

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 804 764**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.06.2010 PCT/US2010/036962**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.12.2010 WO10141511**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2010 E 10783959 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020 EP 2438168**

54 Título: **Polinucleótidos para la interferencia de ARN multivalente, composiciones y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

01.06.2009 US 183011 P

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

09.02.2021

73 Titular/es:

**HALO-BIO RNAI THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
4111 E. Madison Box 140
Seattle, Washington 98112, US**

72 Inventor/es:

HAUSER, TODD M.

74 Agente/Representante:

MILTENYI , Peter

ES 2 804 764 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

Polinucleótidos para la interferencia de ARN multivalente, composiciones y métodos de uso de los mismos

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica el beneficio según 35 U.S.C. § 119(e) de la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos n.º 61/183.011, presentada el 1 de junio de 2009.

10 **DECLARACIÓN ACERCA DEL LISTADO DE SECUENCIAS**

Hay un listado de secuencias asociado con la presente solicitud.

Antecedentes

15

Campo técnico

La presente invención se refiere en general a moléculas polinucleotídicas estructuradas con precisión y a métodos de uso de las mismas para interferencia de ARN multivalente y el tratamiento de enfermedades.

20

Descripción de la técnica relacionada

25

El fenómeno de silenciamiento génico, o inhibición de la expresión de un gen, es bastante prometedor para fines terapéuticos y de diagnóstico, así como para el estudio de la función génica en sí misma. Los ejemplos de este fenómeno incluyen tecnología antisentido y formas de ARNbc de silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) que se ha popularizado en forma de interferencia de ARN (iARN).

30

Las estrategias antisentido para silenciamiento génico han atraído mucha atención en los últimos años. El concepto subyacente es sencillo pero, en principio, eficaz: ácidos nucleicos (AN) antisentido forman pares de bases con un ARN diana, lo que da lugar a la inactivación del ARN diana. El reconocimiento de ARN diana por ARN o ADN antisentido puede considerarse una reacción de hibridación. Ya que la diana se une mediante complementariedad de secuencia, esto implica que una elección adecuada de AN antisentido debería garantizar alta especificidad. Se puede producir inactivación del ARN diana a través de diferentes rutas, dependiendo de la naturaleza del AN antisentido (ya sea ADN o ARN modificado o sin modificar o un híbrido de los mismos) y de las propiedades del sistema biológico en el que se va a producir la inhibición.

35

40

La supresión de genes basada en iARN es un método ampliamente aceptado en el que un ARN con sentido y uno antisentido forman ARN bicatenario (ARNbc), p. ej., como una doble cadena de ARN larga, una doble cadena de 19-24 nucleótidos o como una doble cadena de ARNbc en horquilla corto (ARNhc), que está implicado en la modulación génica al implicar maquinaria compleja de enzimas y/o proteínas. La doble cadena de ARN largo y la doble cadena de ARNhc son precursores que se procesan en ARN interferente pequeño (ARNip) por la endorribonucleasa descrita como Dicer. Se cree que el ARNip procesado o ARNip introducido directamente se une con el complejo proteico RISC para orientación hacia un gen complementario, que es escindido por el complejo RISC/ARNip.

45

Sin embargo, muchos problemas persisten en el desarrollo de tecnologías eficaces antisentido y de iARN. Por ejemplo, los oligonucleótidos antisentido de ADN presentan solo eficacia a corto plazo y son habitualmente tóxicos a las dosis requeridas; de manera similar, el uso de ARN antisentido también ha resultado ineficaz debido a problemas de estabilidad. Además, se ha demostrado que el ARNip usado en iARN da lugar a supresión significativa fuera de diana debido a la posible implicación de complejos de escisión guiados por hebras en rutas reguladoras endógenas.

50

Se han empleado diversos métodos en intentos de mejorar la estabilidad antisentido mediante la reducción de la sensibilidad a la nucleasa y se han utilizado modificaciones químicas de ARNip. Estas incluyen modificación de la cadena principal normal de fosfodiéster, p. ej., usando fosforotioatos o metilfosfonatos, incorporando nucleótidos 2'-OMe, usando ácidos nucleicos peptídicos (Peptide Nucleic Acids, PNA) y usando caperuzas 3'-terminales, tales como modificaciones de 3'-aminopropilo o enlaces 3'-3' terminales. Sin embargo, estos métodos pueden ser costosos y requerir etapas adicionales. Además, el uso de nucleótidos y modificaciones de origen no natural impide la capacidad de expresar las secuencias antisentido o de ARNip *in vivo*, por lo que es necesario que se sinteticen y administren a continuación.

55

60

Además, la doble cadena de ARNip presenta eficacia primaria para un solo gen y fuera de diana para un gen secundario. Este efecto no pretendido es negativo y no es una multivalencia de iARN fiable.

65

El documento WO 2007/091269 enseña compuestos que comprenden moléculas de ARN interferente pequeño (ARNip) con una cadena antisentido y una cadena con sentido; los compuestos de ARNip que se enseñan incluyen dos o más moléculas de ARNip bicatenario que están unidas entre sí mediante uno o más conectores. El documento WO 2010/090452 desvela complejos de ARNip que pueden inhibir la expresión de múltiples genes, en donde el complejo está formado por "ARNip múltiple" y un vehículo celular. El documento US 2005/196781 describe

compuestos (ácidos nucleicos interferentes cortos, tales como ARNip) para la inhibición por iARN de, p. ej., el gen de STAT3.

- 5 En consecuencia, sigue existiendo la necesidad de métodos y composiciones eficaces y sostenidos para la inhibición directa, dirigida, de la función génica *in vitro* e *in vivo*, en particular en células de vertebrados superiores, incluyendo un complejo de una única molécula con capacidad de inhibición génica multivalente.

Breve resumen

- 10 La presente invención proporciona composiciones y métodos novedosos, que incluyen oligonucleótidos estructurados con precisión que son útiles en la regulación específica de la expresión génica de uno o más genes simultáneamente cuando la secuencia del sitio diana de nucleótidos de cada uno no es idéntica a la otra.

- 15 En determinadas realizaciones, la presente invención incluye un complejo polinucleotídico tricatenario estructurado con precisión y aislado que comprende una región que tiene una secuencia complementaria a un gen diana o secuencia en múltiples sitios o complementaria a múltiples genes en sitios individuales como se describe en las reivindicaciones adjuntas.

- 20 En determinadas realizaciones, la presente invención incluye un polinucleótido estructurado con precisión y aislado que comprende una región que tiene una secuencia complementaria a un gen diana o secuencia en múltiples sitios o complementaria a múltiples genes en sitios individuales; teniendo cada uno regiones parcialmente autocomplementarias como se especifica adicionalmente en las reivindicaciones adjuntas. En realizaciones particulares, el oligonucleótido comprende dos o más regiones autocomplementarias. Los polinucleótidos de la presente invención comprenden ARN.

- 25 Determinadas realizaciones se refieren a complejos polinucleotídicos de al menos tres polinucleótidos separados, que comprenden (a) un primer polinucleótido que comprende una región específica de diana que es complementaria a una primera secuencia diana, una región 5' y una región 3'; (b) un segundo polinucleótido que comprende una región específica de diana que es complementaria a una segunda secuencia diana, una región 5' y una región 3'; y
30 (c) un tercer polinucleótido que comprende una región nula o una región específica de diana que es complementaria a una tercera secuencia diana, una región 5' y una región 3', en donde cada una de las regiones específicas de diana del primer, el segundo y el tercer polinucleótidos son complementarias a una secuencia diana diferente, en donde la región 5' del primer polinucleótido es complementaria a la región 3' del tercer polinucleótido, en donde la región 3' del primer polinucleótido es complementaria a la región 5' del segundo polinucleótido y en donde la región
35 3' del segundo polinucleótido es complementaria a la región 5' del tercer polinucleótido, y en donde los tres polinucleótidos separados se hibridan a través de sus regiones complementarias 3' y 5' para formar un complejo polinucleotídico con una primera, segunda y tercera región monocatenaria, y una primera, segunda y tercera región autocomplementaria, en donde el primer, el segundo y/o el tercer polinucleótido comprende aproximadamente 15-30 nucleótidos. En determinadas realizaciones, el primer, el segundo y/o el tercer polinucleótido comprende
40 aproximadamente 17-25 nucleótidos. En determinadas realizaciones, una o más de las regiones autocomplementarias comprenden aproximadamente 5-10 pares de nucleótidos. En determinadas realizaciones, una o más de las regiones autocomplementarias comprenden aproximadamente 7-8 pares de nucleótidos.

- 45 En determinadas realizaciones, cada una de dichas primera, segunda y tercera secuencias diana están presentes en el mismo gen, ADNc, ARNm o microARN. En determinadas realizaciones, al menos dos de dichas primera, segunda y tercera secuencias diana están presentes en diferentes genes, ADNc, ARNm o microARN.

- 50 En determinadas realizaciones, toda o una parte de la región 5' y/o 3' de cada polinucleótido también es complementaria a la secuencia diana para ese polinucleótido. En determinadas realizaciones, una o más de las regiones autocomplementarias comprenden un saliente 3'.

- Determinadas realizaciones se refieren a moléculas polinucleotídicas autohibridantes, que comprenden (a) una primer secuencia de nucleótidos que comprende una región específica de diana que es complementaria a una primera secuencia diana, una región 5' y una región 3', (b) una segunda secuencia de nucleótidos que comprende
55 una región específica de diana que es complementaria a una segunda secuencia diana, una región 5' y una región 3'; y (c) una tercera secuencia de nucleótidos que comprende una región nula o una región específica de diana que es complementaria a una tercera secuencia diana, una región 5' y una región 3', en donde las regiones específicas de diana de cada una de la primera, segunda y tercera secuencias de nucleótidos son complementarias a una secuencia diana diferente, en donde la región 5' de la primera secuencia de nucleótidos es complementaria a la
60 región 3' de la tercera secuencia de nucleótidos, en donde la región 3' de la primera secuencia de nucleótidos es complementaria a la región 5' de la segunda secuencia de nucleótidos y en donde la región 3' de la segunda secuencia de nucleótidos es complementaria a la región 5' de la tercera secuencia de nucleótidos, y en donde cada de las regiones 5' hibrida con sus regiones 3' complementarias para formar una molécula polinucleotídica autohibridante con una primera, segunda y tercera región monocatenaria, y una primera, segunda y tercera región
65 autocomplementaria.

**En determinados aspectos, la primera, la segunda o la tercera secuencias polinucleotídicas comprenden aproximadamente 15-60 nucleótidos. En determinadas realizaciones, la región específica de diana comprende aproximadamente 15-30 nucleótidos. En determinados aspectos, una o más de las regiones autocomplementarias comprenden aproximadamente 10-54 nucleótidos. En determinadas realizaciones, una o más de las regiones autocomplementarias comprenden un saliente 3'. En determinadas realizaciones, una o más de las regiones autocomplementarias forman una estructura de tallo-bucle. En determinadas realizaciones, una o más de las regiones autocomplementarias comprenden una secuencia proximal de dinucleótidos AG/UU que está fuera de la región específica de diana. En determinadas realizaciones, una o más de las regiones autocomplementarias comprenden una secuencia distal de 4 nucleótidos que está fuera de la región específica de diana, en donde el tercer nucleótido de la secuencia distal no es una G. También se incluyen vectores que codifican una molécula polinucleotídica autohíbrida, como se describe en el presente documento.

En determinadas realizaciones, cada una de dichas primera, segunda y tercera secuencias diana están presentes en el mismo gen, ADNc, ARNm o microARN. En determinadas realizaciones, al menos dos de dichas primera, segunda y tercera secuencias diana están presentes en diferentes genes, ADNc, ARNm o microARN.

En determinadas realizaciones, una región autocomplementaria comprende una estructura de tallo-bucle compuesta por un bibucle, tetrabucle o bucle mayor. En determinadas realizaciones, la secuencia complementaria a una secuencia del gen diana comprende al menos 17 nucleótidos o de 17 a 30 nucleótidos, incluyendo todos los números enteros entre ellos.

En determinadas realizaciones, la región autocomplementaria (o región bicatenaria) comprende al menos 5 nucleótidos, al menos 6 nucleótidos, al menos 24 nucleótidos o de 12 a 54 o 60 nucleótidos, incluyendo todos los números enteros entre ellos.

En determinadas realizaciones, una región de bucle de una estructura de tallo-bucle comprende al menos 1 nucleótido. En determinadas realizaciones, la región de bucle comprende al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7 o al menos 8 nucleótidos.

En realizaciones adicionales, una región de bucle de una estructura de tallo-bucle comprende una secuencia específica de tetrabucle NGNN o AAGU o UUUU o UUGA o GUUA, donde estas secuencias son de 5' a 3'.

En una realización adicional, la presente invención incluye un vector de expresión capaz de expresar un polinucleótido de la presente invención. En diversas realizaciones, el vector de expresión es un vector constitutivo o inducible.

El presente incluye además una composición que comprende un vehículo fisiológicamente aceptable y un polinucleótido de la presente invención.

También se desvela un método para reducir la expresión de un gen, que comprende introducir un complejo polinucleotídico o molécula de la presente invención en una célula. En diversas realizaciones, la célula es vegetal, animal, protozoaria, vírica, bacteriana o fúngica. En una realización, la célula es de mamífero.

En algunas realizaciones, el complejo polinucleotídico o la molécula se introduce directamente en la célula, mientras que, en otras realizaciones, el complejo polinucleotídico o la molécula se introduce de manera extracelular por un medio suficiente para administrar el polinucleótido aislado a la célula.

También se desvela un método para tratar una enfermedad, que comprende introducir un complejo polinucleotídico o molécula de la presente invención en una célula, en donde la sobreexpresión del gen diana está asociada con la enfermedad. En una realización, la enfermedad es un cáncer.

También se desvela un método para tratar una infección en un paciente, que comprende introducir en el paciente un complejo polinucleotídico o molécula de la presente invención, en donde el polinucleótido aislado media en la entrada, replicación, integración, transmisión o mantenimiento de un agente infeccioso.

También se desvela un método para identificar una función de un gen, que comprende introducir en una célula un complejo polinucleotídico o molécula de la presente invención, en donde el complejo polinucleotídico o molécula inhibe la expresión del gen, y determinar el efecto de la introducción del complejo polinucleotídico o molécula en una característica de la célula, determinando de este modo la función del gen diana. En un aspecto, el método se realiza usando exploración de alto rendimiento.

También se desvela un método para diseñar una secuencia polinucleotídica que comprende dos o más regiones autocomplementarias para la regulación de la expresión de un gen diana, que comprende: (a) seleccionar las tres primeras secuencias de guía de 17 a 25 nucleótidos de longitud y complementarias a un gen diana o múltiples genes diana; (b) seleccionar una o más secuencias adicionales de 4 a 54 nucleótidos de longitud, que comprende regiones autocomplementarias y que no son completamente complementarias a la primera secuencia; y opcionalmente (c)

definir el motivo de secuencia en (b) para que sea complementario, no complementario o replique una secuencia génica que no sea complementaria a la secuencia seleccionada en la etapa (a).

En otra realización, el gen mutado es un gen expresado a partir de un gen que codifica un polipéptido p53 mutante.

- 5 En otra realización, el gen es vírico y puede incluir uno o más genes víricos diferentes. En realizaciones específicas, el gen es un gen del VIH, tal como gag, pol, env o tat, entre otros descritos en el presente documento y conocidos en la técnica. En otras realizaciones, el gen es ApoB.

Breve descripción de las diversas vistas de los dibujos

10

Las figuras 1 a 6 ilustran ejemplos de estructuras polinucleotídicas de la presente invención.

La figura 1 muestra un complejo polinucleotídico de tres moléculas polinucleotídicas separadas. (A) indica la región que comprende la secuencia complementaria a un sitio en un gen diana (sombreado); (B) indica la región que comprende la secuencia complementaria a un segundo sitio en el gen diana o un sitio en un gen diferente (sombreado cruzado); (C) indica la región que comprende la secuencia complementaria a un tercer sitio en el gen diana o un sitio en un gen diferente (rellenado en negro). Los números 1, 2 y 3 indican el extremo 3' de cada oligonucleótido que guía el silenciamiento génico; (A) carga en la dirección de 1, (B) en la dirección 2 y (C) en la dirección 3. Las regiones 3' y 5' de cada molécula, que se hibridan entre sí para formar sus respectivas regiones autocomplementarias o bicatenarias, se indican mediante barras de conexión. Cada polinucleótido comprende un saliente 3' de dos nucleótidos.

20

La figura 2 muestra un único polinucleótido autohibridante de la invención, que tiene tres regiones monocatenarias y tres regiones autocomplementarias, que es un precursor para procesar a una molécula central. Las regiones específicas de diana están oscurecidas. (D) indica una región de tallo-bucle autocomplementaria (rellenada en blanco) cubierta con un tetrabucle de cuatro nucleótidos; (D) también indica una región de tallo-bucle que tiene un sitio de escisión de 14/16 nucleótidos dentro de la estructura de tallo-bucle; la escisión puede producirse mediante RNasa III para eliminar los nucleótidos de tallo-bucle mostrados en blanco; (E) indica una secuencia distal en donde el tercer nucleótido determinado de 5' a 3' no es una G, ya que se cree que la presencia de una G bloquearía la escisión por RNasa III necesaria para la eliminación de la región de tallo-bucle; (F) indica una secuencia proximal de dinucleótidos AG/UU, que es un determinante *in vivo* del reconocimiento de RNasa III y la unión de RNasa III (Nichols 2000); (G) indica un tetrabucle. La molécula polinucleotídica mostrada en la figura 2 es un ARN de transcrito más largo que se 'procesa previamente' en la célula por RNasa III. La estructura de ARN resultante es idéntica a la estructura representada en la figura 1.

25

30

35

La figura 3 representa un oligonucleótido monocatenario de autoconformación con formatos de tetrabucle. (H) indica un tetrabucle; (I) indica un tribucle que conecta dos cadenas centrales cuando la cadena adelantada incorpora un saliente de 2 nucleótidos. En esta estructura, se usan tetrabucles para imitar lo que sería un hidroxilo 3'/fosfato 5' de los salientes en la estructura mostrada en la figura 1 y actúan más directamente que los de la estructura mostrada en la figura 2. Como se ha demostrado en el ejemplo 2, este formato corto de tetrabucle guía el silenciamiento directamente sin procesamiento previo. Se cree que el bucle GUUA tuerce los nucleótidos en el bucle y expone los hidrógenos (véase, p. ej., Nucleic Acids Research, 2003, Vol. 31, n.º 3, fig. 6, página 1094). Esta estructura es compatible con PAZ o RISC.

40

45

La figura 4 representa un oligonucleótido monocatenario de autoconformación para uso divalente. (J) indica un bucle mayor que conecta dos cadenas centrales; (K) indica la cadena clave que completa la formación del complejo, pero "nula" para un gen diana, es decir, inespecífica para un gen diana. Las dos regiones específicas de diana están sombreadas. Esta estructura es una composición para uso 'divalente' cuando se trabaja con transcritos de ARN. Ya que no son posibles modificaciones químicas, la estructura determina de manera asimétrica la actividad de carga y silenciamiento. Los primeros 19 nucleótidos de la molécula son la cadena PRIMARIA, (K) indica una cadena CLAVE que está desactivada y la cadena SECUNDARIA son los últimos 21 nucleótidos de la molécula. La primera prioridad de carga en RISC y funcionamiento es la cadena SECUNDARIA por extremos expuestos 5'/3'. La siguiente prioridad es la cadena PRIMARIA, que se expone después de procesamiento previo por RNasa III en la célula. El extremo 3' de la cadena CLAVE anulada no es funcional, ya que el bucle grande no se procesa ni es compatible con la carga en el RISC en sí mismo.

50

55

La figura 5 representa un complejo polinucleotídico de la presente invención que tiene bases de ARN modificadas. (L), (M) y (N) ilustran regiones (definidas por líneas discontinuas) en las que la T_m puede incrementarse gradualmente mediante el uso de ARN modificado (p. ej., 2'-O-metil ARN o 2'-fluoro ARN en lugar de 2'-OH ARN) para dar preferencia al orden de hibridación y/o silenciamiento de los extremos 1, 2 o 3.

60

La figura 6 representa dos realizaciones de complejos oligonucleotídicos de la presente invención. (O) ilustra una cadena de ADN de extremos romos que desactiva la función silenciadora de esta cadena; y (P) ilustra un extremo que puede utilizarse para la conjugación de una química de administración, ligando, anticuerpo u otra carga útil o molécula dirigida.

65

La figura 7 muestra los resultados de la supresión de la expresión de GFP por moléculas de ARNip multivalente de la invención, en comparación con moléculas de ARNhc convencionales (véase ejemplo 1). La figura 7A muestra mayor supresión de GFP por el clon MV largo I (108 %) y el clon MV largo II (119 %), en relación con el control de ARNhc (establecido en 100 %). La figura 7B muestra mayor supresión de expresión de GFP por ARNip-MV GFP I sintético (127 %), en relación con el control de ARNhc (establecido en 100 %), que se reduce ligeramente cuando una de las cadenas del complejo sintético de ARNip-MV se reemplaza por una cadena de ADN (ADN de ARNip-MF GFP I (116 %)).

La figura 8 muestra regiones de direccionamiento ilustrativas (subrayadas) para la secuencia de codificación de GFP (SEQ ID NO: 8). La figura 8A muestra las regiones que fueron diana de las moléculas de ARNip-MV de las tablas 1 y 2 en el ejemplo 1. Las figuras 8B y 8C muestran regiones de direccionamiento ilustrativas adicionales.

La figura 9 muestra los efectos inhibidores de moléculas de ARNip-MV en la replicación de VIH, en el que un ARNip-MV divalente dirigido tanto a gag como a tat tiene un efecto inhibidor significativamente mayor sobre la replicación del VIH que un ARNip dirigido solo a gag. El ARNip-MV divalente presentó 56,89 % de inhibición a los 10 días y 60,02 % de inhibición a los 40 días, en comparación con el ARNip dirigido a gag solo, que presentó 19,77 % de inhibición a los 10 días y 32,43 % de inhibición a los 40 días.

La figura 10 muestra la secuencia de nucleótidos de un genoma de VIH ilustrativo (SEQ ID NO: 9), que puede dirigirse según las moléculas de ARNip-MV de la presente invención. Esta secuencia se extiende desde la figura 10A hasta la figura 10D.

La figura 11 muestra la secuencia de nucleótidos del gen de env (SEQ ID NO: 4), procedente de la secuencia genómica del VIH de la figura 10.

La figura 12 proporciona secuencias de VIH adicionales. La figura 12A muestra la secuencia de nucleótidos del gen de gag (SEQ ID NO: 2) y la figura 12B muestra la secuencia de nucleótidos del gen de tat (SEQ ID NO: 3), ambas procedentes de la secuencia genómica del VIH de la figura 10.

La figura 13 muestra la secuencia codificante de la apolipoproteína B murina (ApoB) (SEQ ID NO: 10), que puede ser diana usando determinados ARNip-MV proporcionados en el presente documento. Esta secuencia se extiende desde la figura 13A hasta la figura 13E.

La figura 14 muestra la secuencia de ARNm de la apolipoproteína B humana (apoB) (SEQ ID NO: 1), que puede ser diana usando determinados ARNip-MV proporcionados en el presente documento. Esta secuencia se extiende desde la figura 14A hasta la figura 14E.

Descripción detallada

La presente invención proporciona composiciones y métodos novedosos para inhibir la expresión de un gen en múltiples sitios diana o para inhibir la expresión de múltiples genes en uno o más sitios diana, sitios que no tienen secuencias de nucleótidos equivalentes, en eucariotas *in vivo* e *in vitro*. En particular, la presente invención proporciona complejos polinucleotídicos y moléculas polinucleotídicas que comprenden dos, tres o más regiones que tienen secuencias complementarias a regiones de uno o más genes diana, que son capaces de dirigirse a y reducir la expresión de los genes diana. En diversas realizaciones, las composiciones y los métodos de la presente invención se pueden usar para inhibir la expresión de un solo gen diana dirigiéndose a múltiples sitios dentro del gen diana o su ARN expresado. Como alternativa, se pueden usar para dirigirse a dos o más genes diferentes al dirigirse a sitios dentro de dos o más genes diferentes o sus ARN expresados.

La presente invención ofrece ventajas significativas con respecto a moléculas de ARNip tradicionales. En primer lugar, cuando los complejos polinucleotídicos o las moléculas de la presente invención se dirigen a dos o más regiones dentro de un solo gen diana, son capaces de lograr mayor inhibición de la expresión génica del gen diana, en comparación con un agente de iARN que se dirige solo a una región dentro de un gen diana. Además, los complejos polinucleotídicos o moléculas de la presente invención que se dirigen a dos o más genes diana diferentes pueden usarse para inhibir la expresión de múltiples genes diana asociados con una enfermedad o un trastorno usando un único complejo polinucleotídico o molécula. Asimismo, los complejos polinucleotídicos y las moléculas de la presente invención no requieren la cadena adicional no dirigida presente en agentes de iARN bicatenarios convencionales, de modo que no tienen efectos fuera de diana provocados por la cadena no dirigida. En consecuencia, los complejos polinucleotídicos y las moléculas de la presente invención ofrecen ventajas sorprendentes con respecto a los inhibidores polinucleotídicos de la técnica anterior, incluyendo ARN antisentido y moléculas de interferencia de ARN, incluyendo mayor potencia y mayor eficacia contra uno o más genes diana.

La presente invención también se basa en el reconocimiento de la estructura polinucleotídica que guía un complejo proteico para escisión usando solo una, dos o tres de las cadenas guía, que son complementarias a una, dos o tres secuencias nucleicas distintas de los genes diana. Esta función multivalente da lugar a una inhibición notablemente más amplia y potente de un gen diana o un grupo de genes diana que la del ARNhc, utilizando al mismo tiempo

muchos de los mismos mecanismos endógenos.

Determinadas realizaciones de la presente invención también se basan en el reconocimiento de la estructura polinucleotídica direccionalmente mediante la presentación de los salientes 3' y el fosfato 5' que dan como resultado un complejo sin cadena con sentido, que contribuye a mayor especificidad que la del ARNip basado en ARNbc.

Dada su eficacia, las composiciones de la presente invención pueden administrarse a una célula o un sujeto con una garantía de especificidad adjunta predicha por la cadena de guía única complementaria al gen diana o múltiples genes diana.

ARNip multivalentes

La presente invención incluye complejos y moléculas polinucleotídicas que comprenden dos o más regiones de direccionamiento complementarias a regiones de uno o más genes diana. Los complejos y moléculas polinucleotídicas de la presente invención pueden denominarse ARNip multivalentes (ARNip-mv), ya que comprenden al menos dos regiones de direccionamiento complementarias a regiones de uno o más genes diana. En consecuencia, las composiciones y los métodos de la presente invención se pueden usar para inhibir o reducir la expresión de uno o más genes diana, ya sea dirigiéndose a dos o más regiones dentro de un solo gen diana o dirigiéndose a una o más regiones dentro de dos o más genes diana.

En determinadas realizaciones, los complejos polinucleotídicos de la presente invención comprenden tres o más oligonucleótidos separados, cada uno con un extremo 5' y 3', comprendiendo dos o más de los oligonucleótidos una región de direccionamiento, hibridando dichos oligonucleótidos entre sí como se describe en el presente documento para formar un complejo. Cada una de las cadenas se denomina en el presente documento "cadena guía". En otras realizaciones, las moléculas polinucleotídicas de la presente invención son un solo polinucleótido que comprende tres o más cadenas guía, comprendiendo dos o más de las cadenas guía una región de direccionamiento, hibridándose dicho polinucleótido consigo mismo a través de regiones autocomplementarias para formar una estructura descrita en el presente documento. La estructura resultante puede procesarse después, p. ej., intracelularmente, para eliminar estructuras de bucle que conectan las diversas cadenas guía. Cada cadena guía, que puede estar presente en diferentes oligonucleótidos o dentro de un único polinucleótido, comprende regiones complementarias a otras cadenas guía.

En determinadas realizaciones, la presente invención proporciona complejos y moléculas polinucleotídicas que comprenden al menos tres cadenas guía, al menos dos de las cuales comprenden regiones que son complementarias a diferentes secuencias dentro de uno o más genes diana. En diversas realizaciones, los complejos polinucleotídicos de la presente invención comprenden dos, tres o más polinucleótidos separados, comprendiendo cada uno una o más cadenas guía, que pueden hibridarse entre sí para formar un complejo. En otras realizaciones, las moléculas polinucleotídicas de la presente invención comprenden un único polinucleótido que comprende tres o más cadenas guía dentro de diferentes regiones del polinucleótido único.

Determinadas realizaciones de la presente invención están dirigidas a complejos polinucleotídicos o moléculas que tienen al menos tres cadenas guía, dos o más de los cuales son parcial o totalmente complementarias a uno o más genes diana; y teniendo cada una de aproximadamente 4 a aproximadamente 12, de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 o preferentemente de aproximadamente 7 a aproximadamente 8, nucleótidos en cada extremo que son complementarios entre sí (es decir, complementarios a una región de otra cadena guía), lo que permite la formación de un complejo polinucleotídico (véase, p. ej., figura 1). Por ejemplo, cada extremo de una cadena guía puede comprender nucleótidos que son complementarios a nucleótidos en un extremo de otro de las cadenas guía del complejo polinucleotídico o molécula. Determinadas realizaciones pueden incluir complejos polinucleotídicos que comprenden 4, 5, 6 o más moléculas polinucleotídicas individuales o cadenas guía.

En determinadas realizaciones, un complejo polinucleotídico de la presente invención comprende al menos tres polinucleótidos separados, que incluyen: (1) un primer polinucleótido que comprende una región específica de diana que es complementaria a una primera secuencia diana, una región 5' y una región 3'; (2) un segundo polinucleótido que comprende una región específica de diana que es complementaria a una segunda secuencia diana, una región 5' y una región 3'; y (3) un tercer polinucleótido que comprende una región nula o una región específica de diana que es complementaria a una tercera secuencia diana, una región 5' y una región 3', en donde cada una de las regiones específicas de diana del primer, el segundo y el tercer polinucleótidos son complementarias a una secuencia diana diferente, en donde la región 5' del primer polinucleótido es complementaria a la región 3' del tercer polinucleótido, en donde la región 3' del primer polinucleótido es complementaria a la región 5' del segundo polinucleótido y en donde la región 3' del segundo polinucleótido es complementaria a la región 5' del tercer polinucleótido, y en donde los tres polinucleótidos separados se hibridan a través de sus regiones complementarias 3' y 5' para formar un complejo polinucleotídico con una primera, segunda y tercera región monocatenaria, y una primera, segunda y tercera región autocomplementaria.

Como se ha descrito anteriormente, en realizaciones particulares, un complejo polinucleotídico de la presente invención comprende al menos tres oligonucleótidos separados, teniendo cada uno un extremo 5' y un extremo 3'.

Como se muestra en la figura 1, una región en el extremo 5' del primer oligonucleótido hibrida con una región en el extremo 3' del tercer oligonucleótido; una región en el extremo 5' del tercer oligonucleótido hibrida con una región en el extremo 3' del segundo oligonucleótido; y una región en el extremo 5' del segundo oligonucleótido hibrida con una región en el extremo 3' del primer oligonucleótido. Si están presentes oligonucleótidos adicionales en el complejo, después se hibridan con otros oligonucleótidos del complejo de manera similar. Las regiones en los extremos de los oligonucleótidos que hibridan entre sí pueden incluir los últimos nucleótidos en uno o ambos extremos 5' y/o 3'. Cuando las regiones de los extremos de hibridación 3' y 5' incluyen los últimos nucleótidos de los oligonucleótidos, la región bicatenaria resultante tiene extremos romos. En realizaciones particulares, la región en el extremo 3' que hibrida no incluye los últimos y/o penúltimos nucleótidos, lo que da como resultado una región bicatenaria que tiene un saliente 3' de uno o dos nucleótidos.

En determinadas realizaciones, las cadenas guía están presentes en una única molécula polinucleotídica y se hibridan para formar un solo polinucleótido autohibridante con tres regiones monocatenarias y tres regiones autocomplementarias (o regiones bicatenarias) y al menos dos regiones específicas de diana (véase, p. ej., figura 2). En realizaciones relacionadas, una sola molécula puede comprender al menos 3, al menos 4, al menos 5 o al menos 6 cadenas guía y forma un solo polinucleótido autohibridante con al menos 3, al menos 4, al menos 5 o al menos 6 regiones autocomplementarias (o regiones bicatenarias) y al menos 2, al menos 3, al menos 4 o al menos 5 regiones específicas de diana, respectivamente. En realizaciones particulares, este único polinucleótido autohibridante es una molécula precursora que puede ser procesada por la célula para eliminar las regiones de bucle y, opcionalmente, una cantidad de región bicatenaria proximal, lo que da lugar a una molécula activa de ARNip-mv (véase, p. ej., figura 2).

Por tanto, en realizaciones particulares, la presente invención incluye una molécula polinucleotídica autohibridante, que comprende: (1) una primera secuencia de nucleótidos que comprende una región específica de diana que es complementaria a una primera secuencia diana, una región 5' y una región 3', (2) una segunda secuencia de nucleótidos que comprende una región específica de diana que es complementaria a una segunda secuencia diana, una región 5' y una región 3'; y (3) una tercera secuencia de nucleótidos que comprende una región nula o una región específica de diana que es complementaria a una tercera secuencia diana, una región 5' y una región 3', en donde las regiones específicas de diana de cada una de la primera, segunda y tercera secuencias de nucleótidos son complementarias a una secuencia diana diferente, en donde la región 5' de la primera secuencia de nucleótidos es complementaria a la región 3' de la tercera secuencia de nucleótidos, en donde la región 3' de la primera secuencia de nucleótidos es complementaria a la región 5' de la segunda secuencia de nucleótidos y en donde la región 3' de la segunda secuencia de nucleótidos es complementaria a la región 5' de la tercera secuencia de nucleótidos, y en donde cada una de las regiones 5' hibrida con sus regiones 3' complementarias para formar una molécula polinucleotídica autohibridante con una primera, segunda y tercera región monocatenaria, y una primera, segunda y tercera región autocomplementaria.

En realizaciones particulares, un solo polinucleótido autohibridante de la presente invención puede comprender uno o más nucleótidos escindibles en los bucles monocatenarios que se forman cuando el polinucleótido se hibrida consigo mismo. Una vez que el único polinucleótido autohibridante se hibrida consigo mismo, los nucleótidos escindibles pueden escindirse para dar lugar a un complejo polinucleotídico que comprende tres o más oligonucleótidos separados. Los ejemplos de nucleótidos escindibles que pueden usarse según la presente invención incluyen, pero sin limitación, nucleótidos fotescindibles, tales como pcSpacer (Glen Research Products, Sterling, VA, Estados Unidos), o nucleótidos de fosforamida.

Como se usa en el presente documento, los complejos y moléculas polinucleotídicos de la presente invención incluyen polinucleótidos aislados que comprenden tres regiones monocatenarias, al menos dos de las cuales son complementarias a dos o más secuencias diana, cada secuencia diana ubicada dentro de uno o más genes diana, y que comprenden al menos dos o tres regiones autocomplementarias que interconectan los extremos 5' o 3' de las regiones monocatenarias, formando una región bicatenaria, tal como una estructura de tallo-bucle. Los polinucleótidos también pueden denominarse en el presente documento oligonucleótidos.

En determinadas realizaciones, los complejos y moléculas polinucleotídicos de la presente invención comprenden dos o más regiones de secuencia complementarias a un gen diana. En realizaciones particulares, estas regiones son complementarias a los mismos genes o genes diana, mientras que, en otras realizaciones, son complementarias a dos o más genes o genes diana diferentes.

En consecuencia, la presente invención incluye uno o más polinucleótidos autocomplementarios que comprenden una serie de secuencias complementarias a uno o más genes o genes diana. En realizaciones particulares, estas secuencias están separadas por regiones de secuencia que no son complementarias o semi-complementarias a una secuencia de genes diana y no son complementarias a una región autocomplementaria. En otras realizaciones del polinucleótido que comprende múltiples secuencias que son complementarias a genes o genes diana, el polinucleótido comprende una región autocomplementaria en el extremo 5', extremo 3' o ambos extremos de una o más regiones de secuencia complementarias a un gen diana. En una realización particular, un polinucleótido comprende dos o más regiones de secuencia complementarias a uno o más genes diana, con regiones autocomplementarias ubicadas en el extremo 5' y 3' de cada cadena guía que es complementaria a un gen diana. En

determinadas realizaciones, todas o una parte de estas regiones 3' y 5' pueden ser complementarias a la secuencia diana, además de ser complementarias a sus regiones 3' o 5' correspondientes.

El término "complementario" se refiere a secuencias de nucleótidos que son total o parcialmente complementarias entre sí, según las normas convencionales de formación de pares de bases. La expresión "parcialmente complementario" se refiere a secuencias que tienen una complementariedad inferior a la completa, pero todavía tiene un número suficiente de pares de nucleótidos complementarios para sustentar la unión o hibridación dentro del tramo de nucleótidos en condiciones fisiológicas.

En realizaciones particulares, la región de una cadena guía complementaria a un gen diana (es decir, la región de direccionamiento) puede comprender uno o más emparejamientos erróneos de nucleótidos en comparación con el gen diana. Opcionalmente, el o los nucleótidos desapareados en la cadena guía pueden sustituirse con un ácido nucleico desbloqueado (Unlocked Nucleic Acid, UNA) o un ácido nucleico de fosforamidita (p. ej., rSpacer, Glen Research, Sterling, VA, Estados Unidos), para permitir la formación de pares de bases, p. ej., formación de pares de bases de Watson-Crick, de los nucleótidos desapareados con el gen diana.

Como se usa en el presente documento, la expresión "autocomplementario" o "región autocomplementaria" puede referirse a una región de una molécula polinucleotídica de la invención que se une o hibrida con otra región de la misma molécula para formar pares de hibridación A-T(U) y G-C, formando de este modo una región bicatenaria; y/o puede referirse a una región de una primera molécula de nucleótidos que se une con una región de una segunda o tercera molécula de nucleótidos para formar un complejo polinucleotídico de la invención (es decir, un complejo polinucleotídico de iARN), en donde el complejo tiene capacidad de actividad de interferencia de iARN contra dos o más sitios diana. Las dos regiones que se unen entre sí para formar la región autocomplementaria pueden ser contiguas o estar separadas por otros nucleótidos. Además, como en un complejo polinucleotídico de iARN, las dos regiones pueden estar en moléculas de nucleótidos separadas.

En determinadas realizaciones, una "región autocomplementaria" comprende una "región 3'" de una primera secuencia de nucleótidos definida que está unida o hibridada con una "región 5'" de una segunda o tercera secuencia de nucleótidos definida, en donde la segunda o tercera secuencia definida está dentro de la misma molécula, para formar una molécula polinucleotídica autohibridante. En determinadas realizaciones, una "región autocomplementaria" comprende una "región 3'" de una primera molécula polinucleotídica que está unida o hibridada con una "región 5'" de una molécula polinucleotídica separada, para formar un complejo polinucleotídico. Estas regiones 3' y 5' se definen normalmente en relación con sus respectivas regiones específicas de diana, porque las regiones 5' están en el extremo 5' de la región específica de diana y las regiones 3' están en el extremo 3' de la región específica de diana. En determinadas realizaciones, una o ambas de estas regiones 3' y 5' no solo hibridan con sus regiones 3' o 5' correspondientes para formar una región autocomplementaria, sino que pueden estar diseñadas para contener también la complementariedad total o parcial de su secuencia diana respectiva, formando parte de este modo de la región específica de diana. En estas realizaciones, la región específica de diana contiene tanto una región monocatenaria como una región autocomplementaria (es decir, bicatenaria).

En determinadas realizaciones, estas "regiones autocomplementarias" comprenden aproximadamente 5-12 pares de nucleótidos, preferentemente 5-10 o 7-8 pares de nucleótidos, incluyendo todos los números enteros entre ellos. De manera análoga, en determinadas realizaciones, cada región 3' o región 5' comprende aproximadamente 5-12 nucleótidos, preferentemente 5-10 o 7-8 nucleótidos, incluyendo todos los números enteros entre ellos.

La expresión "no complementario" indica que en un tramo particular de nucleótidos, no hay nucleótidos dentro que se alineen con una diana para formar hibridaciones A-T(U) o G-C. La expresión "semicomplementario" indica que, en un tramo de nucleótidos, hay al menos un par de nucleótidos que se alinea con una diana para formar hibridaciones A-T(U) o G-C, pero no hay un número suficiente de pares de nucleótidos complementarios para sustentar la unión dentro del tramo de nucleótidos en condiciones fisiológicas.

El término "aislado" se refiere a un material que carece, al menos parcialmente, de componentes que normalmente acompañan al material en el estado nativo del material. El aislamiento connota un grado de separación de una fuente o entorno original. Aislado, como se usa en el presente documento, p. ej., en relación con ADN, se refiere a un polinucleótido que está sustancialmente alejado de otras secuencias codificantes o no codificantes y que la molécula de ADN puede contener grandes partes de ADN codificante no relacionado, tales como fragmentos cromosómicos grandes u otros genes funcionales o regiones codificantes de polipéptidos. Por supuesto, esto se refiere a la molécula de ADN como se aisló originalmente y no excluye genes o regiones codificantes añadidas posteriormente al segmento artificialmente.

En diversas realizaciones, un complejo o molécula polinucleotídica de la presente invención comprende moléculas de ARN. Además, un polinucleótido puede comprender ácidos nucleicos modificados, o derivados o análogos de ácidos nucleicos. Los ejemplos generales de modificaciones de ácido nucleico incluyen, pero sin limitación, marcaje de biotina, marcaje fluorescente, modificadores de amino que introducen una amina primaria en el polinucleótido, grupos fosfato, desoxiuridina, nucleósidos halogenados, fosforotioatos, análogos de 2'-O-metil ARN, análogos químicos de ARN, grupos oscilantes, bases universales y desoxiinosina.

- Una "subunidad" de un polinucleótido u oligonucleótido se refiere a una unidad de nucleótido (o análogo de nucleótido). El término puede referirse a la unidad de nucleótido con o sin el enlace intersubunitario adjunto, aunque, cuando hace referencia a una "subunidad con carga", la carga reside normalmente dentro del enlace intersubunitario (p. ej., un enlace de fosfato o fosforotioato o un enlace catiónico). Un ARNip-MV sintético dado puede utilizar uno o más tipos diferentes de subunidades y/o enlaces intersubunitarios, principalmente para alterar su estabilidad, T_m, sensibilidad a RNasa u otras características, según se desee. Por ejemplo, determinadas realizaciones pueden emplear subunidades de ARN con una o más subunidades de 2'-O-metil ARN.
- Las subunidades cíclicas de un polinucleótido o un oligonucleótido pueden estar basadas en ribosa u otro azúcar pentosa o, en determinadas realizaciones, grupos alternos o modificados. Los ejemplos de cadenas principales de oligonucleótidos modificados incluyen, sin limitación, fosforotioatos, fosforotioatos quirales, fosforoditioatos, fosfotriésteres, aminoalquilfosfotriésteres, metil y otros alquil fosfonatos, incluyendo 3'-alquilen fosfonatos y fosfonatos quirales, fosfinatos, fosforamidatos incluyendo 3'-amino fosforamidato y aminoalquilfosforamidatos, fosforodiamidatos, tionofosforamidatos, tionoalquilfosfonatos, tionoalquilfosfotriésteres y boranofosfatos que tienen enlaces 3'-5' normales, análogos unidos 2'-5' de estos y los que tienen polaridad invertida en donde los pares adyacentes de unidades de nucleósidos están unidos 3'-5' a 5'-3' o 2'-5' a 5'-2'. También se contemplan ácidos nucleicos peptídicos (PNA), ácidos nucleicos bloqueados (LNA), 2'-O-metil oligonucleótidos (2'-OMe), 2'-metoxietoxi oligonucleótidos (MOE), entre otros oligonucleótidos conocidos en la técnica.
- El resto de formación de pares de bases de purina o pirimidina es normalmente adenina, citosina, guanina, uracilo, timina o inosina. También se incluyen bases tales como piridin-4-ona, piridin-2-ona, fenilo, pseudouracilo, 2,4,6-trimetil-5-toribenceno, 3-metil uracilo, dihidrouridina, naftilo, aminofenilo, 5-alquilcitolinas (p. ej., 5-metilcitolina), 5-alquiluridinas (p. ej., ribotimidina), 5-halouridina (p. ej., 5-bromouridina) o 6-azapirimidinas o 6-alquilpirimidinas (p. ej., 6-metiluridina), propino, quesosina, 2-tiouridina, 4-tiouridina, wibutosina, wibutoxosina, 4-acetiluridina, 5-(carboxihidroxi)metiluridina, 5'-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluridina, β-D-galactosilqueosina, 1-metiladenosina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanosina, 3-metilcitolina, 2-metiladenosina, 2-metilguanosina, N6-metiladenosina, 7-metilguanosina, 5-metoxiaminometil-2-tiouridina, 5-metilaminometiluridina, 5-metilcarbonilmetiluridina, 5-metiloxiuridina, 5-metil-2-tiouridina, 2-metil-N6-isopenteniladenosina, β-D-manosilqueosina, ácido uridin-5-oxiacético, 2-tiocitolina, derivados de treonina y otros (Burgin *et al.*, 1996, *Biochemistry*, 35, 14090; Uhlman y Peyman, mencionado anteriormente). Por "bases modificadas" en este aspecto se entienden bases de nucleótidos distintas de adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T) y uracilo (U), como se ha ilustrado anteriormente; dichas bases pueden usarse en cualquier posición en la molécula antisentido. Los expertos en la materia apreciarán que, dependiendo de los usos o la química de los oligómeros, T y U son intercambiables. Por ejemplo, con otras químicas antisentido tales como 2'-O-metil oligonucleótidos antisentido que son más similares al ARN, las bases T pueden mostrarse como U.
- Como se ha indicado anteriormente, determinados polinucleótidos u oligonucleótidos desvelados en el presente documento incluyen una o más subunidades de ácido nucleico peptídico (PNA). Los ácidos nucleicos peptídicos (PNA) son análogos de ADN en los que la cadena principal es estructuralmente homomorfa con una cadena principal de desoxirribosa, que consiste en unidades de N-(2-aminoetil)glicina con las que se unen bases de pirimidina o purina. Los PNA que contienen bases de pirimidina y purina naturales hibridan con oligonucleótidos complementarios que cumplen las normas de formación de pares de bases de Watson-Crick e imitan el ADN con respecto a reconocimiento de pares de bases (Egholm, Buchardt *et al.* 1993). La cadena principal de los PNA está formada por enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster, haciéndolos muy adecuados para aplicaciones antisentido (véase la estructura a continuación). Una cadena principal hecha completamente de PNA no tiene carga, lo que da como resultado dobles cadenas de PNA/ADN o PNA/ARN que presentan estabilidad térmica mayor de la normal. Los PNA no son reconocidos por nucleasas o proteasas.
- Los PNA pueden producirse de manera sintética usando cualquier técnica conocida en este campo. PNA es un análogo de ADN en el que una cadena principal de poliamida reemplaza el anillo tradicional de ribosa de fosfato del ADN. A pesar de un cambio estructural radical en la estructura natural, el PNA tiene capacidad de unión específica de secuencia en forma de hélice con ADN o ARN. Las características del PNA incluyen una alta afinidad de unión con ADN o ARN complementario, un efecto desestabilizador provocado por un emparejamiento erróneo de una sola base, resistencia a nucleasas y proteasas, hibridación con ADN o ARN independiente de la concentración de sal y formación de triple hélice con ADN de homopurina. Panagene™ ha desarrollado sus monómeros patentados de PNA Bts (Bts; grupo benzotiazol-2-sulfonilo) y proceso de oligomerización patentado. La oligomerización de PNA usando monómeros de PNA Bts se compone de ciclos repetitivos de desprotección, acoplamiento y recubrimiento. Las patentes de Panagene para esta tecnología incluyen los documentos US 6969766, US 7211668, US 7022851, US 7125994, US 7145006 y US 7179896. Las patentes representativas de los Estados Unidos que enseñan la preparación de compuestos de PNA incluyen, pero sin limitación, patentes de los Estados Unidos n.º 5.539.082; 5.714.331; y 5.719.262. Se puede encontrar más enseñanzas sobre compuestos de PNA en Nielsen *et al.*, *Science*, 1991, 254, 1497.
- También se desvelan subunidades de "ácido nucleico bloqueado" (Locked Nucleic Acid, LNA). Las estructuras de los LNA son conocidas en la técnica: por ejemplo, Wengel, *et al.*, *Chemical Communications* (1998) 455; *Tetrahedron*

(1998) 54, 3607 y Accounts of Chem. Research (1999) 32, 301); Obika, *et al.*, Tetrahedron Letters (1997) 38, 8735; (1998) 39, 5401 y Bioorganic Medicinal Chemistry (2008) 16, 9230.

Los polinucleótidos y oligonucleótidos pueden incorporar uno o más LNA; en algunos casos, los compuestos pueden estar compuestos únicamente de LNA. Se conocen en la técnica métodos para la síntesis de subunidades de nucleósidos de LNA individuales y su incorporación en oligonucleótidos: patentes de los Estados Unidos 7.572.582; 7.569.575; 7.084.125; 7.060.809; 7.053.207; 7.034.133; 6.794.499; y 6.670.461. Los conectores intersubunitarios habituales incluyen restos de fosfodiéster y fosforotioato; como alternativa, se pueden emplear conectores que no contienen fósforo. Una realización incluye un compuesto que contiene LNA donde cada subunidad de LNA está separada por un ARN o una subunidad de ADN (es decir, un nucleótido de desoxirribosa). Los compuestos ilustrativos adicionales pueden estar compuestos por subunidades alternantes de LNA y ARN o ADN donde el conector intersubunitario es fosforotioato.

Determinados polinucleótidos u oligonucleótidos pueden comprender subunidades basadas en morfolino que portan restos de formación de pares de bases, unidos por enlaces sin carga o sustancialmente sin carga. Las expresiones "oligómero de morfolino" o "PMO" (oligómero de morfolino fosforamidato o fosforodiamidato) se refieren a un análogo de oligonucleótido compuesto por estructuras de subunidades de morfolino, donde (i) las estructuras están unidas entre sí por enlaces que contienen fósforo, de uno a tres átomos de longitud, preferentemente dos átomos de longitud y preferentemente sin carga o catiónicos, que unen el nitrógeno morfolino de una subunidad con un carbono exocíclico 5' de una subunidad adyacente y (ii) cada anillo morfolino porta una purina o pirimidina o un resto equivalente de formación de pares de bases eficaz para unirse, mediante enlace de hidrógeno específico de base, con una base en un polinucleótido.

Se pueden realizar variaciones de este enlace siempre que no interfieran con la unión o la actividad. Por ejemplo, el oxígeno unido a fósforo puede estar sustituido con azufre (tiofosforodiamidato). El oxígeno 5' puede estar sustituido con amino o amino sustituido con alquilo inferior. El nitrógeno colgante unido a fósforo puede estar sin sustituir, monosustituido o disustituido con alquilo inferior (opcionalmente sustituido). El resto de formación de pares de bases de purina o pirimidina es normalmente adenina, citosina, guanina, uracilo, timina o inosina. La síntesis, las estructuras y las características de unión de oligómeros de morfolino se detallan en las patentes de los Estados Unidos n.º 5.698.685, 5.217.866, 5.142.047, 5.034.506, 5.166.315, 5.521.063 y 5.506.337, y las solicitudes PCT. n.º PCT/US07/11435 (enlaces catiónicos) y el documento US08/012804 (síntesis mejorada).

En un aspecto de la invención, ARNip-MV comprende al menos un ligando unido a una nucleobase alterada o no natural. Se incluyen moléculas de carga útil y moléculas de direccionamiento. Un gran número de compuestos puede actuar como la base alterada. La estructura de la base alterada es importante en la medida en que la base alterada no debe impedir sustancialmente la unión del oligonucleótido a su diana, p. ej., ARNm. En determinadas realizaciones, la base alterada es difluorotolilo, nitropirrolilo, nitroimidazolilo, nitroindolilo, naftalenilo, antrancenilo, piridinilo, quinolinilo, pirenilo o el radical divalente de una cualquiera de las nucleobases no naturales descritas en el presente documento. En determinadas realizaciones, la nucleobase no natural es difluorotolilo, nitropirrolilo o nitroimidazolilo. En determinadas realizaciones, la nucleobase no natural es difluorotolilo.

Se conocen en la técnica una amplia diversidad de ligandos y estos son susceptibles a la presente invención. Por ejemplo, el ligando puede ser un esteroide, ácido biliar, lípido, ácido fólico, piridoxal, B12, riboflavina, biotina, compuesto aromático, compuesto policíclico, éter de corona, intercalador, molécula de escisión, agente de unión a proteínas o carbohidrato. En determinadas realizaciones, el ligando es un esteroide o un compuesto aromático. En determinados casos, el ligando es colesterol.

En otras realizaciones, el polinucleótido u oligonucleótido está unido con un ligando con el fin de mejorar el direccionamiento y la captación celular. Por ejemplo, un agente de ARNip-MV puede estar unido a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. Como ejemplo adicional, un agente ARNip-MV puede estar unido a una molécula de unión a ligando específica, tal como un polipéptido o fragmento polipeptídico que se une específicamente a un receptor particular de la superficie celular, o que en general mejora la captación celular, tal como un péptido rico en arginina.

El término "análogo" como se usa en el presente documento se refiere a una molécula, un compuesto o una composición que conserva la misma estructura y/o función (p. ej., que se une con una diana) como un polinucleótido en el presente documento. Los ejemplos de análogos incluyen compuestos peptidomiméticos y orgánicos o inorgánicos pequeños y grandes.

El término "derivado" o "variante", como se usa en el presente documento, se refiere a un polinucleótido que difiere de un polinucleótido de origen natural (p. ej., secuencia del gen diana) por una o más supresiones, adiciones, sustituciones o modificaciones de cadenas laterales de ácido nucleico. En determinadas realizaciones, las variantes tienen al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % de identidad de secuencia con una región de una secuencia de un gen diana. Por tanto, por ejemplo, en determinadas realizaciones, un oligonucleótido de la presente invención comprende una región que es complementaria a una variante de una secuencia de un gen diana.

Los complejos polinucleotídicos y las moléculas de la presente invención comprenden una región de secuencia o dos o más regiones de secuencia, cada una de las cuales es complementaria, y en realizaciones particulares completamente complementarias, de una región de un gen diana o secuencias polinucleotídicas (o una variante de las mismas). En realizaciones particulares, un gen diana es un gen de mamífero, p. ej., un gen humano o un gen de un microorganismo que infecta a un mamífero, tal como un virus. En determinadas realizaciones, un gen diana es una diana terapéutica. Por ejemplo, un gen diana puede ser un gen cuya expresión o sobreexpresión está asociada con una enfermedad o un trastorno humano. Esto puede ser un gen mutante o un gen de tipo silvestre o normal. Se han identificado diversos genes diana terapéuticos y cualquiera de estos puede ser diana de complejos polinucleotídicos y moléculas de la presente invención. Los genes diana terapéuticos incluyen, pero sin limitación, oncogenes, genes de factores de crecimiento, translocaciones asociadas con enfermedades tales como leucemias, genes de proteínas inflamatorias, genes de factores de transcripción, genes de receptores de factores de crecimiento, genes antiapoptóticos, interleucinas, genes de canales de sodio, genes de canales de potasio, tales como, pero sin limitación, los siguientes genes o genes que codifican las siguientes proteínas: apolipoproteína B (ApoB), apolipoproteína B-100 (ApoB-100), miembros de la familia bcl, incluyendo bcl-2 y bcl-x, MLL-AF4, gen de Huntington, gen de fusión de AML-MT68, IKK-B, Aha1, PCSK9, Eg5, factor de crecimiento transformante beta (TGFbeta), Nav1 .8, RhoA, HIF-1 alfa, Nogo-L, Nogo-R, receptor 9 de tipo toll (TLR9), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), SNCA, beta-catenina, CCR5, c-myc, p53, interleucina-1, interleucina-2, interleucina-12, interleucina-6, interleucina-17a (IL-17a), interleucina-17f (IL-17f), gen de osteopontina (OPN), gen de psoriasis y gen del factor de necrosis tumoral.

En realizaciones particulares, los complejos o moléculas polinucleotídicos de la presente invención comprenden cadenas guía o regiones específicas de diana que se dirigen a dos o más genes, p. ej., dos o más genes asociados con una enfermedad o un trastorno en particular. Por ejemplo, pueden incluir cadenas guía complementarias al gen o ARNm de interleucina-1 y del gen o ARNm del factor de necrosis tumoral; complementarias al gen o ARNm de interleucina-1 y del gen o ARNm de interleucina-12; o complementario al gen o ARNm de interleucina-1, gen o ARNm de interleucina-12 y gen o ARNm de factor de necrosis tumoral, para el tratamiento de la artritis reumatoide. En una realización, incluyen cadenas guía complementarias al gen o ARNm de osteopontina y del gen o ARNm de TNF.

Otros ejemplos de genes diana terapéuticos incluyen genes y ARNm que codifican proteínas víricas, tales como proteínas del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), proteínas del virus HTLV, proteínas del virus de la hepatitis C (VHC), proteínas del virus del Ébola, proteínas del virus JC, proteínas del virus del herpes, proteínas del virus del poliovirus humano, proteínas del virus de la gripe y proteínas del virus del sarcoma de Rous. En realizaciones particulares, los complejos polinucleotídicos o moléculas de la presente invención incluyen cadenas guía complementarias a dos o más genes o ARNm expresados por un virus en particular, p. ej., dos o más genes de proteínas del VIH o dos o más genes de proteínas del virus del herpes. En otras realizaciones, incluyen cadenas guía que tienen complementariedad con dos o más genes o ARNm del virus del herpes simple, p. ej., el gen o ARNm de UL29 y el gen o ARNm de nectina-1 del VHS-2, para reducir la expresión, replicación o actividad del VHS-2. En una realización, los complejos polinucleotídicos o moléculas que tienen regiones que se dirigen a dos o más genes o ARNm del VHS-2 están presentes en una formulación para administración tópica.

En realizaciones particulares, los complejos y moléculas polinucleotídicos de la presente invención comprenden una, dos, tres o más cadenas guía o regiones específicas de diana que se dirigen a un gen o ARNm de la apolipoproteína B (ApoB), p. ej., el gen o ARNm de ApoB humana o el gen o ARNm de ApoB de ratón. En consecuencia, en realizaciones particulares, comprenden una, dos, tres o más regiones que comprenden una región complementaria a una región de la secuencia de ApoB humana expuesta en la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones, comprenden una, dos, tres o más regiones que comprenden una región complementaria a una región de la secuencia de ApoB de ratón expuesta en la SEQ ID NO: 10. En realizaciones particulares, comprenden dos o más secuencias guía que tienen las secuencias específicas expuestas en los ejemplos adjuntos.

En determinadas realizaciones, los complejos y moléculas polinucleotídicos de la presente invención comprenden una, dos, tres o más cadenas o regiones guía que se dirigen a genes del VIH. En realizaciones particulares, se dirigen a uno, dos, tres o más genes o ARNm de VIH que codifican una o más proteínas seleccionadas de proteínas gag de VIH, tat de VIH, env de VIH, gag-pol de VIH, vif de VIH y nef de VIH. En consecuencia, en realizaciones particulares, comprenden una, dos, tres o más regiones complementarias a una región de la secuencia de gag del VIH expuesta en la SEQ ID NO: 2; una, dos, tres o más regiones complementarias a una región de la secuencia de tat del VIH expuesta en la SEQ ID NO: 3, una, dos, tres o más regiones complementarias a una región de la secuencia de env del VIH expuesta en la SEQ ID NO: 4, una, dos, tres o más regiones complementarias a una región de la secuencia de gag-pol del VIH expuesta en la SEQ ID NO: 5, una, dos, tres o más regiones que comprenden una región complementaria a una región de la secuencia de vif del VIH expuesta en la SEQ ID NO: 6, una, dos, tres o más regiones que comprenden una región complementaria a una región de la secuencia de nef del VIH expuesta en la SEQ ID NO: 7. En realizaciones particulares, comprenden dos o más secuencias guía que tienen las secuencias del VIH específicas expuestas en los ejemplos adjuntos.

En determinadas realizaciones, la selección de una región de secuencia complementaria a un gen diana (o gen) se

basa en el análisis de la secuencia diana elegida y la determinación de la estructura secundaria, T_m , energía de unión y estabilidad relativa y especificidad celular. Dichas secuencias pueden seleccionarse en función de su incapacidad relativa para formar dímeros, horquillas u otras estructuras secundarias que reducirían la integridad estructural del polinucleótido o impedirían la unión específica con el gen diana en una célula hospedadora.

Las regiones diana preferidas del gen o ARNm diana pueden incluir las regiones en o cerca del codón de inicio de la traducción AUG y las secuencias que son sustancialmente complementarias a regiones 5' del gen o ARNm. Se pueden realizar estos análisis de estructura secundaria y consideraciones de selección del sitio diana, por ejemplo, usando la versión 4 del software de análisis de cebadores OLIGO y/o el software de algoritmo BLASTN 2.0.5 (Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 1997, 25 (17): 3389-402) u Oligoengine Workstation 2.0.

En una realización, los sitios diana preferentemente no se ubican dentro de las regiones no traducidas (Untranslated Region, UTR) 5' y 3' o regiones cercanas al codón de inicio (a una distancia de aproximadamente 75 bases), ya que las proteínas que se unen a regiones reguladoras pueden interferir con la unión del polinucleótido. Además, los posibles sitios diana pueden compararse con una base de datos genómica adecuada, tal como BLASTN 2.0.5, disponible en el servidor de NCBI en www.ncbi.nlm, y las posibles secuencias diana con homología significativa con otras secuencias codificantes eliminadas.

En otra realización, los sitios diana se ubican dentro de la región no traducida (UTR) 5' o 3'. Además, la región autocomplementaria al polinucleótido puede estar compuesta por una secuencia en particular que se encuentra en el gen de la diana.

El gen diana puede ser de cualquier especie, incluyendo, por ejemplo, vegetal, animal (p. ej., mamífero), protozoaria, vírica (p. ej., VIH), bacteriana o fúngica. En determinadas realizaciones, los polinucleótidos de la presente invención pueden comprender o ser complementarios a las secuencias de GFP en el ejemplo 1, las secuencias de VIH en el ejemplo 2 o las secuencias de ApoB en el ejemplo 3.

Como se ha indicado anteriormente, la secuencia del gen diana y la región complementaria al polinucleótido pueden ser complementos completos entre sí o pueden no ser completamente complementarios, siempre que las hebras hibriden entre sí en condiciones fisiológicas.

Los complejos y moléculas polinucleotídicos de la presente invención comprenden al menos una, dos o tres regiones complementarias a uno o más genes diana, así como una o más regiones autocomplementarias y/o bucles de interconexión. Normalmente, la región complementaria a un gen diana tiene de 15 a 17 a 24 nucleótidos de longitud, incluyendo valores enteros dentro de estos intervalos. Esta región puede tener al menos 16 nucleótidos de longitud, al menos 17 nucleótidos de longitud, al menos 20 nucleótidos de longitud, al menos 24 nucleótidos de longitud, entre 15 y 24 nucleótidos de longitud, entre 16 y 24 nucleótidos de longitud o entre 17 y 24 nucleótidos de longitud, incluidos los valores finales, incluyendo cualquier valor entero dentro de estos intervalos.

La región autocomplementaria tiene normalmente entre 2 y 54 nucleótidos de longitud, al menos 2 nucleótidos de longitud, al menos 16 nucleótidos de longitud o al menos 20 nucleótidos de longitud, incluyendo cualquier valor entero dentro de cualquiera de estos intervalos. Por lo tanto, en una realización, una región autocomplementaria puede comprender aproximadamente 1-26 pares de nucleótidos. Una región monocatenaria puede tener aproximadamente 3-15 nucleótidos, incluyendo todos los números enteros entre ellos. Una región nula se refiere a una región que no es específica para ningún gen diana, al menos intencionadamente. Se puede usar una región o cadena nula en lugar de una región específica de diana, tal como en el diseño de un complejo polinucleotídico bivalente o molécula de la invención (véase, p. ej., figura IV (K)).

En determinadas realizaciones, una región autocomplementaria es suficientemente larga para formar una estructura bicatenaria. En determinadas realizaciones, una región 3' y una región 5' pueden hibridarse para formar una región autocomplementaria (es decir, una región bicatenaria) que comprende una estructura de tallo-bucle. En consecuencia, en una realización, la secuencia primaria de una región autocomplementaria comprende dos tramos de secuencia complementarios entre sí separados por una secuencia adicional que no es complementaria o es semicomplementaria. Aunque es menos óptima, la secuencia adicional puede ser complementaria en determinadas realizaciones. La secuencia adicional forma el bucle de la estructura de tallo-bucle y, por lo tanto, debe ser suficientemente larga para facilitar el plegado necesario para permitir que los dos tramos complementarios se unan entre sí. En realizaciones particulares, la secuencia de bucle comprende al menos 3, al menos 4, al menos 5 o al menos 6 bases. En una realización, la secuencia de bucle comprende 4 bases. Los dos tramos de secuencia complementarios entre sí (dentro de la región autocomplementaria; es decir, las regiones de tallo) son de longitud suficiente para hibridarse específicamente entre sí en condiciones fisiológicas. En determinadas realizaciones, cada tramo comprende de 4 a 12 nucleótidos; en otras realizaciones, cada tramo comprende al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 8 o al menos 10 nucleótidos, o cualquier valor entero dentro de estos intervalos. En una realización particular, una región autocomplementaria comprende dos tramos de al menos 4 nucleótidos complementarios separados por una secuencia de bucle de al menos 4 nucleótidos. En determinadas realizaciones, la totalidad o una parte de una región autocomplementaria puede ser complementaria o no de la región del polinucleótido que es complementaria al gen o gen diana.

En realizaciones particulares, las regiones autocomplementarias poseen parámetros termodinámicos adecuados para la unión de regiones autocomplementarias, p. ej., para formar una estructura de tallo-bucle.

5 En una realización, las regiones autocomplementarias se calculan de manera dinámica mediante el uso de ARN a través del análisis de energía libre y después se comparan con la energía contenida dentro de la "región no autocomplementaria" o región de bucle restante para garantizar que la composición energética sea adecuada para formar una estructura deseada, p. ej., una estructura de tallo-bucle. En general, se consideran diferentes secuencias de nucleótidos de la región de direccionamiento génico al determinar las composiciones de las estructuras de tallo-bucle para garantizar la formación de estas. La fórmula de análisis de energía libre puede alterarse de nuevo para adaptarse al tipo de nucleótido o pH del ambiente en el que se usa. Están disponibles en la técnica muchos programas de predicción de estructura secundaria diferentes y cada uno puede usarse según la invención. Los parámetros termodinámicos para las bases de ARN y ADN también están disponibles públicamente en combinación con algoritmos de selección de secuencia diana, de los que varios están disponibles en la técnica.

15 En una realización, el complejo o molécula polinucleotídica comprende o consiste en (a) tres oligonucleótidos que comprenden de 17 a 24 nucleótidos de longitud (incluyendo cualquier valor entero entre ellos), que son complementarios a y capaces de hibridarse en condiciones fisiológicas con al menos una parte de una molécula génica, flanqueados opcionalmente por (b) secuencias autocomplementarias que comprenden de 16 a 54 nucleótidos de longitud (incluyendo cualquier valor entero entre ellos) o (c) de 2 a 12 nucleótidos capaces de formar un bucle. En una realización, cada secuencia autocomplementaria es capaz de formar una estructura de tallo-bucle, una de las cuales está ubicada en el extremo 5' y una de las cuales está ubicada en el extremo 3' de las cadenas guía secundarias.

25 En determinadas realizaciones, la región autocomplementaria actúa como una estructura para reclutar la escisión enzimática de sí misma y/o unirse con regiones particulares de proteínas implicadas en el proceso catalítico de la modulación génica. Además, el bucle puede ser de una estructura determinada de 4 nucleótidos (p. ej., tetrabucle NGNN, AAGU UUGA o GUUA) para promover la escisión de la región autocomplementaria por una RNasa tal como RNasa III. Además, la región autocomplementaria se puede escindir mediante RNasa III 11/13 o 14/16 nucleótidos en la región bicatenaria dejando un extremo 3' de 2 nucleótidos. En determinadas realizaciones, el tetrabucle tiene la secuencia GNRA o GNYA, donde N indica cualquier nucleótido o nucleósido, R indica un nucleótido o nucleósido de purina; e Y indica un nucleótido o nucleósido de pirimidina.

35 En determinadas realizaciones, el polinucleótido autocomplementario que se ha escindido enzimáticamente como se ha descrito anteriormente se cargará en la región proteica de los complejos RISC. En determinadas realizaciones, la región autocomplementaria que contiene un bucle mayor de 4 nucleótidos puede evitar la escisión de la región autocomplementaria por RNasa tal como RNasa III. En realizaciones preferidas, el polinucleótido de la presente invención se une con y reduce la expresión de un gen diana. Un gen diana puede ser un gen diana conocido o, como alternativa, un gen diana puede no ser conocido, es decir, se puede usar una secuencia aleatoria. En determinadas realizaciones, los niveles de genes diana se reducen al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 90 % o al menos 95 %.

45 En una realización de la invención, el nivel de inhibición de la expresión del gen diana (es decir, expresión génica) es al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % y al menos 99 % o es casi 100 %, y por lo tanto la célula u organismo tendrá en efecto el fenotipo equivalente a la denominada "inactivación" de un gen. Sin embargo, en algunas realizaciones, puede preferirse lograr solo inhibición parcial, de modo que el fenotipo sea equivalente a la denominada "atenuación" del gen. Este método de atenuación de la expresión génica puede usarse terapéuticamente o para investigación (p. ej., para generar modelos de patologías, para examinar la función de un gen, para evaluar si un agente actúa sobre un gen, para validar dianas para el descubrimiento de fármacos).

50 Los complejos y moléculas polinucleotídicas de la invención pueden usarse para dirigirse a y reducir o inhibir la expresión de genes (incluyendo secuencias codificantes y no codificantes), ADNc, ARNm o microARN. En realizaciones particulares, sus cadenas guía o regiones de direccionamiento se unen con ARNm o microARN.

55 La invención proporciona además matrices del polinucleótido de la invención, incluyendo micromatrices. Las micromatrices son dispositivos miniaturizados normalmente con dimensiones en el intervalo de micrométrico a milimétrico para realizar reacciones químicas y bioquímicas y son particularmente adecuadas para realizaciones de la invención. Pueden construirse matrices a través de microelectrónica y/o microfabricación usando esencialmente todas y cada una de las técnicas conocidas y disponibles en la industria de semiconductores y/o en la industria bioquímica, siempre que dichas técnicas sean susceptibles a y compatibles con la deposición y/o el cribado de secuencias polinucleotídicas.

65 Las micromatrices de la invención son deseables en particular para análisis de alto rendimiento de múltiples polinucleótidos. Una micromatriz normalmente se construye con regiones o puntos discretos que comprenden el polinucleótido de la presente invención, comprendiendo cada punto uno o más polinucleótidos, preferentemente en

ubicaciones posicionalmente direccionables en la superficie de la matriz. Las matrices de la invención pueden prepararse por cualquier método disponible en la técnica. Por ejemplo, el proceso de síntesis química dirigida por la luz desarrollado por Affymetrix (véase, patentes de los Estados Unidos n.º 5.445.934 y 5.856.174) puede usarse para sintetizar biomoléculas en superficies de chips combinando síntesis fotoquímica en fase sólida con técnicas de fabricación fotolitográfica. El enfoque de deposición química desarrollado por Incyte Pharmaceutical usa sondas de ADNc presintetizadas para deposición dirigida sobre superficies de chips (véase, p. ej., patente de los Estados Unidos n.º 5.874.554).

En determinadas realizaciones, una molécula polinucleotídica de la presente invención se sintetiza químicamente usando técnicas ampliamente disponibles en este campo y se hibrida como un complejo de tres cadenas. En una realización relacionada, las tres o más cadenas guía de un complejo polinucleotídico de la presente invención pueden sintetizarse químicamente de manera individual e hibridarse para producir el complejo polinucleotídico.

En otras realizaciones, se expresa *in vitro* o *in vivo* usando técnicas adecuadas y ampliamente conocidas, tales como vectores o construcciones plasmídicas. En consecuencia, en determinadas realizaciones, la presente invención incluye vectores de expresión *in vitro* e *in vivo* que comprenden la secuencia de un polinucleótido de la presente invención interconectada por secuencias de nucleótidos formadoras de bucles o tallo-bucle. Pueden usarse métodos bien conocidos por los expertos en la materia para construir vectores de expresión que contienen secuencias que codifican un polinucleótido, así como elementos adecuados de control de la transcripción y la traducción. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Dichas técnicas se describen, por ejemplo, en Sambrook, J. *et al.* (1989) *Molecular Cloning*, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. y Ausubel, F. M. *et al.* (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.

Un sistema de construcción de vector o ácido nucleico puede comprender un solo vector o plásmido, dos o más vectores o plásmidos, que contienen juntos el ADN total que se va a introducir en el genoma de la célula hospedadora, o un transposón. La elección del vector dependerá normalmente de la compatibilidad del vector con la célula hospedadora en la que se va a introducir el vector. En el presente caso, la construcción del vector o ácido nucleico es preferentemente una que es operativamente funcional en una célula de mamífero. El vector también puede incluir un marcador de selección tal como un gen de resistencia a antibióticos o fármacos, o un gen indicador (es decir, proteína verde fluorescente, luciferasa), que pueden usarse para la selección o identificación de transformantes o transfectantes adecuados. Los sistemas de administración ilustrativos pueden incluir sistemas de vectores víricos (es decir, transducción mediada por virus) incluyendo, pero sin limitación, vectores retrovíricos (p. ej., lentivíricos), vectores adenovíricos, vectores víricos adenoasociados y vectores víricos de herpes, entre otros conocidos en la técnica.

Como se ha indicado anteriormente, determinadas realizaciones emplean vectores retrovíricos tales como vectores lentivíricos. El término "lentivirus" se refiere a un género de retrovirus complejos que son capaces de infectar células tanto en división como no en división. Los ejemplos de lentivirus incluyen VIH (virus de la inmunodeficiencia humana; incluyendo VIH de tipo 1 y VIH de tipo 2), visna-maedi, el virus de la encefalitis-artritis caprina, virus de la anemia infecciosa equina, virus de la inmunodeficiencia felina (FIV), virus de la inmunodeficiencia bovina (BIV) y virus de la inmunodeficiencia de los simios (SIV). Pueden obtenerse vectores lentivíricos de uno o más cualesquiera de estos lentivirus (véase, p. ej., Evans *et al.*, *Hum Gene Ther.* 10: 1479-1489, 1999; Case *et al.*, *PNAS USA* 96: 2988-2993, 1999; Uchida *et al.*, *PNAS USA* 95: 11939-11944, 1998; Miyoshi *et al.*, *Science* 283: 682-686, 1999; Sutton *et al.*, *J Virol* 72: 5781-5788, 1998; y Frecha *et al.*, *Blood* 112: 4843-52, 2008).

En determinadas realizaciones, el vector retrovírico comprende determinadas secuencias mínimas de un genoma de lentivirus, tal como el genoma del VIH o el genoma del SIV. El genoma de un lentivirus normalmente se organiza en una región de repetición terminal larga (Long Terminal Repeat, LTR) 5', el gen de gag, el gen de pol, el gen de env, los genes accesorios (p. ej., nef, vif, vpr, vpu, tat, rev) y una región LTR 3'. La LTR vírica se divide en tres regiones denominadas U3, R (repetición) y U5. La región U3 contiene los elementos potenciadores y promotores, la región U5 contiene las señales de poliadenilación y la región R separa las regiones U3 y U5. Las secuencias transcritas de la región R aparecen en los extremos tanto 5' como 3' del ARN vírico (véase, p. ej., "RNA Viruses: A Practical Approach" (Alan J. Cann, Ed., Oxford University Press, 2000); O Narayan, *J. Gen. Virology* 70: 1617-1639, 1989; Fields *et al.*, *Fundamental Virology* Raven Press., 1990; Miyoshi *et al.*, *J Virol* 72: 8150-7, 1998; y la patente de los Estados Unidos n.º 6.013.516. Los vectores lentivíricos pueden comprender uno o más cualesquiera de estos elementos del genoma lentivírico, para regular la actividad del vector según se desee, o pueden contener supresiones, inserciones, sustituciones o mutaciones en uno o más de estos elementos, tal como para reducir los efectos patológicos de la replicación lentivírica o para limitar el vector lentivírico a un solo ciclo de infección.

Normalmente, un vector retrovírico mínimo comprende determinadas secuencias de LTR 5' y LTR 3', uno o más genes de interés (que se van a expresar en la célula diana), uno o más promotores y una secuencia de acción en *cis* para el empaquetamiento del ARN. Se pueden incluir otras secuencias reguladoras, como se describe en el presente documento y se conoce en la técnica. El vector vírico normalmente se clona en un plásmido que puede transfectarse en una línea celular de empaquetamiento, tal como una célula eucariota (p. ej., 293-HEK), y también comprende normalmente secuencias útiles para la replicación del plásmido en bacterias.

En determinadas realizaciones, el vector vírico comprende secuencias de las LTR 5' y/o 3' de un retrovirus tal como un lentivirus. Las secuencias de LTR pueden ser secuencias de LTR de cualquier lentivirus de cualquier especie. Por ejemplo, pueden ser secuencias de LTR del VIH, SIV, FIV o BIV. Preferentemente, las secuencias de LTR son

En determinadas realizaciones, el vector vírico comprende las secuencias R y U5 de la LTR 5' de un lentivirus y una LTR 3' inactivada o "autoinactivadora" de un lentivirus. Una "LTR 3' autoinactivadora" es una repetición terminal larga (LTR) 3' que contiene una mutación, sustitución o supresión que impide que las secuencias de LTR impulsen la expresión de un gen cadena abajo. Una copia de la región U3 de la LTR 3' actúa como molde para la generación de ambas LTR en el provirus integrado. Por tanto, cuando la LTR 3' con una supresión o mutación inactivadora se integra como la LTR 5' del provirus, no es posible la transcripción a partir de la LTR 5'. Esto elimina la competencia entre el potenciador/promotor vírico y cualquier potenciador/promotor interno. Se describen LTR 3' autoinactivadoras, por ejemplo, en Zufferey *et al.*, *J Virol.* 72: 9873-9880, 1998; Miyoshi *et al.*, *J Virol.* 72: 8150-8157, 1998; e Iwakuma *et al.*, *Virology* 261: 120-132, 1999. Pueden generarse LTR 3' autoinactivadoras por cualquier método conocido en la técnica. En determinadas realizaciones, el elemento U3 de la LTR 3' contiene una supresión de su secuencia potenciadora, preferentemente la secuencia TATA, los sitios Spl y/o NF-kappa B. Como resultado de la LTR 3' autoinactivadora, el provirus que está integrado en el genoma de la célula hospedadora comprenderá una LTR 5' inactivada.

Los vectores de expresión normalmente incluyen secuencias reguladoras, que regulan la expresión del polinucleótido. Las secuencias reguladoras presentes en un vector de expresión incluyen las regiones no traducidas del vector, p. ej., potenciadores, promotores, regiones no traducidas 5' y 3', que interactúan con proteínas celulares del hospedador para llevar a cabo transcripción y traducción. Dichos elementos pueden variar en su concentración y especificidad. Dependiendo del sistema de vector y la célula utilizados, se puede usar cualquiera de varios elementos de transcripción y traducción adecuados, incluyendo promotores constitutivos e inducibles. Además, también se pueden usar promotores específicos de tejido o célula.

Para la expresión en células de mamíferos, generalmente se prefieren promotores de genes de mamíferos o de virus de mamíferos. Además, generalmente hay disponibles varios sistemas de expresión basados en virus. Por ejemplo, en casos donde se usa un adenovirus como vector de expresión, se pueden ligar secuencias que codifican un polipéptido de interés en un complejo de transcripción/traducción de adenovirus que consiste en el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Se puede usar inserción en una región E1 o E3 no esencial del genoma vírico para obtener un virus viable que sea capaz de expresar el polipéptido en células hospedadoras infectadas (Logan, J. y Shenk, T. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 3655-3659). Además, se pueden usar potenciadores de la transcripción, tales como el potenciador del virus del sarcoma de Rous (VSR), para aumentar la expresión en células hospedadoras de mamíferos.

Determinadas realizaciones pueden emplear uno o más de los promotores de la ARN polimerasa II y III. Se puede encontrar una selección adecuada de promotores de la ARN polimerasa III, por ejemplo, en Paule y White. *Nucleic Acids Research.*, Vol 28, págs. 1283-1298, 2000. Los promotores de la ARN polimerasa II y III también incluyen cualquier fragmento de ADN sintético o modificado por ingeniería genética que pueda dirigir la ARN polimerasa II o III, respectivamente, para transcribir sus secuencias codificantes de ARN cadena abajo. Además, el promotor o los promotores de la ARN polimerasa II o III (Pol II o III) usados como parte del vector vírico pueden ser inducibles. Se puede usar cualquier promotor de Pol II o III inducible adecuado con los métodos de la invención. Los promotores ilustrativos de Pol II o III incluyen los promotores sensibles a la tetraciclina proporcionados en Ohkawa y Taira, *Human Gene Therapy*, Vol. 11, págs. 577-585, 2000; y Meissner *et al.*, *Nucleic Acids Research*, Vol. 29, págs. 1672-1682, 2001.

Los ejemplos no limitantes de promotores constitutivos que pueden usarse incluyen el promotor de ubiquitina, el promotor de CMV (véase, p. ej., Karasuyama *et al.*, *J. Exp. Med.* 169: 13, 1989), la β -actina (véase, p. ej., Gunning *et al.*, *PNAS USA* 84: 4831-4835, 1987) y el promotor pgk (véase, p. ej., Adra *et al.*, *Gene* 60: 65-74, 1987); Singer-Sam *et al.*, *Gene* 32: 409-417, 1984; y Dobson *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 10: 2635-2637, 1982. Los ejemplos no limitantes de promotores específicos de tejido incluyen el promotor lck (véase, p. ej., Garvin *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 8: 3058-3064, 1988; y Takadera *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 9: 2173-2180, 1989), el promotor de miogenina (Yee *et al.*, *Genes and Development* 7: 1277-1289, 1993) y el thy1 (véase, p. ej., Gundersen *et al.*, *Gene* 113: 207-214, 1992).

Los ejemplos adicionales de promotores incluyen el promotor de ubiquitina-C, el promotor de la cadena pesada μ humana o el promotor de la cadena pesada de Ig (p. ej., MH-b12) y el promotor de la cadena ligera κ humana o el promotor de la cadena ligera de Ig (p. ej., EEK-b12), que son funcionales en linfocitos B. El promotor MH-b12 contiene el promotor de la cadena pesada μ humana precedido por el potenciador iE μ flanqueado por regiones de asociación de matriz y el promotor EEK-b12 contiene el promotor de la cadena ligera κ precedido por un potenciador intrónico (iE κ), una región asociada a la matriz y un potenciador 3' (3'E κ) (véase, p. ej., Luo *et al.*, *Blood*. 113: 1422-1431, 2009). En consecuencia, determinadas realizaciones pueden emplear uno o más de estos elementos promotores o potenciadores.

En determinadas realizaciones, la invención proporciona la expresión condicional de un polinucleótido. Se conocen y están disponibles en la técnica diversos sistemas de expresión condicionales para su uso tanto en células como en animales y la invención contempla el uso de cualquier sistema de expresión condicional de este tipo para regular la expresión o actividad de un polinucleótido. En una realización de la invención, por ejemplo, se logra expresión inducible usando el sistema REV-TET. Están bien documentados en la bibliografía componentes de este sistema y métodos de uso del sistema para controlar la expresión de un gen y están disponibles en el mercado vectores que expresan el transactivador controlado por tetraciclina (tTA) o el tTA inverso (rtTA) (p. ej., vectores pTet-Off, pTet-On y pTet-2/3/4, Clontech, Palo Alto, CA). Dichos sistemas se describen, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos n.º 5.650.298, n.º 6.271.348, 5.922.927 y patentes relacionadas.

En determinadas realizaciones, los vectores víricos (p. ej., retrovíricos, lentivíricos) proporcionados en el presente documento están "pseudotipificados" con una o más glucoproteínas víricas o proteínas de envoltura seleccionadas, principalmente para dirigirse a tipos celulares seleccionados. La pseudotipificación se refiere en general a la incorporación de una o más glucoproteínas víricas heterólogas en la partícula del virus de la superficie celular, lo que permite con frecuencia que la partícula vírica infecte una célula seleccionada que difiere de sus células diana normales. Un elemento "heterólogo" procede de un virus distinto del virus del que procede el genoma de ARN del vector vírico. Normalmente, las regiones codificantes de glucoproteínas del vector vírico se han alterado genéticamente, tal como mediante supresión, para evitar la expresión de su propia glucoproteína. Simplemente de manera ilustrativa, las glucoproteínas de la envoltura gp41 y/o gp120 de un vector lentivírico procedente del VIH se suprimen normalmente antes de la pseudotipificación con una glucoproteína vírica heteróloga.

Se puede lograr generación de vectores víricos usando cualquier técnica de ingeniería genética adecuada conocida en este campo, incluyendo, sin limitación, las técnicas convencionales de digestión con endonucleasas de restricción, ligamiento, transformación, purificación de plásmidos, amplificación por PCR y secuenciación de ADN, por ejemplo, como se describe en Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1989)), Coffin *et al.* (Retroviruses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1997)) y "RNA Viruses: A Practical Approach" (Alan J. Cann, Ed., Oxford University Press, (2000)).

Se puede usar cualquiera de diversos métodos conocidos en la técnica para producir partículas retrovíricas adecuadas cuyo genoma comprende una copia de ARN del vector vírico. Como un método, el vector vírico se puede introducir en una línea celular de empaquetamiento que empaqueta el ARN genómico vírico basado en el vector vírico en partículas víricas con una especificidad celular diana deseada. La línea celular de empaquetamiento normalmente proporciona en *trans* las proteínas víricas que son necesarias para empaquetar el ARN genómico vírico en partículas víricas e infectar la célula diana, incluyendo las proteínas gag estructurales, las proteínas pol enzimáticas y las glucoproteínas de la envoltura.

En determinadas realizaciones, la línea celular de empaquetamiento puede expresar de manera estable determinadas proteínas víricas necesarias o deseadas (p. ej., gag, pol) (véase, p. ej., patente de los Estados Unidos n.º 6.218.181. En determinadas realizaciones, la línea celular de empaquetamiento puede transfectarse de manera transitoria con plásmidos que codifican determinadas proteínas víricas necesarias o deseadas (p. ej., gag, pol, glucoproteína), incluyendo las secuencias de glucoproteínas del virus del sarampión descritas en el presente documento. En una realización ilustrativa, la línea celular de empaquetamiento expresa de manera estable las secuencias de gag y pol y la línea celular se transfecta después con un plásmido que codifica el vector vírico y un plásmido que codifica la glucoproteína. Tras la introducción de los plásmidos deseados, se recogen y procesan partículas víricas de la manera correspondiente, tal como por ultracentrifugación para lograr una reserva concentrada de partículas víricas. Las líneas celulares de empaquetamiento ilustrativas incluyen las líneas celulares 293 (ATCC CCL X), HeLa (ATCC CCL 2), D17 (ATCC CCL 183), MDCK (ATCC CCL 34), BHK (ATCC CCL-10) y Cf2Th (ATCC CRL 1430).

En una realización particular, los polinucleótidos se expresan usando un sistema de vector que comprende una cadena principal de vector pSUPER y secuencias adicionales correspondientes al polinucleótido que se va a expresar. Se ha mostrado que el sistema de vectores pSUPER es útil para expresar reactivos de ARNhc y regular negativamente la expresión génica (Brummelkamp, T.T. *et al.*, Science 296: 550 (2002) y Brummelkamp, T.R. *et al.*, Cancer Cell, publicado en línea el 22 de agosto de 2002). Los vectores PSUPER están disponibles en el mercado en OligoEngine, Seattle, WA.

Métodos de regulación de la expresión génica

Los polinucleótidos de la invención se pueden usar para diversos fines, todos relacionados en general con su capacidad para inhibir o reducir la expresión de uno o más genes diana. En consecuencia, la invención proporciona métodos para reducir la expresión de uno o más genes diana que comprenden introducir un complejo o molécula polinucleotídica de la presente invención en una célula que comprende dichos uno o más genes diana. En realizaciones particulares, el complejo o molécula polinucleotídica comprende una o más cadenas guía que se dirigen colectivamente al uno o más genes diana. En una realización, se introduce un polinucleótido de la invención en una célula que contiene un gen diana o un homólogo, una variante o un ortólogo del mismo, diana de cualquiera de una, dos o tres de las cadenas guía o regiones de direccionamiento.

Además, los polinucleótidos de la presente invención se pueden usar para reducir la expresión de manera indirecta. Por ejemplo, un complejo o molécula polinucleotídica de la presente invención se puede usar para reducir la expresión de un transactivador que conduce la expresión de un segundo gen (es decir, el gen diana), reduciendo de este modo la expresión del segundo gen. De manera similar, se puede usar un polinucleótido para aumentar la expresión de manera indirecta. Por ejemplo, un complejo o molécula polinucleotídica de la presente invención se puede usar para reducir la expresión de un represor de la transcripción que inhibe la expresión de un segundo gen, aumentando de este modo la expresión del segundo gen.

En diversas realizaciones, un gen diana es un gen procedente de la célula en la que se va a introducir un polinucleótido, un gen endógeno, un gen exógeno, un transgén o un gen de un patógeno que está presente en la célula después de la transfección de la misma. Dependiendo del gen diana en particular y la cantidad del polinucleótido suministrado a la célula, el método de la presente invención puede provocar inhibición parcial o completa de la expresión del gen diana. La célula que contiene el gen diana puede obtenerse de o estar contenida en cualquier organismo (p. ej., planta, animal, protozoo, virus, bacteria u hongo). Como se usa en el presente documento, los "genes diana" incluyen genes, ARNm y microARN.

La inhibición de la expresión del gen diana puede verificarse por medios que incluyen, pero sin limitación, observación o detección de una ausencia o disminución observable del nivel de proteína codificada por un gen diana, una ausencia o disminución observable del nivel de un producto génico expresado a partir de un gen diana (p. ej., ARNm0 y/o un fenotipo asociado con la expresión del gen, usando técnicas conocidas por un experto en el campo de la presente invención).

Los ejemplos de características celulares que pueden examinarse para determinar el efecto provocado por la introducción de un complejo o molécula polinucleotídica de la presente invención incluyen, crecimiento celular, apoptosis, características del ciclo celular, diferenciación celular y morfología.

Un complejo o molécula polinucleotídica de la presente invención puede introducirse directamente en la célula (es decir, intracelularmente) o introducirse extracelularmente en una cavidad o un espacio intersticial de un organismo, p. ej., un mamífero, en la circulación de un organismo, introducirse por vía oral, introducirse bañando un organismo en una solución que contiene el polinucleótido o por algún otro medio suficiente para administrar el polinucleótido a la célula.

Además, un vector obtenido por ingeniería genética para expresar un polinucleótido puede introducirse en una célula, en donde el vector expresa el polinucleótido, introduciéndolo de este modo en la célula. Son ampliamente conocidos y están disponibles en la técnica métodos para transferir un vector de expresión a una célula, incluyendo, p. ej., transfección, lipofección, carga por raspado, electroporación, microinyección, infección, pistola génica y retrotransposición. En general, un experto en la técnica determina fácilmente un método adecuado para introducir un vector en una célula en función del tipo de vector y el tipo de célula y las enseñanzas ampliamente disponibles en la técnica. Se pueden introducir agentes infecciosos por diversos medios fácilmente disponibles en la técnica, incluyendo, p. ej., inhalación nasal.

Los métodos para inhibir la expresión génica usando los oligonucleótidos de la invención pueden combinarse con otros métodos de atenuación y supresión, p. ej., dirección génica, ARN antisentido, ribozimas, ARN bicatenario (p. ej., ARNhc y ARNip) para reducir adicionalmente la expresión de un gen diana.

En diferentes realizaciones, las células diana de la invención son células primarias, líneas celulares, células inmortalizadas o células transformadas. Una célula diana puede ser una célula somática o una célula germinal. La célula diana puede ser una célula que no se divide, tal como una neurona, o puede ser capaz de proliferar *in vitro* en condiciones adecuadas de cultivo celular. Las células diana pueden ser células normales o pueden ser células enfermas, incluyendo las que contienen una mutación genética conocida. Las células diana eucariotas de la invención incluyen células de mamífero, tales como, por ejemplo, una célula humana, una célula murina, una célula de roedor y una célula de primate. En una realización, una célula diana de la invención es una célula madre, que incluye, por ejemplo, una célula madre embrionaria, tal como una célula madre embrionaria murina.

Los complejos y moléculas polinucleotídicas de la presente invención pueden usarse para tratar cualquiera de una amplia diversidad de enfermedades o trastornos, incluyendo, pero sin limitación, enfermedades inflamatorias, enfermedades cardiovasculares, enfermedades del sistema nervioso, tumores, enfermedades desmielinizantes, enfermedades del sistema digestivo, enfermedades del sistema endocrino, enfermedades del sistema reproductivo, enfermedades hemáticas y linfáticas, enfermedades inmunológicas, trastornos mentales, enfermedades del aparato locomotor, enfermedades neurológicas, enfermedades neuromusculares, enfermedades metabólicas, enfermedades de transmisión sexual, enfermedades de la piel y del tejido conectivo, enfermedades urológicas e infecciones.

El tratamiento se puede practicar en un animal, en particular, un mamífero o específicamente un ser humano.

En consecuencia, los complejos de ARNip multivalentes de la invención son útiles para el tratamiento o la

prevención de una enfermedad asociada con la desregulación, sobreexpresión o mutación génica. Por ejemplo, un complejo polinucleotídico o molécula de la presente invención puede introducirse en una célula cancerosa o tumor y de este modo inhibir la expresión de un gen necesario para o asociado con el mantenimiento del fenotipo carcinogénico/tumorigénico. Para prevenir una enfermedad u otra patología, se puede seleccionar un gen diana que sea, p. ej., necesario para el inicio o mantenimiento de una enfermedad/patología. El tratamiento puede incluir el alivio de cualquier síntoma asociado con la enfermedad o indicación clínica asociada con la patología.

Además, los polinucleótidos de la presente invención son útiles para tratar enfermedades o trastornos asociados con la mutación génica. En un aspecto, se utiliza un polinucleótido para modular la expresión de un gen o alelo mutado. En dichos aspectos, el gen mutado es una diana del complejo o molécula polinucleotídico, que comprenderá una región complementaria a una región del gen mutado. Esta región puede incluir la mutación, pero no es necesario, ya que también puede ser diana otra región del gen, lo que da como resultado una disminución de la expresión del gen o gen mutante. En determinados aspectos, esta región comprende la mutación y, en aspectos relacionados, el complejo o molécula polinucleotídico inhibe específicamente la expresión del gen o gen mutante pero no el gen o gen de tipo silvestre. Dicho polinucleótido es particularmente útil en situaciones, p. ej., donde un alelo está mutado pero otro no. Sin embargo, en otros aspectos, esta secuencia no comprendería necesariamente la mutación y puede, por lo tanto, comprender solamente una secuencia de tipo silvestre. Dicho polinucleótido es particularmente útil en situaciones, p. ej., donde todos los alelos están mutados. Se conoce en la técnica que diversas enfermedades y trastornos están asociados con o provocados por la mutación génica.

En determinados aspectos, un gen de un patógeno es diana de inhibición. Por ejemplo, el gen podría provocar inmunosupresión del hospedador directamente o ser esencial para la replicación del patógeno, transmisión del patógeno o mantenimiento de la infección. Además, el gen diana puede ser un gen del patógeno o gen del hospedador responsable de la entrada de un patógeno en su hospedador, metabolismo farmacológico por el patógeno o el hospedador, replicación o integración del genoma del patógeno, establecimiento o propagación de una infección en el hospedador o ensamblaje de la siguiente generación de patógeno. Se desvelan en el presente documento métodos de profilaxis (es decir, prevención o disminución del riesgo de infección), así como reducción de la frecuencia o gravedad de los síntomas asociados con la infección. Por ejemplo, las células en riesgo de infección por un patógeno o células ya infectadas, en particular infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), pueden ser diana de tratamiento mediante la introducción de un polinucleótido según la invención (véanse los ejemplos 1 y 2 para secuencias de direccionamiento). Por tanto, complejos o moléculas polinucleotídicos de la presente invención que se dirigen a una o más proteínas del VIH son útiles para tratar o inhibir la infección por VIH o el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA).

En otros aspectos específicos, la presente invención es útil en el tratamiento o desarrollo de tratamientos para cánceres de cualquier tipo. Los ejemplos de tumores que pueden tratarse usando los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, neuroblastomas, mielomas, cánceres de próstata, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de colon, cáncer de ovario, cáncer de pulmón no microcítico, tumores cerebrales, cáncer de mama, leucemias, linfomas y otros.

En una realización, los complejos o moléculas polinucleotídicos de la presente invención que se dirigen a la apolipoproteína B (apoB) son útiles para tratar, reducir o inhibir la aterosclerosis o cardiopatía. ApoB es la apolipoproteína primaria de lipoproteínas de baja densidad (LDL), que es responsable de portar el colesterol a los tejidos. ApoB en la partícula de LDL actúa como un ligando para receptores de LDL y los altos niveles de ApoB pueden conducir a placas que provocan vasculopatías (ateroesclerosis), lo que conduce a cardiopatía.

Los complejos polinucleotídicos, moléculas y vectores de expresión (incluyendo vectores víricos y virus) pueden introducirse en las células *in vitro* o *ex vivo* y después colocarse en un animal para efectuar terapia o pueden introducirse directamente en un paciente mediante administración *in vivo*. Por tanto, se desvelan en el presente documento métodos de terapia génica. Pueden administrarse composiciones de la invención a un paciente de cualquiera de varias maneras, incluyendo parenteral, intravenosa, sistémica, local, tópica, oral, intratumoral, intramuscular, subcutánea, intraperitoneal, por inhalación o cualquier método similar de administración. En un aspecto, las composiciones se administran por vía parenteral, es decir, por vía intraarticular, por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía subcutánea o por vía intramuscular. En un aspecto específico, las composiciones liposómicas se administran mediante infusión intravenosa o por vía intraperitoneal mediante una inyección de embolada.

Las composiciones de la invención pueden formularse como composiciones farmacéuticas adecuadas para su administración a un sujeto. Las composiciones farmacéuticas de la invención comprenderán con frecuencia además uno o más tampones (p. ej., solución salina tamponada neutra o solución salina tamponada con fosfato), hidratos de carbono (p. ej., glucosa, manosa, sacarosa, dextrosa o dextranos), manitol, proteínas, polipéptidos o aminoácidos tales como glicina, antioxidantes, bacteriostáticos, agentes quelantes tales como EDTA o glutatión, adyuvantes (p. ej., hidróxido de aluminio), solutos que hacen que la formulación sea isotónica, hipotónica o débilmente hipertónica con la sangre de un receptor, agentes de suspensión, agentes espesantes y/o conservantes. Como alternativa, las composiciones de la presente invención pueden formularse como un liofilizado.

La cantidad de los oligonucleótidos administrados a un paciente puede ser determinada fácilmente por un médico basándose en diversos factores, incluyendo, p. ej., la enfermedad y el nivel de los oligonucleótidos expresados a partir del vector que se use (en los casos donde se administre un vector). La cantidad administrada por dosis se selecciona normalmente para que esté por encima de la dosis terapéutica mínima pero por debajo de una dosis tóxica. La elección de la cantidad por dosis dependerá de varios factores, tales como el historial médico del paciente, el uso de otras terapias y la naturaleza de la enfermedad. Además, la cantidad administrada puede ajustarse a lo largo del tratamiento, dependiendo de la respuesta del paciente al tratamiento y la presencia o gravedad de cualquier efecto secundario asociado al tratamiento.

10 Métodos para determinar la función génica

La divulgación incluye además un método para identificar la función génica en un organismo que comprende el uso de un complejo o molécula polinucleotídica de la presente invención para inhibir la actividad de un gen diana de función previamente desconocida. En lugar del lento y laborioso aislamiento de mutantes mediante cribado genético tradicional, la genómica funcional prevé determinar la función de genes no caracterizados empleando el método desvelado para reducir la cantidad y/o alterar el ritmo de la actividad del gen diana. El método puede usarse para determinar dianas potenciales para la farmacia, entender los acontecimientos normales y patológicos asociados con el desarrollo, determinar las rutas de señalización responsables del desarrollo/envejecimiento postnatal y similares. La velocidad creciente de adquisición de información de secuencias de nucleótidos de fuentes genómicas y génicas expresadas, incluyendo secuencias totales para los genomas de levadura, *D. melanogaster* y *C. elegans*, se puede acoplar con la invención para determinar la función del gen en un organismo (p. ej., nematodo). La preferencia de diferentes organismos para usar codones particulares, búsqueda de bases de datos de secuencias para productos génicos relacionados, correlación del mapa de enlaces de rasgos genéticos con el mapa físico del que proceden las secuencias de nucleótidos y métodos de inteligencia artificial se pueden usar para definir marcos abiertos de lectura potenciales de las secuencias de nucleótidos adquiridas en dichos proyectos de secuenciación.

En un aspecto, se usa un polinucleótido de la presente invención para inhibir la expresión génica basándose en una secuencia parcial disponible a partir de un marcador de secuencia expresada (Expressed Sequence Tag, EST), p. ej., para determinar la función del gen o la actividad biológica. Alteraciones funcionales en el crecimiento, el desarrollo, el metabolismo, la resistencia a enfermedades u otros procesos biológicos serían indicativas de la función normal del producto génico de EST.

La facilidad con la que se puede introducir un polinucleótido en una célula/organismo intacto que contiene el gen diana permite que la presente invención se use en exploración de alto rendimiento (High Throughput Screening, HTS). Por ejemplo, las soluciones que contienen el polinucleótido que son capaces de inhibir diferentes genes expresados se pueden colocar en pocillos individuales situados en una placa de microtitulación como una matriz ordenada y se pueden analizar células/organismos intactos en cada pocillo para detectar cualquier cambio o modificación en el comportamiento o desarrollo debido a inhibición de la actividad del gen diana. La función del gen diana puede analizarse a partir de los efectos que tiene sobre la célula/organismo cuando se inhibe la actividad del gen. En un aspecto, los polinucleótidos de la invención se usan para exploración quimiocogenómica, es decir, probar compuestos para determinar su capacidad para revertir una enfermedad modelada por la reducción de la expresión génica usando un polinucleótido de la invención.

Si se determina que una característica de un organismo está genéticamente ligada a un polimorfismo mediante análisis de RFLP o QTL, la presente invención se puede usar para obtener información acerca de si ese polimorfismo genético podría ser directamente responsable de la característica. Por ejemplo, un fragmento que define el polimorfismo genético o las secuencias en las proximidades de dicho polimorfismo genético puede amplificarse para producir un ARN, se puede introducir un polinucleótido en el organismo y se puede determinar si una alteración en la característica está correlacionada con la inhibición.

La presente invención también es útil para permitir la inhibición de genes esenciales. Dichos genes pueden ser necesarios para la viabilidad de células u organismos solo en etapas particulares del desarrollo o compartimentos celulares. El equivalente funcional de las mutaciones condicionales puede producirse inhibiendo la actividad del gen diana cuando o donde no sea necesario para la viabilidad. La invención permite la adición de un polinucleótido en momentos específicos del desarrollo y en ubicaciones del organismo sin introducir mutaciones permanentes en el genoma diana. De manera similar, la invención contempla el uso de vectores inducibles o condicionales que expresan un polinucleótido solo cuando se desee.

La presente invención también permite un método para validar si un producto génico es una diana para el descubrimiento o desarrollo de fármacos. Se introduce un polinucleótido que se dirige al gen que corresponde al gen para la degradación en una célula u organismo. La célula u organismo se mantiene en condiciones en las que se produce la degradación del gen, lo que da lugar a una disminución de la expresión del gen. Se determina si la disminución de la expresión del gen tiene un efecto sobre la célula o el organismo. Si la disminución de la expresión del gen tiene un efecto, entonces el producto genético es una diana para el descubrimiento o desarrollo de fármacos.

Métodos de diseño y producción de complejos y moléculas polinucleotídicas

Los complejos y moléculas polinucleotídicos de la presente invención comprenden un conjunto nuevo y único de secuencias funcionales, dispuestas de manera que adopten una estructura secundaria que contenga una o más regiones bicatenarias (en ocasiones unidas por estructuras de tallo-bucle o bucle), que transmite las ventajas del polinucleótido. En consecuencia, en determinadas realizaciones, la presente invención incluye métodos para diseñar los complejos y moléculas polinucleotídicos de la presente invención. Dichos métodos implican normalmente una selección adecuada de los diversos componentes de secuencia de los complejos y moléculas polinucleotídicos. Las expresiones "cadena primaria", "cadena secundaria" y "cadena clave" se refieren a las diversas cadenas guía presentes dentro de un complejo o molécula polinucleotídico de la presente invención.

En una realización, el diseño básico del complejo polinucleotídico es el siguiente:

DISEÑAR MOTIVOS:

(cadena primaria)(UU)(cadena secundaria)(UU)(cadena clave)(UU)

En consecuencia, en una realización relacionada, el polinucleótido está diseñado de la siguiente manera:

II. (cadena secundaria)(UU)(UU)(cadena clave)(UU)(cadena primaria)

III. (cadena secundaria)(UU)(bucle o tallo-bucle)(cadena clave)(UU)(bucle o tallo-bucle)(cadena primaria)(UU)

ESTABLECER PARÁMETROS

Establecer el tamaño de siembra para autocomplementariedad en aproximadamente 38-43 %. Para 19 dianas de nucleótidos, se prefiere un intervalo de 7 u 8 nucleótidos como SEED_SIZE.

Para cada gen, definir un gen diana PRIMARIO y SECUNDARIO.

DEFINIR CADENAS PRIMARIAS

Comenzar con una o más secuencias de genes diana. Para cada gen, elaborar una lista de secuencias diana PRIMARIAS de 17-24 motivos de nucleótidos que cumplan los criterios de contenido de G/C, especificidad y ausencia de poli-A o poli-G. Para cada uno, encontrar también una cadena SECUNDARIA y CLAVE.

ENCONTRAR CADENAS SECUNDARIAS Y CLAVE

d. Para cada secuencia diana en cada gen, alinear por clustal de base 1 a SEED_SIZE el inverso de cada secuencia al gen SECUNDARIO

Registrar la secuencia con una alineación perfecta. La secuencia diana en el gen SECUNDARIO es el inicio de la alineación, menos la longitud del motivo, más SEED_SIZE al inicio de la alineación, más SEED_SIZE. La cadena SECUNDARIA es el complemento inverso.

Para encontrar cada cadena CLAVE, definir SEED_A como base 1 a SEED_SIZE de la cadena PRIMARIA, definir SEEDJ3 como bases en la longitud del motivo menos SEED_SIZE a la longitud del motivo de la cadena SECUNDARIA. Establecer una MID_SECTION como caracteres "I" repetidos de longitud de secuencia de motivo menos longitud de SEED_A más longitud de SEED_B. Establecer la secuencia de alineación clave como SEED_A, MID_SECTION, SEED_B. Alinear por clustal con el gen diana para el segmento clave. Registrar la secuencia diana CLAVE como bases en el acierto de alineación en el gen diana clave a aciertos de alineación de bases más la longitud del motivo. La cadena CLAVE es el complemento inverso.

CONSTRUIR UN POLINUCLEÓTIDO OPCIONAL

g. Construir los tallos A y B candidatos con (4-24) nucleótidos que tengan una temperatura de fusión dominante a región de igual longitud de la diana. Las cadenas del tallo tienen complementariedad A-T, G-C entre sí. La longitud y la composición dependen de qué endorribonucleasa se elija para el preprocesamiento de la estructura de tallo-bucle.

h. Construir los tallos C y D candidatos con (4-24) nucleótidos que tengan una temperatura de fusión dominante a región de igual longitud de la diana. Las cadenas del tallo tienen complementariedad A-T, G-C entre sí, pero no complementariedad con los tallos A y B. La longitud y la composición dependen de qué endorribonucleasa se elija para el preprocesamiento de la estructura de tallo-bucle.

i. Construir candidatos de bucle con (4-12) nucleótidos ricos en AT en el bucle A y B. La longitud y la composición dependen de qué endorribonucleasa se elija para el preprocesamiento de la estructura de tallo-bucle. Se han sugerido tetrabucles como se describe para tallos más largos procesados por endorribonucleasas RNasa III o Pac1

RNasa III como se muestra en la (Fig. A.). Se sugieren bucles mayores para evitar el procesamiento de RNasa III o Pac1 y se colocan en tallos más cortos como se muestra en (Fig. C, Fig. D).

j. Formar una secuencia contigua para cada motivo candidato.

k. Plegar la secuencia candidata usando un software con los parámetros deseados.

l. A partir del resultado, ubicar estructuras con regiones diana monocatenarias que estén flanqueadas en uno o ambos extremos con una estructura de tallo/bucle deseada.

En una realización, un método para diseñar una secuencia polinucleotídica que comprende una o más regiones autocomplementarias para la regulación de la expresión de un gen diana (es decir, un polinucleótido), incluye: (a) seleccionar una primera secuencia de 17 a 30 nucleótidos de longitud y complementaria a un gen diana; y (b) seleccionar una o más secuencias adicionales de 12 a 54 nucleótidos de longitud, que comprende regiones autocomplementarias y que no son complementarias a la primera secuencia.

Estos métodos, en determinadas realizaciones, incluyen determinar o predecir la estructura secundaria adoptada por las secuencias seleccionadas en el etapa (b), p. ej., para determinar que son capaces de adoptar una estructura de tallo-bucle.

De manera similar, estos métodos pueden incluir una etapa de verificación, que comprende probar la secuencia polinucleotídica diseñada para determinar su capacidad de inhibir la expresión de un gen diana, p. ej., en un sistema de prueba *in vivo* o *in vitro*.

La invención permite además el uso de un programa informático para seleccionar secuencias de un polinucleótido, en función de las características de complementariedad descritas en el presente documento. La divulgación, por tanto, proporciona programas de software informático y medios legibles por ordenador que comprenden dichos programas de software, para su uso para seleccionar las secuencias polinucleotídicas, así como ordenadores que contienen uno de los programas.

En determinados aspectos, un usuario proporciona a un ordenador información acerca de la secuencia, ubicación o nombre de un gen diana. El ordenador usa esta información en un programa para identificar una o más regiones adecuadas del gen diana a diana y genera o proporciona secuencias complementarias para su uso en el polinucleótido de la invención. El programa informático usa después esta información de secuencia para seleccionar secuencias de la o las regiones autocomplementarias al polinucleótido. Normalmente, el programa seleccionará una secuencia que no sea complementaria a una secuencia genómica, incluyendo el gen diana, o la región del polinucleótido que es complementaria al gen diana. Asimismo, el programa seleccionará secuencias de regiones autocomplementarias que no son complementarias entre sí. Cuando se desee, el programa también proporciona secuencias de regiones de huecos. Tras la selección de secuencias adecuadas, el programa informático genera o proporciona esta información al usuario.

Los programas pueden usar además información acerca de la secuencia genómica del organismo que contiene el gen diana, p. ej., bases de datos públicas o privadas, así como programas adicionales que predicen la estructura secundaria y/o las características de hibridación de secuencias particulares, para garantizar que el polinucleótido adopta la estructura secundaria correcta y no se hibrida con genes no diana.

La presente invención se basa, en parte, en el sorprendente descubrimiento de que el polinucleótido, como se describe en el presente documento, es extremadamente eficaz para reducir la expresión del gen diana de uno o más genes. El polinucleótido ofrece ventajas significativas sobre los ARN antisentido descritos anteriormente, incluyendo mayor potencia y mayor eficacia para múltiples genes diana. Asimismo, el polinucleótido de la invención ofrece ventajas adicionales sobre las moléculas de ARNbc tradicionales usadas para ARNip, ya que el uso del polinucleótido elimina sustancialmente la supresión fuera de diana asociada con las moléculas de ARNbc y ofrece iARN multivalente.

Se entiende que las composiciones y los métodos de la presente invención pueden usarse para dirigirse a diversos genes diana diferentes. La expresión "gen diana" puede referirse a un gen, un ARNm o un microARN. En consecuencia, las secuencias diana proporcionadas en el presente documento pueden representarse como secuencias de ADN o secuencias de ARN. Un experto en la materia apreciará que las composiciones de la presente invención pueden incluir regiones complementarias a las secuencias de ADN o ARN proporcionadas en el presente documento. Por tanto, cuando se proporcione una secuencia diana de ADN o ARN, se entiende que la secuencia diana de ARN o ADN correspondiente, respectivamente, también puede ser diana.

La práctica de la presente invención empleará diversas técnicas convencionales de biología celular, biología molecular, microbiología y ADN recombinante, que están dentro de la experiencia de la materia. Dichas técnicas se describen completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989); y DNA Cloning, volúmenes I y II (D.

N. Glover ed. 1985).

Ejemplos

5 Ejemplo 1

TRIVOID ANTI-GFP

Se diseñaron ARNip multivalentes contra un solo gen, la proteína verde fluorescente (GFP). Se analizó un complejo de ARN ARNip-MV sintético multivalente dirigido contra GFP para comparar la actividad de supresión en relación con la de un solo clon de ARNhc. Además, para probar el efecto de desactivar una de las cadenas del complejo sintético de ARNip-MV, una cadena se reemplazó con ADN (T1-19/7_C_dna); como se muestra a continuación. Este reemplazo dio lugar a un descenso relativo en la supresión de ~30 %. Además, las formas 'corta' y 'larga' de los clones autocomplementarios a ARNip-MV descritos en el presente documento se probaron y compararon con la supresión de la expresión de GFP en relación con la de un clon de ARNhc publicado.

Las secuencias oligoméricas para el ARNip-MV sintético, y la cadena de reemplazo de ADN, se muestran a continuación en la tabla 1. Las regiones diana de la secuencia codificante de GFP se ilustran en la figura 8A.

20 Tabla 1: Oligos para ARNip-MV sintético:

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
TI-19/7_A	GGGCAGCUUGCCGGUGGUGUU	11
TI-19/7_B	CACCACCCCGGUGAACAGCUU	12
TI-19/7_C	GCUGUUCACGUCGUGCCCUU	13
TI-19/7_C_dna	GCTGTTACGTCGCTGCCC	14

Para preparar los ARNip multivalentes (ARNip-MV) sintéticos, cada tubo de los oligos individuales anteriores se resuspendió en agua sin RNasa para obtener una concentración final de 50 μ M (50 pmoles/ μ l). Los oligos individuales se combinaron después como (a) TI-19/7_A, TI-19/7_B y TI-19/7_C (ARNip-MV GFP I), o como (b) TI-19/7_A, TI-19/7_B y TI-19/7_C_dna (ARNip-MV GFP I ADN), y se hibridó de la siguiente manera. Se combinaron 30 μ l de cada uno de los oligos reacondicionados con 10 μ l de tampón de hibridación 10x (Tris-HCl 100 mM pH 7,5, NaCl 1 M, EDTA 10 mM), se agitaron vorticialmente, se calentaron durante 5 minutos a 94 °C y se enfriaron por etapas a 70 °C durante 30 minutos. La concentración final del ARNip-MV hibridado fue de aproximadamente 15 μ M.

30 Para preparar los clones de ARNip multivalente y el control de ARNhc, las secuencias en la tabla 2 a continuación se clonaron en el vector pSUPER, según el manual de pSUPER. La primera secuencia para cada clon nombrado (p. ej., TI, T1_long, TII) representa la secuencia del ARNip multivalente autocomplementario que se expresó en la célula como un transcrito de ARN (comparable a la secuencia de los ARNip -MV sintéticos en la tabla 1), y la secuencia denominada "_as" es parte de la secuencia codificante para esa molécula.

35 Tabla 2: Oligos para clones que expresan ARNip-MV:

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
TI	GATCCCCCACCACCCCGGTGAACAGCgtaGCTGTTACGTCGCTGCCGgtaGGGCAGCTTGCCGGTGGTGtTTTTTA	15
TI_as	AGCTTAACACCACCGGCAAGCTGCCCTAACGGGCAGCGACGTGAACAGCTAACGCTGTTACACGGGGTGGTGGGG	16
T1_long	GATCCCCCACCACCCCGGTGAACAGCTTGTAGGTGGCATCGCA GAAGCGATGCCACCTACAAGCTGTTACGTCGCTGCCCTTGTAG GTGGCATCGCAGAAGCGATGCCACCTACAAGGGCAGCTTGCCG GTGGTGtTTTTTA	17
T1_long_as	AGCTTAACACCACCGGCAAGCTGCCCTTGTAGGTGGCATCGCTT CTGCGATGCCACCTACAAGGGCAGCGACGTGAACAGCTTGTAG GTGGCATCGCTTCTGCGATGCCACCTACAAGCTGTTACACGGG GTGGTGGGG	18
TII	GATCCCCCGTGCTGCTTCATGTGGTCGTTgtaCGACCACAATGG CGACAACCTTgtaGGTTGTCGGGCAGCAGCACGTTtTTTTTA	19

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
TII_as	AGCTTAAAACGTGCTGCTGCCCCGACAACCTAACAAGGTTGTCGC CATTGTGGTCGTAACAACGACCACATGAAGCAGCACGGGG	20
TII_long	GATCCCCCGTGCTGCTTCATGTGGTCGTTGTAGGTGGCATCGCA GAAGCGATGCCACCTACAACGACCACAATGGCGACAACCTTGTA GGTGGCATCGCAGAAGCGATGCCACCTACAAGGTTGTCGGGCA GCAGCACGttTTTTTA	21
TII_long_as	AGCTTAACGTGCTGCTGCCCCGACAACCTTGTAGGTGGCATCGCT TCTGCGATGCCACCTACAAGGTTGTGCGCCATTGTGGTCGTTGTA GGTGGCATCGCTTCTGCGATGCCACCTACAACGACCACATGAA GCAGCACGGGG	22
ARNhc	GATCCCCGCAAGCTGACCCTGAAGTTCTTCAAGAGAGAACTTCA GGGTCAGCTTGCTTTTTA	23
shRNA_as	AGCTTAAAAGCAAGCTGACCCTGAAGTTCTCTCTTGAAGAACTT CAGGGTCAGCTTGCGGG	24

Para probar los efectos sobre la expresión de GFP, Las moléculas de ARNip-MV hibridado (a una concentración final de 7,5 nM por pocillo) y los vectores pSUPER que contenían los clones de ARNip-MV o el control de ARNhc se transfectoron con Lipofectamine 2000 en células 293 que expresan de manera constitutiva GFP. La fluorescencia de GFP se midió mediante citometría de flujo 24 horas después de la transfección.

Los resultados para un experimento se muestran en la tabla 3 a continuación y se resumen en la figura 7A. En la figura 7A, los clones ARNip-MV largo I y largo II demuestran supresión significativamente mayor de la actividad de GFP en comparación con el control de ARNhc (denominado en esa figura "ARNip").

Tabla 3:

Pocillo	Transfectado:	Fluorescencia media	% de GFP
ARNhc positivo	ARNhc	330	66 %
	ARNhc	302	60 %
Sintético:	ARNip-MV	305	61 %
Clon:	ARNip-MV corto TI	360	72 %
	ARNip-MV largo TI	218	43 %
	ARNip-MV largo TII	245	49 %
Negativo	Blanco	502	100 %
	células no GFP 293	0,5	0 %

La figura 7B muestra los resultados de un experimento en el que el complejo sintético de ARNip-MV GFP I demostró mayor supresión de la actividad de GFP en comparación con el clon de ARNhc (denominado en esa figura "ARNip"). Sin embargo, la actividad de supresión para el complejo de ARNip-MV GFP I se redujo ligeramente cuando una cadena se reemplazó con ADN, como se muestra para el complejo de ADN sintético ARNip-MV GFP I.

Los ARNm-MV sintéticos ilustrativos dirigidos a GFP también se pueden diseñar como en la tabla 4 a continuación, en la que los 3 oligos de T1.A-C pueden hibridarse como se ha descrito anteriormente. De manera similar, los 3 oligos de T2.A-C pueden hibridarse como se ha descrito anteriormente.

Tabla 4: Conjuntos de ARNip sintéticos ilustrativos T1 y T2.

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
T1.A	CUGCUGGUAGUGGUCGGCGUU	25
T1.B	CGCCGACUUCGUGACGUGCUU	26
T1.C	GCACGUCGCCGUCCAGCAGUU	27
T2.A	GUUGCCGUCGUCCUUGAAGUU	28

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
T2.B	CUUCAAGUGGAACUACGGCUU	29
T2.C	GCCGUAGGUAGGCGGCAACUU	30

Los clones de ARNip-MV dirigidos a GFP también se pueden diseñar como en la tabla 5 a continuación. Como se ha ilustrado anteriormente, estas secuencias se pueden clonar en el vector pSuper o en cualquier otro sistema de vector.

5

Tabla 5: Clones ilustrativos de ARNip-MV

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
T1_transcript	CGCCGACUUCGUGACGUGCUUGUGCACGUCGCCGUCCAGC AGUUGUCUGCUGGUAGUGGUCGGCGUU	31
T1	GATCCCCCGCCGACTTCGTGACGTGCTTGTGCACGTGCGCGT CCAGCAGTTGTCTGCTGGTAGTGGTCGGCGTTTTTTTA	32
T1_as	AGCTTAAAAAACGCCGACCACTACCAGCAGACAACCTGCTGG ACGGCGACGTGCACAAGCACGTACGAAGTCGGCGGGG	33
transcrito T1_long	de <u>CGCCGACUUCGUGACGUGCUUGUAGGUGGCAUCGCAGAAG</u> <u>CGAUGCCACCUACAAGCACGUCGCCGUCCAGCAGUUGUAGG</u> <u>UGGCAUCGCAGAAGCGAUGCCACCUACAACUGCUGGUAGUG</u> <u>GUCGGCGUU</u>	34
T1_long	GATCCCCCGCCGACTTCGTGACGTGCTTGTAGGTGGCATCGC AGAAGCGATGCCACCTACAAGCACGTGCGCGTCCAGCAGTTG TAGGTGGCATCGCAGAAGCGATGCCACCTACAAC <u>TGCTGGTA</u> <u>GTGGTCGGCGTTTTTA</u>	35
T1_long_as	AGCTTAAAAAACGCCGACCACTACCAGCAGTTGTAGGTGGCAT CGCTTCTGCGATGCCACCTACAACCTGCTGGACGGCGACGTGC TTGTAGGTGGCATCGCTTCTGCGATGCCACCTACAAGCACGT CACGAAGTCGGCGGGG	36
T2_transcript	CUUCAAGUGGAACUACGGCUUGUGCCGUAGGUAGGCGGCAA CUUGUGUUGCCGUCGUCCUUGAAGUU	37
T2	GATCCCCGGATCCGACATCCACGTTCTTCAAGAGAGAACGTG GATGTCGGATCCTTTTTA	38
T2_as	AGCTTAAAAAGGATCCGACATCCACGTTCTCTCTTGAAGAACG TGGATGTCGGATCCGGG	39
transcrito T2_long	de CUUCAAGUGGAACUACGGCUUGUAGGUGGCAUCGCAGAAGC GAUGCCACCUACAAGCCGUAGGUAGGCGGCAACUUGUAGGU GGCAUCGCAGAAGCGAUGCCACCUACAAGUUGCCGUCGUCC UUGAAGUU	40
T2_long	GATCCCCCTTCAAGTGGAACTACGGCTTGTAGGTGGCATCGC AGAAGCGATGCCACCTACAAGCCGTAGGTAGGCGGCAACTTG TAGGTGGCATCGCAGAAGCGATGCCACCTACAAGTTGCCGTC GTCTTTGAAGTTTTTA	41
T2_long_as	AGCTTAAAAACTTCAAGGACGACGGCAACTTGTAGGTGGCATC GCTTCTGCGATGCCACCTACAAGTTGCCGCCTACCTACGGCTT GTAGGTGGCATCGCTTCTGCGATGCCACCTACAAGCCGTAGT TCCACTTGAAGGGG	42

Ejemplo 2

10 TRIVOID ANTI-VIH

Puede diseñarse ARNip multivalente contra múltiples genes en sitios no relacionados. En este ejemplo, se ensayó un ARNip-MV clonado contra el VIH.

Estos resultados muestran que una molécula de ARNip-MV divalente contra los genes Gag y Tat (hv_sB) del VIH fue significativamente más eficaz en la inhibición de la replicación del VIH que un ARNip dirigido contra Gag solo (hv_s).

Los oligos mostrados en la tabla 6 se clonaron en el vector pSUPER.neo+gfp según las directrices del fabricante. El hv_s está dirigido solo a Gag y el hv_sB está dirigido tanto a Gag como a Tat.

Tabla 6: Clones de ARNip-MV anti-VIH

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
hv_s	GATCCCCGTGAAGGGGAACCAAGAGATTgaTCTCTTGTTAATATCAGCTTgaGCTGATATTTCTCCTTCACTTTTTA	43
hv_s_as	AGCTTAAAAAGTGAAGGAGAAATATCAGCTCAAGCTGATATTAACAA GAGATCAATCTCTTGTTCCCTTCACGGG	44
hv_sB	GATCCCCCAAGCAGTTTTAGGCTGACgTTaGTCAGCCTCATTGACAC AGgTTaCTGTGTGTCAGCTGCTGCTTGTTTTTTA	45
hv_sB_As	AGCTTAAAAAAACAAGCAGCAGCTGACACAGTAACCTGTGTCAATGA GGCTGACTAACGTCAGCCTAAACTGCTTGGGG	46

Las construcciones de vector que codifican los clones de ARNip-MV se transfectaron en células y los análisis se llevaron a cabo los días 10 y 40 después de la infección con VIH-1 (cepa pNL4.3) con una MOI de 1,0. La figura 9 muestra que a los 10 días después de la transfección, la inhibición de la replicación del VIH por el ARNip-MV dirigido tanto a Gag como a Tat fue aproximadamente 3 veces mayor que la inhibición por la molécula de ARNip dirigida solo a Gag.

Puede diseñarse ARNip multivalente para dirigirse a 1, 2 o 3 genes diferentes del VIH. Se proporciona la secuencia de un genoma de VIH ilustrativo en la figura 10. Se proporciona una secuencia de un gen env en la figura 11, un gen gag en la figura 12A y un gen tat en la figura 12B. Los diversos genes o regiones del VIH pueden definirse en general y ser diana por su gama de secuencia de nucleótidos de la siguiente manera: LTR 5': 1-181; GAG: 336-1838; POL: 1631-4642; VIF: 4587/4662-5165; VPR: 5105-5395 (incluyendo mutaciones en 5157, 5266 y 5297); TAT: 5376-7966; REV: 5515-8195; VPU: 5607-5852; ENV: 5767-8337; NEF: 8339-8959; y LTR 3': 8628-9263. En función de estos genes diana, se proporcionan secuencias de oligo MV-ARN ilustrativas para VIH en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7: Secuencias trivalentes de ARNip-MV ilustrativas

N.º	Secuencia	Gen diana	SEQ ID NO:
1	GCCUUCCCUUGUGGGAAGGUU	1649	47
2	CCUUCCCUUGUGGGAAGGCUU	1648	48
3	GCCUUCCUUGUGGGAAGGCUU	1648	49
4	UUCUGCACCUUACCUCUUAUU	6259	50
5	UAAGAGGAAGUAUGCUGUUUU	4062	51
6	AACAGCAGUUGUUGCAGAAUU	5291	52
7	CCAGACAAUAAUUGUCUGGUU	7387	53
8	CCAGACAAUAAUUGUCUGGUU	7387	53
9	CCAGACAAUAAUUGUCUGGUU	7387	53

N.º	Secuencia	Gen diana	SEQ ID NO:
10	CUCCCAGGCUCAGAU CUGGUU	16	54
11	CCAGAU CUUCCCUAAAAAUU	1630	55
12	UUUUUUUAUCUGCCUGGGAGUU	7011	56
13	UGGGU UCCCUAGUUAGCCAUU	40	57
14	UGGCUAAGAUCUACAGCUGUU	8585	58
15	CAGCUGUCCCAAGAACCCAUU	7325	59
16	AUCCUUUGAUGCACACAAUUU	591	60
17	AUUGUGUCACUCCUUCAGUU	6988	61
18	CUGAAGGAAGCUAAAGGAUUU	1785	62
19	UCCUGUGUCAGCUGCUGCUUU	685	63
20	AGCAGCAUUGUUAGCUGCUIIU	8481	64
21	AGCAGCUUUUAUACACAGGAUU	9046	65
22	ACCAACAAGGUUUCUGUCAUU	1284	66
23	UGACAGAUCUAAUUA CUACUU	6573	67
24	GUAGUAAUUAUCUGUUGGUUU	6311	68
25	CUGAGGGAAGCUAAAGGAUUU	1785	69
26	AUCCUUUGAUGCACACAAUUU	591	60
27	AUUGUGUCACUCCCUCAGUU	6988	61
28	CAAAGCUAGAUGAAUUGCUUU	3534	70
29	AGCAAUUGGUACAAGCAGUUU	5432	71
30	ACUGCUUGUUAGAGCUUUGUU	2952	72

ES 2 804 764 T3

N.º	Secuencia	Gen diana	SEQ ID NO:
31	AGGUCAGGGUCUACUUGUGUU	4872	73
32	CACAAGUGCUGAUUUUUCUUU	5779	74
33	AGAAAUAAUUGUCUGACCUUU	7384	75
34	CUAAGUUAUGGAGCCAUUUU	5212	76
35	AUAUGGCCUGAUGUACCAUUU	758	77
36	AUGGUACUUCUGAACUUAGUU	4736	78
37	UGGCUCCAUUUCUUGCUCUUU	5365	79
38	AGAGCAACCCCAAUCCCUU	7544	80
39	GGGGAUUUAGGGGGAGCCAUU	4191	81
40	AUCUCCACAAGUGCUGAUUU	5784	82
41	UAUCAGCAGUUCUUGAAGUUU	8942	83
42	ACUUCAAUUGUUGGAGAUUU	8158	84
43	AGACUGUGACCCACAAUUUUU	5862	85
44	AAAUUGUGGAUGAAUACUGUU	4310	86
45	CAGUAUUUGUCUACAGUCUUU	499	87
46	ACAGGCCUGUGUAAUGACUUU	6362	88
47	AGUCAUUGGUCUUAAGGUUU	8559	89
48	ACCUUUAGGACAGGCCUGUUU	6371	90
49	UCAGUGUUAUUUGACCCUUUU	6973	91
50	AAGGGUCUGAGGGAUCUCUUU	135	92
51	AGAGAUCUUUCCACACUGAUU	158	93

N.º	Secuencia	Gen diana	SEQ ID NO:
52	CAUAGUGCUUCCUGCUGCUUU	7337	94
53	AGCAGCAUUGUUAGCUGCUUU	8481	95
54	AGCAGCUAACAGCACUAUGUU	8190	96
55	GCUGCUUAUAUGCAGGAUCUU	9044	97
56	GAUCCUGUCUGAAGGGAUGUU	531	98
57	CAUCCCUGUUAAAAGCAGCUU	7118	99
58	UGGUCUAACCAGAGAGACCUU	9081	100
59	GGUCUCUUUUAAACAUUUGCUU	928	101
60	GCAA AUGUUUUCUAGACCAUU	7557	102
61	CUCCCAGGCUCAGAU CUGGUU	9097	103
62	CCAGAU CUUCCCUAAAAAUU	1630	55
63	UUUUUUUAUCUGCCUGGGAGUU	7011	56
64	UGGGU UCCCUAGUUAGCCA UU	9121	104
65	UGGCUAAGAUCUACAGCUGUU	8585	58
66	CAGCUGUCCCAAGAACCCA UU	7325	59

Para preparar complejos de ARNip-MV dirigidos al VIH a partir de las secuencias en la tabla 7 anterior, los oligos individuales se pueden combinar e hibridar de la siguiente manera. 1) ARNip-MV_1649/1648/1648; Hibridar las secuencias 1 y 2, y 3. 2) ARNip-MV_6259/4062/5291; Hibridar las secuencias 4 y 5, y 6. 3) ARNip-MV_7387/7387/7387; Hibridar las secuencias 7 y 8, y 9. 4) ARNip-MV_16/1630/7011; Hibridar las secuencias 10 y 11, y 12. 5) ARNip-MV_40/8585/7325; Hibridar las secuencias 13 y 14, y 15. 6) ARNip-MV_591/6988/1785; Hibridar las secuencias 16 y 17, y 18. 7) ARNip-MV_685/8481/9046; Hibridar las secuencias 19 y 20, y 21. 8) ARNip-MV_1284/6573/6311; Hibridar las secuencias 21 y 22, y 23. 9) ARNip-MV_1785/591/6988; Hibridar las secuencias 24 y 25, y 26. 10) ARNip-MV_3534/5432/2952; Hibridar las secuencias 27 y 28, y 29. 11) ARNip-MV_4872/5779/7384; Hibridar las secuencias 30 y 31, y 32. 12) ARNip-MV_5212/758/4736; Hibridar las secuencias 33 y 34, y 35. 13) ARNip-MV_5365/7544/4191; Hibridar las secuencias 36 y 37, y 38. 14) ARNip-MV_5784/8942/8158; Hibridar las secuencias 39 y 40, y 41. 15) ARNip-MV_5862/4310/499; Hibridar las secuencias 42 y 43, y 44. 16) ARNip-MV_6362/8559/6371; Hibridar las secuencias 45 y 46, y 47. 17) ARNip-MV_6973/135/158; Hibridar las secuencias 48 y 49, y 50. 18) ARNip-MV_7337/8481/8190; Hibridar las secuencias 51 y 52, y 53. 19) ARNip-MV_9044/531/7118; Hibridar las secuencias 54 y 55, y 56. 20) ARNip-MV_9081/928/7557; Hibridar las secuencias 57 y 58, y 59. 21) ARNip-MV_9097/1630/7011; Hibridar las secuencias 60 y 61, y 62. 22) ARNip-MV_9121/8585/7325; Hibridar las secuencias 63 y 64, y 65.

Ejemplo 3**TRIVOID ANTI-APOB**

El ARNip multivalente puede diseñarse para suprimir genes grandes al dirigirse a 2-3 ubicaciones en un solo gen. El ARNip-MV también puede emplear químicas de ARN alternativas para mejorar la T_m durante la hibridación. En este ejemplo, como se muestra en la tabla 8 a continuación, una serie de ARNip-MV están diseñados para dirigirse al gen de la apolipoproteína B (ApoB) y la presencia de subunidades de 2'-O metil ARN opcionales se indica entre paréntesis.

Tabla 8: ARNip-MV trivalente para ApoB

N.º	Secuencia	Gen diana	SEQ ID NO:
1	(UGGAACU)UUCAGCUUCAUAUU	ApoB a 268	105
2	(UAUGAAG)GCACCAUGAUGUUU	ApoB a 9905	106
3	(ACAUCAU)CUUCC(AGUUCCA)UU	ApoB a 1703	107
4	(ACUCUUC)AGAGUUCUUGGUUU	ApoB a 448	108
5	(ACCAAGA)CCUUGGAGACACUU	ApoB a 2288	109
6	(GUGUCUC)AGUUG(GAAGAGU)UU	ApoB a 6609	110
7	(ACCUUGA)CAUGGCAGCUGCUU	ApoB a 469	111
8	(GCAGCUG)CAAACUCUUCAGUU	ApoB a 458	112
9	(CUGAAGA)CGUAU(UCCAGGU)UU	ApoB a 12263	113
10	(CAGGGUA)AAGAACAAUUUGUU	ApoB a 520	114
11	(CAAAUUG)CUGUAGACAUUUUU	ApoB a 4182	115
12	(AAAUGUC)CAGCG(UACCCUG)UU	ApoB a 12548	116
13	(CCCUGGA)CACCGCUGGAACUUUU	ApoB a 279	117
14	(AAGUUC)AAUAACUUUUCUUAUU	ApoB a 9161	118
15	(AUGGAAA)AGGCAAG(UCCAGGG)UU	ApoB a 9968	119
16	(CCCUGGA)CACCGCUGGAACUUUUU	ApoB a 278	120
17	(AAAGUUC)CAAUAACUUUUCUUAUU	ApoB a 9161	121
18	(AUGGAAA)AUGGCAAG(UCCAGGG)UU	ApoB a 9968	122

Para preparar complejos trivalentes sintéticos de ARNip-MV a partir de las secuencias en la tabla 8 anterior, los oligos individuales se pueden combinar e hibridar de la siguiente manera.

1) ARNip-MV_268/9950/1703; Hibridar las secuencias 1 y 2, y después 3. 2) ARNip-MV_448/2288/6609; Hibridar las secuencias 4 y 5, y después 6. 3) ARNip-MV_469/458/12263; Hibridar las secuencias 7 y 8, y después 9. 4) ARNip-MV_520/4182/12548; Hibridar las secuencias 10 y 11, y después 12. 5) ARNip-MV_279/9161/9986; Hibridar las secuencias 13 y 14, y después 15. 6) ARNip-MV_278/9161/9986; Hibridar las secuencias 16 y 17, y después 18.

Los ARNip multivalentes que están diseñados con potentes cadenas primarias y secundarias también pueden

emplear bases oscilantes o universales para completar la complementariedad de diana o ADN con extremos romos para desactivar el silenciamiento por la cadena de cualquier diana. Se muestran oligos ilustrativos dirigidos a ApoB en la tabla 9 a continuación, en la que (*) indica una base oscilante o universal opcional.

5 Tabla 9: ARNip-MV bivalente ilustrativo para ApoB

N.º	Secuencia	Gen diana	SEQ ID NO:
19	UGAAUCGAGUUGCAUCUUUUU	ApoB a 223	123
20	AAAGAUGCUGCUCAUCACAUU	ApoB a 883	124
21	UGUGAUGACACUCGAUUCAUU	ApoB a 10116 (pares G/A)	125
22	U*UGAU*ACACUCGAUUCAUU	ApoB a 10116 (base univ.)	126
23	TGTGATGACACTCGATTCA	nulo a 10116	127
24	CAGCUUGAGUUCGUACCUGUU	ApoB a 483	128
25	CAGGUACAGAGAACUCCAAUU	ApoB a 11596	129
26	UUGGAGUCUGACCAAGCUGUU	ApoB a 2454	130
27	UUGGAGUCUGAC*AAGCU*UU	ApoB a 2454	131
28	TTGGAGTCTGACCAAGCTG	nulo a 2454	132

Para preparar complejos bivalentes sintéticos de ARNip-MV a partir de las secuencias en la tabla 9 anterior, los oligos individuales se pueden combinar e hibridar de la siguiente manera. 7a) ARNip-MV_223/883/10116); Hibridar las secuencias 19, 20 y 21. 7b) ARNip-MV_223/883/10116*); Hibridar las secuencias 19, 20 y 22. 7c) ARNip-MV_223/883/nulo); Hibridar las secuencias 19, 20 y 23. 8a) ARNip-MV_483/11596/2454); Hibridar las secuencias 24, 25 y 26. 8b) ARNip-MV_483/11596/2454*); Hibridar las secuencias 24, 25 y 26. 8c) ARNip-MV_483/11596/nulo); Hibridar las secuencias 24, 25 y 26.

Los ARNip multivalentes también pueden diseñarse para suprimir genes grandes al dirigirse a 2-3 ubicaciones en un solo gen. Como se ha señalado, anteriormente, determinadas realizaciones de los presentes ARNip-MV también pueden emplear químicas de ARN alternativas para mejorar la T_m durante la hibridación. En la tabla 10 a continuación, las bases opcionales de 2'-O metil ARN 2'-fluoro se indican entre paréntesis. Entre otros ejemplos de bases alternativas, el 5-metilo también puede aumentar la T_m de la estructura de ARNip-MV, si se desea.

20 Tabla 10: ARNip-MV trivalente ilustrativo para ApoB

N.º	Secuencia	Gen diana	SEQ ID NO:
1	UGG(AA)CUUUCAGCUUCAUAAU	ApoB a 268	105
2	U(AU)GAAGGCACCAUGAUGUUU	ApoB a 9905	106
3	(ACAUCAU)CUUCCAGUUCUAAU	ApoB a 1703	107
4	AC(U)CUUCAGAGUUCUUGGUUU	ApoB a 448	108
5	(ACCAAGA)CCUUGGAGACACUU	ApoB a 2288	109
6	G(U)GUCUCAGUUGGAAGAGUUU	ApoB a 6609	110
7	(ACCUUGGA)CAUGGCAGCUGCUU	ApoB a 469	111
8	GC(A)GCUGCAAACUCUUCAGUU	ApoB a 458	112

N.º	Secuencia	Gen diana	SEQ ID NO:
9	(CUGAAGA)CGUAU(UCCAGGU)UU	ApoB a 12263	113
10	(CAGGGUA)AAGAACAAUUUGUU	ApoB a 520	114
11	(CAAAUU)GCUGUAGACA(UUU)UU	ApoB a 4182	115
12	(AAAUGUC)CAGCGUACCCUGUU	ApoB a 12548	116
13	(CCCUGGA)CACCGCUGGAACUUUU	ApoB a 279	117
14	(AAGUUC)AAUAACUUUCCAUUU	ApoB a 9161	118
15	(AU)GGAAAAGGCAAG(UCCAGGG)UU	ApoB a 9968	119
16	CCC(U)GGACACCGCUGG(AACUUU)UU	ApoB a 278	120
17	(AAA)GUUCCAAUAACUU(UU)CC(AU)UU	ApoB a 9161	121
18	(AUGGAAA)AUGGCAAG(UCCAGGG)UU	ApoB a 9968	122
19	UCAGGGCCGCUCUGUAUUUUU	ApoB a 6427	133
20	AAAUACAUUUCUGGAAGAGUU	ApoB a 8144	134
21	CUCUCCAAAAAGCCCUGAUU	ApoB a 12831	135
22	AAAUACAUUUCUGGAAGAGuu&CUCUCCAAAA GCCCUGAuu&UCAGGGCCGCUCUGUAUUUuu	Construcción de conector para escisión después de la hibridación. "&" = PC Spacer, o fosforamidita de enlace	136

Para preparar complejos bivalentes sintéticos de ARNip-MV a partir de las secuencias en la tabla 10 anterior, los oligos individuales se pueden combinar e hibridar de la siguiente manera. 1) ARNip-MV_268/9950/1703; Hibridar las secuencias 1 y 2, y después 3. 2) ARNip-MV_448/2288/6609; Hibridar las secuencias 4 y 5, y después 6. 3) ARNip-MV_469/458/12263; Hibridar las secuencias 7 y 8, y después 9. 4) ARNip-MV_520/4182/12548; Hibridar las secuencias 10 y 11, y después 12. 5) ARNip-MV_279/9161/9986; Hibridar las secuencias 13 y 14, y después 15. 6) ARNip-MV_278/9161/9986; Hibridar las secuencias 16 y 17, y después 18. 7) ARNip-MV_6427/8144/12831; Hibridar las secuencias 19 y 20, y después 21. 7b) ARNip-MV_6427/8144/12831; Hibridar la cadena 22, después escindir el fosfato de enlace con hidróxido de amonio. 7b) ARNip-MV_6427/8144/12831; Hibridar la cadena 22, después escindir PC Spacer con luz UV en el intervalo espectral de 300-350 nm.

En determinadas realizaciones, los ARNip multivalentes que están diseñados con potentes cadenas primarias y secundarias puede emplear tipos de bases oscilantes, espaciadoras o abásicas (los ejemplos se indican con (*)) en la tabla 11 a continuación) para completar los complementos de diana o ADN con extremos romos para desactivar el silenciamiento por la cadena de cualquier diana. En algunas realizaciones, UNA, fosforamiditas conectoras, rSpacer, 5-nitroindol pueden actuar como bases abásicas eficaces en lugar de nucleótidos desapareados. Si se desea, el uso de bases abásicas puede dar lugar a una Tm debilitada y/o las pirimidinas que rodean un sitio abásico pueden utilizar bases 2'-fluoro para aumentar la Tm en aproximadamente 2 grados para cada base 2'-fluoro.

Tabla 11: ARNip-MV ilustrativo dirigido a ApoB

N.º	Secuencia	Gen diana	SEQ ID NO:
23	UGAAUCGAGUUGCAUCUUUUU	ApoB a 223	123
24	AAAGAUGCUGCUCAUCACAUU	ApoB a 883	124

N.º	Secuencia	Gen diana	SEQ ID NO:
25	UGUGAUGACACUCGAUUCAUU	ApoB a 10116 (pares G/A)	125
26	U*UGAU*ACACUCGAUUCAUU	ApoB a 10116 (* base rSPACER)	126
27	TGTGATGACACTCGATTCA	nulo a 10116	127
28	CAGCUUGAGUUCGUACCUGUU	ApoB a 483	128
29	CAGGUACAGAGAACUCCAAUU	ApoB a 11596	129
30	UUGGAGUCUGACCAAGCUGUU	ApoB a 2454	130
31	UUGGAGUCUGAC*AAGCU*UU	ApoB a 2454 (* base básica)	131
32	TTGGAGTCTGACCAAGCTG	nulo a 2454	132
33	AACCCACUUUCAAUUUCCUU	ApoB a 9244	137
34	GGAAAUUGAGAAUUCUCCAUU	ApoB a 1958	138
35	UGGAGAAUCUCAGUGGGUUUU	ApoB a 8005	139
36	rUrGrGfA-fArArUrCrUrCrA-fUrGrGrG-fUrUrU	ApoB a 8005	140
37	GAUGAUGAAACAGUGGGUUUU	ApoB a 10439	141
38	AACCCACUUUCAAUUUCCUU	ApoB a 9244	137
39	GGAAAUUGGAGACAUCAUCUU	ApoB a 2284	142
40	-rGfAfArUrUrGrGrArGrArCfA-rCfArUrCrUrU	ApoB a 2284	143
41	GCAAACUCUUCAGAGUUCUUU	ApoB a 452	144
42	AGAACUCCAAGGGUGGGAUUU	ApoB a 11588	145
43	AUCCACUUUCAAGUUUGCUU	ApoB a 9244	146
44	fA-rCrCrArCrUrUrUrCrAfA-fUrUrU-rC	ApoB a 9244	147

Para preparar complejos bivalentes sintéticos de ARNip-MV a partir de las secuencias en la tabla 11 anterior, los oligos individuales se pueden combinar e hibridar de la siguiente manera. 7a) ARNip-MV_223/883/10116); Hibridar las secuencias 23, 24 y 25. 7b) ARNip-MV_223/883/10116*); Hibridar las secuencias 23, 24 y 26. 7c) ARNip-MV_223/883/nulo); Hibridar las secuencias 23, 24 y 27. 8a) ARNip-MV_483/11596/2454); Hibridar las secuencias 28, 29 y 30. 8b) ARNip-MV_483/11596/2454*); Hibridar las secuencias 28, 29 y 31. 8c) ARNip-MV_483/11596/nulo); Hibridar las secuencias 28, 29 y 32. 9) ARNip-MV_9244/1958/8005); Hibridar las secuencias 33, 34 y 35. 9b) ARNip-MV_9244/1958/8005); Hibridar las secuencias 33, 34 y 36. 10) ARNip-MV_10439/9244/2284); Hibridar las secuencias 37, 38 y 39. 10b) ARNip-MV_10439/9244/2284); Hibridar las secuencias 37, 38 y 40. 11) ARNip-MV_452/11588/9244); Hibridar las secuencias 41, 42 y 43. 11b) ARNip-MV_452/11588/9244); Hibridar las secuencias 41, 42 y 44.

Como se ilustra en la tabla 12 a continuación, el ARNip multivalente puede dirigirse contra ApoB humana. El ARNip-MV bivalente puede actuar con diversas tolerancias a la estructura y complementariedad de diana de cada cadena.

Tabla 12: ARNip multivalente ilustrativo dirigido a ApoB humana

N.º	Secuencia	Sitio génico de ApoB	SEQ ID NO:
1	CUUCAUCACUGAGGCCUCUUU	1192	148
2	AGAGGCCAAGCUCUGCAUUUU	5140	149
3	AAUGCAGAUGAAGAUGAAGAA	10229	150
4	UUCAGCCUGCAUGUUGGCUUU	2724	151
5	AGCCAACUAUACUUGGAUCUU	13294	152
6	GAUCCAAAAGCAGGCUGAAGA	4960	153
7	CCCUCAUCUGAGAAUCUGGUU	8927	154
8	CCAGAUUCAUAAACCAAGUUU	9044	155
9	ACUUGGUGGCCCAUGAGGGUU	3440	156
10	UCAAGAAUCCUUAAGCCUU	9595	157
11	GGCUUGAAGCGAUCACACUUU	758	158
12	AGUGUGAACGUAUUCUUGAUU	4367	159
13	UUGCAGUUGAUCCUGGUGGUU	344	160
14	CCACCAGGUAGGUGACCACUU	1354	161
15	GUGGUCAGGAGAACUGCAAUU	2483	162
16	CCUCCAGCUCAACCUUGCAUU	358	163
17	UGCAAGGUCUAAAAAUGUU	6341	164
18	CAUUUUUGAUCUCUGGAGGUU	4043	165
19	CAGGAUGUAAGUAGGUUCAUU	570	166
20	UGAACCUUAGCAACAGUGUUU	5687	167
21	ACACUGUGCCCACAUCCUGUU	9109	168

ES 2 804 764 T3

N.º	Secuencia	Sitio génico de ApoB	SEQ ID NO:
22	GGCUUGAAGCGAUCACACUUU	758	169
23	AGUGUGAACGUAUUCUUGUUU	4367	170
24	ACAAGAAUCCUUCAAGCCUU	9595	171
25	UGAAGAGAUUAGCUCUCUGUU	1153	172
26	CAGAGAGGCCAAGCUCUGCUU	5143	173
27	GCAGAGCUGGCUCUCUUCAUU	10304	174
28	CUCAGUAACCAGCUUAUUGUU	1170	175
29	CAAUAAGAUUUUAUACAAUUU	7084	176
30	UUUGUUAUCUUAUACUGAGUU	9650	177
31	GAACCAAGGCUUGUAAAGUUU	1258	178
32	ACUUUACAAAAGCAACAAUUU	6286	179
33	AUUGUUGUUAUUAUUGGUUCUU	6078	180
34	CAGGUAGGUGACCACAUCUUU	1350	181
35	AGAUGUGACUGCUUCAUCAUU	1203	182
36	UGAUGAACUGCGCUACCUGUU	8486	183
37	CCAGUCGCUUAUCUCCCGGUU	1786	184
38	CCGGGAGCAAUGACUCCAGUU	2678	185
39	CUGGAGUCAUGGCGACUGGUU	2486	186
40	UGGAAGAGAAACAGAUUUGUU	2046	187
41	CAAAUCUUUAAUCAGCUUCUU	2403	188
42	GAAGCUGCCUCUUCUCCAUU	12299	189

ES 2 804 764 T3

N.º	Secuencia	Sitio génico de ApoB	SEQ ID NO:
43	AUCCAAAGGCAGUGAGGGUUU	2152	190
44	ACCCUCAACUCAGUUUUGAUU	12242	191
45	UCAAAACCGGAAUUUGGAUUU	3316	192
46	UAGAGACACCAUCAGGAACUU	2302	193
47	GUUCCUGGAGAGUCUUCAAUU	1102	194
48	UUGAAGAAUUAGGUCUCUAUU	1153	195
49	GCUCAUGUUUAUCAUCUUUUU	2350	196
50	AAAGAUGCUGAACUUAAGUU	7622	197
51	CUUUAAGGGCAACAUGAGCUU	2863	198
52	GGAGCAAUGACUCCAGAUGUU	2675	199
53	CAUCUGGGGGAUCCCCUGCUU	2544	200
54	GCAGGGGAGGUGUUGCUCUU	912	201
55	UCACAAACUCCACAGACACUU	2761	202
56	GUGUCUGCUUUAUAGCUUGUU	5672	203
57	CAAGCUAAAGGAUUUGUGAUU	9683	204
58	GCAGCUUGACUGGUCUCUUUU	2914	205
59	AAGAGACUCUGAACUGCCCUU	4588	206
60	GGGCAGUGAUGGAAGCUGCUU	8494	207
61	CAGGACUGCCUGUUCUCAAUU	2996	208
62	UUGAGAACUUCUAAUUUGGUU	8522	209
63	CCAAAUUUGAAAAGUCCUGUU	9855	210

ES 2 804 764 T3

N.º	Secuencia	Sitio génico de ApoB	SEQ ID NO:
64	UGUAGGCCUCAGUUCCAGCUU	3132	211
65	GCUGGAAUUCUGGUAUGUGUU	8335	212
66	CACAUACCGAAUGCCUACAUI	9926	213
67	GACUUCACUGGACAAGGUCUU	3300	214
68	GACCUUGAAGUUGAAAUGUU	5301	215
69	CAUUUUCUGCACUGAAGUCUU	11983	216
70	AAGCAGUUUGGCAGGCGACUU	3549	217
71	GUCGCCUUGUGAGCACCACUU	5039	218
72	GUGGUGCCACUGACUGCUUUU	12521	219
73	CAGAUGAGUCCAUIUGGAGUU	3568	220
74	CUCCAAACAGUGCCAUGCCUU	9142	221
75	GGCAUGGAGCCUUCAUCUGUU	3256	222
76	CACAGACUUGAAGUGGAGGUU	4086	223
77	CCUCCACUGAGCAGCUUGAUU	2924	224
78	UCAAGCUUCAAGUCUGUGUU	974	225
79	AUGGCAGAUUGGAAUCCCACUU	4102	226
80	GUGGGAUCACCUCCGUUUUUU	2971	227
81	AAAACGGUUUCUCUGCCAUIU	12836	228
82	UGAUACAACUUGGGAAUGGUU	4148	229
83	CCAUUCCCUAUGUCAGCAUIU	2971	230
84	AUGCUGACAAAUUGUAUCAUI	12836	231

Para preparar complejos bivalentes sintéticos de ARNip-MV a partir de las secuencias en la tabla 12 anterior, los oligos individuales se pueden combinar e hibridar de la siguiente manera. ARNip-MV; Hibridar las secuencias 1, 2 y 3. ARNip-MV; Hibridar las secuencias 4, 5 y 6. ARNip-MV; Hibridar las secuencias 7, 8 y 9. ARNip-MV; Hibridar las secuencias 10, 11 y 12. ARNip-MV; Hibridar las secuencias 13, 14 y 15. ARNip-MV; Hibridar las secuencias 16, 17 y 18. ARNip-MV; Hibridar las secuencias 19, 20 y 21. ARNip-MV; Hibridar las secuencias 22, 23 y 24. ARNip-MV; Hibridar las secuencias 25, 26 y 27. ARNip-MV; Hibridar las secuencias 28, 29 y 30. ARNip-MV; Hibridar las secuencias 31, 32 y 33. ARNip-MV; Hibridar las secuencias 34, 35 y 36. ARNip-MV; Hibridar las secuencias 37, 38 y 39. ARNip-MV; Hibridar las secuencias 40, 41 y 42. ARNip-MV; Hibridar las secuencias 43, 44 y 45. ARNip-MV; Hibridar las secuencias 46, 47 y 48. ARNip-MV; Hibridar las secuencias 49, 50 y 51. ARNip-MV; Hibridar las secuencias 52, 53 y 54. ARNip-MV; Hibridar las secuencias 55, 56 y 57. ARNip-MV; Hibridar las secuencias 58, 59 y 60. ARNip-MV; Hibridar las secuencias 61, 62 y 63. ARNip-MV; Hibridar las secuencias 64, 65 y 66. ARNip-MV; Hibridar las secuencias 67, 68 y 69. ARNip-MV; Hibridar las secuencias 70, 71 y 72. ARNip-MV; Hibridar las secuencias 73, 74 y 75. ARNip-MV; Hibridar las secuencias 76, 77 y 78. ARNip-MV; Hibridar las secuencias 79, 80 y 81. ARNip-MV; Hibridar las secuencias 82, 83 y 84.

Se puede usar ARNip-MV dirigido a ApoB para tratar o controlar una amplia variedad de enfermedades o afecciones asociadas con la expresión de esa proteína diana, como se describe en el presente documento y se conoce en la técnica.

Referencias:

1. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. y Mello, C. C. (1998) Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 408, 325-330.
2. Kennerdell, J. R. y Carthew, R. W. (1998) Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in the wingless pathway. *Cell*. 95, 1017-1026.
3. Misquitta, L. y Paterson, B. M. (1999) Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-i): a role for *nautilus* in embryonic somatic muscle formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96, 1451-1456.
4. Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D. y Hannon, G. J. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 404, 293-296.
5. Lohmann, J. U., Endl, I. y Bosch, T. C. (1999) Silencing of developmental genes in *Hydra*. *Dev. Biol.* 214, 211-214.
6. Wargelius, A., Ellingsen, S. y Fjose, A. (1999) Double stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263, 156-161.
7. Ngo, H., Tschudi, C., Gull, K. y Ullu, E. (1998) Double stranded RNA induces gene degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95, 14687-14692.
8. Montgomery, M. K., Xu, S., Fire, A. (1998) RNA as a target of double stranded RNA mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95, 15502-15507.
9. Boshier, J. M., Dufourcq, P., Sookhareea, S., Labouesse, M. (1999) RNA interference can target pre-gene. Consequences for gene expression in *Caenorhabditis elegans* operon. *Genetics*. 153, 1245-1256.
10. Fire, A. (1999) RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet.* 15, 358-363.
11. Sharp, P. A. (1999) RNAi and double-stranded RNA. *Genes Dev.* 13, 139-141.
12. Ketting, R. F., Harerkamp, T. H., van Luenen, H. G. y Plasterk, R. H. (1999) Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNase I. *Cell*. 99, 133-141.
13. Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W. G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A. y Mello, C. C. (1999) The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell*. 99, 123-132.
14. Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., and Bartel, D. P. (2000) RNAi: Double stranded RNA directs the ATP dependent cleavage of gene at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*. 101, 25-33.
15. Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M. y Hannon, G. J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*. 409, 363-366.
16. Elbashir, S., Lendeckel, W. y Tuschl, T. (2001) RNA interference is mediated by 21 and 22 nucleotide RNAs. *Genes and Dev.* 15, 188-200.

17. Sharp, P. A. (2001) RNA interference 2001. *Genes and Dev.* 15, 485-490.
18. Hunter, T., Hunt, T. y Jackson, R. J. (1975) The characteristics of inhibition of protein synthesis by double-stranded ribonucleic acid in reticulocyte lysates. *J. Biol. Chem.* 250, 409-417.
19. Bass, B. L. (2001) The short answer. *Nature.* 411, 428-429.
20. Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. y Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 411, 494-498.
21. Carson, P. E. y Frischer, H. (1966) Glucose-6-Phosphate dehydrogenase deficiency and related disorders of the pentose phosphate pathway. *Am J Med.* 41, 744-764.
22. Stamato, T. D., Mackenzie, L., Pagani, J. M. y Weinstein, R. (1982) Mutagen treatment of single Chinese Hamster Ovary cells produce colonies mosaic for Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. *Somatic Cell Genetics.* 8, 643-651.
23. Genetic characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Vaccine. 2004, 6 de diciembre; 22 Supl. 1: S5-8. [Hiramatsu K, Watanabe S, Takeuchi F, Ito T y Baba T].
24. A novel family of RNA tetraloop structure forms the recognition site for *Saccharomyces cerevisiae* RNase III. [EMBO J. 2001].
25. Solution structure of conserved AGNN tetraloops: insights into RNase IIIp RNA processing. [EMBO J. 2001].
26. RevisiónThe RNase III family: a conserved structure and expanding functions in eukaryotic dsRNA metabolism. [Curr Issues Mol Biol. 2001]
27. Sequence dependence of substrate recognition and cleavage by yeast RNase III. [J Mol Biol. 2003]
28. Noncatalytic assembly of ribonuclease III with double-stranded RNA. [Structure. 2004]
29. Intermediate states of ribonuclease III in complex with double-stranded RNA. [Structure. 2005]
30. RevisiónStructural basis for non-catalytic and catalytic activities of ribonuclease III. [Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 2006]
31. RevisiónRibonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes. [Curr Opin Struct Biol. 2007]
32. Short RNA guides cleavage by eukaryotic RNase III. [PLoS ONE. 30 de mayo de 2007; 2 (5): e472.]
33. A stepwise model for double-stranded RNA processing by ribonuclease III. [Mol Microbiol. 2008]
34. Revisión: The mechanism of RNase III action: how dicer dices. [Curr Top Microbiol Immunol. 2008]

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Halo-Bio RNAi Therapeutics, Inc. Hauser, Todd
- <120> POLINUCLEÓTIDOS PARA LA INTERFERENCIA DE ARN MULTIVALENTE, COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS
- <130> 270038.405PC
- <140> PCT
- <141> 01/06/2010
- <150> US 61/183.011
- <151> 01/06/2009
- <160> 231
- <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1
 <211> 14119
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 1

ucccaccggg	accugcgggg	cugagugccc	uucucgguug	cugccgcuga	ggagcccgcc	60
cagccagcca	gggcccgcgag	gccgaggcca	ggccgcagcc	caggagccgc	cccaccgcag	120
cuggcgauug	acccgccgag	gcccgcgcug	cuggcgcguc	uggcgcgucc	ugcgcgugug	180
cugcugcugc	uggcgggcg	cagggccgaa	gaggaaaugc	uggaaaaugu	cagccugguc	240
uguccaaaag	augcgacccg	auucaagcac	cuccggaagu	acacauacaa	cuaugaggcu	300
gagaguucca	guggaguccc	ugggacugcu	gauucaagaa	gugccaccag	gaucaacugc	360
aagguugagc	uggagguucc	ccagcucugc	agcuucaucc	ugaagaccag	ccagugcacc	420
cugaaagagg	uguauggcuu	caaccucgag	ggcaaagccu	ugcugaagaa	aaccaagaac	480
ucugaggagu	uugcugcagc	cauguccagg	uauagcucua	agcuggccau	uccagaaggg	540
aagcagguuu	uccuuuaccc	ggagaaagau	gaaccuacuu	acauccugaa	caucaagagg	600
ggcaucauuu	cugcccuccu	gguuccccca	gagacagaag	aagccaagca	aguguuguuu	660
cuggauaccg	uguauggaaa	cugcuccacu	cacuuuaccg	ucaagacgag	gaagggaau	720
guggcaacag	aaauauccac	ugaaagagac	cuggggcgau	gugaucgcuu	caagcccuauc	780
cgcacaggca	ucagcccacu	ugcucucauc	aaaggcauga	cccggcccuu	gucaacucug	840
aucagcagca	gccaguccug	ucaguacaca	cuggacgcua	agaggaagca	uguggcgagaa	900
gccaucugca	aggagcaaca	ccucuuccug	ccuuucuccu	acaacaauaa	guaugggaug	960
guagcacaag	ugacacagac	uuugaaacuu	gaagacacac	caaagaucua	cagccgcuuc	1020
uuuggugaag	guacuaagaa	gauggggccuc	gcuuuugaga	gcacccaauc	cacauaccu	1080
ccaaagcagg	ccgaagcugu	uuugaagacu	cuccagggaac	ugaaaaaacu	aaccaucucu	1140
gagcaaaaau	uccagagagc	uaaucucuuu	aaauagcugg	uuacugagcu	gagaggccuc	1200
agugaugaag	cagucacauc	ucucuugcca	cagcugauug	agguguccag	ccccaucacu	1260
uuacaagccu	ugguucagug	uggacagccu	cagugcucca	cucacauccu	ccaguggcug	1320
aaacgugugc	augccaaccc	ccuucugaua	gaugugguca	ccuaccuggu	ggcccgauuc	1380
cccagagccu	cagcacagca	gcugcgagag	aucuucaaca	uggcgagggg	ucagcgagc	1440
cagagccaccu	uguaugcgcu	gagccacgcg	gucaacaacu	aucuaagac	aaaccuaca	1500
gggaccagag	agcugcugga	cauugcuauu	uaccugaugg	aacagauuca	agaugacugc	1560
acuggggauu	aagauuacac	cuauuugauu	cugcggguca	uuggaaaauu	gggcccuaac	1620
auggagcagu	uaacuccaga	acucaagucu	ucaauccuca	aaugugucca	aaguacaaag	1680
ccaucacuga	ugauccagaa	agcugccauc	caggcucugc	ggaaaaugga	gccuaaagac	1740
aaggaccagg	agguuccuuc	ucagacuuc	cuuugaugau	cuucuccggg	agauaagcga	1800
cuggcugccu	aucuuauugu	gaugaggagu	ccuucacagg	cagauauuaa	caaaaauugc	1860
caaaauucua	caugggaaca	gaaugagcaa	gugaagaacu	uuguggcuuc	ccauauugcc	1920
aaauaucuuga	acucagaaga	auuggauauc	caagaucuga	aaaaguuaugu	gaaagaagcu	1980
cugaaagaau	cucaacuucc	aacugucaug	gacuucagaa	aaucucucg	gaacuaucua	2040
cucuaaaaau	cuguuucucu	uccaucacuu	gacccagccu	cagccaaaau	agaagggaau	2100
cuuauauuug	auccaaaaua	cuaccuuccu	aaagaaagca	ugcugaaaac	uaccucacu	2160
gccuuuggau	uugcuucagc	ugaccucauc	gagauuggcu	uggaaggaaa	aggcuuugag	2220

ccaacauugg	aagcucuuuu	ugggaagcaa	ggauuuuuucc	cagacagugu	caacaaagcu	2280
uuuacuggg	uuuauugcu	aguuccugau	ggugucucua	aggucuuagu	ggaccacuuu	2340
ggcuauacca	aagaugauaa	acaugagcag	gauauugguaa	auggaaauaa	gcucaguguu	2400
gagaagcuga	uuuagauuu	gaaauccaaa	gaagucccgg	aagccagagc	cuaccuccgc	2460
aucuugggag	aggagcuugg	uuuugccagu	cuccaugacc	uccagucccu	gggaaagcug	2520
cuucugaugg	gugcccgcac	ucugcagggg	aucccccaga	ugauuggaga	ggucaucagg	2580
aagggcucaa	agaugacuu	uuuucuuac	uacauuuca	uggagaaugc	cuuugaacuc	2640
cccacuggag	cuggauuaca	guugcaaaau	ucuucaucug	gagucauugc	ucccgaggcc	2700
aaggcuggag	uaaaacugga	aguagccaac	augcaggcug	aacugguggc	aaaacccucc	2760
gugucugugg	aguugugag	aaauaugggc	aucaucauuc	cggacuucgc	uaggaguggg	2820
guccagauga	acaccaacuu	cuuccacgag	ucgggucugg	aggcucaugu	ugcccuaaaa	2880
gcuggggaagc	ugaaguuuau	cauuccuucc	ccaaagagac	cagucaagcu	gcucagugga	2940
ggcaacacau	uacauuuggu	cucuaccacc	aaaacggagg	ugauccacc	ucucauugag	3000
aacaggcagu	ccuggucagu	uugcaagcaa	gucuuuuccug	gccugaauua	cugcaccuca	3060
ggcgcuuacu	ccaacgccag	cuccacagac	uccgccuccu	acuaucgcgu	gaccggggac	3120
accagauuag	cuguggaacu	gaggccuaca	ggagagaauug	agcaguauuc	ugucagcgca	3180
accuagagc	uccagagaga	ggacagagcc	uugguggaau	cccugaaguu	uguaacucua	3240
gcagaaggug	cgaagcagac	ugaggcuacc	augacauuca	aaauaaucg	gcagaguau	3300
accuugucca	gugaagucca	aaauccggau	uuugauguug	accucggaac	aauccucaga	3360
guuauaug	aaucucuga	gggcaaaacg	ucuuacagac	ucacccugga	cauucagaac	3420
aagaaaaaua	cugaggucgc	ccucaugggc	caccuaaguu	gugacacaaa	ggaagaaaga	3480
aaaaucaagg	guguuauuuc	cauaccccg	uugcaagcag	aagccagaag	uagauccuc	3540
gcccacuggu	cgccugccaa	acugcuucuc	caauuggacu	caucugcuac	agcuuauagg	3600
uccacaguuu	ccaagagggg	ggcauggcau	uugaugaag	agaagauga	auuugaauug	3660
aacacaggca	ccaaguaga	uacaaaaaa	augacuucca	auuucccugu	ggauucucc	3720
gauuauucca	agagcuugca	uauugaugcu	aaauagacuc	uggaucacag	agucccugaa	3780
acagacaua	cuuuccggca	cguggguucc	aaauuaauag	uugcaaugag	cucauggcuu	3840
cagaaggcau	cugggagucu	uccuuauacc	cagacuucgc	aagaccaccu	caauagccgu	3900
aaggagauca	accuccagaa	caugggaau	cagacuucc	acaucacaga	aaaccucuc	3960
uuaaaaagcg	auggccgggu	caauuaauacc	uugaacaaga	acaguuaaga	aaauagauu	4020
ccuuggccuu	uugguggcaa	auccuccaga	gaucuaaaga	uguuagagac	uguuaggaca	4080
ccagcccucc	acuucaaguc	ugugggguuc	caucugccau	cucgagaguu	ccaagucccu	4140
acuuuuacca	uucccaaguu	guaucaacug	caagugccuc	uccugggugu	ucuaagaccuc	4200
uccacgaau	ucuaacagaa	cuuguacaac	ugguccgccc	ccuacagugg	uggcaacacc	4260
agcacagacc	auuucagccu	ucgggucugu	uaccacauga	aggcugacuc	uugguugag	4320
cugcuuuccu	acaauugca	aggauucgga	gaaacaacau	augaccacaa	gaauacguuc	4380
acacuaucua	gugauggguc	ucuaacggcc	aaauuuucua	auucgaauu	caauuucagu	4440
cauguagaaa	aacuuggaaa	caaccaguc	ucaaaaagggu	uacuaauuu	cgaugcaucu	4500
aguuccuggg	gaccacagau	gucugcuuca	guucauuugg	acuccaaaaa	gaaacagcau	4560
uuguuuguca	aagaagucua	gauugauggg	caguucagag	ucucuuucgu	cuauucuaaa	4620
ggcacauaug	gccugucuu	ucagagggau	ccuaacacug	gccggcucaa	uggagagucc	4680
aaacugaggu	uuuacuccuc	cuaccuccaa	ggcaccacac	agauaacagg	aagauaugaa	4740
gauggaacc	ucuccucac	cuccaccucu	gaucugcaaa	guggcaucau	uaaaaauacu	4800
gcuucccuua	aguauagaa	cuacgagcug	acuuuaaaau	cugacaccaa	ugggaaguau	4860
aagaacuuug	ccacuucuaa	caagauggau	augaccuucu	cuaagcaaaa	ugcagucgug	4920
cguucugaau	aucaggcuga	uuacgaguca	uugagguucu	ucagccugcu	uucuggauca	4980
cuaaaauccc	auggucuuu	guuauaugcu	gacauuuuag	gcacugacaa	aaauaaauag	5040
ggugcucaca	aggcgacacu	aaggauuggc	caagauggaa	uaucuaccag	ugcaacgacc	5100
aaucugaagu	guagucuccu	ggugcuggag	aaugagcuga	augcagagcu	uggccucucu	5160
ggggcaucua	ugaaauuaac	aaacaauggc	cgcuucaggg	aacacaaugc	aaaauucagu	5220
cuggauggga	aagccgccc	cacagagcua	ucacugggaa	gugcuuauca	ggccaugauu	5280
cugggugucg	acagcaaaaa	cauuuucac	uucaaggguca	gucaagaagg	acuuuagcuc	5340
ucaaaugaca	ugaugggcuc	auaugcugaa	augaaaauug	accacacaaa	cagucugaac	5400
auugacagcu	uauacugga	cuucucuuca	aaacuugaca	acauuuacag	cucugacaag	5460
uuuuauaagc	aaacuguuua	uuuacagcua	cagcccuauu	cucugguaac	uacuuuaaac	5520
agugaccuga	aaauacaugc	ucuggaucuc	accaacaau	ggaaacuacg	gcuagaacc	5580
cugaagcugc	auguggcugg	uaaccuaaaa	ggagccuacc	aaaauaauga	aaauaaacac	5640
aucuaugcc	ucucuuucg	ugccuuuaca	gcaagcuaua	aagcagacac	uguugcuuag	5700
guucagggug	uggaguuuag	ccaucggcuc	aacacagaca	ucgucgggcu	ggcuucagcc	5760
auugacaua	gcacaaacua	uaauucagac	ucacugcauu	ucagcaaugu	cuuccguucu	5820
guuauaggcc	cguuuaccu	gacacugau	gcacauacaa	auggcaauug	gaaacucgcu	5880
cucuggggag	aaauacugc	gcagcuuau	agcaaaaucc	uguugaaagc	agaaccucug	5940
gcuuuacuu	ucucucuga	uuacaaaggc	uccacaaguc	aucaucucgu	gucuaaggaa	6000
agcaucagug	cagcucuuu	acacaaaguc	agugcccugc	uuacuccagc	ugagcagaca	6060
ggcaccugga	aacucaagac	ccauuuuac	aaauuugaau	acagccagga	cuuggaugcu	6120

uacaacacua	aagauaaaau	uggcguggag	cuuacuggac	gaacucuggc	ugaccuaacu	6180
cuacuagacu	ccccauuaa	agugccacuu	uuacucagug	agcccauca	uaucauugau	6240
gcuuuagaga	ugagagaugc	cguugagaag	ccccagaau	uuacaaugu	ugcuuuugua	6300
aaguaugaua	aaaaccaaga	uguucacucc	auuaaccucc	cauuuuuuga	gaccuugcaa	6360
gaauauuuug	agaggaaucg	acaacccauu	auaguuguag	uggaaaacgu	acagagaaac	6420
cugaagcaca	ucaauauuga	ucauuuugua	agaaaauaca	gagcagcccu	gggaaaacuc	6480
ccacagcaag	cuaaugauua	ucugaauuca	uucaauuggg	agagacaagu	uucacaugcc	6540
aaaggagaaac	ugacugcucu	cacaaaaaag	uauagaauua	cagaaaauga	uauacaaauu	6600
gcauuagaug	augccaaaau	caacuuuaau	gaaaaacua	cucaacugca	gacauauaug	6660
auacaauuug	aucaguauau	uaaagauagu	uauaguuuac	augauuugaa	aaugcuaauu	6720
gcuaauauua	uugaugaaau	cauugaaaaa	uuaaaaaguc	uugaugagca	cuaucauauc	6780
cguuuaaaau	uaguaaaaac	aauccaugau	cuacauuugu	uuauugaaaa	uauugauuuu	6840
aacaaaagug	gaaguaguac	ugcauccugg	auucaaaaug	uggauacuaa	guaccaaauc	6900
agaauccaga	uacaagaaaa	acugcagcag	cuuaagagac	acauacagaa	uauagacauc	6960
cagcaccuag	cuggaaaguu	aaaacaacac	auugaggcua	uugauguuag	agugcuuuua	7020
gaucaauggg	gaacuacaau	uucuuuugaa	agaauaaaug	auguucuuga	gcaugucaaa	7080
cacuuuguaa	uaauucuuau	uggggauuuu	gaaguagcug	agaaaaucua	ugccuucaga	7140
gccaaagucc	augaguuaau	cgagagguau	gaaguagacc	aacaaaacca	gguuuuaaug	7200
gauaaaauag	uagaguugac	ccaccaauac	aaguugaagg	agacuauuca	gaagcuuagc	7260
aauguccuac	aacaaguuaa	gauaaaagau	uacuugagaa	aauggguugg	auuuauugau	7320
gaugcuguga	agaagcuuaa	ugaauuaacu	uuuaaaacau	ucauuugaaga	uguuuaacaaa	7380
uuccuugaca	uguugauaaa	gaaauuaaag	ucauuugauu	accaccaguu	uguagaugaa	7440
accaaugaca	aaauccguga	ggugacucag	agacucuaug	gugaaauuca	ggcucuggaa	7500
cuaccacaaa	aaugcuagac	auuaaaacug	uuuuuagagg	aaaccaaggc	cacaguugca	7560
guguauucug	aaagccuaca	ggacacccaa	auaaccuuaa	ucaucaauug	guuacaggag	7620
gcuuuuaguu	cagcaucuuu	ggcucacaug	aaggccaaa	uccgagagac	ucuagaagau	7680
acacgagacc	gaugguauca	aaugggacuu	cagcagggaac	uucacacgaa	ccugcucug	7740
guaggccagg	uuuuuagcac	acuuugcacc	uacauuucug	auugggugac	ucuugcugcu	7800
aagaaccuua	cugacuuugc	agagcaauau	ucuaucuaag	auugggcuua	acguauugaa	7860
gcauugguag	agcaaggguu	cacuguuucc	gaaaucaaga	ccauccuugg	gaccaugccu	7920
gccuuugaag	ucagucuuca	ggcucuucag	aaagcuaccu	uccagacacc	ugauuuuaa	7980
gucccccuaa	cagauuugag	gauuccauca	guucagauaa	acuucuaaga	cuuaaaaaau	8040
auaaaaaucc	cauccagguu	uuccacacca	gaaauuacca	uccuuuacac	uuccacauu	8100
ccuuuccuuu	caauugacuu	ugucgaaug	aaaguuuaaga	ucaucagaac	cauugaccag	8160
augcagaaca	gugagcugca	guggcccggu	ccagauauau	aucucaggga	ucugaaggug	8220
gaggacaauc	cucuagcgag	aaucaccucg	ccagacuucc	guuuaccaga	aaucgcauu	8280
ccagaauuca	uaaucccaac	ucucaaccuu	aaugauuuuc	aaguuccuga	ccuucacaua	8340
ccagaauucc	agcuucccca	caucucacac	acaauguag	uaccuacuuu	uggcaagcua	8400
uacaguauuc	ugaaaaucca	aucuccucuu	uucacauuag	augcaauugc	ugacauaggg	8460
aauggaacca	ccucagcaaa	cgaagcaggu	aucgcagcuu	ccaucacugc	caaaggagag	8520
uccaaaauag	aaguucuaa	uuuuuaguuu	caagcaaaug	cacaacucuc	aaaccuuaag	8580
auuaauccgc	uggcucugaa	ggagucagug	aaguucucca	gcaaguaccu	gagaacggag	8640
caugggagug	aaaugcuguu	uuuuggaaau	gcuauugagg	gaaaaucaaa	cacaguggca	8700
aguuuacaca	cagaaaaaaa	uacacuggag	cuuaguuuag	gagugauugu	caagauaaac	8760
aaucagcuua	cccuggauag	caacacuaaa	uacuuccaca	aaugaacau	ccccaaacug	8820
gacuuucua	gucaggcuga	ccugcgcaac	gagaucaaga	cacuguugaa	agcuggccac	8880
auagcaugga	cuucuuucug	aaaaggguca	uggaaauggg	ccugccccag	auucucagau	8940
gagggaacac	augaaucaca	aaauaguuuu	accuagaag	gacccucac	uuccuuugga	9000
cuguccaaua	agaucuuuag	caaacaccua	agaguuaacc	aaaacuuggu	uuauagaucu	9060
ggcuuccuca	acuuuucuaa	acuugaaauu	cauucacaag	ucgauuccca	gcaugugggc	9120
cacaguguuc	uaacugcuua	aggcauggca	cuguuuggag	aagggaaggc	agaguuuacu	9180
gggagggaug	augcucauuu	aaaugggaa	guuauuggaa	cuuugaaaaa	uucucuuuu	9240
uuuucagccc	agccauuuga	gaucacggca	uccacaaaca	augaaggggaa	uuugaaaguu	9300
cguuuuccau	uaagguuaac	agggaagaua	gacuuccuga	auaacuauug	acuguuucug	9360
agucccagug	cccagcaagc	aaguuggcaa	guaagugcua	gguucaauca	guauaaguac	9420
aacaaaaauu	ucucugcug	aaacaacgag	aacauuaugg	aggcccaugu	aggauuaauu	9480
ggagaagcaa	aucuggauuu	cuuaaacaau	ccuuuaacaa	uuccugaaa	gcgcuuaccu	9540
uacacaauaa	ucacaacucc	uccacugaaa	gauuucucuc	uaugggaaaa	aacaggcuug	9600
aaaggauuuc	ugaaaaacgac	aaagcaauca	uuugauuuua	guguaaaaag	ucaguauaag	9660
aaaaaacaac	agaggcauuc	caucacaaau	ccuuuggcug	ugcuuuguga	guuuuacagu	9720
cagagcauca	aauccuuuga	caggcauuuu	gaaaaaaaca	gaaacaauug	auuagauuuu	9780
gucaccaaau	ccuauaauuga	aacaaaaauu	aaguuuugaua	aguacaaagc	ugaaaaauuc	9840
cacgacgagc	uccccaggac	cuuucaaaau	ccuggauuaca	cuguuccagu	ugucuuuugu	9900
gaagugucuc	cauucaccau	agagaugucg	gcauucggcu	augguuuccc	aaaagcaguc	9960
agcaugccua	guuucuccau	ccuagguucu	gacguccgug	ugccuucuaa	cacauuaaau	10020

cugccauc	uagagcugcc	aguccuuc	gucccuaga	aucucaagc	uucucuucca	10080
cauuucaagg	aaugugugac	cauaagccau	auuuuuauuc	cugccauggg	caauauuacc	10140
uagauuuuc	ccuuuaaau	aagugucauc	acacugaa	ccaauugc	acuuuuuac	10200
cagucagaua	uuguugcuca	ucuccuuuc	ucaucuuc	cugucauuga	ugcacugcag	10260
uacaaaauag	agggcaccac	aagauugaca	agaaaaagg	gauugaaguu	agccacagcu	10320
cugucucuga	gcaacaaaau	uguggagggu	agucauaaca	guacugugag	cuuaaccacg	10380
aaaaauaugg	aagugucagu	ggcaaaaacc	acaaaagccg	aaauuccaau	uuugagaau	10440
aauuucaagc	aagaacuaa	uggaaauacc	aagucaaaac	cuacugucuc	uuccuccaug	10500
gaauuuagu	augauuucaa	uucuuaaau	cuguacucua	ccgcuaaagg	agcaguugac	10560
cacaagcuua	gcuuggaaa	ccucaccucu	uacuuuucca	uugagucauc	uaccaaagga	10620
gaugucaagg	guucggguuc	uucucgggaa	uaauucagg	cuauugcuag	ugaggccaac	10680
acuuacuuga	auuccaagag	cacacggguc	ucagugaagc	ugcaggggcac	uuccaaaaau	10740
gaugauaucu	ggaaccuuga	aguaaaagaa	aaauuugcug	gagaagccac	acuccaacgc	10800
auauauucc	ucugggagca	caguacgaaa	aaccacuuac	agcuagaggg	ccucuuuuuc	10860
accaacggag	caauacaag	caaagccacc	uggaaccucu	cuccauggca	agcagucucu	10920
cuuguucagg	uccaugcaag	ucagcccagu	uccuuccaug	auuucccuga	ccuuggccag	10980
gaaguggccc	ugaauugcua	cacuaagaac	cagaagauca	gauggaaaa	ugaaguccgg	11040
auucauucug	ggucuuuucca	gagccagguc	gagcuuuucca	augaccaaga	aaaggcacac	11100
cuugacaau	caggauccuu	agaaggacac	cuaagggucc	ucaaaaaau	cauccuacca	11160
gucuaugaca	agagcuuaug	ggauuuuccu	aagcuggaug	uaaccaccag	cauugguagg	11220
agacagcauc	uucguguuuc	aacugccuuu	guguacacca	aaaacccca	uggcuauuca	11280
uuccuccauc	cuguaaaaagu	uuuggcugau	aaauuccaua	cuccugggcu	gaaacuaaa	11340
gaucuaaaau	caguucuuugu	caugccuacg	uuccaugucc	cauuuacaga	ucuuacaggu	11400
ccaucgugca	aacuugacu	cagagaaaua	caaaucuaa	agaagcugag	aacuucaca	11460
uuugcccuca	accuaccaac	acuccccgag	guaaaauucc	cugaaguuuga	uguguuaaca	11520
aaauauucuc	aaccagaaga	cuccuugauu	ccuuuuuuug	agauaaccgu	gccugaaucu	11580
caguuuacug	ugucccaguu	cacgcuucca	aaaaguguuu	cagauggcau	ugcugcuuug	11640
gaucuaaaug	caguagccaa	caagaucgca	gacuuugagu	ugcccaccau	caucgugccu	11700
gagcagacca	uugagauucc	cuccauuaag	uucucugua	cugcuggaau	ugucauuccu	11760
uccuuucaag	cacugacugc	acgcuuugag	guagacucuc	ccguguauaa	ugccacuugg	11820
agugccaguu	ugaaaaacaa	agcagauuau	guugaaacag	uccuggauuc	cacaugcagc	11880
ucaaccguac	aguuccuaga	auaugaacua	aauguuuug	gaacacacaa	aaucgaagau	11940
gguacguuag	ccucuaagac	uaaagggaaca	cuugcacacc	gugacuucag	ugcagaaau	12000
gaagaagaug	gcaaaauuga	aggacuucag	gaauuggaag	gaaaagcgca	ccucaauauc	12060
aaaagcccag	cguuaccga	ucuccaucug	cguuaccaga	aagacaagaa	aggcauccuc	12120
accucagcag	ccuccccagc	cguaggcacc	gugggcaugg	auauggauga	agaugacgac	12180
uuuucuaaa	ggaacuucua	cuacagcccu	caguccucuc	cagauaaaa	acucaccaua	12240
uucaaaacug	aguugagggu	ccgggaaucu	gaugaggaaa	cucagaucua	aguuaauug	12300
gaagaagagg	cagcuucug	cuugcuuacc	ucucugaaa	acaacgugcc	caaggccaca	12360
gggguccuuu	augauuau	caacaaguac	cacugggaa	acacagggcu	caccucagag	12420
gaagugucuu	caaagcugag	aagaaucug	cagaacaag	cugagugggu	uuaucaagg	12480
gccaauaggc	aaauugauga	uaucgagug	agguuccaga	aagcagccag	uugcaccacu	12540
gggaccuacc	aagaguggaa	ggacaaggcc	cagaauucgu	accaggaa	guugacucag	12600
gaaggccaag	ccaguuuucca	gggacucaag	gauaacgugu	uugauggcuu	gguacgagu	12660
acucaaaaau	uccauaugaa	agucaagcau	cugaaugacu	cacucauuga	uuuucugaac	12720
uuccccagau	uccaguuuucc	ggggaaaccu	gggaauuaca	cuaggaggga	acuuugcacu	12780
auguucuaaa	gggagguagg	gacgguacug	ucccagguau	auucgaaagu	ccauaauggu	12840
ucagaaaaua	uguuuuuccu	uuuccaagac	uaguugauua	cacuuccuuu	cgaguuaagg	12900
aaacauaaac	uaauagaugu	aaucucgaug	uauggggaac	uguugaaaga	uuuaucaaaa	12960
gaagcccaag	agguauuuua	agccauucag	ucucucaaga	ccacagaggu	gcuacguauu	13020
cuucaggacc	uuuuacaauu	cauuuuucca	cuaauagaag	auaacaauua	acagcugaaa	13080
gagaugaaau	uuacuuauc	uaauaaauau	auccaagaug	agaucacac	aaucuucaau	13140
gauuauaucc	cauauuuuu	uaauuuguug	aaagaaaacc	uaugccuuua	ucuucauaag	13200
uucaaugaa	uuauuacaaa	cgagcuucag	gaagcuucuc	aagaguua	gcagauccau	13260
caauacaaua	ugggccuucg	ugaagaauau	uuugauccaa	guauaguugg	cuggcagug	13320
aaauuuauug	aacuugaaga	aaagauaguc	agucugauca	agaaccuugu	aguugcucu	13380
aaggacuucc	auucugaaua	uaugucagu	gccucuaacu	uuacuuccca	acucucaagu	13440
caaguugagc	aaauucugca	cagaaauau	caggaaauuc	uuagcauccu	uaccgaucca	13500
gauggaaaag	ggaaagagaa	gauugcagag	cuuucugcca	cugcucagga	aaauuuuaa	13560
agccaggcca	uugcgacgaa	gaaaauaaau	ucugauuacc	accagcaguu	uagauauaaa	13620
cugcaagauu	uuucagacca	acucucugau	uacauagaaa	aaauuauugc	ugaauccaaa	13680
agaugauug	accuguccau	ucaaaaacuc	acacaauuc	ugauauacau	cacggguua	13740
cugaaaaagc	ugcaaucaac	cacagucaug	aaccccuaca	ugaagcuugc	uccaggagaa	13800
cuuacuauc	uccucuaauu	uuuuuuuaga	aaucuucauu	uaucuuucuu	uuccaaauuga	13860
acuuucacau	agcacagaaa	aaauucaaac	ugccuauauu	gauaaaaacca	uacagugagc	13920

cagccuugca	guaggcagua	gacuauaagc	agaagcacau	augaacugga	ccugcaccaa	13980
agcuggcacc	agggcucgga	aggucucuga	acucagaagg	auggcauuuu	uugcaaguua	14040
aagaaaauca	ggaucugagu	uauuuugcua	aacuuggggg	aggaggaaca	aauaaaugga	14100
gucuuuauug	uguaucaua					14119

<210> 2
 <211> 1503
 <212> ADN
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 2

atgggtgcga	gagcgtcagt	attaagcggg	ggagaattag	atcgatggga	aaaaattcgg	60
ttaaggccag	ggggaaagaa	aaaatataaa	ttaaaacata	tagtatgggc	aagcagggag	120
ctagaacgat	tgcaggttaa	tcctggcctg	ttagaacat	cagaaggctg	tagacaaata	180
ctgggacagc	tacaaccatc	ccttcagaca	ggatcagaag	aacttagatc	attatataat	240
acagtagcaa	ccctctattg	tgtgcatcaa	aggatagaga	taaaagacac	caagggaagct	300
ttagacaaga	tagaggaaga	gcaaaacaaa	agtaagaaaa	aagcacagca	agcagcagct	360
gacacaggac	acagcaatca	ggtcagccaa	aattacccta	tagtgcagaa	catccagggg	420
caaattggtac	atcaggccat	atcacctaga	acttttaaatg	catgggtaaa	agtagtagaa	480
gagaaggctt	tcagcccaga	agtgatcccc	atgttttcag	cattatcaga	aggagccacc	540
ccacaagatt	taaacaccat	gctaaacaca	gtgggggggac	atcaagcagc	catgcaaatg	600
ttaaaagaga	ccatcaatga	ggaagctgca	gaatgggata	gagtgcattc	agtgcattgca	660
gggcctattg	caccaggcca	gatgagagaa	ccaaggggaa	gtgacatagc	aggaactact	720
agtacccttc	aggaacaaat	aggatggatg	acaaataatc	cacctatccc	agtaggagaa	780
atttataaaa	gatggataat	cctgggatta	aataaaatag	taagaatgta	tagccctacc	840
agcattctgg	acataagaca	aggaccaaa	gaacccttta	gagactatgt	agaccgggtc	900
tataaaaactc	taagagccga	gcaagcttca	caggagggtaa	aaaattggat	gacagaaaacc	960
ttgttgggtc	aaaatgcgaa	cccagattgt	aagactattt	taaaagcatt	gggaccagcg	1020
gctacactag	aagaaatgat	gacagcatgt	caggagtag	gaggaccccg	ccataaggca	1080
agagtttttg	ctgaagcaat	gagccaagta	acaaattcag	ctaccataat	gatgcagaga	1140
ggcaatttta	ggaaccaaag	aaagattgtt	aagtgtttca	attgtggcaa	agaagggcac	1200
acagccagaa	attgcagggc	ccctaggaaa	aagggctgtt	ggaaatgtgg	aaaggaagga	1260
caccaaataga	aagattgtac	tgagagacag	gctaattttt	taggggaagat	ctggccttcc	1320
tacaagggaa	ggccagggaa	ttttcttcag	agcagaccag	agccaacagc	cccaccagaa	1380
gagagcttca	ggtctgggg	agagacaaca	actccccctc	agaagcagga	gccgatagac	1440
aaggaactgt	atcctttaac	ttccctcagg	tcactctttg	gcaacgaccc	ctcgtcacia	1500
taa						1503

<210> 3
 <211> 261
 <212> ADN
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 3

atggagccag	tagatcctag	actagagccc	tggaagcatc	cagggaagtca	gcctaaaact	60
gcttgtacca	attgctattg	taaaaagtgt	tgctttcatt	gccaagtttg	tttcataaca	120
aaagccttag	gcatctccta	tggcaggaag	aagcggagac	agcgacgaag	agctcatcag	180
aacagtcaga	ctcatcaagc	ttctctatca	aagcaaccca	cctcccaacc	ccgagggggac	240
ccgacaggcc	cgaaggaata	g				261

<210> 4
 <211> 2571
 <212> ADN
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 4

atgagagtga aggagaaata tcagcacttg tggagatggg ggtggagatg gggcaccatg 60
ctccttgagg tgttgatgat ctgtagtgtc acagaaaaat tgtgggtcac agtctattat 120
ggggtacctg tgtggaagga agcaaccacc actctatctt gtgcatcaga tgctaaagca 180
tatgatacag aggtacataa tgtttgggcc acacatgcct gtgtaccac agacccaac 240
ccacaagaag tagtattggg aaatgtgaca gaaaatttta acatgtggaa aaatgacatg 300
gtagaacaga tgcattgagg tataatcagt ttatgggatc aaagcctaaa gccatgtgta 360
aaattaaccc cactctgtgt tagtttaag tgcactgatt tgaagaatga tactaatacc 420

aatagtagta gcgggagaat gataatggag aaaggagaga taaaaaactg ctctttcaat 480
atcagcacia gcataagagg taagggtgcag aaagaatatg cttttttta taaacttgat 540
ataataccaa tagataatga tactaccagc tataagttga caagttgtaa cacctcagtc 600
attacacagg cctgtccaaa ggtatccttt gagccaattc ccatacatta ttgtgccccg 660
gctggttttg cgattctaaa atgtaataat aagacgttca atggaacagg accatgtaca 720
aatgtcagca cagtacaatg tacacatgga attaggccag tagtacaac tcaactgctg 780
ttaaatggca gtctagcaga agaagaggta gtaattagat ctgtcaattt caggacaatt 840
gctaaaacca taatagtaca gctgaacaca tctgtagaaa ttaattgtac aagacccaac 900
aacaatacaa gaaaaagaat ccgtatccag agaggaccag ggagagcatt tgttacaata 960
ggaaaaatag gaaatatgag acaagcacat tgtaacatta gtagagcaaa atggaataac 1020
actttaaaac agatagctag caaattaaga gaacaatttg gaaataataa aacaataatc 1080
tttaagcaat cctcaggagg ggaccagaa attgtaacgc acagttttta ttgtggaggg 1140
gaatttttct actgtaattc aacacaactg tttaatatga cttggtttaa tagtacttgg 1200
agtactgaag ggtcaaataa cactgaagga agtgacacaa tcaccctccc atgcagaata 1260
aaacaaatta taacatgtg gcagaaagta ggaaaagcaa tgtatgcccc tcccatcagt 1320
ggacaaatta gatgttcac aaatattaca gggctgctat taacaagaga tgggtggaat 1380
agcaacaatg agtccgagat cttcagacct ggaggaggag atatgaggga caattggaga 1440
agtgaattat ataaatataa agtagtaaaa attgaacct taggagtagc accaccaag 1500
gcaaagagaa gagtgggtga gagagaaaaa agagcagtg gaataaggag ttgttcctt 1560
gggttcttgg gagcagcagg aagcactatg ggcgcagcct caatgacgct gacggtagag 1620
gccagacaat tattgtctgg tatagtgcag cagcagaaca atttgctgag ggctattgag 1680
gcgcaacagc atctgttgca actcacagtc tggggcatca agcagctcca ggcaagaatc 1740
ctggctgtgg aaagatacct aaaggatcaa cagctcctgg ggatttgggg ttgctctgga 1800
aaactcattt gcaccactgc tgtgccttgg aatgctagtt ggagtaataa atctctggaa 1860
cagatttgga atcacacgac ctggatggag tgggacagag aaattaacaa ttacacaagc 1920
ttaatacact ccttaattga agaatcgcaa aaccagcaag aaaagaatga acaagaatta 1980
ttggaattag ataaatgggc aagtttgtgg aatttggttta acataacaaa ttggctgtgg 2040
tatataaaat tattcataat gatagtagga ggcttggtag gtttaagaat agtttttgtc 2100
gtactttcta tagtgaatag agttaggcag ggatattcac cattatcgtt tcagaccac 2160
ctcccaacc cgaggggacc cgacaggccc gaaggaatag aagaagaagg tggagagaga 2220
gacagagaca gatccattcg attagtgaac ggatccttgg cacttatctg ggacgatctg 2280
cggagcctgt gcctcttcag ctaccaccgc ttgagagact tactcttgat tgtaacgagg 2340
attgtggaac ttctgggacg cagggggtgg gaagccctca aatattggtg gaatctccta 2400
cagtattgga gtcaggaact aaagaatagt gctgttagct tgctcaatgc cacagccata 2460
gcagtagctg aggggacaga tagggttata gaagtagtac aaggagcttg tagagctatt 2520
cgccacatac ctagaagaat aagacagggc ttggaaagga ttttgctata a 2571

5 <210> 5
<211> 4308
<212> ADN
<213> Virus de la inmunodeficiencia humana

10 <400> 5

ES 2 804 764 T3

```

atgggtgcga gagcgtcagt attaagcggg ggagaattag atcgatggga aaaaattcgg 60
ttaaggccag ggggaaagaa aaaatataaa ttaaaacata tagtatgggc aagcagggag 120
ctagaacgat tcgcagttaa tcctggcctg ttagaaacat cagaaggctg tagacaaata 180
ctgggacagc tacaaccatc ccttcagaca ggatcagaag aacttagatc attatataat 240
acagtagcaa ccctctattg tgtgcatcaa aggatagaga taaaagacac caaggaagct 300
ttagacaaga tagaggaaga gcaaaacaaa agtaagaaaa aagcacagca agcagcagct 360
gacacaggac acagcaatca ggtcagccaa aattacccta tagtgcagaa catccagggg 420
caaatggtac atcaggccat atcacctaga actttaaatg catgggtaaa agtagtagaa 480
gagaaggctt tcagcccaga agtgataccc atgttttcag cattatcaga aggagccacc 540
ccacaagatt taaacaccat gctaaacaca gtggggggac atcaagcagc catgcaaattg 600
ttaaaagaga ccatcaatga ggaagctgca gaatgggata gagtgcattc agtgcattgca 660
gggcctattg caccaggcca gatgagagaa ccaaggggaa gtgacatagc aggaactact 720
agtacccttc aggaacaaat aggatggatg acaataatc cacctatccc agtaggagaa 780
atttataaaa gatggataat cctgggatta aataaaatag taagaatgta tagccctacc 840
agcattctgg acataagaca aggaccaaag gaacccttta gagactatgt agaccggttc 900
tataaaactc taagagccga gcaagcttca caggaggtaa aaaattggat gacagaaacc 960
ttgttggtcc aaaatgcgaa cccagattgt aagactatct taaaagcatt gggaccagcg 1020
gctacactag aagaaatgat gacagcatgt caggagtag gaggaccgg ccataaggca 1080
agagttttgg ctgaagcaat gagccaagta acaaattcag ctaccataat gatgcagaga 1140
ggcaatttta ggaaccaaaag aaagattggt aagtgtttca attgtggcaa agaagggcac 1200
acagccagaa attgcagggc ccctaggaaa aagggctgtt ggaaatgtgg aaaggaagga 1260
caccaaatga aagattgtac tgagagacag gctaattttt taagggaaga tctggccttc 1320

```

ctacaagggga	aggccagggga	atthttcttca	gagcagacca	gagccaacag	ccccaccaga	1380
agagagcttc	aggtctgggg	tagagacaac	aactccccct	cagaagcagg	agccgataga	1440
caaggaactg	tatcctttta	cttccctcag	gtcactcttt	ggcaacgacc	cctcgtcaca	1500
ataaagatag	gggggcaact	aaaggaagct	ctattagata	caggagcaga	tgatacagta	1560
ttagaagaaa	tgagtttgcc	aggaagatgg	aaaccaaaaa	tgataggggg	aattggaggt	1620
tttatcaaag	taagacagta	tgatcagata	ctcatagaaa	tctgtggaca	taaagctata	1680
ggtacagtat	tagtaggacc	tacacctgtc	aacataattg	gaagaaatct	gttgactcag	1740
attgggttga	ctttaaattt	tcccattagc	cctattgaga	ctgtaccagt	aaaatttaaag	1800
ccaggaatgg	atggcccaaa	agttaaacia	tggccattga	cagaagaaaa	aataaaaagca	1860
ttagtagaaa	tttgtacaga	gatggaaaag	gaagggaaaa	tttcaaaaat	tgggcctgaa	1920
aatccatata	atactccagt	atthggcata	aagaaaaaag	acagtactaa	atggagaaaa	1980
ttagtagatt	tacagagaact	taataagaga	actcaagact	tctgggaagt	tcaattagga	2040
ataccacatc	ccgcagggtt	aaaaaagaaa	aaatcagtaa	cagtactgga	tgtgggtgat	2100
gcatatthtt	cagttccctt	agatgaagac	ttcagggaagt	atactgcatt	taccatacct	2160
agtataaaca	atgagacacc	agggattaga	tatcagtaca	atgtgcttcc	acagggatgg	2220
aaaggatcac	cagcaatatt	ccaaagtagc	atgacaaaaa	tcttagagcc	ttttagaaaa	2280
caaaatccag	acatagttat	ctatcaatac	atgggatgatt	tgatgttagg	atctgactta	2340
gaaatagggc	agcatagaac	aaaaatagag	gagctgagac	aacatctgtt	gaggtgggga	2400
cttaccacac	cagacaaaaa	acatcagaaa	gaacctccat	tcctttggat	gggttatgaa	2460
ctccatcctg	ataaatggac	agtacagcct	atagtgtctg	cagaaaaaga	cagctggact	2520
gtcaatgaca	tacagaagtt	agtggggaaa	ttgaattggg	caagtcagat	ttaccagggg	2580
attaaagtaa	ggcaattatg	taaactcctt	agaggaacca	aagcactaac	agaagtaata	2640
ccactaacag	aagaagcaga	gctagaactg	gcagaaaaaca	gagagattct	aaaagaacca	2700
gtacatggag	tgtattatga	cccatcaaaa	gacttaatat	cagaaatata	gaagcagggg	2760
caaggccaat	ggacatatca	aattttatcaa	gagccattta	aaaatctgaa	aacaggaaaa	2820
tatgcaagaa	tgaggggtgc	ccacactaat	gatgtaaaac	aattaacaga	ggcagtgcaa	2880
aaaataacca	cagaaagcat	agtaatatgg	ggaaagactc	ctaaatttaa	actgcccata	2940
aaaaggaaa	catgggaaac	atggtggaca	gagtattggc	aagccacctg	gattccttag	3000
tgaggagtth	ttaatacccc	tcctttagtg	aaattatggg	accagttaga	gaaagaaccc	3060
atagtaggag	cagaaacctt	ctatgtagat	ggggcagcta	acagggagac	taaattagga	3120
aaagcaggat	atgttactaa	tagaggaaga	caaaaagttg	tcaccctaac	tgacacaaca	3180
aatcagaaga	ctgagttaca	agcaatttat	ctagctttgc	aggattcggg	attagaagta	3240
aacatagtaa	cagactcaca	atatgcatta	ggaatcattc	aagcacaacc	agatcaaagt	3300
gaatcagagt	tagtcaatca	aataatagag	cagttataaa	aaaaggaaaa	ggtctatctg	3360
gcatgggtac	cagcacacaa	aggaattgga	ggaaatgaac	aagtagataa	attagtcagt	3420
gctggaatca	ggaaagtact	atthtttagat	ggaaatagata	aggcccaaga	tgaacatgag	3480
aaatatcaca	gtaattggag	agcaatggct	agtgtattta	acctgccacc	tgtagtagca	3540
aaagaaatag	tagccagctg	tgataaatgt	cagctaaaaa	gagaagccat	gcatggacaa	3600
ctgagctgta	gtccaggaat	atggcaacta	gattgtacac	atttagaagg	aaaagttatc	3660
ctggtagcag	ttcatgtagc	cagtggatat	atagaagcag	aagttattcc	agcagaaaca	3720
gggcaggaaa	cagcatatth	tctthttaaa	ttagcaggaa	gatggccagt	aaaaacaata	3780
catactgaca	atggcagcaa	tttcaccggt	gctacggtta	gggccgcctg	ttggtgggcg	3840
ggaatcaagc	aggaattttg	aattccctac	aatccccaaa	gtcaaggagt	agtagaatct	3900
atgaataaag	aattaaagaa	aattatagga	caggtaagag	atcaggctga	acatcttaag	3960
acagcagtac	aaatggcagt	attcatccac	aattthtaaa	gaaaaggggg	gattgggggg	4020
tacagtgcag	gggaaagaat	agtagacata	atagcaacag	acatacaaac	taaagaatta	4080
caaaaacaaa	ttacaaaaat	tcaaaattht	cgggtttatt	acagggacag	cagaaatcca	4140
ctthggaaa	gaccagcaaa	gtcctctctg	aaaggtgaag	gggcagtagt	aatacaagat	4200
aatagtgcac	taaaagtagt	gccaagaaga	aaagcaaaag	tcattaggga	ttatggaaaa	4260
cagatggcag	gtgatgattg	tgtggcaagt	agacaggatg	aggattag		4308

<210> 6

<211> 579

<212> ADN

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 6

atggaaaaca	gatggcaggt	gatgattgtg	tggcaagtag	acaggatgag	gattagaaca	60
tggaaaagtt	tagtaaaaca	ccatatgtat	gtttcagggg	aagctagggg	atggttttat	120
agacatcact	atgaaagccc	tcatccaaga	ataagttcag	aagtacacat	cccactaggg	180
gatgctagat	tggtaataac	aacatattgg	ggtctgcata	caggagaaag	agactggcat	240
ttgggtcagg	gagtctccat	agaatggagg	aaaaagagat	atagcacaca	agtagaccct	300
gaactagcag	accaactaat	tcatctgtat	tactttgact	gtttttcaga	ctctgctata	360
agaaaggcct	tattaggaca	catagttagc	cctaggtgtg	aatatcaagc	aggacataac	420
aaggtaggat	ctctacaata	cttggcacta	gcagcattaa	taacacccaa	aaagataaag	480
ccacctttgc	ctagtgttac	gaaactgaca	gaggatagat	ggaacaagcc	ccagaagacc	540
aaggggccaca	gaggggagcca	cacaatgaat	ggacactag			579

5 <210> 7
 <211> 621
 <212> ADN
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

10 <400> 7

atgggtggca	agtggcctaaa	aagtagtgtg	attggatggc	ctactgtaag	ggaaagaatg	60
agacgagctg	agccagcagc	agataggggtg	ggagcagcat	ctcgagacct	ggaaaaacat	120
ggagcaatca	caagtagcaa	tacagcagct	accaatgctg	cttgtgcctg	gctagaagca	180
caagaggagg	aggaggtggg	ttttccagtc	acacctcagg	tacctttaag	accaatgact	240
tacaaggcag	ctgtagatct	tagccacttt	ttaaaagaaa	aggggggact	ggaagggcta	300
attcactccc	aaagaagaca	agatatcctt	gatctgtgga	tctaccacac	acaaggctac	360
ttccctgatt	agcagaacta	cacaccaggg	ccaggggtca	gatatccact	gacctttgga	420
tgggtgctaca	agctagtacc	agttgagcca	gataagatag	aagaggccaa	taaaggagag	480
aacaccagct	tgttacaccc	tgtgagcctg	catgggatgg	atgaccgga	gagagaagtg	540
ttagagtgga	ggtttgacag	ccgcctagca	tttcatcacg	tggcccgaga	gctgcatccg	600
gagtacttca	agaactgctg	a				621

15 <210> 8
 <211> 721
 <212> ARN
 <213> *Aequorea victoria*

20 <400> 8

auggugagca	agggcgagga	gcuguucacc	gggguggugc	ccauccuggu	cgagcuggac	60
ggcgacguaa	acggccacaa	guucagcgug	uccggcgagg	gcgagggcga	ugccaccuac	120
ggcaagcuga	cccugaaguu	caucugcacc	accggcaagc	ugcccugucc	cuggccacc	180
cucgugacca	cccugaccua	cggcgugcag	ugcuucagcc	gcuaccccga	ccacaugaag	240
cagcacgacu	ucuucaaguc	cgccaugccc	gaaggcuacg	uccaggagcg	caccaucuuc	300
uucaaggacg	acggcaacua	caagacccgc	gccgagguga	aguucgaggg	cgacaccucg	360
gugaaccgca	ucgagcugaa	gggcaucgac	uucaaggagg	acggcaacau	ccuggggcac	420
aagcuggagu	acaacuacaa	cagccacaac	gucuauauca	uggccgacaa	gcagaagaac	480
ggcaucaagg	ugaacuucua	gauccgccac	aacaucgagg	acggcagcgu	gcagcucgcc	540
gaccacuacc	agcagaacac	ccccaucggc	gacggccccg	ugcugcugcc	cgacaaccac	600
uaccugagca	cccaguccgc	ccugagcaaa	gaccccaacg	agaagcgcg	ucacaugguc	660
cugcuggagu	ucgugaccgc	cgccgggauc	acucucggca	uggacgagcu	guacaaguaa	720
a						721

25 <210> 9
 <211> 9262
 <212> ARN
 <213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 9

gucucucug	uuagaccaga	ucugagccug	ggagcucucu	ggcuaacuag	ggaacccacu	60
gcuuaagccu	caauaaagcu	ugccuugagu	gcuucaagua	gugugugccc	gucuguugug	120
ugacucuggu	aacuagagau	cccucagacc	cuuuuaguca	guguggaaaa	ucucuagcag	180
uggcgccccga	acagggacau	gaaagcgaaa	gggaaaccag	aggagcucuc	ucgacgcagg	240
acucggcuug	cugaagcgcg	cacggcaaga	ggcgaggggc	ggcgacuggu	gaguacgcca	300
aaaauuuga	cuagcggagg	cuagaaggag	agagaugggu	gcgagagcgu	caguauuuag	360
cgggggaaaa	uuagaucgau	gggaaaaaa	ucgguuuagg	ccagggggaa	agaaaaaua	420
uaauuuaaaa	cauauaguau	gggcaagcag	ggagcuagaa	cgauucgcag	uuauuccugg	480
ccuguuagaa	acaucagaag	gcuguagaca	aaauacugga	cagcuacaac	caucccuuca	540
gacaggauca	gaagaacgua	gaucuuuua	uaauacagua	gcaaccucuc	auugugugca	600
ucaaaggaua	gagauaaaag	acaccaagga	agcuuuagac	aagauagagg	aagagcaaaa	660
caaaaguaag	aaaaaagcac	agcaagcagc	agcugacaca	ggacacagca	gccaggucag	720
ccaaaauuac	ccuauagugc	agaacaacca	ggggcaaaug	guacaucagg	ccauaucacc	780
uagaacuuua	aaugcauggg	uaaaaguagu	agaagagaag	gcuuucagcc	cagaagugau	840
acccauguuu	ucagcauuau	cagaaggagc	caccacacaa	gauuuuuaa	ccaugcuaaa	900
cacagugggg	ggacaucaag	cagccaugca	aauguuuaaa	gagaccauca	augaggaagc	960
ugcagaaugg	gauagagugc	auccagugca	ugcagggccu	auugcaccag	gccagaugag	1020
agaaccaagg	ggaagugaca	uagcaggaac	uacuaguacc	cuucaggaac	aaauaggau	1080

gaugacacau	aauccaccua	ucccaguagg	agaaauucuau	aaaagauugga	uaauccuggg	1140
auuaaaauaaa	auaguaagaa	uguauagccc	uaccagcauu	cuggacauaa	gacaaggacc	1200
aaaggaaacc	uuuagagacu	auguagaccg	auucuaauaaa	acucuaagag	ccgagcaagc	1260
uucacaagag	guaaaaaaau	ggaugacaga	aaccuuguug	guccaaaaug	cgaacccaga	1320
uuguaaagacu	auuuuuaaaag	cauuggggacc	aggagcgaca	cuagaagaaa	ugaugacagc	1380
augucagggg	gugggggggac	ccggccauaa	agcaagaagu	uuggcgugaag	caauagagcca	1440
aguaaacaaa	ccagcuacca	uaaugauaca	gaaaggcaau	uuuaggaacc	aaagaaagac	1500
uguuaagugu	uucaauugug	gcaaagaagg	gcacauagcc	aaaaauugca	gggccccuag	1560
gaaaaagggc	uguuggaaaau	guggaaaagg	aggacaccaa	augaaagauu	guacugagag	1620
acaggcuauu	uuuuuagggg	agaucuggcc	uucccacaa	ggaaggccag	ggaaauuuu	1680
ucagagcaga	ccagagccaa	cagccccacc	agaagagagc	uucagguuug	gggaagagac	1740
aacaacuccc	ucucagaagc	aggagccgau	agacaaggaa	cuguaucuu	uagcuucccu	1800
cagaucacuc	uuuggcagcg	accccucguc	acaaauaaga	uaggggggga	auuaauaggaa	1860
gcucuauuag	auacaggagc	agaugauaca	guauuagaag	aaaugaauuu	gccagggaaga	1920
uggaaaccaa	aaaugauagg	gggaauugga	gguuuuauca	aaguaagaca	guaugaucag	1980
auacucauag	aaauucgagg	acauaaaagcu	auagguacag	uauuaguagg	accuacaccu	2040
gucaacauaa	uuggaagaaa	ucuguugacu	cagauuggcu	gcacuuuaaa	uuuucccauu	2100
aguccuauug	agacuguaac	aguaaaaaua	aagccaggaa	uggaugggcc	aaaaguuaaa	2160
caauuggccau	ugacagaaga	aaaaauaaaa	gcauuaguag	aaauuuuagc	agaaauggaa	2220
aaggaaaggaa	aaauuucaaa	aaauugggcu	gaaaauccau	acaauacucc	aguauuugcc	2280
auaaaagaaa	aagacaguac	uaauuggaga	aaauuaguag	auuucagaga	acuuauaag	2340
agaacucaag	auuucuggga	aguucaauua	ggauuaccac	auccugcagg	guuaaaacag	2400
aaaaaauacag	uaacaguacu	ggaugugggc	gaugcauauu	uuucaguucc	cuuagauaaa	2460
gacuucagga	aguauacugc	auuuaccuau	ccuaguauaa	acauagagac	accagggauu	2520
agauaucagu	acaauugucu	uccacaggga	uggaaaaggau	caccagcaau	auuccagugu	2580
agcaugacaa	aaaucuuaga	gccuuuuaga	aaacaaaauc	cagacauagu	caucuaucua	2640
uacaucggaug	auuuuguauu	aggauucugc	uuagaaauag	ggcagcauag	aacaaaaaua	2700
gaggaaacuga	gacaacauuc	guugaggugg	ggauuuacca	caccagacaa	aaaacauacag	2760
aaagaaccuc	cauuccuuug	gaugggguau	gaacuccauc	cugauaaaug	gacaguacag	2820
ccuauagugc	ugccagaaaa	ggacagcugg	acugucaaug	acauacagaa	auuaguggga	2880
aaauugaaau	gggcaaguca	gauuuuagca	gggauuaaag	uaaggcaauu	auguaaacuu	2940
cuuaggggaa	ccaagcacu	aacagaagua	guaccacuaa	cagaagaagc	agagcuagaa	3000
cuggcagaaa	acaggggagau	ucuaaaagaa	ccgguacaug	gaguguauua	ugaccccau	3060
aaagacuuua	uagcagaaau	acagagcagc	gggcaaggcc	aauggacaua	ucaaauuuau	3120
caagagccau	uuaaaaauuc	gaaaacagga	aaguauagca	gaaugaaagg	ugcccacacu	3180
aaugauguga	aacaauuaac	agaggcagua	caaaaaauag	ccacagaaag	cauaguaaua	3240
uggggaaaga	cuccuaaaau	uaaaauaccc	auacaaaagg	aaacauugga	agcauggugg	3300
acagaguauu	ggcaagccac	cuggauuccu	gagugggagu	uugucaauac	cccucccuua	3360
gugaaguauu	gguaccaguu	agagaaagaa	cccauauuag	gagcagaaac	uuucuaugua	3420
gauggggcag	ccaauaggga	aacuaaaaua	ggaaaagcag	gauauguaac	ugacagagga	3480
agacaaauaag	uugucccccu	aacggacaca	acaaauacaga	agacugagu	acaagcauuu	3540
caucuaucuu	ugcaggauuc	gggauuagaa	guaaacauag	ugacagacuc	acaaauagca	3600
uugggaauc	uucaagcaca	accagauaag	agugaauacag	aguauagucag	ucaaaauaau	3660
gagcaguuua	uaaaaaagga	aaaagucua	cuggcauggg	uaccagcaca	caaagggaau	3720
ggaggaaaug	aacaaguaga	uaauuugguc	agugcuggaa	ucaggaaagu	acuaauuuua	3780
gauggaaug	auaaggccca	agaagaacau	gagaaauauc	acaguaauug	gagagcaaug	3840
gcuagugauu	uuuaccuacc	accuguaaga	gcaaaaagaa	uaguagccag	cuguguaaaa	3900
ugucagcuua	aaagggaagc	caugcaugga	caaguagacu	guagcccagg	aaauagggcag	3960
cuagauugua	cacauuuaga	aggaaaaguu	aucuugguag	caguucaugu	agccagugga	4020
uauauagaag	cagaaguaau	uccagcagag	acaggggcaag	aaacagcaua	cuuccucua	4080
aaauuagcag	gaagauggcc	aguaaaaaca	guacauacag	acaauggcag	caauuuccacc	4140
aguacuacag	uuuaggccgc	cuguuggugg	gcggggauca	agcaggaaau	uggcauuccc	4200
uacaaucucc	aaagucaagg	aguauuagaa	ucuaugaaau	agaaauuaaa	gaaaauuua	4260
ggcagguuaa	gagaucaggc	ugaacauuu	agacagcag	uacaaauggc	aguauuucac	4320
cacaaauuuu	aaagaaaagg	ggguuacag	cagggggaaag	aaauagagac	aaauagagac	4380
auaaauagcaa	cagacauaca	aacuaaagaa	uuacaaaaac	aaauuacaaa	aaaucaaaa	4440
uuucggguuu	auuacaggga	cagcagagau	ccaguuuugga	aaggaccagc	aaagcuccuc	4500
uggaaaggug	aaaggggcagu	aguauuacaa	gauaaauagug	acauaaaagu	agugccaaga	4560
agaaaagcaa	agaucaucag	ggauuuagga	aaacagauug	caggugauga	uuugugggca	4620
aguagacagg	augaggauua	acacauaggaa	aagauuagua	aaacaccaua	uguauuuuuc	4680
aaggaaagcu	aaggacuggu	uuuauagaca	ucacuaugaa	aguacuaaac	caaaaauaag	4740
uucagaaagua	cacauccac	uaggggauuc	uaaaauagua	auaacaacau	auugggggcu	4800
gcuaacagga	gaaagagacu	ggcauuuggg	ucaggggaguc	uccauagaau	ggaggaaaaa	4860
gagauauagc	acacaaguag	accugaccu	agcagaccaa	cuaauucauc	ugcacuauuu	4920
uguauuuuuu	ucagaauucg	cuauaagaaa	uaccuauua	ggacguauag	uuaguccuag	4980

gugugaaau	caagcaggac	auaacaaggu	aggauucua	caguacuug	cacuagcagc	5040
auuaauaaa	ccaaaacaga	uaaagccacc	uuugccuagu	guuaggaaac	ugacagagga	5100
cagauggaac	aagccccaga	agaccaaggg	ccacagaggg	agccauacaa	ugaauaggaca	5160
cuagagcuuu	uagaggaacu	uaagagugaa	gcuguuagac	auuuuccuag	gauauggcuc	5220
cauaacuuag	gacaacauau	cuauagaaacu	uacggggaua	cuugggcagg	aguggaagcc	5280
auaaauagaa	uucugcaaca	acugcuguuu	auccauuuc	gaauugggug	ucgacauagc	5340
agaauaggcg	uuacucgaca	gaggagagca	agaaauaggag	ccaguagauc	cuagacuaga	5400
gccccuggaag	cauccaggaa	gucagccuaa	aacugcuugu	accaauugcu	auuguaaaaa	5460
guguugcuuu	cauugccaag	uuuguuuc	acaaaaagcc	uuaggcaucu	ccuauggcag	5520
gaagaagcgg	agacagcgac	gaagaccucc	ucaaggcagu	cagacucauc	aaguuucucu	5580
aucaaaagcag	uaaguaauac	auguaaagca	accuauacaa	auagcaauag	uagcauuagu	5640
aguagcaaua	auaaauagcaa	uaguugugug	guccauagua	aucauagaau	auagggaaaa	5700
auuaagacaa	agaaaaauag	acagguuaau	ugauagacua	auagaaagag	cagaagacag	5760
uggcaaugag	agugaaggag	aaauaucagc	acuuguggag	auggggggug	agauggggca	5820
ccaugcuccu	ugggaugug	augaucugua	gugcuacaga	aaaauugug	gucacagucu	5880
auuauggggu	accugugug	aaggaaagcaa	ccaccacucu	auuuugugca	ucagaugcua	5940
aagcauauga	uacagaggua	cauaaaguuu	gggccacaca	ugccugugua	cccacagacc	6000
ccaacccaca	agaaguagua	uggguaaaug	ugacagaaaa	uuuaaacaug	uggaaaaaug	6060
acaugggaga	acagugcau	acagguuaaa	ucaguuaug	ggaucaaaagc	cuaaagccau	6120
guguaaaauu	aacccacuc	uguguuagu	uaaagugcac	ugauuugaag	aaugauacua	6180
auaccaauag	uaguagcggg	agaugauaa	uggagaagag	agagauaaaa	aacugcucu	6240
ucaauuacag	cacaagcaua	agagguaaag	ugcagaaaga	auaugcauuu	uuuuauaaac	6300
uugauuaau	accaauagau	aaugauacua	ccagcuauac	guugacaagu	uguaacaccu	6360
cagucauuac	acaggccugu	caaaagguau	ccuuugagcc	aaaucccaua	cauuauugug	6420
ccccggcug	uuuugcgau	cuaaaaugua	auaaauagac	guucaauugga	acaggaccu	6480
guacaaaugu	cagcacagua	caauguacac	auggaauuag	gccaguagua	ucaacucaac	6540
ugcuguuaaa	uggcagucua	gcagaagaag	agguaguau	uagauuguc	aauuucacgg	6600
acaauugcua	aaccuaaaua	guacagcuga	acacauugcu	agaaauuaau	uguacaagac	6660
ccaacaacaa	uacaagaaaa	aaaauccgua	uccagagggg	accagggaga	gcauuugua	6720
caauaggaaa	aaugagaaau	augagacaag	cacauuguaa	cauuaguaga	gcacaaugga	6780
augccacuuu	aaaacagaua	gcuagcaauu	uaagagaaca	auuuggaaau	auaaaaacaa	6840
uaauccuuua	gcaauccuca	ggaggggacc	cagaaauugu	aacgcacagu	uuuaauugug	6900
gaggggaaau	uuucuaucug	aaaucaacac	aacuguuuaa	uaguacuugg	uuuaauagua	6960
cuuggaguc	ugaaggguca	aaauacacug	aaggaaugua	cacaaucaca	cucccaugca	7020
gaauaaaaca	auuuauaaac	auguggcagg	aguuaggaaa	agcaauuguau	gccccuccca	7080
ucagcgagaca	aaauagauu	ucaucaaaau	uuacagggcu	gcuauuaaca	agagauuggu	7140
guauuaacaa	caauuggucc	gagauucuua	gaccuggagg	aggagauaug	agggacaaau	7200
ggagaaugua	auuaauuaaa	uaauaaugu	uaaaaaauga	accauuagg	guagcaccu	7260
ccaaggcaaa	gagaagagug	gugcagagag	aaaaaagagc	agugggaaau	ggagcuuugu	7320
uccuuugggu	cuugggagca	gcagggaagca	cuauugggagc	agcgucuaug	acgcugacgg	7380
uacaggccag	acaauuaauug	ucugguauag	ugcagcagca	gaacaauuug	cugagggcua	7440
uugagggcgca	acagcaucug	uugcaacuca	cagucugggg	caucaagcag	cuccaggcaa	7500
gaauccuggc	uguggaaaga	uaccuaaagg	aucaacagcu	ccuggggauu	ugggguuugcu	7560
cuggaaaacu	cauuugcacc	acugcugugc	cuuggaaugc	uaguuggagu	auuaaaucuc	7620
uggaacagau	ugggaauacac	acgaccugga	uggaguggga	cagagaaauu	aacaauuaca	7680
caagcuuaau	acacuccuaa	auugaagaau	cgcaaaacca	gcaagaaaag	aaugaacag	7740
aaauauugga	auuagauaaa	ugggcaaguu	uguggaaauug	guuuuaacaua	acaaauuggc	7800
ugugguauau	aaaauuaauuc	auaaugauag	uaggaggcuu	gguaggguua	agaauaguuu	7860
uugcuguacu	uucuguagug	aaauagauua	ggcagggaau	uucaccauu	ucguuucaga	7920
cccaccuccc	aaucccgagg	ggaccgcaga	ggcccgagg	aaauagagaa	gaagguggag	7980
agagagacag	agacagauc	auucgauuag	ugaacggau	cuuagcacuu	aucugggacg	8040
aucugcgag	ccugugccuc	uucagcuacc	accgcuugag	agacuuauc	uugauuguaa	8100
cgaggauugu	ggaacuucug	ggacgcagg	ggugggaagc	ccuacaaau	ugguggaauc	8160
uccuacaaua	uuggagucag	gagcuuaaga	auagugcugu	uagcuugcuc	aaugccacag	8220
cuauagcagu	agcugagggg	acagauagg	uuauagaagu	aguacaagaa	gcuuaugag	8280
cuauucgcca	cauaccuaga	agaauaggac	agggcuugga	aaggauuuug	cuauaaaug	8340
gguggcaagu	ggucaaaaag	uagugugguu	ggauggccug	cuguaaggga	aagaauagga	8400
cgagcugagc	cagcagcaga	gcagcucuc	gcagcucuc	gagaccuaga	aaaacauugga	8460
gcaauacaa	guagcaacac	agcagcuac	aaugcugcu	gugccuggu	agaagcaca	8520
gaggaggaga	agguggguuu	uccagucaca	ccucagguac	cuuaaagacc	aaugacuuc	8580
aaggcagcug	uagaucuuag	ccacuuuuu	aaagaaaagg	ggggacugga	agggcuauu	8640
cacucccaac	gaagacaaga	uaucuuugau	cuguggaucu	accacacaca	agguacuuc	8700
ccugauuggc	agaacuacac	accaggacca	gggaucagau	auccacugac	cuuuggaug	8760
cgcuacaagc	uaguaccagu	ugagccagag	aaguuagaag	aagccaacaa	aggagagaac	8820
accagcuugu	uacaccucgu	gagccugcau	ggauuggaug	acccggagag	agaaguguua	8880

ES 2 804 764 T3

gaguggaggu	uugacagccg	ccuagcauuu	caucacgugg	cccgagagcu	gcauccggag	8940
uacuucaaga	acugcugaua	ucgagcuugc	uacaagggac	uuuccgcugg	ggacuuucca	9000
gggagggcgug	gccugggchg	gacuggggag	uggcgagccc	ucagauccug	cauauaagca	9060
gcugcuuuuu	gccuguacug	ggucucucug	guuagaccag	aucugagccu	gggagcucuc	9120
uggcuaacua	gggaaccac	ugcuuaagcc	ucaauaaagc	uugccuugag	ugcuucaagu	9180
agugugugcc	cgucuguugu	gugacucugg	uaacuagaga	ucccucagac	ccuuuuaguc	9240
aguguggaaa	aucucuagca	gu				9262

<210> 10

<211> 13931

5

<212> ARN

<213> *Mus musculus*

<400> 10

uaccugccug	agcuccgccu	ccgaagaccc	uguagagcaa	gcagcagggg	cuaggcccgu	60
ggccaggcca	cagccaggaa	gccacccac	cauccauccg	ccauggggcc	acgaaagccu	120
gcccugcgga	cgccguuacu	gcugcuguuc	cugcuacugu	ucuuggacac	cagcgucugg	180
gcucaagaug	aaguccugga	aaacuaaagc	uucagcuguc	caaaagaugc	aacucgauuc	240
aagcaccucc	gaaaguacgu	guacaacuau	gaagcugaaa	guuccagcgg	uguccagggc	300
acagcugacu	ccagaagcgc	caccaagauc	aacuguaagg	uagagcugga	ggucccccaa	360
aucugugguu	ucaucaugag	gaccaaccag	uguacccuua	aagaggugua	uggcuucaac	420
ccugagggca	aggccuugau	gaagaaaacc	aagaacucug	aagaguugc	agcugccaug	480
uccagguacg	aacucaagcu	ggccauuccu	gaagggaaac	aaauuguucu	uuaccugac	540
aaggaugaac	cuaaaauau	ccugaacauc	aagaggggca	ucaucucugc	ucuucugguu	600
cccccaga	cagaagagga	ccaacaagag	uuguuccugg	auaccgugua	uggaaacugc	660
ucaacucagg	uuaccgugaa	uucaagaaag	ggaaccguac	caacagaaau	guccacagag	720
agaaaccugc	agcaauguga	cggcuuccag	cccaucagua	caagugucag	cccucucgcu	780
cucacaaaag	gccuggucca	ccccuuguca	acucuuauc	gcagcagcca	aacuugccag	840
uacaccucgg	auccuaagag	gaagcaugug	ucugaagcug	ucugugauga	gcagcaucuu	900
uuccugccuu	ucuccuacaa	gaauaaguau	gggaucauga	cacguguuac	acagaaacug	960
agucuugaag	acacaccuaa	gaucaacagu	cgcuuucuca	gugaagguac	caaccggaug	1020
ggucuggccu	uugagagcac	caaguccacg	ucauccccaa	agcaggcuga	ugcuguuuug	1080
aagacccuuc	aagaacugaa	aaaauugucc	aucucagagc	agaaugcuca	gagagcaaa	1140
cucuucaaua	aacugguuac	ugagcugaga	ggccuacacug	gugaagcaau	cacaucccuc	1200
uugccacagc	ugauugaagu	guccagcccc	aucacuuuac	aagccuuggu	ucagugugga	1260
cagccacagu	gcuauacuca	cauccuccag	uggcugaaaa	cugagaaggc	ucacccccuc	1320
cugguugaca	uugucaccua	ccugauggc	cugaucccaa	aucccuaac	acagaggcug	1380
caggaaaucu	uuauuacugc	caaggagcag	cagagccgag	ccacucugua	ugcacugagc	1440
cacgcaguua	acagcuauuu	ugauguggac	cauucaggga	gcccauguuc	gcaggauauc	1500
gcugguuacc	uguugaaaca	gaucgacaau	gaaugcacgg	gcaaugaa	ccacaccuuc	1560
uugauucuga	gggucauugg	aaauauggga	agaaccaugg	aacaaguaau	gccagcccuc	1620
aaguccucag	uccugagcug	uguacgaagu	acaaaacc	cucugcugau	ucagaaagcu	1680
gcucuccag	cccugaggaa	gauggaacug	gaagauagg	uccggacgau	ccuuuuugau	1740
acauuuguaa	auggugucgc	ucccguggag	aagagacugg	cugccuauuc	cuugcugaug	1800
aagaacccuu	ccucaucaga	uauuaacaaa	auugcccaac	uucuccaaug	ggaacagagu	1860
gagcagguga	agaacuucgu	ggcaucucac	auugccaaca	ucuugaacuc	ggaagaacug	1920
uauugccaag	aucugaaagu	uuugaucaaa	aaugcucugg	agaaauucua	auuuccaacg	1980
aucauggacu	ucagaaaauu	uucccgaaac	uaucaaguuu	ccaaaucugc	uucucuccca	2040
auguucgacc	cagucucagu	caaaaauagaa	gggaaucuua	uauuugauc	aagcaguauu	2100
cuucccagag	aaagcuugcu	gaaaacaacc	cucacagucu	uuggacuugc	uucacuugau	2160
cucuunugaga	uugguuuaga	aggaaaagg	uuugagccaa	cacuagaagc	ucuuuuuggu	2220
aagcaaggau	ucuucccaga	cagugucaac	aaggcuuugu	auugggucaa	uggccgaguu	2280
ccagauggug	ucuccaaggu	cuugguggac	cacuuuggcu	auacuacaga	uggcaagcau	2340
gaacaggaca	uggugaau	aaucaugccc	auuguggaca	aguugauc	agaucugaaa	2400
ucuaaagaaa	uuccugaagc	cagggccuau	cuccgcaucc	uaggaaaaga	gcuaagcuuu	2460
gucagacucc	aagaccucca	aguccugggg	aagcuguugc	ugaguggugc	acaaacuug	2520
cagggaaucc	cccagauggu	uguacaggcc	aucagagaag	ggucaaagaa	ugacuuguuu	2580
cuccacuaca	ucuucaugga	caaugccuuu	gagcucccca	cuggagcagg	guuacagcug	2640
caaguguccu	cgucuggagu	cuucaccccc	gggaucagg	cugguguaag	acuggaaaua	2700
gccaacauac	aggcagagcu	aguggcaaag	cccucugugu	ccuuggaguu	ugugacaaa	2760
augggcauca	ucaucccaga	cuucgcuaag	agcagugucc	agaugaacac	caacuucuc	2820
cacgagucag	gccuggaggc	gcgaguggcc	cugaaggcug	ggcagcugaa	ggucaucauu	2880
ccuucuccaa	agaggccagu	caagcuguuc	aguggcagca	acacacugca	ucuggucucu	2940

accacccaaaa	cagaagugau	cccaccucug	guugagaaca	ggcaguccug	gucaacuugc	3000
aagccucucu	ucacuggaau	gaacuacugu	accacaggag	cuuacuccaa	cgccagcucc	3060
acggagucug	ccucuuaa	cccacugaca	ggggacacaa	gguaugagcu	ggagcugagg	3120
cccacgggag	aaguggagca	guauucugcc	acugcaaccu	augaacuccu	aaaagaggac	3180
aagucuuugg	uugacacauu	gaaguuccua	guucaagcag	aaggagugca	gcagucugaa	3240
gcuacugua	uguucaaaua	uaaucggaga	agcaggaccu	uaucuaguga	aguccuaauu	3300
ccagggguuug	augucaacu	cgggacaaua	cuaagaguua	augaugaauuc	ugcuaaggac	3360
aaaaacacuu	acaaacucau	ccuggacauu	cagaacaaga	aaauacacuga	ggucucucuc	3420
guggggccacu	ugaguuaua	uaaaaaggga	gauggcaaga	ucaaaaggugu	uguuuccaua	3480
ccacguuugc	aagcagaagc	caggagugag	guccacaccc	acugguccuc	caccaaaccug	3540
cucuuccaaa	uggacucauc	ugcuacagcu	uacggcucua	caauuuccaa	gagagugaca	3600
uggcgguuacg	auaaugagau	aaauagaauu	gauuggaaca	cgggaaccaa	uguggauacc	3660
aaaaaagugg	ccuccaaauu	cccuguggau	cuuucccau	auccuagaau	guugcaugag	3720
uaugccaaug	gucuccugga	ucacagaguc	ccucaaacag	augugacu	ucgggacaug	3780
gguuuccaaau	uaauugugc	aacaaacaca	uggcuucaga	uggcaaccag	gggucuuuccu	3840
uacccccaaa	cucuacagga	ucaccucaau	agccucucag	aguugaaccu	ccugaaaaug	3900
ggacugucug	acuuccauau	uccagacaac	cucuuccuaa	agacugaugg	cagagucaaa	3960
uacacaaua	acaggaacaa	aaauaaacau	gacaucccu	ugccuuuggg	uggcaugcu	4020
ucaaaaagacc	ucaaagugcc	agagagugug	aggacaccag	cccucaacu	caagucugug	4080
ggauuccauc	ugccaucucg	agagguccag	gucccccacu	uuacaauccc	caagacacau	4140
cagcuucaag	ugccucucuu	ggguguucua	gaccuuucca	caaauugcua	cagcaauuug	4200
uacaacuggu	cagccuccua	cacugguggc	aacaccagca	gagaccacu	cagccuucag	4260
gcucaguacc	gcaugaagac	ugacucugug	guugaccugu	uuuccuacag	ugugcaaggga	4320
ucuggagaaa	caacaua	cagcaagaac	acauuuacau	uguccuguga	uggaucucua	4380
caccauaaa	uucua	aaaauucaaa	gucagccacg	uagaaaaau	uggaaacagc	4440
ccagucucua	aagguuuacu	aacauuugaa	acaucuagug	ccuuggggacc	acagauugcu	4500
gcuacuguu	accua	aaaaaagaaa	caacaucuau	acgucaaaaga	uaucaagguu	4560
gauggacagu	ucagagcuuc	uucuuuuuau	gcucaaggca	aaauaggccu	gucuuugugag	4620
agagaugua	caacuggcca	gcugagcggc	gaauccaaca	ugagaauuaa	cuccaccuac	4680
uuccagggca	ccaaccagau	cgugggaaug	uaccaggaug	gagcccuguc	cauaccuccc	4740
acuucugacc	ugcaagaugg	cauauucaag	aacacagcu	ccuugaaaau	ugaaaacua	4800
gagcugacuc	ugaaaucuga	uagcaguggg	caguaugaga	acuucgcugc	uuccaacaag	4860
cuggauguga	ccuucucua	gcaaagugca	cugcugcgcu	cugaacacca	ggccaauuac	4920
aagucccuga	gcuuugucac	ccuucuuuca	ggaucccuca	cuucccaggg	uguaagaaua	4980
aaugcugaca	ucuuugggcac	agacaaaauu	aaucugggug	cucacaaggc	aacacuaaag	5040
auugcacgug	auggacuauc	aaccagugcg	accaccaacu	ugaaguacag	ccccucugc	5100
cuggagaaug	aguugaaugc	agagcuuggg	cucucugggg	cauccaugaa	auuaucaca	5160
aacggccgcu	ucaaagaaca	ccaugcaaaa	uucagucuu	augggagagc	ugcccucaca	5220
gaggugucac	uggggagcau	uuaccaggcc	augauucugg	gugcagacag	caaaaaacau	5280
uucaacuua	aacucagccg	agaagggcug	aggcugucca	augauuugau	gggucuccau	5340
gcugagaaa	aacuuagacca	cacacacagu	gugaacauug	caggucucuc	acuggacuc	5400
uucucaaaaa	uggacaauau	uuacagugga	gacaaguucu	auaagcagaa	uuuuacuaa	5460
cagcuacagc	ccuauucuuu	cauaacua	uuuagcaacg	accugagaua	uggugcucua	5520
gauuugacca	acaauggaag	guuucggcug	gagccacuga	agcugaau	ggguggcaac	5580
uuuaaaggaa	ccuaucaaaa	uaauagcug	aaacauaucu	auaccuauuc	uuauacugac	5640
cugguaguag	caaguuacag	agcagacacu	guggcuuagg	uucagggugu	cgaauucagc	5700
cauaggcuua	augcagacau	ugaaggacug	acuuccucug	uugaugucac	uaccagcuac	5760
aaucagauac	cacugcauuu	uaacaauuu	uuccacuuu	cucuggcacc	uuuuaccuug	5820
ggcaucgaca	cacauacaag	uggugauggg	aaacuguccu	ucuggggaga	acacacuggg	5880
cagcuauaua	guaauguucu	guugaaa	gaaccucugg	cacuuauugu	cucucaugac	5940
uacaaaggau	ccacaagcca	cagucucccg	uacgagagca	gcaucagcac	ggcucuuuga	6000
cacacaguca	gugccuugcu	gacgccagcu	gagcagacaa	gcaccuggaa	auucaagacc	6060
aaacugaaug	acaaaguaua	cagccaggac	uuugaagccu	acaacacuaa	agacaaaauc	6120
gguguugagc	uuaguggacg	ggcugaccuc	ucuggggcugu	auucuccaa	uaaacuaccg	6180
uuuuucua	gugagccugu	caauguccuu	aauggcuuag	agguaaauga	ugcuguugac	6240
aagccccaag	aauuacaa	uaugcugug	gugaaguacg	auaagaacca	ggauguuac	6300
accuacacc	ucccauucuu	caaaagccug	ccagacuauu	uggagagaaa	ucgaagaggga	6360
augauaaguc	uacuggaagc	caugcgaggg	gaauugcaac	gccucagugu	ugaucaguuu	6420
gugaggaaau	acagagcggc	ccugagcaga	cuuccucagc	agauucauca	uuauucgaa	6480
gcaucugacu	gggagagaca	aguagcuggu	gccaaaggaa	aaauaacuuc	uuucauggaa	6540
aauuauagaa	uuacagauaa	ugauguacua	auugccauag	auagugccaa	aaucacuuc	6600
aaugaaaaac	ucucucaacu	ugagacauac	gcgauacaau	uugaucagua	uauuaagau	6660
aauuaua	cacauagacu	aaaaagaacu	auugcugaga	uuauugaucg	aaucuuugaa	6720
aaguuaaaaa	uucuuuga	acaguaucau	auccguguaa	aucuagcaaa	aucaauccau	6780
aaucucuaau	uaauuguga	aaacguugau	cuuaaccaag	ucaguaguag	uaacaccucu	6840

uggauccaaa	auguggauuc	caauuaucaa	gucagaauc	aaaaucaaga	aaaacuacag	6900
cagcucagga	cacaaaauca	gaauauagac	auucagcagc	uugcugcaga	gguaaaacga	6960
cagauggacg	cuaauugaug	cacaaugcau	uuagaucuu	ugagaacugc	aaauucuauuc	7020
caaagaauaa	gugacauuau	ugaccguguc	aaauacuucg	uuaugaauuc	uauugaagau	7080
uuuaaaguaa	cugagaaaaa	caauacuuiu	agaguuaau	uccgugagcu	aaugagaaa	7140
uauagaugag	accaacacau	ccagguuuua	auggauaaau	caguagaguu	ggccacaga	7200
uauagccuga	gcgagccucu	ucagaaacuc	aguaauuguc	uacagcgauu	ugagauaaaa	7260
gauuacuau	agaaaauugg	uggguuuuu	gaugauacug	uugaguggcu	uaaagcauug	7320
ucuuucaaaa	auaccuau	agaacuauuu	agauugacug	acauuguggu	gaagaaguug	7380
aaagcauuug	auuauaccca	guuuguagac	aaaaccaaca	gcaaaaucgg	ugagaugacu	7440
cagagaauca	augcugaaa	ccaagcucuc	aaacuuccac	aaaaaugga	agcauuaaaa	7500
cuguuugguag	agacuucuaa	aaccacaguc	uccaaauccc	uggaaagacu	caaggacacc	7560
aaaguacug	ugguacau	uuggcugcag	gauauuuuga	cucaaaugaa	agaccuuuuc	7620
caagauacuc	uggaagaugu	aagagaccga	auuuaucaaa	uggacauuca	gagggacucg	7680
gagcacuuuc	ugucucuggu	aaaccaaguu	uacaguacac	uggucaccua	uauugucugac	7740
ugggugacuc	ugacugcuua	aaacauaaca	gacuugcag	agcaauauuc	cauccaaaaac	7800
ugggucugaga	guauaaaagu	acugggugga	caaggauuca	uaguuccuga	aaugcaaaac	7860
uuucugugga	ccaugccugc	uuuugagugc	agucuccgug	cucuccaaga	agguaacuuu	7920
cagacccug	ucuuuauagu	ccccuugaca	gauuugagga	uuccaucaau	ucggauaaaa	7980
uuuaaaaugu	uaaagaauau	aaaaauccca	uugagauuuu	ccacuccaga	auucacucuu	8040
cucaacaccu	uccaugucca	uuccuuuaca	auugacuugc	uggaaaauaa	agcaaaagau	8100
auuagaacua	ucgaccaaau	uuugagcagu	gagcuacagu	ggccucuucc	agaaaugua	8160
uugagagacc	uggauguagu	gaacauuccu	cuugcaagac	ugacucugcc	agacuuccau	8220
guaccagaaa	ucacaaaucc	agaauucaca	aucccaaaug	ucaauucuaa	agauuuacac	8280
guuccugauc	ucacauuacc	agaauuccaa	cuccucacac	ucucacauac	aaugaaaaua	8340
ccugcuuuug	gcaaacugca	uagcauccuu	aagauccaa	cuccucucuu	uauuuuagau	8400
gcuaauugcca	acauacagaa	uguaacaacu	ucaggggaca	aagcagagau	uguggcuucu	8460
gucacugcua	aaggagaguc	ccaauuugaa	gcucucuuu	uugauuuuca	agcacaagcu	8520
caauuccugg	aguuaauucc	ucauccucca	guccugaagg	aauccaugaa	cuuccaccag	8580
aagcauguga	gaauggagca	ugagggugag	auaguauuug	auggaaaggc	cauugagggg	8640
aaaucagaca	cagucgcaag	uuuacacaca	gagaaaaaug	aaguagaguu	uaauaauggu	8700
augacuguca	aaguuaacaa	ucagcucacc	cuugacaguc	acacaaagua	cuuccacaa	8760
uugaguguu	cuaggcugga	cuuccuccag	aaggcuucuc	uuauuaauga	aaucacagca	8820
cuauuagaag	cuggacaugu	ggcauugaca	ucucagggga	cagggucaug	gaacuggggc	8880
ugucccaacu	ucucggau	aggcauacau	ucgucccaa	uuagcuuuac	uguggauuggu	8940
cccuaugcuu	uuguuggacu	auccaaauaac	auaaauggca	aacacuuacg	ggucauccaa	9000
aaacugacuu	augaaucug	cuuccucaac	uauucuaagu	uugaaguuga	gucaaaaguu	9060
gaauucagc	acguggguc	cagcauucua	acagccaaug	gucgggcacu	gcuaaaggac	9120
gcaaaaggcag	aaauagcug	ugagcacaa	gccaaucuaa	auggaaaagu	uauuggaacu	9180
uugaaaaauu	cucucuucuu	uucagcacaa	ccauuugaga	uuacugcauc	cacaaauaa	9240
gaaggaaaau	ugaaaguggg	uuuuccacua	aagcugacug	ggaaaauaga	cuuccugauu	9300
aacuaugcau	uguuucugag	uccccgugcc	caacaagcaa	gcuggcaagc	gaguaccaga	9360
uucauacagu	acaaaaucaa	ucaaaaucuu	ucugcuauaa	acaaugaaca	caacauagaa	9420
gccagauuag	gaauagaug	agaugccaac	cuggauuuc	uaaacaauac	uuuaacaaau	9480
ccugaaaaua	acuugccuaa	cacgggguuc	aaaacucucc	uacugaagga	uuuccucaa	9540
ugggaagaaa	caggcuugaa	agaauuuuug	aagacaacaa	agcaaucauu	ugauuugagu	9600
guaaaaggcuc	aaauaaaaaa	gaacagugac	aagcauucca	uuguuguccc	ucuggguuag	9660
uuuuaugaau	uuauucuaa	caaugucaau	ucgugggaca	gaaaauuuga	gaaagucaga	9720
aacaaugcuu	uacauuuucu	uaccaccucc	uauaaugaag	caaaaauuua	ggugauaaag	9780
uacaaaacug	aaaaaucccu	uaauacagcc	ucugggaccu	uucaaaauca	uggcuacacu	9840
auccagguug	ucaacaau	aguauucucca	uuugcuguag	agacacuggc	uuccagccau	9900
gugaucccca	cagcaauaag	caccccaagu	gucacaauc	cugguccuaa	caucaaggug	9960
ccuucauaca	aguuaugcu	gccacccug	gaguugccag	uuuuccaugg	uccugggaau	10020
cuauucaagu	uuuuccuccc	agaauucaag	ggauucaaca	cuauugacaa	uauuuauuu	10080
ccagccaugg	gcaacuuuac	cuaugacuuu	ucuuuuuuuu	caagugucuu	cacacugaa	10140
accaauggcug	gacuuuuaua	ccaaucagau	aucguugccc	auuuccuuuc	uuccucuuca	10200
uuugucacug	acgcccugca	guacaaaaua	gagggaaacu	cagcugcugau	gcgaaaaagg	10260
ggauugaaac	uagccacagc	ugucucucua	acuaacaaau	uuguaaaggg	cagucugac	10320
agcaccuuua	guuuuaccaa	gaaaaaacug	gaagcaucag	ugagaacaac	ugccaaccuc	10380
caugcuccca	uauucucaau	gaacuucag	caggaaucua	auggaaauac	caagucaaaa	10440
cccacuguuu	caucauccau	ugaacuuaac	uauagcuuca	auuccucaa	gcugcacucu	10500
acugcaacag	gaggcauuga	ucacaaguuc	agcuuagaaa	gucucacuuc	cuacuuuuuc	10560
auugagucuu	ucaccaaagg	aaauaucaag	aguuccuucc	uuucucagga	auauucagga	10620
aguuuugcca	augaagccaa	uguauaucug	aaauccaaag	guacucgguc	uucagugagg	10680
cuacaaggag	cuuccaaagu	ugaugguau	uggaacguug	aaguaggaga	aaauuuugcu	10740

ggagaagcca	cccuccaacg	caucucacacc	acauggggagc	acaauaugaa	aaaccbauug	10800
cagguauaua	gcuacuucuu	cacaaaagga	aagcaaacau	gcagagcuac	uuuggagcuc	10860
uccccaugga	ccaugucaac	cuugcuacag	guucauguga	gucaacucag	uucccuccuu	10920
gaccuccauc	acuuugacca	ggaagugauc	cuaaaaagcua	acacuaagaa	ccagaagauc	10980
agcuggaaag	gugggggucca	gguugaauca	cggguucuu	agcacaau	acaguucucc	11040
aaugaccaag	aagaaauacg	gcuugaccuu	gcaggaucuu	uagacggaca	gcugugggac	11100
cuugaagcua	ucuuuuuacc	aguauauggc	aagagcuugc	aggaacuccu	acaaauggau	11160
ggaaagcgac	aguauucuu	agcuucaacu	ucucuucuu	auaccaaaaa	cccuauuggc	11220
uauccuccuc	cacucccccg	gcaagaacug	gcugauagau	uuauuauacc	agggauaaaa	11280
cuaaaugacu	ucaguggagu	aaaaauucua	aagaaguuua	guacuucacc	auuugcccuc	11340
aaccuaacaa	ugcuccccaa	aguaaaauuc	ccuggggaug	aucuguuuac	acaguacucu	11400
acaccagagg	gcuccucugu	cccuauuuuu	gaggcaacua	uaccugaaa	ucauuuaacu	11460
guauccaggu	uuacacuucc	aaagagccuu	ccaguuggca	acacagucuu	ugauugaaau	11520
aaguuggcca	acaugauugc	cgauugugac	cugccuagug	ucaccucugc	ugagcagacu	11580
auuguaaucc	cacccuugga	guucucugua	ccugcuggga	uuuuuauucc	uuucuuugga	11640
gaacugacug	cacgugcugg	gauggcuuu	ccccuguaa	augucacuug	gagcguggu	11700
uggaaaacca	aagcagauc	uguugaaacg	uuccuagau	ccaugugcac	uucaaccuug	11760
caguucuggg	aguauucuu	aaaaguugua	gaaacacaca	aaauugaaga	agaucugua	11820
accuaaua	ucaaaggaac	acuucaacac	ugugacuuc	auguggagua	uaaugaagau	11880
ggucuaauua	aaggacuuug	ggacuggcag	ggagaggcuc	accuggacau	caccagccca	11940
gcacugacug	acuuucaucu	guacuacaaa	gaagacaaga	caagucuguc	ugccucagca	12000
gccuccucga	ccaucggcac	ugugggucug	gauucgagca	cagaugacca	gaguguggag	12060
cugaauuguc	acuuuccacc	acaguccccu	ccagagaaga	aacucagcau	auucaaaacu	12120
gaguggaggu	acaaggaguc	ugauggugaa	agguacauc	aaauuaauug	ggaagaagag	12180
gcagcuucca	gauugcuagg	cucccuaaaa	agcaaugugc	ccaaggcuuc	uaaggcuauu	12240
uaugauuau	ccaauaagua	ccaccuggaa	uacguuucuu	cagaacuaag	aaaaagucua	12300
caggucaau	cugaacaugc	cagaaggag	guugaugaaa	ugaacaugag	uuuccagaga	12360
guagcccug	auaccuacca	gaaucucua	gaggagaugu	uggcucagaa	gagccugagc	12420
aucccugaga	aucucaagaa	gaggguugua	gacaguauag	uacauguuac	ucagaaguac	12480
cacauggcag	ucauguggc	gauggacuca	uucuuuauu	uucugaaaau	caauagaguc	12540
caguucccag	gguacgcug	aacauauacu	guggacgaac	ucuacacuau	agucaugaag	12600
gaaaccaaga	agucacuguc	ucagcuguuu	aauggguuag	gaaaccuacu	uuccuacguu	12660
caaaaccaag	uagagaaauc	aagauuaa	aaugacauaa	cauuuaaau	uccuuuuuuc	12720
ucaaaaccuu	guaaacuaaa	agaucucua	uugauuuuca	gggaggaguu	aaacauuuua	12780
ucaaacauag	gccaacagga	uaucaagu	acaacaauac	uaaguaguc	ucaggguuuu	12840
uugggagag	uuuuagacau	cauagaagaa	caauuaaa	gccuaaagga	caauugaacu	12900
acuugugug	cugaccuau	caacauuguu	uucaaaauac	aggucccau	ugcuuuuaaa	12960
ucccuagaag	aagacaua	cuuuguccuc	ggugaguuca	augacuucuu	ucaauccaua	13020
cuucaggagg	gguccuacaa	gcuacagcag	guccaucagu	auaugaaggc	ccuucgugaa	13080
gaguauuuug	auccgagcau	gguugggug	acagugaaa	auuaugaaa	agaagaaaau	13140
augguugagc	ugaucaagac	ccuuuuaguu	uccuuuagg	augucuacuc	ugaauauagu	13200
gugacagcug	cugauuuugc	uuccaaaaug	ucaacucaa	uugaacaa	uguguccagg	13260
gauaucagag	aguauucuu	caugcuuacu	gauauaaaug	gaaaguggau	ggaaaagauu	13320
gcagagcuuu	cuauuugggc	aaaggaaa	augaaaagcu	gggucacugc	cguggccaaa	13380
auaaugucug	auuaccccc	gcaguuccac	uccaaucugc	aggauuuuuc	agaccaacuc	13440
ucuagcuacu	augaaaaau	uguuggugag	uccacaagau	ugauugaccu	guccauucaa	13500
aacuaccacg	uguuucucag	auacauacc	gaguucacuga	gaaagcugca	gguggccaca	13560
gccaauaaug	ugagccccua	uauaaagcu	gcucaaggag	agcugaugau	caccuucuga	13620
uucacuacu	aacaaaauca	aauuuaaaccu	ucacauagua	ggagacuug	uagacuacua	13680
uaaagaccu	ccugagccag	accugcaguc	aacagcaaga	gcaagaagca	cauaggaacu	13740
auaccugcaa	ccaagcuggc	auaagaacca	agaccuucaa	agcagccuga	acucaagaug	13800
acauauuuua	caaguuaag	uaaagucaag	agcugaguug	uuuuguccaa	cucaggauug	13860
agggagggag	ggaaggggaa	auaaaauaa	acuuccuuau	ugugcagcaa	aaaaaaaaaa	13920
aaaaaaaaaa	a					13931

<210> 11
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Aequorea victoria*

<400> 11
 gggcagcuug ccgguggugu u 21

 5 <210> 12
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Aequorea victoria*

 10 <400> 12
 caccaccccg gugaacagcu u 21

 15 <210> 13
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Aequorea victoria*

 20 <400> 13
 gcuguucacg ucgcugcccu u 21

 25 <210> 14
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> *Aequorea victoria*

 30 <400> 14
 gctgttcacg tcgctgccc 19

 35 <210> 15
 <211> 80
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligo para clones que expresan ARNip-MV

 <400> 15

 gatccccac caccgccgtg aacagcgta gctgttcacg tcgctgccc ttagggcagc 60
 ttgccggtgg tgtttttta 80

 40 <210> 16
 <211> 75
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 45 <220>
 <223> Oligo para clones que expresan ARNip-MV

 <400> 16

 agcttaacac caccggcaag ctgccctaac gggcagcgac gtgaacagct aacgctgttc 60
 accggggtgg tgggg 75

 55 <210> 17
 <211> 144
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Oligo para clones que expresan ARNip-MV

 60 <400> 17

gatccccac caccggtg aacagcttgt aggtggcatc gcagaagcga tgccacctac 60
aagctgttca cgtcgtgcc cttgtagggtg gcatcgcaga agcgatgcca cctacaagg 120
cagcttgccg gtggtgtttt tttta 144

<210> 18
<211> 139
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Oligo para clones que expresan ARNip-MV

<400> 18

agcttaaac caccggcaag ctgcccttgt aggtggcatc gcttctgcga tgccacctac 60
aagggcagcg acgtgaacag cttgtagggtg gcatcgcttc tgcgatgcca cctacaagct 120
gttcaccggg gtggtgggg 139

15 <210> 19
<211> 89
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Oligo para clones que expresan ARNip-MV

<400> 19

25 gatccccgt gctgcttcat gtggtcgttg ttacgaccac aatggcgaca accttgtag 60
gttgcgggc agcagcacgt ttttttta 89

<210> 20
<211> 84
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligo para clones que expresan ARNip-MV

35 <400> 20

agcttaaaac gtgctgctgc ccgacaacct aacaagggtg tgcgcattgt ggtcgtaaca 60
acgaccacat gaagcagcac gggg 84

<210> 21
40 <211> 147
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> Oligo para clones que expresan ARNip-MV

<400> 21

gatccccgt gctgcttcat gtggtcgttg taggtggcat cgcagaagcg atgccaccta 60
caacgaccac aatggcgaca accttgtagg tggcatcgca gaagcgatgc cacctacaag 120
gttgcgggc agcagcacgt tttttta 147

50 <210> 22
<211> 142
<212> ADN
55 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligo para clones que expresan ARNip-MV

<400> 22

5 agcttaacgt gctgctgccc gacaaccttg taggtggcat cgcttctgcg atgccaccta 60
 caaggttgtc gccattgtgg tcgttgtagg tggcatcgct tctgcgatgc cacctacaac 120
 gaccacatga agcagcacgg gg 142

<210> 23
 <211> 62
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Oligo para clones que expresan ARNip-MV

15 <400> 23

 gatccccgca agctgaccct gaagttcttc aagagagaac ttcagggtca gcttgctttt 60
 ta 62

20 <210> 24
 <211> 62
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Oligo para clones que expresan ARNip-MV

 <400> 24

 agcttaaaaa gcaagctgac cctgaagttc tctcttgaag aacttcaggg tcagcttgcg 60
 gg 62

30 <210> 25
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> ARNip sintético

40 <400> 25
 cugcugguag uggucggcgu u 21

 <210> 26
 <211> 21
 45 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> ARNip sintético

50 <400> 26
 cgccgacuuc gugacgugcu u 21

55 <210> 27
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> ARNip sintético

	<400> 27 gcacgucgcc guccagcagu u	21
5	<210> 28 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> ARNip sintético	
15	<400> 28 guugccgucg uccuugaagu u	21
20	<210> 29 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> ARNip sintético	
30	<400> 29 cuucaagugg aacuacggcu u	21
35	<210> 30 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> ARNip sintético	
45	<400> 30 gccguaggua ggcggaacu u	21
50	<210> 31 <211> 67 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> clones de ARNip multivalente	
60	<400> 31 cgccgacuuc gugacgugcu ugugcacguc gccguccagc aguugucugc ugguaguggu cggcguu	60 67
65	<210> 32 <211> 80 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
70	<220> <223> clones de ARNip multivalente	
75	<400> 32 gatccccgc cgacttcgtg acgtgcttgt gcacgtcgcc gtccagcagt tgtctgctgg tagtggtcgg cgttttttta	60 80
80	<210> 33 <211> 80	

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> clones de ARNip multivalente

<400> 33

10 agcttaaaaa aacgccgacc actaccagca gacaactgct ggacggcgac gtgcacaagc 60
 acgtcacgaa gtcggcgggg 80

<210> 34
 <211> 131
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> clones de ARNip multivalente

<400> 34

20 cgccgacuuc gugacgugcu uguagguggc aucgcagaag cgaugccacc uacaagcacg 60

ucgccgucca gcaguuguag guggcaucgc agaagcgaug ccaccuacaa cugcugguag 120
 uggucggcgu u 131

25 <210> 35
 <211> 142
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> clones de ARNip multivalente

<400> 35

35 gatccccgc cgacttcgtg acgtgcttgt aggtggcatc gcagaagcga tgccacctac 60
 aagcacgtcg ccgtccagca gttgtaggtg gcatcgaga agcgatgcc cctacaactg 120
 ctggtagtgg tcggcgtttt ta 142

<210> 36
 <211> 142
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> clones de ARNip multivalente

<400> 36

45 agcttaaaaa cgccgaccac taccagcagt tgtaggtggc atcgcttctg cgatgccacc 60
 tacaactgct ggacggcgac gtgctttag gtggcatcgc ttctgcgatg ccacctacaa 120
 gcacgtcacg aagtcggcgg gg 142

<210> 37
 <211> 67
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> clones de ARNip multivalente

55 <400> 37

cuucaagugg aacuacggcu ugugccguag guaggcggca acugugugug cgcuguccu 60
ugaaguu 67

5 <210> 38
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> clones de ARNip multivalente
 <400> 38

15 **gatccccgga tccgacatcc acgtttcttca agagagaacg tggatgtcgg atccttttta 60**

20 <210> 39
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> clones de ARNip multivalente
 <400> 39

30 **agcttaaaaa ggatccgaca tccacgttct ctcttgaaga acgtggatgt cggatccggg 60**

35 <210> 40
 <211> 131
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> clones de ARNip multivalente
 <400> 40

cuucaagugg aacuacggcu uguagguggc aucgcagaag cgaugccacc uacaagccgu 60
agguaggcgg caacuuguag guggcaucgc agaagcgaug ccaccuacaa guugccgucg 120
uccuugaagu u 131

45 <210> 41
 <211> 142
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> clones de ARNip multivalente
 <400> 41

gatccccctt caagtggaac tacggcttgt aggtggcatc gcagaagcga tgccacctac 60
aagccgtagg taggcggcaa cttgtaggtg gcatcgaga agcgatgcca cctacaagtt 120
gccgtcgtcc ttgaagtttt ta 142

55 <210> 42
 <211> 142
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> clones de ARNip multivalente

<400> 42

agcttaaaaa cttcaaggac gacggcaact tgtaggtggc atcgcttctg cgatgccacc 60
tacaagttgc cgcctaccta cggctttag tagtgcatcgc ttctgcgatg ccacctacaa 120
gccgtagttc cacttgaagg gg 142

5

<210> 43

<211> 77

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Oligo de ARNip-MV anti-VIH

<400> 43

15

gatccccgtg aaggggaacc aagagattga tctcttgta atatcagctt gagctgatat 60
ttctccttca cttttta 77

<210> 44

<211> 77

20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligo de ARNip-MV anti-VIH

25

<400> 44

agcttaaaaa gtgaaggaga aatatcagct caagctgata ttaacaagag atcaatctct 60
tggttccccct tcacggg 77

30

<210> 45

<211> 80

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Oligo de ARNip-MV anti-VIH

<400> 45

gatcccccaa gcagtttttag gctgacgtta gtcagcctca ttgacacagg ttactgtgtc 60
agctgctgct tgttttttta 80

40

<210> 46

<211> 80

<212> ADN

45

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Oligo de ARNip-MV anti-VIH

50

<400> 46

agcttaaaaa aacaagcagc agctgacaca gtaacctgtg tcaatgaggc tgactaacgt 60
cagcctaaaa ctgcttgggg 80

55

<210> 47

<211> 21

<212> ARN

<213> Secuencia artificial

	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
5	<400> 47 gccuuccuu gugggaaggu u	21
10	<210> 48 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 48 ccuucccuug uggaaggu u	21
20	<210> 49 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 49 gccuuccuug uggaaggu u	21
30	<210> 50 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
40	<400> 50 uucugcaccu uaccucuau u	21
45	<210> 51 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 51 uaagaggaag uaugcuguuu u	21
55	<210> 52 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 52 aacagcaguu guugcagaau u	21
65	<210> 53 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
5	<400> 53 ccagacaaua auugucuggu u	21
10	<210> 54 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 54 cucccaggcu cagaucuggu u	21
20	<210> 55 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 55 ccagaucuuc ccuaaaaaau u	21
30	<210> 56 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
40	<400> 56 uuuuuuau cu gccugggagu u	21
45	<210> 57 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 57 uggguuccu aguuagccau u	21
55	<210> 58 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 58 uggcuaagau cuacagcugu u	21
65	<210> 59 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
5	<400> 59 cagcuguccc aagaacccau u	21
10	<210> 60 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 60 auccuuugau gcacacaau u	21
20	<210> 61 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 61 auugugucac uuccuucagu u	21
30	<210> 62 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
40	<400> 62 cugaaggaag cuaaaggau u	21
45	<210> 63 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 63 uccuguguca gcugcugcuu u	21
55	<210> 64 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 64 agcagcauug uuagcugcuu u	21
65	<210> 65 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
5	<400> 65 agcagcuuua uacacaggau u	21
10	<210> 66 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 66 accaacaagg uuucugucau u	21
20	<210> 67 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 67 ugacagaucu aauuacuacu u	21
30	<210> 68 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
40	<400> 68 guaguaauua ucuguugguu u	21
45	<210> 69 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 69 cugaggaag cuaaaggauu u	21
55	<210> 70 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 70 caaagcuaga ugaauugcuu u	21
65	<210> 71 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
5	<400> 71 agcaauuggu acaagcaguu u	21
10	<210> 72 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 72 acugcuuguu agagcuuugu u	21
20	<210> 73 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 73 aggucagggg cuacuugugu u	21
30	<210> 74 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
40	<400> 74 cacaagugcu gauauuucuu u	21
45	<210> 75 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
50	<400> 75 agaaaauuuu gucugaccuu u	21
55	<210> 76 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
60	<400> 76 cuaaguuuug gagccauuu u	21
65	<210> 77 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
5	<400> 77 auauggccug auguaccuu u	21
10	<210> 78 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 78 augguacuuc ugaacuuagu u	21
20	<210> 79 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 79 uggcuccauu ucuugcucu u	21
30	<210> 80 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
40	<400> 80 agagcaacc caaaucccu u	21
45	<210> 81 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
50	<400> 81 ggggauuuag ggggagccau u	21
55	<210> 82 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
60	<400> 82 aucuccaaa gugcugauu u	21
65	<210> 83 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
5	<400> 83 uaucaagcagu ucuugaaguu u	21
10	<210> 84 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 84 acuucaaaau guuggagauu u	21
20	<210> 85 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 85 agacugugac ccacaauuuu u	21
30	<210> 86 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
40	<400> 86 aaaauugugga ugaauacugu u	21
45	<210> 87 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 87 caguauuuugu cuacagucuu u	21
55	<210> 88 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 88 acaggccugu guaaugacuu u	21
65	<210> 89 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
5	<400> 89 agucauuggu cuuaaagguu u	21
10	<210> 90 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 90 accuuuagga caggccguu u	21
20	<210> 91 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 91 ucaguguuau uugacccuuu u	21
30	<210> 92 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
40	<400> 92 aagggucuga gggaucuuu u	21
45	<210> 93 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
50	<400> 93 agagauuuu ccacacugau u	21
55	<210> 94 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
60	<400> 94 cauagugcuu ccugcugcuu u	21
65	<210> 95 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
5	<400> 95 agcagcauug uuagcugcuu u	21
10	<210> 96 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 96 agcagcuaac agcacuaugu u	21
20	<210> 97 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 97 gcugcuuaua ugcaggaucu u	21
30	<210> 98 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
40	<400> 98 gauccugucu gaagggauugu u	21
45	<210> 99 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
50	<400> 99 caucccuguu aaaagcagcu u	21
55	<210> 100 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
60	<400> 100 uggucuaacc agagagaccu u	21
65	<210> 101 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
5	<400> 101 ggucucuuuu aacauuugcu u	21
10	<210> 102 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 102 gcaaauguuu ucuagaccu u	21
20	<210> 103 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 103 cucccaggcu cagaucuggu u	21
30	<210> 104 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
40	<400> 104 uggguucccu aguuagccau u	21
45	<210> 105 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> ARNip-MV trivalente para ApoB	
50	<400> 105 uggaacuuuc agcucauau u	21
55	<210> 106 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> ARNip-MV trivalente para ApoB	
60	<400> 106 uaugaaggca ccaugauguu u	21
65	<210> 107 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	

	<220> <223> ARNip-MV trivalente para ApoB	
5	<400> 107 acaucacuu ccaguuccau u	21
10	<210> 108 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> ARNip-MV trivalente para ApoB	
	<400> 108 acucuucaga guucuugguu u	21
20	<210> 109 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> ARNip-MV trivalente para ApoB	
	<400> 109 accaagaccu uggagacacu u	21
30	<210> 110 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> ARNip-MV trivalente para ApoB	
40	<400> 110 gugucucagu uggaagaguu u	21
45	<210> 111 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> ARNip-MV trivalente para ApoB	
50	<400> 111 accuggacau ggcagcugcu u	21
55	<210> 112 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> ARNip-MV trivalente para ApoB	
60	<400> 112 gcagcugcaa acucuucagu u	21
65	<210> 113 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	

	<220> <223> ARNip-MV trivalente para ApoB	
5	<400> 113 cugaagacgu auuccagguu u	21
10	<210> 114 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> ARNip-MV trivalente para ApoB	
	<400> 114 caggguaaag aacaauuugu u	21
20	<210> 115 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> ARNip-MV trivalente para ApoB	
	<400> 115 caaaauugcug uagacauuuu u	21
30	<210> 116 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> ARNip-MV trivalente para ApoB	
40	<400> 116 aaauuccag cguaccug u	21
45	<210> 117 <211> 23 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> ARNip-MV trivalente para ApoB	
50	<400> 117 cccuggacac cgcuggaacu uuu	23
55	<210> 118 <211> 23 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> ARNip-MV trivalente para ApoB	
60	<400> 118 aaguuccaau aacuuuucca uuu	23
65	<210> 119 <211> 23 <212> ARN <213> Secuencia artificial	

	<220> <223> ARNip-MV trivalente para ApoB	
5	<400> 119 auggaaaagg caaguccagg guu	23
10	<210> 120 <211> 24 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> ARNip-MV trivalente para ApoB	
	<400> 120 cccuggacac cgcuggaacu uuuu	24
20	<210> 121 <211> 24 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> ARNip-MV trivalente para ApoB	
	<400> 121 aaaguuccaa uaacuuuucc auuu	24
30	<210> 122 <211> 24 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> ARNip-MV trivalente para ApoB	
40	<400> 122 auggaaaug gcaaguccag gguu	24
45	<210> 123 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligo de ARNip-MV bivalente para ApoB	
50	<400> 123 ugaaucgagu ugcaucuuuu u	21
55	<210> 124 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligo de ARNip-MV bivalente para ApoB	
60	<400> 124 aaagaucgug cucaucacau u	21
65	<210> 125 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	

	<220> <223> Oligo de ARNip-MV bivalente para ApoB	
5	<400> 125 ugugaugaca cucgauucau u	21
10	<210> 126 <211> 23 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligo de ARNip-MV bivalente para ApoB	
20	<220> <221> base_modificada <222> 2,7 <223> n = cualquier base, base universal, rSpacer, conector fosforamidita, 5-nitrodol, PC Spacer o base abásica	
25	<400> 126 unguganuga cacucgauuc auu	23
30	<210> 127 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligo de ARNip-MV bivalente para ApoB	
40	<400> 127 tgtgatgaca ctcgattca	19
45	<210> 128 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligo de ARNip-MV bivalente para ApoB	
55	<400> 128 cagcuugagu ucguaccugu u	21
60	<210> 129 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
65	<220> <223> Oligo de ARNip-MV bivalente para ApoB	
	<400> 130	

	uuggagucug accaagcugu u	21
5	<210> 131 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Oligo de ARNip-MV bivalente para ApoB	
15	<220> <221> base modificada <222> 13, 19 <223> n = cualquier base, base universal, rSpacer, fosforamidita conectora, 5-nitrodol, PC Spacer o base abásica	
20	<400> 131 uuggagucug acnaagcunu u	21
25	<210> 132 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligo de ARNip-MV bivalente para ApoB	
35	<400> 132 ttggagtctg accaagctg	19
40	<210> 133 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip-MV trivalente para ApoB	
50	<400> 133 ucagggccgc ucuguauuuu u	21
55	<210> 134 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip-MV trivalente para ApoB	
65	<400> 134 aaauacauuu cuggaagagu u	21
	<210> 135 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip-MV trivalente para ApoB	
	<400> 135 cucuuccaaa aagcccugau u	21
	<210> 136 <211> 65 <212> ARN	

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido de ARNip-MV trivalente para ApoB	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> 22, 44	
10	<223> n = cualquier base, base universal, rSpacer, conector fosforamidita, 5-nitrodol, PC Spacer o base abásica	
	<400> 136	
	aaauacauuu cuggaagagu uncucuucca aaaagcccug auunucaggg ccgcucugua	60
15	uuuuu	65
	<210> 137	
	<211> 21	
	<212> ARN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB	
	<400> 137	
25	aaccacuuu caauuuuccu u	21
	<210> 138	
	<211> 21	
	<212> ARN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB	
35	<400> 138	
	ggaaaauugag aaucuccau u	21
	<210> 139	
	<211> 21	
40	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB	
45	<400> 139	
	uggagaauu caguggguu u	21
	<210> 140	
	<211> 21	
50	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> 5,13,18	
60	<223> n = cualquier base, base universal, rSpacer, fosforamiditas conectoras, 5-nitrodol, PC Spacer o base abásica	
	<220>	
	<221> misc_feature	
65	<222> 1,2,3,7,8,9,10,11,12,15,16,17,20,21	

	<223> Las bases tienen un enlace rSpace	
	<220>	
	<221> base_modificada	
5	<222> 4,6,14,19	
	<223> Las bases tienen una modificación 2'-fluoro	
	<400> 140	
10	ugganaaucu canugggnu u	21
	<210> 141	
	<211> 21	
	<212> ARN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB	
	<400> 141	
20	gaugaugaaa caguggguu u	21
	<210> 142	
	<211> 21	
	<212> ARN	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB	
30	<400> 142	
	ggaaaugga gacaucau u	21
	<210> 143	
	<211> 21	
35	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> 1,15	
45	<223> n = cualquier base, base universal, rSpacer, fosforamiditas conectoras, 5-nitrodol, PC Spacer o base abásica	
	<220>	
	<221> misc_feature	
50	<222> 2,6,7,8,9,10,11,12,13,16,18,19,20,21	
	<223> Las bases tienen un enlace rSpace	
	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> 3,4,5,14,17	
55	<223> Las bases tienen una modificación 2'-fluoro	
	<400> 143	
	ngaaaugga gacancau u	21
60	<210> 144	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
65	<220>	
	<223> oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB	

	<400> 144 gcaaacucuu cagaguucuu u	21
5	<210> 145 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB	
15	<400> 145 agaacuccaa gggugggauu u	21
20	<210> 146 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB	
30	<400> 146 auccacuuu caaguugcu u	21
35	<210> 147 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB	
45	<220> <221> base_modificada <222> 2,14,18 <223> n = cualquier base, base universal, rSpacer, fosforamidita conectora, 5-nitrodol, PC Spacer o base abásica	
50	<220> <221> misc_feature <222> 3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,16,17,19 <223> Las bases tienen un enlace rSpace	
55	<220> <221> base_modificada <222> 1,13,15 <223> Las bases tienen una modificación 2'-fluoro	
60	<400> 147 anccacuuu caanuunc	19
65	<210> 148 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
70	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
75	<400> 148 cuucaucacu gaggccucuu u	21
80	<210> 149 <211> 21	

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 149 agaggccaag cucugcauuu u	21
10	<210> 150 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
20	<400> 150 aaugcagaug aaugaaga a	21
25	<210> 151 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 151 uucagccugc auguuggcuu u	21
35	<210> 152 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 152 agccaacuau acuuggaucu u	21
45	<210> 153 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 153 gauccaaaag caggcugaag a	21
55	<210> 154 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 154 cccucaucug agaaucuggu u	21
65	<210> 155 <211> 21	

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 155	
	ccagauucau aaaccaaguu u	21
10	<210> 156	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 156	
20	acuugguggc ccaugaggggu u	21
	<210> 157	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 157	
30	ucaagaauuc cuucaagccu u	21
	<210> 158	
	<211> 21	
	<212> ARN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
40	<400> 158	
	ggcuugaagc gaucacacuu u	21
	<210> 159	
	<211> 21	
45	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
50	<400> 159	
	agugugaacg uauucuugau u	21
	<210> 160	
55	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 160	
	uugcaguuga uccugguggu u	21
65	<210> 161	
	<211> 21	

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 161	
	ccaccaggua ggugaccacu u	21
10	<210> 162	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 162	
20	guggucagga gaacugcaau u	21
	<210> 163	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 163	
30	ccuccagcuc aaccuugcau u	21
	<210> 164	
	<211> 21	
	<212> ARN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
40	<400> 164	
	ugcaaggucu caaaaaaugu u	21
	<210> 165	
	<211> 21	
45	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
50	<400> 165	
	cauuuuugau cucuggaggu u	21
	<210> 166	
55	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 166	
	caggauguaa guagguucau u	21
65	<210> 167	
	<211> 21	

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 167	
	ugaaccuuag caacaguguu u	21
10	<210> 168	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 168	
20	acacugugcc cacaucugu u	21
	<210> 169	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 169	
30	ggcuugaagc gaucacacuu u	21
	<210> 170	
	<211> 21	
	<212> ARN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
40	<400> 170	
	agugugaacg uauucuuguu u	21
	<210> 171	
	<211> 21	
45	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
50	<400> 171	
	acaagaauuc cuucaagccu u	21
	<210> 172	
55	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 172	
	ugaagagauu agcucucugu u	21
65	<210> 173	
	<211> 21	

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 173	
	cagagaggcc aagcucugcu u	21
10	<210> 174	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 174	
20	gcagagcugg cucucucau u	21
	<210> 175	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 175	
30	cucaguaacc agcuauugu u	21
	<210> 176	
	<211> 21	
	<212> ARN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
40	<400> 176	
	caauaagauu uauaacaau u	21
	<210> 177	
	<211> 21	
45	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
50	<400> 177	
	uuuguuauu uauacugagu u	21
	<210> 178	
55	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 178	
	gaaccaaggc uuguuaaguu u	21
65	<210> 179	
	<211> 21	

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 179	
	acuuuacaaa agcaacaauu u	21
10	<210> 180	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 180	
20	auuguuguua aauugguucu u	21
	<210> 181	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 181	
30	cagguaggug accacaucu u	21
	<210> 182	
	<211> 21	
	<212> ARN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
40	<400> 182	
	agaugugacu gcuucau u	21
	<210> 183	
	<211> 21	
45	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
50	<400> 183	
	ugaugaacug cguaccugu u	21
	<210> 184	
55	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 184	
	ccagucgcuu aucucccggu u	21
65	<210> 185	
	<211> 21	

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 185	
	ccgggagcaa ugacuccagu u	21
10	<210> 186	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 186	
20	cuggagucan ggcgacuggu u	21
	<210> 187	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 187	
30	uggaagagaa acagauuugu u	21
	<210> 188	
	<211> 21	
	<212> ARN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
40	<400> 188	
	caaaucuuua aucagcuucu u	21
	<210> 189	
	<211> 21	
45	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
50	<400> 189	
	gaagcugccu cuucuuccau u	21
	<210> 190	
55	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 190	
	auccaaaggc agugaggguu u	21
65	<210> 191	
	<211> 21	

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 191	
	accucaacu caguuugau u	21
10	<210> 192	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 192	
20	ucaaaccgg aauuuggau u	21
	<210> 193	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 193	
30	uagagacacc aucaggaacu u	21
	<210> 194	
	<211> 21	
	<212> ARN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
40	<400> 194	
	guuccuggag agucucau u	21
	<210> 195	
	<211> 21	
45	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
50	<400> 195	
	uugaagaauu agguucuau u	21
	<210> 196	
55	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 196	
	gcucauguuu aucaucuuu u	21
65	<210> 197	
	<211> 21	

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 197	
	aaagaugcug aacuuaaagu u	21
10	<210> 198	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 198	
20	cuuuuagggc acaugagcu u	21
	<210> 199	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 199	
30	ggagcaauga cuccagaugu u	21
	<210> 200	
	<211> 21	
	<212> ARN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
40	<400> 200	
	caucuggggg aucccgcu u	21
	<210> 201	
	<211> 21	
45	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
50	<400> 201	
	gcaggggagg uguugcuccu u	21
	<210> 202	
55	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 202	
	ucacaaacuc cacagacacu u	21
65	<210> 203	
	<211> 21	

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 203 gugucugcuu uauagcuugu u	21
10	<210> 204 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
20	<400> 204 caagcuaaag gauuugugau u	21
25	<210> 205 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 205 gcagcuugac uggucucuuu u	21
35	<210> 206 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 206 aagagacucu gaacugcccu u	21
45	<210> 207 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 207 gggcagugau ggaagcugcu u	21
55	<210> 208 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 208 caggacugcc uguucuaau u	21
65	<210> 209 <211> 21	

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 209	
	uugagaacuu cuaauuuggu u	21
10	<210> 210	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 210	
20	ccaaaauuga aaaguccugu u	21
	<210> 211	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 211	
30	uguaggccuc aguuccagcu u	21
	<210> 212	
	<211> 21	
	<212> ARN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
40	<400> 212	
	gcuggaaauuc ugguaugugu u	21
	<210> 213	
	<211> 21	
45	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
50	<400> 213	
	cacauaccga augccuacau u	21
	<210> 214	
55	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 214	
	gacuucacug gacaaggucu u	21
65	<210> 215	
	<211> 21	

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 215 gaccuugaag uugaaaaugu u	21
10	<210> 216 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
20	<400> 216 cauuuucugc acugaagucu u	21
25	<210> 217 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 217 aagcaguug gcaggcgacu u	21
35	<210> 218 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 218 gucgccuugu gaccaccacu u	21
45	<210> 219 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 219 guggugccac ugacugcuuu u	21
55	<210> 220 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 220 cagaugaguc cauuuggagu u	21
65	<210> 221 <211> 21	

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 221	
	cuccaaacag ugccaugccu u	21
10	<210> 222	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 222	
20	ggcauggagc cuucaucugu u	21
	<210> 223	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 223	
30	cacagacuug aaguggaggu u	21
	<210> 224	
	<211> 21	
	<212> ARN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
40	<400> 224	
	ccuccacuga gcagcuugau u	21
	<210> 225	
	<211> 21	
45	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
50	<400> 225	
	ucaagcuca aagucugugu u	21
	<210> 226	
55	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
60	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 226	
	auggcagaug gaauccacu u	21
65	<210> 227	
	<211> 21	

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 227	
	gugggaucac cuccguuuuu u	21
10	<210> 228	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 228	
20	aaaacgguuu cucugccauu u	21
	<210> 229	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 229	
30	ugauacaacu uggaauuggu u	21
	<210> 230	
	<211> 21	
	<212> ARN	
35	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
40	<400> 230	
	ccaaucccua ugucagcauu u	21
	<210> 231	
	<211> 21	
45	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
50	<400> 231	
	augcugacaa auugaucau u	21

REIVINDICACIONES

1. Un complejo de ARNip multivalente que consiste en:

- 5 (a) un primer polinucleótido que es total o parcialmente complementario a una primera secuencia diana, en donde el primer polinucleótido es de 15-30 nucleótidos de longitud y en donde el primer polinucleótido es capaz de dirigirse a y reducir la expresión de la primera secuencia diana;
- (b) un segundo polinucleótido que es total o parcialmente complementario a una segunda secuencia diana, en donde el segundo polinucleótido es de 15-30 nucleótidos de longitud y en donde el segundo polinucleótido es capaz de dirigirse a y reducir la expresión de la segunda secuencia diana; y
- 10 (c) un tercer polinucleótido que es o (i) total o parcialmente complementario y capaz de dirigirse a y reducir la expresión de una tercera secuencia diana o (ii) no específico para ninguna secuencia diana, y en donde el tercer polinucleótido es de 15-30 nucleótidos de longitud,
- 15 en donde una región 5' del primer polinucleótido es complementaria a una región 3' del tercer polinucleótido, en donde una región 3' del primer polinucleótido es complementaria a una región 5' del segundo polinucleótido y en donde una región 3' del segundo polinucleótido es complementaria a una región 5' del tercer polinucleótido; en donde los tres polinucleótidos separados se hibridan a través de sus regiones 3' y 5' complementarias para formar un complejo polinucleotídico con una primera, una segunda y una tercera región bicatenaria; y
- 20 en donde la primera, la segunda y la tercera regiones bicatenarias son de 5-12 pares de nucleótidos de longitud.

2. El complejo de ARNip multivalente de la reivindicación 1, en donde cada uno del primer, el segundo y el tercer polinucleótidos son total o parcialmente complementarios a una secuencia diana diferente.

- 25 3. El complejo de ARNip multivalente de la reivindicación 1, en donde: cada una de dichas primera, segunda y tercera secuencias diana están presentes en el mismo gen, ADNc, ARNm o microARN, o al menos dos de dichas primera, segunda y tercera secuencias diana están presentes en diferentes genes, ADNc, ARNm o microARN.

- 30 4. El complejo de ARNip multivalente de la reivindicación 1, en donde toda o una parte de la región 5' y/o 3' de cada polinucleótido también es complementaria a la secuencia diana para ese polinucleótido.

- 35 5. El complejo de ARNip multivalente de la reivindicación 1, en donde una o más de las regiones autocomplementarias comprenden un saliente 3'.

6. Una molécula de ARNip multivalente autohibridante que consiste en una molécula polinucleotídica individual, comprendiendo la molécula polinucleotídica individual

- 40 (a) una primera región específica de diana que es total o parcialmente complementaria a una primera secuencia diana, en donde la primera región específica de diana es de 15-30 nucleótidos de longitud y en donde la primera región específica de diana es capaz de dirigirse a y reducir la expresión de la primera secuencia diana;
- 45 (b) una segunda región específica de diana que es total o parcialmente complementaria a una segunda secuencia diana, en donde la segunda región específica de diana es de 15-30 nucleótidos de longitud y en donde la segunda región específica de diana es capaz de dirigirse a y reducir la expresión de la segunda secuencia diana; y
- (c) una tercera región que es o (a) una región específica de diana que es total o parcialmente complementaria y capaz de dirigirse a y reducir la expresión de una tercera secuencia diana o (b) no específica para ninguna secuencia diana, y en donde la tercera región específica de diana es de 15-30 nucleótidos de longitud
- 50

en donde una región 5' de la primera región específica de diana es complementaria a una región 3' de la región específica de diana, en donde una región 3' de la primera región específica de diana es complementaria a una región 5' de la segunda región específica de diana y en donde una región 3' de la segunda región específica de diana es complementaria a una región 5' de la tercera región específica de diana; en donde cada una de las regiones 5' se une o hibrida con otra región específica de diana de la misma molécula polinucleotídica individual a través de las regiones 3' y 5' complementarias para formar una molécula polinucleotídica autohibridante que tiene una primera, segunda y tercera región autocomplementaria, en donde la primera, la segunda y la tercera regiones autocomplementarias comprenden una primera, una segunda y una tercera región bicatenaria; en donde las regiones específicas de diana de cada una de la primera, la segunda y la tercera secuencias de nucleótidos son complementarias a una secuencia diana diferente; y en donde la primera, la segunda y la tercera regiones bicatenarias son de 5-12 pares de nucleótidos de longitud.

55

60

- 65 7. La molécula de ARNip multivalente autohibridante de la reivindicación 6, en donde la primera, la segunda y la

tercera regiones autocomplementarias comprenden al menos una estructura de tallo-bucle que comprende la primera, la segunda o la tercera región bicatenaria y una secuencia de bucle que comprende al menos 2 nucleótidos.

5 8. La molécula de ARNip multivalente autohíbrida de la reivindicación 6, en donde una o más de las regiones autocomplementarias comprenden un saliente 3'.

9. La molécula de ARNip multivalente autohíbrida de la reivindicación 6, en donde una o más de las regiones autocomplementarias comprenden (i) una secuencia proximal de dinucleótidos AG/UU que está fuera de la región específica de diana; o
10 (ii) una secuencia distal de 4 nucleótidos que está fuera de la región específica de diana, en donde el tercer nucleótido de la secuencia distal no es una G.

10. La molécula de ARNip multivalente autohíbrida de la reivindicación 6, en donde las regiones específicas de diana de cada una de la primera, la segunda y la tercera secuencias de nucleótidos son complementarias a una
15 secuencia diana diferente.

11. La molécula de ARNip multivalente autohíbrida de la reivindicación 6, en donde cada una de dichas primera, segunda y tercera secuencias diana están presentes en el mismo gen, ADNc, ARNm o microARN.

20 12. La molécula de ARNip multivalente autohíbrida de la reivindicación 6, en donde al menos dos de dichas primera, segunda y tercera secuencias diana están presentes en diferentes genes, ADNc, ARNm o microARN.

13. Un vector que codifica una molécula de ARNip multivalente autohíbrida según una cualquiera de las reivindicaciones 6-12.
25

14. Un método no terapéutico para reducir la expresión de un gen, que comprende introducir un complejo de ARNip multivalente de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, una molécula de ARNip multivalente autohíbrida de una cualquiera de las reivindicaciones 6-12 o un vector de la reivindicación 13 en una célula.

30 15. Un complejo de ARNip multivalente de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, una molécula de ARNip multivalente autohíbrida de una cualquiera de las reivindicaciones 6-12, un vector de la reivindicación 13 o un método de la reivindicación 14, en donde cada una de dos o más de la primera, la segunda y/o la tercera regiones específicas de diana es complementaria a una región diana diferente en un transcrito de ARNm de un gen del VIH o cada una de dos o más de la primera, la segunda y/o la tercera regiones específicas de diana es complementaria a
35 una región diana diferente en un transcrito de ARNm de un gen de la apolipoproteína B humana (ApoB).

16. Una composición farmacéutica que comprende un complejo de ARNip multivalente de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o una molécula de ARNip multivalente autohíbrida de una cualquiera de las reivindicaciones 6-12.
40

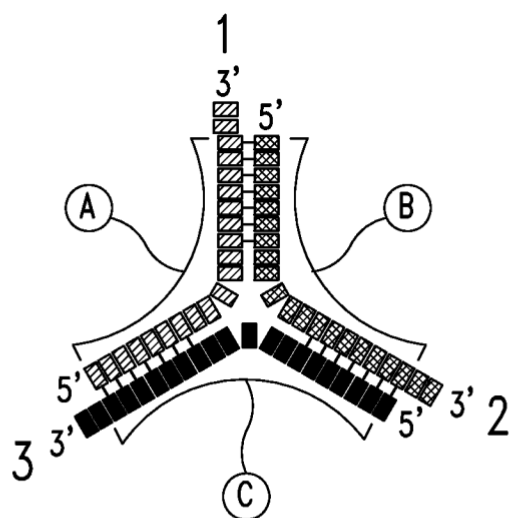


FIG. 1

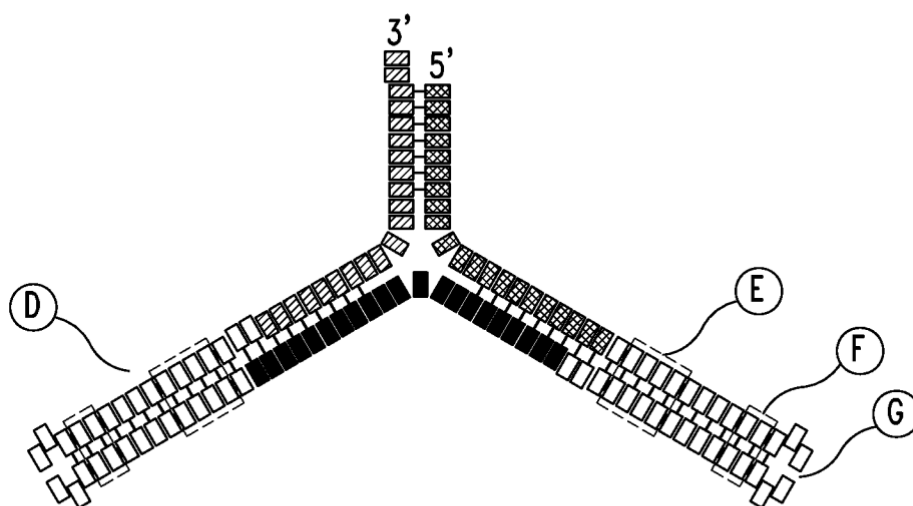


FIG. 2

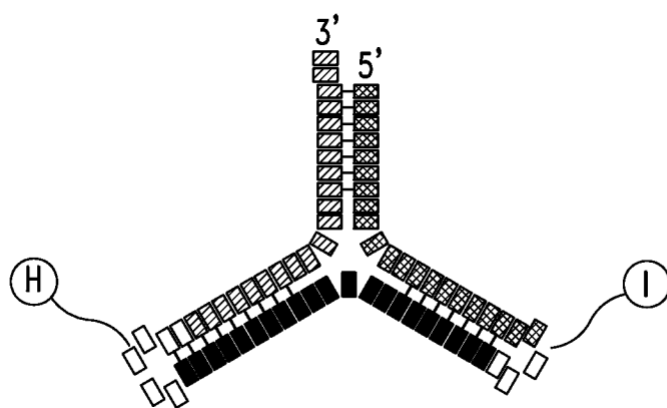


FIG. 3

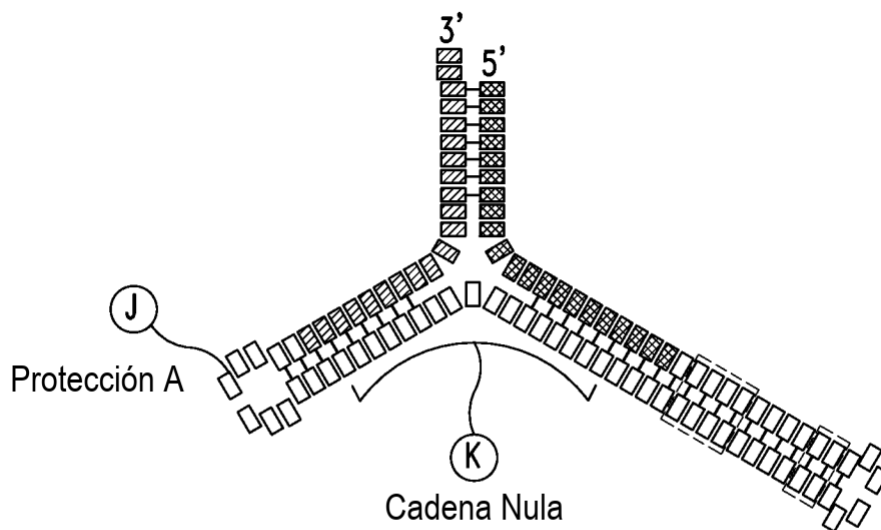


FIG. 4

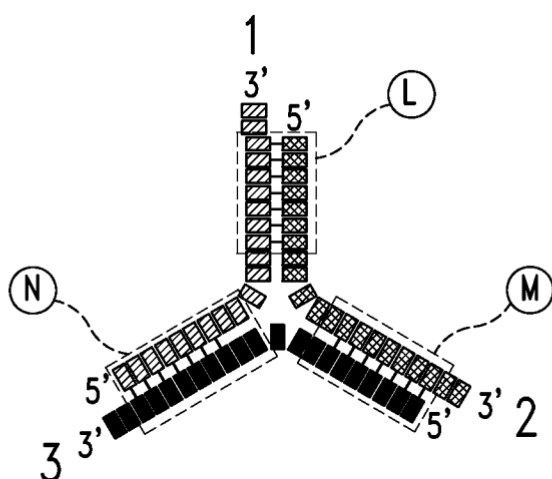


FIG. 5

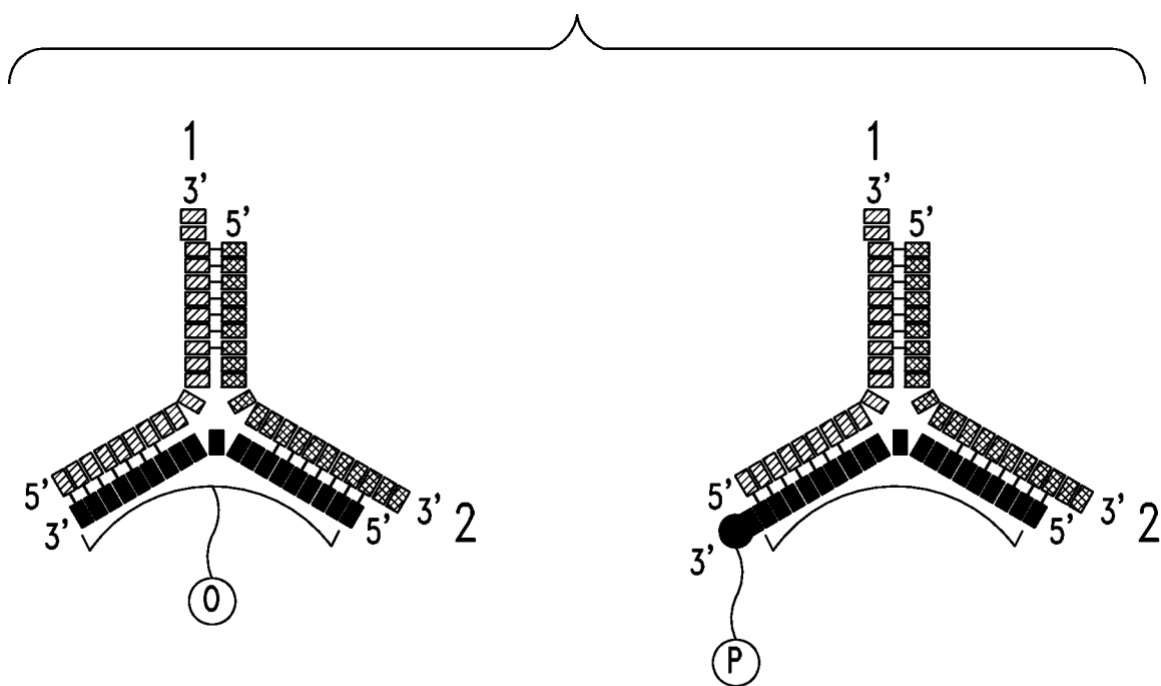


FIG. 6

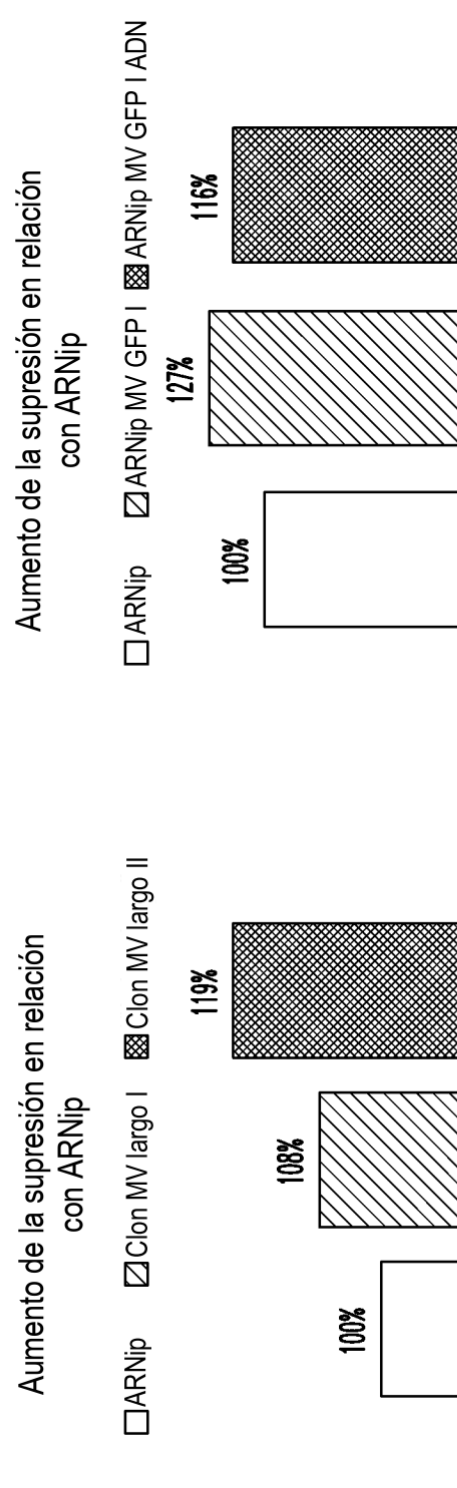


FIG. 7A

FIG. 7B

Direcccionamiento GFP

AUGGUGAGCAAGGGCGAGGAGCUGUUACACCGGGGUGGUGCCAUCCUGGUGAGCUGGACGGCGACGUAA
ACGGCCACAAGUUCAGGUGUCCGGGAGGGCGGCGaUGCCaCCUACGGCAAGCUGACCCUGAAGUU
 CAUCUGCACCACCGGCAAGCUGCCGUGCCUGGCCACCCUGUGACCACCUGACCUACGCGUGCAG
 UGUUUCAGCCCGUACCCGACCACAUGAGCAGCAGAUUCUUAAGUCCCAUGCCGAAGGCUAAG
 UCCAGGAGCGCACAUUCUUACAAGGACGCGCACUACAAGACCCGCGGAGGUGAAGUUCGAGGG
 CGACACCCUGGUAACCGCAUCGAGCUGAAGGGCAUCCGACUUAAGGAGGACGGCAACAUCCUGGGGCAC
 AGCUGGAGUACAUAACACAGCCACAACGUCUAUAUCAUGGCCGACAAGCAGAGAACGGCAUCAAGG
 UGAACUUCAAGAUCCGCCACAACAUCCAGGACGGCAGCGUGCAGCUUGCCGACCAUACCAGCAGAACAC
 CCCCAUCCGGCAGCGCCCGUGUGUCGCCGACACCACCACUACCUGAGCACCCAGUCCGCCCGGAGCAAA
 GACCCCAACGAGAAGCGGAUCAAGGUCCUGGAGAUUCGUGACCGCCCGGGGAUCACUCUCGGCA
 UGGACGAGCUGUACAAGUAAA

FIG. 8A

Direcccionamiento GFP

AUGGUGAGCAAGGGCGAGGAGCUGUUACACCGGGGUGGUGCCAUCCUGGUGAGCUGGACGGCGACGUAA
 ACGGCCACAAGUUCAGGUGUCCGGGAGGGCGAGGGCGaUGCCaCCUACGGCAAGCUGACCCUGAAGUU
 CAUCUGCACCACCGGCAAGCUGCCCGUGCCUGGCCACCCUGUGACCACCUGACCUACGCGUGCAG
 UGUUUCAGCCCGUACCCGACCACAUGAGCAGCAGCACUUCUUAAGUCCCAUGCCCGAAGGCUAAG
 UCCAGGAGCGCACAUUCUUACAAGGACGACGGCACUACAAGACCCGCGCGAGGUGAAGUUCGAGGG
 CGACACCCUGGUAACCGCAUCGAGCUGAAGGGCAUCCGACUUAAGGAGGACGGCAACAUCCUGGGGCAC
 AGCUGGAGUACAUAACACAGCCACAACGUCUAUAUCAUGGCCGACAAGCAGAGAACGGCAUCAAGG
 UGAACUUCAAGAUCCGCCACAACAUCCAGGACGGCAGCGUGCAGCUCCGACCACUACCGCAGAACAC
 CCCCAUCCGGCAGCGCCCGUGUGUCGCCGACAACCACUACCUGAGCACCAGUCCCGCCUGAGCAAA
 GACCCCAACGAGAAGCGGAUCAAGGUCCUGGAGAUUCGUGACCGCCCGGGGAUCACUCUCGGCA
 UGGACGAGCUGUACAAGUAAA

FIG. 8B

Direccionamiento GFP

AUGGUGAGCAAGGCGAGGAGCUGUUACCGGGGUGUGCCCAUCCUGGUCGAGCUGGGACGGCGACGUAA
 ACGGCCACAAGUUCAGCGUGUCCGGGAGGCGAGGGCGAUGCCACCUACGGCAAGCUGACCCUGAAGUU
 CAUCUGCACCCACCGCAAGCUGCCGUGCCUGGCCCAUCCUGGACCAUCCUGACCUACCGGUGCAG
 UGCUUCAGCCGUACCCGACCAUGAAGCAGCAGACUUCUUAAGUCCGCAUCCGGAAGGCUACG
 UCCAGGAGCGCACCAUCUUUUAAGGACGACGGCAACUACAAAGACCCGCGCGAGGUGAAGUUCGAGGG
 CGACACCCUGGUGAACCGCAUJGAGCUGAAGCGCAUCCGACUUCAAGGAGGACGGCAACAUCUUGGGCAC
 AAGCUGGAGUACAAUACAACAGCCACAACGUCUAUAUCAUGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCAUCAAGG
 UGAACUUCAAGAUCCGCCACAACAUCGAGGACGGCAGCGUGCAGCUQCGCGACCAUACCGCAGAACAC
 CCCCaucGGGACGGCCCCGUGCUGCCCCGACAAACCAUACCUAGCACCCAGUCCGCCUGAGCAA
 GACCCCAACGAGAAGCGCGAUCACAUGGUCCUGCUGGAGUUCGUGACCGCCGCGGGAUCAUCUCUGGCA
 UGGACGAGCUGUACAAAGUAAA

FIG. 8C

% de inhibición de VIH

□ ARNip ▨ ARNip MV

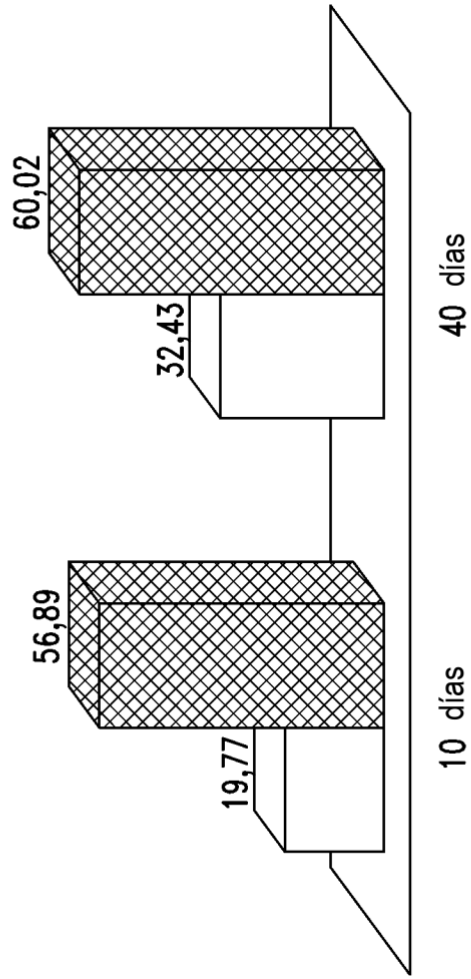


FIG. 9

GENOMA DE VIH ILUSTRATIVO:

GUCUCUCUGGUJAGACCAGUUCUGAGCCUGGGAGCUCUCUGGCUAACUAGGGAACCCACUGCUUAAGCCUCAUAUAAAG
 CUUGCCUUGAGUCUUAAGUAGUCUGCCUGUCUUGUUGUACUCUCUGUAAUAGAGAUCCUCAGAACCCUUUUA
 GUCAGUGUGGAAAUUCUCUAGCAGUGGCCGCCGAACAGGCACAUAGAAAGGAAACAGAGAGCUCUCUCGGA
 CCGAGGACUCGGCUCUGAGCGGCCACCGCAAGAGCGGCGCGCAUCUGUGAGUAAGCCAAAUUUUUGACU
 AGCGGAGGCUAGAACGAGAGAGUUGGUGCGAGAGCGUCAGUAUUAAGCGGGGAAAUUAGAUCCGAUAGGAAUAAU
 UCGGUUAAAGGCCAGGGGAAAGAAAUAAUAAAUAAAUAGUAUAGGGAAGCAGGAGCUAGAACGAUUUCGC
 AGUUAUCCUGGCCUGUAGAAACAUCAGAAAGCGUGUAGACAAAUACUGGGAACAGCUACAAACCAUCCUUCAGACAGG
 AUCAGAAAGAACGUAGAUCAUUAUUAUACAGUAGCAACCCUCUAUUGUGCAUCAAAGGAUAGAGAUAAAGACAC
 CAAGGAAGCUUAGACACAGUAGAGGAAGAGCAAAACAAGUAGAAAGCAAGCAAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGG
 ACACAGCAGCCAGGUCAGCCAAAUUACCCUUAUGUGCAGAAACAUCCAGGGGCAAUUGGUACAUAGGCCCAUUCACC
 UAGAACUUUAUAUGCAUGGGUAAAGUAGUAGAGAGAGAGCGCUUUCAGCCAGAGUUAUCCAUUUUCAGCAU
 AUCAGAAGGAGCCACCCACAGAUUUAACAACCAUGCUAAACACAGUGGGGGACAUCAAGCAGCCAUUGCAAUGUU
 AAAAGAGACCAUCAUGAGGAAGCUGCAGAAUGGGAUAGAGUGCAUCCAGUGCAGGCGCUUUGCAGCCAGGCCA
 GAUGAGAGAACCAAGGGAGUGACAUAGCAGGAACUACUAGUACCCUUCAGGAACAUAUAGGAUGGAUAGACAUA
 UCCACCUAUCCAGUAGGAGAAUCUUAUAAAGAUAGUAUCCUGGGAUUAUAAAUAGUAAGAAUGUAUAGCCC
 UACCAGCAUUCUGGACAUAAAGACAGGACCAAGGAACCCUUUAGAGACUAUUGUAGACCGAUUCUUAUAAACUCUAAG
 AGCCGAGCAAGCUUACAAAGAGGUAAAUAAUUGGAUGACAGAAACCUUGUUGUCCAAAUGCGAAACCCAGAUUGUAA
 GACUAUUUUAAGCAUUGGGACCAGGAGCCACACUAGAGAAAUAGUACAGCAUGUCAGGGAGUGGGGACCCCGG
 CCAUAAAGCAAGAUUUGGCUAGCAAGCAUUGAGCCAGUAACAUAUCCAGCUACCAUUAUGAUACAGAAAGGCAAUU
 UAGGAACCAAAGAAAGACUGUUAAGUGUUAUUGUGGCAAGAGGGCACAUAAGCCAAAUAUUGCAGGGCCCCUAG
 GAAAGGGCUGUUGGAAAUUGUGGAAAGGAAGGACACCAAUGAAAGAUUGUACUGAGAGACAGGCUAAUUUUUAGG
 GAAGAUUCUGGCCUCCACAGGGAAGGCCAGGGAUUUUUCUUCAGAGCAGACAGAGCCACAGCCCAAGGAAAG
 GAGCUUCAGGUUGGGAGAGACAAACUCCUUCUUCAGAGAGCAGGAGCCGUAAGACAAGGAACUGUAUCCUUAAGC
 UUCCUUCAGAUACUUCUGGCAAGGACCCUUCGUCACAAUAAAGAUAGGGGGCAUUAAGGAAGCUCUAUAGAU
 ACAGGAGCAGAUAGUAUAGAAAGAAUUGAAUUGCCAGGAAGAUUGGAACCAAUAUAGUAGGGGAUUGGA
 GGUUUUAUCAAAGUAAAGACAGUAUGAUACAGUAUCUCAUAGAAAUUCUGGGGACAUAAAGCUUAUAGGUACAGUAUAGUA
 GGACCUACACCCUGUACAUAAUUGGAAGAAUUCUGUUGACUCAGAUUGGCUGGCAUUAUAAUUUCCCAUUGUCCU
 AUUGAGACUGUACCAUAAAUUAAAGCCAGGAUUGGAUGGCCCAAAAGUUAACAUAUGGCCCAUUGACAGAGAAAAA
 AUAAAGCAUUAUAGAAAUUUGUACAGAAUUGGAUAGGAAGGAAAUUUCAAAUAUUGGGCCUGAAAUAUCCAUAC
 AAUACUCCAGUAUUGCCAUAAAGAAAAGACAGUACUAAUUGGAGAAAUUAGUAGAUUUCAGAGAAACUUAUAG
 AGAACUCAAGAUUUCUGGGAAGUUCAAUUAAGGAUUAACCAUCCUGCAGGGUUAACACAGAAAACAGUAACAGUA
 CUGGAUGUGGGCGAUGCAUUAUUUUUCAGUUCUCCUJAGAUAAAGACUUCAGGAAGUAUACUGCAUUAUACCAUACCUUAGU

FIG. 10A

AUAAACAAUGAGACACACGGGAUUAGAUUUCAGUACA AUGUGCUUCCACAGGGAUGGAAAGGAUACACCAAAUUC
 CAGUGUAGCAUGACAAAAUUCUUAGAGCCUUUAGAAACAAAAUCCAGACAUAGUCAUUCUAUCAAUACAUUGGAUGAU
 UUGUAUGUAGGAUCUGACUUAGAAAUAGGCGCAGCAUAGAAACAAAAUAGAGGAACUCAGAGACAAACUUCUGUGAGGUGG
 GGAUUUACCAACACAGACAAACAAUACAGAAAGAACCUCAUCCUUGGAUGGUAUAGAACUCCAUCCUGAUAAA
 UGGACAGUACAGCCUUAUGUGCUCACAAAGGACAGCUGGACUGUCAUGACAUACAGAAAUUAGUGGGAUAAUUG
 AAUUGGGCAAGUCAGAUUUAUGCAGGAUUAAAGUAAGGCAUUUUGAAACUUCUUGGGGAACCAAAGCACUAACA
 GAAGUAGUACCAUAAACAGAAAGACAGAGCUAGAAACUGGCAGAAACACGGGAGAUUUCUAAAAGAACCGGUACAUAGA
 GUGUAUUAUGACCCAUCAAAGACUUAUAGCAGAAAUACAGAAAGCAGGGCAAGGCCAAUGGACAUAUCAAUUUUAU
 CAAGAGCCAUUUAAAACUCUGAAACACAGGAAGUAUGCAAGAAUGAAGGGUGCCACACUAUAGUUGUAAAACAUAU
 ACAGAGGCAGUACAAAAAUAGCCACAGAAAGCAUAGUAAUUGGGGAAAGACUCCUAAAUUUAAAUAUACCCAUACAA
 AAGGAACAUGGGAGCAUGGUGGACAGAGUAUUGGCAAGCCACUUGGAUUCUGAGUGGAGUUGUCAUAUACCCCU
 CCCUAGUGAAGUUAUGGUACCCAGUUAAGAGAAAGAACCCAUAAUAGGAGCAGAAACUUUCUUAUGUAGAUUGGGCAGCC
 AAUAGGGAAACUAAAUUAGGAAAGCAGGAUAUGUAAACUGACAGAGGAAGACAATAAGUUGUCCCCUACGGACACA
 ACAAAUCAGAGACUGAGUUACAAGCAAUUCUAGCUUUGCAGGAUUCGGGAUAGAGUAAACAUAUGACAGAC
 UCACAAUUGCAUUGGGAUUCUACAGCAACCAACAGAUAAAGAGUGAAUCAGAGUUAGUCAGUCAAUAUAGAGCAG
 UUAUAAAAGGAAAGAGUUAACUGGCAUGGUACCCAGCACACAAAGGAUUGGAGGAAUAGACACAGUAGAUAAA
 UUGGUCAGUCUGCAAUCAGGAAGUAACUAUUUUAUGAUGGAUAGAAUAGCCCAAGAGAAACAUGAGAAAUUAUCAC
 AGUAUUGGAGAGCAAUGGCUAGUGAUUUUAAACCUACCCUUAUGUAGCAAAAGAAUAGUAGCCAGCUUGUGAUAAA
 UGUCAGCUAAAGGGAGGCCAUGCAUGGACAAGUAGACUGUAGCCAGGAUAUUGGCAGCUAGAUUGUACACAUUUA
 GAAGGAAAGUUAUCUUGGUAGCAGUUAUGUAGCCAGUGGAUUAUAGAGCAGGAAGUAUUCAGCAGAGACAGGG
 CAAGAAACAGCAUACUUCUUCUUAUAAUUAAGCAGGAAGUUGGCCAGUAAACAGUACAUACAGACAAGGGCAGCAAU
 UUCACCAUACAGUUAAGGCCCGCCUGUUGUGGGGGGAUCAAGCAGGAUUUUGGCAUUCUCCUACAAUCCCAA
 AGUCAAGGAGUAUAGAAUCUAUGAAUAAAGAAUUAAGAAAUUAUAGGACAGGUAAAGAGAUACAGGCUGAACAUUU
 AAGACAGCAGUACAAUUGGCAGUUAUUCACAAUUAAGAAAGAAAGGGGGGAUUGGGGUAACAGUGCAGGGGA
 AGAAUAGUAGACAUAAUAGCAACAGACAUACAACUAAGAAUUAACAACAAAUUACAAAUUCAAUUAUUCGG
 GUUUAUUAACGGGACAGCAGAUCCAGUUGGAAGGACCCAGCAAGCUCUUGGAAGGUGAAGGGGAGUAGUA
 AUACAAGAUAAUAGUGACAUAAACUAGUGCCAGAAAGCAAGAUCAUCAGGGAUUUUGGAAACAGAUUGGCA
 GGUGAUGAUUGUGUGGCAAGUAGACAGGAUGAGGAUUAACACUAGGAAGAUUAGUAAAACACCAUUAUGUAUUUUC
 AAGCAAGCUAAGCAUGGUUUUAUAGACAUCACUAUGAAAGUACUAAUCCAAAUAUAGUUCAGAGUACAUCC
 ACUAGGGGAUCCUAAAUAAGUAAUAAACAUAUUGGGGUCUGCAUACAGGAGAAAGACACUGGCAUUUGGGUACAGG

FIG. 10B

AGUCUCCAUAAGAGGAAAGAGAGUAUAGACACACAAGUAGAGCCUGAGCCUAGCAGACCAACUAAUUCUUCUGCA
 CUUUUUUGAUUUGUUUCAGAAUUCUGCUUAUAAAGAAUACCAUAUUAGGACGUUAAGUUAGUCCUAGGUGUGAAUAUCA
 AGCAGGACAUAAACAAGGAGGAUCUCUACAGUACUUGGCACUAGCAGCAUUAAUAAACCAAACAGAUAAAGCCACC
 UUGCCUAGUGUUAGGAAACUGACAGAGGACAGAUAGGAACAAGCCAGAGACCAAGGCCACAGAGGGAGCCAUAC
 AAUGAAUGGACACUAGAGCUUUUAGAGGAAACUUAAGAGUAGAGCUUUGUAGACAUUUUCCUAGGAUUGGCUCCAUAC
 UUAGGACACAUUCUUAUGAAACUUAACGGGAUACUUGGCGAGGAGUGGAGCCAUAAUAGAAUUCUGCAACAACUG
 CUGUUUACCAUUCAGAAUUGGUGUGACAUAGCAGAAUAGGCGUUAUCGACAGAGGAGCAAGAAUUGGAGCC
 AGUAGAUCCUAGACUAGAGCCUGGAGCAUCCAGGAGUCCAGCCUAAACUGCUUUAUCCAAUUGCUAAUUGUAAA
 GUGUUGCUUUAUUGCCAAAGUUUUAUUAACAAGCCUUAAGGCAUCUCCUUAUGGCGAGAAAGCCGGAGACAGCG
 ACGAAGACCUCUACAGGCAUUCAGACUCUACAAGUUCUCUUAUCAAGCAGUAGUAUACAUGUAUUGCAACCUAU
 ACAAUAGCAUAGUAGCAUUAAGUAGCAUAAUUAUAGCAUAGUUGUGUGUCCAUAGUAUACAUAAGAAUAUAG
 GAAAUUAAGACAAAGAAUUAAGACAGGUUAAUUGAUAGACUUAUAGAAAGACAGACAGAGGCAAUAGAGAG
 UGAAGGAGAAUAUCAGCAUUGGAGAUUGGGUGGAGUUGGCAUUGGCUCCUUGGGAUGUUGAUGAUCUGUA
 GUGCUACAGAAAUUUGGGUACAGUCUAUUAUGGGUACCUUGUGGAGGAGCAAGCAACCAACUUAUUUGUG
 CAUCAGAUUGCUAAAGCAUUAUGAUACAGAGGUACAUAUUGUUUGGCCACACAUGCCUGUGUACCCACAGACC
 CACAAGAGUAGUAUUGGUAAUUGUGACAGAAAUUUUAACAUGUGGAAUAAUAGACUUGUUAUUAAGUGCAGG
 AUUAUUCAGUUUAUGGGAUCAAAGCCUAAAGCCUUGUUAUAAUUAACCCUUGUUAUUAAGUGCAUG
 AUUUGAAGAAUGAUACUAAUACCAUAGUAGUAGCCGGAGAUAGUAUUGGAGAAAGGAGAGAUAAUAAACUGCUUU
 UCAAUAUCAGCACAAAGCAUAGAGGUUAGGUGCAGAAAGAAUUAUGCAUUUUUUAUAAACUUGAUUAUUAUACCAUAG
 AUAUAGAUACUACAGCUUAUUGUGUACAAAGUUGUACACCCUAGCUUAUAGCAGCCUGUCCAAAGGUUACCUUUG
 AGCCAAUUCUCAAUUAUUGUGCCCGGUGUUUGUGAUUUAUAAUAGUAAUAAUAGACGUUCAAUGGAAACAG
 GACCAUGUACAAUUGUCAGCACAGUACAUGUACACAUGGAUUAAGCCAGUAGUAUCAUCUACUGCUUUAUUAUG
 GCAGUCUAGCAGAAAGAGGUAGUAUUAAGAUUCUGUCAAUUUICACGGACAAGCUUAAACCAUAAUAGUACAGCUGA
 ACAUUCUGUAGAAUUAUUGUACAGACCCACAACAUAACAAGAAUAAUCCGUUUAUCCAGAGGGACCCAGGGA
 GAGCAUUGUUACAUAAGGAAUUAAGGAAUUAUGAGACAAAGCAUUGUAACAUAUAGUAGAGCAAAUUGGAAUGCCA
 CUUUAACAAGAUAGCUAGCAAUUAAGAGAAACAUAUGGAAUUAUAAACAUAUUCUUAAGCAAUCCUACAGGAG
 GGGACCCAGAAAUUGUAAACGCAAGUUUUAUUGUGGAGGGGAUUUUUUAUCUGUAUUAACAACAACUGUUUAUA
 GUACUUGGUUUAUUAUACUUGGAGUACUGAAGGUCAAUUAACACUGAAGGAAUGAGACAAUACACACUCCCAUGCA
 GAUAUAAACAUTUUAUAAACAUGUGGCAGGAAGUAGGAAAGCAUUGUAUGCCUCCUCCUACAGCGGACAAUUAAGU
 GUUCAUCAAAUUAACAGGCGUCUUAUUAACAAGAGAUUGGUGUAUUAACAACAUGGGUCCGAGAUUCUACAGACCUG
 GAGGAGGAGAUUAGAGGGAUUAUUGGAGAGUGAAUUAUUAUAAUUAUAAAGUAGUAAUUAUUAACCAUUAAGGAGUAG
 CACCCACCAAGGCAAGAGAGAGUGGUGCAGAGAGAAUUAAGACCAGUGGGAUAGGAGCUUUGUCCUUGGGUUCU
 UGGAGCAGCAGGAAGCAUUGGGCGCAGGUCUUAUGACGUGACGGAUAGCCAGCCAGACAAUUAUUGUCUGGUUAG
 UGCAGCAGCAGAAACAUUUGCUGAGGGCUUAUUGAGGGCAACAGCAUCUGUUGCAUCUACAGUCUGGGCAUCAAGC
 AGCUCCAGGCAAGAAUCCUGGCUUGGAAAGAUACCUAAAGGAUCAACAGCUCCUGGGGAUUUGGGUUGCUCUGGAA

FIG. 10C

FIG. 10D


```

>gi|9629357:5771-8341 Virus de la inmunodeficiencia humana 1, genoma completo (gen de ENV)
ATGAGAGTGAAGGAGAAATATATCAGCACTTGTGAGATGGGGTGGAGATCGGCGCACCATCTCTCTTGGGATGTTTCATGATCTCTPAG
TGCTACAGAAATATCTGGGTACAGTCTATATGGGTACCTGTGTGGAAGGAAGCAACCCACCTCTATTTTGTGCATCAGATG
CTAAAGCATATGATACAGAGGTACATAATGTTTGGGCCACACATGCTGTGTGPAACCCACAGACCCCAACCCACAAGAGTAGTATTG
CTAAATGTGACAGAAATTTTAAATGTTGGAAATATGACATGATAGAACAGATGATGAGATATATATCAGTTTATGGGATCAAAAG
CCTAAAGCCATGTGTAAATTAACCCACTCTGTGTAGTTTAAAGTGCACCTGATTGAAGATGATACATAATACCAATAGTAGTA
GGGGAGAAATGATAATGGAGAAAGGAGAGATAAAACCTGCTCTTTCAATATCAGCACAAAGCATAAAGGTAAGGTGAGAAAGAA
TAGTCATTTTATATAAATCTTGATATATAACCAATAGATAATAGATACTACCACTATATAAGTTGACAAAGTTGTAAACCTCAGTCAT
TACACAGGCCCTGTCCAAAGGATCTCTTTGAGCCCAATTCOCATACATTTATTTGTCCTCCCTGGTGTGCGATTCTTAAATGTATA
ATAAGACGTTCAATGGAAACAGGACCATGTACAAATGTCAGCACAGTACATGTACACATGGGAATTAGGCCAGTAGTATCAACTCAA
CTGCTGTAAATGGCAGTCTAGCAGAAAGAGAGGTAGTAAATTAGATCTGTCAATTTTCACGGACAAATGCTAAACCAATATAGTACA
GCTGAACACATCTGTAGAAATTAATTTATACAGACCCCAACAAATACAGAAATCCGTATCCAGAGAGGACCCAGGAGAGAG
CAATTGTTACAAATAGGAAATATAGGAAATATGAGACAAAGCACATTTGTAACATAGTAGAGCAAAATGGAATAACACTTTAAACAG
ATAGCTAGCAAAATTAAGAGAAACAAATTTGGAATATAAATAATCTTTAAGCAATCTCAGGAGGGGACCCAGAAATGTAAAC
GCACAGTTTAAATGTGAGGGGAAATTTTCTACTGHAATTCACACAACTGTTTAAATAGTACTTGGTTAANTAGTACTTGGAGTA
CTGAAGGCTCAATTAACACTGAAGGAAGTACACAAATCAACCTCCATGCCAGATAAAACAAATTAATAACATGTGGCAGAAAGTA
GGAAAGCAATGTATGCCCTCCATTCAGTGGACAAATTAGATGTTTCAATCAATATTACAGGCTGCTATTAAACAAGAGATGCTGG
TAATAGCAACAATGAGTCCGAGATCTTCAGACCTGGAGAGGAGATATGAGGGAACAATTGGAGAAAGTGAATTTATATAATATAAG
TAGTAAATAATTGAACCAATTAGAGTAGCAACCCACCAAGGAAGAGAGTGTGTGCAGAGAAATAAGAGACAGTGGGAATAGGA
GCTTTGTTCCCTTGGGTTCTTGGGACGAGCAAGCACTATGGGCGCAGCTCAATGACGCTGACCGTACAGCCAGACAATTATT
GTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAAACAATTTGCTGAGGGCTATTGAGGGCCAAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCA
AGCAGCTCCAGGCAAGAAATCCTGGCTGTGGAAAGATACTAAAGGATCAACAGCTCCCTGGGATTTGGGTTGCTCTGGAAAACTC
ATTTGCACCACTGTGCTGGCTGGAAATGCTAGTTGGAGTAAPAAATCTCTGGAACAGATTTGGGAATCACACGACCTGGATGGAGTG
GGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAAATCGCAAAACCCAGCAAGAAAGAAATGAACAAGAT
TATTGGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAAATTGGTTTACATPAAACAATTTGGCTGTGGTATATAAATTAATTCATATATGATA
GTAGGAGCTTGGTAGGTTTAAATAGTTTGTCTGTACTTCTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCGAGGATATTCAACCATTTATCGTT
TCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAAGAAAGGTGGAGAGAGAGACAGACAGATCCA
TTTCGATTAGTGAACGGATCCTTGGCACTTATCTGGGACGATCTGGGAGCCTGTGGCTCTTCAGCTACCCACCGCTTGAGAGACTTA
CTCTGTGATTGTAACGAGGATTTGTGGAACCTCTGGGACGACGGGGTGGGAAGCCCTCAATATTGTTGGAAATCTCTACAGTATTG
GAGTCAGCAACTAAAGAAATAGTCTGTGTAGCTTGTCTCAATCCACAGCCATAGCAGTAGCTGAGGGGACAGATAGGTTATAGAG
TAGTACAAGGAGCTGTAGAGCTATTCGGCCACATACCTAGAGAAATAGACAGGGCTTGGAAAGGATTTTGTCTATAA

```

FIG. 11

```
>gi|9629357:336-1838 Virus de la inmunodeficiencia humana 1, genoma completo (gen de GAG)
ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAAGCGGGAGAAATTAGATCGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGAAAGAAAAATA
TAAATTAAACATATAGTATGGGCAAGCCAGGGAGCTAGAAACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCCTGTTAGAAACATCAGAAAGGCTGTA
GACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAGAACTTAGATCATATATAATACAGTAGCAACCCCTCTAT
TGTTGTCATCAAAGGATAGAGATAAAGACACCAAGGAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAGTAAGAAAAAGC
ACAGCAAGCAGCAGCTGACACAGGACACAGCAATCAGGTCAGCCAAAATTACCTATATAGTCCAGAACATCCAGGGGCAAAATGGTAC
ATCAGGCCATATCACCTAGAACTTTAAATGCAATGGTAAAGTAGTAGAGAGAGAGGCTTCAGCCCAAGAGTGATACCCATGTTT
TCAGCATATCAGAAGGAGGCCACCCACAGATTTAACACCATGCTAAACACAGTGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAATGTT
AAAAGAGACCATCAATGAGGAGCTGCAGAAATGGATAGAGTCCATCCAGTGCATGCGGGCCCTATTGCAACAGGCCAGATGAGAG
AAACCAAGGGGAAGTGACATAGCAGGAACCTACTAGTACCCCTCAGCAACAAATAGGATGGATGACAAATAAATCCACCTATCCCAGTA
GGAGAAATTTATAAAGATCGATAATCCTGGGATTAATAAATAGTAAGCAATGTATAGCCCTACAGCAATTCCTGGACATAAGACA
AGGACCAAGGACCCCTTAGAGA CTATGTAGACCGGTTCTATAA ACTCTAAGAGCCGAGCAAGCTTCACAGGAGGTAAAAATT
GGATGACAGAAACCTTGTGTTCCAAAATGCGAACCCAGATTGTAAGACTATTTTAAAGCAATTGGGACCAAGGGCTACACTAGAA
GAAATGATGACAGCATGTACAGGAGTAGGAGGACCCCGCCATAGGCAAGAGTTTGGCTGAAGCAATGAGCCAGTAACAAATTC
AGCTACCATAAATGATGCAGAGGCAATTTTAGGAAACCAAGAAAGATTTAGTGTTCATTTGCTGGCAAGAGAGGGCACACAG
CCAGAAATTCAGGGCCCCCTAGGAAAAAAGGGCTGTTGGAAATGTGAAAGGAGGACACCAATGAAGATTTGTTACTGAGAGACAG
GCTAAATTTTTAGGGAAGATCTGGCCCTTCTTACAAGGAGGCGGAGGAAATTTCTTCAGAGCAGACCCAGAGCCAAACAGCCCAAC
AGAAAGAGAGCTTCAGGTCTGGGGTAGAGACAACTCCCTCAGAAAGCAGGAGCCGATAGACAAAGGAACTGTATCCTTTAACTT
CCCTCAGGTCACTCTTTGGCAACGACCCCTCGTCACATAA
```

FIG. 12A

```
>(gi|9629357:5377-5591, 7925-7970) Virus de la inmunodeficiencia humana 1, genoma completo
(gen de TAT)
ATGGAGCCAGTAGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAGAGCATCCAGGAAAGTCAGCCCTAAAACTGCTTGTACCAATTGCTATTGTAATAAA
GTGTTGCTTTCAATTGCCAAGTTTGTTCATACAAAAGCCTTAGCCATCTCCTATGGCAGGAAGAGCCGAGACAGCGAAGAGAG
CTCATCAGAAACAGTCAGACTCATCAAGCTTCTCTATCAAGCAACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAA
TAG
```

FIG. 12B

111

GUCUUUGGUUGACA CAUUGAAGUUCUAGUUAAGCACAAGGAGUGCAGAGUCUGAAAGCUA CUCUAUGUUCAAUAUAAUUGGA
 GAAGCAGGACC UUAUCUAGUGAAGUCCUAAUUCAGAGGUUGAUGUCAAUCUCCGGACAAUA CUAAGAUAAUGAUAUCUGCU
 AAGGACAAAAACA CUUAACAACUCUCCUGGACAUCUAGAA CAAGAAAUCA CUGAGGUCUCUCUGGGCCACUUGAGUUAUGA
 UAAAAGGGAGAUGGCAAGAUCAAAGGUGUUGUUCUUAACCA CGUUAUCCAGCAGAGCCAGGAGUGAGGUCCACACCCACUGGU
 CCUCCACC AAACUGCUUCCAAUUGGACUAUCUGCUACAGCUUA CGGCUCAA CAUUAUCCAA GAGAGUGA CAUGGGCUUACGAU
 AAUGAGAUAAUAGA AUUGAUGGAACA CGGGAACCAAUGUGGAUACCAAAAAGUGGCCUCCAAUUAUCCUGUGGAUCUUUCCCA
 UUAUCCUAGAAUGUUGCAUGAGUAUGCCAAUGGUCUCCUGGAUCACAGAGUCCUCAAACAGAGUGGACUUUCCGGGACAUGGGUU
 CC AA AUUAUUGUUGCAACAACA CAUGGCUUCAGAUGGCAAC CAGGGGUCUCCUUA CCCCCCAAACUCUACAGGAUCCUCAAU
 AGCCUCUCAGAGUUGAACCCUCCUGAAAUUGGACUGUCUGACUUC CAUUAUCCAGACACCCUUCUAAAGACUGAUGGCAGAGU
 CAAAUACA CAUUAACAGGAACAAAUAA CAUUGACAUC C UUGCCUUGGGUGGCAAGUCUUAAGAGCCUACAGAUGCCAG
 AGAGUGAGGACAC CAGCCCUCAACUUCAGUCUGUGGAUUCUUCUGCCAUUCGAGAGGUCCAGGUCCCCACUUAUACAUC
 CCCAAGACACAUCAGCUUCAAGUGCCUCUUGGGUGUUCUAGACUUUUCACA AAUGUCUACAGCAAUUUGUA CAACUGGUCAGC
 CUCCUACACUGGUGGCAACA CCAGCAGAGACCA CUUCAGCCUUCAGUCCUUCAGUA CCCC AUGAGACUGA CUCUGUGUUGACCUUGU
 UUUCCUACAGUGUGCAAGGACUCUGGAGAA CAACAUAUGACAGCAAGAACAUUUA CAUUGUC CUGUGAUGGAUCUCUACACCAU
 AAUUAUCUAGACUCAA AUUCAAGUACGCCAGUAGAAAUUUGGAAACAGCCCCAGUCUCAAAGGUUUA CUAACA UUGAAAC
 AUUAAGUCCUUGGACCA CAGAUUGUCUACUGUUCACCUUAGACUCAA AAAGAAACAACAUCUAUACGUCAAAGAUUAUCAAAGG
 UUGAUGGACAGUUCAGAGCUUCUUAUUGCUCAAGGCCAAAUUUGCCUGUCUUGUGAGAGAGAUUGUUA CAACUGGCCAGCUG
 AGCGGCGAAUCCAA CAUGAGAUUUAACUCCACCUUCCAGGGCAACCA CCAGAUCCUGGGAAUGUAC CAGGAUGGAGCCUGUC
 CAUCACCUCCACUUCUGACCCUGCAAGAUGGCAUAUUAAGAACACAGCUUCCUUGAAAUUUGAAAAACUAUGAGCUGACUCUGAAAU

FIG. 13B

113

[illegible]

FIG. 13D

CACGGGUUCUUCAGCAACAUGCAGACAGUUCUCAAUGACCAAGAGAAUAACGGCUUGACCCUUGCAGGAUCCUUAGACGACAGCUG
 UGGGACCUUGAAGCUAUCUUUUUACCCAGUAUAUGGCAAGAGCUUGCAGGAACUCCUACAAUUGGAUGGAAAGCGACAGUAUCUICA
 AGCUCAACUUCUCUUCUAUAUACCAAAACCUAAUGGCUAUCUCCUCACUCCCGUGCAAGAACUGGCUGAUAGAUUUUAUA
 UAACAGGGGAUAAAACUAAUUGACUUCAGUGGAGUAAAACUUAUAGAAAGUAUACUUCACCAUUGCCUCAAACCUAAACAAUG
 CUCCCCAAAGUAAAACUCCUGGGAUUGAUCUGUUAACACAGUACUACACAGAGGGGUCCUUGUCCUUAUUUUGAGGCAAC
 UUAACUGAAAUUCAUUAACUGUAUCCAGUUUACACUCCAAAGAGCCUUCACUUGGCAACACACAGUCUUUGAUUCUGAAUAAGU
 UGGCCAAACAUGAUUGCCGAUGUUGACCUUGUACCCUGCCUGAGCAGACUAUUGUAUAAUCCACCCUUGGAGUUCUCUGUA
 CCUGCUGGGAUUUUUAUCCUUUUCUUUGGAGAACUGACUGCACUGUGGAGUGGUUCCUCCUGUAUAUGUCAUUUGGAGCGC
 UGGUUGGAAAACCAAAGCAGAUCAUGUUGAAACGUUCCUAGAUUCCAUUGGCAUUAACCUUGCAGUUUUGGAGUAUGCUUUAA
 AAGUUGUAGAAACACACAAAUUGAAGAGUUCUGUUAACCUUAUAAUUAUCAAAGGAACACUUCACACUGUGACUUCAAUUGUGGAG
 UAUAUUGAAGUGGUUUAUUAAGGACUUUGGACUGGCAGGAGAGGCUACCCUGGACAUACCCAGCCACACUGACUGACUU
 UCAUCUGUACUACAAGAGACAAAGACAGUCUGUCUCCAGCAGCCUCCUGGACCAUUGGCAUUGUGGUUUGGUAUUGGAGCA
 CAGAUACCAAGUGUGGAGCUGAUGUUCUUCUCCACCCACAGUCCUCCAGAGAGAAACUCAGCAUUAUCAAACUGAGUGG
 AGGUACAAGGAGUCUGAUGGGAAGGUACAUCAAAUAUUGGGAAGAGAGGAGCUUCCAGAUUGCUAGGCUCCUAAAAG
 CAAUGUGCCCAAGGUUCUAAGGUUAUUAUGAUUAUCCAAUUAAGUAACCCUUGAAUACGUUUUCUUCAGAAACUAAAGAAUAGUC
 UACAGGUCAUUGCUGAACAUUGCCAGAGAGGUUGAUGAAUUGAACAUUGAGUUCUCCAGAGUAGCCUGUAUACCUACCGAAU
 CUCUAUGAGGAGUUGUGCUCAGAGAGCCUGAGCAUCCUGAGAAUUCUAGAAAGAGGUGUUAAGACAGUAUAGUACAUGUUAAC
 UCAGAAAGUACCAUUGGCAGUCAUGUGCUGAUGGACUCAUUAUUAUUCUUAUUGGAAUUAUAGAGUCCAGUCCAGGUAACG
 CUGGAAACAUUAUCUGUGGACGAACUCUAACAUAUAGUCUAGAGGAACCCAGAGACUUCACUGUCUUCAGCUUUAUUGGUUAGGA
 AACCUACUUCUUAACUUAACAAAGUAGAGAAUCAAAGUAUAAUCAAUGACAUAUUAUAAUUGUCCUUAUUCUCAAACCC
 UUGUAAACUAAAGAUUCUAUUAUUGAUUUUCAGGAGGAGUUAACAUUUUAUCAAACAUAGGCCAACAGGAUAUCAAGUUAACAA
 CAUACUAAGUAGUCUUCAGGCGCUUUUUGGAGAGUUAUAGACAUCAUAGAGAAACAAUUAUAAUUGCCUAAAGGACAAUUAUCU
 ACUUGUGUGUGAGCCAUUAUCAAACAUUGGUUUUCAAUACAGGCUCCAUUUGCUUUUAAUCCUAAAGAGAGACAUUAUACUUGU
 CCUCGGUGAGUUCAAUGACUUCUUCUCAAUCUACUUCAGAGGGGUCCUACAAACUACAGCAGGUCCAUUCAGUAUUAUGAAAGGCC
 UUCGUGAAGAGUAUUUUGAUCCGAGCAUGGUUGGGUGGACAGUGAAAUUAUUAUGAAAUAGAGAAAUUAUGGUUGAGCUGAUCAAG
 ACCUUUUUAGUUUCUUUAGGGAUGUCUAUCUGAAUAUAGUGUGACAGCUGCUGAUUUUGCUUCCAAAUUGUCAAUCUAGUUGA
 ACAUUUUGUGUCCAGGUAUCAGAGAGAUUCUUGCAUGCUUAUGAUUAUAAUGGAAAGUGGAUUGGAAAGAUUGCAGAGCUIU
 CUUUUGGCAAGGAAACAUAUGAAAGCUGGGUCAUCCCGUGGCCAAAUAAUUGUUGGUGAGUCCACAGAUUGAUUGACCUUCCAUUCAA
 CUGCAGGAUUUUUCAGACCAACUCUUCUAGCUACUUAUGAAAUUUUGUUGGUGAGUCCACAGAUUGAUUGACCUUGUCCAUUCAA
 CUACCACGUHUUCUCAGAUACAUCACCGAUUACUGAGAAAGCUGCAGGUGGCCACAGCCAAUUAUUGAGGCCCCCUUAUUAUAAAGC
 UUGUCUAAAGGAGAGCUGAUGAUCAACUUCUGAUUCAUUAACAUAUCAAUUAUAAUCCUUCACAUUAGAGACUUUGUAGA
 CUACUAUAAAGACCAUCCUGAGCCAGACUUGACUACAAGCAGAGAGCAAGAGCAUAUAGCAUUAUACCCUGCAACCAAGCUGGC
 AUAAGAAACCAAGACCUCUCAAAGCAGCCUGAACUCAAGAGUUAUUUAACAAGUUAAGUUAAGUUAAGUUAAGUUAAGUUAAGU
 CCAAUCUAGGAUGGAGGGAGGGAAGGGGAUAUAUAAUUAUUAUUAUUGUGCAGCAAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAUAAU

FIG. 13E

UCCACCGGACCUUGCGGGGCUAGAGUCCUUCUGGUUGUGCGGUGAGGCCCGCCACCGACGCCAGCGCCGGAGGCCGCGAG
GCCAGGCCAGCCAGCCAGCCGCCCCACCGCAGCUUGCGGAUGGACCCGCGGAGGCCCGCGGCGUGCGCGUGCGCGUGCGGCGUG
CGCUGCGUGCGUGCGUGCGCGGGGCCACGGGCCGAAAGGAAUUGCUGGAAAUUGUCAGCCCGUGUUGUUCUUCUCAAAGAUGGAC
CCAUUCAGCACCCUCCGGAAAGUACACAUAACAUAUGAGCGCUGAGAUCCAGUGGAGUCCUGGAGACUGCUGAUUCAAGAAGUGC
CACAGGAUACAUCUGCAAGUUGAGCUGGAGGUCCCGAGCUCUGCAGCUUACUCCUGAAGACCGACCGAGCCACCCUGAAGAGAG
UGUAUGGCUUACAACCCUGAGGGCAAGCCUUGUGAAGAAACCAAGAACUCUGAGGAGUUCGCGAGCCAUUGCCAGUAUGAG
CUCAAGCUGGCCCAUUCAGAAAGGAGCAGGUUUCUUUACCCGGAGAAAGAUAAACCUACUACAUCUCUGAACAUCAAGAGGGG
CAUCAUUUCUGCCUCCUGUCCCGCAGAGAGAACCCAGCAAGUGUGUUUGUUGGUAUACCGUGUAUGCAACUCGCUUACA
CUCAUUUACCGUACAAGCAGGAGGGCAUUGUGCAACAGAAAUUACCAUGAAAGACCCUGGGGAGUGUGAUCCGUUACAAG
CCCCUCCGACAGGCCUACUUGCCUUCUACAAGGCAUGACCCGCCCUUUGUCAUCUCUGAUACGACGACGACCAAGUCCUG
UCAGUAACAUCUGGACGCUAAGAGGAAGCAUUGGGCAGAAAGCAUCUGCAAGGAGCAACAACUCUUCUGCGCUUUCUUCJACACA
AUAAGUAUGGAUGGUAACAAGUGACACAGAGACUUGAAACUUGAAGACACACCAAGAUACAACUGCCGCUUUCUUGGUAAGGU
ACUAGAAGAGUUGGCCUCCGCAUUNGAGAGCACCAAAUCCACAUCACCUCCAAAGCAGGCCGAAGCUGUUGAAGACUCUCCAGGA
ACUGAAAAACUAAACCAUCUGAGCAAAAUUACAGAGAGCUAAUCUCUCAAUAAAGCUGGUUACUGAGCUGAGAGGCCUCAGUG
AUGAAGCAGUACAUCUUCUUGCCACAGUGAUGAGUGUGCGAGCCCAUCACUUAACAGCCUUGGUUACAGUGGACAGACCCU
CAGUGCUCCACUCACAUCUCCAGUGGCUGAACGUGUGCAUGGCCAACCCCUUCUGAUAGAUGUGGUCACCUAOCUGGUGGCCU
GAUCCCGAGGCCUCAGCACAGCAGCUCGAGAGAUUCUACAUCUGCGAGGGAUACGGCAGCCAGCCACCUUGUAUUGCGCUGA
GCCACGGGUCACAAUAUCUAAGACAAACCUACAGGAACCCAGAGCUGCUGGACAUUGCUAAUUAACUGAUGGAACAGAUU
CAGAUGACUGCACUGGGGAGUAAGAUUACACCUAUUUGAUUCUGCGGUCAUUGGAAAUUGGCCCAAUAUGGGAGCAGUUAAC
UCCAGAACUCAAGUCUCAAUCUCUCAAUGUGUCCAAAGUACAAAGCCAUCAUGAUGAUCCAGAAAGCUGCCAUCCAGGCCUCUG
GGAAAAUGGAGCCUAAAGACAAAGCACAGGAGGUUCUUCUACAGACUUCUCUGAUGAUGCUUCUCGGGAGUAUACGCAUGGCCU
GCCUAUCUUAUGUUGAUGAGGAGUCCUUCACAGGCAGAUUAUAAACAAAUUGUCCAAAUUCUACCAUGGGAAACAGAAUGACAAAG
GAAGAACUUGUGGCUUCCCAUUAUUGCCAAUAUCUUGAACUCAGAGAAAUUGGAUACCAAGAUUCUGAAAAAGUAGUGAAAGAA
CUCUGAAGAAUUCUACAUCUGUACAUGGACUUCAGAAAUUCUCUGGAAACUACAACUCUACAUAUCUGUUCUUCUUCUCCA
UACUUGACCCAGCCUCCAGCCAAAUAAGAAAGGAUUCUUAUUGAUCCAAUAAACUACCUUCAAAGAAAGCAUGCUGAAAAAC
UUUCUCUACUGCCUUGGAUUUGCUUCAGCUGACCUCAUGGAGAUUGGCUUGGAAGGAUAGGCUUUGAGCCAACAUUGGAAGCUUC
UUUUUGGAAGCCAGGAUUUUCGACAGUGUCAACAAGCUUUGUAUCUGGUUUAUUGGUCAAGUUCUUGAUGGUGUCUUAAG
GUCUUAUGGACCACTUUGGCUUAUACCAAGAUUAUAAACAUAGCAGGAUAUGGUAUAUUGCUACAGUUGAGGAAGCU
GAUUAAGAUUGAAAUCCAAAGAGUCCCGGAAGCCAGCCUACCCUCCAUUCUUGGGAGGAGCUUGGUUUUGCCAGUCUUC
AUGACCCUCCAGCUCUCGGGAAAGCUGCUGAUGGGUGCCCGCACUCUGCAGGGGAUCCCCGACAGUAUGGAGAGUICAUACA
AAGGCCCAAGAAUGACAUUUUUUCUACAUCUUCUGAGGAUUGCCUUGAACUCCCCACUGGAGCUGGAUACAGAUUGCA
AAUAUCUACAUCUGGAGUCAUUGUUCUCCGGAGCCAGGCUUGGAUUAACUGGAAGUAGCCCAACUAGCAGGCUGAACUGGUGGCA
AAACCCUCCGUGUCUGGAGUUUGAGACAAAUUGGGCAUCAUCAUUCGGACUUCGCUAGGAGUGGGGUCGAGUAACACCAAC
UUCUUCACGAGUUGGGUCUGAGGCUCAUGUUGCCCUAAAGGCUUGGAAGCUGAAGUUUAUCAUUCUCCUCCCAAAGAGACCAU
CAAGCUGCUCAGHGGAGGCAACACAUAUCAUUGGUUCUUAACCAACAAADGGAGGGUGAUCCACCUUCUUGAGAACAGGCAGU

FIG. 14A

FIG. 14B

118

119

FIG. 14E