de síntesis química o por métodos de biología molecular, principalmente por transcripción a partir de matrices de ADN o de plásmidos aislados a partir de microorganismos recombinantes. Preferentemente, esta etapa de transcripción utiliza ARN polimerasas de fago tales como la ARN polimerasa T7, T3 o SP6.

45 Por secuencia derivada, se entiende una secuencia que presenta una identidad de al menos el 80%, preferentemente de al menos el 90% y de manera particularmente preferida de al menos el 95% con una secuencia de referencia. La determinación de una identidad de secuencia se efectúa según la fórmula siguiente:

$$I = n/L$$

50 Donde I representa la identidad en porcentaje (%), n es el número de nucleótidos idénticos entre una secuencia dada y una secuencia de miARN dada y L es la longitud de la secuencia. Los nucleótidos A, C, G y U pueden corresponder a ribonucleótidos, desoxirribonucleótidos y/o análogos de nucleótidos, como los análogos sintéticos de nucleótido. Además, los nucleótidos pueden estar sustituidos por nucleótidos que forman uniones de hidrógeno análogas con una secuencia nucleica complementaria. Así, el nucleótido U puede estar sustituido por un nucleótido T.

60 Las moléculas de ácidos nucleicos utilizadas para fabricar un medicamento destinado al tratamiento de la leucemia mieloide tienen preferentemente una longitud comprendida entre 15 y 100 nucleótidos, preferentemente entre 18 y 80 nucleótidos y de manera particularmente preferida entre 18 y 30 nucleótidos. En el caso de las moléculas de miARN maduras, presentan una longitud comprendida entre 19 y 24 nucleótidos y más particularmente de 21, 22 ó 23 nucleótidos. Ventajosamente, la secuencia complementaria a un miARN presenta una longitud comprendida entre 19 y 24 nucleótidos. Sin embargo, es posible utilizar la secuencia derivada de un precursor de miARN de una longitud comprendida entre 50 y 90 nucleótidos, la mayoría de las veces entre 60 y 80 nucleótidos, pero que también puede presentar una longitud superior a 100 nucleótidos.

65 La administración de las moléculas de ácidos nucleicos puede efectuarse por los métodos de transferencia de genes conocidos por el experto en la técnica.

Los métodos comunes de transferencia de genes incluyen el fosfato de calcio, DEAE-Dextrano, electroporación, microinyección, métodos virales y liposomas catiónicos (GRAHAM y VAN DER EB, *Virology*, vol. 52, p: 456, 1973; McCUTCHAN y PAGANO, *J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 41, p: 351, 1968; CHU *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, vol. 15, p. 1311; FRALEY *et al.*, *J. Biol. Chem.*, vol. 255, p: 10431, 1980; CAPECCHI *et al.*, *Cell*, vol. 22, p: 479, 1980; FELGNER *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 84, p: 7413, 1988).

Las moléculas de ácidos nucleicos a administrar pueden estar en la forma de una disolución, principalmente de una disolución inyectable, de una crema, de un comprimido o de una suspensión. El soporte puede ser cualquier soporte farmacéutico. Preferentemente, se utilizará un soporte capaz de mejorar la entrada de las moléculas de ácidos nucleicos a las células. Dichos soportes incluyen principalmente los liposomas, preferentemente los liposomas catiónicos.

Una cantidad eficaz de las moléculas de ácidos nucleicos a administrar a un paciente la puede determinar sencillamente un experto en la técnica. Como ejemplo, una cantidad eficaz de las moléculas de ácidos nucleicos está comprendida entre 0,001 mg y 10 g/kg del paciente a tratar, preferentemente entre 0,01 mg y 1 g/kg y de manera particularmente preferida entre 0,1 y 100 mg/kg.

Los ejemplos siguientes se proporcionan como ilustración y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1

Diferenciación de las células NB4 y NB4-LR1 en presencia de ATRA y/o de AMPc

Las células de la línea celular NB4 y de la línea celular NB4-LR1, resistente a la maduración por ATRA solo, se cultivaron como se describe en LANOTTE *et al.* (1991, citado anteriormente) y en RUCHAUD *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 91, p: 8428-8432, 1994). Las células se trataron durante 4 días en presencia de 1 μ M de ácido retinoico *todo trans* (ATRA, SIGMA-ALDRICH) solo o con la adición de 100 μ M de un análogo de AMPc (8-CPT-AMPc-SIGMA-ALDRICH).

La proliferación celular se determinó diariamente por conteo de las células utilizando un contador de células (BECKMAN COULTER FRANCIA SA) del día 0, después de la adición del agente terapéutico, al día 4. Los resultados muestran que los diferentes tratamientos inducen una disminución de la proliferación.

Paralelamente, la evolución de la diferenciación se determinó diariamente durante el tratamiento. La diferenciación granulocítica se evaluó simultáneamente según criterios morfológicos y bioquímicos. El análisis morfológico se efectuó después de una tinción de May-Grünwald. El análisis bioquímico se efectuó por un ensayo de coloración basado en la reducción de NBT (azul de nitro tetrazolio) que permite medir la capacidad oxidativa de las células maduras para reducir el colorante NBT. A este efecto, 0,5 a 1 x 10⁵ células se centrifugaron durante 5 min a 190 g, el sedimento celular se recogió en 200 μ l de tampón salino fosfato (PBS) con NBT (SIGMA ALDRICH, 1 mg/ml) y PMA (Forbol 12-miristato-13-acetato, SIGMA, 10⁻⁷M) y se incubó 20 minutos a 37°C. Las células se recogieron en láminas por centrifugación Cytospin® y se observaron con microscopio de contraste de fase. Se examinó un mínimo de 200 células por lámina bajo microscopio óptico y se calculó un porcentaje de diferenciación sobre la base del número de células NBT positivas. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla I siguiente:

TABLA I

Línea celular	Tratamiento	Evolución del porcentaje de células diferenciadas durante el tratamiento (en días)				
		0	1	2	3	4
NB4	ATRA	0%	6%	20%	43%	95%
	ATRA+AMPc	0%	6%	30%	80%	100%
NB4-LR1	ATRA	0%	0%	2%	5%	5%
	ATRA+AMPc	0%	5%	25%	75%	95%

Los resultados muestran que el co-tratamiento ATRA/AMPc permite obtener una diferenciación de las células NB4 y NB4-LR1. En cambio, sólo las células de la línea celular NB4 se diferencian en presencia de ATRA solo. La figura 4 muestra un ejemplo de coloración de células NB4 con NBT antes y después de tres días de tratamiento con ATRA. Se observa claramente el cambio de morfología de las células resultante de su diferenciación.

ES 2 308 575 T3

Ejemplo 2

Expresión de los miARN durante la diferenciación de las células NB4 inducida por ATRA

5 En una primera serie de experimentos, se evaluó la expresión de diferentes miARN durante la diferenciación de las células NB4 en presencia o en ausencia de ATRA. Se determinó principalmente la expresión de los miARN siguientes:

	miR23a	(SEQ ID NO : 9)	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCCA
10	miR27a	(SEQ ID NO : 11)	UUCACAGUGGCUAAGUUCCGC
	miR24-2	(SEQ ID NO : 12)	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG
	miR15a	(SEQ ID NO : 14)	UAGCAGCACAUAAUGGUUUUGUG
	miR16	(SEQ ID NO : 15)	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG
15	miR19b	(SEQ ID NO : 4)	UGUGCAAUCCAUGCAAACUGA
	miR92	(SEQ ID NO : 6)	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU
	miR19a	(SEQ ID NO : 3)	UGUGCAAUUCUAUGCAAACUGA
	miR20	(SEQ ID NO : 5)	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUA
20	miR17	(SEQ ID NO : 1)	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAGU
	miR18	(SEQ ID NO : 2)	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGUA
	miR91	(SEQ ID NO : 8)	ACUGCAGUGAAGGCACUUGU
	let-7a	(SEQ ID NO : 17)	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
25	let-7d	(SEQ ID NO : 18)	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGU
	miR15b	(SEQ ID NO : 19)	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA
	miR142S	(SEQ ID NO : 20)	CAUAAAGUAGAAAGCACUAC
	miR223	(SEQ ID NO : 21)	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCC
30	miR320	(SEQ ID NO : 22)	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAA
	miR422b	(SEQ ID NO : 23)	CUGGACUUGGAGUCAGAAGGCC

35 Entre estos miARN, algunos pertenecen a un mismo precursor, así (A) los miARN miR-19b, miR-92, miR-17, miR-18, miR-19a, miR-19b, miR-20, miR-91 y miR-92, (B) los miARN miR15a y miR16 y (C) los miARN miR23a, miR27a y miR24-2 (véase la figura 1). Un modelo plantea que dichos miARN generados a partir de un mismo ARN precursor presentan un mismo perfil de expresión (LEE *et al.*, Embo J., vol. 21, p: 4663-4670, 2002).

40 Los ARN totales se extrajeron de las células de las líneas celulares NB4 tratadas o no con 1 μ M de ATRA en los mismos intervalos de tiempo que en el ejemplo 1 y utilizando el kit Tri-Reagent[®] (SIGMA) según las instrucciones del fabricante. El análisis por northern de los ARN de bajo peso molecular se efectuó como se describe en LLAVE *et al.* (2002, citado anteriormente). Todos los experimentos de northern se efectuaron en duplicado. Los oligonucleótidos de ADN complementarios a las secuencias de los miARN analizados se marcaron en su extremo con ATP γ -P³² utilizando la polinucleótido quinasa T4 (NEW ENGLAND BIOLABS) según las instrucciones del fabricante.

45 La figura 5 muestra el perfil de expresión de los diferentes miARN analizados en las células NB4 después de 0, 1, 2, 3 y 4 días de tratamiento. La cantidad de ARN en cada pocillo se controló por coloración del gel con bromuro de etidio y visualización de los ARN ribosómicos (ARNr) bajo luz UV.

50 Los resultados muestran que la inducción de la diferenciación de las células NB4 en presencia de ATRA induce una modificación de la expresión de numerosos miARN (véase la figura 5). Además, resulta que los miARN que pertenecen a un mismo precursor presentan efectivamente un perfil de expresión similar en el tiempo.

55 De forma más detallada, los resultados obtenidos muestran una modulación del nivel de expresión de los miARN miR-19b, miR-23a y miR-92 durante la diferenciación de las células NB4 en respuesta al tratamiento con ATRA. En el caso de miR-23a, su nivel de expresión aumenta con el tiempo en respuesta al tratamiento con ATRA.

60 El perfil de expresión de miR-19b y de miR-92 difiere del de miR-23. Este perfil de expresión corresponde a un primer aumento del nivel de expresión de miR-19b y miR-92, inmediatamente después del tratamiento (D0) con un máximo de expresión en el tercer día de tratamiento. Finalmente, el nivel de expresión de miR-19b y de miR-92 cae entre el 3^{er} y 4^o día de tratamiento (entre D3 y D4) cuando se completa la diferenciación de los granulocitos (véase la tabla I). Además, el nivel de expresión de miR-19b y de miR-92 en el 4^o día de tratamiento es inferior a su nivel de expresión en las células no tratadas.

65

Ejemplo 3

Expresión de los miARN en las células de las líneas celulares NB4 y NB4-LR1 en respuesta a un tratamiento con ATRA

5 Para establecer formalmente la correlación entre la expresión de los diferentes miARN identificados y la diferenciación en granulocitos, las células de las líneas celulares NB4 y NB4-LR1 se cultivaron en presencia o en ausencia de ATRA como se ha descrito en el ejemplo 1.

10 Se efectuaron experimentos de northern según el protocolo descrito en el ejemplo 2. Los diferentes experimentos de northern se realizaron con sondas complementarias a los miARN miR-23a, miR-17, miR-18, miR-19a, miR-19b, miR-20, miR-23 y miR-92.

15 Los resultados obtenidos muestran que el perfil de expresión de miR-23 es similar en las células NB4 y NB4-LR1 en respuesta a un tratamiento con ATRA (véanse las figuras 5 y 6). En cambio, no se observa ningún aumento de la expresión de miR-23a en el caso de un tratamiento de las células NB4-LR2 con ATRA.

20 En cambio, los resultados han mostrado que los diferentes miARN miR-17, miR-18, miR-19a, miR-19b, miR-20 y miR-92, que están codificados por un mismo ARN precursor, presentan un perfil de expresión diferente entre las células NB4 y NB4-LR1 en respuesta al tratamiento con ATRA.

Ejemplo 4

25 *Expresión de los miARN en las células de las líneas celulares NB4 y NB4-LR1 en respuesta a un tratamiento simultáneo con ATRA y AMPc*

30 Para confirmar la correlación entre la expresión de los diferentes miARN y principalmente miR-17, miR-18, miR-19a, miR-19b, miR-20 y miR-92 y la diferenciación en granulocitos, las células de las líneas celulares NB4 y NB4-LR1 se cultivaron en presencia o en ausencia de ATRA/AMPc como se ha descrito en el ejemplo 1. Después de un co-tratamiento ATRA/AMPc, se restaura la diferenciación de las células de la línea celular NB4-LR1 en granulocitos.

35 Se efectuaron experimentos de northern según el protocolo descrito en el ejemplo 2. Los diferentes experimentos de northern se realizaron con sondas complementarias a los miARN miR-17, miR-18, miR-19a, miR-19b, miR-20 y miR-92.

40 Los resultados han mostrado que el perfil de expresión de estos diferentes miARN es idéntico entre las células NB4 y NB4-LR1 en respuesta al co-tratamiento ATRA/AMPc. Sin embargo, el perfil de expresión de estos miARN difiere del observado en las células NB4 en respuesta al tratamiento con ATRA solo. En respuesta al co-tratamiento ATRA/AMPc, los miARN miR-17, miR-18, miR-19a, miR-19b, miR-20 y miR-92 muestran un efecto máximo de expresión en el 2º día de tratamiento, después una disminución importante de su nivel de expresión entre el 2º y el 3º día de tratamiento y finalmente su nivel de expresión inicial se restablece entre el 3º y el 4º día de expresión.

45 La inducción y la caída consecutiva del nivel de expresión de los miARN miR-17, miR-18, miR-19a, miR-19b, miR-20 y miR-92 se produce por lo tanto de manera más precoz en respuesta al co-tratamiento ATRA/AMPc (respecto al tratamiento con ATRA solo), al igual que la diferenciación de las células NB4 en granulocitos (véase la tabla I).

50 Los resultados obtenidos confirman, por lo tanto, la correlación entre la expresión de determinados miARN y principalmente los miARN miR-17, miR-18, miR-19a, miR-19b, miR-20 y miR-92 y la diferenciación de las células NB4 y NB4-LR1 en granulocitos. Además, la cinética diferente de la expresión de los miARN estudiados entre el tratamiento con ATRA y el co-tratamiento ATRA/AMPc puede justificarse por la cinética diferente de diferenciación entre los dos tratamientos. Finalmente, la cinética de la expresión de los miARN miR-17, miR-18, miR-19a, miR-19b, miR-20 y miR-92 muestra, por lo tanto, sucesivamente una inducción de su expresión con el inicio de la diferenciación y una inhibición de su expresión al final de la diferenciación.

55

Ejemplo 5

Diferenciación de las células NB4 en respuesta a una sobreexpresión de diferentes miARN

60 Para determinar la posible implicación de algunos de los miARN analizados en la granulopoyesis, las secuencias genómicas que codifican el ARN precursor de secuencia SEQ ID NO: 7 que codifica los miARN miR17/92 (véase la figura 3, la secuencia complementaria de la secuencia que codifica el ARN precursor de secuencia SEQ ID NO: 7 se representa en la figura 8, SEQ ID NO: 10), el ARN precursor de secuencia SEQ ID NO: 13 que codifica los miARN miR23a/24-2 y el ARN precursor de secuencia SEQ ID NO: 16 (véase la figura 7) que codifica los miARN miR16/15a se clonaron en posición 5' respecto al sitio interno de entrada ribosomal (IRES) del vector MIE (MSCV IRES EGFP (proteína verde fluorescente amplificada), SYSTEMIX) como se describe en CHANGCHUN *et al.* (Blood, vol. 94(2), p: 793-802, 1999). La producción de sobrenadantes que contienen los diferentes retrovirus MIE- miARN (conteniendo

ES 2 308 575 T3

MIE principalmente la secuencia genómica SEQ ID NO: 10 bajo el control de un promotor pol II) en la línea celular Bosc 23 (PEAR *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 90, p8392-8396, 1993) se efectuó como se describe en LAVAU *et al.* (EMBO J., vol. 16, p: 4226-4237, 1997). Las células de la línea celular NB4 se infectaron con los diferentes retrovirus seleccionados según el protocolo descrito en CHANGCHUN *et al.* (1999, citado anteriormente).

5 Las células de la línea celular NB4 infectadas con el vector MIE solo o con los diferentes vectores MIE-miARN se cultivan como se ha descrito en el ejemplo 1 en presencia o en ausencia de ATRA.

10 La evolución de la diferenciación se determinó diariamente para los diferentes cultivos como se ha descrito en el ejemplo 1.

15 Los resultados muestran que a diferencia de las células infectadas con los vectores MIE solo, MIE-miR17/miR92 y miR15a/16, los cuales se diferencian al cabo de cuatro días de cultivo en presencia de ATRA, las células infectadas con el vector MIE-miR23a/miR24-2 no se diferencian en las mismas condiciones (véanse las figuras 9 y 10).

20 Con el fin de confirmar la sobreexpresión de los miARN en las células NB4 infectadas, se efectuaron experimentos de northern según el protocolo descrito en el ejemplo 2. Los diferentes experimentos de northern se realizaron con sondas complementarias a los miARN miR-23a, miR16 y miR-92.

25 Los resultados confirman que las células infectadas con los vectores MIE- miARN presentan un nivel de expresión para los miARN codificados por el vector MIE- miARN utilizado para infectarlas (véase la figura 11).

Consecuentemente, y de forma inesperada, los resultados sugieren que los miARN miR23a, miR27a y miR24-2 están implicados potencialmente en la diferenciación de las células NB4 en presencia de ATRA y más precisamente que estos miARN regulan “negativamente” la vía de diferenciación de la granulopoyesis en las células NB4.

Ejemplo 6

30 *Diferenciación de las células NB4 en respuesta a una sobreexpresión de diferentes miARN codificados por el precursor miR23a/24-2*

35 Para determinar individualmente la implicación de los diferentes miARN codificados por el precursor miR23a/24-2 en la granulopoyesis inducida por ATRA, la secuencia genómica que codifica el ARN precursor de secuencia SEQ ID NO: 13 que codifica los miARN miR23a/24-2, así como diferentes construcciones que presentan una delección para uno o dos miARN codificados por este último ($\Delta 24\Delta 27$, $\Delta 24$, $\Delta 23\Delta 24$, $\Delta 23$, $\Delta 23\Delta 27$ y $\Delta 27$) se clonaron en posición 5' respecto al sitio interno de entrada ribosomal (IRES) del vector MIE como se ha descrito anteriormente.

40 Las células de la línea celular NB4 se infectaron con estos diferentes vectores retrovirales, se seleccionaron según el protocolo descrito en el ejemplo 5 y se cultivaron como se ha descrito en el ejemplo 1 en presencia o en ausencia de ATRA.

45 La evolución de la diferenciación se determinó diariamente para los diferentes cultivos como se ha descrito en el ejemplo 1.

Los resultados muestran que sólo el vector que integra el precursor completo miR23a/24-2 permite bloquear la diferenciación de las células NB4 en presencia de ATRA (véase la figura 12). Los experimentos de transferencia northern efectuados según el protocolo descrito anteriormente muestran que los vectores que codifican los precursores truncados miR23a/24-2 permiten sin embargo obtener la sobreexpresión de los miARN efectivamente codificados por estos últimos (véase la figura 13).

Consecuentemente, la expresión coordinada de los miARN miR23a, miR27a y miR24-2 es necesaria para obtener un bloqueo de la diferenciación de las células NB4 en presencia de ATRA.

55 Con el fin de determinar si el precursor completo miR23a/24-2 es necesario para la inhibición de la diferenciación de las células NB4 en presencia de ATRA, las células NB4 se co-infectaron con el vector MIE solo o con los vectores MIE- $\Delta 23\Delta 27$ y MIE- $\Delta 24$ simultáneamente.

60 Los resultados muestran que la complementación in trans de los diferentes miARN del precursor miR23a/24-2 no permite bloquear la diferenciación de las células NB4 en presencia de ATRA (véase la figura 14). Sin embargo, los experimentos de northern efectuados sobre las células infectadas según el protocolo descrito anteriormente muestran que los diferentes miARN miR23a, miR27a y miR24-2 están sobreexpresados en las células infectadas simultáneamente con los vectores MIE- $\Delta 23\Delta 27$ y MIE- $\Delta 24$ (véase la figura 15).

65 En conclusión, y de forma inesperada, estos experimentos muestran que la expresión de los miARN miR23a, miR27a y miR24-2 simultáneamente y a partir de un mismo precursor es necesaria para inhibir la diferenciación de las células NB4 en presencia de ATRA.

ES 2 308 575 T3

Ejemplo 7

Diferenciación de las células NB4 en respuesta a una inhibición de la expresión de los miARN miR23a, miR27a y miR24-2

5

Se sintetizaron oligonucleótidos modificados químicamente (LNA[®]-DNA, PROLIGO) y de secuencia complementaria a miR23a, miR27a y miR24-2. Estos oligonucleótidos modificados están compuestos de análogos de nucleótidos que contienen un puente 2'-O, 4'-C metileno que permite mejorar tanto la estabilidad del oligonucleótido obtenido como los rendimientos de hibridación de éste.

10

Las células de las líneas celulares NB4 o NB4-LR1 se transfectaron con los oligonucleótidos sintetizados según el protocolo descrito en MEISTER *et al.* (RNA, vol. 10(3), p: 544-50, 2004).

15

Las células de las líneas celulares NB4 y NB4-LR1, transfectadas o no con un oligonucleótido complementario a los miARN miR23a, miR27a y miR24-2, se cultivan como se ha descrito en el ejemplo 1 en presencia o en ausencia de ATRA o de una mezcla ATRA/AMPc.

20

La evolución de la diferenciación se determinó diariamente para los diferentes cultivos como se ha descrito en el ejemplo 1.

Paralelamente, se efectuaron experimentos de northern según el protocolo descrito en el ejemplo 2. Los diferentes experimentos de northern se realizaron con sondas complementarias a los miARN miR23a, miR27a y miR24-2.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Utilización, para fabricar un medicamento destinado al tratamiento de la leucemia mieloide, de una molécula de ácidos nucleicos que tiene una longitud de al menos 15 nucleótidos elegida entre el ARN precursor miR23a/24-2 (SEQ ID NO: 13), una secuencia derivada que presenta una identidad de al menos el 80% con dicho ARN, una secuencia complementaria de dicho ARN y una secuencia derivada que presenta una identidad de al menos el 80% con dicha secuencia complementaria.
2. Utilización según la reivindicación 1, **caracterizada** porque dicho medicamento comprende una molécula de ácidos nucleicos elegida entre una secuencia complementaria del ARN precursor miR23a/24-2 (SEQ ID NO: 13) y una secuencia derivada de dicha secuencia complementaria.
3. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, **caracterizada** porque dicho medicamento comprende una molécula de ácidos nucleicos que presenta una secuencia elegida entre:
- i) la secuencia de miR23a (SEQ ID NO: 9), una secuencia derivada de miR23a, la secuencia complementaria de miR23a, una secuencia derivada de dicha secuencia complementaria,
 - ii) la secuencia de miR27a (SEQ ID NO: 11), una secuencia derivada de miR27a, la secuencia complementaria de miR27a, una secuencia derivada de dicha secuencia complementaria,
 - iii) la secuencia de miR24-2 (SEQ ID NO: 12), una secuencia derivada de miR24-2, la secuencia complementaria de miR24-2 y una secuencia derivada de dicha secuencia complementaria.
4. Utilización según la reivindicación 3, **caracterizada** porque dicho medicamento comprende una molécula de ácidos nucleicos elegida entre una secuencia complementaria de miR23a (SEQ ID NO: 9), de miR27a (SEQ ID NO: 11) y de miR24-2 (SEQ ID NO: 12) y las secuencias derivadas de dichas secuencias complementarias.
5. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, para fabricar un medicamento destinado al tratamiento de una leucemia mieloide asociada a un bloqueo de la granulopoyesis.
6. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada** porque las secuencias de ácidos nucleicos tienen una longitud comprendida entre 15 y 100 nucleótidos.
7. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizada** porque las moléculas de ácidos nucleicos se eligen entre las moléculas de ADN y de ARN.
8. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizada** porque las moléculas de ácidos nucleicos contienen uno o varios nucleótidos modificados.
9. Utilización según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, **caracterizada** porque las moléculas de ácidos nucleicos están en forma de una hebra o de doble hebra.
10. Procedimiento *in vitro* para identificar agentes terapéuticos o combinaciones de agentes terapéuticos eficaces para inducir la diferenciación de células leucémicas mieloides, **caracterizado** porque comprende las etapas de:
- i) poner en cultivo células procedentes de una leucemia mieloide,
 - ii) adición de al menos un compuesto al medio de cultivo de dicha línea celular,
 - iii) análisis de la evolución del nivel de expresión de al menos un miARN codificado por el ARN precursor de secuencia SEQ ID NO: 13 entre las etapas (i) y (ii),
 - iv) identificación de los compuestos o combinaciones de compuestos que conllevan una modificación del nivel de expresión de dicho miARN entre las etapas (i) y (ii).
11. Procedimiento según la reivindicación 10, **caracterizado** porque la etapa (iii) consiste en el análisis del nivel de expresión de al menos un miARN elegido entre miR-23a (SEQ ID NO: 9), miR-27a (SEQ ID NO: 11) y miR-24-2 (SEQ ID NO: 12).
12. Procedimiento según la reivindicación 11, **caracterizado** porque la etapa (iv) consiste en la identificación de los compuestos o combinaciones de compuestos que modulan el nivel de expresión de al menos un miARN elegido entre miR-23a (SEQ ID NO: 9), miR-27a (SEQ ID NO: 11) y miR-24-2 (SEQ ID NO: 12).

ES 2 308 575 T3

13. Procedimiento según la reivindicación 12, **caracterizado** porque la etapa (iv) consiste en la identificación de los compuestos o combinaciones de compuestos que disminuyen el nivel de expresión de al menos un miARN elegido entre miR-23a (SEQ ID NO: 9), miR-27a (SEQ ID NO: 11) y miR-24-2 (SEQ ID NO: 12).

5 14. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, **caracterizado** porque el compuesto es un agente terapéutico para el tratamiento del cáncer.

10 15. Procedimiento según la reivindicación 14, **caracterizado** porque el agente terapéutico se elige entre AMPc, arsénico, interferones, TNF, rexinoides, ácido retinoico y los derivados de los retinoides.

16. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, **caracterizado** porque la etapa (iii) de análisis utiliza la técnica de transferencia northern.

15 17. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 16, **caracterizado** porque las células que se ponen en cultivo en la etapa (i) proceden de una leucemia mieloide asociada a un bloqueo de la granulopoyesis.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

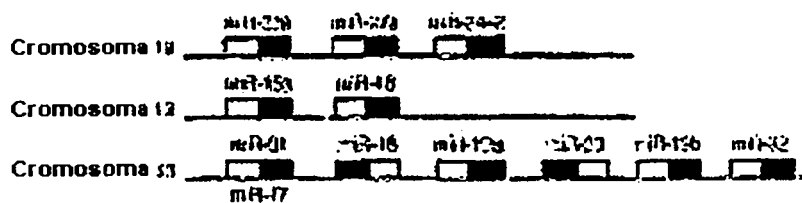


FIG 1

CUCUGCCUCUCCAGUCCUGGGGUCUGGAACGGAGGGCACAGCUAGGCUCCA
 GCUCCCCGUGUGGUGGCUCUCUGCAUAUGAGAAAAGAGCUUCCCUGUGAUC
 AAAGGAAGCAUCUGGGGACCUGGAGGGGAGGUGUCCCCAAAUCUCAUUAUAC
 CUCUUUGCUCUCUCUCUCUUCUCCCCUCCAGGUGCCAGCCUCUGGCCCC
 CGCCCGUGCCCCCUACCCCUUGUGCCACGGCCGGCUGGGGUUCCUGGG
 GAUGGGAUUUGCUUCCUGUCACAAAUCACAUUGCCAGGGAUUUCCAACCG **MIR-23A**
 ACCCUGAGCUCUGCCACCGAGGAUGCUGCCCGGGACGGGGUGGCAGAGA
 GGCCCCGAAGCCUGUGCCUGGCCUGAGGAGCAGGGCUUAGCUGCUUGUGA
 GCAGGGUCCACACCAAGUCGUGUUCACAGUGGCUAAGUUCGCCCCCCCAG **MIR-27A**
 GCCUCAACUCCUCUGGCCUUGCCGCCUUGCCCCUGCUGCCGCCUGUCUG
 CCUGCCAUCCUGCUGCCUGGCCUCCUGGGCUCUGCCUCCCGUGCCUACU
 GAGCUGAAACACAGUUGGUUUGUGUACACUGGCUCAGUUCAGCAGGAACA **MIR-24-2**
 GGGGUCAAGCCCCUUGGAGCCUGCAGCCCCUGCCUUCCCUGGGUGGGCU
 GAUGCUGGAGCAGAGAUGAGGACTUCAGAAUCAGACCUUGUGUCUGGAGGA
 GGGAUUGUGGGUGGGUUGGCUGGGCCAAAUGUGUGCUGCAGGCCCU
 GAUCCCCAACUCUGCAACUGGGGACCCUUGCAUGGCCACAGCUCAGGCUG
 GGCUGUGGUGCCAGCAUAGAUAGGUGGGUGAGUGGGUGGCCCUUCCAUA
 AAAGGAAGCCAGCUGUGCCUUCGCGGCCUGGAGGCUUGGCCCCUCCU
 CUCCAAGCCUGGCAGGGGCACTGGCCCCGGCCCGCACCUCUAGCAGCC

FIG 2

UUAGAGUUUGAGGUGUAAUUCUAAUUAUCUAAUUUCAAUUUAGCAGGAAAAAGAGAACAU
CACCUUGUAAAACUGAAGAUGUGACCAGUCAGAAUAAUGUCAAAAGUGCUUACAGUGCAGGU
AGUGAU AUGUGCAUCUACUGCAGUGAAGGCACUUGUAGCAUUAUGGUGACAGCUGCCUCGGG
AAGCCAAGUUGGGCUUUAAGUGCAGGGCCUGCUGAUGUUGAGUGCUUUUUGUUCUAAAGGUG
CAUCUAGUGCAGAUAGUGAAGUAGAUUAGCAUCUACUGCCCUAAGUGCUCCUUCUGGCAUAA
GAAGUUAUGUAUUCAUCCAUAUUAAGCCAAGCAAGUAUUAUAGGUGUUUUAUAGUUUUU
GUUUGCAGUCCUCUGUUAGUUUUGCAUAGUUGCACUACAAGAAGAAUGUAGUUGUGCAAUC
UAUGCAAACUGAUGGUGGCCUGCUAAUUCCUUCAAAUGAAUGAUUUUACUAAUUUUGUGU
ACUUUUUAUUGUGUCGAUGUAGAAUCUGCCUGGUCUUCUGAUGUGACAGCUUCUGUAGCACU
AAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAGUGUUUAGUUUUCUACUGCAUUAUGAGCACUAAAAGUACUG
CUAGCUGUAGAACUCCAGCUUCGGCCUGUCGCCCAAUCAACUGUCCUGUUACUGAACACUG
UUCUAUGGUUAGUUUUGCAGGUUUGCAUCCAGCUGUGUGAUUUCUGCUGUGCAAUCCAUG
CAAACUGACUGUGGUAGUGAAAAGUCUGUAGAAAAGUAAGGGAAACUCAAAACCCUUUCUA
CACAGGUUGGAUCGGUUGCAAUGCUGUGUUUCUGUAUGGUUUGCACUUGUCCCGGCCUGU
UGAGUUUGGUGGGGAUUGUGACCAGAAGAUUUUGAAAAUAAAUAUUACUGAAGAUUUCGAC
UUCCACUGUUAAAUGUACAAGAUACAUGAAAUAUUAAGAAAAUGUGUAA

FIG 3

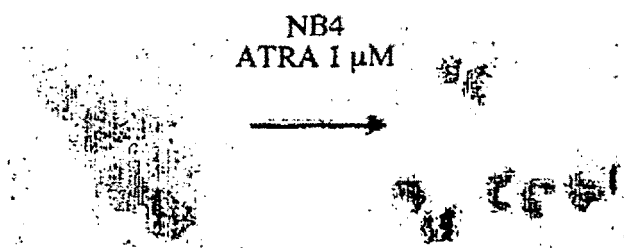


FIG 4

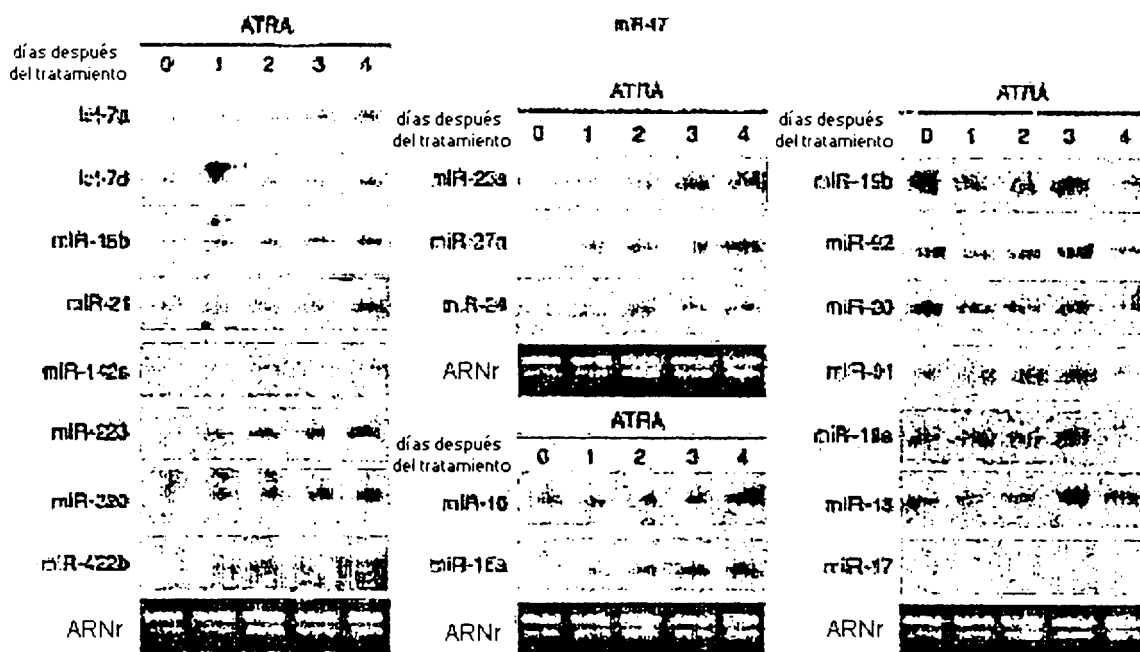


FIG 5

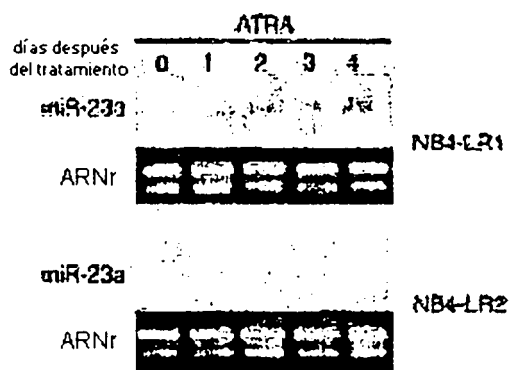


FIG 6

GAUGAAGAUGUCUUUUGAAAGGUGUACUGCAAGGAACAAAAUGUUUGUAAAUUCUCCUUUUA
 CCAAGGUAAGAUCAAAUUUUUAUAAAUUUACUUGUUUGUUUAUACAAGGAAAAUAACUUCA
 UAUUUGAAUUAUUCAAAAGUUUAAGCAUUUAGUUGUAUUGCCCUGUUAAGUUGGCAUAGC
 AAUAAAUGCUUUUCUUUCCUCAUUUUUAUUCUUUGUGUUUCCUAACCUAUAGCAUGUGCU
 GGGCACAGAAUGGACUUCAGUUAAGUUUUUGAUGUAGAAAUGUUUUUAUUUUCUACUAAAA
 UCUCUUAAAAAAUAAUUUUGCAUUAUACAUCAAUUGUUUAUAAUGUUUAAAACAUAGAUUUUUU
 ACAUGCAUUCUUUUUUUCCUGAAAAGAAAAUAAUUUUUAUAAUUCUUUAGGCGCGAAUGUGUGU
 UAAAAAAAAAAUAAAACCUUGGAGUAAAGUAGCAGCACAUAAUGGUUUGUGGAUUUUGAAAAG
 GUGCAGGCCAUUUGUGCUGCCUCAAAAAUACAAGGAUCUGAUCUUCUGAAGAAAAUUAUU
 UCUUUUUAUUCAUAGCUCUUAUGAUAGCAAUGUCAGCAGUGCCUUAGCAGCACGUAAAUAUU
 GCGUUAAGAUCUAAAUAUUCUCCAGUAUUAAUCUGUGCUGCUGAAGUAAGGUUGACCAUA
 CUCUACAGUUGUGUUUAUGUAUUAUAAUGUUACUAAUGUGUUUUCAGUUUUUAUUGAUAGU
 CUUUUCAGUAUUUAUGAUAAUCUUGUUAUUUUUAGUAUGAUUCUGUAAAAUUGAAUUAUAC
 UAAUUUUUCAGAUUAUCAUCUCUUAAAAAUACUGUAAUUGCAAUUUAUAAUUGUAUUGAAU
 GCCAUCAAGUUUUUUAAAAAGCUUAGCAGCAUUAAGAGGAUUUAUUUUAAUGCACAUUUA
 UAUUCAACAUAGACAUUAAUUCAGAUUUUUACUUGGGAUAAAACAAAUCUAGUUUCCCUU
 UGUUUUGAAUUACUUUUAAAAUAUGUCUUUACAGAUAAAUAUAAAAUUAUUAAGCAUUUU
 GAACAGAGCUUAGAAGACAAUAAUUUAGUACUGUUUCUGAAUAAUUCUUUAUUAUCUGAAGGG
 AAAAGCCAUC

FIG 7

TTAGAGTTTGAGGTGTTAATTCCTAATTATCTATTTCAAATTTAGCAGGAAAAAGAGAACAT
 CACCTTGTAAACTGAAGATTGTGACCAGTCAGAATAATGTCAAAGTGCTTACAGTGCAGGT
 AGTGATATGTGCATCTACTGCAGTGAAGGCACCTTGTAGCATTATGGTGACAGCTGCCTCGGG
 AAGCCAAGTTGGGCTTTAAAGTGCAGGGCCTGCTGATGTTGAGTGCTTTTTGTCTAAGGTG
 CATCTAGTGCAGATAGTGAAGTAGATTAGCATCTACTGCCCTAAGTGCTCCTTCGGCATAA
 GAAGTTATGTATTCATCCAATAATTCAGCCAAGCAAGTATATAGGTGTTTTAATAGTTTTT
 GTTTGCAGTCTCTGTTAGTTTTGCATAGTTGCACTACAAGAAGAAATGTAGTTGTGCAAATC
 TATGCAAACTGATGGTGGCCTGCTATTTCTTCAAATGAATGATTTTTACTAATTTTGTGT
 ACTTTTTATTGTGTCGATGTAGAATCTGCCTGGTCTATCTGATGTGACAGCTTCTGTAGCACT
 AAAGTGCTTATAGTGCAGGTAGTGTTAGTTATCTACTGCATTATGAGCACTTAAAGTACTG
 CTAGCTGTAGAACTCCAGCTTCGGCCTGTGCGCCCAATCAAACCTGTCCTGTTACTGAACACTG
 TTCTATGGTTAGTTTTGCAGGTTTGCATCCAGCTGTGTGATATTCTGCTGTGCAAATCCATG
 CAAAACGACTGTGGTAGTGAAAAGTCTGTAGAAAAGTAAGGGAACTCAAACCCCTTTCTA
 CACAGGTTGGGATCGGTTGCAATGCTGTGTTTTCTGTATGGTATTGCACTTGTCCCGGCCTGT
 TGAGTTTGGTGGGATTGTGACCAGAAGATTTTGAAAATTAATATTACTGAAGATTTTCGAC
 TTCCACTGTTAAATGTACAAGATACATGAAATATTAAGAAAATGTGTAA

FIG 8

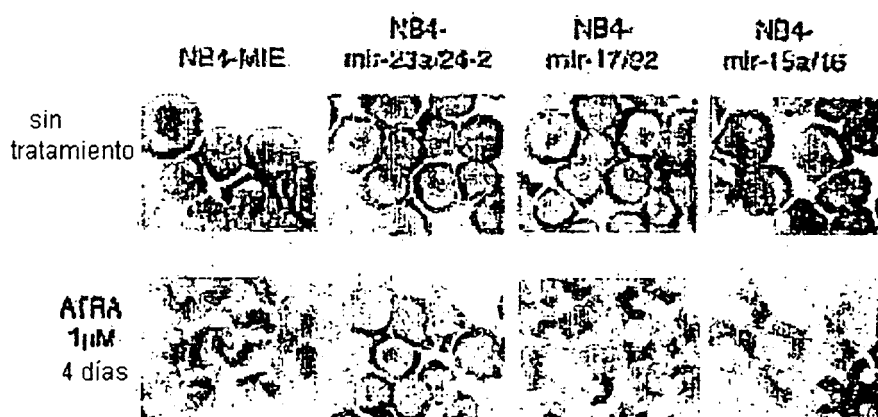


FIG 9

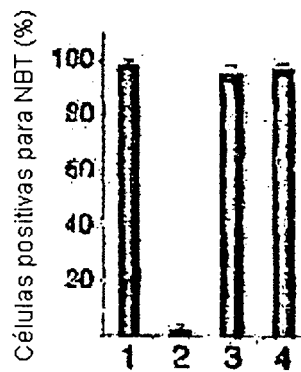


FIG 10



FIG 11

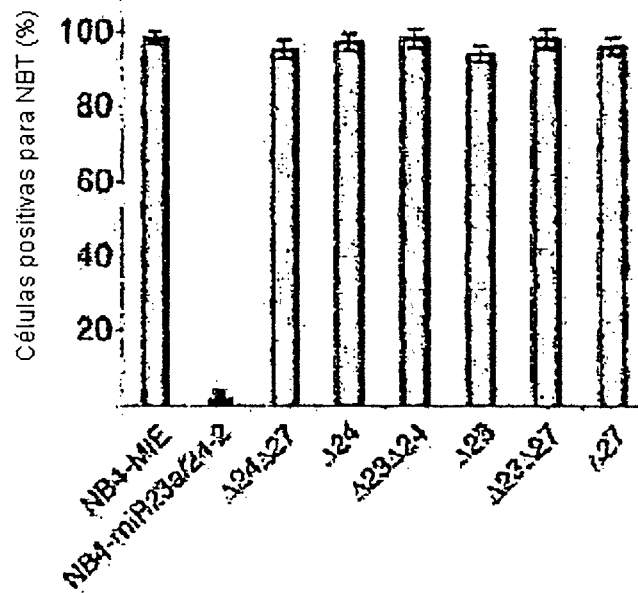


FIG 12

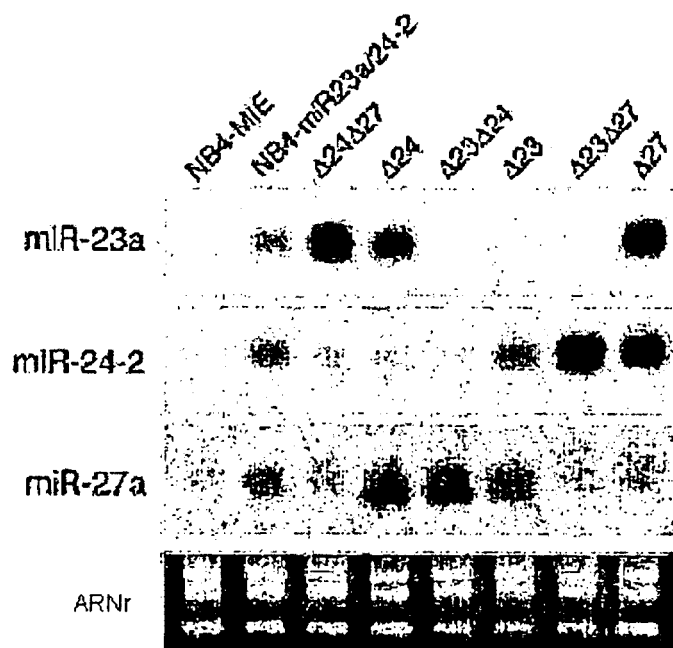


FIG 13

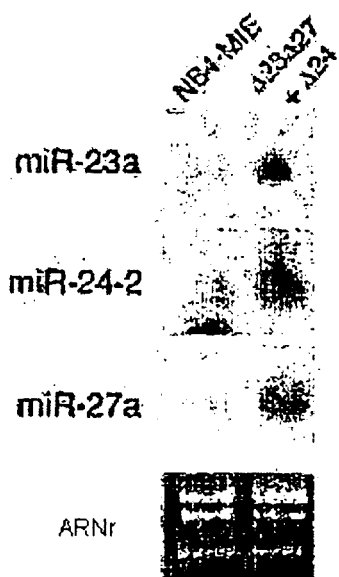


FIG 15

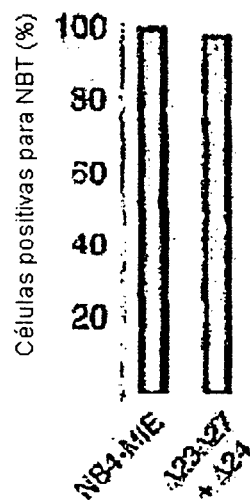


FIG 14

ES 2 308 575 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)
VOINNET, Olivier
5 LECELLIER, Charles-Henri
SAUMET, Anne
LANOTTE, Michel
- <120> Utilización de miARN en el tratamiento de la leucemia mieloide
10
- <130> 36661/PCT
- <150> FR 04/11725
15 <151> 2004-11-03
- <160> 23
- <170> Versión PatentIn 3.3
20
- <210> 1
<211> 24
25 <212> ARN
<213> *Homo sapiens*
- <400> 1
30
- caaagugcuu acagugcagg uagu 24**
- <210> 2
35 <211> 22
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
- <400> 2
40
- uaaggugcau cuagugcaga ua 22**
- <210> 3
45 <211> 23
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
- <400> 3
50
- ugugcaaauc uaugcaaaac uga 23**
- <210> 4
55 <211> 23
<212> ARN
60 <213> *Homo sapiens*
- <400> 4
- <400> 4
65
- ugugcaaauc caugcaaaac uga 23**

ES 2 308 575 T3

<210> 11

<211> 21

<212> ARN

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 11

10 uucacagugg cuaaguuccg c 21

<210> 12

<211> 22

15 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 12

20 uggcucaguu cagcaggaac ag 22

<210> 13

25 <211> 950

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

30 <400> 13

	cucugccucu ccaguccugg ggcuggaacg gagggcacag cuaggcucca gcuccccgug	60
35	ugguggcucc ugcatauagag aaaagagcuu cccugugauc aaaggaagca ucuggggacc	120
	uggaggggag guguccccaa aucucauuac cuccuuugcu cucucucucu uucuccccuc	180
	caggugccag ccucuggcc cgcgggugc ccccucacc ccugugccac ggcggcugg	240
40	gguuceuggg gaugggauuu gcuccuguc acaaaucaca uugccagggg uuuccaaccg	300
	aqccugagcu cugccaccga ggauqcugcc cggggacggg guggcagaga ggcgccgag	360
45	ccugugccug gccugaggag caggccuuag cugcuuguga gcagggucca caccaagucg	420
	uguucacagu ggcuaaguu cgcggggcag gccucaccu ccucuggccu ugccggcugu	480
	ccccugcugc cgcugucug ccugccauc ccugugccug ccucccuggg cucugccucc	540
50	cgugccuacu gagcugaaac acaguugguu uguguacacu ggcucaguuc agcaggaaca	600
	ggggucaagc ccccuuggag ccugcagccc cugccuuccc ugggugggcu gaugcuugga	660
55	gcagagauga ggaucucagaa ucagaccugu gucuggagga gggauugguu gggugggguu	720
	ggcugggccc aaavgugugc ugcaaggccu gaucggcaac ucugcaacug gggacccug	780
	cauggccaca gcucaggcug ggcuguggug ccagcauaga uaggugggug aguggguggc	840
60	ccuuccauua aaagggzagc cagcuguguc cuuuccgggc cuggaggcuu ggcuccucc	900
	cucccaagcc uggcaggggc acugggcccg cccgcaccuu ccuagcagcc	950

65 <210> 14

<211> 22

<212> ARN

ES 2 308 575 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 14

5 uagcagcaca uaaugguuug ug 22

<210> 15

10 <211> 22

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

15 <400> 15

 uagcagcacg uaaaauuugg cg 22

20 <210> 16

<211> 1126

<212> RNA

25 <213> *Homo sapiens*

<400> 16

30	gaugaagaug ucuuuugaaa gguguacugc aagggaacaaa auguuuguaa auucuccuuu	60
	uaccaaggua aagaucaaa uuuuuuuuuu uacuuguuug uuuuuacaag gaaaaauaac	120
	uucuuuuuuu gaaauuuuuu aaaaaguuuua gcauuuuuuu guuuugcccu guuaaguuug	180
35	cauagcaaa uaaugcuuuu cuuuuuccuca uuuuuuuuuu uguguuuuccu aaccuuuagc	240
	acugugcugg gcacagaau gacuuuaguu aaguuuuuga uguagaaug uuuuuuuuu	300
40	cuacuuaaaa ucuccuuuuu aauuuuuuuu cauauuacau caauguuuuu auguuuuuac	360
	auagauuuuu uuacaugcau ucuuuuuuuuu cugaaagaaa auuuuuuuuu uuuuuuuuuu	420
	gcgcgaaugu guguuuuuuu aaaauuuuuu cuuggaguuu aguagcagca cauuuuuuuu	480
45	uguggauuuu gaaaaggugc aggccuuuuu gugcugccuc aaaaauaca ggaucugauc	540
	uucugaagaa auuuuuuuuu uuuuuuuuuu uagcucuuuu gauagcaau uagcagugc	600
50	cuuagcagca cguuuuuuuu ggcguuuuuu uucuuuuuuu aucuccagua uuaucugugc	660
	ugcugaaguu agguugacca uacucuacag uuguguuuuu auguuuuuuu auguuuuuuu	720
	uguguuuuuu guuuuuuuuu uagucuuuuu aguauuuuuu auuuuuuuuu uuuuuuuuuu	780
55	auguuuuuuu aaaaauuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu	840
	uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu	900
60	uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu	960
	uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu	1.020
	uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu	1.080
65	uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu uuuuuuuuuu	1.126

ES 2 308 575 T3

<210> 17
 <211> 22
 <212> ARN
 5 <213> *Homo sapiens*

 <400> 17

 10 **ugagguagua gguuguauag uu** 22

 <210> 18
 15 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

 20 <400> 18

 agagguagua gguugcauag u 21

 25 <210> 19
 <211> 22
 <212> ARN
 30 <213> *Homo sapiens*

 <400> 19

 35 **uagcagcaca ucaugguua ca** 22

 <210> 20
 <211> 20
 40 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 20
 45 **cauaaaguag aaagcacuac** 20

 <210> 21
 50 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 55 <400> 21

 ugucaguuug ucaaauacc c 21
 60
 <210> 22
 <211> 23
 <212> ARN
 65 <213> *Homo sapiens*

ES 2 308 575 T3

<400> 22

aaaagcuggg uugagagggc gaa 23

5

<210> 23

<211> 22

10 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 23

15

cuggacuugg agucagaagg cc 22

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65