

(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.

15    **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**

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 25 fenómeno incluyen tecnología antisentido y formas de ARNbC de silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) que se ha popularizado en forma de interferencia de ARN (iARN).

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

30    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 35 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.

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

40    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 55    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.

Además, la doble cadena de ARNip presenta eficacia primaria para un solo gen y fuera de diana para un gen 60    secundario. Este efecto no pretendido es negativo y no es una multivalencia de iARN fiable.

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 65    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.

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 sumario

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.

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.

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.

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 (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 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 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.

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, 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 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', (b) 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 (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 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 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 5 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 10 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 autohibridante, como se describe en el presente documento.
- En determinadas realizaciones, cada una de dichas primera, segunda y tercera secuencias diana están presentes en 15 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 20 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 bicanalicular) comprende al menos 5 25 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 30 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 35 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 40 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 45 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 50 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 55 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 60 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 65 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.

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 transcripto 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.

- 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 tetrabules 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.

- 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.

- 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 Tm 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.

- 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 %)).
- 5 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.
- 10 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.
- 15 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.
- 20 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.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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**
- 40 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.
- 45 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.
- 50 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 ARNbc, utilizando al mismo tiempo
- 55
- 60
- 65

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 polinucleotídicos que comprenden dos o más regiones de direccionamiento complementarias a regiones de uno o más genes diana. Los complejos y moléculas polinucleotídicos de la presente invención pueden denominarse ARNip multivalentes (ARNip-my), 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 polinucleotídicos 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 tercero polinucleótidos son complementarias a una secuencia diana diferente, en donde la región 5' del primer polinucleótido es complementaria a la región 3' del tercero 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 tercero 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, 5 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 10 región bicanal 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 bicanal 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 bicanalarias) y al menos dos regiones específicas de diana (véase, p. ej., figura 2). 15 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 bicanalarias) 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, 20 una cantidad de región bicanalaria 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, 25 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 30 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 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, 35 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 40 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 photoescindibles, tales como pcSpacer (Glen Research Products, Sterling, VA, Estados Unidos), o nucleótidos de fosforamidita.

45 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 bicanalaria, tal como una estructura de tallo-bucle. Los polinucleótidos también pueden denominarse en el presente documento oligonucleótidos.

50 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.

55 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.

- 5 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.
- 10 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 despareados 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 despareados con el gen diana.
- 15

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 20 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 25 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 30 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 35 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).

40 40 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.

45 45 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.

55 55 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.

60 60 En diversas realizaciones, un complejo o molécula polinucleotídico 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, Tm, sensibilidad a RNasa u otras características, según se deseé. 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, tioalquilfosfonatos, tioalquilfosfotriésteres 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-trimel 15toxicobenceno, 3-metil uracilo, dihidrouridina, naftilo, aminofenilo, 5-alquilcitidinas (p. ej., 5-metilcitidina), 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-acetiltiudina, 5-(carboxihidroximetil)uridina, 5'-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluridina, β-D-galactosilqueosina, 1-metiladenosina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanosina, 3-metilcitidina, 2-metiladenosina, 2-metilguanosina, N6-metiladenosina, 7-metilguanosina, 5-metoxiaminometil-2-tiouridina, 5-metilaminometiluridina, 5-metilcarbonilmetyluridina, 5-metiloxiuridina, 5-metil-2-tiouridina, 2-metiltio-N6-isopenteniladenosina, β-D-manosilqueosina, ácido uridin-5-oxiacético, 2-tiocitidina, 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.

- 5 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.
- 10 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.
- 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
- 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, antracenilo, 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 poliomavirus 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.

- 5 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.
- 10 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 15 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](http://www.ncbi.nlm), y las posibles secuencias diana con homología significativa con otras secuencias codificantes eliminadas.
- 15 En otra realización, los sitios diana se ubican dentro de la región no traducida (UTR) 5' o 3'. Además, la región 20 autocomplementaria al polinucleótido puede estar compuesta por una secuencia en particular que se encuentra en el gen de la diana.
- 20 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 25 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.
- 25 Como se ha indicado anteriormente, la secuencia del gen diana y la región complementaria al polinucleótido pueden 30 ser complementos completos entre sí o pueden no ser completamente complementarios, siempre que las hebras hibriden entre sí en condiciones fisiológicas.
- 30 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, 35 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.
- 40 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 45 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)).
- 50 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 55 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 60 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, 65 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.
- 10 15 En una realización, el complejo o molécula polinucleotídico 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 los cuales está ubicada en el extremo 3' de las cadenas guía secundarias.
- 20 25 30 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 40 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 50 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).
- 55 Los complejos y moléculas polinucleotídicos 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.
- 60 65 La invención proporciona además matrices del polinucleótido de la invención, incluyendo micromatrizes. Las micromatrizes 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.
- Las micromatrizes 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.

5 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).

10 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.

15 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.

20 25 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 30 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 35 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; 40 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 cualesquier 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 Viro* 72: 5781-5788, 1998; y Frecha et al., *Blood*. 112: 4843-52, 2008).

45 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 Viro*. 72: 8150-7, 1998; y la patente de los Estados Unidos n.º 6.013.516. Los vectores lentivíricos pueden comprender uno o más cualesquier de estos elementos del genoma lentivírico, para regular la actividad del vector según se deseé, 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.

50 55 60 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 lentiavirus. Las secuencias de LTR pueden ser secuencias de LTR de cualquier lentiavirus de cualquier especie. Por ejemplo, pueden ser secuencias de LTR del VIH, SIV, FIV o BIV. Preferentemente, las secuencias de LTR son secuencias de LTR del VIH.
- En determinadas realizaciones, el vector vírico comprende las secuencias R y U5 de la LTR 5' de un lentiavirus y una LTR 3' inactivada o "autoinactivadora" de un lentiavirus. 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 Ick (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 iEμ flanqueado por regiones de asociación de matriz y el promotor EEK-b12 contiene el promotor de la cadena ligera kprecedido por un potenciador intrónico (iEk), una región asociada a la matriz y un potenciador 3' (3'Ek) (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 ptTA-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 "pseudotipificadas" 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 transfecirse 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 polinucleotídico de la presente invención en una célula que comprende dichos uno o más genes diana. En realizaciones particulares, el complejo o molécula polinucleotídico 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 polinucleotídico 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 polinucleotídico 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.

5 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.

10 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.

15 20 Los ejemplos de características celulares que pueden examinarse para determinar el efecto provocado por la introducción de un complejo o molécula polinucleotídico de la presente invención incluyen, crecimiento celular, apoptosis, características del ciclo celular, diferenciación celular y morfología.

25 30 Un complejo o molécula polinucleotídico 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.

35 40 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.

45 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 bícatenario (p. ej., ARNh y ARNip) para reducir adicionalmente la expresión de un gen diana.

50 55 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.

60 65 Los complejos y moléculas polinucleotídicos 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.

70 75 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 dextrans), 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 polinucleotídico 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 genético 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 quimiocromática, 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 deseé.

La presente invención también permite un método para validar si un producto genético 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.

65 Métodos de diseño y producción de complejos y moléculas polinucleotídicos

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 "||" 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 tetrabuces 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.

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

I. 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.

10 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.

15 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.

20 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*.

25 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.

30 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

35 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.

40 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.

45 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 50 mayor potencia y mayor eficacia para múltiples genes diana. Asimismo, el polinucleótido de la invención ofrece ventajas adicionales sobre las moléculas de ARNb tradicionales usadas para ARNip, ya que el uso del polinucleótido elimina sustancialmente la supresión fuera de diana asociada con las moléculas de ARNb y ofrece iARN multivalente.

55 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.

60 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, 2<sup>a</sup> 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

10 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\_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.

15 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	CACCACCCCCGGUGAACACAGCUU	12
TI-19/7_C	GCUGUUCACGUCGCUGCCCUU	13
TI-19/7_C_dna	GCTGTTCACGTCGCTGCC	14

25 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 µM (50 pmoles/µl). 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 µl de cada uno de los oligos reacondicionados con 10 µl de tampón de hibridación 10x (Tris-HCl 100 mM pH 7,5, NaCl 1 M, EDTA 10 mM), se agitaron vorticalmente, 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 µM.

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., T1, T1\_long, TII) representa la secuencia del ARNip multivalente autocomplementario que se expresó en la célula como un transcríto 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:
T1	GATCCCCCACCACCCGGTGAACAGCgttaGCTGTTCACGTCGCTGCCgttaGGGCAGCTTGCCTGGTGGTttTTTTA	15
T1_as	AGCTTAACACCACCGGCAAGCTGCCCTAACGGGCAGCGACGTG AACAGCTAACGCTGTTCACCGGGGTGGTGGGG	16
T1_long	GATCCCCCACCACCCGGTGAACAGCTGTAGGGGGCATCGCA GAAGCGATGCCACCTACAAGCTGTTCACGTCGCTGCCCTGTAG GTGGCATCGCAGAAGCGATGCCACCTACAAGGGCAGCTGCCG GTGGTGttTTTTA	17
T1_long_as	AGCTTAACACCACCGGCAAGCTGCCCTGTAGGGGGCATCGCTT CTGCGATGCCACCTACAAGGGCAGCGACGTGAACAGCTGTAG GTGGCATCGCTTGCGATGCCACCTACAAGCTGTTACCGGG GTGGTGGGG	18
TII	GATCCCCCGTGTGCTTCATGTGGTCGTTgttaCGACCACAAATGG CGACAACTTgttaGGTTGTCGGGCAGCAGCACGTTttTTTTA	19

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
TII_as	AGCTTAAACGTGCTGCCGACAACCTAACAAAGGTTGTCGC CATTGTGGTCGTAACAACGACCACATGAAGCAGCACGGGG	20
TII_long	GATCCCCGTGCTGCTCATGTGGCGTTGAGGTGGCATCGCA GAAGCGATGCCACCTACAACGACCACAATGGCGACAACCTTGTA GGTGGCATCGCAGAAGCGATGCCACCTACAAGGTTGTCGGCA GCAGCACGttTTTTTA	21
TII_long_as	AGCTTAAACGTGCTGCCGACAACCTGTAGGTGGCATCGCT TCTCGATGCCACCTACAAGGTTGTCGCCATTGTGGCGTTGTA GGTGGCATCGCTCTGCGATGCCACCTACAACGACCACATGAA GCAGCACGCCCC	22
ARNhc	GATCCCCGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCTCAAGAGAGAACTTCA GGGTCAGCTTGCTTTTA	23
shRNA_as	AGCTTAAAAGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCTCTTGAAGAACTT 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 ARNh se transfecaron 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 ARNh (denominado en esa figura "ARNip").

5

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 T1	360	72 %
	ARNip-MV largo T1	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 ARNh (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	CUGCUGGUAGUGGUUCGGCGUU	25
T1.B	CGCCGACUUCGUGACGUGCUU	26
T1.C	GCACGUCGCCGUCCAGCAGUU	27
T2.A	GUUGCUCGUCCUUGAAGUU	28

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
T2.B	CUUCAAGUGGAACUACGGCUU	29
T2.C	GCCGUAGGUAGGC GGCAACUU	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	CGCCGACUUUCGUGACGUGCUUGUGUGCACGUUCGCCGUCCAGC AGUUGUCUGCUGGUAGUGGUUCGGCGUU	31
T1	GATCCCCCGCCGACTTCGTGACGTGCTTGTGCACGTGCCGT CCAGCAGTTGTCTGCTGGTAGTGGTCGGCGTTTTTA	32
T1_as	AGCTTAAAAAACGCCGACCACTACCAGCAGACAACTGCTGG ACGGCGACGTGCACAAGCACGTACAGAAGTCGGCGGGG	33
transcrito de T1_long	<u>CGCCGACUUUCGUGACGUGCUUGUAGGUAGGUUCAGCAGAAG</u> <u>CGAUGCACCUACAAAGCACGUUCGCCGUCCAGCAGUUGUAGG</u> <u>UGGCAUCGCAGAAGCGAUGCACCUACACUGCUGGUAGUG</u> <u>GUCGGCGUU</u>	34
T1_long	GATCCCCCGCCGACTTCGTGACGTGCTTGTAGGTGGCATCGC AGAAGCGATGCCACCTACAAG <u>GCACGTGCCGTCCAGCAGTTG</u> <u>TAGGTGGCATCGCAGAAGCGATGCCACCTACA<u>ACTGCTGGTA</u></u> <u>GTGGTCGGCGTTTTA</u>	35
T1_long_as	AGCTTAAAAACGCCGACCACTACCAGCAGTTGTAGGTGGCAT CGCTTCTCGATGCCACCTACA <u>ACTGCTGGACGGCGACGTGC</u> <u>TTGTAGGTGGCATCGCTTCTCGATGCCACCTACAAGCACGT</u> <u>CACGAAGTCGGCGGGG</u>	36
T2_transcript	CUUCAAGUGGAACUACGGCUUGUGCCGUAGGUAGGC GGCAA CUUGUGUUGCCGUCGUCCUUGAAGUU	37
T2	GATCCCCGGATCCGACATCCACGTTCTCAAGAGAGAACGTG GATGTCGGATCCTTTTA	38
T2_as	AGCTTAAAAGGATCCGACATCCACGTTCTCTCTGAAGAACG TGGATGTCGGATCCGGG	39
transcrito de T2_long	CUUCAAGUGGAACUACGGCUUGUAGGUAGGUAGGUAGGU GAUGCCACCUACAAAGCCGUAGGUAGGUAGGC GGCAACUUGUAGGU GGCAUCGCAGAAGCGAUGCACCUACAGUUGCCGUCGUCC UUGAAGUU	40
T2_long	GATCCCCCTCAAGTGGAACTACGGCTTGTAGGTGGCATCGC AGAAGCGATGCCACCTACAAG <u>CCGTAGGTAGGCGGCAACTTG</u>	41
	<u>TAGGTGGCATCGCAGAAGCGATGCCACCTACAAGTTGCCGTC</u> <u>GTCCTGAAGTTTTTA</u>	
T2_long_as	AGCTTAAA <u>ACTTCAAGGACGACGGCAACTTGTAGGTGGCATC</u> GCTTCTCGATGCCACCTACAAG <u>TTGCCGCTACCTACGGCTT</u> <u>GTAGGTGGCATCGCTTCTCGATGCCACCTACAAGCCGTAGT</u> TCCACTTGAAGGGG	42

**Ejemplo 2**

## ES 2 804 764 T3

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.

10 Tabla 6: Clones de ARNip-MV anti-VIH

Nombre	Secuencia	SEQ ID NO:
hv_s	GATCCCCGTGAAGGGGAACCAAGAGATTgaTCTCTTGTAAATATCAG CTTgaGCTGATATTCCTCCTTCACTTTA	43
hv_s_as	AGCTTAAAAGTGAAGGAGAAATATCAGCTCAAGCTGATATTAACAA GAGATCAATCTCTGGTCCCTCACGGG	44
hv_sB	GATCCCCAAGCAGTTTAGGCTGAcTTaGTCAGCCTCATTGACAC AGgTTaCTGTGTCAGCTGCTGTTTTTTA	45
hv_sB_As	AGCTTAAAAAAACAAGCAGCAGCTGACACAGTAACCTGTGTCATGA GGCTGACTAACGTCAGCCTAAAACGTGCTGGGG	46

Las construcciones de vector que codifican los clones de ARNip-MV se transfecaron 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.

15 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.

20 Tabla 7: Secuencias trivalentes de ARNip-MV ilustrativas

N.º	Secuencia	Gen diana	SEQ ID NO:
1	GCCUUCCCUUGUGGGAAAGGUU	1649	47
2	CCUUCCCUUGUGGGAAAGGUU	1648	48
3	GCCUUCCUUGUGGGAAAGGUU	1648	49
4	UUCUGCACCUUACCUCUUUU	6259	50
5	UAAGAGGAAGUAUGCUGUUU	4062	51
6	AACAGCAGUUGUUGCAGAAUU	5291	52
7	CCAGACAAUAAUUGUCUGGUU	7387	53
8	CCAGACAAUAAUUGUCUGGUU	7387	53
9	CCAGACAAUAAUUGUCUGGUU	7387	53

# ES 2 804 764 T3

N.º	Secuencia	Gen diana	SEQ ID NO:
10	CUCCCAGGCUCAGAUCUGGUU	16	54
11	CCAGAUCUUCCCUAAAAAAUU	1630	55
12	UUUUUUUAUCUGCCUGGGAGUU	7011	56
13	UGGGUUCCCUAGUUAGCCAUU	40	57
14	UGGCUAAGAUCUACAGCUGUU	8585	58
15	CAGCUGUCCCAAGAACCCAUU	7325	59
16	AUCCUUUGAUGCACACAAUUU	591	60
17	AUUGUGUCACUUCUUCAGUU	6988	61
18	CUGAAGGAAGCUAAAGGAUUU	1785	62
19	UCCUGUGUCAGCUGCUGCUUU	685	63
20	AGCAGCAUUGUUAGCUGCUUU	8481	64
21	AGCAGCUUUAUACACAGGAUU	9046	65
22	ACCAACAAGGUUUCUGUCAUU	1284	66
23	UGACAGAUCUAAUUACUACUU	6573	67
24	GUAGUAAUUAUCUGUUGGUUU	6311	68
25	CUGAGGGAAGCUAAAGGAUUU	1785	69
26	AUCCUUUGAUGCACACAAUUU	591	60
27	AUUGUGUCACUUCCCUCAGUU	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	CACAAGUGCUGAUUUUCUUU	5779	74
33	AGAAAUAUUUGUCUGACCUUU	7384	75
34	CUAAGUUAUGGAGCCAUUUU	5212	76
35	AUAUGGCCUGAUGUACCAUUU	758	77
36	AUGGUACUUCUGAACUUAGUU	4736	78
37	UGGCUCCAUUUCUUGCUCUUU	5365	79
38	AGAGCAACCCAAUCCCCUU	7544	80
39	GGGGAUUUAGGGGGAGCCAUU	4191	81
40	AUCUCCACAAGUGCUGAUUU	5784	82
41	UAUCAGCAGUUCUUGAAGUUU	8942	83
42	ACUUCAAAUUGUUGGAGAUUU	8158	84
43	AGACUGUGACCCACAAUUUUU	5862	85
44	AAAUUGUGGAUGAAUACUGUU	4310	86
45	CAGUAUUUGUCUACAGUCUUU	499	87
46	ACAGGCCUGUGUAUGACUUU	6362	88
47	AGUCAUUGGUCUAAAGGUUU	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	GCUGCUUUAUAUGCAGGAUCUU	9044	97
56	GAUCCUGUCUGAAGGGAUGUU	531	98
57	CAUCCCUGUUAAAAGCAGCUU	7118	99
58	UGGUCUAACCAGAGAGACUU	9081	100
59	GGUCUCUUUUAAACAUUUGCUU	928	101
60	GCAA AUGUUUUUCUAGACCAUU	7557	102
61	CUCCCAGGCUCAGAUCUGGUU	9097	103
62	CCAGAUCUUCCUAAAAAAUU	1630	55
63	UUUUUUUAUCUGCCUGGGAGUU	7011	56
64	UGGGUUCCCCUAGUUAGCCAUU	9121	104
65	UGGCUAAGAUCUACAGCUGUU	8585	58
66	CAGCUGUCCCAAGAACCCAUU	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.

- 5 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.
- 10 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.
- 15 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

5 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 Tm 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 optionales se indica entre paréntesis.

10

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)AGAGUUUCUUGGUUU	ApoB a 448	108
5	(ACCAAGA)CCUUGGAGACACUU	ApoB a 2288	109
6	(GUGUCUC)AGUUG(GAAGAGU)UU	ApoB a 6609	110
7	(ACCUGGA)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	(AAGUUCC)AAUAACUUUUCCAUUU	ApoB a 9161	118
15	(AUGGAAA)AGGCAAG(UCCAGGG)UU	ApoB a 9968	119
16	(CCCUGGA)CACCGCUGGAACUUUU	ApoB a 278	120
17	(AAAGUUC)CAAUAACUUUUCCAUUU	ApoB a 9161	121
18	(AUGGAAA)AUGGCAAG(UCCAGGG)UU	ApoB a 9968	122

15 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	UGAAUCGAGUUGCAUCUUUU	ApoB a 223	123
20	AAAGAUGCUGCUCAUCACAUU	ApoB a 883	124
21	UGUGAUGACACUCGGAUCAUU	ApoB a 10116 (pares G/A)	125
22	U*UGAU*ACACUCGGAUCAUU	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.

10 15 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 Tm durante la hibridación. En la tabla 10 a continuación, las bases optionales de 2'-O metil ARN 2'-fluoro se indican entre paréntesis. Entre otros ejemplos de bases alternativas, el 5-metilo también puede aumentar la Tm 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)CUUUCAGCUUCAUAUU	ApoB a 268	105
2	U(AU)GAAGGCACCAUGAUGUUU	ApoB a 9905	106
3	(ACAUCAU)CUUCCAGUUCCAUU	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	(ACCUGGA)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)AAGAACAUUUGUU	ApoB a 520	114
11	(CAAAUU)GCUGUAGACA(UUU)UU	ApoB a 4182	115
12	(AAAUGUC)CAGCGUACCCUGUU	ApoB a 12548	116
13	(CCUGGA)CACCGCUGGAACUUUU	ApoB a 279	117
14	(AAGUUCC)AAUAACUUUUCUCAUUU	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	UCAGGGCCGCU CUGUAUUUUU	ApoB a 6427	133
20	AAAUACAUUUCUGGAAGAGUU	ApoB a 8144	134
21	CUCUUCACAAAAAGCCCUGAUU	ApoB a 12831	135
22	AAAUACAUUUCUGGAAGAGUU&CUCUUCACAAAAA GCCCUUGAUu&UCAGGGCCGCU CUGUAUUUUu	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.

20 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

ES 2 804 764 T3

N.º	Secuencia	Gen diana	SEQ ID NO:
25	UGUGAUGACACUCGAAUCAUU	ApoB a 10116 (pares G/A)	125
26	U*UGAU*ACACUCGAAUCAUU	ApoB a 10116 (* base rSPACER)	126
27	TGTGATGACACTCGATTCA	nulo a 10116	127
28	CAGCUUGAGUUUCGUACCUGUU	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	AACCCACUUUCAAAUUUCCUU	ApoB a 9244	137
34	GGAAAUUGAGAAUUCUCCAUU	ApoB a 1958	138
35	UGGAGAAUCUCAGUGGGUUUU	ApoB a 8005	139
36	rUrGrGfA-fArArUrCrUrCrA-fUrGrGrG-flUrUrU	ApoB a 8005	140
37	GAUGAUGAACAGUGGGUUUU	ApoB a 10439	141
38	AACCCACUUUCAAAUUUCCUU	ApoB a 9244	137
39	GGAAAUUGGAGACAUCAUCUU	ApoB a 2284	142
40	-rGfAfAfArUrUrGrGrArGrArCfA-rCfArUrCrUrU	ApoB a 2284	143
41	GCAAACUCUUCAGAGUUCUUU	ApoB a 452	144
42	AGAACUCCAAGGGUGGGAUUU	ApoB a 11588	145
43	AUCCCACUUUCAAGUUUGCUU	ApoB a 9244	146
44	fA-rCrCrCrArCrUrUrCrAfA-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-

5 las secuencias 28, 29 y 26. 7b) ARNip-MV\_223/883/10439); Hibridar las secuencias 28, 29 y 26. 7b) 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.

# ES 2 804 764 T3

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	ACUUGGUGGCCAUGAGGGUU	3440	156
10	UCAAGAAUUCUUCAGCCUU	9595	157
11	GGCUUGAAGCGAUCACACUUU	758	158
12	AGUGUGAACGUAUUCUUGAUU	4367	159
13	UUGCAGUUGAUCCUGGUGGUU	344	160
14	CCACCAGGUAGGUGACCACUU	1354	161
15	GUGGUCAGGAGAACUGCAAUU	2483	162
16	CCUCCAGCUAACCUUGCAUU	358	163
17	UGCAAGGUCUAAAAAAUGUU	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	AGUGUGAACGUUUUCUUGUUU	4367	170
24	ACAAGAAUUCUCAAGCCUU	9595	171
25	UGAAGAGAUUAGCUCUCUGUU	1153	172
26	CAGAGAGGCCAAGCUCUGCUU	5143	173
27	GCAGAGCUGGCUCUCUUCAUU	10304	174
28	CUCAGUAACCAGCUUAUUGUU	1170	175
29	CAAUAAGAUUUUAACAAUUU	7084	176
30	UUUGUUAUCUUUAACUGAGUU	9650	177
31	GAACCAAGGCUUGUAAAGUUU	1258	178
32	ACUUUACAAAAGCAACAAUUU	6286	179
33	AUUGUUGUAAAUGGUUCUU	6078	180
34	CAGGUAGGUGACCACAUCUUU	1350	181
35	AGAUGUGACUGCUUCAUCAUU	1203	182
36	UGAUGAACUGCGCUACCUGUU	8486	183
37	CCAGUCGCUUAUCUCCCGUU	1786	184
38	CCGGGAGCAAUGACUCCAGUU	2678	185
39	CUGGAGUCAUGGCGACUGGUU	2486	186
40	UGGAAGAGAACAGAUUUGUU	2046	187
41	CAAAUCUUUAUCAGCUUCUU	2403	188
42	GAAGCUGGCCUUCUUCUCCAUU	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	CAUCUGGGGAUCCCCUGCUU	2544	200
54	GCAGGGGAGGUGUUGCUCUU	912	201
55	UCACAAACUCCACAGACACUU	2761	202
56	GUGUCUGCUUUUAUGCUUGUU	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	GCUGGAAUUCUGGU AUGGUU	8335	212
66	CACAUACCGAAUGC CUACAUU	9926	213
67	GACUUCACUGGACAAGGUCUU	3300	214
68	GACCUUGAAGUUGAAAUGUU	5301	215
69	CAUUUUCUGCACUGAAGUCUU	11983	216
70	AAGCAGUUUGGCAGGC GACUU	3549	217
71	GUCGCCUUGUGAGCACCACUU	5039	218
72	GUGGUGCCACUGACUGCUUUU	12521	219
73	CAGAUGAGUCCAUU UGGAGUU	3568	220
74	CUCCAAACAGUGCCAUGCCUU	9142	221
75	GGCAUGGAGCCUUC AUCUGUU	3256	222
76	CACAGACUUGAAGUGGAGGUU	4086	223
77	CCUCCACUGAGCAGCUUGAUU	2924	224
78	UCAAGCUUCAAAGUCUGUUU	974	225
79	AUGGCAGAUGGAAUCCCACUU	4102	226
80	GUGGGAUCACCUC CGUUUUUU	2971	227
81	AAAACGGUUUCUCUGCCAUUU	12836	228
82	UGAUACAACUUGGGAAUGGUU	4148	229
83	CCAUUCCUAUGUCAGCAUUU	2971	230
84	AUGCUGACAAAUUGUAUCAUU	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.

15 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.

## 20 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.
- 25 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.
- 30 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.
- 35 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.
- 40 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. Bosher, 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.
- 45 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.
- 50 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.
- 55 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.
- 60 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.
- 5 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.
- 10 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.
- 15 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. 20 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 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]
- 30 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]
- 35 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. 40 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]
- 45 34. Revisión: The mechanism of RNase III action: how dicer dices. [Curr Top Microbiol Immunol. 2008]

## LISTADO DE SECUENCIAS

- 50 <110> Halo-Bio RNAi Therapeutics, Inc. Hauser, Todd  
 <120> POLINUCLEÓTIDOS PARA LA INTERFERENCIA DE ARN MULTIVALENTE, COMPOSICIONES Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS
- 55 <130> 270038.405PC  
 <140> PCT  
 <141> 01/06/2010
- 60 <150> US 61/183.011  
 <151> 01/06/2009  
 <160> 231
- 65 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

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

5

<400> 1

ucccacccggg accugcgggg cugagugccc uucucgguug cugccgcuga ggagccgc 60  
cagccagcca gggccgcgag gcccaggcca ggccgcagcc caggagccgc cccaccgcag 120  
cuggcgaagg acccgcgcgag gccccgcgcug cuggcgcugc uggcgcuugcc ugcgcugcug 180  
cugcugcugc uggcgccccgc cagggcccga gaggaaaugc uggaaaaaugu cagccugguc 240  
uguccaaaag augcgacccg auucaaggcac cuccggaaagu acacauacaa cuauugaggcu 300  
gagaguucca guggaguccc ugggacugcu gauucaagaa gugccaccag gaucaacugc 360  
aaggguugagc uggagguucc ccagcucugc agcuucaucc ugaagaccag ccagugcacc 420  
cugaaagagg uguauuggcuu caacccugag ggcaaagccu ugcugaagaa aaccaagaac 480  
ucugaggagu uugcugcagc cauguccagg uaugagcuca agcuggccau uccagaaggg 540  
aagcagguuu uccuuuaccc ggagaaagau gaaccuacuu acauccugaa caucaagagg 600  
ggcaucauuu cugcccuuccu gguuccccca gagacagaag aagccaagca aguguuguuu 660  
cuggauaccg uguauuggaaa cugcuccacu cacuuuaccc ucaagacgag gaaggc 720  
guggcaacag aaaaauccac ugaagagac cuggggcagu gugaucgcuu caagcccauc 780  
cgcacaggca ucagcccacu ugcucucauc aaaggcauga cccgccccuu gucaacucug 840  
aucagcagca gccaguccug ucaguacaca cuggacgcua agaggaagca uguggcagaa 900  
gccaucugca aggagcaaca ccuciuuccug cciuucuccu acaacaauaa guaugggaug 960  
guagcacaag ugacacagac uuugaaacuu gaagacacac caaagaucaa cagccgcuuc 1020  
uuuggugaag guacuaagaa gauggggccuc gcauuugaga gcacacaauc cacaucaccu 1080  
ccaaagcagg ccgaagcugu uuugaagacu cuccaggaac uggaaaaacu aaccaucucu 1140  
gagaaaaaua uccagagagc uaaucucuuc aauaagcugg uuacugagcu gagagggccuc 1200  
agugaugaag cagucacacu ucuciuugcca cagcugauug agguguccag ccccaucacu 1260  
uuacaagccu ugguiucagug uggacagccu cagugcucca cucacauccu ccaguggcug 1320  
aaacgugugc augccaaccc cciuucugaua gaugugguca cciuaccuggu gggccugauc 1380  
cccgagcccu cagcacagca gcugcgagag auciucuaca uggcgaggga ucagcgcagc 1440  
cgagccaccu uguauugcgcu gagccacgcg guacaacaacu aucauaagac aaacccuaca 1500  
gggaccagg agcugcugga cauugcuaau uaccugauug aacagauuca agaugacugc 1560  
acugggggaug aagauuacac cuauuugauu cugcggguca uuggaaaaau gggccaaacc 1620  
auggagcagu uaacuccaga acucaagucu ucaauccuca aaugugucca aaguacaaag 1680  
ccaucacuga ugauccagaa agcugccauc caggcucugc gggaaaaugga gccuaaagac 1740  
aaggaccagg agguuucuuuc ucagacuuuc cuugauug ciiucuccggg agauaagcga 1800  
cuggcugccu aucuuauug uauugaggagu cciuucacagg cagauauuaa caaaauuguc 1860  
caaaauucuac caugggaaca gaaugagcaa gugaagaacu uuguggccuuc ccauauugcc 1920  
aaauaucuuga acucagaaga auuggauauc caagaucuga aaaaguuagu gaaagaagcu 1980  
cugaagaaau cucaacucc aacugucaug gacuucagaa aauucucucg gaacuaucuu 2040  
cucuacaaaau cuuuuucucu uccaucacuu gacccagccu cagccaaaaa agaaggaaau 2100  
cuuauauuuug auccaaauaa cuacuuuccu aaagaaagca ugcugaaaac uacccucacu 2160  
gccuuuggau uugcucuac cugccuacuca gagauuggcu uggaaggaaa aggcuuugag 2220

ccaacauugg aagcucuuuu uggaagcaa ggauuuuuucc cagacagugu caacaaagcu 2280  
 uuuguacuggg uuaugguca aguuccugau ggugucucua aggucuuagu ggaccacuu 2340  
 ggcuauiacca aagaugauaa acaugagcg gauaugguaa auggaauaa ucucaguguu 2400  
 gagaaggcuga uuaaggauuu gaaaucaaaaa gaagucccg aagccagagc cuaccuccgc 2460  
 auciuggggag aggacuugg uuuugccagu cuccaugacc ucacgcuucc gggaaagcug 2520  
 cuucugaugg gugccgcac ucugcagggg aucccccaga ugauuggaga ggucaucagg 2580  
 aaggccucaa agaaugacuu uuuucuucac uacaucuuca uggagaaugc cuuugaacuc 2640  
 cccacuggag cuggauuaca guugcaauua uciuicauug gaguauugc ucccggagcc 2700  
 aaggcuggag uaaaacugga aguagccaauc augcaggug aacugguggc aaaacccucc 2760  
 gugucugugg aguuugugac aaauaugggc aucauauuc cggacuucgc uaggaguggg 2820  
 guccagauga acaccaacuu cuuucacgag ucgggucugg aggcucaug ugcuccuaaaa 2880  
 gcugggaagc ugaaguuuuau cauuccuucc ccaaagagac caguacagcu gcucagugga 2940  
 ggcacacacau uacauuuggu cuuaccacc aaaaacggagg ugaucccacc ucucauugag 3000  
 aacaggcagu ccuggucagu uugcaagcaa guciuuccug gccugaaauua cugcaccuca 3060  
 ggcgcuiau ccaacgccag cuccacagac uccgcccuccu acuauccgcu gaccggggac 3120  
 accagauuag agcuggaacu gagggcuaca ggagagauug agcaguauuc ugucagcgca 3180  
 accuaugagc uccagagaga ggacagagcc uugguggaua cccugaaguu uguacucaa 3240  
 gcaagaaggug cgaagcagac ugagggcuacc augacauuca aauauaaucg gcagaguau 3300  
 accuugucca gugaaguucca aauuuccggau uuugauguug accucggAAC aauuccucaga 3360  
 guuaauugaua aaucuacuga gggcaaaacg uciuicagac ucacccugga cauucagaac 3420  
 aagaaaaauua cugaggugc ccucauugggc caccuaaguu gugacacaaa ggaagaaaaga 3480  
 aaaaaucaagg guguuauuuc cauaccccgu uugcaagcag aagccagaag ugagauucc 3540  
 gcccacuggu cgccugccaa acugcuucuc caaauggacu caucugcuac agcuuauggc 3600  
 uccacaguuu ccaagagggg ggcauggcau uaugaugaag agaagauuga auuugauugg 3660  
 aacacaggca ccaauguaga uacaaaaaaaaa augacuucca auuuccugu ggaucucucc 3720  
 gauuauccua agagcuugca uauguaugcu aauagacucc uggaucacag aguuccugaa 3780  
 acagacauga cuuucggca cguggguucc aauuuuaauag uugcaauugag cucauggcuu 3840  
 cagaaggcau cugggagucu uccuuauacc aagacuucc acauuaagc uggacuacu caauagccu 3900  
 aaggagauica accuccagaa caugggauug ccagacuucc acauucccaga aaaccucuuc 3960  
 uuaaaaaagcg auggccggg uaaauauacc uugaacaaga acaguuugaa aauugagauu 4020  
 cccuuugccuu uugguggcaa auccuccaga caucugccau cuugagaguu ccaaguccu 4140  
 ccaagccccucc acuuicaaguc ugugggauuc caagugccuc uccuugggugu ucuagaccuc 4200  
 acuuuuuacca uucccaaguu guaucaacug uggucgccc ccuacagugg uggcaacacc 4260  
 uccacgaaug ucuacagcaa cuuguacaac uaccacaua aggcugacuc ugugguugac 4320  
 agcacagacc auuucagccu ucgggcucgu caaauacacau augaccacaa gaaauacguuc 4380  
 cugcuiuuccu acaauggca aggaucugga acacaucau gugauuggc aaauuucuag auucgaauau caaauuucagu 4440  
 acacaucau gugauuggc ucuacgccc cauuaauuu uacuuauuu cgaugcaucu 4500  
 cauuaauuu aacuuggaaa caacccaguc guiuuauugg acuccaaaaa gaaacagcau 4560  
 aguuuccugg gaccacagau gucguuca uuguuuuguca aagaagucaa gauugauggg caguucagag ucucuucguu cuauugcu 4620  
 ggcacauuaug gccugucuuug ucagaggguu ccuaacacug gccggcucaa uggagagucc 4680  
 aaccugaggu uuaacuccuc cuacucccaa ggcaccaacc agauaaacagg aagauauugaa 4740  
 gauggaagccc ucuccucac cuccaccucu gaucugcaaa guggcaucu uaaaaaaaaacu 4800  
 guuuuccuua aguaugagaa cuacgagcg aauuuuauuu cugacaccaa uggaauau 4860  
 aagaacuuug ccacuucuaa caagauggau uugacuuccu cuaagcaaaaa ugcacugcug 4920  
 cguucugauu aucaggcuga uuacgaguca uugagguiu ucaaggcugcu uucuggauca 4980  
 cuuuuuuaccc auggucuuga guuuaauugcu gacauuuuacu gacuacuacaa aauuaauuagu 5040  
 gugucucaca aggccacacu aaggauuggc caaagcugac aacuuaagc uugccucucu 5100  
 aacuugaagu guagucuccu ggugcuggag auggacuacu auggacuacu accacacaaa cagucugaac 5160  
 ggggcaucua ugaauuaac aacaaauggc cguucugauu acauacuacu aacaccaugg aacaccaugc aaaaauucagu 5220  
 aacuauugcua uaucacugga cuucucuuca uacuauuau aacuauuacag aacuauuacuuc 5280  
 uuuuauuaacg aacacuacu aacuauuacg aacuauuacg aacuauuacg aacuauuacg 5340  
 agugaccuga aauacaaugc ucuggaucuc aacuauuacg aacuauuacg aacuauuacg aacuauuacg 5400  
 cugaaggcugc auguggcugg uaaccuuaaaa aacuauuacg aacuauuacg aacuauuacg aacuauuacg 5460  
 aucuaugcua ucucuucugc ugcuccuuca aacuauuacg aacuauuacg aacuauuacg aacuauuacg 5520  
 guucaggggug uggaguuuag ccaucggcuc aacacagaca ucgccuggc ugcuccagcc 5580  
 auugacauga gcacaaacua uauuucagac accaacaaua ggaaacuacg gcuagaaccc 5640  
 guuauggccc cguuuuaccau gaccacuacu aacuauuacg aacuauuacg aacuauuacg aacuauuacg 5700  
 cucuggggag aacauacugg gcagcugaua aacacagaca ucgccuggc ugcuccagcc 5760  
 gcauuuacuu ucucucauga uuacaaaggc aacuauuacg aacuauuacg aacuauuacg aacuauuacg 5820  
 agcaucagug cagcucuuga acacaaaguc aacuauuacg aacuauuacg aacuauuacg aacuauuacg 5880  
 ggcaccugga aacuauuacg aacuauuacg aacuauuacg aacuauuacg aacuauuacg aacuauuacg 5940  
 gcauuuacuu ucucucauga uuacaaaggc aacuauuacg aacuauuacg aacuauuacg aacuauuacg 6000  
 agcaucagug cagcucuuga acacaaaguc aacuauuacg aacuauuacg aacuauuacg aacuauuacg 6060  
 ggcaccugga aacuauuacg ccaauuuac aacuauuacg aacuauuacg aacuauuacg aacuauuacg 6120

uacaacacua aagauaaaaau uggcguggag cuuacuggac gaacucuggc ugaccuaacu 6180  
 cuacuagacu ccccaauuaa agugccacuuu uuacucagug agcccacaau uaucauugau 6240  
 gcuuuuagaga ugagagaaugc cgwuqagaag ccccaagaau uuacaauuugu ugcuuuuugua 6300  
 aaguaugaua aaaaccaaga uguucacucc auuuaccucc cauuuuuuga gaccuugcaa 6360  
 gaauauuuug agaggaaucg acaaaccuuu auaguuguaag ugaaaaacgu acagagaaac 6420  
 cugaaggcaca ucaauauuga ucaauuuugua agaaaaauuacu gaggagccu gggaaaacuc 6480  
 ccacagcaag cuauugauua ucugauuica uucaauuuggg agagacaagu uucacaugcc 6540  
 aaggagaaac ugacugcucu cacaaaaaag uauagaauua cagaaaaauga uauacaaauu 6600  
 gcacuuuagaug augccaaaaa caacuuuuauu gaaaaacuuu cuaacugca gacauauuug 6660  
 auacaauuuug aucaguauau uaaagauagu uauugauuuac augauuuugaa aauagcuauu 6720  
 gcuaauauua uugaugaaaa cauugaaaaa uuaaaaaaguc uugaugagca cuaucauau 6780  
 cguguuaauu uaguaaaaac aauccaugau cuacauuuugu uuauugaaaa uauugauuuu 6840  
 aacaaaagug gaaguaguac ugcauccugg auucaaaaug uggaucuua guaccaaauc 6900  
 agaaauccaga uacaagaaaa acugcagcag cuuaagagac acauacagaa uauagacauc 6960  
 cagcaccuag cuggaaaguu aaaacaacac auugaggcua uugauguuag agugcuuuuua 7020  
 gaucaauuugg gaacuacauu uucauuugaa agaauaaaaug auguucuuga gcaugucaaa 7080  
 cacuuuuguua uaaaucuuau uggggauuuu gaaguagcug agaaaaaucau ugcciuicaga 7140  
 gccaaagucc augaguuaau cgagaggua ugaugagacc aacaauucca guuuuuuaug 7200  
 gauaaauuag uagaguugac ccaccaauac aaguugaagg agacuauuca gaagcuaagc 7260  
 aauguccuac aacaaguuaa gauaaaaagau uacuuugaga aauugguugg auuuauugau 7320  
 gaugcuguga agaagcuuaa ugaauuuauu uuuuaaacaau ucauugaaga uguuaacaaa 7380  
 uuccuugaca uguugauaa gaaauuuuaag ucauuugauu accaccaguu uguagaugaa 7440  
 accaaugaca aaaucgcug aggugacuag agacucaauu gugaaauuca ggcucuggaa 7500  
 cuaccacaaa aagcugaagc auuuaaacug uuuuuuagagg aaaccaaggc cacaguugca 7560  
 guguaucugg aaagccuaca ggacacccaa auuaccuuua ucaucaauug guuacaggag 7620  
 gcuuuuuaguu cagcaucuuu ggcucaccaug aaggccaaau uccgagagac ucuagaagau 7680  
 acacgagacc gaauguaucu aauuggacauu cagcaggaac uucaacgaua ccugucucug 7740  
 guagggccagg uuuauagcac acuucgcacc uacauuuucug auugguggac uciugcugcu 7800  
 aagaaccuuu uugcucuugc agagcaauau ucuauccaag auugggcuaa accuauugaaa 7860  
 gcauugguag agcaagggguu cacuguuccu gaaaaucaaga ccauccuugg gaccaugccu 7920  
 gccuuuugag ucaugcuuca ggcucuucag aaagcuacc uccagacacc ugauuuuuaau 7980  
 gucccccuuag cagauuuugag gauuccauca guicagauaa aciuucaaaga cuuaaaaau 8040  
 auaaaaauucc cauccagggu uuccacacca gauuuuacca uccuuuacac cuuccacauu 8100  
 cciuuccuuua caauugacuu ugcugaaaaug aaaguuaaga ucaucagaac cauugaccag 8160  
 augcagaaca gugagcugca guggcccgguu ccagauauu aucucaggga ucugaaggug 8220  
 gaggacauuc cuciagcggg aaucacccug ccagacuucc guuuaaccaga aaucgcuaauu 8280  
 ccagaauuica uaaucacca ucuacaaccu uauuguuuic aaguuccuga cciuucacaua 8340  
 ccagaauuucc agciuuccca caucucacac acaauuugaag uaccuacuuu uggcaagcua 8400  
 uacaguauuc ugaaaaucca aucuccucuu uucacauuuag augcaaaugc ugacauuagg 8460  
 aauggaacca ccucagcaaa cgaagcaggu aucgcagcui ccaucacugc caaaggagag 8520  
 uccaaauuag aaguucuuaa uuuugauuuu caagcaaaug cacaacucuc aaacccuaag 8580  
 auuaauccgc ugugcucugaa ggagucagug aaguucucca gcaaguaccu gagaacggag 8640  
 caugggagug aaaaugcuguu uuuuggaaaa gcuauugagg gaaaaaucaaa cacaguggca 8700  
 aquuuuacaca cagaaaaaaa uacacuggag cuuquaauu gugugauuug caagauuaac 8760  
 aaucagcuua cccuggauag caacacuaaa uaciuccaca aauugaacau ccccaaaacug 8820  
 gacuucucua gucaggcuga ccugcgcac gagaucaga cacuguugaa agcuggccac 8880  
 auagcaugga cuucuucugg aaaaggguca ugaaaauggg ccugcccccag auiucucagau 8940  
 gagggAACAC augaaucaca aauuaguui accauagaag gacccucac uuccuuugga 9000  
 cuguccaaaua agaucaauag caaacaccua agaguuaacc aaaacuuggu uuauguaauu 9060  
 ggcucccuuca acuuuuucua acuugaaaaau caauucacaag ucgauuucca gcaugugggc 9120  
 cacaguguuuc uaacugcuaa aggcauggca cuguuuggag aagggaaggc agaguuuacu 9180  
 gggaggcaug augcuauuuu aauuggaaaa guuauuggaa cuuugaaaaa uucucuuuic 9240  
 uuuucagccc agccauuuga gaucacggca uccacaaaca augaaggaa uuugaaaguu 9300  
 cguiuuuccau uaaggguuac aggaaagaua gaciuuccuga auuacuaugc acuguuuicug 9360  
 agucccagug cccagcaagc aaguuggcaa guaagugcua gguucaauca guauaaguac 9420  
 aaccaaaaaau ucucugcugg aaacaacagag aacauuuauugg aggcccuaug aggaauuaau 9480  
 ggagaagcaa aucuggauuu cuuuaacauu cccuuuaacaa uuccuuaauu ggcucuaccu 9540  
 uacacaauua ucacaacucc uccacugaaa gauuucucuc uauuggaaaa aacaggcuug 9600  
 aaggauuuuc uggaaaacgac aaagcaauca uuuuguuuaa gugaaaaaagc ucaugauuaag 9660  
 aaaaacaaac acaggcauuc caucacaaau cccuuuggcug ugcuuuguga guuuaucagu 9720  
 cagagcauca aauccuuuga caggcauuu gaaaaaaaca gaaacaaugc aauugauuuu 9780  
 gucaccaauu ccuauuaauga aacaaaaauu aaguuguaa aguacaaagc ugaaaaauu 9840  
 cacgacgagc ucccccaggac cuuucaaaaauu ccuggauuaca cuguuccag ugucaauug 9900  
 gaugugucuc cauucaccau agagaugc gcauucggcu auguguuuccc aaaagcaguc 9960  
 agcaugccua guuucuccau ccuagguuucu gacguuccug ugcuuucaua cacauuaau 10020

cugccaucau uagagcugcc aguccuucau gucccuagaa aucucaagcu uucucuucca 10080  
 cauuucaagg aauuguguac cauaagccau auuuuuauuc cugccauggg caauauuacc 10140  
 uaugauuuu cuuuuuaauc aagugucauc acacugaauc ccaaugcuga acuuuuuaac 10200  
 cagucagaua uuguugcuba ucuccuuic ucaucuucau cugucauuga ugcacugcag 10260  
 uacaaaauag agggcaccac aagauugaca agaaaaagg gauugaaguu agccacagcu 10320  
 cugucucuga gcaacaaau uguggaggg agucauaaca guacugugag cuuaaccacg 10380  
 aaaaaauaugg aagugucau ggcaaaaacc acaaaagccg aauuuccaaau uuggagaau 10440  
 aauuuucaagc aagaacuuua ugaaaaauacc aaguaaaaac cuacugucus uuccuccaung 10500  
 gaauuuuaagu augauuuuca auciucuaug cuguacucua ccgcuuaagg agcaguugac 10560  
 cacaagcuua gciuggaaag ccucaccucu uacuuuuucca uugagucauc uaccaaagg 10620  
 gaugucaagg guucgguiu uucucggaa uauucagggaa cuauugcuag ugaggccaac 10680  
 acuacuuga auuccaagag cacacggucu ucagugaagc ugcagggcac uuccaaaau 10740  
 gaugauaucu ggaaccuuga aguaaaaagaa auuuuugcug gagaagccac acuccaacgc 10800  
 auauauuccc ucugggagca caguacgaaa aaccacuuac agcuagaggg ccucuuuic 10860  
 accaacggag aacauacaag caaagccacc cuggaacucu cuccauggca aaugucagcu 10920  
 cuuguucagg uccaugcaag ucagccccagu ucciuuccaung auuuuccuga cciuggccag 10980  
 gaaguggccc ugaaugcuua cacuaagaac cagaagauca gauggaaaaa ugaagucccg 11040  
 auucauucug ggucuuucca gagccagguc gagcuiucca augaccaaga aaaggcacac 11100  
 cuugacauug caggaucuu agaaggacac cuaagguiucc ucaaaaaauau cauccuacca 11160  
 gucuaugaca agagcuaaug ggauuuccua aagcuggaung uaaccaccag cauugguagg 11220  
 agacagcauc uucguguiuc aacugccuuu guguacacca aaaaccccaa uggcuauuca 11280  
 uucuccaucc cuguaaaaagu uuuggcugau aauuucauua cuccugggcu gaaacuuaau 11340  
 gaucuaaaauu caguucuuu caugccuacg uuccaugucc cauuuacaga uciuicagg 11400  
 ccaucgugca aacuugacuu cagagaaaaa caaaucuaua agaagcugag aaciucauca 11460  
 uuuugccuca accuaccaac acucccccgag guaaaaaucc cugaaguuga uguguuuaca 11520  
 aaaaauuucuc aaccagaaga cuccuugauu cccuuuuuug agauaaccgu gccugaaucu 11580  
 caguuaacug uguccccaguu cacgcuucca aaaaguguuu cagauggcav ugcugcuiuug 11640  
 gaucuaaaug caguagccaa caagaucgca gacuuugagu ugcccaccau caucgugccu 11700  
 gagcagagca uugagauucc cuccauuaag uucucuguac cugcuggaau ugucauuccu 11760  
 uccuuucaag cacugacugc acgcuuggag guagacucu ccguguauaa ugcccacuugg 11820  
 agugccaguu ugaaaaacaa agcagauuuu guugaaacag uccuggauuc cacaugcagc 11880  
 ucaaccguac agiuuccuaga auuugaacua aauguuuugg gaacacacaa aaucgaagau 11940  
 gguacguuag ccucuaagac uaaaggaaca cuugcacacc gugacuucag ugcagaaau 12000  
 gaagaagaaug gcaauuuuuga aggacuucag gaaugggaag gaaaagcgca ccucaauauc 12060  
 aaaaagcccg cguucaccga ucuuccaucug cgcuaccaga aagacaagaa aggcaucucc 12120  
 accucaggc ccuuccccagc cguaggcacc guggggcaugg auauuggauga agaugacgac 12180  
 uuuuucuaauu ggaacuucua cuacagcccu caguccucuc cagauaaaaa acucaccaua 12240  
 uucaaaacug aguugagggu ccggaaauuc gaugaggaaa cucagauca aguuaauuugg 12300  
 gaagaagagg cagcuucugg cuugcuaacc ucucugaaag acaacgugcc caaggccaca 12360  
 gggguccuuu augauuaugu caacaaguac cacugggaac acacaggguu caccugaga 12420  
 gaagugucuu caaagcugag aagaaaaucug cagaacaaug cugaguggu uuaucagg 12480  
 gccaauuaggc aaaaugauga uaucgacug agguuccaga aagcagccag uggcaccacu 12540  
 gggaccuacc aagagugaa ggacaaggcc cagaaucuu accaggaacu guugacucag 12600  
 gaaggccaaag ccaguuucca ggacucaag gauaacgugu uugauuggu gguacgagu 12660  
 acucaaaaaau uccauuaugaa agucaagcau cugauugacu cacucuuuga uuuucugaac 12720  
 uuccccagau uccaguucc gggaaaccu gggauauaca cuaggggagga acuuuugcacu 12780  
 augiucauaa gggagguagg gacgguacug ucccagguaau auucgaaagu ccauaauugg 12840  
 ucagaaaaac uuuuuccua uuuuccaagac cuagugauua cacuuccuuu cgaguuaagg 12900  
 aaacauaaac uaaauagauu aaucucgaug uauagggaaac uguugaaaga uuuaucaaaa 12960  
 gaagcccaag agguauuuua agccauucag ucucucaaga ccacagaggu gcuacguau 13020  
 cuucaggacc uuuuacaauu cauuuuuccaa cuaauagaag auaacauuaa acagcugaaa 13080  
 gagaugaaaa uuacuuuauc uuuuauuuau auccaagaug agaucaacac aaucuuucaau 13140  
 gauuuuaucc cauauguuuu uaaaaugguug aaagaaaaacc uaugccuuua uciuicauua 13200  
 uucaauugaaau uuuuucaaaa cgacuucag gaagcuucuc aagaguuaaca gcagauucc 13260  
 caauacuuua uggcccuucg ugaagaauau uuugauccaa guauaguugg cuggacagug 13320  
 aaaaauuaug aacuugaaga aaagauaguc agucugauca agaaccuguu aguugcucuu 13380  
 aaggacuucc uuucugaaaua uauugucagu gcccucuaacu uacuuccca acucucaagu 13440  
 caaguugagc auuuucugca cagaaaaauu cagggaaauuc uuagcauccu uaccgauc 13500  
 gauggaaaaag ggaaagagaa gauugcagag cuuucugccu cugcucagga aauuaauua 13560  
 agccaggccu uugcgacaa gaaaaauuu ucugauuacc accagcaguu uagauauaaa 13620  
 cugcaagauu uuuucagacca acucucugau uacuaugaaa aauuuauugc ugaauccaa 13680  
 agauugauug accuguccau ucaaaacuac cacacauuic ugauauacau cacggaguua 13740  
 cugaaaaagc ugcaaucaac cacagucaug aaccccuaca ugaagcuiugc uccaggagaa 13800  
 cuuacauca uccucuuauu uuuuaaaaga aauciucuuu uauucuuicu uuccaaauuuga 13860  
 acuuucacau agcacagaaa aauuuuacaaac ugccuauauu gauaaaaacca uacagugagc 13920

cagccuugca guaggcagua gacuauaagc agaagcacau augaacugga ccugcaccaa 13980  
 agcuggcacc agggcucgga aggucucuga acucagaagg auggcauuuu uugcaaguua 14040  
 aagaaaaauca ggaucugagu uauuuugcuu aacuuggggg aggaggaaca aauaaaugga 14100  
 gucuuuuauug uguaucaua 14119

<210> 2

<211> 1503

5 <212> ADN

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 2

atgggtgcga gagcgtcagt attaagcggg ggagaattag atcgatggg aaaaattcgg 60  
 ttaaggccag ggggaaagaa aaaatataaa ttaaaaacata tagtatggc aagcaggag 120  
 ctagaacat tcgcagttaa tcctggcctg ttagaaacat cagaaggctg tagacaata 180  
 ctgggacagc tacaaccatc ctttcagaca ggatcagaag aacttagatc attatataat 240  
 acagtagcaa ccctctattt tgtgcataa aggatagaga taaaagacac caaggaagct 300  
 ttagacaaga tagaggaaga gcaaaacaaa agtaagaaaa aagcacagca agcagcagct 360  
 gacacaggac acagcaatca ggtcagccaa aattacccta tagtgcagaa catccagggg 420  
 caaatggtaa atcaggccat atcacctaga actttaaatg catgggtaaa agtagtagaa 480  
 gagaaggctt tcagcccaga agtgataccc atgtttcag cattatcaga aggagccacc 540  
 ccacaagatt taaacaccat gctaaacaca gtgggggac atcaagcago catgaaatg 600  
 ttaaaagaga ccatcaatga ggaagctgca gaatggata gatgcatacc agtgcatac 660  
 gggcctattt caccaggcca gatgagagaa ccaagggaa gtgacatagc aggaactact 720  
 agtacccttc aggaacaaaat aggatggatg acaaataatc caccatccc agtaggagaa 780  
 atttataaaa gatggataat cctggatta aataaaatag taagaatgtt tagccctacc 840  
 agcattctgg acataagaca aggaccaaag gaacccttta gagactatgt agaccgggtc 900  
 tataaaaactc taagagccga gcaagcttca caggaggtt aaaaattggat gacagaaacc 960  
 ttgttggtcc aaaatgcgaa cccagattgt aagactattt taaaagcatt gggaccagcg 1020  
 gctacactag aagaaatgtt gacagcatgt cagggagtag gaggacccgg ccataaggca 1080  
 agagtttgg ctgaagcaat gagccaagta acaaattcag ctaccataat gatgcagaga 1140  
 ggcaattttt ggaacccaaag aaagattgtt aagtgttca attgtggcaa agaaggcac 1200  
 acagccagaa attgcagggc ccctaggaaa aaggctgtt ggaatgtgg aaaggaagga 1260  
 caccaaatga aagattgtac tgagagacag gctaatttt taggaaagat ctggccttcc 1320  
 tacaaggaa gcccaggaa ttttcttcag agcagaccag agccaacagc cccaccagaa 1380  
 gagagcttca gtcgtgggtt agagacaaca actccccctc agaagcagga gccgatagac 1440  
 aaggaactgt atccttaac ttccctcagg tcactcttg gcaacgaccc ctcgtcacaa 1500  
 10 taa 1503

<210> 3

<211> 261

15 <212> ADN

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana

<400> 3

atggagccag tagatcctag actagagccc tggaagcatc caggaagtca gcctaaaact 60  
 gcttgcacca attgctattt taaaaagtgt tgctttcatt gccaagtttgc ttctataaca 120  
 aaagccttag gcatctccat tggcaggaaag aagcggagac agcagacgaag agctcatcag 180  
 aacagtccaga ctcataaagc ttctctatca aagcaacccca cctcccaacc ccgaggggac 240  
 20 ccgacaggcc cgaaggaata g 261

<210> 4

<211> 2571

<212> ADN

<213> Virus de la inmunodeficiencia humana

25

<400> 4

ctcctggta aggagaaaata tcagcaacttggatggatgggg ggtggagatg gggcaccatg 60  
gggtacccgt tggaaaggaa agcaaccacc actctatttt gtgcatacaga tgctaaagca 120  
tatgatacag aggtacataa ttgttggcc acacatgcct gtgtacccac agaccccaac 180  
ccacaagaag tagtatttgtt aaatgtgaca gaaaattttt acatgtggaa aatgacatg 300  
gtagaacaga tgcatacgat tataatcgat ttatggatc aaagcctaaa gccatgtgta 360  
aaatataaccc cactctgtgt tagttaaag tgcactgatt tgaagaatga tactaataacc 420  
  
aatagtagta gcgggagaat gataatggag aaaggagaga taaaaaactg ctcttcaat 480  
atcagcacaa gcataagagg taaggtgcag aaagaatatg cattttttta taaacttgat 540  
ataataccaa tagataatga tactaccgc tataagtga caagtgtaa cacctcagtc 600  
attacacagg cctgtccaaa ggtatcctt gagccaattc ccatacatta ttgtgccccg 660  
gtctggtttg cgattctaaa atgtataat aagacgttca atggAACAGG accatgtaca 720  
aatgtcagca cagtagcaatg tacacatgga attaggccag tagtatcaac tcaactgctg 780  
ttaaatggca gtctagcaga agaagaggtt gtaatttagat ctgtcaattt cacggacaaat 840  
gtctaaaacca taatagtaca gctgaacaca tctgtagaaa ttaatttgatc aagacccaaac 900  
aacaatacaa gaaaagaat ccgtatccag agaggaccag ggagagcatt tggtacaata 960  
ggaaaaatag gaaatatgag acaagcacat tgaacatta gttagacaaa atggataaac 1020  
actttaaaac agatacgatg caaattaaga gacaatttg gaaataataa aacaataatc 1080  
tttaagcaat cctcaggagg ggacccagaa attgtAACGC acagttttaa ttgtggaggg 1140  
gaattttct actgttaatc aacacaactg ttaatagtta cttggttaa tagtacttgg 1200  
agtactgaag ggtcaataaa cactgaagga atgtacacaa tcaccctccc atgcagaata 1260  
aaacaaatataa taaacatgtg gcagaagta gggaaagcaa tttatggccc tcccatcagt 1320  
ggacaaatataa gatgttcatc aaatattaca ggctgttatc taacaagaga ttgtggtaat 1380  
agcaacaatg agtcccgatg cttcagacct ggaggaggag atatgaggaa caattggaga 1440  
agtgaatttat ataaatataa agtagtaaaa attgaaccat taggatgtc acccaccac 1500  
gcaaaagagaa gaggtgtca gagagaaaaa agagcagtgg gaataggagc ttgttcctt 1560  
gggttcttgg gaggcagg aagcactatg gggcgcgcct caatgacgt gacggatcag 1620  
gccagacaat tattgtctgg tatagtgcag cagcagaaca atttgcgtg ggctattgtg 1680  
gcgcaacacgc atctgttgcactcagatc tggggcatca agcagctcca ggcaagaatc 1740  
ctggctgtgg aaagataacctt aaaggatcaa cagctcctgg ggatttgggg ttgtcttgg 1800  
aaactcattt gcaccactgc tggccttgg aatgtctgtt ggagtaataa atctcttggaa 1860  
cagatttggaa atcacacgcac tggatggag tggacagagaa atttacacaatc 1920  
tttaataactt ccttaatttga agaatcgaa aaccagcaag aaaagaatga acaagaatata 1980  
tttggaaattttt ataaatgggc aagtttggg aatttggttt acataacaaa ttggctgtgg 2040  
tatataaaat tattcataat gatgttagga ggcttggtag gtttaagaat agttttgtt 2100  
gtactttcta tagtgaatag agtttagcgg ggtatattcac cattatcgat tcaagacccac 2160  
ctcccaaccc cgaggggacc cgacagggccca gaggaaataag aagaagaagg tggagagaga 2220  
gacagagaca gatccattcg attagtgtac ggatccttgg cacttatctg ggacgtatctg 2280  
cgggacccgtt gccttctcag ctaccaccgc ttgagagact tactcttgcat tgcatacgagg 2340  
attgtggaaatc ttctgggacg caggggtgg gaaagccctca aatattgggtt gaaatcttca 2400  
cagttttggaa gtcaggaaactt aaagaatagt gctgttagct tgcataatgc cacagccata 2460  
gcagtagctg agggacacaa tagggttata gaaatgttac aaggagctt tagagctt 2520  
cgccacatac ttagaagaat aagacaggc ttggaaagga ttttgcataa a 2571

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

10 <400> 5

atgggtgcga gagcgtcagt attaagcggg ggagaattag atcgatggga aaaaattcgg 60  
ttaaggccag gggaaagaa aaaatataaa taaaacata tagtatggc aagcaggag 120  
ctagaacgat tcgcagttaa tcctggcctg ttagaaacat cagaaggctg tagacaata 180  
ctgggacagc tacaaccatc cttcagaca ggatcagaag aacttagatc attatataat 240  
acagtagcaa ccctctattt tgtcatcaa agatagaga taaaagacac caaggaagct 300  
ttagacaaga tagaggaaga gcaaaacaaa agtaagaaaa aagcacagca agcagcagct 360  
gacacaggac acagcaatca ggtcagccaa aattacccta tagtgcagaa catccaggg 420  
caaatggtaatcaggccat atcacctaga actttaaatg catggtaaa agttagtagaa 480  
gagaaggctt tcagcccaga agtgataccc atgtttcag cattatcaga aggagccacc 540  
ccacaagatt taaacaccat gctaaacaca gtgggggac atcaagcagc catgcaaatg 600  
ttaaaagaga ccatcaatga ggaagctgca gaatggata gagtgcattc agtgcattc 660  
gggcctattt caccaggcca gatgagagaa ccaagggaa gtgacatagc aggaactact 720  
agtacccttc aggaacaaat aggtggatg acaaataatc cactatccc agtaggagaa 780  
atttataaaa gatggataat cctggatta aataaaatag taagaatgtt tagccattacc 840  
agcattctgg acataagaca aggaccaaag gaaccctta gagactatgt agaccgttc 900  
tataaaactc taagagccga gcaagcttca caggaggtt aaaaattggat gacagaaacc 960  
tttgttgc 960  
aaaatgcgaa cccagattgt aagactattt taaaagcatt gggaccagcg 1020  
gctacactag aagaaatgtt gacagcatgt cagggagtag gaggaccgg ccataaggca 1080  
agagtttgg ctgaagcaat gagccaagta acaaattcag ctaccataat gatgcagaga 1140  
ggcaattttt ggaaccaaag aaagattgtt aagtgttca attgtggcaa agaaggcacc 1200  
acagccagaa attgcagggc cccttagaaa aaggctgtt gaaatgtgg aaaggaagga 1260  
caccaaatga aagattgtac tgagagacag gctaattttt taagggaaaga tctggcatttc 1320

ctacaaggga aggccaggga atttcttca gagcagacca gagccaacag ccccaccaga 1380  
 agagaagcttc aggtctgggg tagagacaaac aactccccct cagaagcagg agccgataga 1440  
 caaggaactg tatttttaa cttccctcag gtcactttt ggcaacgcacc cctcgtaaca 1500  
 ataaagatag gggggcaact aaaggaagct ctattagata caggagcaga tgatacagta 1560  
 ttagaaagaaa tgagtttgc aggaagatgg aaaccaaaaa tgataggggg aattggaggt 1620  
 tttatcaaag taagacagta tgatcagata ctcatagaaa tctgtggaca taaagctata 1680  
 ggtacagtat tagtaggacc tacacctgtc aacataattt gaagaaatct gttgactcag 1740  
 attgggtgca ctttaaattt tccattagc cctattgaga ctgtaccagt aaaattaaag 1800  
 ccaggaatgg atggcccaa agttaaacaa tggccatgta cagaagaaaa aataaaagca 1860  
 ttagtagaaa ttgtacaga gatgaaaaag gaagggaaaa tttcaaaaat tgggcctgaa 1920  
 aatccatatacata atactccagt atttgccata aagaaaaaag acagtactaa atggagaaaa 1980  
 ttagtagatt tcagagaact taataagaga actcaagact tctgggaagt tcaatttagga 2040  
 ataccacatc ccgcagggtt aaaaaagaaa aatcagtaa cagttactgga tgtgggtgat 2100  
 gcatatttt cagttccctt agatgaagac ttcaaggaatc atactgcatt taccatcac 2160  
 agtataaaca atgagacacc agggattaga tatcagttaca atgtgcttc acagggatgg 2220  
 aaaggatcac cagcaatatt ccaaagtgc atgacaaaaa tcttagagcc ttttagaaaa 2280  
 caaaatccag acatagttt ctatcaatac atggatgatt tttatgttagg atctgactta 2340  
 gaaatagggc agcatagaac aaaaatagag gagctgagac aacatctgtt gaggtgggaa 2400  
 cttaccacac cagacaaaaa acatcagaaa gaacctccat tcctttggat gggttatgaa 2460  
 ctccatcctg ataaatggac agtacagcct atagtgcgtc cagaaaaaaga cagctggact 2520  
 gtcaatgaca tacagaagtt agtggggaaa ttgaatttggg caagtcagat ttaccagg 2580  
 attaaagtaa ggcaattatg taaactcctt agaggaacca aagcactaac agaagtaata 2640  
 ccactaacag aagaagcaga gctagaactg gcagaaaaaca gagagattct aaaagaacca 2700  
 gtacatggag tttttatgta cccatcaaaa gacttaatag cagaaataca gaagcagg 2760  
 caaggccaat ggacatatca aatttatcaa gagccattt aaaaatctgaa aacaggaaaa 2820  
 tatgcaagaa tgaggggtgc ccacactaat gatgtaaaac aattaacaga ggcagtgca 2880  
 aaaataacca cagaaagcat agtaatatgg ggaaagactc ctaaattttaa actgcccata 2940  
 caaaaggaaa catggggaaac atggggaca gagtatttgc aagccacctg gattcctgag 3000  
 tgggagttt ttaataccctt tcccttagtq aaattatgtt accagttaga gaaagaaccc 3060  
 atagtaggag cagaaacctt ctatgttagat ggggcagcta acaggagac taaatttagga 3120  
 aaagcaggat atgttactaa tagaggaaga caaaaagttt tcacccttaac tgacacaaca 3180  
 aatcagaaga ctgagttaca agcaatttat ctatgttgc aggattcggg attagaagta 3240  
 aacatagtaa cagactcaca atatgcattt ggaatcattt aagcacaacc agatcaaagt 3300  
 gaatcagagt tagtcaatca aataatagag cagttataaa aaaaaggaaaa ggtctatctg 3360  
 gcatgggtac cagcacacaa aggaatttgg gggaaatgaaac aagttagataa attagtcgt 3420  
 gctggaatca gggaaatgtt atttttatgat ggaatagata aggcccaaga tgaacatgag 3480  
 aaatatcaca gtaatttggg agcaatggct agtatttttta acctgcccacc tttatgttagca 3540  
 aaagaaatag tagccagctg tgataaatgtt cagctaaaag gagaagccat gcatggacaa 3600  
 gtagactgta gtccaggaat atggcaacta gattgtacac atttagaagg aaaagtattc 3660  
 ctggtagcag ttcatgtac cagttggat atagaagcag aagtatttcc agcagaaaca 3720  
 gggcagggaaa cagcatattt tctttaaaaa ttagcagggaa gatggccagt aaaaacaata 3780  
 catactgaca atggcagcaa tttcaccggt gctacggta gggccgcctg ttgggtggcg 3840  
 ggaatcaagc aggaatttgg aattccctac aatccccaaa gtcaaggagt agtagaatct 3900  
 atgaataaaag aattaaagaa aattatagga caggttaagag atcaggctga acatcttaag 3960  
 acagcagtac aaatggcaatcattt aattttaaaaa gaaaaggggg gattgggggg 4020  
 tacagtgcag gggaaagaat agtagacata atagcaacag acatacaaaac taaagaatta 4080  
 caaaaacaaa ttacaaaaat tcaaaaattt cgggtttattt acagggacag cagaaatcca 4140  
 ctttggaaag gaccagcaa gtcctctgg aaaggtgaag gggcagttgt aatacaagat 4200  
 aatagtgaca taaaagttagt gccaagaaga aaagcaaaaga tcatttaggaa ttatggaaaa 4260  
 cagatggcag gtgtatgtt gttggcaagt agacaggatg aggattag 4308

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 579

5 &lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Virus de la inmunodeficiencia humana

&lt;400&gt; 6

atggaaaaca gatggcaggt gatgattgtg tggcaagtag acaggatgag gattagaaca 60  
 tggaaaaagt tagtaaaaca ccatatgtat gtttcaggga aagctagggg atggtttat 120  
 agacatcaat atgaaagccc tcataccaaga ataagtctcg aagtacacat cccactaggg 180  
 gatgctagat tggtaataac aacatattgg ggtctgcata caggagaaag agactggcat 240  
 ttgggtcagg gagtctccat agaatggagg aaaaagagat atagcacaca agtagaccct 300  
 gaactagcag accaactaat tcatactgtat tactttgact gttttcaga ctctgctata 360  
 agaaaggcct tattaggaca catagttagc cctagggttg aatatcaagc aggacataac 420  
 aagtaggat ctctacaata cttggacta gcagcattaa taacacccaa aaagataaaag 480  
  
 ccacctttgc ctatgttac gaaactgaca gaggatagat ggaacaagcc ccagaagacc 540  
 aagggccaca gagggagcaca cacaatgaat ggacactag 579

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

10 <400> 7

atgggtggca agtggtcaaa aagttagtgtg attggatggc ctactgtaa gaaaaagaatg 60  
 agacgagctg agccagcagc agatagggtg ggagcagcat ctcgagacat ggaaaaacat 120  
 ggagcaatca caagtagcaa tacagcagct accaatgtcg ctgtgcctg gctagaagca 180  
 caagaggagg aggaggtggg tttccagtc acacctcagg tacctttaag accaatgact 240  
 tacaaggcag ctgtagatct tagccactt taaaaagaaa aggggggact ggaaggccta 300  
 attcaactccc aaagaagaca agatatcctt gatctgtgg tctaccacac acaaggctac 360  
 ttccctgatt agcagaacta cacaccaggg ccaggggtca gatatccact gacctttgga 420  
 tggtgctaca agctagtacc agttgagcca gataagatag aagaggccaa taaaggagag 480  
 aacaccagct tgttacaccc tgtgagcctg catggatgg atgacccgga gagagaagtg 540  
 ttagagtgg a gtttgacag cgcctagca tttcatcacg tgccccgaga gctgcacccg 600  
 gactttca agaactgtcg a 621

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

20 <400> 8

auggugagca agggcgagga gcuguucacc gggguggugc ccauccuggu cgagcuggac 60  
 ggcgacguaa acggccacaa guucagcug uccggcgagg gcgaggcgca ugcccaccc 120  
 ggcaagcuga cccugaaguu caucugcacc accggcaagc ugcccugcc cuggccacc 180  
 cucgugacca cccugaccua cggcgugcag ugcuucagcc gcuaccccgca ccacaugaag 240  
 cagcacgacu ucuucaaguc cggcaugccc gaaggcuacg uccaggagcg caccaucuuc 300  
 uucaaggacg acggcaacua caagacccgc gcccagguga aguucgaggg cgacacccug 360  
 gugaaccgca ucgagcugaa gggcaucgac uucaaggagg acggcaacau ccuggggcac 420  
 aagcuggagu acaacuacaa cagccacaac gucuauauca uggccgacaa gcagaagaac 480  
 ggcaucaagg ugaacucaa gauccgccc aacaucgagg acggcagcgu gcagcucgcc 540  
 gaccacuacc agcagaacac ccccaucggc gacggcccg ugcugcugcc cgacaaccac 600  
 uaccugagca cccaguccgc ccugagcaaa gaccccaacg agaagcgcga ucacaugguc 660  
 cugcuggagu ucgugaccgc cgccgggauc acucucggca uggacgagcu guacaaguua 720  
 a 721

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

<400> 9

gucucucugg uuagaccaga ucugagccug ggagcucucu ggcuaacuag ggaaccacu 60  
 gcuuaagccu caauaaagcu ugccuugagu gcuucaagua gugugugccc gucuguugug 120  
 ugacucuggu aacuagagau cccucagacc cuuuuaguca guguggaaaa ucucuagcag 180  
 uggcgcccga acagggacau gaaagcgaaa gggaaaccag aggagcucuc ucgacgcagg 240  
 acucgcuug cugaagcgcg cacgcaaga ggcgaggggc ggcgacuggu gaguacgcca 300  
 aaaauuuuuga cuagcggagg cuagaaggag agagaugggu gcgagagcgu caguauuaag 360  
 cggggaaaaa uuagaucgau gggaaaaaaau ucgguuuagg ccagggggaa agaaaaaaaua 420  
 uaaaaauaaa cauauaguau gggcaagcag ggagcuagaa cgauucgcag uuauuccugg 480  
 ccuguuagaa acaucagaag gcuguagaca aauacuggga cagcuacaac caucccuuca 540  
 gacaggauca gaagaacgua gaucauuuaa uaaucagua gcaacccucu auugugugca 600  
 ucaaaggaua gagauaaaaag acaccaagga agcuuuagac aagauagagg aagagcaaaa 660  
 caaaaguaag aaaaaagcac agcaagcagc agcugacaca ggacacagca gccaggucag 720  
 ccaaaauuac ccuauagugc agaacaucca ggggcaaaug guacaucagg ccauauccacc 780  
 uagaacuuua aaugcauggg uaaaaaguagu agaagagaag gcuuucagcc cagaagugau 840  
 acccauguuu ucagcauuau cagaaggagc caccaccaa gauuuuaaca ccaugcuaaa 900  
 cacagugggg ggacaucaag cagccaugca aauguuaaaa gagaccauca augaggaagc 960  
 ugcagaaugg gauagagugc auccagugca ugcagggccu auugcaccag gccagaaugag 1020  
 agaaccaagg ggaagugaca uagcaggaac uacuaguacc cuucaggaac aauuaggaaug 1080

gaugacacau aauccaccua ucccaguagg agaaaucuau aaaagaugga uaauccuggg 1140  
 auuuaauaaa auaguaagaa uguauagccc uaccagcauu cuggacauaa gacaaggacc 1200  
 aaaggaaccc uuuagagacu auguagaccg auucuauaaa acucuaagag ccgagcagc 1260  
 uucacaagag guaaaaaauu ggaugacaga aaccuuuguug guccaaaaug cgaacccaga 1320  
 uuguaagacu auuuuuuaag cauugggacc aggagcgaca cuagaagaaa ugaugacagc 1380  
 augucagggg guggggggac ccggcccauaa agcaagagu uuggcuqaag caaugagcca 1440  
 aquaacaauu ccagcuacca uaaugauaca gaaaggcaau uuuaggaacc aaagaaagac 1500  
 uguuaagugu uucaauuugug gcaaagaagg gcacauagcc aaaaaauugca gggccccuag 1560  
 gaaaaaggcc uguuggaaau guggaaagga aggacaccaa augaaagauu guacugagag 1620  
 acagggcuauu uuuuuuaggga agaucuggcc uuccccacaag ggaaggccag ggaauuuuucu 1680  
 ucagagcaga ccagagccaa cagccccacc agaagagagc uucagguuug gggaaagagac 1740  
 aacaacuccc ucucagaagc aggagccgau agacaaggaa cuguauccuu uagciuuccu 1800  
 cagaucacuc uuuggcagcg accccucugc acaauuaaga uagggggca auuuaaggaa 1860  
 gcucuauuaug auacaggagc agaugauaca guauuaagaag aaaaugaaaa gccaggaaga 1920  
 uggaacacaa aaaaugauagg gggaaauugga gguuuuuauca aaguaagaca guaugaucag 1980  
 auacucauag aaaaucugcg acauuaagcu auaggguacag uuuuaguagg accuacaccu 2040  
 gucaacauaa uuggaaagaa ucuguugacu cagauuggcu gcacuuuuaaa uuuuucccauu 2100  
 aguccuauug agacuguacc aguaaaaauu aagccaggaa uggauggccc aaaaaguuaaa 2160  
 caauggccau ugacagaaga aaaaauaaaa gcauuaguag aaaaauuguac agaaauggaa 2220  
 aaggaaggaa aaaaauucaaa aauugggcu gaaaaauccau acaauacucc aguauuuugcc 2280  
 auaaaagaaaa aagacaguac uaaauggaga aaaaauaguag uuuucagaga acuuuaauaag 2340  
 agaacucaag auuucuggga agucaauuu gggaaucacc auccugcagg guuaaaacag 2400  
 aaaaaauucag uaacaguacu ggaugugggc gaugcaauu uucaguiucc cuuagauaaa 2460  
 gacuucagga aguauacugc auuuaccaua ccuaguauaa acaauagagc accagggaauu 2520  
 agauauucagu acaauggugc uccacaggga uggaaggau caccagcaau auiuccagugu 2580  
 agcaugacaa aaaaucuuaaga gcccuuuua aacaaaaauc cagacauagu caucuaucuu 2640  
 uacauggaug auuuuguauu aggaucugac uuagaaauag ggcagcauag aacaaaaauua 2700  
 gaggaacuga gacaacaucu guugaggugg ggauuuuacca caccagacaa aaaaacaucag 2760  
 aaagaaccuc cauuccuuug gauggguuuu gaacuccauc cugauuaauu gacaguacag 2820  
 ccuauagugc ugccagaaaa ggacagcugg acugucaauu acauacagaa auiuagugga 2880  
 aaaaugaaaa gggcaaguca gauuuuugca gggauuuuaag uaaggcaauu auiuuaacuu 2940  
 cuuaggggaa ccaaagcacu aacagaagua guaccacuaa cagaagaagc agacuagaa 3000  
 cuggcagaaa acaggagagau ucuuuaagaa cggguacaua gaguquaua uaccccauca 3060  
 aaagacuuua uagcagaaa acagaaggcg gggcaaggcc aauuggacaua ucaauuuuuu 3120  
 caagagccau uaaaaauucu gaaaacagga aaguauugca gaaugqagg ugccccacacu 3180  
 aaugauguga aacaauuaac agagggcagua caaaaaaaaa uacaaaaagg ccacagaaag cauaguauua 3240  
 ugaaaaaaga cuccuuuuu uaaaaauuccc auacaaaaagg aaacauuggg agcauggugg 3300  
 acagaguauu ggcagccac cuggauuccu gaguggggagu uugucaauac cccuuccuuua 3360  
 guaagguuuu gguaccaguu agagaaagaa cccauuuuag ggcagaaac uuiucuaugua 3420  
 gauggggcaag ccaaauuggg aacuuuuuuu ggaaaagcag gauauguaua ugacagagga 3480  
 agacaaaaaa uuguccccc aacggacaca acaauaucaga agacugaguu acaagcaauu 3540  
 caucuagcuu ugcaggauuc gggauuuuag guaaacauuu ugacagacuc acaauuaugca 3600  
 uuggggauuca uucaaggcaca accgauuaag aguauaucag aguuauugca uaaaaauuaa 3660  
 gagcaguuaa uaaaaaaggaa aaaagcuauc cuggcauggg uaccagcaca caaaggaaauu 3720  
 ggaggaaaaug aacaaguaga uaaaauuggc agugcuggaa ucaggaaagu acuauuuuuu 3780  
 gauggaaauag auaaggccc aagaagaacauu gagaaaaauu acaguauuug gagagcaauu 3840  
 gcuagugauu uuaaccuacc accguaguaa gcaaaaaaaa uaguagccag cugugauaaa 3900  
 uguacgcuua aaggggaaagc caugcaugga caaguagacu guagcccagg aauauuggcag 3960  
 cuagauuugua cacauuuuaga agaaaaaaguu auciugguag caguucaugu agccagugga 4020  
 uauauagaag cagaaguauu uccagcagag acaggccaa aacacgcaua cuuuccuuua 4080  
 aaaaauagcag gaagauggcc aguaaaaaca guacauacag acaauuggcag caauuuucacc 4140  
 aguacuacag uuaaggccgc cuguuggugg gcggggauca agcaggaauu ugcauuccc 4200  
 uacaauuccc aaaaucuagg aguauuugaa ucuauugaua aagaauuuaa gaaaaauuaa 4260  
 ggacagguua gagaucaggc ugaacauuu aagacagcag uacaaaauggc aguauucauc 4320  
 cacaauuuua aaaaagggg gggauuuggg gggauacagug cagggaaag aauaguagac 4380  
 auaauagcaa cagacauuaca aacuuuagaa uuacaaaaac aaaaauacaaa aauuuaauu 4440  
 uuuccgguuu uuuacaggga cagcagagau ccaguuugga aaggaccagc aacgcuuccu 4500  
 ugaaaaaggug aaggggcagu aguauuacaa gauauuugug acauaaaaagu agugccaaga 4560  
 agaaaaagcaa agaucaucag ggauuuuugga aaacagauug cagggauuga uguguguggca 4620  
 aguagacagg augaggauua acacauggaa aagauuagu aacaccaua uguauuauu 4680  
 aaggaaagcu aaggacuggu uuuauagaca ucacauuagu aguacuaauc caaaaaauaag 4740  
 uucagaaguua cacaucuccac uaggggaugc uaaaaauuagu auaacaacau auuggggucu 4800  
 gcauacagga gaaagagacu ggcuuuuggg ucagggaguc ucacauuauu ggagggaaaa 4860  
 gagauauuagc acacaaguag acccugacccu agcagaccaa cuuuuuucauc ugacauuuu 4920  
 ugauuguuuu ucagauaucug cuauuaagaaa uaccauauua ggacguauag uuaguuccuag 4980

gugugaaauau caagcaggac auacaacaggua aggaucucua caguacuugg cacuagcagc 5040  
 auuaauaaaa ccaaaacaga uaaagccacc uuugccuagu guuaggaaac ugacagagga 5100  
 cagauggaac aagccccaga agaccaaggg ccacagaggg agccauacaa ugauuggaca 5160  
 cuagagcuuu uagaggaacu uaagagugaa gcuguuagac auuuuccuag gauauggcuc 5220  
 cauaaciuuag gacaacauau cuaugaaacu uacgggguaa cuugggcagg aguggaagcc 5280  
 auuaauaagaa uucugcaaca acugcuguuu auccauuuca gaauugggug ucgacauagc 5340  
 agaauaaggcg uuacucgaca gaggagagca agaaauggag ccaguagauc cuagacuaga 5400  
 gcccuggaag cauccaggaa gucagccuaa aacugcuugu accaaauugcu auuguaaaaa 5460  
 guguugcuuu cauugccaag uuuguuuicau aacaaaaggcc uuaggcaucu ccuauggcag 5520  
 gaagaagccg agacagcgac gaagaccucc ucaaggcagu cagacuacu aaguuucucu 5580  
 aucaaagcg uaaguaauac auguaaugca accuauacaa auagcaauag uagcauuagu 5640  
 aguagcaua auuaauagcaa uaguugugug guccauagua aucauagaau auagggaaaau 5700  
 auuaagacaa agaaaaauag acagguaau ugauagacua auagaaagag cagaagacag 5760  
 uggcaaugag agugaaggag aaaauaucagc acuuguggag augggggugg agauggggca 5820  
 ccaugcuccu uggauguuug augaucugua gugcuacaga aaaaauuggg gucacagucu 5880  
 auuauggggu accugugugg aaggaagcaa ccaccacucu auuuugugca ucagaugcua 5940  
 aagcauauga uacagaggua cauaauguuu gggccacaca ugccugquua cccacagacc 6000  
 ccaaccacaca agaaguqua uugguaauug ugacagaaaa uuuuaacaug ugaaaaaaug 6060  
 acaugguaga agaaugcuaug gagguaauua ucaguuaug ggaucaaaagc cuaaagccau 6120  
 guguaauuuu aacccacac uuguuuuag uuaagugcuc uaguuuugaag aaugauacua 6180  
 auacaaauag uaguagcggg agaaugauaa ugagaaaaag agagauaaaa aacugcucuu 6240  
 ucaaaauucag cacaagcaua agagguuagg ugcagaaaga auaugcauuu uuuuauaaac 6300  
 uugauauau accaaauagau aaugauacua ccagcauaac guugacaagu uguuacaccu 6360  
 cagucauauc acaggccuqu ccaaagguaau ccuuuugagcc auuucccaua cauuauugug 6420  
 ccccgccugg uuuugcgaau cuaaaaugua auuaauagac guucauugga acaggaccu 6480  
 guacaaauug cagcacqua caauguacac auggaauuag gccaguqua ucaacucaac 6540  
 ugcuguuaaa uggcagucua gcagaagaag agguaguaua uagaucuguc aauuucacgg 6600  
 acaaungcuua aaccauaaua guacagcuga acacaucugu agaaauuaau uguacaagac 6660  
 ccaacaacaa uacaagaaaa aaaaucgua uccagagggg accaggagaga gcauuuguuia 6720  
 caauagggaa aauagggaaau augagacaag cacauugua cauuaguaga gcaaaauugga 6780  
 augccacuuu aaaacagaua gcuagcaaaau uaagagaaca auuuggaaau auuaaaacaa 6840  
 uaaucuuuaa gcaauuccuua ggaggggacc cagaaauugu aacgcacagu uuuuauugug 6900  
 gagggggauu uuuucuacuug aauucaacac aacuguuuaa uaguacuugg uuuuauugua 6960  
 cuuggaguc ugaagggcua aauuacacug aaggaaguga cacaucaca cuccaugcga 7020  
 gaaauaaaaaca auuuaauaaac auguggcagg aaguaggaaa agcaauuguu gcccucucca 7080  
 ucagcggaca auuuagaug ucaucaaaaua uuacaggcgcu gcuuuaaca agagauggug 7140  
 guauuaacaa caaugggucc gagaucuuu gaccugggg aggagauauug aggacacauu 7200  
 ggagaaguga auuaauuaaua uauuaaguag uaaaaauuga accauuugga guagcaccca 7260  
 ccaaggccaa gagaagagug gugcagagag aaaaagagc aguggggaua ggacuuuugu 7320  
 ucuiuggguu cuuggggagca gcaggaagca cuuugggcgc agcguuauug accugacgg 7380  
 uacaggccag acaauuaug ucugguauag ugcagcagca gaacauuuug cugagggcua 7440  
 uugaggcgca acagcaucug uugcaacuca cagucugggg caucaagcag cuccaggcua 7500  
 gaaucucuggc ugugggaaaga uaccuaaagg aucaacagcu ccuggggauu ugugguugcu 7560  
 cuggaaaacu cauuugcacc acugcugugc cuugggaugc uaguuggagu auuaauucuc 7620  
 uggaacagau uuggaaucac acgaccugga ugagugggga cagagaaaaau aacaauuaca 7680  
 caagcuuau acacuccuua auugaagaau cgcaaaaacca gcaagaaaaag auugaacaag 7740  
 aauuuauugga auuagauaaa ugggcaagu uguggaaauug guuuuacaua acaaauuggc 7800  
 ugugguauau aaaaauuuc auuauugauag uaggaggcuu gguagguuua agaaauuguu 7860  
 uugcuguacu uucuguauag auuagaguua ggcagggaaua uucaccuuua ucguiucaga 7920  
 cccaccucca aauccccagg ggaccgcaca ggcccgaagg aauuagaaag gaagguggag 7980  
 agagagacag agacagacau aauucgauuag ugaacggcua cuuagcacuu auciugggacg 8040  
 aucugcggag ccugugccuc uucagcuacc accgcuugag agacuacuac uugauugua 8100  
 cgaggauugu ggaacuucug ggacgcagg ggugggaagc cuucaauau ugugggaauc 8160  
 uccuacaaaua uuggagucag gagguaaaga auagugcugu uagcuugcuc aauugccacag 8220  
 cuauagcagu agcugagggg acagauaggg uuaauagaagu aguacaagaa gcuuauugag 8280  
 cuauucgcca cauaccuaga agaaauaggac agggcuugga aaggauuuug cuauaagau 8340  
 ggugggcaagu gguacaaaaag uagugugguu ggauggccug cuguaaggga aagaaugaga 8400  
 cgagcugagc cagcagcaga ugfffff gcaugcuauc gacaccuaga aaaaacauuga 8460  
 gcaaucacaa guagcaacac agcagcuaac aauugcugcii gugccuggcu agaagcacaa 8520  
 gaggaggaga aguggguuu uccagucaca ccucaggua cuuuuagacc aaugacuuac 8580  
 aaggcagcug ugaucuuuag ccacuuuuua aaagaaaaag ggggacugga agggcuuauu 8640  
 cacucccaac gaagacaaga uauccuugau cuguggaucu accacacaca aggcuacuuc 8700  
 ccugauuggc agaacuacac accaggacca gggcaugcua auccacugac cuuuggaugg 8760  
 cgcuacaaagc uaguaccagu ugagccagag aaguuaagaag aagccaaacaa aggagagaac 8820  
 accagcuugu uacacccugu gagccugcua gggaauggaag acccgagag aagaguguua 8880

ES 2 804 764 T3

gaguggagg uugacagccg ccuagcauuu caucacgugg cccgagagcu gcauccggag 8940  
uacuuacaaga acugcugaua ucgaugcugc uacaaggggac uuuccgcugg ggacuuucca 9000  
gggaggcgug gccuggggcg gacuggggag uggcgagccc ucagauccug cauauaagca 9060  
gcugcuiuuu gccuguaucug ggucucucug guuagaccag aucugagccu gggagcucuc 9120  
uggcuaacua gggaaacccac ugcuuaagcc ucaauuaagc uugccuugag ugcuucaagu 9180  
agugugugcc cgucuguuugu gugacucuagg uaacuagaga uccucuagac ccuuuuuaguc 9240  
aguguggaaa aucucuagca gu 9262

5 <210> 10  
<211> 13931  
<212> ARN  
<213> *Mus musculus*  
<400> 10

uaccugccug agcuccgccc ccgaagaccc uguagagcaa gcagcgaaaa cuaggccccu 60  
 ggcaggcca cagccaggaa gccaccccac cauccauccg ccauggggccc acgaaaagccu 120  
 gcccugccga cgccguuacu gcugcuguuc cugcuacugu ucuuggacac cagcgucugg 180  
 gcucaagaug aaguccugga aaacuuuagc uucagcuguc caaaagaugc aacucgauuc 240  
 aagcaccucc gaaaguacgu guacaacuuu gaagcugaaa guuccagcgg uguccaggc 300  
 acagcugacu ccagaagcgc caccaagauc aacuguaagg uagagcugga ggcccccaa 360  
 aucugugguu ucaucaugag gaccaaccag uguacccuuu aagaggugua uggcuucaac 420  
 ccugaggcga aggccuugau gaagaaaacc aagaacucug aagaguuuugc agcugccaug 480  
 uccagguacg aacucaagc ggccauuccu gaagggaaac aaaauuguuu uuaccugac 540  
 aaggauaac cuaaaaauu ccugaacauc aagagggcga ucaucucugc uciucugguu 600  
 cccccagaga cagaagagga ccaacaagag uugguuccugg auaccgugua ugaaacugc 660  
 ucaacucagg uuaccgugaa uucaagaaag ggaaccguac caacagaaa guccacagag 720  
 agaaaccugc agcaauguga cggcuuccag cccaucagua caagugucag cccucucgcu 780  
 cucaucaag gccuggucca cccuuguca acucuuuaca gcagcagcga aacuugccag 840  
 uacacccugg auccuaagag gaagcaugug ucugaaagcug ucugugaua gcagcaucuu 900  
 uuccugccuu ucuccuacaa gaaaaaguau gggaucauga cacguguuac acagaaacug 960  
 agucuugaag acacaccuuu gaucaacagu cgcuuciuuca gugaaggua caaccggau 1020  
 ggucuggccu uugagagcac caaguccacg ucauccccaa agcaggcuga ugcuguuuug 1080  
 aagacccuuc aagaacugaa aaaauugucc aucucagagc agaaugcuca gagagcaaaau 1140  
 cucuuucaaua aacugguuac ugagcugaga ggccucacug gugaagcaau cacaucuc 1200  
 uugccacagc ugauuugaagu guccagcccc aucacuuuac aagccuuggu ucagugugga 1260  
 cagccacagu gcuauacuca cauccuccag ugugugaaaa cugagaaggc ucacccuc 1320  
 cugguugaca uugucaccua ccugauuggc ugaucuccaa auccucaac acagaggcug 1380  
 cagggaaucu uuaauacugc caaggagcag cagagccgag ccacucugua ugcacugagc 1440  
 cacgcaguua acagcuauu ugauguggac cauuuagga gcccaguucu gcaggauauc 1500  
 gcugguuiacc uguugaaaca gaucgacaaau gaaugcacgg gcaauugaaga ccacaccuuc 1560  
 uugauuicuga gggucauugg aaaaauugga agaaccaugg aacaaguau gccagccuc 1620  
 aaguccucag uccugagcug uguacgaagu acaaaaccuu cucugcugau ucagaaagcu 1680  
 gcucuccagg cccugagggaa gauggaacug gaagauuggg uccggacgau ccuuuuugau 1740  
 acauuuuguaa auggugucgc ucccuggag aagagacugg cugccuauucu cuugcugau 1800  
 aagaacccuu ccucaucaga uauuaacaaa auugcccaac uucuccaaug ggaacagag 1860  
 gagcagguga agaacuucgu ggcaucucac auugccaaaca ucuugaacuc ggaagaacug 1920  
 uauguccaag aucugaaagu uuugaucaaa aaugcucugg agaaauuucu auuuuccaaacg 1980  
 aucauggacu ucagaaaaau uucccgaaac uaucagauuu cccaaucugc uucucucca 2040  
 auguucgacc cagucucagu caaaaauugaa gggaaucuuu uauuuugaucc aagcaguau 2100  
 cuuuccagag aaagcuugc gaaaacaacc cucacagucu uuggacuugc uucacuugau 2160  
 cucuuuugaga uugguuuugaa agggaaaaggg uuuugagccaa cacuagaagc ucuuuuuggu 2220  
 aagcaaggau uciuuccaga cagugucaac aaggccuuuug uuugggucaa ugcccggau 2280  
 ccagauuggug ucuuccaagg cuugugggac cacuuuggc uuacuacaga ugcaagcau 2340  
 gaacaggaca uggugaaugg aaucaugccc auuguggaca aguugaucaa agaucugaaa 2400  
 ucuuuaagaa uuccugaagc cagggccuau cuccgcaucc uagggaaaaga gcuaagc 2460  
 gucagacucc aagaccucca agucuggggg aagcugugc ugaguggugc acaaaccuug 2520  
 cagggaaucc cccagauugg uguacaggcc aucagagaag ggucaaagaa ugacuuguuu 2580  
 cuccacuaca uciuicauugga caauugccuuu gagcuccccc cuggagcagg gnuacagcug 2640  
 caaguguccu cgucuggagc cuucacccccc gggaucaagg cugguguaag acuggaaauua 2700  
 gccaacauac aggcagagc aguggcaaag cccucugugu cciuuggaguu ugugacaaau 2760  
 augggcauca ucauuccaga ciuicgcuaag agcagugucc agauuaacac caacuucuuc 2820  
 cacgagucag gccuggaggc gcgaguggcc cugaaggcug ggcagcugaa ggucaucauu 2880  
 cciuucuccaa agagggcagu caagcuguuc aguggcagca acacacugca ucuggucu 2940

accaccaaaa cagaagugau cccaccucug guugagaaca ggcaguccug gucaacuugc 3000  
 aagccucucu ucacuggaaau gaacuacugu accacaggag cuuacuccaa cgccagcu 3060  
 acggagucug ccucuuacua cccacugaca ggggacacaa gguauagagc ggagcugagg 3120  
 cccacgggag aaguggagca guauucugcc acugcaaccu augaacuccu aaaagaggac 3180  
 aagucuuugg uugacacauu gaaguuccua guucaagcag aaggagugca gcagucugaa 3240  
 gcuacuguac uguucaaaau uaauccggaga agcaggaccu uaucuaguga aguccuaauu 3300  
 ccaggguuug augucaacuu cggacaaaua cuaagaguua augaugaauc ugcuaaggac 3360  
 aaaaacacuu acaaacucuu ccuggacauu cagaacaaga aauacacuga ggucucucuc 3420  
 gugggcccacu ugaguuauga uaaaaaggga gauggcaaga ucaaaggugu uguuuuccaua 3480  
 ccacguuugc aagcagaagc caggagugag guccacaccc acugguccuc caccacacug 3540  
 cucuuccaaa uggacucauc ugcuacagcu uacggcucaa caauuuccaa gagagugaca 3600  
 uggeguuacg auuauugagau aauagaaauu gauuggaaca cgggaaccaa uguggauacc 3660  
 aaaaaagugg ccuucaauu cccuguggau cuuucccaauu auccuagaaau guugcaugag 3720  
 uaugccaaug gucuccugga ucacagaguc ccuucaaaacag augugacuuu ucgggacau 3780  
 gguuccaaaau uaauuugugc aacaaacaca uggeciucaga ugcaaccag ggguciuccu 3840  
 uacccccaaa cucusacagga ucaccucaau agccucucag aguugaaccu ccugaaaaug 3900  
 ggacugucug aciuuccauu uccagacaac cucusuccua agacugauug cagagucaa 3960  
 uacacaauga acaggaacaa aauaaacauu gacaucuccu ugcuuuuggg uggaagucu 4020  
 ucaaaagacc ucaagaugcc agagagugug aggacaccag cccucaacuu caagucugug 4080  
 ggauuccauc ugcuacucg agagguccag gucccccacuu uuacaauucc caagacacau 4140  
 cagcuucaag ugcccucuu ggguguucua gaccuuucca caaauugcua cagcaauuug 4200  
 uacaacuggu cagccuccua cacugguggc aacaccagca gagaccacuu cagccuucag 4260  
 gcucaguacc gcaugaagac ugacucugug guugaccug uuuuccuacag ugugcaagg 4320  
 ucuggagaaa caacauuauga cagaagaac acauuuacau ugucugugua uggaucucua 4380  
 caccuuaauu uucuagacuc aaaauiucaa guagccacg uagaaaaauu ugaaaacagc 4440  
 ccagcuucaaa aagguuuacu acauuuugaa acaucaugug cciuugggacc acagaugucu 4500  
 gcuacuguuc accuagacuc aaaaagaaa caacaucuau acgucaaaga uaucaagg 4560  
 gauggacagu ucagagcuc uucuuuuuau gcuucaaggca aauauuggccu gucuugugag 4620  
 agagauguua caacuggcca gcugagccgc gaaucaca a ugaguuuua cuccaccuac 4680  
 uuccagggca ccaaccagau cgugggaaug uaccaggaug gagcccuguc caucaccucc 4740  
 aciuucugacc ugcaagaugg cauauucaag aacacagcuu cciuugaaaaa ugaaaacauu 4800  
 gagcugacuc ugaaaucuga uagcaguggg caguauugaga aciuucgcugc uiuccaacaag 4860  
 cuggaugga cciuucucuac gcaagugca cugcugcggu cugaacacca ggccaauuac 4920  
 aaguuccuga ggcuugucac cciuucuuuca ggaucuccu cauucccaggg uguagaauua 4980  
 aaugcugaca ucuuugggac agacaaaaau aauacugugug cucacaaggc aacacuaaag 5040  
 auugcacqug auggacuac aaccagugcg accaccaacu ugaaguacag ccccccugcug 5100  
 cuggagaaug aguugaaugc agagcuiuggg cucucugggg cauccaugaa auuaucaaca 5160  
 aacggccgcu ucaaagaaca ccaugcaaaa uucagucuug augggagagc ugcccucaca 5220  
 gagugugucac ugffffgacau uuaccaggcc augauuucugg gugcagacag caaaaacauc 5280  
 uuacacuuuca aacucagccg agaaggccug aggcugucca augauuuggau gggcuuccau 5340  
 gcugagaua aacuugacca cacacacagu cugaacacauug caggucucuc acuggacuuc 5400  
 uucucaaaaa uggacaaauu uuacagugga gacaaguucu auaagcagaa uuuuaacuuua 5460  
 cagcuacagc cciuucuuu cauacuacu uuaagcaacg accugagaua ugugcucua 5520  
 gauuugacca acaauggaag guuucggcug gagccacuga agcugaaugu ggguggcaac 5580  
 uuuuaaggaa cciuacaaaaa uaaugagcug aacacauauc auaccaauuc uuauacugac 5640  
 cugguaguag caaguuacac agcagacacu guggcuaagg uucaggugug cgaauucagc 5700  
 cauaggcuua augcagacau ugaaggacug aciuuccucug uugaugucac uaccagcuc 5760  
 aauucugauc cacugcauuu uaacaauguu uuccacuuu cucuggcacc uuuuaccuug 5820  
 ggcacucgaca cacauacaag ugugugggg aaacuguccu ucugggggaga acacacuggg 5880  
 cagcuuauua guaaguuuucu guuagaaagca gaaccucugg cacuuauugu cucuauugac 5940  
 uacaaaggau ccacaaggca cagucucccg uacgagagca gcaucaggc ggcucuugaa 6000  
 cacacaguca gugccuugc gacgcccacu gaggcagacaa gcaccuggaa auucaagacc 6060  
 aaacugaaug acaaaguuaa caggcaggac uuugaaggccu acaacacuuua agacaaaaau 6120  
 gguguugagc uuaguggagc ggcugaccuc ucuggggcug uuucuccaaau uaaacuaccc 6180  
 uuuuucuacuca gugagccugu caaugguccu aauggccuag agguaaaauga ugcuguugac 6240  
 aagccccaaag aauucacaaau uauugcugug gugaaguacg auaagaacca ggauguucac 6300  
 accaucaacc uccacuuu ccaaagccug ccagacauuu ugagagaaaa ucgaaagagg 6360  
 augauuaaguc uacuggaagc caugcgaggg gaauuugcaac gcccucaggu ugaucagu 6420  
 gugagggaaa acagagccgc ccugagcaga ciuuccucagc agauucauca uuaucugaa 6480  
 gcaucugacu gggagagaca aguagcuggu gccaaggaaaa aauuaacuuc uuucauggg 6540  
 aauuaauagaa uuacagauaa ugauguacua auuugccauag auagugccaa aaucaacuuc 6600  
 aaugaaaaac ucucuacuac ugaacauac gcgauacaa uugauacu uuuuaagau 6660  
 aauuaugauc cacaugacuu aaaaagaacu auugcugaga uuauugauug aaucauugaa 6720  
 aaguuaaaaaa uucuugaua acaguaucu auccgugua aucuagcaa aucaauccau 6780  
 aauucucuauu uuuuuguuga aaacguugau cuuacaccaag ucaguaguag uaacaccucu 6840

uggauccaaa auguggauuc caauuaucaa gucagaaucc aaauucaaga aaaacuacag 6900  
 cagcucagga cacaaaucu gaaauuagac auucagcagc uugcugcaga gguaaaacga 6960  
 cagauggacg cuauugaugu cacaaugc auugcugcaga gguaaaacga 6960  
 caaagaaauaa gugacauuuu ugaccguguc aaauacuuug uuaugaauuc uauugaagau 7080  
 uuuuaaguua cugagaaaaa caauacuuuu agaguuaauag ucggugagcu aauugagaaa 7140  
 uaugaaguag accaacacau ccagguuuu auggauaaau caguagaguu ggccccacaga 7200  
 uauagccuga gcgagccuc ucagaaacuc aguuaugugc uacagcgaau ugagauaaaa 7260  
 gauuacuauug agaaaauuggu ugguuuuuu gaugauacug uugaguggcu uaaagcauug 7320  
 ucuuucaaaa auaccauuga agaacuuaau agauugacug acauguuggu gaagaaguug 7380  
 aaagcauuiug auuaucacca guuuguagac aaaaccaaca gaaaaauccg ugagaugacu 7440  
 cagagaaucu augcugaaaa ccaagcucuc aaacuuccac aaaaaaugga agcauuaaaa 7500  
 cuguugguag aagacuiaa aaccacaguc uccaauuccc ugaaaagacu caaggacacc 7560  
 aaaguaacug uggucauuga uggcugcag gauauuuuuga cucaauggaa agaccauuiuc 7620  
 caagauacuc uggagaaugu aagagaccga auuuaucaaa uggacauuca gagggAACug 7680  
 gagcaciuuc uguccucuggu aaaccaaguu uacaguacac ugguccaccua uauugucugac 7740  
 ugguuggacuc ugacugcuu aaacauuaaca gacuuuggcag agcaauuiuc cauccaaaac 7800  
 ugguccugaga guuaaaaagu acugguggaa caaggauuca uaguuccuga aaugcaaaaca 7860  
 uiucugugga ccaugccugc uuuugagguc agucuccugc cucuccaaga agguaacuuu 7920  
 cagacccccug ucuuuauagu cccciugaca gauuuugaggaa uuccaucaau ucggauaaac 7980  
 uuuuaauug uaaagaaauu aaaaauccca uugagauuuu ccacuccaga auucacuucuu 8040  
 cuacaacucc uccaugucca uuccuuuaca auugacuugc ugaaaauaaa agcaaaagac 8100  
 auuagaacu ucgaccaaaau uuugagcagu gacuacagu ggccucuucc agaaaauuguau 8160  
 uugagagac uggauguagu gaacauuccu cuugcaagac ugacuugcc agacuuccau 8220  
 guaccagaaa ucacaaauucc agaaauucaca aucccuaauug ucaauucaaa agauuuuacac 8280  
 guuccugauc uucacauacc agaaauucca cuuuccaccc ucucacauac aauugaaaaa 8340  
 ccugcuiuug gcaaacugca uagcauccuu aagauuccaa cuuccucuu uauuaauagau 8400  
 gcuaauugcca acauacagaa uguuacaacu ucagggaaaca aagcaagagau ugugcciuuci 8460  
 gucacugcua aaggagaguc ccaauuuugaa gcucucaauu uugauuuuca agcacaagcu 8520  
 caauuccugg aguuuaaucc ucauccucca guccugaaagg aauccaaugaa ciuccuccagu 8580  
 aagcauguga gaauggagca ugagggugag auagauuuuug auggaaaggc cauugaggggg 8640  
 aauucagaca cagucgcaag uiuacacaca gagaaaaauug aaguagaguu uauuaauuggu 8700  
 augacuuga aaguaacaa uacgcucacc cuugacaguc acacaaagua ciuccacaag 8760  
 uugaguguiuc cuaggcugga cuuucccagu aaggcuiuuc uuaauuauga aaucaagaca 8820  
 cuauuagaag cuggacauug gcaauugaca uciuicaggga cagggcuaug gaacuggggcc 8880  
 ugucuccaaci ucucggaua aggcauacau ucgucccaaa uuagcuiuac uguggauuggu 8940  
 cccauuugcuu uuguuggacu auccaauuac auuuauuggca aacacuuacg ggucauccaa 9000  
 aaacugacuu augaaucugg cuuccucaac uauucuaagu uugaaguuga guaaaaaguu 9060  
 gaaucucagc acgugggcuc cagcauuua acagccaaug guccggcaci gcucaaggac 9120  
 gcaaaggcag aauugacugg ugagcacaau gccaacuuua auggaaaagu uauuggaacu 9180  
 uugaaaaauu cucucuucuu uucagcacaa ccauuugaga uuacugcauc cacaauuaau 9240  
 gaaggaaaaau ugaaaguggg uuuucccua aagcugacug ggaaaaauaga ciuccugaaau 9300  
 aacuaugcau uguuucugag ucccugugcc caacaagcaa gcuggcaagc gaguaccaga 9360  
 uiucaauucau acaaauacaa ucaaauuuu uciugcuaua acaaauuaca caacauagaa 9420  
 gccaguauag gaaugccaaac cuggauuuc uaaacauacc uiuaacaaau 9480  
 ccugaaaaaa acuugccuuu cacggaguuc aaaacuccu uacugagga uiucuccaua 9540  
 ugguuaggaaa caggcuiugaa agaaauuuuug aagacaacaa agcaauucau uguuuggagu 9600  
 guuaaggcuc aauuaaaaaa gaacagugac aagcauucca uuguuguccc ucuggguau 9660  
 uiuuauugau uuaauucucau caauucaau ucguugggaca gaaaauuuga gaaagucaga 9720  
 aacaauugcuu uacauuuuucu uaccaccucc uuaauuugaa caaaaaauuaa gguugauaag 9780  
 uacaaaacug aaaaauuccu uaaucagccc ucuggggaccu uiucaauuca uggcuaacacu 9840  
 auuccaguuug ucaacauuuga agauucucca uiuugcugau agacacuggc uiuccagccau 9900  
 gugauccca cagcaauuaag caccuaagu gucacaaucc cugguccua caucauggug 9960  
 cciuicauaca aguuagugcu gccaccccaug gaguugccag uiuiuccaugg uccuggggau 10020  
 cuauucaagu uuuuccuccc agauuuucaag gguuuaaca cuauugacaa uauuuauauu 10080  
 ccagccauugg gcaacuuuuucau uciuuuuuauu caagugucau cacacugaaau 10140  
 accaaugcug gacuuuuuaua ccaauucau auctguugcc auiuccuuuc uiuccuciua 10200  
 uiugucacug acgcccugca guacaaauua gggggacau cacgugcugau gcaaaaaagg 10260  
 ggauuugaaac uagccacagc uguccucuca acuaacaaau uuguaagggg cagucaugac 10320  
 agcaccuuua guuuuaccaa gaaaaacaaug gaagcaucag ugagaacaac ugccaaccuc 10380  
 caugcuccca uauucucaau gaacuucuag caggacauua auggaaaaac caaguacaaa 10440  
 cccacuguuu caucauccau ugaacuuaac uauugacuca uiuccucaaa gcugccacucu 10500  
 acugcaacag gaggcauuga ucacaaguuc agcuiuagaaa gucucacuuc cuacuuuuucc 10560  
 auuugaguau ucaccaagg aauuaucuag aguuccuucc uiuucucagga uauuucagga 10620  
 aguguugcca augaaggccaa uguauaucug aauuuccaagg guacucgguc uucagugagg 10680  
 cuacaaggag cuuccaaagu ugaugguauc uggaacguug aaguaggaga aauuuuuggu 10740

ggagaagcca cccuccaacc caucuacacc acaugggagc acaaauaugaa aaaccauuug 10800  
 cagguauuaa gcuacuucuu cacaaaagga aagcaaaca gcaagagcuc uuggagcuc 10860  
 ucccccaugga ccauguaac cuugcuacag guucauguga gucaacucag ucccuccuu 10920  
 gaccuccauc acuuuugacca ggaagugauc cuaaaagcua acacuaagaa ccagaagauc 10980  
 agcuggaaag guggggucca gguugaaauca cggguucuuc agcacaaugc acaguucucc 11040  
 aaugaccaag aagaaauacg gcuugaccuu gcaggauccu uagacggaca gcugugggac 11100  
 cuugaagcua ucuuuuuacc aguauauggc aagagcucg aggaacuccu acaaauuggau 11160  
 gaaaagcgac aguaucuuca agcuucaacu ucuciuuuau auaccaaaaa cccuaauuggc 11220  
 uaucuccuu cacuccccgu gcaagaacug gcugauagau uuauuauacc agggauaaaa 11280  
 cuaaauugacu ucaguggagu aaaaauuuau aagaaguuaa guacuucacc auuugcccuc 11340  
 aaccuaacaa ugcuucccaa aguaaaaaauuc ccugggauug aucuguuac acaguacucu 11400  
 acaccagagg gcucccucu gccuauuuuu gaggcaacua uaccugaaaa ucauuuaacu 11460  
 guaucccagu uuacacuucc aaagagccuu ccaguuggca acacagucuu ugaucugau 11520  
 aaguuggcca acaugauugc cgauugugac cugccuagug ucacccugcc ugagcagacu 11580  
 auuguaaucc cacccuugga guucucugua ccugcugggua uuuuuauucc uuuuuuugga 11640  
 gaacugacug cacgugcugg gauggcucu cccuuguaau augucacuug gagcgcuggu 11700  
 uggaaaaacca aaggcagauc uguugaaacg uuccuagauu ccaugugcac uucaaccuug 11760  
 caguucucugg aguaugcuum aaaaguugua gaaacacaca aauuugaaga agaucuguua 11820  
 accuauauua ucaaaggAAC acuuucaacac ugugacuuca auguggagua uaaugaagau 11880  
 ggucuauuuua aaggacuuug ggacuggcag ggagaggcuc accuggacau caccagccca 11940  
 gcacugacug acuuucaucu guacuacaaa gaagacaaga caagucuguc ugcccucagca 12000  
 gccuccucga ccaucggcac ugugggucug gauucgagca cagaugacca gaguguggag 12060  
 cugaaugucu acuuccaccc acaguuccu ccagagaaga aacucagcau auucaaaacu 12120  
 gaguggaggu acaaggaguc ugauggugaa agguacauca aauuuauug ggaagaagag 12180  
 gcagcuiucca gauugcuagg cucccuaaaa agcaaugugc ccaaggcuiuc uaaggcuaauu 12240  
 uaugauuaug ccaauuaagua ccaccuggaa uacguuucuu cagaacuaag aaaaagucua 12300  
 caggucaaug cugaacaugc cagaaggaug guugauugaaa ugaacaugag uuuccagaga 12360  
 guagcccgug auaccuacca gaaucucuuu gaggagaugu ugucugagc 12420  
 aucccugaga aucucaagaa gagguguuu gacaguauag uacauguuac ucagaaguac 12480  
 cacauggcag ucauguggcu gauggacuca uucuuucaau uucugaaaaa caauagaguc 12540  
 caguuccccag gguacgcugg aacauauacu guggacgaac ucuacacuuu agucaugaag 12600  
 gaaaccaaga agucacuguc ucagcuguuu aauugguuuag gaaaccuacu uuccuacguu 12660  
 caaaaccaag uagagaaauc aagauuaauuc aauugacauua cauuuuaauug uccuuuuuuc 12720  
 ucaaaaccuu guaaacuaaa agaucuaua uugauuuuca gggaggaguu aaacauuuua 12780  
 ucaaacauag gccaacagga uaucaaguuu acaacaauac uaaguaguc ucaaggcuum 12840  
 uuggagagag uuuuagacau cauagaagaa caauuuuaauu gccuuaagga caaugaaucu 12900  
 acuuuguguug cugaccauau caacaugguu uucuuuauac agguuccaua ugcuuuuuua 12960  
 ucccuaagag aagacauaua cuuuguccuc ggugaguica augacuuuuc ucaauccaua 13020  
 cuicaggagg gguuccuacca gcuacagcag guccaucagu auaugaaggc cciucugugaa 13080  
 gaguauuuug auccgagcau gguuggugg acagugaaaa auuaugaaaa agaagaaaa 13140  
 augguugagc ugaucaaagac cciuuuuuaguu uccuuuaggg augucuacuc ugaauauagu 13200  
 gugacagcug cugauuuuugc uuccaaaaau ucaacucaag uugaacaauu uguguccagg 13260  
 gauaucagag aquaucuuuag caugcuiucu gauauaaaaug gaaaguggau ggaaaagauu 13320  
 gcagagcuiuu cuauuguggc aaaggaaaca augaaaagcu gggucacugc cguggccaaa 13380  
 auaauugucug auuacccca gcaaguuccac uccaaucugc aggauuuuuc agaccaacuc 13440  
 ucuagcuacu augaaaaauu uguuggugag uccacaagau ugaauugaccu guccauucaa 13500  
 aacuaccacg uguuucucag auacaucacc gaguuacuga gaaagcugca gguggccaca 13560  
 gccaauuaug ugagccccua uuaauagcui gcucaaggag agcugauagau caccuucuga 13620  
 uucuuuacu aacaaauuca auuuaaaccu ucacauagua ggagacuuug uagacuacua 13680  
 uaaagaccau ccugagccag accugcaguc aacagcaaga gcaagaagca cauaggaacu 13740  
 auaccugcaa ccaagcuggc auaagaacca agaccuucaa agcagccuga acucaagaug 13800  
 acauauuuua caaguuaagag uaaagucaag agcugaguug uuuuguccaa cucaggaugg 13860  
 agggagggag ggaaggggaa auuuauuaau acuuccuuau ugugcagcaa aaaaaaaaaa 13920  
 aaaaaaaaaa a 13931

	<400> 11 gggcagcuug ccgguggugu u	21
5	<210> 12 <211> 21 <212> ARN <213> <i>Aequorea victoria</i>	
10	<400> 12 caccaccccg gugaacagcu u	21
15	<210> 13 <211> 21 <212> ARN <213> <i>Aequorea victoria</i>	
20	<400> 13 gcuguucacg ucgcugccu u	21
25	<210> 14 <211> 19 <212> ADN <213> <i>Aequorea victoria</i>	19
30	<400> 14 gctgttcacg tcgctgccc	
35	<210> 15 <211> 80 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Oligo para clones que expresan ARNip-MV	
40	<400> 15  gatcccccac caccgggtg aacagcgta gctgttcacg tcgctgccc ttagggcagc 60 ttggcggtgg tgaaaaata 80	
45	<210> 16 <211> 75 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Oligo para clones que expresan ARNip-MV	
50	<400> 16  agcttaaacac caccggcaag ctgccctaac gggcagcgac gtgaacagct aacgctgttc 60 accgggggtgg tgggg 75	
55	<210> 17 <211> 144 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> Oligo para clones que expresan ARNip-MV	
60	<400> 17	

gatcccccac caccgggtg aacagcttgt aggtggcatc gcagaagcga tgccacctac 60  
 aagctgttca cgtcgtgcc ctttaggtg gcatgcaga agcgatgcca cctacaagg 120  
 cagctgccc gtggtgttt ttt 144

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

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

<400> 18

agcttaaacac caccggcaag ctgcccgt aggtggcatc gcttctgcga tgccacctac 60  
 aaggcagcg acgtgaacag ctttaggtg gcatgcgttc tgcgatgcca cctacaagct 120  
 gttcacccggg gtggtgggg 139

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

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

<400> 19

gatccccgt gctgcttcat gtggtcgttg ttacgaccac aatggcgaca accttggtag 60  
 gttgtcgggc agcagcacgt ttttttta 89

25 <210> 20  
 <211> 84  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Oligo para clones que expresan ARNip-MV

<400> 20

agcttaaaac gtgctgtgc ccgacaacct aacaagggttgcgccattgt ggtcgtaaca 60  
 acgaccacat gaagcagcac gggg 84

35 <210> 21  
 <211> 147  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Oligo para clones que expresan ARNip-MV

<400> 21

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

45 <210> 22  
 <211> 142  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Oligo para clones que expresan ARNip-MV

<400> 22

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

5 <220> 22  
 <223> Oligo para clones que expresan ARNip-MV  
 10 <210> 23  
 <211> 62  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Oligo para clones que expresan ARNip-MV  
 <400> 23  
 20 gatccccgca agctgaccct gaagttcttc aagagagaac ttcagggtca gcttgcttt 60  
 ta 62  
 <210> 24  
 <211> 62  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Oligo para clones que expresan ARNip-MV  
 <400> 24  
 30 agctaaaaaa gcaagctgac cctgaagttc tctcttgaag aacttcaggg tcagcttgcg 60  
 gg 62  
 <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  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> ARNip sintético  
 50 <400> 26  
 cgccgacuuc gugacgugcu u 21  
 <210> 27  
 <211> 21  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 55 <220>  
 <223> ARNip sintético  
 60 <220>  
 <223> ARNip sintético

	<400> 27 gcacgucgcc guccaggagu u	21
5	<210> 28 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> ARNip sintético	
	<400> 28 guugccgucg uccuugaagu u	21
15	<210> 29 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> ARNip sintético	
	<400> 29 cuucaagugg aacuacggcu u	21
25	<210> 30 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> ARNip sintético	
30	<400> 30 gccguaggua ggcggcaacu u	21
	<210> 31 <211> 67	
40	<212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> clones de ARNip multivalente	
45	<400> 31	
	<b>cgccgacuuc gugacgugcu ugugcacguc gccguccagc aguugucugc ugguaguggu 60</b> <b>cggcgua 67</b>	
50	<210> 32 <211> 80 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> clones de ARNip multivalente	
	<400> 32	
60	<b>gatccccccgc cgacttcgtg acgtgcttgt gcacgtcgcc gtccagcagt tgtctgtgg 60</b> <b>tagtggtcgg cgtttttta 80</b>	
	<210> 33 <211> 80	

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> clones de ARNip multivalente

<400> 33

```

    agcttaaaaa aacgccgacc actaccagca gacaactgct ggacggcgac gtgcacaagc 60
    acgtcacgaa gtcggcgaaaa 80
  
```

10 <210> 34  
 <211> 131  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> clones de ARNip multivalente

<400> 34

20 cgccgacuuuc gugacgugcu uguagguggc aucgcagaag cgaugccacc uacaagcacg 60

```

    ucggccgucca gcaguuguag guggcaucgc agaagcgaug ccaccuacaa cugcugguag 120
    ugguccggcggu u 131
  
```

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

30 <220>  
 <223> clones de ARNip multivalente

<400> 35

```

    gatccccccgc cgacttcgtg acgtgcttgt aggtggcatc gcagaagcga tgccacctac 60
    aaggcacgtcg ccgtccagca gtttaggtg gcatcgacaga agcgatgccca cctacaactg 120
    ctggtagtgg tcggcgaaaa ta 142
  
```

35 <210> 36  
 <211> 142  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> clones de ARNip multivalente

45 <400> 36

```

    agcttaaaaa cggccgaccac taccagcagt tgttaggtggc atcgcttctg cgatgccacc 60
    tacaactgct ggacggcgac gtgcctgttag gtggcatcgac ttctgcgtatg ccacacctacaa 120
    gcacgtcacg aagtccggcg 142
  
```

50 <210> 37  
 <211> 67  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> clones de ARNip multivalente

<400> 37

cuucaagugg aacuacggcu uguaggcguag guaggccgca acuuguguug ccgucguccu 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 acgttcttca agagagaacg tggatgtcgg atcctttta 60  
 <210> 39  
 <211> 60  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> clones de ARNip multivalente

<400> 39

25 agcttaaaaaa ggatccgaca tccacgttct ctcttgaaga acgtggatgt cggatccggg 60  
 <210> 40  
 <211> 131  
 30 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> clones de ARNip multivalente

35 <400> 40

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

40 <210> 41  
 <211> 142  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> clones de ARNip multivalente

<400> 41

gatccccctt caagtggAAC tacggcttgt aggtggcatc gcagaAGCga tgccacctac 60  
 aagccgtagg taggcggcaa cttgttaggtg gcatcgCaga agcgatGCCa cctacaAGTT 120  
 50 gccgtcgTCC ttGAAGTTT TA 142

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

<220>  
 <223> clones de ARNip multivalente

&lt;400&gt; 42

agcttaaaaaa cttcaaggac gacggcaact tggtaggtggc atcgcttctg cgatgccacc 60  
 tacaagttgc cgcctaccta cggctttagt gtggcatcgc ttctgcgatg ccacctacaa 120  
 gccgtatc cacttgaagg gg 142

5

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 77

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

10

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligo de ARNip-MV anti-VIH

&lt;400&gt; 43

15

gatccccgtg aaggggaaacc aagagattga tctcttgtta atatcagtt gagctgatat 60  
 ttctccctca cttttta 77

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 77

20

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligo de ARNip-MV anti-VIH

25

&lt;400&gt; 44

agcttaaaaaa gtgaaggaga aatatcagct caagctgata ttaacaagag atcaatctct 60  
 tggttcccct tcacggg 77

30

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 80

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

35

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligo de ARNip-MV anti-VIH

&lt;400&gt; 45

40

gatcccccaa gcagtttag gctgacgttta gtcagcctca ttgacacagg ttactgtgtc 60  
 agctgctgct tttttttta 80

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 80

&lt;212&gt; ADN

45

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligo de ARNip-MV anti-VIH

50

&lt;400&gt; 46

agcttaaaaaa aacaaggcgc agctgacaca gtaacctgtg tcaatgaggc tgactaacgt 60  
 cagcctaaaaa ctgtttgggg 80

55

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; ARN

&lt;213&gt; Secuencia artificial

	<220>	
	<223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
5	<400> 47 gcuuuccuu guggaagggu u	21
10	<210> 48 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
20	<400> 48 ccuuccuug uggaaggcu u	21
25	<210> 49 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
35	<400> 49 gcuuuccuug uggaaggcu u	21
40	<210> 50 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	21
45	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
50	<400> 50 uucugcaccu uaccucuuau u	21
55	<210> 51 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
65	<400> 51 uaagaggaag uaugcuguuu u  <210> 52 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	21
	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	

	<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	
20	<400> 54 cucccaggcu cagaucuggu u	21
25	<210> 55 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
35	<400> 55 ccagaucucc cuaaaaaaaa u	21
40	<210> 56 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
50	<400> 56 uuuuuuaucu gccugggagu u	21
55	<210> 57 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
65	<400> 57 uggguuccu aguuagccau u	21
	<210> 58 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 58 uggcuaagau cuacagcugu u	21
	<210> 59 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	

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

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

	<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	
20	<400> 72 acugcuuguu agagcuuugu u	21
25	<210> 73 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
35	<400> 73 aggucaggggu cuacuugugu u	21
40	<210> 74 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	21
45	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
50	<400> 74 cacaagugcu gauauuucuu u	21
55	<210> 75 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
65	<400> 75 agaaaauaauu gucugaccuu u	21
	<210> 76 <211> 21 <212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<210> 77 <211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	

	<220>	
	<223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
5	<400> 77 auauggccug auguaccauu u	21
10	<210> 78 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
20	<400> 78 augguacuuc ugaacuuagu u	21
25	<210> 79 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
35	<400> 79 uggcuucaau ucuugcucuu u	21
40	<210> 80 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
50	<400> 80 agagcaaccc caaaucccc u	21
55	<210> 81 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
65	<400> 81 ggggauuuag ggggagccau u	21
	<210> 82 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 82 aucuccacaa gugcugauau u	21
	<210> 83 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	

	<220>	
	<223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
5	<400> 83 uaucagcagu ucuugaaguu u	21
	<210> 84	
	<211> 21	
10	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
15	<400> 84 acuucaaauu guuggagauu u	21
	<210> 85	
20	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<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	
	<400> 86 aaauugugga ugaauacugu u	21
40	<210> 87	
	<211> 21	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
	<400> 87 caguauuugu cuacagucuu u	21
50	<210> 88	
	<211> 21	
	<212> ARN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Secuencias oligo de ARNip-MV trivalente	
60	<400> 88 acaggccugu guaaugacuu u	21
	<210> 89	
	<211> 21	
65	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	

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

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

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

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

	<220>	
	<223> ARNip-MV trivalente para ApoB	
5	<400> 113 cugaagacgu auuccaggguu u	21
10	<210> 114 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> ARNip-MV trivalente para ApoB	
20	<400> 114 caggguaaaag aacaauuuugu u	21
25	<210> 115 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> ARNip-MV trivalente para ApoB	
35	<400> 115 caaauugcug uagacauuuu u	21
40	<210> 116 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> ARNip-MV trivalente para ApoB	
50	<400> 116 aaauguccag cguaccugu u	21
55	<210> 117 <211> 23 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> ARNip-MV trivalente para ApoB	
65	<400> 117 cccuggacac cgugaaacu uuu	23
	<210> 118 <211> 23 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> ARNip-MV trivalente para ApoB	
	<400> 118 aaguuccaaau aacuuuuucca uuu	23
	<210> 119 <211> 23 <212> ARN <213> Secuencia artificial	

	<220>	
	<223> ARNip-MV trivalente para ApoB	
5	<400> 119 augggaaaagg caagucccagg guu	23
10	<210> 120 <211> 24 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> ARNip-MV trivalente para ApoB	
20	<400> 120 cccguggacac cgcuggaacu uuuu	24
25	<210> 121 <211> 24 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> ARNip-MV trivalente para ApoB	
35	<400> 121 aaaguuccaa uaacuuuuucc auuu	24
40	<210> 122 <211> 24 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> ARNip-MV trivalente para ApoB	
50	<400> 122 augggaaaug gcaaguccag gguu	24
55	<210> 123 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligo de ARNip-MV bivalente para ApoB	
65	<400> 123 ugaaucgagu ugcaucuuu u	21
	<210> 124 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Oligo de ARNip-MV bivalente para ApoB	
	<400> 124 aaagaugcug cucaucacau u	21
	<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-nitroadol, PC Spacer o base abásica	
25	<400> 126 ungunganuga cacucgauuc auu	23
30	<210> 127 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligo de ARNip-MV bivalente para ApoB	19
40	<400> 127 tgtgatgaca ctcgattca	
45	<210> 128 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	21
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-nitrool, 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 ucuguaauuu 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	
5	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip-MV trivalente para ApoB	
10	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> 22, 44	
	<223> n = cualquier base, base universal, rSpacer, conector	
	fosforamidita, 5-nitrool, PC Spacer o base abásica	
	<400> 136	
	<b>aauauacauuu cuggaaagagu uncucuuucca aaaagccug auunucaggg ccgcucugua</b>	<b>60</b>
	<b>uuuuuu</b>	<b>65</b>
15	<210> 137	
	<211> 21	
	<212> ARN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB	
25	<400> 137	
	<b>aaccacuuuu caaauuuuccu u</b>	<b>21</b>
	<210> 138	
	<211> 21	
30	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB	
35	<400> 138	
	<b>gaaauugag aauucuccau u</b>	<b>21</b>
	<210> 139	
	<211> 21	
40	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB	
45	<400> 139	
	<b>uggagaaucu cagugguuuu u</b>	<b>21</b>
	<210> 140	
50	<211> 21	
	<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 conectadoras, 5-nitrool, 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	
5	<220>	
	<221> base_modificada	
	<222> 4,6,14,19	
	<223> Las bases tienen una modificación 2'-fluoro	
10	<400> 140 ugganaaucu canuggnuu u	21
15	<210> 141 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB	
25	<400> 141 gaugaugaaa caguggguuu u	21
	<210> 142 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB	
35	<400> 142 ggaaauugga gacaucaucu u	21
	<210> 143 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB	
45	<220> <221> base_modificada <222> 1,15 <223> n = cualquier base, base universal, rSpacer, fosforamiditas conectoras, 5-nitrodol, PC Spacer o base abásica	
50	<220> <221> misc_feature <222> 2,6, <sup>7</sup> 8,9,10,11,12,13,16,18,19,20,21 <223> Las bases tienen un enlace rSpace	
55	<220> <221> base_modificada <222> 3,4, <sup>5</sup> 14,17 <223> Las bases tienen una modificación 2'-fluoro	
60	<400> 143 ngaaauugga gacancaucu u	21
65	<210> 144 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<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 aucccacuuu caaguuugcu 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-nitrool, 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 ancccacuuu caanuuunc	19
65	<210> 148 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
	<400> 148 cuucaucacu gaggccucuu u	21
	<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  <400> 150 aaugcagaug aagaugaaga a	21
20	<210> 151 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 151 uucagccugc auguuggcuu u	21
30	<210> 152 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 152 agccaaacauu acuuggaucu u	21
40	<210> 153 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 153 gauccaaaag caggcugaag a	21
50	<210> 154 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 154 cccucaucug agaaucuggu u	21
60	<210> 155 <211> 21	

	<212> ARN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 155 ccagauucau aaaccaagu 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 acuuggggc ccaugagggu u	21
20	<210> 157 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 157 ucaagaauuc cuucaagcc u	21
30	<210> 158 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 158 ggcuugaagc gaucacacuu u	21
40	<210> 159 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana	
50	<400> 159 agugugaacg uauucuugau u	21
55	<210> 160 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 160 uugcaguuga uccugggggu u	21
65	<210> 161 <211> 21	

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

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

	<212> ARN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <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 gcagagcugg cucucuucau u	21
20	<210> 175 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 175 cucaguaacc agcuuauugu u	21
30	<210> 176 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 176 cauaaagauu uauaacaauu u	21
40	<210> 177 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 177 uuuguuaucu uauacugagu u	21
50	<210> 178 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 178 gaaccaaggc uuguaaaguu u	21
60	<210> 179 <211> 21	
65		

	<212> ARN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <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 auuguuguua aauugguucu u	21
20	<210> 181 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 181 cagguaggug accacaucuu u	21
30	<210> 182 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 182 agaugugacu gcuucaucau u	21
40	<210> 183 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 183 ugaugaacug cgcuaccugu u	21
50	<210> 184 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 184 ccagucgcuu aucucccggu u	21
60	<210> 185 <211> 21	

	<212> ARN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <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 cuggagucau ggcgacuggu u	21
20	<210> 187 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 187 uggaagagaa acagauuugu u	21
30	<210> 188 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 188 caaaucuuua aucagcuuc u	21
40	<210> 189 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 189 gaagcugccu cuucuuccau u	21
50	<210> 190 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 190 auccaaaggc agugagggu u	21
60	<210> 191 <211> 21	

	<212> ARN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 191 acccucaacu caguuuugau 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 ucaaaaccgg aauuuggau u	21
20	<210> 193 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 193 uagagacacc aucaggaacu u	21
30	<210> 194 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 194 guuccuggag agucuucaau u	21
40	<210> 195 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 195 uugaagaauu aggucucuau u	21
50	<210> 196 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 196 gcucauguuu aucaucuuuu u	21
60	<210> 197 <211> 21	

	<212> ARN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 197 aaagaugcug aacuuuaagu 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 cuuuuagggc aacaugagcu u	21
20	<210> 199 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 199 ggagcaauga cuccagaugu u	21
30	<210> 200 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 200 caucugggg auccccugcu u	21
40	<210> 201 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 201 gcaggggagg uguugcuccu u	21
50	<210> 202 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 202 ucacaaaacuc cacagacacu u	21
60	<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  <400> 204 caagcuaaaag gauuugugau u	21
20	<210> 205 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 205 gcagcugac ugguccuuu u	21
30	<210> 206 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 206 aagagacucu gaacugccu u	21
40	<210> 207 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 207 ggcagugau ggaaggcugcu u	21
50	<210> 208 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 208 caggacugcc uguucucaau u	21
60	<210> 209 <211> 21	

	<212> ARN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <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 ccaaauuuga aaaguccugu u	21
20	<210> 211 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 211 uguaggccuc aguuccagcu u	21
30	<210> 212 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 212 gcuggaaauuc ugguauugugu u	21
40	<210> 213 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 213 cacauaccga augccuacau u	21
50	<210> 214 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 214 gacuucacug gacaaggugu u	21
60	<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  <400> 216 cauuuucugc acugaagucu u	21
20	<210> 217 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 217 aagcaguuug gcaggcgacu u	21
30	<210> 218 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 218 gucgccuugu gaggcaccac u	21
40	<210> 219 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 219 guggugccac ugacugcuuu u	21
50	<210> 220 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 220 cagaugaguc cauuuggagu u	21
60	<210> 221 <211> 21	

	<212> ARN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <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 ggcauggagc cuucaucugu u	21
20	<210> 223 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 223 cacagacuug aagguggaggu u	21
30	<210> 224 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 224 ccuccacuuga gcagcuugau u	21
40	<210> 225 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 225 ucaagcuuuca aagucugugu u	21
50	<210> 226 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Oligonucleótido de ARNip multivalente dirigido a ApoB humana  <400> 226 auggcagaug gaaucccacu u	21
60	<210> 227 <211> 21	

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

20    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 en donde la primera, la segunda y la tercera regiones bicatenarias son de 5-12 pares de nucleótidos de longitud.

25    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.

30    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.

35    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.

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

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

50    (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;

55    (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

60    (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

65    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.

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 bicanteraria y una secuencia de bucle que comprende al menos 2 nucleótidos.

- 5     8. La molécula de ARNip multivalente autohibridante de la reivindicación 6, en donde una o más de las regiones autocomplementarias comprenden un saliente 3'.
- 10    9. La molécula de ARNip multivalente autohibridante 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  
     (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.
- 15    10. La molécula de ARNip multivalente autohibridante 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 secuencia diana diferente.
- 20    11. La molécula de ARNip multivalente autohibridante 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.
- 25    12. La molécula de ARNip multivalente autohibridante 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.
- 30    13. Un vector que codifica una molécula de ARNip multivalente autohibridante según una cualquiera de las reivindicaciones 6-12.
- 35    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 autohibridante de una cualquiera de las reivindicaciones 6-12 o un vector de la reivindicación 13 en una célula.
- 40    15. Un complejo de ARNip multivalente de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, una molécula de ARNip multivalente autohibridante 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 transcripto 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 una región diana diferente en un transcripto 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 autohibridante de una cualquiera de las reivindicaciones 6-12.

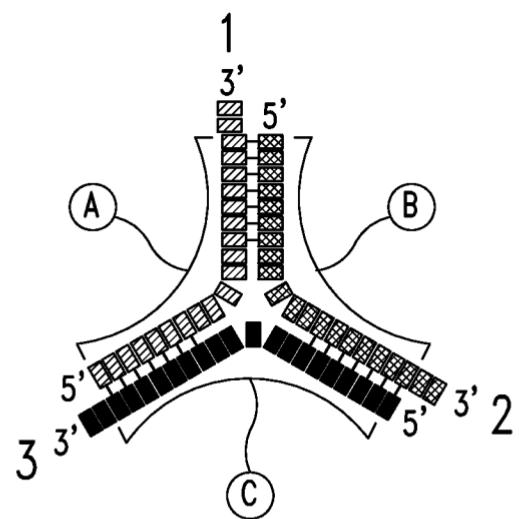


FIG. 1

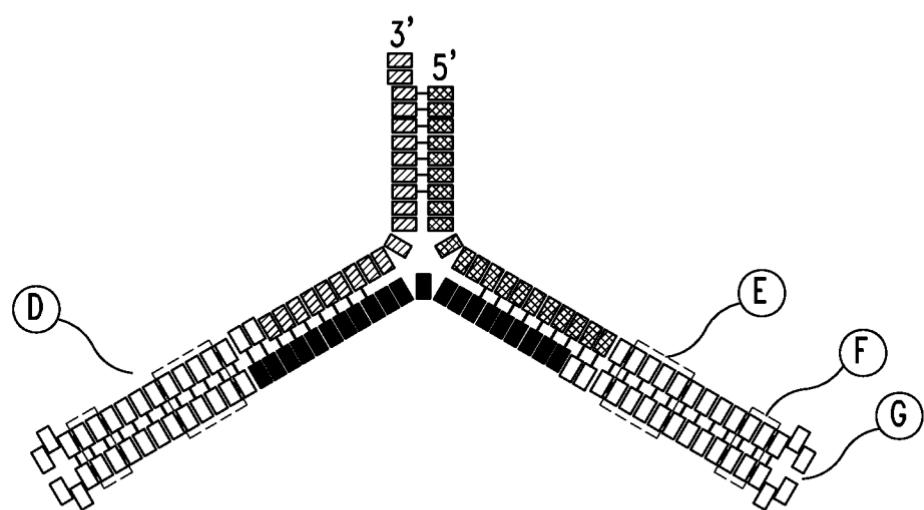
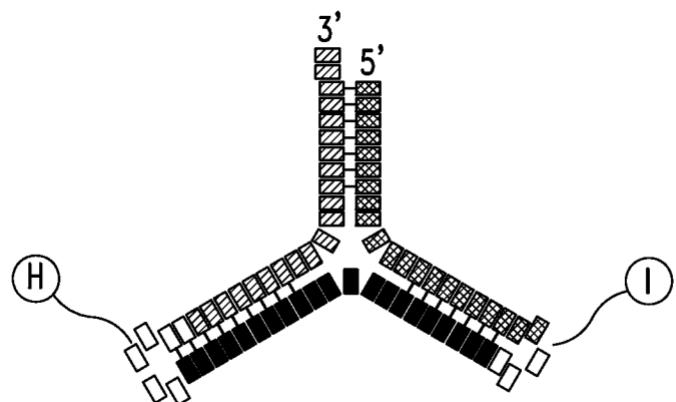
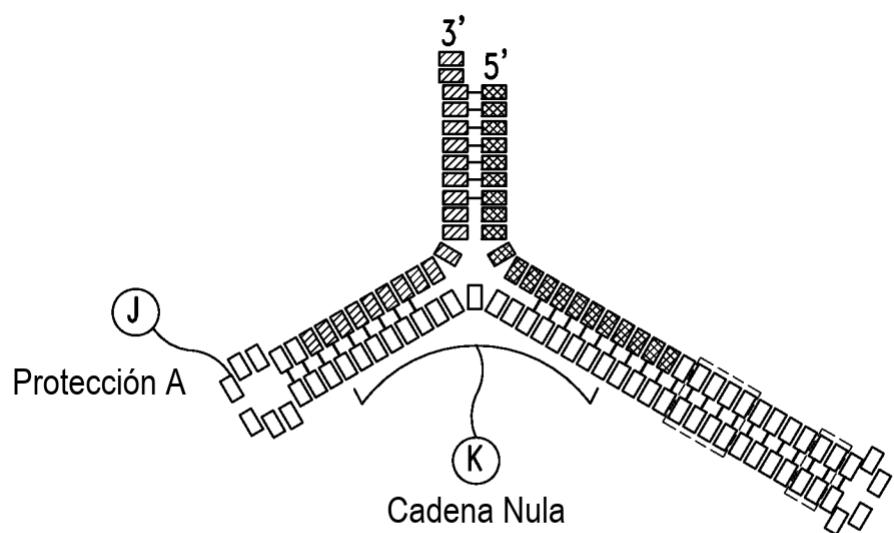


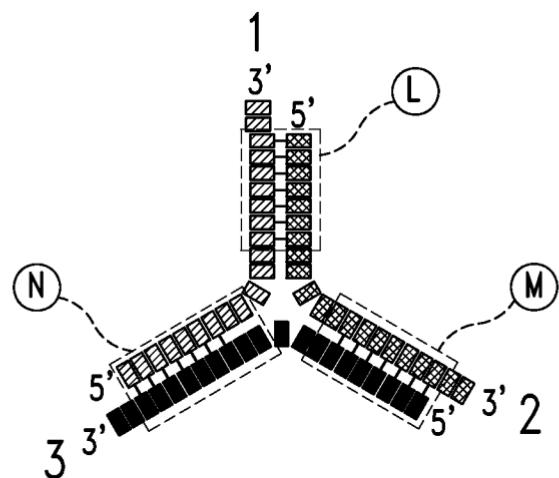
FIG. 2



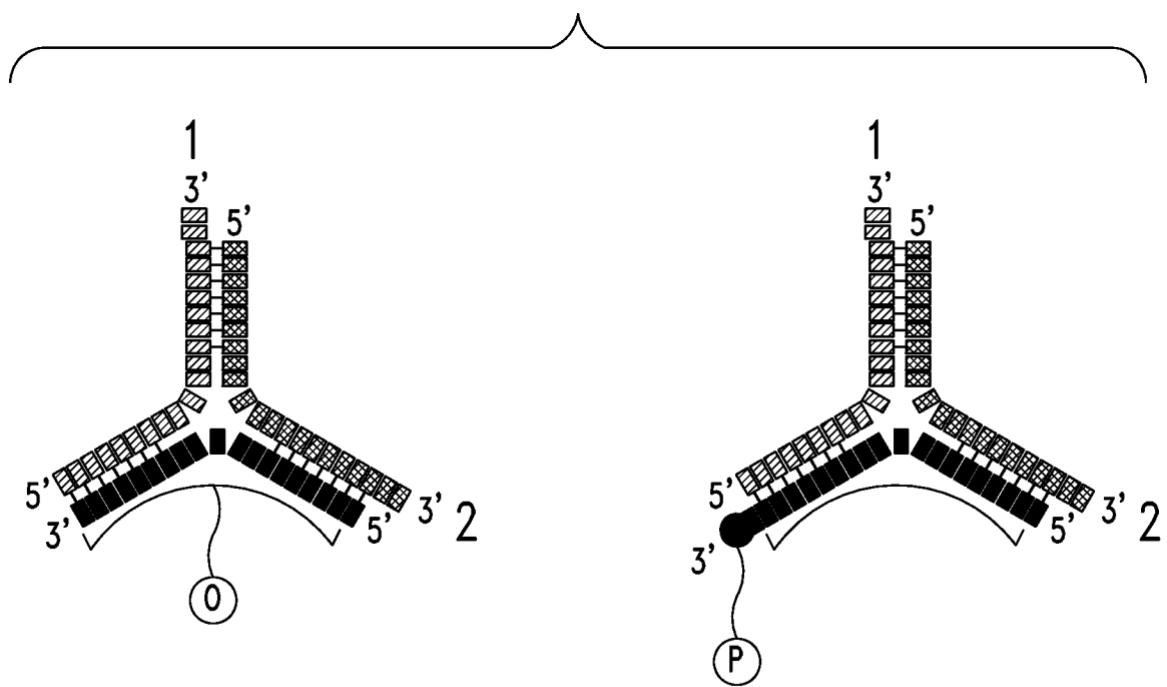
*FIG. 3*



*FIG. 4*



*FIG. 5*



*FIG. 6*

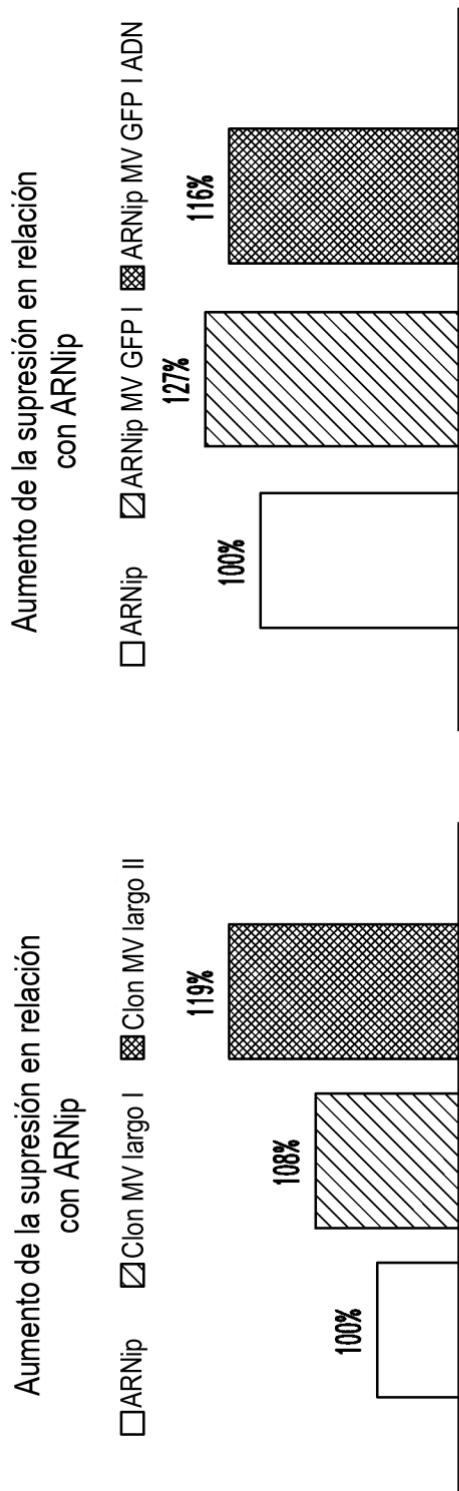


FIG. 7A

FIG. 7B

## Direccionamiento GFP

AUGGUGACCAAGGGCGAGGCCUGUUCACCCGGGUCCAUCCUGGUCCGACGGGACCCGUAA  
ACGGGCCACAAGUUUCAGCGUGUUCGGGAGGGCAGGGCAGGGGAGGGGAGGGGAGGG  
CAUCUSCACCCACGGCAAGCUGGCCAACCCGGCAUCUCCGCCCCACCCUGUGACCACCUA  
UGCUUCAGCCCUCUACCCGUACUCCGACCAAGUAAGCCACGACCCACAUUCAAGGAC  
UCCAGGAGGGACCAUUCUUCUCAAGGACGAGGCAACUACAAGGACGGCAAGACCGAC  
CGACACCCUGGUAAACGCAUCGAGGUAAAGGGCAUCCGUAAUCAUGGACGGACGGCA  
AAGCUGGUAAACUACAACAGCACAACGUCACCAACAGGUAAACCGGACGGCAAGACAC  
UGAACUUCAGAACGGCCACACAGGAGGACGGCAACGGGUCCACCUACCCAGUCCAC  
CCCCAUCCGGCACGGGCCAACCCGGCCACAAACCCACAUUACCCAGUCCACCCAGU  
GACCCAACGAGGACGUACAGGGGAUCACAGGUCCUGGAGUCCUGGUACACUUCGGCA  
UGGACCGAGGACGUACAGGUAAA

**FIG. 8A**

## Direccionamiento GFP

AUGGUGACCAAGGGCGAGGCCUGUUCACCCGGGUCCAUCCUGGUCCGACGGGACCCGUAA  
ACGGGCCACAAGUUUCAGCGUGUUCGGGAGGGCAGGGCAGGGCAGGGGAGGGGAGGG  
CAUCUGCACCCACGGCAAGCUGGCCAACCCGGCAUCUCCGCCCCACCCUGUGACCAC  
UGCUUCAGCCGUACCCGGCACAUUAGCAGGCCACUUCUCAAGGACGGCAACGGCA  
UCCAGGAGGGACCAUCUUCUCAAGGACGGCAACGGCAUCGAGGUAAAGGGGAGGG  
CGACACCCUGGUAAACGCAUCGAGGUAAACAGGCAUCGGCAUCCGUAAACGGCAAC  
AAGCUGGUAAACUACAACAGGCCACAUUACCCAGUCCACCCAGUCCACCCAGU  
UGAACUUCAGAACGGCOACACAGGAGGACGGCAGCGUGGUCCACUACCCAGU  
CCCCAUCCGGCACGGGCCAACCCGGGUCCACAAACCCACUACCCAGUCCACCCAGU  
GACCCAACGAGGACGUACAGGGGAUCACAGGUCCUGGAGUCCUGGUACACUUCGGCA  
UGGACCGAGGACGUACAGGUAAA

**FIG. 8B**

Direccionamiento GFP

```

AUGGUGACCAAGGGCGAGGACCUUACCGGGGUCCAUCCUGGUOAGGCCGGGACGGUAA
ACGGCCACAAGGUUCAGGGGCGAGGGCAGGGGUCCGGGAUGGCCACCGCAACGGCA
CAUCUGACCACGGCAAGCUGCCGUGCCGUGCCGUGACCCUGACCUACGGCGUGCCAG
UGCUUUACGGGUACCCGACCAUGGAAGCCACGGACCUUACGGACGGGGCAACUACAA
UCCAGGGAGGGGCAACUUCUUCAAGGGACGGGGCAACUACAAAGACCCGGCGAGG
CGACACCCUGGUAGCCGGACGGCAUCCGGCAUCCGGCAUCCGGCAACACGGAGGACGGCAC
AGCGUGGAGUACAACUACAACAGCCACAACGUUCAAGGGCAACGGCAUCAAGGAACGG
UGAACUUCAAGGAUCCGGCACAACAUGGGACGGCAGGGCAGGGCAGGGCAGGG
CCCCAUCCGGGACGGCCGUGCCGACAAACCUACGGGGCAACUACAAACGGACGG
GACCCAAACGAGAAGGGCGGAUCACAUGGGAGUUCGUUGACCCGGCGCGG
UGGACGAGCTGUACAAGUAA

```

*FIG. 8C*

% de inhibición de VIH

□ ARNip ☒ ARNip MV

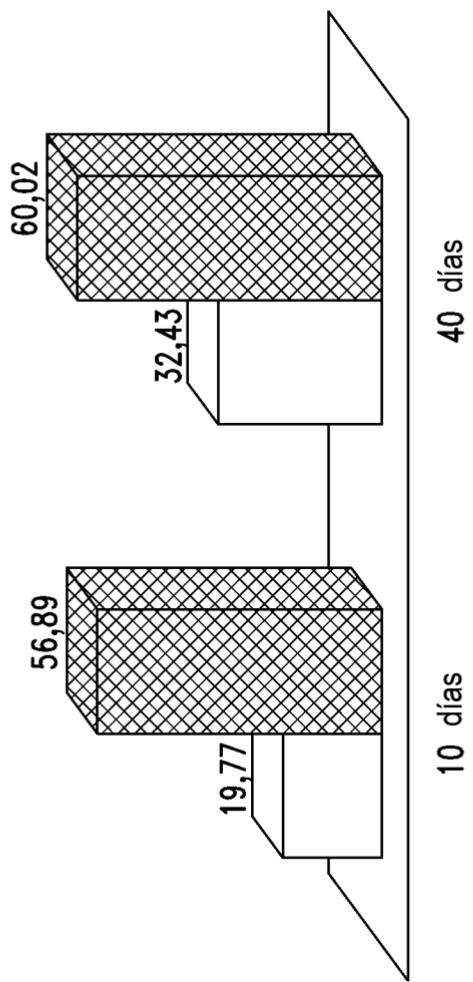


FIG. 9

GENOMA DE VIH ILUSTRATIVO:

FIG. 10A

FIG. 10B



AACUCAUJUGCACACUGCCUJUGGAGGUAAAUCUCUGGAACAGAUUJGGAAUCACACGA  
 CCUGGAUGGAGGGCACAGAGAAAUUACAABUACACAAGCTTUAUJAGAACUCCUUAAUTGAA  
 AAGAAAAGAAUCAAGAAACAAGAAUUAUUCAUAAUGAUAGGUAGGGCUUJGGGUAAUJGUAG  
 UGJGGUAAUAAUAAUAAUUCAUAAUGAUAGGUAGGGCUUJGGGUAAUJGUAGGUACUJJUCUGUAG  
 UGAAUAGAGGUAAUAAUAAUAAUUCAUAAUUCACCTTAAUCCUJUCAGACCCTCCCAAUCCGACGG  
 AAGGAAGAAAGAAAGGAAGGGAGCAGAGACAGACAGACAGACAGACAGACAGACAGACAG  
 GGGACGAUCUGGGAGCCUGGGCUGGCCUUCAGCUACCCACCGCUUJGGGUAAUJGUAGGU  
 AACUUCUGGGACCCACGGGGCUCCAAAGCCUAAUAAUUTSGUGGAUCUCCUACAUAAUJGG  
 AUAGUGGCUGGUAGGUAGCCUCAUAGCCAGAGGAAAGGAAGGGAAAGGAAGGGAAAGGA  
 AACSCUUAAUAGGGCUAAUUCGCCACAUACCUGAAGAAUAGGACAGGGCUUJGGGUAA  
 AGUGGGUCAAAAGGUAGUGGUUGGUAGGGAAAGGGCUUJGGGUAAUJGUAGGU  
 GUUGGGAGCAUCUOAGGGCUAGCAACAGAGGAAAGGGCUUJGGGUAAUJGUAGGU  
 GCUGGGCUAAAGGGCUAAUJGGGUAAUJGUAGGUACACCUCAGGUACCUUAAAGACAA  
 AACCCAGCUGGUAGCAUCUUAGGCCACUUUJGGGUAAUJGUAGGUACACCAGGAC  
 GATUAUCCUJGAUCHIGGUAGGUACUCCACACAGGCUACUCCACACAGGCU  
 AGAUAAUCCACUGACCUUJGGGUACUCCACACAGGCUACUCCACACAGGCU  
 GAGAACACCCAGGUAGGUACUCCACACAGGCUACUCCACACAGGCU  
 GACAGGGCCUAGGCAUUCUACGGGCCGAGAGCUGCAUCCAGG  
 UACAAGGGACUUCUCCUGGGGACUUCUCCUGGUACUCCUGGGGACUUCUCC  
 UGCAUAAAGCAGCCUCUUCUUCUUCUUCUUCUUCUUCUUCUUC  
 ACUAGGGAACCCACUGGUAAAGCCUCAAGGUAGGUACUCC  
 CUCUGGUAAUAGGAGAUCCUCAGACCCUUCUAGGUAGGUAGGU

**FIG. 10D**

>gi|9629357:5771-8341 Virus de la inmunodeficiencia humana 1, genoma completo (gen de ENV)  
ATGAGAAGTCACCGAGAAATAATCAGCACTTGTCAACAGTATTATGGCTTACAGCTTGTCTGAGATCACGCCAACCATGCTCTCTGCATGATCTGAG  
CTAAGACCATATGATACAGAGGTACATAATGTTGCCCCACACATGCGCTGTGACCTGACAGACAGACAGACAGACAGACAGACAGACAGACAG  
CTAAATGTCACCGAAATTTCACATGCGAACAAATGACATGCGAACATGCAAGATGCAAGACATGCAAGACATGCAAGACATGCAAGACAG  
CCTAAAGCCATGTGTAAGAAATTAAACCCACTCTGTTAGTTAAAGTGCACTGATTGAAGAATGAAATCAAACAAATAGTAGTAA  
GCGGAGAAATGATAATGGAGAAAGGAGATAAAAAGTCTCTTCAATATCAGGACAAGCATAACAGGTTAACGGTAAAGTGCAAGAAAG  
TATGCAATTCTTATAACTGATAATAACCAATAGATAAAATGAAACACTGCTTAAAGCTTAAACCCATTACATTATGTCGCGCTTAAAGTCAAA  
TACACGGCCGTGTCACGGCAACAGGACATGTCACAAATGTCACAGGACATGTCACAAATGTCACAGGACATGTCACAAATGTCAC  
ATAAGACGTTCAATGGCAATGGCAGTGTAGGAAAGGAGTAGTAAATTAGATCTGTCATTTACCGGACATGTCACAGGACATGTCAC  
CTGCTGTTAAATGGCAGTGTAGGAAAGGAGTAGTAAATTAGATCTGTCATTTACCGGACATGTCACAGGACATGTCAC  
GCTGAAACACACTCTGTAGAAATTGTCACAGGACACCCAAACACAAATAACCAACAAATAACCAACAAATAACCAACAAATAACCAAC  
CATTGTTACAAATAAGAAAATAAGAAAATAAGAAAATAAGAAAATAAGAAAATAAGAAAATAAGAAAATAAGAAAATAAGAAAATAAG  
ATAAGCTTAGCAAAATAAGAGAACAAATTGGAAATAACCAACAAATAACCAACAAATAACCAACAAATAACCAACAAATAACCAAC  
GCACAGTTTAATTTGTCAGGGAAATTCTACTGTAATTCAACACAACTGTTAATCTGAAACACAACTGACCCCTCCATGAGAAACTA  
CTGAAGGGTCAAATAACACTGAAACAGGAAAGTGACACAAATCACCCCTCCATCACGAGAAATTAGATGTTCAITCAAATAACGGCTG  
GSAAGAACAACTGTAATGCCCTCCATCACGAGAAATTAGATGTTCAITCAAATAACGGCTGCAATTAGATGTTCAITCAAATAACGGCTG  
TAATAGCAACAACTGAGTTCGAGATCTGAGACCTGAGCTTCAAGGAGATATGGGCAAAATTGAGAAGTGGGAACTTCAAAATAAG  
TAGAAAATGAAACATTAGGAGTGGCAAGGAAACCAAGGCAAGGAAACCAAGGCAAGGAAACCAAGGCAAGGAAACCAAGGCAAGG  
GCTTTGTTCCCTGGGTTCTGGGACCAACTGAGCTGGCAACCCCTCAATGACGCTGACGCTAACACCCATGCAATTGCAACTCACAGT  
GTCCTGTTAACTGTCAGGCTTAAAGTCAACAGGCTTAAAGTCAACAGGCTTAAAGTCAACAGGCTTAAAGTCAACAGGCTTAAAGT  
ATAAGCACCACCTGGCTGGCTTGGCAATGGTAGCTGGCAATTGCTGAGCTGAGGCTTAAAGTCAACAGGCTTAAAGTCAACAGG  
GGACASAGAAATTAAACAAATCACAGCTTAATGAGAAATCACAGCTTAATGAGAAATCACAGCTTAATGAGAAATCACAGCT  
TATGGSAATTAGAAATTGGCAAGTGGAAATTGGTAACTTAACTAACAAATTGGCTTAACTAACAAATTGGCTTAACTAACAAATTGG  
GTAGGAGGCTGGCTGGAGGTTAAAGAATAGTTTTCGCTGACTTCTGATAGGAAATAGAGTAACTGAGCTTAACTAACAAATTGG  
TCAGACCCACCTCCCAACCCGAGGGACCCGACAGGAGAAATAGAAGAAGAAGGTTGGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAG  
TTCGAAATTAGTGAACGGGATCTGGAAACTCTGGACGGATCTGGCTGCTGGCTCTGCTGAGCTTCAAAATTGCTGAGGCTTAACT  
CTCTGATTGTTAACGGAGGATTGGAAACTCTGGACGGCTGGCTCAATGAGCTTAACTAACAAATTGGCTTAACTAACAAATTGG  
GAGTCAAGGAACCTAAAGAAATAGTCTCTGGTAACTGAGCTTAACTAACAAATTGGCTTAACTAACAAATTGGCTTAACTAACAA  
TAGTCAACAGGAGCTTGTAGAGCTTAACTAACAAATTGGCTTAACTAACAAATTGGCTTAACTAACAAATTGGCTTAACTAACAA.

FIG. 11

FIG. 12A

> (11) 3629357 : 5377-5591, 7925-7970) Virus de la inmunodeficiencia humana 1, genoma completo  
 (gen de TAT)  
 ATGGAGCCAGTAACTCTAGACTTAGGCCCTGGAAAGCAATCAGGAAGTCAGCCPAAAACCTGCTTGATCCAAATTGCTATGTAAAGA  
 GTGTTGCPTCATGCCAACGTTAGCTTACATCCCATGGCATTAACAAAGCCTTACATGGCAGGAAGAACGGGAGACAGCGACGAAGAG  
 CTCAATCAGAACAGTCAAGACTCATCAAGCTTCTATCAAAGCAACCCACCTCCCACAGGGGACAGGCCGACAGGGAA  
 TAG

FIG. 12B



GUCUUJGGUJUGACACAUUGAACGUUCAAGUCAAGGUCAAUUCCGCUAAGGUCAACGUACGUUCAAAUAUAUAAUCGGCA  
 GAAGCAGGACCUUAAUCGUAGUGAAAGUCUCAAGUCAAUUCCGGACAUUCCGACAAUCGUAGUAAUACGUAGUAAUCGGU  
 AAGGACAAACACGUACAAACGUAAACGUAAAGGUUUCGUUCAAGGUUUCGUUCAAGGUUUCGUUCAAGGUUUCGUUCA  
 UAAAAGGGAGAUGGCAAGGUCAAGGUUUCGUUCAAGGUUUCGUUCAAGGUUUCGUUCAAGGUUUCGUUCAAGGUU  
 CCGUCCACCAACUGGUCCUUCUCAAADGGACCUACUGGUCCUACAGGUUCAACGUUCAAGGUUUCGUUCAAGGUU  
 AUGAGAUAAUAGAAUUTGAAUGGAACACGGAAACCAUUGGUAAUCCGAAACGGAAACACGGAAACACGGAAACACGGAA  
 UUAUCCGAAAGGUUCAUGGUAAUCCGAAACGGAAACACGGAAACACGGAAACACGGAAACACGGAAACACGGAAACACGGAA  
 CCAAUUAUUAUUGGUUCAACAAACACGGAAACACGGAAACACGGAAACACGGAAACACGGAAACACGGAAACACGGAA  
 AGCCUCUCUGAGGUUACGUUCCAUUCCGUUACGUUCCAUUCCGUUACGUUCCAUUCCGUUACGUUCCAUUCCGUUACGU  
 CAAAUACACAAUUGAACACGGAACACGGAACACGGAACACGGAACACGGAACACGGAACACGGAACACGGAACACGGAA  
 AGAGGUJUGAGGACACCCAGGCCUCAACGUUCAAGUCCUUCUCCGUUACGUUCCAUUCCGUUACGUUCCAUUCCGUUACGU  
 CCAAGAGACACAUCAUGGCCUCAAGGUCCUUCUCCGUUACGUUCCAUUCCGUUACGUUCCAUUCCGUUACGUUCCAUUCCGU  
 GUCCUACACUGGGCAACACGGAGAACACGGAGAACACGGAGAACACGGAGAACACGGAGAACACGGAGAACACGGAGAAC  
 UTGUCCUACACUGGGCAACACGGAGAACACGGAGAACACGGAGAACACGGAGAACACGGAGAACACGGAGAACACGGAGAAC  
 AAACGUUCAAGGUUAAUUCUAAAGGUUCAACGUUCAAGGUUCAACGUUCAAGGUUCAACGUUCAAGGUUCAACGUUCA  
 AAACGUUCAAGGUUAAUUCUAAAGGUUCAACGUUCAAGGUUCAACGUUCAAGGUUCAACGUUCAAGGUUCAACGUUCA  
 UGUCAUGGUUCAAGGUUCAACGUUCAAGGUUCAACGUUCAAGGUUCAACGUUCAAGGUUCAACGUUCAAGGUUCAACGU  
 AGCGGGGGAUCCAACCAACGUUAGGUUACGUUAGGUUACGUUAGGUUACGUUAGGUUACGUUAGGUUACGUUAGGUU  
 CAUCACCUCACUUCUGGUUACGUUAGGUUACGUUAGGUUACGUUAGGUUACGUUAGGUUACGUUAGGUUACGUUAGGUU

**FIG. 13B**



FIG. 13D



>X04506 (ApoB humana)

FIG. 14A

CCUGGUCCAGUUGGCAAGCAAGGUUCGUUUCCUGGCCUGAAUUAUCGGACCUCCUCUACCUCCAGGUCCACAGACUCCCGCC  
 UCCUACAUUCCGCTUSAACCGGCUAAGCACCAGAGGGAAACUCAAGGCUUACUAGGCUUACUAGGCUUACUAGGCUUAC  
 CCAUGACGUCCAGAGGACAGGGACAGGGACAGGGACAGGGACAGGGACAGGGACAGGGACAGGGACAGGGACAGGGAC  
 CUGAAGGUCAUUAUAAUUCUAGGAGGUACGUUACUUCUUCGUUACUAGGUACGUUACUAGGUACGUUACUAGGUAC  
 CUGGUCCAGAGGACAGGGACAGGGACAGGGACAGGGACAGGGACAGGGACAGGGACAGGGACAGGGACAGGGAC  
 GAAGUGGAUCCUCGCCCCACUGGUCCUCCAAACUGGUCCUCCAAACUGGUCCUCCAAACUGGUCCUCCAAACUGGUCC  
 AGAGGGGGCAUGGCCAUUAAAUGAUGAAGAGAGAAUUGAUUAAAUGGAACACGGCACCAAGGUAAUUGAUUAAAUGAU  
 CAAUUDCCUGGUCAUCUCCGUUCAUUAUAGGUCAUUAUAGGUCAUUAUAGGUCAUUAUAGGUCAUUAUAGGUCA  
 ACAUGACGUCCAGAGGACAGGGACAGGGACAGGGACAGGGACAGGGACAGGGACAGGGACAGGGACAGGGAC  
 CAGACGUUCCAGAGGACAGGGACAGGGACAGGGACAGGGACAGGGACAGGGACAGGGACAGGGACAGGGAC  
 CUCUCAAAAGGGGAUGGCCGUUAAUACGUUACAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUAC  
 CUCAGAGAGAUCAUAAAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUAC  
 UUCCAGGUCCUACUUUACAUUCCAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUAC  
 CAGCAAUCCGUACUACUGGUCCUCCUACAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGU  
 AGGUUACUCCUACUGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGU  
 UCAUGUGAAGGUUACUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGU  
 AAAACGUUACAUAAUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUAC  
 AUHUGGUUCAAAAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUAC  
 AGGGAUOCUAAACUGGCCGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUAC  
 AGAGAUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUAC  
 AGAACUACGGAGGUACGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUAC  
 AGCAAAAUUGCACUGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUAC  
 CCAUGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUAC  
 AUGGGAAUUAUCUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUAC  
 GGGCAUCUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUAC  
 GCUAUCACUGGGAAUGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUACUAGGUUAC

**FIG. 14B**

UUAAGCCUCUCAAUCGACAUUGGCCUCAUUGCCUGAAUUGAATAUUGACCACACAACAGUCUGAACAUUSCAGCCJUAUCACUT  
 GACIUCUCUCCUAAACUUCGACAAACAUUJACAGCUUGCAUACAGUUUJAAUAGCAACUGUUUJAAUUGACCCUAAUUCUCU  
 GGUAAACUACUACUUCUAAACUGACCUUACAGUGACCCUAAACAUUACUGCCUAAACAUUACUGCCUAAACGGCUAAAGCG  
 AUGUGGCCUGGUACCUAAAGGAGCCUAAAGGAUAAUAAAACACAUUACUGCCUAAUCUUCUCCUUCUCCUAAUOJAGCCAGC  
 UAUAAAGCACACUUCUCCUAAAGGAGCCUAAAGGAUAAUAAAACACAUUACUGCCUAAUCUUCUCCUUCUCCUAAUOJAGCCAGC  
 UGACAUAGGAGGACAAACAUUAAUUCAGACUCACUUCAGCAUUCUCCUAAACAGACAUUACUGCCUAAUCUUCUCCUUCUCC  
 AUGCACAUUACAAAUUGGOAAUUGGAACACUCGCUUCUCCUUCUCCGAGAAACAUUACUGCCUAAUCUUCUCCUUCUCC  
 CCUCUGGCATUUAUUCUCCUAAAGGAGCCUAAACAUUACUGCCUAAACAGACAUUACUGCCUAAUCUUCUCCUUCUCC  
 ACACAAAGGACUUCAGUGCCUGGUACUCCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGC  
 AGGACUUCUGGAUCSCUUAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCU  
 CCAAAUUAAGUGCCACUUCUACUGCCUAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCU  
 AUUUACAAUUGGUUCUUUGUAAGUAGUAAAAACCAAGAUCUUCUACUCCAAACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACAC  
 AUUUGAGAGGAACUGACAAACCAACAUUACAGUUCUAGGAAACCCACACCAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCU  
 AGAAAAAUACAGGAGGCGCCGGAAACUCCACACCAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCU  
 UGCCCCAACCGGAAACUCCACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCU  
 ACUUAAGGAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCU  
 AAAAUAGGAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCU  
 AAAAACAUCCAUCAUGAUUACAUUACAUUACAUUACAUUACAUUACAUUACAUUACAUUACAUUACAUUACAUUACAUU  
 UGGAUACUAAGUACCAAUCAGAAUUCAGGCUAAUUCAGGCUAAUUCAGGCUAAUUCAGGCUAAUUCAGGCUAAUUCAGG  
 CIAGCCUGGAAAGUAAAACACACAUUACAGGAGACUAAUUCAGGCUAAUUCAGGCUAAUUCAGGCUAAUUCAGGCUAAU  
 AAUAAAUGAUCUUCUUGAGCAUUCAGGCUAAUUCAGGCUAAUUCAGGCUAAUUCAGGCUAAUUCAGGCUAAUUCAGG  
 GAGCCAAAGUCCAUCAUGAUUACAUUACAUUACAUUACAUUACAUUACAUUACAUUACAUUACAUUACAUUACAUUACAU  
 CAAUACAGGUGAAAGGAGCCUAAACAUUACAUUACAUUACAUUACAUUACAUUACAUUACAUUACAUUACAUUACAUUACAU  
 GAAUAAUAGGAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCUAAACACCU  
 CGAAAAGGCTUACAGGACACCCAACAUUACCCUAAACAUUACCCUAAACAUUACCCUAAACAUUACCCUAAACAUUACCC  
 GUAGGGCCAGGUUUAUAGCACACUUCAGGACACUUCAGGACACUUCAGGACACUUCAGGACACUUCAGGACACUUCAGG  
 AUAUUCUUAUCGAAGAUUGGCCGCUAAACGUUAUGGAZAGCAUUCAGGACACUUCAGGACACUUCAGGACACUUCAGG  
 CCAUGGCCUGCCUUGAAGGUCAUCGUUCUCCAGGUUCUCCAGGUUCUCCAGGUUCUCCAGGUUCUCCAGGUUCUCCAGGU  
 AGGAUUCUCAUCGUUCUCCAGGUUCUCCAGGUUCUCCAGGUUCUCCAGGUUCUCCAGGUUCUCCAGGUUCUCCAGGUUC  
 UAACACCUUCUCCACAUUCCACUUCUCCACAUUCCACUUCUCCACAUUCCACUUCUCCACAUUCCACUUCUCCACAUUCC  
 CGUGGCCAGGUUCUCCAGGUUCUCCAGGUUCUCCAGGUUCUCCAGGUUCUCCAGGUUCUCCAGGUUCUCCAGGUUCUCC

**FIG. 14C**



FIG. 14E