

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 855 577**

(51) Int. Cl.:  
**C12N 15/09**  
(2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.03.2012 PCT/JP2012/059430**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **04.10.2012 WO12133947**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.03.2012 E 12763652 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.11.2020 EP 2691522**

---

(54) Título: **Molécula de ácido nucleico funcional y uso de la misma**

(30) Prioridad:

**30.03.2011 US 201161469399 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**23.09.2021**

(73) Titular/es:

**TRANSINE THERAPEUTICS LIMITED (50.0%)  
1 Middle Drift  
Royston SG8 5BU, GB y  
INTERNATIONAL SCHOOL FOR ADVANCED  
STUDIES (50.0%)**

(72) Inventor/es:

**CARNINCI, PIERO;  
FORREST, ALISTAIR;  
GUSTINCICH, STEFANO;  
CARRIERI, CLAUDIA y  
ZUCCHELLI, SILVIA**

(74) Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 855 577 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**

Molécula de ácido nucleico funcional y uso de la misma

**Campo técnico**

5 La presente invención se refiere a (a) una molécula de ácido nucleico funcional que tiene la función de incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas, y (b) un uso de la molécula de ácido nucleico funcional.

**Técnica anterior**

10 Existen varios tipos de moléculas de ácido nucleico funcionales, tipificadas por moléculas de ARN funcionales relativamente largas, tales como el ARN antisentido, por ejemplo. Otros ejemplos típicos de moléculas de ácido nucleico funcionales son moléculas de ARN funcionales relativamente cortas, tales ARNhC (ARN en horquilla corta), ARNip (ARN de interferencia pequeño) y miARN (ARN micro interferente). Generalmente se sabe que estas moléculas de ARN funcionales contribuyen a la regulación por disminución de la expresión génica. Se han revisado ampliamente varios ejemplos como "ARN de interferencia" como en (Bibliografía no Relacionada con Patentes 1).

15 Una técnica de ARN antisentido tiene una especificidad de la diana excelente. Sin embargo, esta técnica tiene la desventaja de que se activa una respuesta antiviral en una célula. Por el contrario, la técnica que utiliza moléculas de ARN funcionales relativamente cortas, tales como el ARNhC, no activa prácticamente la respuesta antiviral. En cambio, las moléculas de ARN funcionales relativamente cortas tienen la posibilidad de causar efectos en sitios diferentes al sitio diana ("off-target") ya que es difícil que la longitud de secuencia corta mantenga una alta especificidad para las secuencias diana. Por tanto, las moléculas de ARN funcionales relativamente cortas tienden a mostrar una escasa especificidad diana en comparación con la técnica de ARN antisentido.

20 20 La bibliografía Relacionada con Patentes 1 describe una molécula de ácido nucleico funcional (molécula de ADN) que comprende: un promotor pol III de tipo III; una secuencia idéntica o complementaria a una secuencia diana que realiza una regulación por disminución; y una secuencia obtenida de ARN pequeño de 7SL (más específicamente, un fragmento de una secuencia obtenida de Alu) que incluye al menos dominios de unión a proteínas srp9 y srp14. Las proteínas srp9 y srp14 son miembros de una familia de proteínas que se unen a un ARN 7SL en la transcripción génica para formar un complejo de ARN 7SL.

25 Se describe que la molécula de ácido nucleico funcional descrita en la Bibliografía Relacionada con Patentes 1 se utiliza como una técnica de regulación por disminución de la expresión génica en la que una molécula de ARN transcrita a partir de la molécula de ácido nucleico funcional prácticamente no provoca activación de respuesta antiviral y tiene una excelente especificidad de diana.

30 30 Alu se clasifica en un grupo de SINE (Elementos Cortos Intercalados). Obsérvese que la secuencia obtenida de Alu de la molécula de ácido nucleico funcional descrita en la Bibliografía Relacionada con Patentes 1 se inserta en una orientación particular y se considera que está implicada en la estabilidad del ARN.

Por otro lado, se ha informado de que algunas pequeñas moléculas de ARN también pueden mejorar el nivel de transcripción.

**35 Lista de referencias**

Bibliografía Relacionada con Patentes 1

Publicación internacional WO 2008/113773 A2 (Fecha de Publicación: 25 de Septiembre de 2008)

Bibliografía No Relacionada con Patentes 1

He L, Hannon GJ. Nat Rev Genet. Julio de 2004; 5(7):522-31. PMID: 15211354

**40 Compendio de la invención****Problema técnico**

45 Como se informa ampliamente en la Bibliografía Relacionada con Patentes 1 y otros documentos, se conocen bien muchos tipos de moléculas de ácido nucleico funcionales que regulan por disminución la expresión génica o similares. Aunque ha habido algunas técnicas para regular por incremento la expresión génica aumentando la eficacia de la transcripción (como en el caso de Nature Chemical Biology 3, 166-173 (2007), B. Janowski et al), el incremento de la eficacia de la transcripción no siempre aumenta la eficacia de la síntesis de proteínas en proporción directa debido al efecto meseta. En este sentido, la síntesis de la proteína traducida puede depender de muchos otros factores, incluida la capacidad de un ARN dado para interactuar de manera eficaz con los ribosomas. Adicionalmente, no siempre es posible aumentar la transcripción del ARNm natural en las células u organismos. Es decir, no se ha informado de ninguna molécula de ácido nucleico funcional que incremente directamente la eficacia de la síntesis de proteínas.

Los autores de la presente invención consideran que existen muchas condiciones en las que se desea actuar únicamente sobre la traducción. Por ejemplo, la potenciación de la traducción de una proteína animal con fines terapéuticos sin interferir en su transcripción puede ser muy deseable porque no requiere la reprogramación de la transcripción del ARNm en el núcleo.

- 5 La presente invención se logra en vista del problema anterior. Un objeto de la presente invención es proporcionar una molécula de ácido nucleico funcional que tenga la función de incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas y un uso de la molécula de ácido nucleico funcional.

#### **Solución al problema**

10 El conocimiento actual de los autores de la presente invención sugirió que la traducción de proteínas puede estar regulada por factores que incluyen la estructura de las regiones de los ARNm que se coloca aguas arriba de la fracción traducida de los ARNm. Esta región se conoce como 5' UTR (región 5' no traducida). Para el propósito de esta invención, la 5' UTR puede ser natural (que se encuentre en los ARN naturales, desde el sitio de inicio de la transcripción hasta el codón de inicio de la proteína), o puede ser una secuencia artificial, tal como la secuencia presente en un vector de clonación o cualquier otra secuencia recombinante.

15 Los autores de la presente invención estudiaron diligentemente para lograr el objeto anterior. En consecuencia, a través del análisis de las funciones de las moléculas de ARN conocidas como ARN no codificantes, los autores de la presente invención encontraron el hecho sorprendente de que una estructura particular de tal molécula de ARN tiene la función de incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas. Este ácido nucleico funcional mostró el efecto contra una proteína diana específica a través de una secuencia antisentido para una secuencia diana. Basándose en los hallazgos, los autores de la presente invención han logrado la presente invención.

20 Es decir, una molécula de ácido nucleico funcional según la presente invención comprende:

- (a) una secuencia determinante de la diana que comprende una secuencia antisentido para una secuencia diana en el ARN que codifica la proteína para el que se va a incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas; y
- (b) una secuencia reguladora que tiene la actividad de incrementar la eficacia .

25 En la molécula de ácido nucleico funcional según la presente invención, la secuencia reguladora comprende un elemento SINE (Elemento Intercalado Corto) B2. Las secuencias SINE B2 se enumeran en la Tabla 1 a continuación.

En la molécula de ácido nucleico funcional de acuerdo con la presente invención, la secuencia reguladora se puede seleccionar del grupo que consiste en los siguientes (1) a (5):

- 30 (1) un ARN, que está codificado por un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 1 (SINE/B2 en AS Uchl1)
- (2) un ARN, que está codificado por un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 2 (SINE/B2, espaciador de 39 nt indicado como subrayado y SINE/Alu en AS Uchl1)
- (3) un ARN, que está codificado por un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 3 (SINE/B2 en AS Uxt)
- 35 (4) un ARN codificado por un ADN que consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias mostradas en la Tabla 1; o
- (5) un ARN que es al menos 95% similar al ARN de los apartados (1), (2), (3) o (4) y tiene la función de incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas.

40 En la molécula de ácido nucleico funcional de acuerdo con la presente invención, la secuencia determinante de la diana comprende una secuencia antisentido para una secuencia diana en el ARN que codifica la proteína para el que se va a incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas.

En la molécula de ácido nucleico funcional de acuerdo con la presente invención, la secuencia determinante de la diana puede estar ubicada entre un extremo 5' y la secuencia reguladora en la molécula de ácido nucleico funcional.

45 En la molécula de ácido nucleico funcional de acuerdo con la presente invención, es preferible que la secuencia antisentido en la secuencia determinante de la diana tenga una longitud de más de 7 nucleótidos pero menos de 250 nucleótidos.

50 En la molécula de ácido nucleico funcional de acuerdo con la presente invención, es preferible que la secuencia antisentido en la secuencia determinante de la diana tenga al menos 60% de similitud con una secuencia diana en el ARN que codifica la proteína o con la secuencia del plásmido aguas arriba del ATG en el ARN que codifica la proteína para el que se va a incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas.

En la molécula de ácido nucleico funcional de acuerdo con la presente invención, es preferible que la dirección de la secuencia obtenida de SINE que está anotada como directa en la secuencia reguladora esté orientada en una dirección inversa con respecto a la dirección (dirección directa como se define anteriormente), en donde la secuencia obtenida de SINE está orientada en la misma dirección que la secuencia consenso de SINE. Es decir, la secuencia reguladora de la molécula de ácido nucleico funcional está orientada en una dirección directa con respecto a la dirección de traducción y en una orientación inversa con respecto a la dirección de transcripción de la molécula de ácido nucleico antisentido.

Si la dirección de 5' a 3' se define como la dirección de avance, la secuencia obtenida de SINE en esta invención, en donde su orientación 5' a 3' concuerda con la secuencia consenso de SINE, está integrada en la dirección inversa de la molécula de ácido funcional en esta invención.

En la molécula de ácido nucleico funcional de acuerdo con la presente invención, la secuencia antisentido en la secuencia determinante de la diana se puede diseñar para que hibride con una secuencia diana en la 5'-UTR del ARN que codifica la proteína para el cual se va a incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas. Alternativamente, la secuencia determinante de la diana se puede diseñar para que hibride con una secuencia diana en la región codificante del ARN que codifica la proteína para el que se va a incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas. Adicionalmente, la secuencia determinante de la diana se puede solapar con la secuencia del plásmido aguas arriba del codón de inicio o incluir el codón de inicio en la secuencia diana del ARN que codifica la proteína. La molécula de ácido nucleico funcional de acuerdo con la presente invención se puede dirigir a variantes de corte y empalme específicas en los extremos 5' del ARN que codifica la proteína o en otras partes de la molécula.

La molécula de ácido nucleico funcional de acuerdo con la presente invención puede ser diseñada y producida apropiadamente por un experto en la técnica relacionada, siempre que la molécula de ácido nucleico funcional incluya: una secuencia determinante de la diana que comprenda una secuencia antisentido para una secuencia diana en el ARN que codifica la proteína para el que se va a incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas; y una secuencia reguladora que tenga la actividad de incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas. Cualquier modificación durante o post/síntesis puede ser aplicada a la molécula de ácido nucleico funcional por un experto en la técnica relacionada de acuerdo con los conocimientos prácticos en procedimientos terapéuticos de ARN o similares.

Una molécula de ADN de acuerdo con la presente invención codifica cualquiera de las moléculas de ARN tales como las moléculas de ácido nucleico funcionales mencionadas anteriormente.

Un vector de expresión de acuerdo con la presente invención incluye una cualquiera de las moléculas de ARN o la molécula de ADN como moléculas de ácido nucleico funcionales mencionadas anteriormente.

Una composición para aumentar la eficacia de la síntesis de proteínas de acuerdo con la presente invención comprende una cualquiera de las moléculas de ácido nucleico funcionales antes mencionadas y/o el vector de expresión mencionado anteriormente.

Un método para incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas de acuerdo con la presente invención comprende la etapa para permitir que una cualquiera de las moléculas de ácido nucleico funcionales antes mencionadas o el vector de expresión antes mencionado coexistan con un ARN que codifique la proteína para el que se va a incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas. El ARN que codifica la proteína se puede hibridar con el antisentido en la secuencia determinante de la diana de la molécula de ácido nucleico funcional.

En el método de incremento de la eficacia de la síntesis de proteínas de la presente invención, el método puede comprender la etapa de transfectar (o transducir a) una célula cualquiera de las moléculas de ácido nucleico funcionales antes mencionadas o el vector de expresión antes mencionado.

Un método de síntesis de proteínas de acuerdo con la presente invención es un método para sintetizar una proteína, que comprende la etapa de incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas mediante uno cualquiera de los métodos de incremento de la eficacia de la síntesis de proteínas mencionados anteriormente.

Las moléculas de ácido nucleico funcionales de la presente invención se pueden utilizar para tratar una enfermedad, en donde la enfermedad está causada por una disminución cuantitativa de una proteína normal predeterminada o de una haploinsuficiencia, incrementando la eficacia de la síntesis de proteínas.

La enfermedad también puede ser causada por una disminución cuantitativa de una proteína normal predeterminada o una haploinsuficiencia. Además, la molécula de ácido nucleico funcional puede incrementar la eficacia de la síntesis de la proteína normal predeterminada.

Adicionalmente, en caso de que la enfermedad sea causada por una disminución cuantitativa de una proteína normal predeterminada o de una haploinsuficiencia, y causada por un incremento cuantitativo de otra proteína que incluya una proteína anormal similar a una proteína mutante, se pueden usar las moléculas funcionales de ácido nucleico de la presente invención combinadas con una molécula convencional para suprimir la expresión de la otra proteína mediante ARNip, ARNhC o similar, y/o una molécula convencional para inactivar una función de una proteína mediante el uso de un anticuerpo, un compuesto de bajo peso molecular, o similar, según sea apropiado.

Adicionalmente, la enfermedad puede ser una enfermedad neurodegenerativa o un cáncer, por ejemplo.

#### **Efectos ventajosos de la invención**

De acuerdo con la presente invención, es posible proporcionar satisfactoriamente (a) una molécula de ácido nucleico funcional que tiene la función de incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas y (b) un uso de la molécula de ácido nucleico funcional.

5

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

Fig.1

La Fig. 1, relacionada con el experimento 1, es un diagrama esquemático de la organización genómica Uchl1/AS Uchl1. Los exones de Uchl1 están en color negro; las UTR de 3' y 5' están en color blanco.

10 Fig.2

La Fig. 2, relacionada con el experimento 2, es un diagrama esquemático de la organización del dominio AS Uchl1. Los exones de AS Uchl1 están en color gris; los elementos repetitivos están en color rojo (Alu/SINEB1) y azul (SINEB2). Los intrones se indican en forma de líneas.

Fig.3

15 La Fig. 3, relacionada con el experimento 3, es una vista que muestra que AS Uchl1 regula los niveles de proteína UchL1. Las células MN9D transfectadas con AS Uchl1 muestran mayores niveles de proteína UchL1 endógena con respecto al control de vector vacío, con una cantidad de ARNm sin cambios.

Fig.4

20 La Fig. 4, relacionada con el experimento 4, es una vista que muestra que AS Uchl1 regula los niveles de proteína UchL1. Las dosis crecientes de AS Uchl1 transfectadas valoran la cantidad de proteína UchL1 en las células HEK. Sin cambios en los niveles de ARNm de Uchl1.

Fig.5

25 La Fig. 5, relacionada con el experimento 5, es una vista que muestra que AS Uchl1 regula los niveles de proteína UchL1. Se requiere AS Uchl1 de longitud completa (FL) para regular los niveles de proteína UchL1 endógena (células MN9D, panel izquierdo) y expresada en exceso (células HEK, panel derecho). Se muestra el esquema de mutantes de delección Δ5' o Δ3'.

Fig.6

30 La Fig. 6, relacionada con el experimento 6, es una vista que muestra que Uchl1 regula los niveles de proteína UchL1 a través de SINEB2 integrado. SINEB2 invertido es suficiente para controlar los niveles de proteína UchL1. Se muestra el esquema de mutantes.

Fig.7

35 La Fig. 7, relacionada con el experimento 7, es una vista que muestra los transcritos de la familia de AS con SINEB2 integrado. Familia de clones no codificantes FANTOM 3 que son AS para genes que codifican proteínas y contienen SINEB2 integrado en orientación invertida.

Fig.8

40 La Fig. 8, relacionada con el experimento 8, es una vista que muestra los transcritos de la familia de AS con SINEB2 integrado. Diagrama esquemático de la organización genómica Uxt/AS Uxt. AS Uxt incrementa los niveles de proteína Uxt endógena en células MN9D transfectadas (izquierda), sin afectar a su transcripción (derecha).

Fig.9

45 La Fig. 9, relacionada con el experimento 9, es una vista que muestra la expresión de AS Uchl1 en el núcleo de neuronas dopaminérgicas. Los transcritos de AS Uchl1 (rojo) y Uchl1 (verde) se expresan en el núcleo y el citoplasma de las neuronas DA positivas para TH de la Sustancia Negra (azul). Los detalles de la localización están en imágenes de zoom.

Fig.10

50 La Fig. 10, relacionada con el experimento 10, es una vista que muestra la translocación de AS Uchl1 al citoplasma tras el tratamiento con rapamicina en células MN9D. Niveles de ARNm medidos con cebadores que abarcan las porciones 5' solapantes o 3' distales del transcríto. Los datos indican la media ± d.t., n ≥ 3 (3). \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,005.

Fig.11

La Fig. 11, relacionada con el experimento 11, es una vista que muestra que el tratamiento con rapamicina induce la expresión de la proteína UchL1. El nivel de proteína UchL1 se incrementa en las células MN9D tratadas con rapamicina.

5 Fig.12

La Fig. 12, relacionada con el experimento 12, es una vista que muestra cómo SINEB2 integrado en Uchll induce la traducción de Uchll tras el tratamiento con rapamicina. El silenciamiento de la transcripción de AS Uchll en células MN9D (ARNhc, que abarca la posición -15/+4 de la secuencia diana) inhibe el nivel de proteína UchL1 inducida por rapamicina. La secuencia reguladora de ARNhC, desorganizada. A la izquierda, niveles de ARNm; a la derecha, niveles de proteína.

10

Fig.13

La Fig. 13, relacionada con el experimento 13, es una vista que muestra cómo SINEB2 integrado en Uchll induce la traducción de Uchll tras el tratamiento con rapamicina. La delección de SINEB2 integrad ( $\Delta$ SINEB2) es suficiente para inhibir la regulación por incremento de la proteína UchL1 inducida por rapamicina.

15 Fig.14

La Fig. 14, relacionada con el experimento 14, es una vista que muestra que un transcripto de AS artificial con SINEB2 integrado (AS Gfp) para un ARNm de Proteína Fluorescente Verde (Gfp) mejorada humanizada artificialmente incrementa la síntesis de proteína GFP: (a) de la Fig. 14 muestra el diagrama esquemático de las construcciones de Gfp/AS Gfp, (b) de la Fig. 14 muestra cómo AS Gfp aumenta los niveles de proteína Gfp en células HEK transfectadas mientras que una secuencia solapante desorganizada o un plásmido vacío no aumentan los niveles de proteína Gfp en células HEK transfectadas. El solapamiento tiene una longitud de 72 nt y está centrado en el ATG.

20 Fig.15

La Fig. 15, relacionada con el experimento 15, es una vista que muestra un transcripto de AS artificial con SINEB2 integrado (clon de AS Fc) para un anticuerpo recombinante artificial en pHYGRO (clones de pHYGRO) que incrementa la síntesis de la proteína codificada en pHYGRO. a, Diagrama esquemático de construcciones pHYGRO/AS Fc. b, AS Fc incrementa los niveles de proteína codificada en las células HEK transfectadas, mientras que una secuencia solapante desorganizada o un plásmido vacío no lo hacen, detectado a través de la etiqueta SV5.

25 Fig.16

La Fig. 16, relacionada con el experimento 16, es una vista que muestra cómo un transcripto de AS artificial con SINEB2 integrado para un ARNm de Proteína Fluorescente Verde (EGFP) incrementa la síntesis de la proteína EGFP.

30 Fig.17

La Fig. 17 es una vista que muestra los ejemplos de las posibles estructuras pronosticadas de la secuencia obtenida de SINE B2.

### **Descripción de realizaciones**

35 A continuación se describe una realización de la presente invención, más específicamente.

#### **[1. Molécula de ARN funcional]**

##### **(Constitución de la molécula de ácido nucleico funcional)**

Una molécula de ácido nucleico funcional de acuerdo con la presente invención tiene una característica que comprende: una secuencia determinante de la diana que comprende una secuencia antisentido para una secuencia diana en el ARN que codifica la proteína para el cual se va a incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas; y una secuencia reguladora que tiene la actividad de incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas. La molécula de ácido nucleico funcional de acuerdo con la presente invención puede ser diseñada y producida apropiadamente por un experto en la técnica relacionada basándose en la descripción de la presente memoria.

40 La eficacia de la síntesis de proteínas se incrementa de acuerdo con la presente invención. En una realización, la eficacia de la síntesis de proteínas se incrementa como resultado del incremento de la eficacia de la traducción, preferiblemente, sin cambiar sustancialmente la eficacia de la transcripción. Por tanto, la eficacia de la síntesis de proteínas se puede incrementar aumentando la eficacia de la traducción. En otra realización, tanto la transcripción como la traducción se pueden incrementar por medios independientes; obviamente, puede darse el caso de que un ARN produzca un nivel de expresión más bajo y, sin embargo, la proteína produzca un nivel de expresión más alto.

**(ARN que codifica la proteína para el que se va a incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas)**

El ARN que codifica la proteína para el que se va a incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas por medio de la molécula de ácido nucleico funcional de acuerdo con la presente invención no está especialmente limitado con respecto a su secuencia, origen y similares, siempre que el ARN comprenda un dominio de traducción (región codificante) que tenga un codón de inicio 5' terminal y un codón de terminación 3' terminal. Específicamente, el ARN que codifica la proteína para el cual se va a incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas (el ARN diana) por medio de la molécula de ácido nucleico funcional de acuerdo con la presente invención puede tener adicionalmente una estructura de protección terminal 5', una región 5' no traducida (5'-UTR) y/o una 3' región no traducida. Estas regiones se pueden obtener de una secuencia endógena en una célula o de una secuencia sintetizada artificialmente.

El ORFoma, en el que se colocan Marcos de Lectura Abiertos (secuencias codificantes) de genes en vectores de expresión, es uno de los ejemplos.

Adicionalmente, es preferible que la región 3' no traducida incluya, en su extremo terminal 3', una secuencia (señal de adición de poliA) de modo que se pueda añadir una secuencia de poliA. La señal de adición de poliA puede ser, por ejemplo, una secuencia de nucleótidos que consiste en AAUAAA, una señal de poliA temprana de SV40 que tiene dos secuencias de AAUAAA, una secuencia en la que las señales de poliA tempranas de SV40 se alinean en tandem, o similares. La señal de adición de poliA no se limita a ellas. Como ejemplos, se han descrito en la bibliografía varios sitios alternativos de poliadensilación, y algunos ARNm ni siquiera llevan señales de poliadensilación convencionales (Carninci et al., Genome Res. Junio 2003; 13(6B): 1273-89. PMID: 12819125).

El ARN que codifica la proteína para el que se va a incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas de acuerdo con la presente invención puede tener una secuencia de poliA en su extremo 3' terminal. Un ARN que tiene una secuencia de poliA en su extremo 3' terminal tiene una excelente eficacia de síntesis de proteínas a partir de un dominio de traducción y una excelente estabilidad del propio ARN. Tal ARN puede ser, por ejemplo, uno cualquiera de los ARN mostrados en Uchl1, Uxt, GFP o un homólogo de uno cualquiera de estos ARN, aunque tal ARN no se limita a ellos.

Ubiquitina hidrolasa carboxi-terminal L1 (Uchl1) de *Mus musculus* RefSeq: NM\_011670.2

La secuencia de ADN de Uchl1 que codifica el ARN de Uchl1 se muestra en SEQ ID NO: 4.

Transcrito expresado ubicuamente de *Mus musculus* (Uxt) RefSeq: NM\_013840.3

La secuencia de ADN de Uxt que codifica el ARN de Uxt se muestra en SEQ ID NO: 5.

GFP (secuencia del vector pEGFP)

La secuencia de ADN de GFP que codifica la secuencia de ARN de GFP se muestra en SEQ ID NO: 6.

El ARN que codifica la proteína para el que se va a incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas puede ser ARN endógeno de origen biológico (por ejemplo, ARNm) o sintetizado artificialmente. Adicionalmente, el ARNm obtenido de eucariotas abarca ARNm maduro que se ha sometido a lo que se denomina procesamiento y ARNm precursor que no se ha sometido a procesamiento.

**(Secuencia determinante de la diana)**

La secuencia determinante de la diana es una secuencia que comprende una secuencia antisentido para una secuencia diana en el ARN que codifica la proteína para el que se va a incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas. Una secuencia diana se selecciona arbitrariamente de una secuencia parcial de ARN que codifica una proteína para el cual se va a incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas en la presente invención. Una secuencia diana se puede obtener de la secuencia de ARN transcrita a partir del ADN plasmídico en el que se inserta el ADNc que codifica la proteína y alrededor del primer codón de inicio 5' terminal. La longitud de la secuencia antisentido no está especialmente limitada. Sin embargo, desde el punto de vista del incremento de la especificidad para un ARN diana en un sistema que incluye diferentes ARN, la secuencia antisentido puede tener una longitud de preferiblemente más de 7 nucleótidos, más preferiblemente 10, más preferiblemente 15. Además, la secuencia antisentido puede tener una longitud de preferiblemente menos de 250 nucleótidos, más preferiblemente 200, más preferiblemente 150, más preferiblemente 100, más preferiblemente 90, más preferiblemente 80, más preferiblemente 77 nucleótidos, más preferiblemente 70 nucleótidos, más preferiblemente 60 nucleótidos, más preferiblemente 50 nucleótidos, más preferiblemente 40 nucleótidos, más preferiblemente 30 nucleótidos.

En una realización, se puede incluir más de una secuencia antisentido diferente en la secuencia determinante de la diana. Estas múltiples secuencias antisentido se pueden aplicar al direccionamiento de múltiples proteínas, por ejemplo. Alternativamente, las múltiples secuencias antisentido se pueden aplicar para mejorar la especificidad para un ARN que codifica una proteína en donde las múltiples secuencias antisentido se pueden hibridar con el mismo ARN que codifica una proteína. En una realización, la secuencia determinante de la diana de la presente invención puede contener emparejamientos erróneos contra el ARN diana con el propósito de prevenir la reacción del interferón gamma que puede tener lugar en las células en presencia de una molécula de ácido nucleico de doble hebra larga, como los ARN de doble hebra largos.

Adicionalmente, desde el punto de vista del incremento de la especificidad entre la molécula de ácido nucleico funcional de la presente invención y el ARN diana, la secuencia antisentido en una secuencia determinante de la diana se diseña para que tenga preferiblemente al menos un 60% de similitud, más preferiblemente al menos 65% de similitud, más preferiblemente al menos 70% de similitud, más preferiblemente al menos 75% de similitud, más preferiblemente al menos 80% de similitud, más preferiblemente al menos 85% de similitud, más preferiblemente al menos 90% de similitud, más preferiblemente al menos 95% de similitud con una secuencia diana correspondiente en el ARN que codifica la proteína para el que se va a incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas, siempre que la secuencia antisentido pueda hibridar con la secuencia diana en el ARN que codifica la proteína y/o el ARN obtenido del plásmido que contiene la secuencia diana. Es específicamente preferible que la secuencia antisentido en la secuencia determinante de la diana se diseñe para que sea completamente idéntica a la secuencia correspondiente de la secuencia diana.

Adicionalmente, se puede diseñar una secuencia antisentido en una secuencia determinante de la diana para que hibride con una 5' UTR del ARN que codifica la proteína para el que se va a incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas. Este diseño se puede aplicar a la proteína codificada de longitud completa que se esté sintetizando. La 5' UTR se puede obtener de una secuencia endógena en una célula o secuencia artificial. La secuencia antisentido en la secuencia determinante de la diana se puede diseñar para que se pueda hibridar con otras regiones, excepto la 5' UTR, del ARN diana, tal como una región codificante del ARN diana. Por ejemplo, la secuencia antisentido en la secuencia determinante de la diana se puede diseñar para que se pueda hibridar con una parte determinada de la región codificante del ARN diana. Este diseño es útil para un gen de distrofina o similar en el que una proteína que va a ser codificada por un ARN es muy grande y tiene un dominio que muestra bioactividad por sí mismo.

Además, la secuencia antisentido en la secuencia determinante de la diana se puede diseñar para que hibride tanto con la UTR 5' como con una parte de la otra parte funcional de la secuencia, como la secuencia codificante o las UTR 3' de los ARNm que codifican la proteína.

#### **(Secuencia reguladora)**

En la molécula de ácido nucleico funcional de acuerdo con la presente invención, la secuencia reguladora tiene una actividad de incremento de la eficacia de la síntesis de proteínas.

En una realización, se pueden incluir múltiples secuencias SINE en la secuencia reguladora. Estas múltiples secuencias SINE pueden ser una combinación de diferentes secuencias, por ejemplo, una combinación de la secuencia SINE B2 y la secuencia obtenida de Alu o una combinación de diferentes secuencias obtenidas de SINE B2.

Los ejemplos de las posibles estructuras pronosticadas de las secuencias SINE B2 se muestran en los apartados (a) y (b) de la Fig. 17.

La secuencia similar indica una secuencia que tiene al menos 25% de similitud, preferiblemente al menos 50% de similitud, más preferiblemente al menos 55% de similitud, más preferiblemente al menos 60% de similitud, más preferiblemente al menos 65% de similitud, más preferiblemente al menos 70% de similitud, más preferiblemente al menos 75% de similitud, más preferiblemente al menos 80% de similitud, más preferiblemente al menos 85% de similitud, más preferiblemente al menos 90% de similitud, más preferiblemente al menos 95% de similitud con la secuencia consenso del SINE.

La secuencia de un SINE puede desviarse de estos consensos conservativos descritos anteriormente. Por ejemplo, el análisis de la similitud de consenso entre las secuencias SINE B2 de tres secuencias solas, la fracción SINE B2 de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, y otro SINE B2 tomado aleatoriamente de la bibliografía (referencia: Espinosa et al., <http://rnajournal.cshlp.org/content/13/4/583.full>), indica claramente que las fracciones de SINE B2 por sí solas pueden compartir tan poco como 9 bases de 36, con solo 25% de similitud.

Sin embargo, a pesar de diverger, éstas todavía son reconocibles como un elemento SINE B2 utilizando programas como RepeatMasker tal como se publicó (Bioinformatics. Noviembre de 2000; 16(11):1040-1. MaskerAid: a performance enhancement to RepeatMasker. Bedel JA, Korf I, Gish W.).

En una realización, la longitud se puede limitar a las secuencias más cortas con similitud con los elementos SINE, que son capaces de provocar un aumento de la eficacia de la síntesis de proteínas.

En una realización, es posible sintetizar secuencias de ácidos nucleicos artificiales que tienen similitud parcial con los elementos SINE descritos en la presente invención y actúan para incrementar el nivel de la proteína sintetizada.

Adicionalmente, la molécula de ácido nucleico funcional según la presente invención puede incluir una pluralidad de secuencias reguladoras alineadas en tandem, con el fin de promover aún más la eficacia de la síntesis de proteínas.

En la descripción de la presente invención, "SINE" indica ampliamente, entre el retrotransposón distinto de LTR (replicación terminal larga), una secuencia repetitiva intercalada (a) que codifica una proteína que no tiene actividad de transcripción inversa ni actividad endonucleasa o similar y (b) cuyas secuencias de copias completas o incompletas

existen abundantemente en genomas de organismos vivos. Es decir, SINE es una secuencia de ADN que se inserta en un genoma a través de la transcripción inversa de ARN a ADNc, dependiendo de otros factores del anfitrión en estos procesos. La longitud del SINE no está especialmente limitada, pero generalmente, se encuentra en un intervalo de no menos de 20 pb, preferiblemente no menos de 30 pb, más preferiblemente no menos de 50 pb, más preferiblemente no menos de 50 pb, pero no más de 700 pb, preferiblemente no más de 600 pb, más preferiblemente no más de 500 pb, más preferiblemente no más de 400 pb. Adicionalmente, el origen de SINE no está limitado, sino que generalmente se obtiene de ARNt y tiene una secuencia que tiene una secuencia correspondiente al ARNt en su lado 5'-terminal. Adicionalmente, el SINE puede ser una secuencia obtenida del ARN 7SL, tal como Alu, y una secuencia obtenida del ARNr 5S, tal como SINE 3. Con respecto al SINE 3, se puede hacer referencia al documento de Kapitonov et al. (Vladimir V. Kapitonov y Jerzy Jurka: Molecular Biology AND Evolution 20(5):p694-702, 2003) y documentos similares.

La secuencia reguladora se puede seleccionar, por ejemplo, entre las siguientes (1) a (5):

- (1) un ARN, que está codificado por un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 1
- (2) un ARN, que está codificado por un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 2
- (3) un ARN, que está codificado por un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 3
- (4) un ARN codificado por un ADN que consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias mostradas en la Tabla 1; o
- (5) un ARN que es al menos 95% similar al ARN de (1), (2), (3) o (4) y tiene la función de incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas.

El número de nucleótidos que se va a eliminar, sustituir, añadir y/o insertar es preferiblemente no menos de 1 pero no más de 175, más preferiblemente no menos de 1 pero no más de 150, más preferiblemente no menos de 1 pero no más de 125, más preferiblemente no menos de 1 pero no más de 100, más preferiblemente no menos de 1 pero no más de 75, más preferiblemente no menos de 1 pero no más de 50, más preferiblemente no menos de 1 pero no más de 30, más preferiblemente no menos de 1 pero no más de 20.

#### **25 (Relación posicional entre la secuencia determinante de la diana y la secuencia reguladora)**

En la presente invención, una dirección (una dirección de hebra efectora) a lo largo de la cual se traduce una proteína diana se define como "dirección de avance", y la dirección opuesta a la dirección de avance se define como "dirección inversa". En la molécula de ácido nucleico funcional según la presente invención, la relación posicional entre la secuencia determinante de la diana y la secuencia reguladora no está especialmente limitada. Sin embargo, es preferible que la secuencia determinante de la diana se ubique más cerca de un lado en la dirección de avance en la molécula de ácido nucleico funcional que la secuencia reguladora. La secuencia determinante de la diana puede estar vinculada directamente a la secuencia reguladora. Alternativamente, se puede insertar entre ellas una secuencia conectora y/o una secuencia similar para conectar la secuencia determinante de la diana y la secuencia reguladora.

En la molécula de ácido nucleico funcional de acuerdo con la presente invención, es preferible que la dirección de la secuencia SINE, que está anotada como de avance en la secuencia reguladora, esté orientada en una dirección inversa con respecto a esa dirección (dirección de avance como se define anteriormente), en donde la secuencia SINE está orientada en la misma dirección que la secuencia consenso de SINE. Es decir, la secuencia reguladora de la molécula de ácido nucleico funcional está orientada en una orientación de avance con respecto a la dirección de traducción.

Si la dirección de 5' a 3' se define como la dirección de avance, la secuencia SINE en esta invención, en donde su orientación 5' a 3' concuerda con la secuencia consenso de SINE, está integrada en la dirección inversa de la molécula de ácido nucleico funcional en esta invención. Por ejemplo, en el caso de una secuencia de SINE B2, el sitio Abox de la secuencia obtenida de SINE B2 está ubicado en el lado 3' de la molécula de ácido nucleico funcional en comparación con el sitio Bbox de la secuencia SINE B2.

#### **45 (Producción de molécula de ácido nucleico funcional)**

Un método de acuerdo con la presente invención para producir una molécula de ácido nucleico funcional comprende la etapa de preparar la molécula de ARN mencionada anteriormente. Las moléculas de ácido nucleico funcionales se pueden preparar mediante un método de biosíntesis de ácido nucleico bien conocido, o un método tal que (i) se produzca una molécula de ADN que codifique la molécula de ARN funcional y (ii) la molécula de ADN se transcriba a la molécula de ARN funcional, por ejemplo. El tamaño de la molécula de ácido nucleico funcional no está especialmente limitado, pero la molécula de ácido nucleico funcional tiene un tamaño preferiblemente no mayor de 2000 nucleótidos, más preferiblemente no mayor de 250 nucleótidos, por ejemplo, desde el punto de vista de la producción de la molécula de ácido nucleico funcional por medio del método de biosíntesis de ácidos nucleicos.

**[2. Molécula de ADN, vector de expresión, composición para incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas]**

Una molécula de ADN de acuerdo con la presente invención codifica cualquiera de las moléculas de ácido nucleico funcionales mencionadas anteriormente de acuerdo con la presente invención. Adicionalmente, un vector de expresión de acuerdo con la presente invención es un vector de ARN que comprende una cualquiera de las moléculas de ARN funcionales de la presente invención mencionadas anteriormente o un vector de ADN que comprende la molécula de ADN de acuerdo con la presente invención. Adicionalmente, una composición para aumentar la eficacia de la síntesis de proteínas de acuerdo con la presente invención comprende una cualquiera de las moléculas de ácido nucleico funcionales antes mencionadas o el vector de expresión antes mencionado.

En una realización, la composición de acuerdo con la presente invención puede comprender un agente de traducción basado en un sistema *in vitro* como extracto de reticulocitos para producir proteína *in vitro*; o para producir proteína *in vivo* en células de mamífero que expresan una proteína para uso industrial, con fines de investigación o para cualquier otro escrutinio, por ejemplo.

El esqueleto del vector de expresión de acuerdo con la presente invención no se limita especialmente a ningún tipo particular, y se puede seleccionar apropiadamente de un vector plasmídico. El vector plasmídico puede ser un vector de expresión de mamífero, levadura, insecto, un vector de virus (por ejemplo, un vector de expresión lentiviral o retroviral, vectores de adenovirus o virus adenoasociado), un vector de fago, un vector de cósmido y similares, dependiendo de tipos de células anfitrionas que se utilizarán y de la finalidad del uso. Por ejemplo, en el caso en el que la presente invención se utiliza para el tratamiento génico de mamíferos, incluido un ser humano, la presente invención se puede preparar en forma de un vector de virus, tal como un vector de adenovirus o adenoasociado o un vector de lentivirus.

Alternativamente, el vector de expresión puede finalmente integrarse en el genoma de las células de expresión u organismo al que se dirigirá.

**[3. Método para incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas]****(Método para incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas)**

Un método para incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas de acuerdo con la presente invención comprende la etapa de permitir que una molécula de ácido nucleico funcional de acuerdo con la presente invención o el vector de expresión mencionado anteriormente coexistan con un ARN que codifica proteínas para las que se va a incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas. Esta etapa se puede llevar a cabo *in vivo* o *in vitro* utilizando, por ejemplo, un sistema de síntesis de proteínas sin células. En la presente invención, "*in vivo*" significa un sistema que utiliza un cultivo celular o un animal completo específicamente, e "*in vitro*" significa un sistema que utiliza un ensayo sin células específicamente. En caso de que la etapa se lleve a cabo *in vivo*, se puede permitir que la molécula de ácido nucleico funcional o el vector de expresión mencionado anteriormente coexistan, en una célula o tejido aislados, con un ARN que codifica una proteína para el que se va a incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas. Alternativamente, se puede permitir que la molécula de ácido nucleico funcional o el vector de expresión mencionado anteriormente coexistan, en un organismo vivo, con un ARN para el que se va a incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas.

El método para incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas de acuerdo con la presente invención puede comprender transfectar a una célula un vector de expresión mencionado anteriormente que codifica la molécula de ácido nucleico funcional o la propia molécula de ácido nucleico funcional para permitir que la molécula de ácido nucleico funcional coexista con el ARN que codifica la proteína. La "célula" indica no solo una célula aislada sino también las que constituyen un individuo. El ARN para el que se va a incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas se puede obtener de una secuencia endógena en una célula o un ARN que codifica una proteína sintetizada artificialmente. La transfección (o inducción génica) de una molécula de ácido nucleico en una célula se puede llevar a cabo de manera apropiada mediante métodos convencionales, por ejemplo, autoinfección por un vector, una técnica de microinyección, una técnica de lipofección, una técnica de electroporación, un método de fosfato de calcio, transducción de un virus y similares. El vector puede estar integrado o no permanentemente en el genoma del anfitrión.

Las células se pueden obtener de una cualquiera de las células de cualquier organismo, incluidos animales y plantas, o una cualquiera de las células seleccionadas de las líneas celulares establecidas.

En la presente invención, los animales incluyen vertebrados, preferiblemente mamíferos, incluido un ser humano, pero no se limitan a estos ejemplos.

En la presente invención, las plantas incluyen tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas. En una realización, las plantas son plantas de cultivo (por ejemplo, cereales y leguminosas, maíz, trigo, patatas, tapioca, arroz, sorgo, mijo, mandioca, cebada o guisantes) u otras legumbres. En otra realización, las plantas pueden ser hortalizas o plantas ornamentales. Las plantas de la invención pueden ser: maíz (*Zea mays*), canola (*Brassica napus*, *Brassica rapa* spp.), Lino (*Linum usitatissimum*), alfalfa (*Medicago sativa*), arroz (*Oryza sativa*), centeno (*Secale cereale*), sorgo (*Sorghum bicolor*, *Sorghum vulgare*), girasol (*Helianthus annus*), trigo (*Triticum aestivum*), soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), patata, (*Solanum tuberosum*), cacahuetes (*Arachis hypogaea*), algodón (*Gossypium hirsutum*), batata (*Lopmoea batatas*), mandioca (*Manihot esculenta*), café (*Coffea spp.*), coco (*Cocos nucifera*), piña (*Anana comosus*),

árboles cítricos (*Citrus spp.*), cacao (*Theobroma cacao*), té (*Camellia sinensis*), plátano (*Musa spp.*), aguacate (*Persea americana*), higo (*Ficus carica*), guayaba (*Psidium guajava*), mango (*Mangifer indica*), olivo (*Olea europaea*), papaya (*Carica papaya*), anacardo (*Anacardium occidentale*), macadamia (*Macadamia integrifolia*), almendra (*Prunus amygdalus*), remolacha azucarera (*Beta vulgaris*), avena o cebada, pero no se limitan a estos ejemplos.

- 5 En la presente invención, las líneas celulares establecidas que incluyen células derivadas de mamíferos tales como COS-1 (ATCC Núm. CRL 1650), COS-7 (ATCC CRL 1651), línea de riñón embrionario humano 293 (ATCC Núm. CRL 1573), PerC6 (Crucell), células de riñón de cría de hámster (BHK) (ATCC CRL.1632), BHK570 (ATCC Núm. CRL 10314), células de ovario de hámster chino CHO (p. ej., CHO-K1, ATCC Núm: CCL 61, línea de células CHO DHFR menos tal como DG44, particularmente aquellas líneas celulares CHO adaptadas para cultivo en suspensión, células de Sertoli de ratón, células de riñón de mono, células de riñón de mono verde africano (ATCC CRL-1587), células HeLa, células SH-Y5Y, células de riñón canino (ATCC CCL 34), células pulmonares humanas (ATCC CCL 75), células Hep G2 y de mieloma o linfoma, p. ej., NSO (véase el documento US 5.807.715), Sp2/0, YO, otras células obtenidas de animales tales como las células Sf9, DT40, pero no se limitan a estos ejemplos. Además, las líneas celulares establecidas pueden ser hibridomas o una célula a la que se le ha dotado de una característica concreta mediante transferencia génica, transferencia nuclear y/o tratamiento de un compuesto químico, por ejemplo, una célula madre embrionaria de transferencia nuclear o una célula iPS (documentos WO2007/069666, JP-A 2010-273680, JP-A 2010-284088, JP-A 2011-50379, JP-A 2011-4674, etc.), una célula neuronal diferenciada a partir de una célula madre neural, una célula iPS o similar, o células neuronales obtenidas de fibroblastos reprogramados o similares, pero no se limitan a estos ejemplos.
- 10
- 15
- 20 El método de incremento de la eficacia de la síntesis de proteínas de acuerdo con la presente invención contribuye de manera óptima a incrementar la eficacia de la traducción del ARN. El incremento de la eficacia de la síntesis de proteínas indica que la eficacia de la síntesis de proteínas se incrementa en comparación con un caso en el que no se permite que la molécula de ácido nucleico funcional de acuerdo con la presente invención o el vector de expresión mencionado anteriormente coexistan con el ARN diana en un sistema. No se limita especialmente en qué medida se incrementará la eficacia de la síntesis de proteínas. Sin embargo, es preferible que la cantidad de una proteína que se vaya a sintetizar mediante el método de incremento de la eficacia de la síntesis de proteínas sea al menos 1,5 veces, más preferiblemente al menos 2 veces más que la cantidad de una proteína que se va a producir en el caso en el que no se permita que la molécula de ARN funcional coexista con el ARN diana en el sistema.
- 25
- 30 En un caso en el que se permite que la molécula de ácido nucleico funcional o el vector de expresión mencionado anteriormente coexistan con el ARN diana en el sistema, la razón cuantitativa entre la molécula de ácido nucleico funcional (o el vector de expresión) y el ARN diana no está especialmente limitada. La razón cuantitativa entre ellos puede ser, por ejemplo, de 1:1 a 1:10.

#### **(Método para sintetizar proteínas)**

- 35 El método de incremento de la eficacia de la síntesis de proteínas mencionado anteriormente de acuerdo con la presente invención se puede utilizar como un método de síntesis de proteínas. Es decir, un método de síntesis de proteínas de acuerdo con la presente invención es un método para producir una proteína diana, que comprende la etapa de incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas mediante cualquiera de los métodos de incremento de la eficacia de la síntesis de proteínas mencionados anteriormente. Es preferible que el método de síntesis de proteínas permita la síntesis eficaz de la proteína diana mediante el incremento de la eficacia de la traducción de la proteína a partir del ARN diana.
- 40

- 45 En el método de síntesis de proteínas de la presente invención, un ejemplo de la proteína que se va a sintetizar es un anticuerpo, en particular que sintetiza una cadena ligera o pesada o ambas, del anticuerpo o de la versión recombinante de cadena sencilla de un anticuerpo. La síntesis del anticuerpo se lleva a cabo preferiblemente en un sistema *in vitro* o en un sistema celular aislado de manera que se pueda permitir que una molécula de ácido nucleico funcional de acuerdo con la presente invención o el vector de expresión mencionado anteriormente coexistan, en el sistema, con un ARN diana para el que se va a incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas.

#### **(Método para tratar enfermedades)**

- 50 La molécula de ácido nucleico funcional de acuerdo con la presente invención se puede utilizar para el tratamiento de una enfermedad causada por una disminución cuantitativa de una proteína normal predeterminada, por ejemplo. La enfermedad no está especialmente limitada, pero puede ser, por ejemplo; miodegeneración tal como distrofia muscular; enfermedad neurodegenerativa tal como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica y las enfermedades de repetición de tripletes tanto a nivel de codificación de proteínas (es decir, enfermedad de Huntington) como a nivel de ADN/ARN (es decir, X Frágil).
- 55

- Además, también se puede aplicar la presente invención a un tumor mediante el incremento de la expresión de una proteína proapoptótica o una proteína supresora de tumores para el tratamiento de tumores como, por ejemplo, para los miembros de la familia p53.

Tal tumor, incluido un cáncer, puede ser uno cualquiera de los tumores que incluyen, sin limitación, carcinoma, melanoma y sarcoma, carcinoma de vejiga, tumor cerebral, tumor de mama, tumor cervical, tumor colorrectal, tumor

esofágico, tumor endometrial, carcinoma hepatocelular, tumor del estroma gastrointestinal, tumor de laringe, tumor de pulmón, osteosarcoma, tumor de ovario, tumor de páncreas, tumor de próstata, carcinoma de células renales, tumor de piel o tumor de tiroides.

- 5 Para obtener el incremento de la eficacia de la síntesis de proteínas, se permite que la molécula de ácido nucleico funcional de acuerdo con la presente invención o el vector de expresión antes mencionado coexistan, en el organismo de un sujeto, con un ARN diana. La propia molécula de ácido nucleico funcional o un vector de expresión mencionado anteriormente se transfecan a una célula del sujeto. El ARN diana puede ser un ARN endógeno (ARNm o similar) en la célula del sujeto o ARN sintetizado artificialmente. Alternativamente, el ARN diana o una molécula de ADN que codifica el ARN se pueden transfecar a la célula del sujeto.
- 10 Adicionalmente, la molécula de ácido nucleico funcional de acuerdo con la presente invención es aplicable al tratamiento de una enfermedad mediante la amplificación en el organismo de un sujeto de un factor proteico (p. ej., interferón, un factor inductor de apoptosis o similar) que mejora la enfermedad. Por ejemplo, un factor inductor de apoptosis amplificado de acuerdo con la presente invención se puede utilizar eficazmente para el tratamiento de tumores o similares.
- 15 Cuando se permite que la molécula de ácido nucleico funcional de acuerdo con la presente invención o el vector de expresión mencionado anteriormente coexistan con un ARN diana que codifica una proteína que mejora una enfermedad en el organismo de un sujeto, el ARN diana hibrida con el antisentido en la secuencia determinante de la diana de la molécula de ácido nucleico funcional. La propia molécula de ácido nucleico funcional o el vector de expresión mencionado anteriormente se transfecan a una célula del sujeto. El ARN que codifica la proteína que mejora la enfermedad puede ser un ARN endógeno en la célula del sujeto. Alternativamente, el ARN que codifica la proteína que mejora la enfermedad o una molécula de ADN que codifica el ARN se pueden transfecar a la célula del sujeto.
- 20 La molécula de ácido nucleico funcional se puede utilizar como un pretratamiento para una célula aislada que va a ser trasplantada al organismo del sujeto. La célula se puede aislar del organismo del sujeto antes del tratamiento y el trasplante. Se puede permitir que la molécula de ácido nucleico funcional de acuerdo con la presente invención coexista en una célula aislada con un ARN diana; y a continuación la célula puede trasplantarse al organismo de un sujeto. Una célula aislada puede ser una célula que tiene capacidad de diferenciación, por ejemplo, una célula madre embrionaria (célula ES), una célula germinal embrionaria (célula EG), una célula madre somática, especialmente una célula progenitora adulta multipotente, una célula madre, una célula madre hematopoyética, una célula madre endotelial vascular, una célula madre mesenquimatosa, una célula madre hepática, una célula madre neural, una célula madre endotelial, una célula madre pancreática, una célula germinal primordial o una célula de diferenciación multilinaje como una célula Muse (Kuroda et al., 2010, PNAS). Además, una célula aislada puede ser también una célula artificial indiferenciada, por ejemplo, una célula madre embrionaria de transferencia nuclear o una célula que adquiere la capacidad pluripotente mediante transferencia génica y/o tratamiento con un compuesto químico, como una célula madre pluripotente inducida (célula iPS (documentos WO2007/069666, JP-A 2010-273680, JP-A 2010-284088, JP-A 2011-50379, JP-A 2011-4674, etc.)). Adicionalmente, una célula aislada también puede ser un fibroblasto o una célula somática adulta que adquirió la capacidad de convertirse en otra célula somática tras la reprogramación. Además, después de la etapa (a) pero antes de la etapa (b), la célula aislada se puede cultivar indiferenciada. Alternativamente, después de la etapa (a) pero antes de la etapa (b), la célula aislada se puede diferenciar para obtener una célula diferenciada o un grupo de células diferenciadas (lámina de células o similar), y la célula diferenciada o el grupo de células diferenciadas se pueden trasplantar al organismo.

- 40 El sujeto indica animales, en donde los animales incluyen un ser humano, preferiblemente mamíferos, incluido un ser humano, más preferiblemente un ser humano. Adicionalmente, el sujeto incluye generalmente (a) uno que ya ha mostrado los síntomas de una enfermedad y (b) uno que tiene una causa predisponente genética pero que todavía no ha mostrado los síntomas de una enfermedad. En vista de esto, el concepto de "tratamiento" en la presente invención incluye el tratamiento terapéutico y el tratamiento preventivo de una enfermedad.

#### **[Ejemplo]**

La presente invención se describirá a continuación más específicamente basándose en Ejemplos, Ejemplos Comparativos y similares. Transcripción antisentido en el locus sintético PARK5/Uchl1.

- 50 El clon Rik6430596G22 de FANTOM2 se identificó como un supuesto ARN no codificante AntiSentido (AS) empalmado (ARNnc9 del gen 7 de la ubiquitina hidrolasa carboxi terminal 1 (UCHL1) (Experimento 1). Uchl1 es una proteína restringida a neuronas que actúa como enzima desubiquitinante, ubiquitina ligasa o estabilizador de monoubiquitina (Referencia 1; Liu, Y., Fallon, L., Lashuel, H.A., Liu, Z. y Lansbury, P.T., Jr. The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. Cell 111, 209-218 (2002). Referencia 2; Osaka, H., et al. Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. Hum Mol Genet 12, 1945-1958 (2003)). Está mutada en una forma autosómica dominante de PD (PARK5) (Referencia 3; Leroy, E. et al. The ubiquitin pathway in Parkinson's disease. Nature 395, 451-452 (1998)). En la sustancia negra (SN) de cerebros post-mortem esporádicos, la expresión de Uchl1 se encontró reducida y correlacionada con la formación de agregados de aSYN. La pérdida de actividad de Uchl1 también se ha asociado con la demencia con cuerpos de Lewy (DCL) y la enfermedad de Alzheimer (EA). El aumento de la expresión de Uchl1

se ha propuesto como estrategia terapéutica para la EA ya que su expresión ectópica rescató la pérdida inducida por beta-amiloide de la función sináptica y la memoria contextual en un modelo de ratón (Referencia 1, Referencia 4; Butterfield, D.A. et al. Redox proteomics identification of oxidatively modified hippocampal proteins in mild cognitive impairment: Insights into the development of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 22, 223-232 (2006)., Referencia 5;

- 5 Castegna, A., et al. Proteomic identification of oxidatively modified proteins in Alzheimer's disease brain. Parte II: dihydropirimidinase-related protein 2, alpha-enolase and heat shock cognate 71. *J Neurochem* 82, 1524-1532 (2002). Referencia 6; Choi, J. et al. Oxidative modifications and down-regulation of ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 associated with idiopathic and Alzheimer's diseases. *J Biol Chem* 279, 13256-13264 (2004)).

Rik6430596G22 es un transcripto de cabeza a cabeza en 5' típico que se inicia dentro del segundo intrón de Uchl1 y se solapa con los primeros 72 nt del ARNm efector (S), incluido el codón AUG (Experimento 1). La parte no solapante del transcripto también contiene dos secuencias repetitivas integradas, SINEB2 y Alu, identificadas por Repeatmasker. El clon de ADNc de FANTOM2 abarca una región genómica de 70 kb y es un transcripto empalmado compuesto por cuatro exones cuyas uniones de intrones siguen la regla tradicional de GT-AG (Experimento 2). En la parte restante de la divulgación, se hace referencia a Rik6430596G22 como un transcripto antisentido natural para Uchl1 (AS Uchl1).

- 10 15 AS Uchl1 incrementa los niveles de proteína Uchl1 con un mecanismo que requiere una repetición SINEB2 invertida integrada.

Después se examinó la interacción entre los transcriptos S y AS. Después de clonar el ADNc de longitud completa para AS Uchl1 a partir de células MN9D con amplificación rápida 5' de los extremos del ADNc (RACE), se expresó en exceso transitoriamente un AS Uchl1 impulsado por CMV en células dopaminérgicas MN9D y los niveles de proteína y ARNm de Uchl1 endógenos se controlaron mediante qRT-PCR y transferencia Western. Aunque no se observó ningún cambio significativo en los niveles endógenos de ARNm de Uchl1, se detectó una regulación por incremento fuerte y reproducible del producto proteico Uchl1 en 24 horas (Experimento 3). Los autores de la presente invención sometieron a prueba si la cotransfección de ambos ADNc en células HEK que no expresaban ninguno de los transcriptos podría recapitular lo que se observó en las células MN9D. Cuando se cotransfectaron cantidades crecientes de AS Uchl1 con Uchl1 murino, se registró una regulación por incremento de la proteína Uchl1 dependiente de la dosis en ausencia de cualquier cambio significativo en el nivel de ARNm de Uchl1 exógeno (Experimento 4). Este efecto específico no se observó para controles no relacionados tales como GFP. Para identificar secuencias y/o elementos estructurales del ARNm de AS Uchl1 que provocan su actividad funcional sobre la proteína Uchl1, se produjeron y sometieron a prueba mutantes por delección en células MN9D, así como en la cotransfección en células HEK. Las construcciones de delección de AS Uchl1 que carecían del primer exón 5' (AS Uchl1 Δ 5'), o los últimos tres exones (AS Uchl1 Δ 3') no lograron inducir los niveles de proteína Uchl1 en los modelos de células MN9D y HEK, lo que sugiere que los componentes tanto 5' como 3' eran importantes para la función de AS Uchl1 (Experimento 5).

Por tanto, se sintetizaron mutantes de delección adicionales para evaluar el papel de las secuencias repetitivas integradas, Alu y SINEB2, en la regulación por incremento de la proteína Uchl1.

- 35 40 La delección dirigida de la región que contiene los elementos repetidos tanto SINEB2 como Alu (AS Uchl1 Δ SINEB2+ALU) impidió la inducción de la proteína Uchl1. La delección de un solo elemento repetitivo, (A-SINE B2 (764-934) y Δ-ALU (1000-1045), reveló que SINEB2 era la región funcional del transcripto requerida para el incremento de la proteína Uchl1 (Experimento 6). En ningún caso se detectó ningún cambio en el nivel de ARNm de Uchl1 por transfección de construcciones de delección y de tipo salvaje de AS Uchl1.

Además, el mutante Δ-SINEB2 tiene una actividad negativa dominante sobre el AS Uchl1 de longitud completa.

Dado que el mutante por delección Δ-SINEB2 carece de 170 nucleótidos que potencialmente alteran la estructura secundaria del ARN de AS Uchl1, se produjo un mutante con la secuencia de SINEB2 volteada entre los nucleótidos 764-934. Curiosamente, SINEB2 volteada no pudo aumentar los niveles de proteína Uchl1, lo que demuestra la actividad dependiente de la orientación del dominio SINEB2 integrado en AS Uchl1 (Experimento 6).

- 45 50 Los pares S/AS con una repetición SINEB2 invertida integrada en el transcripto AS identifican una nueva clase funcional de ARNnc:

La colección FANTOM3 de ADNc no codificantes se escrutó bioinformáticamente en busca de otros ejemplos de transcriptos de AS naturales que contuvieran elementos SINEB2 (subclase B3) en la orientación correcta y 5' cabeza a cabeza que se solaparan con un gen que codificara una proteína. Esto identificó 31 pares S/AS similares a la estructura de Uchl1/AS Uchl1 (Experimento 7).

- 55 Para someter a prueba si la observación de Uchl1/AS Uchl1 se generaliza a otros ejemplos, se clonó y expresó en exceso el transcripto solapante de AS de Uxt (transcripto expresado de forma ubicua), AS Uxt (Rik4833404H03). La transfección de AS Uxt en células dopaminérgicas MN9D mostró una regulación por incremento del producto proteico Uxt sin cambios en los niveles totales de ARNm, lo que confirma que está funcionando un mecanismo más general (Experimento 8).

AS Uchl1 es un transcripto nuclear enriquecido expresado en neuronas dopaminérgicas:

La RT-PCR multiplex en un panel de tejidos adultos de ratón, regiones cerebrales disecadas macroscópicamente y líneas celulares neuronales encontradas como expresión de AS Uchl1 estaba restringida al mesencéfalo ventral, la corteza y las células dopaminérgicas MN9D, pero ausente en los tejidos y las líneas celulares no neuronales. La hibridación doble *in situ* con ribosondas dirigidas a la región no solapante de Uchl1 mostró que el ARNm prevalecía en el citoplasma de las células del hipocampo, la corteza y las regiones subcorticales, así como en el mesencéfalo dorsal y ventral. La ribosonda AS Uchl1 decoró estructuras similares. Una combinación de doble hibridación *in situ* con inmunohistofluorescencia anti-tirosina hidroxilasa mostró que los ARNm para Uchl1 y AS se expresaban en las mismas neuronas DA del SN. Curiosamente, los transcritos para el par S/AS se localizaron predominantemente en dos compartimentos subcelulares diferentes: el ARNm de Uchl1 maduro se observó principalmente en el citoplasma, mientras que el ARN AS era nuclear, acumulándose en regiones subnucleares específicas (Experimento 9). El 50% de los transcritos celulares se ha encontrado recientemente enriquecido en el núcleo representando principalmente ARNnc con función desconocida. Los ARN de retención nuclear tienden a acumularse en zonas, denominadas "paraspeckles" (compartimentos de forma irregular del espacio intercromatínico de núcleo), que se asemejan mucho a los sitios de localización de AS Uchl1 y cuya asociación está regulada por SINE integrados (Referencia 7; Chen, L.L., DeCerbo, J.N. Y Carmichael, G.G. Alu element-mediated gen silencing. *Embo J* 27, 1694-1705 (2008)).

Aprovechando RACE, se mapeó el sitio de inicio de la transcripción (TSS) preciso del gen AS Uchl1 en células MN9D. Como se muestra en el Experimento 2, el TSS se encuentra 250 pb aguas arriba de la secuencia anotada previamente y está localizado en el segundo intrón de Uchl1.

AS Uchl1 está regulado por disminución en modelos neuroquímicos de EP y cerebros humanos post-mortem:

A continuación, se comparó una región de 70 kb del genoma de ratón que abarcaba el locus AS Uchl1 con la secuencia genómica humana correspondiente utilizando el alineamiento Genome Vista (<http://genome.lbl.gov/cgi-bin/GenomeVista>). Mediante el uso de cebadores diseñados sobre la secuencia humana en correspondencia con los picos de CST, se clonó un transcripto no codificante de 1,6 kb, 5' cabeza a cabeza AS para el gen UCHL1 humano, a partir de ARN de cerebro humano. La organización anatómica del gen hAS UCHL1 fue muy similar a su contraparte de ratón, incluida la extensión de la región solapante del par S/AS, así como la presencia de elementos repetitivos integrados. La expresión de hAs UCHL1 estaba muy restringida a los tejidos neuronales como se encontró en el ratón.

La síntesis de la proteína UCH-L1 se incrementa con el tratamiento con rapamicina a través del transporte del núcleo al citoplasma del ARN de AS Uchl1 y el reclutamiento de ARNm de Uchl1 dependiente de AS a polisomas activos.

Hasta ahora, el ARNnc de AS puede incrementar los niveles de proteína S sin cambios en la cantidad de ARNm de S. Dado que en condiciones fisiológicas el ARNm de S y el ARNnc de AS parecen estar localizados en diferentes compartimentos subcelulares, se analizaron varios factores estresantes que se han implicado en la patogénesis de la EP por su capacidad para redistribuir el ARNnc de AS nuclear en el citoplasma, donde tiene lugar la traducción. Las células MN9D se expusieron a peróxido de hidrógeno 1 mM, inanición de suero, rapamicina a 1 ug/ml, tunicamicina 20 nM y TNFalfa 20 nM durante 45 minutos y el contenido de ARNm de AS Uchl1 se midió de forma independiente en el citoplasma y el núcleo mediante qRT-PCR. La mayoría de los tratamientos no tuvieron ningún efecto, sin embargo, la rapamicina reguló fuertemente la cantidad de ARNm citoplásico de AS Uchl1 (Experimento 10).

La rapamicina es un inhibidor bien conocido de la traducción dependiente de CAP a través de su efecto sobre mTORC1 y la subsiguiente represión de las actividades de S6K y 4E-BP1. Actualmente se prueba como fármaco contra el cáncer y se propone para ensayos clínicos de enfermedades neurodegenerativas. El bloqueo del inicio de la traducción mediado por rapamicina es capaz de rescatar la pérdida de células DA observada en moscas modificadas genéticamente para inactivar la expresión del gen de parkina y pink1 así como en aquellas que expresan en exceso la mutación dominante asociada a EP de LRRK2 (Referencia 8; Tain, L.S. et al. Rapamycin activation of 4E-BP prevents parkinsonian dopaminergic neuron loss. *Nat Neurosci* 12, 1129-1135 (2009)). Además, protege las células DA de mamíferos de la intoxicación neuroquímica *in vitro* y en ratones (Referencia 9; Malagelada, C., Jin, Z.H., Jackson-Lewis, V., Przedborski, S. & Greene, L.A. Rapamycin protects against neuron death *in vitro* and *in vivo* models of Parkinson's disease *J Neurosci* 30, 1166-1175 (2010), Referencia 10; Malagelada, C., Ryu, E.J., Biswas, S.C., Jackson-Lewis, V. & Greene, L.A. RTP801 is elevated in Parkinson brain substantia nigra neurons and mediates death in cellular models of Parkinson's disease by a mechanism involving mammalian target of rapamycin inactivation. *J Neurosci* 26, 9996-10005 (2006)). Recientemente, se demostró que la rapamicina previene la discinesia inducida por L-DOPA, un efecto secundario motor grave común del tratamiento sintomático para la EP (Referencia 11; Santini, E., Heiman, M., Greengard, P., Valjent, E. & Fisone, G. Inhibition of mTOR signaling in Parkinson's disease prevents L-DOPA-induced dyskinesia. *Sci Signal* 2, ra36 (2009)).

Los efectos de la rapamicina sobre el contenido citoplásico de AS Uchl1 se confirmaron por la presencia de una disminución concomitante en sus niveles de estado estacionario nuclear y por la ausencia de cualquier transcripción de novo de AS Uchl1 (Experimento 10). El contenido celular total de estos transcritos se mantuvo constante. El ARNm de Uchl1 no mostró cambios en la distribución subcelular, la transcripción de novo o el contenido celular total.

A pesar del bloqueo en la traducción dependiente de CAP, tras el tratamiento con rapamicina, el nivel de proteína

UchL1 se incrementó varias veces (Experimento 11).

Los autores de la presente invención evaluaron si se requería AS Uchl1 para la inducción de UchL1. A continuación, se establecieron líneas celulares MN9D estables que expresaban constitutivamente ARNhc para AS Uchl1, dirigidas a la región promotora de AS Uchl1 de -4 a +15 nt alrededor del TSS validado por RACE (Referencia 12; Hawkins, P.G., Santoso, S., Adams, C., Anest, V. y Morris, K.V. Promoter targeted small RNAs induce long-term transcriptional gene silencing in human cells. Nucleic Acids Res 37, 2984-2995 (2009)). Como se esperaba, las células desorganizadas mostraron una regulación por incremento de la proteína UchL1 como en la línea parental MN9D, mientras que las células que expresaban ARNhc para AS Uchl1 carecían de cambios en los niveles de proteína UchL1, lo que demuestra un vínculo causal entre la inducción por rapamicina de la proteína UchL1 y la expresión de ARNnc de AS Uchl1 (Experimento 12). Como modelo independiente, se establecieron líneas celulares estables con expresión de un mutante negativo dominante de AS Uchl1 ( $\Delta$ -SINEB2). Cuando las células de control MN9D estables para el vector vacío se trataron con rapamicina, se encontró que la proteína UchL1 se incrementaba. En presencia de la forma negativa dominante de AS Uchl1, esta regulación por incremento ya no era visible (Experimento 13).

Un modelo para el incremento dependiente de AS en los niveles de proteína codificada por S tras el tratamiento con rapamicina:

En células en crecimiento, la señalización de mTORC1 es necesaria para la proliferación y controla la maquinaria de traducción dependiente de CAP a través de la fosforilación de sus sustratos aguas abajo 4E-BP y S6K. El fármaco citostático rapamicina inhibe la actividad de mTORC1 que conduce al bloqueo de la traducción dependiente de CAP. Aquí, los autores de la presente invención muestran que en estas condiciones se requiere la transcripción de AS para la síntesis de proteínas de ARNm seleccionados. Tras la adición de rapamicina, el ARNnc AS Uchl1 enriquecido nuclear se transporta al citoplasma donde recluta los ARNm de su compañero que codifica la proteína S a los polisomas para su traducción.

AS Uchl1 es, por tanto, el miembro representativo de una nueva clase funcional de ARNnc que están asociados a pares S/AS en el genoma de los mamíferos y parece estar compuesto por dos dominios. La región de solapamiento en el 5' proporciona especificidad a un compañero de ARNm que codifica una proteína transcrita a partir de la hebra complementaria. Se requiere un elemento SINEB2 invertido en 3' para la activación de la traducción, lo que representa una nueva función para SINEB2 integrado en el citoplasma.

Se ha propuesto la manipulación de la expresión de Uchl1 *in vivo* para la intervención terapéutica en enfermedades neurodegenerativas, incluidas la EP y la EA. Los transcritos de AS naturales con elementos repetitivos integrados pueden representar herramientas moleculares endógenas para incrementar la síntesis de proteínas de ARNm seleccionados que definen una nueva clase potencial de terapias de ARN.

La rapamicina se encuentra actualmente bajo un intenso escrutinio en la investigación biomédica como agente neuroprotector para enfermedades neurodegenerativas y como fármaco contra el cáncer. En ratones, la rapamicina previene la discinesia inducida por L-DOPA, un efecto secundario motor grave común del tratamiento sintomático de la EP. Además, protege a las neuronas de la apoptosis tanto en modelos genéticos de *Drosophila* como de intoxicación neuroquímica en mamíferos, lo que la convierte en una molécula atractiva para terapias antiparkinsonianas (Referencia 11; Santini, E et al., (2009)). Por tanto, es importante comprender mejor sus modos de acción *in vivo* y su interacción con las vías implicadas en casos familiares de EP, como se muestra aquí para Uchl1. El papel de la transcripción de AS en la síntesis de proteínas inducida por rapamicina añade un cambio inesperado a sus actividades.

La AS sintetizada artificialmente para aumentar la expresión de EGFP o la expresión de anticuerpos regula por incremento la expresión de cada diana en la célula:

Los autores de la presente invención probaron si se puede lograr o no un incremento síntesis de proteínas en un ARN sintético insertando un antisentido de una secuencia determinante de la diana de 72 nt de longitud a la proteína fluorescente verde mejorada (EGFP) en la secuencia apropiada en AS Uchl1. Como en el Experimento 14, se diseñó la expresión del AS artificial para regular por incremento la expresión de EGFP. Los fragmentos que codifican el AS artificial se clonaron en el vector pcDNA3.1 (Invitrogen). Esto demuestra que una molécula de ácido nucleico funcional con una secuencia determinante de la diana y una secuencia reguladora puede incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas de cualquier gen de interés.

De la misma manera, el anticuerpo se puede aplicar como se muestra en el Experimento 15. Se diseñó un AS artificial para regular por incremento un anticuerpo recombinante para dirigir a la secuencia líder del anticuerpo recombinante (el solapamiento tiene 72 pb alrededor de ATG) y se integró en el vector (AS Fc). También se produjo como control un AS artificial que comprendía una secuencia desorganizada como secuencia determinante de la diana (Desorganizada) (Fig. 15). La secuencia diana del anticuerpo se incluyó en los vectores pHYGRO (pHYGRO). La línea celular HEK se cotransfectó con pHYGRO y AS Fc o control. La transfección transitoria en células HEK produjo una regulación por incremento específica de AS Fc del anticuerpo recombinante en productos lisados celulares. AS Fc incrementa los niveles de proteína codificada en células HEK transfundidas, mientras que una secuencia solapante desorganizada o un plásmido vacío no lo hacen, detectado a través de la etiqueta SV5.

Para un examen más detallado (Experimento 16), la línea celular HEK se transfundió con el vector de expresión de

EGFP pEGFP-C2 (Clontech) con Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A continuación, se seleccionaron los transfectantes que expresaban de manera estable una baja expresión de EGFP. AS GFP comprende la secuencia determinante de la diana contra EGFP y se diseñó artificialmente para aumentar la eficacia de la síntesis de la proteína EGFP (Fig. 16). Los transfectantes estables se transfecionaron adicionalmente con el vector que codificaba AS GFP o con el vector de control. Después de 24 horas o 48 horas desde la transfección de la construcción de AS GFP o el vector de control, las células se recogieron y lisaron. El nivel de GFP en el producto lisado celular se controló mediante transferencia Western. La baja expresión de EGFP en el transfectante se incrementó mediante la transfección de la construcción de AS GFP (Fig. 16).

En un experimento adicional, se ha sintetizado una construcción con una secuencia determinante de la diana que se solapa durante 44nt a la cadena principal del plásmido hasta el codón ATG para EGFP. Esta construcción (SINEup005) incrementa la síntesis de proteínas del gen diana de manera muy eficaz (más de 10 veces).

Por lo tanto, esta es una de las evidencias de que el nuevo tipo de AS que encontraron los autores de la presente invención se puede diseñar artificialmente siempre que la molécula de ácido nucleico funcional incluya una secuencia determinante de la diana que comprenda una secuencia antisentido para una secuencia diana en el ARN que codifica la proteína para el cual se va a incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas y una secuencia reguladora que tenga la actividad de incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas.

## Métodos

### Plásmidos

Fragmento RACE: La UTR 5' de AS Uchl1 se amplificó mediante PCR para RACE (GeneRacer, Invitrogen) mediante ARN total de MN9D y se clonó en el vector pGEM®-T Easy (Promega).

AS Uchl1 de longitud completa: la secuencia de ADN de longitud completa de AS se amplificó mediante PCR de fusión a partir del fragmento RACE y el clon FANTOM Rik 6430596G22 con los siguientes cebadores mAS Uchl1 fl Directo 5'-ACAAAGCTCAGCCCACACGT-3' (SEQ ID NO: 13) y mAS Uchl1fl Inverso 5'-CATAGGGTTCATT-3' (SEQ ID NO: 14).

Uchl1: El ARNm de Uchl1 de ratón se clonó a partir de FANTOM 2900059022 con los siguientes cebadores: mUchl1Directo 5'-ATGCAGCTGAAGCCGATG-3' (SEQ ID NO: 15) y mUchl1 Inverso 5'-TTAACGCTTGCAGAGAGC-3' (SEC ID NO: shRNA: 16); Los oligo que contienen la secuencia -14/+4 alrededor del TSS de AS Uchl1 CGCGCAGTGACACAGCACAAA (SEQ ID NO: 17) se clonan en el vector pSUPER.retro.puro (OligoEngine, Seattle, WA), se utilizó la secuencia desorganizada como control.

### Mutantes por delección:

Δ5': mAS Uchl1 fl Directo y Δ 5'AS Uchl1 Inverso 5' TACCATTCTGTGCGGTGCA-3 '(SEQ ID NO: 18).

Δ3' : mAS Uchl1 Directo GACCTCCTCTAGCACTGCACA-3' (SEQ ID NO: 19) y mAS Uchl1 fl Inverso.

Para mutantes por delección fina, el fragmento de PCR I se clona en el sitio NheI-EcoRI en PCDNA3.1- y el fragmento de PCR II en el siguiente sitio EcoRI-HindII.

### AS Uchl1 Δ (Alu + SINEB2):

Fragmento de PCR I: mAS Uchl1 fl Directo y pre-SINE B2 Inverso 5'-CAATGGATTCCATGT-3' (SEQ ID NO: 20). Fragmento de PCR II: post-ALU Directo 5'-GATATAAGGAGAATCTG-3' (SEQ ID NO: 21) y mAS fl Inverso.

### AS Uchl1 Δ (Alu):

Fragmento de PCR I: mAS Uchl1 fl y pre-Alu Inverso 5'-TTATAG TATGTGTTGTC-3' (SEQ ID NO: 22). Fragmento de PCR II: post-ALU Directo 5'-GATATAAGGAGAATCTG-3' (SEQ ID NO: 23) y mAS fl Inverso clonado en el sitio EcoRI-HindII.

### AS Uchl1 Δ (SINEB2):

Fragmento de PCR I: mAS Uchl1 fl Directo y pre-SINE B2 Inverso 5'-CAATGGATTCCATGT-3' (SEQ ID No: 24). Fragmento de PCR II: post-SINE B2 Directo 5'-GAATTCCCTCCAGTCTCTTA-3' (SEQ ID NO: 25) y mAS fl Inverso.

AS uchl1 (Alu + SINEB2) volteado: fragmento de PCR I: obtenido con SINE B2 Directo dentro de 5'-TGCTAGAGGAGG-3' (SEQ ID NO: 26) y Alu volteado1 Inverso 5'- GTCAGGCAATCC -3' (SEQ ID NO: 27) se clonan en el sitio EcoRI único de AS Uchl1 Δ (Alu + SINEB2). AS uchl1 SINEB2 volteado: el fragmento de PCR obtenido con SINE B2 Directo dentro de 5'-TGCTAGAGGAGG-3' (SEQ ID NO: 28) y SINE volteado Inverso 5'-AAAGAGATGGC-3' (SEQ ID NO: 29) se clonan en el Sitio EcoRI de AS Uchl1 Δ (SINEB2).

## Células

Se sembraron células MN9D en placas de Petri de 10 mm en medio de Eagle modificado de Dulbecco que contenía

10% de suero bovino fetal y penicilina (50 unidades/ml), estreptomicina (50 unidades/ml). Los tratamientos se realizaron añadiendo Rapamicina (R0395, Sigma) a una concentración final de 1 ug/ml en medio de nueva aportación durante 45 minutos.

- 5 Para el establecimiento de células estables MN9D (ARNip -15/+4, ARNip desorganizado, pcDNA 3.1- y Δ SINE B2), se sembraron células MN9D en placas de Petri de 100 mm y se transfectaron con Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, el día después de que las células se sembraran para la selección con 500 uM de neomicina (núm. N1142, Sigma). Las células HEK-293T se cultivaron en DMEM (GIBCO) con un suplemento de suero bovino fetal al 10% (Sigma-Aldrich), 100 unidades/mL de penicilina y estreptomicina de 100 µm/ml (Sigma) a 37°C en una incubadora con CO<sub>2</sub> humidificada.

#### 10 PCR

Análisis de PCR: Se extrajo el ARN total utilizando reactivo Trizol (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se sometió a tratamiento con ADNasa I (Ambion) y se retrotranscribió 1 ug utilizando el Kit de Síntesis de ADNc iScript (BioRad). La qRT-PCR en tiempo real se llevó a cabo utilizando colorante fluorescente verde Sybr (2X iQ5 SYBR Green supermix, BioRad). Se utilizaron actina y GAPDH como patrón interno. La cuantificación relativa se realizó con el método Ct comparativo.

Actina: efector 5'-CACACCCGCCACCAGTTC-3' (SEQ ID NO: 30), antisentido 5'-CCCATTCCCACCATCACACC-3' (SEQ ID NO: 31).

Gapdh: efector 5'-GCAGTGGCAAAGTGGAGATT-3' (SEQ ID NO: 32), antisentido 5'-GCAGAAGGGCGGGAGATGAT-3' (SEQ ID NO: 33).

20 Solapamiento AS Uchl1: efector 5'-GCACCTGCAGACACAAACC-3' (SEQ ID NO: 34), antisentido 5'-TCTCTCAGCTGCTGGAATCA-3' (SEQ ID NO: 35).

AS Uchl1: 5'CTGGTGTGTATCTCTTATGC (SEQ ID NO: 36) antisentido 5'CTCCCGAGTCTCTGTAGC (SEQ ID NO: 37).

Uchl1: efector 5'-CCCGCCGATAGAGCCAAG (SEQ ID NO: 38), antisentido 5'-ATGGTTCACTGGAAAGGG-3' (SEQ ID NO: 39).

25 ASUchl1 pre ARN: 5'-CCATGCACCGCACAGAACG-3' (SEQ ID NO: 40), 5'-GAAAGCTCCCTCAAATAGGC-3' antisentido (SEQ ID NO: 41).

ARN pre\_A0 ribosómico efector 5'-TGTGGTGTCCAAGTGTTCATGC-3' (SEQ ID NO: 42), antisentido 5'-CGGAGCACACATCGATCTAAG-3 (SEQ ID NO: 43).

30 AS\_Uxt: efector 5'-CAACGTTGGGGATGACTTCT (SEQ ID NO: 44), antisentido 5'-TCGATTCCCATTACCCACAT (SEQ ID NO: 45);

Uxt: efector 5'-TTGAGCGACTCCAGGAACT-3' (SEQ ID NO: 46), 5'-GAGTCCTGGTGAGGCTGTC-3' antisentido (SEQ ID NO: 47).

35 La RT PCR multiplex se realizó con el Sistema de RT-PCR SuperScript® III One-Step con ADN Polimerasa Taq Platinum® (Invitrogen). Se incubaron 500 mg de ARN tratado con ADNasa total con cebadores inversos para Gapdh, Uchl1, AS Uchl1. La reacción se realizó durante 60 minutos a 60 grados.

Después, cada volumen se dividió en tres y se añadieron cebadores directos a una concentración final de 200 nM a la reacción. La reacción de PCR comprendió 40 ciclos de 95 grados durante 15 segundos, seguidos de 60 grados durante 45 segundos y 68 grados finales durante 30 segundos.

#### Transferencia Western

40 Las células se lisaron en tampón de muestra SDS 2X. Las proteínas se separaron en gel de poliacrilamida-SDS al 15% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La inmunotransferencia se realizó con los anticuerpos primarios: anti-Uchl1 (Señalización Celular núm. 3524) 1:300 y anti-actina b (A5441, Sigma) 1:5000. Las señales se revelaron después de la incubación con anticuerpos secundarios recomendados conjugados con peroxidasa de rábano picante mediante el uso de quimioluminiscencia mejorada para Uchl1 (sustrato núm. WBKLS0500 Immobilion Western Chemiluminescent HRP) y reactivo de detección ECL (RPN2105, GE Healthcare).

#### Fraccionamiento celular

El fraccionamiento del núcleo citoplasmático se realizó utilizando el kit de separación Nucleo Cytoplasmic (Norgen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se hizo eluir el ARN y se trató con ADNasa I. La pureza de la fracción citoplásica se confirmó mediante qRT-PCR en tiempo real en ARN pre-ribosómico.

### Hibridación *in situ* con dos colores (ISH)

Reactivos: anticuerpo anti DIG D8156 (Sigma); estreptavidina HRP RPN1231-100 UL (Amersham Bioscience); Mezcla de marcate DIG núm. 11277 073 910 (Roche) Mezcla de marcate BIO núm. 11685597910 (Roche), Ácido ribonucleico, de transferencia de levadura de panadería R8759 (Sigma), Ácido desoxirribonucleico, de hebra sencilla de testículos de salmón D7656 (Sigma), Reactivo de bloqueo núm. 11096176001 (Roche), *Sistema TSA Cy3* (Perkin Elmer, Heidelberg, Alemania).

Después de la perfusión con formaldehído al 4%, el cerebro del ratón se crioprotegió durante la noche en sacarosa al 30%. La hibridación *in situ* se realizó en cortes de criostato (16 um). Las sondas efectora y antisentido fueron generadas por transcripción *in vitro* del ADNc que codifica los 600 pb distales del ADNc de Uchl1 de ratón y los últimos 1000 pb de AS Uchl1 de ratón. Las sondas para Uchl1 se marcaron con digoxigenina, las sondas para AS Uchl1 se marcaron con biotina. La incorporación tanto de biotina como de digoxigenina se comprobó mediante Transferencia Northern. Los cortes se trataron previamente con peróxido de hidrógeno al 3% durante 30 minutos. La hibridación se realizó con sondas a una concentración de 1 mg/ml (Uchl1) y 3 mg/ml para AS Uchl1 a 60°C durante 16 h. Para la detección de ARN biotinilado, se utilizó estreptavidina-HRP 1:250 durante 2 horas en tampón TNB (Tris HCl pH 7,5 100 mM, NaCl 150 mM, Reactivo de Bloqueo al 0,5%), y las señales se visualizan utilizando el *Sistema TSA Cy3* después del lavado en tampón TNT (Tris HCl pH 7,5 100 mM, NaCl 150 mM, Tween al 0,05%).

La ISH en la sonda marcada con DIG se realizó incubando los cortes con anticuerpo monoclonal anti-DIG después de la reacción de TSA. Para combinar la ISH de ARN con inmunofluorescencia, los cortes se incubaron con el anticuerpo anti TH (núm. AB152, Chemicon) 1:1000. A continuación, las señales se detectan con anticuerpo secundario conjugado con colorante fluorescente 405 anti-conejo de cabra y 488 anti-ratón de cabra. A continuación, las secciones se lavaron, se montaron con medio de montaje Vectashield (Vector lab) y se observaron en un microscopio confocal (Leica).

### Muestras post-mortem de cerebro humano

Se obtuvieron muestras de cerebro del banco de cerebros del Instituto de Neuropatología, Hospital de Bellvitge (Universidad de Barcelona, España). Las muestras fueron diseccionadas en autopsia con el consentimiento informado de los pacientes o sus familiares y la aprobación institucional del Comité de Ética de la Universidad de Barcelona. Los cerebros se obtuvieron de casos de EP confirmados patológicamente caucásicos y de controles de la misma edad (Navarro et al., 2009). En resumen, todos los casos de EP habían padecido EP clásica, ninguno presentaba deterioro cognitivo y su caracterización neuropatológica se realizó según criterios establecidos. Los sujetos sanos de control mostraron ausencia de síntomas neurológicos y de enfermedades metabólicas y vasculares, y el estudio neuropatológico no reveló anomalías, incluida la ausencia de enfermedad de Alzheimer y patologías relacionadas. El tiempo entre la muerte y la preparación del tejido estuvo en el intervalo de 3 a 5 horas.

### Análisis bioinformático

Para la identificación de un ortólogo humano candidato de AS Uchl1, se realizó la conservación entre seres humanos y ratones en la región del ortólogo de AS uchl1 utilizando el navegador del genoma VISTA. Los autores de la presente invención seleccionaron parámetros para etiquetas de secuencias conservadas (CTS) que tienen un mínimo de 75% de identidad entre el genoma del ratón y el humano. Para cada elemento conservado se diseñó un cebador en la región humana homóloga.

Para la identificación de candidatos activadores de la traducción adicionales, los autores de la presente invención buscaron ADNc de longitud completa de FANTOM3 que fueran ARN no codificantes y se superpusieran al extremo 5' de los transcritos codificantes en una configuración de cabeza a cabeza [PMID: 16141072]. El conjunto filtrado de 8535 transcritos de ARNc de FANTOM3 descrito por Nordstrom et al. 2009 (Nordstrom, K.J. et al. Critical evaluation of the FANTOM3 non-coding RNA transcripts. *Genomics* 94, 169-176 (2009)) se utilizó como punto de partida de los autores de la presente invención. Las ubicaciones genómicas de estos transcritos de ARNnc y los transcritos codificantes de REFSEQ (Maglott, D.R., Katz, K.S., Sicotte, H. y Pruitt, K.D. LocusLink y RefSeq de NCBI. *Nucleic Acids Res* 28, 126-128 (2000)) se extrajeron de los alineamientos en el navegador UCSC Genome (Kent, W.J. et al. The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 12, 996-1006 (2002)) para identificar un conjunto de 788 pares codificantes-efectores: no codificantes-antisentido. A continuación, se comprobaron los ARNnc mediante RepeatMasker para identificar secuencias relacionadas con SINEB2 (Smit, AFA, Hubley, R & Green, P. RepeatMasker Open-3.0.1996-2010 <<http://www.repeatmasker.org>>). Esto redujo el número de pares a 127 transcritos codificantes de proteínas con superposición en el extremo 5' (60 con una versión de hebra efectora de la repetición, 53 con una versión antisentido y 14 con versiones efectora y antisentido).

El alineamiento de los elementos relacionados con SINEB2 se llevó a cabo utilizando Clustalw (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). A partir de este análisis, los transcritos solapantes antisentido con una repetición más parecida a la de Uchl1-as y en la misma orientación fueron elegidos para pruebas experimentales (Uxt1-AS).

### Secuencias

Como ejemplo, la siguiente es una lista de secuencias que son complementarias a los ARNm que codifican proteínas.

Contienen una fracción que proporciona ejemplos de una secuencia determinante de la diana [ahora resaltada en azul claro] y una secuencia reguladora [ahora resaltada en rojo]. La secuencia reguladora en esta lista de antisentido natural es tan corta como 89 nucleótidos en este ejemplo. La longitud de las secuencias adaptadoras en esta lista parcial de ARN antisentido es tan corta como 44 nt.

- 5 Debajo de cada secuencia hay un resumen de los alineamientos con los elementos de retrotransposición según lo determinado por el programa Repeatmask.

**En negrita** región solapante (**UchL1**) *la cursiva son 72 pb*

El nucleótido CAT recuadrado es complementario al ATG de inicio de CDS

SW posición en repetición	perc puntuación	perc niv.	perc del. ins.	problema secuencia	posición en problema			repetición coincidente (izquierda)	repetición coincidente clase/familia
					inicio	fin	repetición ID		
701	19.7	1.2	10.3	AK078321.1	521	690	(995) C B3		(60)
156	1	1							
303	29.2	2.1	0.0	AK078321.1	730	802	(883) + B1F1	SINE/Alu	1
77	(50)	2							
<b>EVIDENCIA DE ANOTACIÓN:</b>									
701	19.67	1.18	10.26	AK078321.1	521	690	995 C B3	SINE/B2	1
156	60	0							
AK078321.1				521 GTGC--AGTGCTAGAGGAGGGCAGAAGAGGGCATGGATCCCCAGAACT	568				
C B3+SINE/B2				--i iv v i i ii					
				156 GTGCCCTGGTGCAGCGGAGGCCAGAACAGAGGGCGTCGGATCCCTGGAACT	107				
AK078321.1				569 GGAGITATACTGTTAACCTCCTGGTGGTGTGAACACCACCAITGGATGGAT	618				
C B3+SINE/B2				i ----- 1 1 1 1 ---					
				106 GGAGITACA-----GATGGTTGTGAGCCGCAITGTGGGIG---	72				
AK078321.1				619 ATGGAGTTCAAACACTGGTCTGTGCAAGAGGCATCCAGTGCTCTTAAGT	668				
C B3+SINE/B2				-1 1 VVI 1 V V V V VI					
				71 -CTGGGAATCGAACCCGGGTCCTCTGGAAAGAGCAGCCAGTGCTCTTAACC	23				
AK078321.1				669 GCTGAGCCAATCTTTAGCTCC 690					
C B3+SINE/B2				ii i					

Matriz = 25p43g.matriz  
Transiciones / transversiones = 2.00 (20 / 10)  
Tasa inicio espacio = 0.02 (3 / 169), tamaño espacio promedio = 6.00 (18 / 3)

AK029359.1 (AS\_Uxt) (SEQ ID No:8)

#### **En negrita región solapante (UchL1)**

SW posición en repetición puntuación inicio	perc div.	perc del.	perc ins.	problema secuencia (izquierda) ID	posición en problema			repetición clase / familia	
					fin	inicio	fin (izquierda)		
617 (79)	19.5	0.8	2.3	Secuencia Sin Nombre	160	290	(855)	C B3	
137		9	1						
883 (7)	19.9	12.3	0.5	Secuencia Sin Nombre	774	960	(105)	C B3	
209		1	2						
327 (9)	27.5	6.1	4.3	Secuencia Sin Nombre	977	1090	(55)	C FB1D10	
117		2	3					SINE/A1v	

## EVIDENCIA DE ANOTACIÓN:

617 19.54 0.76 2.33 Secuencia Sin Nombre 160 290 556 C B3 SINE/B2

AK029359.1 160 GCCAGAAGAACGGATCCCTGGAACTGGAGCAACCAACAGTTGT 209  
i vi v i iv vi ii -

AK029359.1 210 GTGC-ACCATGTGGGTAATGGGAATCGAACCTGGGTCCCTATAAGACTG 258  
V -i iv i iv VII

00 0A9CCCCCCCAC1G1GGGG1GCG1GGGAAACCGAAACCCGGGG

AK029359.1 259 GCCAGTGTCTTAACTACTGAGGTGCATTCT 2

C-B345TNE/B2

Matriz = 25p43d.matriz  
Transiciones/transversiones = 1.78 (16 / 9)  
Tasa inicial\_espacio = 0.02 (3 / 130), tamaño espacio promedio = 1.33 (4 / 3)  
EVIDENCIA DE ANOTACIÓN:

Matriz = 25p43d.matriz  
Transiciones/transversiones = 1.28 (16 / 9)

Tasa inicial\_espacio = 0.02 (3 / 130), tamaño espacio promedio = 1.33 (4 / 3)

EVIDENCIA DE ANOTACION: Secuencia Sin Nombre 774 862 22-6-82 SIME (82)

1 209 7 1 Secuencia Sint. Número 774 960 720 83 SÍNE/SZ

AK029359.1 774 TTTTTTAAATATAATGAGTATTTCACCTGCAATAG-----GCGCAC---- 813

vi i i ii iv - i - -

AK029357.1 514 AGTACCCAGAGAGCTAAGAGGGGCGCAACGTCGAG 534

AK029359.1 855 ACTGGAGTTA---ATGCTTGTGAGCTGCCATGTGGATGCTGGAAATCAAA 901

109 ACTGGAGTTACAGATGGGTTGAGGCGGCATGAGCTGGGAAATCGAA 60

C B38SINE/B2 59 CCCGGGTCCCTCIGGAGAGCAGCCAG-TGCTCTTACCGCTGAGCCATCT 11

C. REASINGE/B2 10. STCCGAGGGGG 1

C B9#SINE/B2 10 C1CCCCCCCC 1

Otras secuencias del estudio:

B2 númer. SINE/B2 (SEQ ID NO: 9)

```
gggtggagagatggctcagtggtaagagacccctgactgccttccagggcttgatcaattcccagcaaccacat
gtggctcacaaaccatctgtaatgagatgtatgcctttctggtgtgtcaagacagctacagtacttatata
ataaataaataaataaataatctaaaaaaaagaaaaaaa
```

>B3 númer. SINE/B2 216 pb (SEQ ID NO: 10)

```
GGGGCTGGAGAGATAGCTCAGCGTTAAGAGCACTGGCTGCTCTCCAGAGGACCCGGTTCGGTTCCAGCACCCACAT
GGCGGCTCACAAACCGCTGTAACTCTAGTCCAGGGGATCTRACNCCTCTCTGACCTCCACGGGCACCAGGCACGCAC
GTGGTACACAGACGTACATGCARGCAAAACACTCATACACATAAAAATAAATWAAAAAA
```

Uchl1 clonado en sitio rojo Pme de pcDNA 3.1 - (SEQ ID NO: 11)

```
CGGCTCCCTCGGGTTTGTGTCAGGTGCCATCCGCGAAGATGCAAGCTGAACCGGATGGAGATTAAACCCGAGATGCTGA
ACAAAGTGTGGCCAAGCTGGGGTCGCCCCCAGTGGCGCTTCGCCAGCTGCTAGGGCTGGAGGAGGAGACTCTGGGC
TCAGTGCATCCCTGCCCTGCTCTCTGTTTCCCACAGGCCAGCTGGAAACTTCAGGAAAGCTGGTACCGATCAAAGCAAT
TGAGGAAGCTGAAGGGCAGCGGAAGTTAGCCCTAAAGTTACTTCTGAAAGCAGACCATCGGAAACTCTCTGTGGTACCGATCG
GGTGTATCCACCGCAGTGGCCAACAACAAAGCAGCTGGAAATTGAGGATCCGCTCTGAAACAGTTCTGTGAA
ACGGAGAAGCTGCCCCCGAAGATAGAGCCAAGTGTTCAGAAGAAGCAGGGCATCCAGGGGGCATGACTCCGTGGC
CCAGGAGGGCCAGTGTGGGTAGATGACAAGTGAATTTCATTTATCTGTTCAACACCGTGGACGGCCATCTGTGAC
ACCTCGATGGCGAATGCCCTTCCAGTGAACCATGCCAGCTCAGAGGACTCTCTGCTGCAAGGATGCTCCAAGGTG
TCAGAGAAATTACTGAGCGCGAGCAGGGGAGGTCCGCTCTGCCGTGGCTCTGCAAAGCAGCTTAAGTCTGGG
AGAGAGAACCGCCGATCCCCCTTCCCTGGCAGGTGGCGCGGGGGCCCTTGGTTGCAAGCTTAGCACTTAAACC
ACAGCTGCTTCTTGCTGTTCTACAGCCCCATCCCCCTCCACCCACCCAGGGCCACCAGGGGGCTCTGTCACAGCCACACCA
GGCTGAGCACTTCCCTCTGTGTCTGCTACCTTGCTCTACGGCTCTTTGGTTCTGTGTCAGTTACGGCC
GGATGTGGTTGTCTAGTCCTAAGAGGAAGATAAAACTTTGCTGGTGGAG
```

AS Uchl1 de longitud completa clonado en sitio Xba-HindII en pcDNA 3.1 (SEQ ID NO: 12)

```
ACAAAGCTCAGCCCCACACGTGGCTCGCGCGAAGCCCTCGGACTAGAGTCGCCCGGGCCCTGCCACGCCCTCGAGAGCTGC
TCCCCGCGCTCGTTGTCAGGTGCTCCCGGCTCATCTCCGCCACCTCTCCCGTGTATCGATCTCTCAGTCAGTCACTCCAAACCCCTAGA
TAACTCAGGGCAGAGACGACACCAGCTGGCGGCGCCACCTCCATGCAAGGGCGGCCGCGCTGGCTGGCGCTGGCGT
CTCCAAACAGATGCTCTGGAGGATAGGGACAGAGACTGCGCCGCGCAGCTACTTGTTCAGCATCTGAAAGCCAAAAA
GCAAGAGGAAATGATAATAAAACTAAATGATTCACTACCGAGCTGTAGCTAAGGGTCAAGCTTATTCTCCGAAGC
GACCCAGCAGCTATGCTTACCTCGGGGTTAATCTCCATCGGCTTCAGCTGATCTCCGGATGGCACCTGCAAGACACAA
ACCCGAGGGAGCGAAAAAACAGCGGTGGAGCCGCCAGGCTGCTGTTATAAGCGCCGGCTCGCTCACTGGGAAAGCC
TGAGCAGGGAGACGGAGCAGAACAGCAGAGGAGGGAGGCAAGAGGGCTCGAACTCCCCCATGCAACCGCACAGAAT
GGTACAAGCCAAGCCCCAAACCTTGCACTCTCACTCGCCGAAGTGCTCCCCGGACTGGGATGGTAGCACCGCACCTGTG
ATTCCAGCAGCTGAGAGAGAGGGCGAGCCACATGGAATCCATTGTCAGTGCTAGAGGGTCAAGAGAGGGCATTTGGA
TCCCCCAGAACCTGGAGTTACGCTAACCTGCTGGTGTGTAACCACCATGTGGATGGATATTGAGTTCAAACACTG
GTCTGTGCAAGAGCATCCAGTGCTTAAAGTGTCTGAGCCATCTCTTACGCTCCAGTCCTTAAACAAACAAACGAA
CGAACAGCAAGGGAGCTGGGTATGACAACACATACTATAATTCTAGTACTCAGGATGCTGAAACAGGGAGGATTGCTGAC
TGGGAGATAAGGAGAATCTGTCACCCCCACCCCTCCCTATAAGGAGAATAAAAGAAGCTCTATAAAACAAATA
ACAAACAAACCAATAAAACAAACCAAGATCTCTCACCTTTCTTGTCTTTTACAGACTTTGTAATAAGGGCCCTTGG
AGTGCAGGATATTCCGGCAGGACAAGCAGAGBAGGGAGACCATCAGTTCTCTTGTCAAGAAGACTATGTTCTTAGCA
AACTGGTGTGATTATCTCTTATGCAATGAGCCTGGAAAGAGGGCACAGCCACCGAGGATGGTACAGCATGGATGGATGG
TACGCTACAGAGACTCGGGAGGCCAACTGTGAGTGGCTGACTGGCATGGTAGGTTAGGGAGAATTGGCTGTGAGAAGA
AATGTTCTGAAAAGTGAACAAAGGTGAGGAGGATGGAGTGGGCTCTGGCAAGCAGGGGTGCACTCCACCCCTCAGGG
AATAGGCACAGCAGGGATCTGTTGATGCACTCGAGTGCACTGACCTGCTTGCAAAATAGACGATCAAGAATGGGAAAGCATC
ATGGGTGATGAGTGGGAGAGGGATGAGACATTCTTCTCCCTGCTGAGACTTCACTGAAACCGATGAGTTCTGAATAG
AAGATGCCCTCCCCACCCCGACCACTGTGAGAATCTGAAAGGGAGGATATATTACCCATATTACTCTGTGTTGGCGCC
AGCTATCTGACAGCCAACCTCCATACATTCTGGGATACACTAATGACAGGAAGTCTTGTGCTTATTTGTTCAATAAAATGAAAC
ACTCCATG
```

Los ejemplos de SINE B2 integrados en la secuencia de clones de ADNc son los siguientes.

# ES 2 855 577 T3

Tabla 1

Gen con AS_refseq	inicio B2	fin B2		hebra	subtipo				Leyenda; ID clon ADNc_posición de inicio del alineamiento_final de alineamiento_tipo de elemento de Repetición
NM_177182	973	1013	-2766	+	B2_Mm2	SINE/B2	2	42	-153 >AK032380_973_10 13_+ B2_Mm2
NM_009351	859	1044	-1470	+	B2_Mm1t	SINE/B2	2	185	-8 >AK033525_859_10 44_+ B2_Mm1t
NM_144515	1564	1718	-761	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	158	-37 >AK033993_1564_1 718_+ B2_Mm2
NM_198300	520	712	-1160	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	188	-7 >AK039361_520_71 2_+ B2_Mm2
NM_0284 28	1801	1997	-245	+	B2_Mm1t	SINE/B2	1	193	0 >AK042841_1801_1 997_+ B2_Mm1t
NM_0106 61	946	1111	-1515	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	195	0 >AK043817_946_11 11_+ B2_Mm2
NM_0074 85	722	912	-417	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	194	-1 >AK044205_722_91 2_+ B2_Mm2
NM_0106 33	971	1164	-67	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	195	0 >AK047213_971_11 64_+ B2_Mm2
NM_0302 07	714	787	-446	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	88	-107 >AK079217_714_78 7_+ B2_Mm2
NM_1454 70	1498	1697	-1057	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	193	-2 >AK081722_1498_1 697_+ B2_Mm2
NM_0242 82	1379	1555	-2	+	B2_Mm2	SINE/B2	2	187	-8 >AK132990_1379_1 555_+ B2_Mm2
NM_1339 94	1001	1057	-86	+	B2_Mm2	SINE/B2	2	58	-137 >AK133457_1001_1 057_+ B2_Mm2
NM_1339 94	1057	1137	-6	+	B2_Mm2	SINE/B2	91	171	-24 >AK133457_1057_1 137_+ B2_Mm2
NM_1782 44	2323	2513	-45	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	195	0 >AK133632_2323_2 513_+ B2_Mm2
NM_0089 97	734	923	-3	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	186	-9 >AK133808_734_92 3_+ B2_Mm2
NM_0805 55	286	382	-4	+	B2_Mm1t	SINE/B2	75	171	-22 >AK134674_286_38 2_+ B2_Mm1t
NM_0103 32	2428	2606	-1	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	183	-12 >AK135599_2428_2 606_+ B2_Mm2
NM_1724 67	2948	3108	-3	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	162	-33 >AK137583_2948_3 108_+ B2_Mm2
NM_1751 15	81	274	-2006	+	B2_Mm2	SINE/B2	2	195	0 >AK138675_81_274_+ B2_Mm2
NM_0100 71	3150	3339	-54	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	195	0 >AK155102_3150_3 339_+ B2_Mm2
NM_1830 14	288	442	-20	+	B3A	SINE/B2	48	198	0 >AK015655_288_44 2_+ B3A
NM_0265 55	277	435	-24	+	B3A	SINE/B2	40	198	0 >AK021299_277_43 5_+ B3A
NM_0330 77	1109	1295	-1732	+	B3A	SINE/B2	5	189	-9 >AK029689_1109_1 295_+ B3A
NM_0197 89	1052	1211	-1195	+	B3	SINE/B2	33	196	-20 >AK030353_1052_1 211_+ B3
NM_1788 91	2403	2558	-3	+	B3	SINE/B2	20	176	-40 >AK030551_2403_2 558_+ B3

# ES 2 855 577 T3

Gen con AS_refseq	inicio B2	fin B2		hebra	subtipo				Leyenda; ID clon ADNc_posición de inicio del alineamiento_final de alineamiento_tipo de elemento de Repetición
NM_1455 79	2546	2719	-346	+	B3	SINE/B2	2	206	-10 >AK031007_2546_2 719+_B3
NM_0085 10	2255	2404	-429	+	B3A	SINE/B2	57	198	0 >AK034030_2255_2 404+_B3A
NM_1535 79	1071	1262	-798	+	B3	SINE/B2	1	214	-2 >AK035406_1071_1 262+_B3
NM_1459 42	1006	1219	-681	+	B3	SINE/B2	2	216	0 >AK037188_1006_1 219+_B3
NM_0257 88	1871	2045	-757	+	B3	SINE/B2	1	215	-1 >AK039409_1871_2 045+_B3
NM_0080 19	877	1044	-1057	+	B3	SINE/B2	2	211	-5 >AK040162_877_10 44+_B3
NM_0010 81475	1431	1582	-6	+	B3	SINE/B2	69	216	0 >AK040401_1431_1 582+_B3
NM_0010 81475	1586	1745	-2	+	B3	SINE/B2	3	206	-10 >AK040401_1586_1 745+_B3
NM_0074 85	722	810	-519	+	B3	SINE/B2	1	89	-127 >AK044205_722_81 0+_B3
NM_0074 85	835	912	-417	+	B3	SINE/B2	138	215	-1 >AK044205_835_91 2+_B3
NM_1787 94	826	959	-986	+	B3A	SINE/B2	2	129	-69 >AK045196_826_95 9+_B3A
NM_0089 15	737	940	-298	+	B3	SINE/B2	8	201	-15 >AK046652_737_94 0+_B3
NM_0106 33	971	1096	-135	+	B3	SINE/B2	1	129	-87 >AK047213_971_10 96+_B3
NM_1994 76	3267	3405	-1039	+	B3	SINE/B2	2	149	-67 >AK047540_3267_3 405+_B3
NM_1447 95	2052	2248	-546	+	B3	SINE/B2	2	210	-6 >AK048854_2052_2 248+_B3
#N/A	1858	2028	-5	+	B3A	SINE/B2	1	176	-22 >AK049524_1858_2 028+_B3A
NM_0010 38621	1207	1363	-359	+	B3A	SINE/B2	2	160	-38 >AK053130_1207_1 363+_B3A
NM_1814 23	1666	1733	-71	+	B3A	SINE/B2	2	72	-126 >AK054359_1666_1 733+_B3A
NM_1535 15	1403	1520	-470	+	B3A	SINE/B2	63	183	-15 >AK078013_1403_1 520+_B3A
NM_1984 15	403	623	-1212	+	B3	SINE/B2	1	216	0 >AK078328_403_62 3+_B3
NM_1522 20	1794	1979	-561	+	B3	SINE/B2	3	213	-3 >AK078537_1794_1 979+_B3
NM_0257 29	1	165	-203	+	B3	SINE/B2	15	177	-39 >AK079403_1_165+_B3
NM_0166 93	1307	1517	-13	+	B3	SINE/B2	2	216	0 >AK080235_1307_1 517+_B3
NM_0101 51	814	1024	-451	+	B3	SINE/B2	2	216	0 >AK082108_814_10 24+_B3
NM_0097 13	1690	1882	-5	+	B3	SINE/B2	1	199	-17 >AK082325_1690_1 882+_B3
NM_0010 29985	221	280	-1179	+	B3	SINE/B2	108	168	-48 >AK084376_221_28 0+_B3

# ES 2 855 577 T3

Gen con AS_refseq	inicio B2	fin B2		hebra	subtipo				Leyenda; ID clon ADNc_posición de inicio del alineamiento_final de alineamiento_tipo de elemento de Repetición	
NM_0097 37	1805	2005	-406	+	B3	SINE/B2	1	207	-9 >AK085337_1805_2 005_+_B3	
NM_0270 81	984	1130	-	1155	+	B3	SINE/B2	1	162	-54 >AK086470_984_11 30_+_B3
NM_0187 79	876	1062	-530	+	B3A	SINE/B2	2	188	-10 >AK089148_876_10 62_+_B3A	
NM_0279 19	1468	1667	-185	+	B3	SINE/B2	1	213	-3 >AK090182_1468_1 667_+_B3	
NM_0110 34	434	608	-12	+	B3	SINE/B2	2	216	0 >AK131819_434_60 8_+_B3	
NM_1755 51	1802	1895	-513	+	B3A	SINE/B2	64	176	-22 >AK132737_1802_1 895_+_B3A	
NM_1755 51	1829	1928	-480	+	B3	SINE/B2	101	213	-3 >AK132737_1829_1 928_+_B3	
NM_0079 21	951	1134	-	1650	+	B3A	SINE/B2	3	187	-11 >AK133325_951_11 34_+_B3A
NM_0010 39042	1220	1315	-292	+	B3A	SINE/B2	48	142	-56 >AK134755_1220_1 315_+_B3A	
NM_1773 28	1378	1504	-285	+	B3	SINE/B2	85	216	0 >AK134874_1378_1 504_+_B3	
NM_0218 99	1172	1259	-140	+	B3	SINE/B2	1	95	- 121 >AK135206_1172_1 259_+_B3	
NM_0087 05	1521	1717	-572	+	B3A	SINE/B2	1	197	-1 >AK136279_1521_1 717_+_B3A	
NM_0010 79932	2116	2299	-702	+	B3	SINE/B2	6	208	-8 >AK137643_2116_2 299_+_B3	
NM_0010 79932	3059	3253	-2	+	B3	SINE/B2	4	205	-11 >AK137643_3059_3 253_+_B3	
NM_0010 33286	2524	2698	-63	+	B3A	SINE/B2	4	181	-17 >AK138296_2524_2 698_+_B3A	
NM_0089 62	928	1095	-375	+	B3	SINE/B2	1	153	-63 >AK138521_928_10 95_+_B3	
NM_1753 49	2151	2347	-181	+	B3A	SINE/B2	11	196	-2 >AK139254_2151_2 347_+_B3A	
NM_1770 03	1277	1466	0	+	B3	SINE/B2	1	200	-16 >AK139647_1277_1 466_+_B3	
NM_0079 65	1338	1488	-5	+	B3	SINE/B2	51	216	0 >AK140072_1338_1 488_+_B3	
NM_0101 92	1808	1933	-45	+	B3	SINE/B2	1	126	-90 >AK140346_1808_1 933_+_B3	
NM_0274 46	1871	1983	-	2794	+	B3A	SINE/B2	1	130	-68 >AK140616_1871_1 983_+_B3A
NM_0274 46	2318	2342	-	2435	+	B3A	SINE/B2	131	156	-42 >AK140616_2318_2 342_+_B3A
NM_1771 86	2061	2142	-351	+	B3	SINE/B2	130	211	-5 >AK142359_2061_2 142_+_B3	
NM_1451 34	2963	3148	-	1292	+	B3	SINE/B2	28	210	-6 >AK142507_2963_3 148_+_B3
NM_0098 90	2740	2968	-135	+	B3	SINE/B2	1	216	0 >AK142879_2740_2 968_+_B3	
NM_1460 55	5202	5272	-94	+	B3	SINE/B2	60	141	-75 >AK143143_5202_5 272_+_B3	

# ES 2 855 577 T3

Gen con AS_refseq	inicio B2	fin B2		hebra	subtipo				Leyenda; ID clon ADNc_posición de inicio del alineamiento_final de alineamiento_tipo de elemento de Repetición
NM_0089 77	1344	1513	-645	+	B3	SINE/B2	11	205	-11 >AK143279_1344_1 513+_B3
NM_0260 36	2001	2167	-272	+	B3A	SINE/B2	1	169	-29 >AK149843_2001_2 167+_B3A
NM_00 11 59519	1440	1548	1422	+	B3A	SINE/B2	55	163	-35 >AK157402_1440_1 548+_B3A
NM_00 11 59519	2503	2556	-558	+	B3	SINE/B2	1	56	-160 >AK157402_2503_2 556+_B3
NM_00 11 59519	2544	2616	-498	+	B3	SINE/B2	109	177	-39 >AK157402_2544_2 616+_B3
NM_00 11 59519	2702	2896	-412	+	B3A	SINE/B2	1	198	0 >AK157402_2702_2 896+_B3A
NM_00 11 10504	1778	1909	-25	+	B3	SINE/B2	58	210	-6 >AK160921_1778_1 909+_B3
NM_0307 14	2153	2335	-62	+	B3	SINE/B2	40	216	0 >AK165234_2153_2 335+_B3
NM_0258 25	945	1052	-383	R C	B2_Mm1a	SINE/B2	-85	108	1 >AK014613_945_10 52_RC_B2_Mm1a
NM_1337 56	1102	1289	-246	R C	B2_Mm2	SINE/B2	-4	191	1 >AK016234_1102_1 289_RC_B2_Mm2
NM_1832 94	1565	1750	1384	R C	B2_Mm1a	SINE/B2	-8	185	4 >AK029702_1565_1 750_RC_B2_Mm1a
NM_0094 46	531	710	-2730	R C	B2_Mm2	SINE/B2	-6	189	2 >AK030803_531_71 0_RC_B2_Mm2
NM_0257 88	1687	1839	-963	R C	B2_Mm2	SINE/B2	-11	184	1 >AK039409_1687_1 839_RC_B2_Mm2
NM_1777 85	1626	1682	1130	R C	B2_Mm2	SINE/B2	-4	191	137 >AK040275_1626_1 682_RC_B2_Mm2
NM_1777 85	1682	1739	1073	R C	B2_Mm2	SINE/B2	-94	101	46 >AK040275_1682_1 739_RC_B2_Mm2
NM_1777 85	1776	1952	1036	R C	B2_Mm1t	SINE/B2	-13	180	2 >AK040275_1776_1 952_RC_B2_Mm1t
NM_0074 85	1137	1341	-192	R C	B2_Mm2	SINE/B2	0	195	2 >AK044205_1137_1 341_RC_B2_Mm2
NM_1752 73	537	714	1793	R C	B2_Mm2	SINE/B2	-5	190	1 >AK048762_537_71 4_RC_B2_Mm2
NM_0294 09	1005	1172	2204	R C	B2_Mm1t	SINE/B2	-14	179	1 >AK049449_1005_1 172_RC_B2_Mm1t
NM_0078 36	282	407	2067	R C	B2_Mm2	SINE/B2	-67	128	2 >AK054076_282_40 7_RC_B2_Mm2
NM_0078 36	1764	1860	-614	R C	B2_Mm2	SINE/B2	-97	98	2 >AK054076_1764_1 860_RC_B2_Mm2
NR_0028 91	1	181	2344	R C	B2_Mm1a	SINE/B2	-10	183	2 >AK076350_1_181_RC_B2_Mm1a
NM_0265 00	984	1157	1501	R C	B2_Mm2	SINE/B2	-14	181	1 >AK076438_984_11 57_RC_B2_Mm2
NM_0529 94	2158	2323	1225	R C	B2_Mm2	SINE/B2	-4	191	8 >AK079094_2158_2 323_RC_B2_Mm2
NM_1531 00	1870	2057	1774	R C	B2_Mm2	SINE/B2	0	195	1 >AK086953_1870_2 057_RC_B2_Mm2
NM_1753 13	2088	2261	2958	R C	B2_Mm2	SINE/B2	-9	186	14 >AK132441_2088_2 261_RC_B2_Mm2

# ES 2 855 577 T3

Gen con AS_refseq	inicio B2	fin B2		hebra	subtipo				Leyenda; ID clon ADNc_posición de inicio del alineamiento_final de alineamiento_tipo de elemento de Repetición
NM_00 11 14140	5305	5461	-1145	R C	B2_Mm2	SINE/B2	-38	157	2 >AK133162_5305_5 461_RC_B2_Mm2
NM_0095 79	1059	1251	-2941	R C	B2_Mm2	SINE/B2	0	195	1 >AK137370_1059_1 251_RC_B2_Mm2
NM_0105 67	1613	1794	-1882	R C	B2_Mm2	SINE/B2	-2	193	1 >AK138181_1613_1 794_RC_B2_Mm2
NM_0010 08423	2088	2222	-57	R C	B2_Mm2	SINE/B2	-60	135	1 >AK141165_2088_2 222_RC_B2_Mm2
NM_1990 27	935	1064	-63	R C	B2_Mm2	SINE/B2	-65	130	1 >AK141411_935_10 64_RC_B2_Mm2
NM_0010 33316	3103	3283	-440	R C	B2_Mm2	SINE/B2	-5	190	2 >AK145736_3103_3 283_RC_B2_Mm2
NR_0034 92	748	810	-977	R C	B2_Mm1a	SINE/B2	-6	187	123 >AK147092_748_81 0_RC_B2_Mm1a
NM_0105 67	935	1129	-78	R C	B2_Mm2	SINE/B2	0	195	2 >AK148373_935_11 29_RC_B2_Mm2
NM_0261 15	3593	3791	-204	R C	B2_Mm2	SINE/B2	-1	194	1 >AK155374_3593_3 791_RC_B2_Mm2
NM_0103 98	1080	1265	-909	R C	B2_Mm2	SINE/B2	-8	187	1 >AK157261_1080_1 265_RC_B2_Mm2
NM_0078 93	764	820	-1012	R C	B2_Mm2	SINE/B2	-94	101	47 >AK163105_764_82 0_RC_B2_Mm2
NM_0078 93	894	1062	-938	R C	B2_Mm2	SINE/B2	-13	182	1 >AK163105_894_10 62_RC_B2_Mm2
NM_0078 93	1390	1436	-564	R C	B2_Mm2	SINE/B2	-5	190	137 >AK163105_1390_1 436_RC_B2_Mm2
NM_0078 93	1436	1490	-510	R C	B2_Mm2	SINE/B2	-94	101	47 >AK163105_1436_1 490_RC_B2_Mm2
NM_0078 93	1543	1701	-299	R C	B2_Mm1t	SINE/B2	-24	169	1 >AK163105_1543_1 701_RC_B2_Mm1t
NM_1771 86	1783	1964	-258	R C	B2_Mm1t	SINE/B2	-7	186	2 >AK163831_1783_1 964_RC_B2_Mm1t
NM_0307 14	1401	1588	-809	R C	B2_Mm2	SINE/B2	0	195	3 >AK165234_1401_1 588_RC_B2_Mm2
NM_0011 10101	1253	1420	-1139	R C	B2_Mm2	SINE/B2	-22	173	2 >AK169421_1253_1 420_RC_B2_Mm2
NM_0076 01	387	544	-1715	R C	B3A	SINE/B2	-22	176	1 >AK016423_387_54 4_RC_B3A
NM_0273 46	1459	1690	-74	R C	B3	SINE/B2	-2	214	1 >AK019925_1459_1 690_RC_B3
NM_1386 64	1382	1411	-1334	R C	B3A	SINE/B2	-14	50	21 >AK028982_1382_1 411_RC_B3A
NM_0138 40	160	290	-556	R C	B3	SINE/B2	-79	137	9 >AK029359_160_29 0_RC_B3
NM_0138 40	774	960	-72	R C	B3	SINE/B2	-7	209	1 >AK029359_774_96 0_RC_B3
NM_1535 91	769	982	-1569	R C	B3	SINE/B2	-6	210	1 >AK032194_769_98 2_RC_B3
NM_0287 94	1926	2130	-654	R C	B3	SINE/B2	-12	204	2 >AK032215_1926_2 130_RC_B3
NM_0010 12311	1317	1437	-1013	R C	B3	SINE/B2	-44	172	38 >AK034331_1317_1 437_RC_B3

# ES 2 855 577 T3

Gen con AS_refseq	inicio B2	fin B2		hebra	subtipo				Leyenda; ID clon ADNc_posición de inicio del alineamiento_final de alineamiento_tipo de elemento de Repetición
NM_0010 12311	1335	1437	-1013	R C	B3A	SINE/B2	-54	144	38 >AK034331_1335_1 437_RC_B3A
NM_1341 22	1094	1205	-719	R C	B3	SINE/B2	-88	128	1 >AK035015_1094_1 205_RC_B3
NM_1535 79	1443	1617	-577	R C	B3	SINE/B2	-2	214	45 >AK035406_1443_1 617_RC_B3
NM_1535 79	1483	1633	-561	R C	B3A	SINE/B2	-18	180	27 >AK035406_1483_1 633_RC_B3A
NM_0010 81014	1615	1715	-218	R C	B3A	SINE/B2	-88	110	1 >AK039704_1615_1 715_RC_B3A
NM_0187 47	432	531	-1672	R C	B3A	SINE/B2	-31	167	49 >AK040672_432_53 1_RC_B3A
NM_1768 41	1677	1886	-64	R C	B3	SINE/B2	0	216	2 >AK041236_1677_1 886_RC_B3
NM_1338 78	1676	1882	-314	R C	B3	SINE/B2	-7	209	1 >AK041654_1676_1 882_RC_B3
NM_1452 15	2334	2533	-484	R C	B3	SINE/B2	0	216	3 >AK041742_2334_2 533_RC_B3
NM_1453 69	1132	1336	-593	R C	B3	SINE/B2	-7	209	5 >AK042861_1132_1 336_RC_B3
NM_1726 91	248	442	-151	R C	B3A	SINE/B2	-18	180	10 >AK043958_248_44 2_RC_B3A
NM_0074 85	938	1127	-202	R C	B3	SINE/B2	-37	179	2 >AK044205_938_11 27_RC_B3
NM_0074 85	989	1127	-202	R C	B3A	SINE/B2	-57	141	2 >AK044205_989_11 27_RC_B3A
NM_0079 25	592	713	-719	R C	B3	SINE/B2	-54	162	39 >AK045677_592_71 3_RC_B3
NM_1770 06	3566	3620	-1104	R C	B3	SINE/B2	-16 0	56	2 >AK046828_3566_3 620_RC_B3
NM_0106 33	431	640	-591	R C	B3	SINE/B2	-4	212	8 >AK047213_431_64 0_RC_B3
NM_0106 33	457	640	-591	R C	B3A	SINE/B2	-7	191	8 >AK047213_457_64 0_RC_B3A
NM_0088 42	1460	1636	-53	R C	B3A	SINE/B2	-4	194	10 >AK047301_1460_1 636_RC_B3A
NM_1994 76	2716	2780	-1664	R C	B3A	SINE/B2	-36	162	98 >AK047540_2716_2 780_RC_B3A
NM_0135 14	1203	1416	-311	R C	B3	SINE/B2	0	216	1 >AK048309_1203_1 416_RC_B3
NM_0807 93	2342	2396	-1333	R C	B3A	SINE/B2	-5	193	144 >AK048747_2342_2 396_RC_B3A
NM_0807 93	2430	2530	-1199	R C	B3A	SINE/B2	-55	143	47 >AK048747_2430_2 530_RC_B3A
NM_0010 38621	159	275	-1447	R C	B3	SINE/B2	-56	160	34 >AK053130_159_27 5_RC_B3
NM_0078 36	1747	1860	-614	R C	B3	SINE/B2	-97	119	2 >AK054076_1747_1 860_RC_B3
NM_0108 78	1134	1337	-1192	R C	B3	SINE/B2	0	216	1 >AK078161_1134_1 337_RC_B3
NM_0116 70	521	690	-995	R C	B3	SINE/B2	-60	156	1 >AK078321_521_69 0_RC_B3

# ES 2 855 577 T3

Gen con AS_refseq	inicio B2	fin B2		hebra	subtipo				Leyenda; ID clon ADNc_posición de inicio del alineamiento_final de alineamiento_tipo de elemento de Repetición
NM_0260 86	882	1046	-355	R C	B3A	SINE/B2	-18	180	1 >AK079515_882_10 46_RC_B3A
NM_0253 96	1081	1179	-370	R C	B3	SINE/B2	-27	189	75 >AK080749_1081_1 179_RC_B3
NM_0079 23	2420	2567	-582	R C	B3A	SINE/B2	-48	150	4 >AK086589_2420_2 567_RC_B3A
NM_0284 27	1420	1597	-495	R C	B3	SINE/B2	-5	211	2 >AK090347_1420_1 597_RC_B3
NM_0261 57	1871	2066	1227	R C	B3A	SINE/B2	0	198	5 >AK132393_1871_2 066_RC_B3A
NM_0261 57	2342	2408	-885	R C	B3A	SINE/B2	-13 1	67	1 >AK132393_2342_2 408_RC_B3A
NM_0261 57	2473	2606	-687	R C	B3A	SINE/B2	-25	173	28 >AK132393_2473_2 606_RC_B3A
NM_1753 13	2113	2261	2958	R C	B3	SINE/B2	-40	176	14 >AK132441_2113_2 261_RC_B3
NM_1753 13	4127	4308	-948	R C	B3	SINE/B2	-6	210	28 >AK132441_4127_4 308_RC_B3
NM_0242 82	1137	1290	-91	R C	B3A	SINE/B2	-39	159	1 >AK132990_1137_1 290_RC_B3A
NM_1773 28	277	358	1283	R C	B3A	SINE/B2	-56	142	66 >AK134874_277_35 8_RC_B3A
NM_1773 28	405	484	1157	R C	B3A	SINE/B2	-13 3	65	1 >AK134874_405_48 4_RC_B3A
NM_1773 28	545	713	-928	R C	B3A	SINE/B2	-4	194	14 >AK134874_545_71 3_RC_B3A
NM_1773 28	787	971	-670	R C	B3A	SINE/B2	-4	194	7 >AK134874_787_97 1_RC_B3A
NM_0218 99	161	307	1092	R C	B3A	SINE/B2	-46	152	1 >AK135206_161_30 7_RC_B3A
NM_0103 32	228	409	1967	R C	B3	SINE/B2	-28	188	2 >AK135599_228_40 9_RC_B3
NM_1724 07	1470	1683	-74	R C	B3	SINE/B2	-5	211	2 >AK143014_1470_1 683_RC_B3
NM_0010 09935	1389	1495	-157	R C	B3	SINE/B2	-96	120	1 >AK143784_1389_1 495_RC_B3
NM_0198 27	2953	3143	1064	R C	B3	SINE/B2	-1	215	1 >AK145079_2953_3 143_RC_B3
NM_0112 12	2131	2283	1263	R C	B3A	SINE/B2	-47	151	2 >AK148045_2131_2 283_RC_B3A
NM_0105 67	984	1129	-78	R C	B3A	SINE/B2	-60	138	2 >AK148373_984_11 29_RC_B3A
NM_00 11 10504	1406	1594	-400	R C	B3A	SINE/B2	-10	188	2 >AK149403_1406_1 594_RC_B3A
NM_0260 36	2270	2439	0	R C	B3	SINE/B2	-4	212	27 >AK149843_2270_2 439_RC_B3
NM_0103 98	1292	1476	-698	R C	B3A	SINE/B2	-11	187	3 >AK157261_1292_1 476_RC_B3A
NM_00 11 10504	1292	1362	-572	R C	B3A	SINE/B2	-11 2	86	11 >AK160921_1292_1 362_RC_B3A
NM_0078 93	1080	1254	-746	R C	B3	SINE/B2	0	216	21 >AK163105_1080_1 254_RC_B3

Gen con AS_refseq	inicio B2	fin B2		hebra	subtipo				Leyenda; ID clon ADNc_posición de inicio del alineamiento_final de alineamiento_tipo de elemento de Repetición
NM_0078 93	1427	1491	-509	R C	B3A	SINE/B2	-82	116	46 >AK163105_1427_1 491_RC_B3A
NM_0307 14	1954	2064	-333	R C	B3	SINE/B2	-95	121	2 >AK165234_1954_2 064_RC_B3
NM_0011 10101	853	1043	1516	R C	B3	SINE/B2	-5	211	6 >AK169421_853_10 43_RC_B3
NM_0011 10101	1742	1936	-623	R C	B3	SINE/B2	-2	214	8 >AK169421_1742_1 936_RC_B3

### Aplicabilidad industrial

De acuerdo con la presente invención, es posible proporcionar una molécula de ácido nucleico funcional que tenga la función de mejora de la eficacia de traducción de un ARN y su uso.

### 5 [Lista de secuencias]

Lista de secuencias RK23223PCT

#### Lista de secuencias

<110> RIKEN, ESCUELA INTERNACIONAL DE ESTUDIOS AVANZADOS

<120> MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEICO FUNCIONAL Y SU USO

10 <130> RK23223PCT

<150> US 61/469,399  
<151> 30-03-2011

<160> 47

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1

<211> 250

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 1

tgcctcccg actggcatg ttagcacgca cctgtgattc cagcagctga gagagaggcc 60

gagccccacat ggaatccatt gtgcagtgc agaggaggc agaagaggc attggatccc 120

ccagaactgg agttatacgg taacctcgta gtggtgtga accaccatgt ggatggatat 180

tgagttccaa acactggtec tgtgcaagag catccagtgc tcttaagtgc tgagccatct 240

20 cttagtc 250

<210> 2

<211> 363

<212> ADN

<213> Mus musculus

# ES 2 855 577 T3

<400> 2		
gtgtccccg gactggcat gtagcacgc acctgtgatt ccagcagctg agagagaggc	60	
cgagccaca tggaatccat tgtcagtgc tagaggaggt cagaagaggg cattggatcc	120	
cccagaactg gagttatacg gtaacctcggttgc aaccaccatg tggatggata	180	
tttagttcca aacactggtc ctgtcaaga gcatccagtg ctcttaagtgc tgagccatc	240	
tcttagctc cagtctcta aaaaacaaac aaacgaacga acagcaaggg agctggtat	300	
gacaacacat actataattc tagtactcag gatgctgaaa caggaggatt gcctgactgg	360	
 gag	363	
<210> 3		
<211> 187		
5 <212> ADN		
<213> Mus musculus		
<400> 3		
ttatTTaaa tatatgagta ttacacctgc ataggcac agtacccaca gagactagaa	60	
gagggtggca gatctctga gactggagtt aatgctgtg agctgccatg tggatgctgg	120	
aaatcaaacc caggtectt ggaaggcagg caggtgtct taatcatgga agcatcttt	180	
 cagtc	187	
<210> 4		
<211> 1146		
10 <212> ADN		
<213> Mus musculus		

## ES 2 855 577 T3

<400> 4  
 gggagttcga gccctttgg cttccctct ctgcttgtt ctgctccgt ctcccctgct 60

caggcttcc cagttagcga ggccggcgct ttataacagc agcctggcg gctccaccgg 120

ctgttttc ggctcctcggtttgtct gcaggtgcca tccgcaaga tgcaactgaa 180

gccgatggag attaaccggc agatgctgaa caaatgttg gccaagctgg gggtcgcgg 240

ccagtggcgc ttgcgcacg tgcgtggct ggaggaggag actctggct cagtgcac 300

ccctgcctgc gccctgtgc tcctgttcc ctcacggcc cagcatgaaa acttcaggaa 360

aaagcaaatt gaggaactga agggacagga agttggccct aaagtttact tcatgaagca 420

gaccatcgga aactcctgtgttaccatcggtttgatccac gcagtggcca acaaccaaga 480

caagctggaa ttggaggatg gatccgtcct gaaacagttt ctgtctgaaa cggagaagct 540

gtcccccgaa gatagagcca agtgttcga gaagaacgag gccatccagg cggeccatga 600

ctccgtggcc caggaggggc agtgtcggtt agatgacaaa gtgaatttcc attttattct 660

gttcaacaac gtggacggcc atctgtacga gctcgatgg cgaatgcctt ttccagtgaa 720

ccatggcgcc agtcagagg actctctgtt gcaggatgtt gccaagggtt gcagagaatt 780

cactgagcgc gaggcagggg aggtccgcctt ctctgcgtt gctctctgca aagcagctt 840

agtctgggaa gagagaacca gccatcccc cttccctgg gcagggtgcgc gcccggcc 900

cttggtttgc agcttagcga cttagaacca cagctgttctt cttgcgttctt acagccccat 960

ccctccacc ccacccaggc caccaggggg ctctgtcaca gccacaccag gctgagact 1020

tccctctgttgc tttttttttt accttgcctt ctacggtctt tttggtttctt gtctgttaagt 1080

taegggccctg gatgtggttt gtcttagtcct taagaggaag aataaaactt tgctggtgag 1140

agtatac 1146

5 <210> 5  
 <211> 875  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

# ES 2 855 577 T3

<400> 5	
atccatccgc gccacccgga agccgcggct catactaaca gttattgccg gtggccctac	60
ggtaaacgcc gcactcctgt accggtgcgcc gtcatggcga cgccccgaa acggccggcc	120
ttggatacgg tggggagaaa agtgctcggt tacgagacct ttatcagtga cgtactgcag	180
cgagacttgc aaaagggtgct ggatcatcga gacaaggat atgagcagct gtccgtatat	240
cttcaactaa gaaatgtcat tgagcgactc cagggaaacta atcactcgga gttatataatg	300
caggtggatt tggctgtaa ctcttcgtt gacacagtgg tccagatac ttcacgcata	360
tatgtggccc tgggatatgg ttttcctg gaactgacac tggctgaage actcaagttc	420
attgaccgaa agagttctct ctcacagag ctcagegaca gcctcaccaa ggactccatg	480
aatatcaagg cccatatcca catgatgcta gagggactta gagaactaca aggccctgcag	540
aatttcccag agccatetcc ccattgactg catcttccca gcctccaata ttaaaggcacc	600
tgaatgcctt ggaatcacat agtcctttt tccctaattc tcactaattt actaagtgcc	660
ctagagacca aaattactgg aagacccatc cttctgttag aacctctaaa acgttctaga	720
ggtcttgcct agaacttgcg ttttctct gactttatgc tttactctct tttgtcgct	780
ttagaaccctt ggcctgctc ctcacaattc ctttccttag atatttgtat ctgtgccctt	840
tgtcttacca taaagaatgg actgaatggg ctgaa	875
5 <210> 6	
<211> 748	
<212> ADN	
<213> Mus musculus	

# ES 2 855 577 T3

<400> 6	
atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac	60
 ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac	120
 ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgccctgccc ctggccacc	180
 ctcgtgacca ccctgaccta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccgaa ccacatgaag	240
 cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatttc	300
 ttcaaggacg acggcaacta caagacccgc gcccggatgtga agttcgaggg cgacaccctg	360
 gtgaaccgca tcgagctgaa ggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac	420
 aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac	480
 ggcatcaagg tgaactcaa gatccggcac aacatcgagg acggcagcgt gcagctgcc	540
 gaccactacc agcagaacac cccatcgcc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac	600
 tacctgagca cccatcgcc cctgagcaaa gacccaaacg agaagcgca tcacatggtc	660
 ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctggca tggacgagct gtacaagtcc	720
 ggactcagat ctgcgactca agttcgaa	748
5 <210> 7	
<211> 1685	
<212> ADN	
<213> Mus musculus	

ES 2 855 577 T3

<400> 7

aaacgatgct cttggaggat agggacagag actgcgcgcc gcgecaactca ctttgttcag	60
catctgaaag ccaaaggcaa agaggaaaat gataataaaa ctaaatgatt cagctaccga	120
gctgttagcta agggtcagcc ttatctcc cgaagcgacc cagcagctat gcttacctcg	180
gggttaatct ccatcggtt cagctgcatt ttcgcggatg gcacctgcag acacaaaccc	240
gaggagccga aaaaacagcc ggtggagecg cccaggctgc tgttataaag cgccggcctc	300
gctcactggg aaagcctgag caggggagac gggagcagaa acaagcagag gaggaaggcc	360
aagagggctc gaactcccc atgcacgcga cagaatgta caagccaage cccaaacct	420
tgeagtctca ctgcgcgaag tgcgtccgg actggcatg gtagcaegca cctgtgatc	480
cagcagctga gagagaggcc gageccacat ggaatccatt gtgcagtget agaggaggtc	540
agaagagggc attggatccc ccagaactgg agttatacgg taacctcgta gtggttgtga	600
accaccatgt ggatggatat tgagttcaa acactggtcc tgtgcaagag catccagtgc	660
tcttaagtgc tgagccatct cttagctcc agtctcttaa aaaacaaaca aacgaacgaa	720
cagcaaggga gctgggtatg acaacacata ctataattct agtactcagg atgctgaaac	780

## ES 2 855 577 T3

aggaggattt cctgactggg agatataagg agaatctgtt gtcacccca cccctcccc 840  
 taaaggcaga ataaaagaac gtcctataaa caaataaaca aacaacccaa taaaacaaaa 900  
 ccaagatetc tccacccttt ctggcttt tcagactttg taataaggcc ctggagtg 960  
 caggatattt ggcaggacaa gcagagaggg agaccatcg ttcttcctt gatcaagaag 1020  
 actatgttcc ttagcaaact ggtgtgtatt atctcttatg caatgagcct ggaaagaggg 1080  
 cacagccacc gaggatggta cagcatggat ggtggtaacg ctacagagac tcggagccc 1140  
 aactgtgagt ggctgactgg catggtaggt tcaggaaaga attggctgt gaagaaaatg 1200  
 ttctgaaaaa gtgaacaagg tgcaggaggt aggagtgggt cctggcaaa gcaggggtg 1260  
 catccagcc tcagggataa gcacagcaga ggtctgttgc tgcatgcgag tgcatgacct 1320  
 gcttgccaaat agacgatcaa gaatggcaaa agcatcatgg gtgatgagtg ggagagggga 1380  
 tgagacattt ctgtccct gctgagactt ccattgaacc gatgagttct gaatagaaga 1440  
 tgccccccca cccccccacc agtgtagaat ctgaagggag gcatatatta ccctatatta 1500  
 ctctgtgttg gggcgaget atctgacagc caacccccc atacattca ttggcatac 1560  
 actaatgaca ggaagttcct ttgtttgttca tgcaagagat ggctcacacg atggagaatt 1620  
 taatcttggttt agtttggttt ttatgtgtcc taaattttgt tcaataaaaaa tgaaacactc 1680  
 ctatg 1685  
 <210> 8  
 <211> 1145  
 5 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

# ES 2 855 577 T3

<400> 8  
tagtctcgct gcagtacgtc actgataaaag ccactcaacg ttggggatga cttcttcgg . 60

ctcgagctac ggagttgctt ctgccaacc cgatttgga actcgttcac tcacccgtac 120

aggagtaacgg cgtttaccgt agggccaccc gcaataactg ccagaagaag ttgtgggatt 180

cccttggact ggagcaacca acagtttgt tgeaccatgt gggtaatggg aatcgaacct 240

gggtctctta taagactggc cagtgcctt aactactgag gtgcatttct ttcggaattg 300

attcacataa ctattatgct atactgttg aagtatttt tagaaaaaca tcagaaagag 360

atttggacca ctttcattta catgaagaaa tatcttaggg ttctttca ggtatcttg 420

agtatcttct gacactagaa gatcctgtaa actctacaga cttcaacaga attgaagaac 480

ctggacagag cagagttacc aacaagagag cccagggata gcattaacat ggtggttact 540

caagacctaa ctcagccagg gagacatacc aaggcctatg aggtgaaggg aaaagaaggg 600

tgacccaaag ggcaggaatt tttatcctg aacttttag ccttatagaa aaacataatt 660

tgttggcat gtttctgac cctcatacag ttttacaac catttgaaga tatagttcta 720

gctctagtag gctctacagg aagttatatc aaactttta acagaacact ttattttt 780

aaatatatga gtatttcacc tgcataggcg cacagtaccc acagagacta gaagagggtg 840

gcagatctcc tgagactgga gttaatgcct gtgagctgcc atgtggatgc tggaaatcaa 900

acccagggtcc ttggaaaggc aggccagggtgc tcttaatcat ggaagcatct cttcagctcc 960

taccctagtt cttaatttt gtttaaattt ttgaggtag gttttgcta agttacttgg 1020

gctggccttg gactagtaac cattctgtgt cagccttcgt ggatttagagg tatgtgctag 1080

catgtctage atctttctat ttctttgggtt ttccctctaa ttaattaaaa aatacattat 1140

cttct 1145

5 <210> 9  
<211> 209  
<212> ADN  
<213> Mus musculus

# ES 2 855 577 T3

<400> 9		
gggctggaga gatggctcag tggtaagag cacctgactg ctttccagc ggtctgagt	60	
tcaattcca gcaaccacat ggtggctcac aaccatgtt aatgagatct gatgcctct	120	
tctggtgtgt ctgaagacag ctacagtta cttacatata ataaataaaat aaataaataa	180	
atcttaaaaa aaaaaaaaaaag aaagaaaaaa	209	
<210> 10		
<211> 228		
5 <212> ADN		
<213> Mus musculus		
<220>		
<221> rasgo_misc		
<222> (125)..(125)		
10 <223> n es a, c, g o t		
<400> 10		
ggggctggag agatagctca gcggtaaga gcactggctg ctttccaga ggaccgggt	60	
tcggttcca gcacccacat ggccgctcac aaccgtctgt aactctagg ccagggate	120	
tracncctc ttctgacctc cacggcacc aggcacgcac gtggcacaca gacgtacatg	180	
cargcaaaac actcatacac ataaaataaa aataaatmtt twaaaaaa	228	
<210> 11		
<211> 1013		
15 <212> ADN		
<213> Mus musculus		

# ES 2 855 577 T3

<400> 11	
cggtccctcg ggtttggtc tgcagggtgcc atccgcaag atgcagctga agccgatgga	60
 gattaacccc gagatgctga acaaagtgtt gccaaagctg ggggtcgccg gccagtggcg	120
 cttcggcgcac gtgcttagggc tggaggagga gactctggc tcagtgcctt cccctgcctg	180
 cgccctgctg ctccgtttc ccctcacggc ccagcatgaa aacttcagga aaaagcaaat	240
 tgaggaactg aagggacagg aagtttagccc taaagttac ttcatgaagc agaccatcg	300
 aaactcctgt ggttccatcg ggttgcattca cgcaatggcc aacaaccaag acaagctgga	360
 attttaggat ggatccgtcc tgaaacagtt tctgtctgaa acggagaagc tgtccccga	420
 agatagagcc aagtgtttcg agaagaacga ggccatccag gcccgcattg actccgtggc	480
 ccaggagggc cagtgtcggg tagatgacaa agtgaattt cattttattc tgtcaacaa	540
 cgtggacggc catctgtacg agtcgtatgg gegaatgccc tttccagtga accatggcg	600
 cagtcagag gactctctgc tgcaggatgc tgccaagggtc tgcaagaaat tcactgagcg	660
 cgagcagggg gaggtccgt tctctgcgt ggctctctgc aaagcagtt aagtctgggg	720
 agagagaacc agecgatccc ccctccctg ggcagggtgcg cgccgcgc cttggtttgc	780
 cagtttagc acttagaacc acagctgtct tcttgcgttc tacagccccca tccctccac	840
 cccacccagg ccaccagggg gctctgtac agccacacca ggetgagcac ttccctccct	900
 gtgtgtctcg tacttgtc tctacggtct cttgggttc tgtctgtaaat ttacggccct	960
 ggatgtggtt tgtcttagtcc ttaagaggaa gaataaaaact ttgctgggtga gag	1013
5 <210> 12	
<211> 1929	
<212> ADN	
<213> Mus musculus	

ES 2 855 577 T3

<400> 12  
acaaagctca gcccacacgt ggctcgcg aagccctcg actagagtcc gcgggccgtc 60  
  
gccacgcct cgagagctgc tccccgcgt cgttgctgtc cgggtccatc ctccgcacc 120  
  
tccccgtat cgatctctca gtcactccca aaccctaga taactcaggg cagagacgac 180  
  
acccagctgg gcgccccaggc ccagccacct ccattgcaca gggcgcgcc ggctggcg 240  
  
ctccaaacga tgctttgga ggatagggac agagactgct cgcgcgcca ctcactttgt 300  
  
tcagcatctg aaagccaaaa gcaaagagga aaatgataat aaaactaaat gattcagcta 360  
  
ccgagctgta gctaagggtc agccttattt ctcccgaagc gaccagcag ctatgcttac 420  
  
ctcgggtta atctccatcg gettcagctg catttcgcg gatggcaccc geagacacaa 480

# ES 2 855 577 T3

acccgaggag ccgaaaaaac agccggtgga gcccgcagg ctgtgttat aaagcgccgg	540
cctcgctcac tggaaagcc tgagcagggg agacgggagc agaaacaagc agaggaggaa	600
ggccaagagg gctegaactc cccatgcac cgacagaat ggtacaagcc aagccccaa	660
acttgcagt ctcactcgcc gaagtgcctcc cggactggg catggtagca cgcacctgt	720
attccagcag ctgagagaga ggccgagccc acatgaaatc cattgtgcag tgctagagga	780
ggtcagaaga gggcattgga tccccagaa ctggagttt acggttaacct cgtgggttt	840
gtgaaccacc atgtggatgg atattgagtt ccaaacaactg gtcctgtca agagcatcca	900
tgctttaa gtgctgagcc atcttttag ctccagtctc taaaaaaaaaca aacaaacgaa	960
cgaacagcaa gggagctggg tatgacaaca catactataa ttctagtact caggatgct	1020
aaacaggagg attgcgtac tggagatata aaggagaatc tggtcacc cccacccctc	1080
cccataaaagg cagaataaaa gaacgtcta taaacaata aacaaacaac ccaataaaaac	1140
aaaaccaaga tcttcacc tttctttgc ttttcagac ttgtataaa ggcctttgg	1200
agtgcaggat attcggcagg acaagcagag agggagacca tcagttttt ctgtatcaa	1260
gaagactatg ttcccttagca aactgggtg tattatctt tatcaatga gcctggaaag	1320
agggcacagc caccgaggat ggtacagcat ggtggatgg tacgtacag agactcggga	1380
gcccaactgt gagttggctga ctggcatggt aggttcaggg aagaattggc ctgtgaagaa	1440
aatgttcttg aaaagtgaac aaggtgcagg aggtaggagt gggctctggg caaagcagg	1500
ggtgcatccc agcctcagg aatgcacag cagaggtctg ttgtatgcgt cgagtgcgt	1560

# ES 2 855 577 T3

	acctgcttc caatagacga tcaagaatgg gcaaageatc atgggtgatg agtgggagag	1620
	gggatgagac attcctttct ccctgctgag acttccattg aaccgatgag ttctgaatag	1680
	aagatcccc cccacccccc caccagtgt aaatctgaag ggaggcatat attaccatat	1740
	attactctgt gttggggcg agctatctga cagccaacct teccatacat ttcatgggc	1800
	atacactaat gacaggaagt tcctttgct tgtatgcaag agatggctca cacgatggag	1860
	aatttaatct tgtagtttg ttatttatgt gtcctaaatt ttgttcaata aaaatgaaac	1920
	actcctatg	1929
	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 13	
	acaaagctca gcccacacgt	20
10	<210> 14	
	<211> 13	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> cebador	
	<400> 14	
	catagggttc att	13
	<210> 15	
	<211> 18	
20	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 15	
25	atgcagctga agccgatg	18
	<210> 16	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 16	
	ttaagctgct ttgcagagag c	21
	<210> 17	
35	<211> 21	

	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
5	<400> 17 cgccgagtga cacagcacaa a	21
	<210> 18 <211> 19 <212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
	<400> 18 taccattctg tgccgtgca	19
15	<210> 19 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> cebador	
	<400> 19 gacctccct agcactgcac a	21
	<210> 20 <211> 15	
25	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
	<400> 20 caatggattc catgt	15
	<210> 21 <211> 17 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> cebador	
	<400> 21 gatataagga gaatctg	17
	<210> 22 <211> 17	
40	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
45	<400> 22 ttatagtgatg tgggtgc	17
	<210> 23 <211> 17 <212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	

	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 23	
	gatataagga gaatctg	17
5	<210> 24	
	<211> 15	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> cebador	
	<400> 24	
	caatggattc catgt	15
	<210> 25	
	<211> 19	
15	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 25	
20	gaattcctcc agtctctta	19
	<210> 26	
	<211> 12	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
25	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 26	
	tgcttagagga gg	12
	<210> 27	
30	<211> 12	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
35	<400> 27	
	gtcaggcaat cc	12
	<210> 28	
	<211> 12	
	<212> ADN	
40	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 28	
	tgcttagagga gg	12
45	<210> 29	
	<211> 11	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
50	<223> cebador	

	<400> 29 aaagagatgg c	11
5	<210> 30 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
10	<400> 30 cacacccgcc accaggtc	18
	<210> 31 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> cebador	
	<400> 31 cccatccccca cccatcacacc	20
20	<210> 32 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador	
25	<400> 32 gcagtggcaa agtggagatt	20
	<210> 33 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> cebador	
	<400> 33 gcagaagggg cgagatgtat	20
35	<210> 34 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> cebador	
	<400> 34 gcacctgcag acacaaacc	19
	<210> 35 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> cebador	
	<400> 35 tcttcagct gctgaaatca	20

	<210> 36 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> cebador  <400> 36 ctgggtgtata tcttttatgc	20
10	<210> 37 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> cebador	
15	<400> 37 ctcccgagtc tctgttagc	18
20	<210> 38 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> cebador  <400> 38 ccggccgata gagccaag	18
25	<210> 39 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220>	
30	<223> cebador  <400> 39 atggttcact gaaaaggg	18
35	<210> 40 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> cebador	
40	<400> 40 ccatgcaccc cacagaatg	19
45	<210> 41 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial  <220> <223> cebador	
50	<400> 41 gaaagctccc tcaaataaggc  <210> 42 <211> 22	20

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
5	<400> 42	
	tgttgttcc aagtgttcat gc	22
	<210> 43	
	<211> 22	
	<212> ADN	
10	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 43	
	cggagcacca catcgatcta ag	22
15	<210> 44	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> cebador	
	<400> 44	
	caacgttggg gatgacttct	20
	<210> 45	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 45	
30	tcgattccca ttacccacat	20
	<210> 46	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
35	<220>	
	<223> cebador	
	<400> 46	
	ttgagcact ccaggaaact	20
	<210> 47	
40	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador	
45	<400> 47	
	gagccttgtt gaggctgtc	19

**REIVINDICACIONES**

1. Una molécula de ácido nucleico funcional que actúa en trans que comprende:

5 (a) una secuencia determinante de la diana que comprende una secuencia antisentido para una secuencia diana en el ARN que codifica la proteína para el que se va a incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas; y

(b) una secuencia reguladora que comprende:

10 (1) un ARN, que está codificado por un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 1;

(2) un ARN, que está codificado por un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 2;

(3) un ARN, que está codificado por un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 3;

(4) un ARN codificado por un ADN que consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias que se muestran en la siguiente tabla:

Gen con AS_refseq	inicio B2	fin B2		hebra	subtipo					Leyenda; ID clon ADNc_posición de Inicio del alineamiento_Final de alineamiento_tipo de elemento de Repetición
NM_177182	973	1013	-2766	+	B2_Mm2	SINE/B2	2	42	-153	>AK032380_973_1013_+_B2_Mm2
NM_009351	859	1044	-1470	+	B2_Mm1t	SINE/B2	2	185	-8	>AK033525_859_1044_+_B2_Mm1t
NM_144515	1564	1718	-761	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	158	-37	>AK033993_1564_1718_+_B2_Mm2
NM_198300	520	712	-1160	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	188	-7	>AK039361_520_712_+_B2_Mm2
NM_028428	1801	1997	-245	+	B2_Mm1t	SINE/B2	1	193	0	>AK042841_1801_1997_+_B2_Mm1t
NM_010661	946	1111	-1515	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	195	0	>AK043817_946_1111_+_B2_Mm2
NM_007485	722	912	-417	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	194	-1	>AK044205_722_912_+_B2_Mm2
NM_010633	971	1164	-67	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	195	0	>AK047213_971_1164_+_B2_Mm2
NM_030207	714	787	-446	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	88	-107	>AK079217_714_787_+_B2_Mm2
NM_145470	1498	1697	-1057	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	193	-2	>AK081722_1498_1697_+_B2_Mm2
NM_024282	1379	1555	-2	+	B2_Mm2	SINE/B2	2	187	-8	>AK132990_1379_1555_+_B2_Mm2
NM_133994	1001	1057	-86	+	B2_Mm2	SINE/B2	2	58	-137	>AK133457_1001_1057_+_B2_Mm2
NM_133994	1057	1137	-6	+	B2_Mm2	SINE/B2	91	171	-24	>AK133457_1057_1137_+_B2_Mm2
NM_178244	2323	2513	-45	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	195	0	>AK133632_2323_2513_+_B2_Mm2
NM_008997	734	923	-3	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	186	-9	>AK133808_734_923_+_B2_Mm2
NM_080555	286	382	-4	+	B2_Mm1t	SINE/B2	75	171	-22	>AK134674_286_382_+_B2_Mm1t
NM_010332	2428	2606	-1	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	183	-12	>AK135599_2428_2606_+_B2_Mm2

# ES 2 855 577 T3

NM_172467	2948	3108	-3	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	162	-33	>AK137583_2948_3108_+_B2_Mm2	
NM_175115	81	274	-2006	+	B2_Mm2	SINE/B2	2	195	0	>AK138675_81_274_+_B2_Mm2	
NM_010071	3150	3339	-54	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	195	0	>AK155102_3150_3339_+_B2_Mm2	
NM_183014	288	442	-20	+	B3A	SINE/B2	48	198	0	>AK015655_288_442_+_B3A	
NM_026555	277	435	-24	+	B3A	SINE/B2	40	198	0	>AK021299_277_435_+_B3A	
NM_033077	1109	1295	-1732	+	B3A	SINE/B2	5	189	-9	>AK029689_1109_1295_+_B3A	
NM_019789	1052	1211	-1195	+	B3	SINE/B2	33	196	-20	>AK030353_1052_1211_+_B3	
NM_178891	2403	2558	-3	+	B3	SINE/B2	20	176	-40	>AK030551_2403_2558_+_B3	
NM_145579	2546	2719	-346	+	B3	SINE/B2	2	206	-10	>AK031007_2546_2719_+_B3	
NM_008510	2255	2404	-429	+	B3A	SINE/B2	57	198	0	>AK034030_2255_2404_+_B3A	
NM_153579	1071	1262	-798	+	B3	SINE/B2	1	214	-2	>AK035406_1071_1262_+_B3	
NM_145942	1006	1219	-681	+	B3	SINE/B2	2	216	0	>AK037188_1006_1219_+_B3	
NM_025788	1871	2045	-757	+	B3	SINE/B2	1	215	-1	>AK039409_1871_2045_+_B3	
NM_008019	877	1044	-1057	+	B3	SINE/B2	2	211	-5	>AK040162_877_1044_+_B3	
NM_001081 475	1431	1582	-6	+	B3	SINE/B2	69	216	0	>AK040401_1431_1582_+_B3	
NM_001081 475	1586	1745	-2	+	B3	SINE/B2	3	206	-10	>AK040401_1586_1745_+_B3	
NM_007485	722	810	-519	+	B3	SINE/B2	1	89	-127	>AK044205_722_810_+_B3	
NM_007485	835	912	-417	+	B3	SINE/B2	138	215	-1	>AK044205_835_912_+_B3	
NM_178794	826	959	-986	+	B3A	SINE/B2	2	129	-69	>AK045196_826_959_+_B3A	
NM_008915	737	940	-298	+	B3	SINE/B2	8	201	-15	>AK046652_737_940_+_B3	
NM_010633	971	1096	-135	+	B3	SINE/B2	1	129	-87	>AK047213_971_1096_+_B3	
NM_199476	3267	3405	-1039	+	B3	SINE/B2	2	149	-67	>AK047540_3267_3405_+_B3	
NM_144795	2052	2248	-546	+	B3	SINE/B2	2	210	-6	>AK048854_2052_2248_+_B3	
#N/A	1858	2028	-5	+	B3A	SINE/B2	1	176	-22	>AK049524_1858_2028_+_B3A	
NM_001038 621	1207	1363	-359	+	B3A	SINE/B2	2	160	-38	>AK053130_1207_1363_+_B3A	
NM_181423	1666	1733	-71	+	B3A	SINE/B2	2	72	-126	>AK054359_1666_1733_+_B3A	
NM_153515	1403	1520	-470	+	B3A	SINE/B2	63	183	-15	>AK078013_1403_1520_+_B3A	

# ES 2 855 577 T3

NM_198415	403	623	-1212	+	B3	SINE/B2	1	216	0	>AK078328_403_623_+ B3
NM_152220	1794	1979	-561	+	B3	SINE/B2	3	213	-3	>AK078537_1794_1979_+ B3
NM_025729	1	165	-203	+	B3	SINE/B2	15	177	-39	>AK079403_1_165_+ B3
NM_016693	1307	1517	-13	+	B3	SINE/B2	2	216	0	>AK080235_1307_1517_+ B3
NM_010151	814	1024	-451	+	B3	SINE/B2	2	216	0	>AK082108_814_1024_+ B3
NM_009713	1690	1882	-5	+	B3	SINE/B2	1	199	-17	>AK082325_1690_1882_+ B3
NM_001029 985	221	280	-1179	+	B3	SINE/B2	108	168	-48	>AK084376_221_280_+ B3
NM_009737	1805	2005	-406	+	B3	SINE/B2	1	207	-9	>AK085337_1805_2005_+ B3
NM_027081	984	1130	-1155	+	B3	SINE/B2	1	162	-54	>AK086470_984_1130_+ B3
NM_018779	876	1062	-530	+	B3A	SINE/B2	2	188	-10	>AK089148_876_1062_+ B3A
NM_027919	1468	1667	-185	+	B3	SINE/B2	1	213	-3	>AK090182_1468_1667_+ B3
NM_011034	434	608	-12	+	B3	SINE/B2	2	216	0	>AK131819_434_608_+ B3
NM_175551	1802	1895	-513	+	B3A	SINE/B2	64	176	-22	>AK132737_1802_1895_+ B3A
NM_175551	1829	1928	-480	+	B3	SINE/B2	101	213	-3	>AK132737_1829_1928_+ B3
NM_007921	951	1134	-1650	+	B3A	SINE/B2	3	187	-11	>AK133325_951_1134_+ B3A
NM_001039 042	1220	1315	-292	+	B3A	SINE/B2	48	142	-56	>AK134755_1220_1315_+ B3A
NM_177328	1378	1504	-285	+	B3	SINE/B2	85	216	0	>AK134874_1378_1504_+ B3
NM_021899	1172	1259	-140	+	B3	SINE/B2	1	95	-121	>AK135206_1172_1259_+ B3
NM_008705	1521	1717	-572	+	B3A	SINE/B2	1	197	-1	>AK136279_1521_1717_+ B3A
NM_001079 932	2116	2299	-702	+	B3	SINE/B2	6	208	-8	>AK137643_2116_2299_+ B3
NM_001079 932	3059	3253	-2	+	B3	SINE/B2	4	205	-11	>AK137643_3059_3253_+ B3
NM_001033 286	2524	2698	-63	+	B3A	SINE/B2	4	181	-17	>AK138296_2524_2698_+ B3A
NM_008962	928	1095	-375	+	B3	SINE/B2	1	153	-63	>AK138521_928_1095_+ B3
NM_175349	2151	2347	-181	+	B3A	SINE/B2	11	196	-2	>AK139254_2151_2347_+ B3A
NM_177003	1277	1466	0	+	B3	SINE/B2	1	200	-16	>AK139647_1277_1466_+ B3
NM_007965	1338	1488	-5	+	B3	SINE/B2	51	216	0	>AK140072_1338_1488_+ B3
NM_010192	1808	1933	-45	+	B3	SINE/B2	1	126	-90	>AK140346_1808_1933_+ B3

# ES 2 855 577 T3

NM_027446	1871	1983	-2794	+	B3A	SINE/B2	1	130	-68	>AK140616_1871_1983 _+_B3A	
NM_027446	2318	2342	-2435	+	B3A	SINE/B2	131	156	-42	>AK140616_2318_2342 _+_B3A	
NM_177186	2061	2142	-351	+	B3	SINE/B2	130	211	-5	>AK142359_2061_2142 _+_B3	
NM_145134	2963	3148	-1292	+	B3	SINE/B2	28	210	-6	>AK142507_2963_3148 _+_B3	
NM_009890	2740	2968	-135	+	B3	SINE/B2	1	216	0	>AK142879_2740_2968 _+_B3	
NM_146055	5202	5272	-94	+	B3	SINE/B2	60	141	-75	>AK143143_5202_5272 _+_B3	
NM_008977	1344	1513	-645	+	B3	SINE/B2	11	205	-11	>AK143279_1344_1513 _+_B3	
NM_026036	2001	2167	-272	+	B3A	SINE/B2	1	169	-29	>AK149843_2001_2167 _+_B3A	
NM_001159 519	1440	1548	-1422	+	B3A	SINE/B2	55	163	-35	>AK157402_1440_1548 + B3A	
NM_001159 519	2503	2556	-558	+	B3	SINE/B2	1	56	-160	>AK157402_2503_2556 _+_B3	
NM_001159 519	2544	2616	-498	+	B3	SINE/B2	109	177	-39	>AK157402_2544_2616 _+_B3	
NM_001159 519	2702	2896	-412	+	B3A	SINE/B2	1	198	0	>AK157402_2702_2896 _+_B3A	
NM_001110 504	1778	1909	-25	+	B3	SINE/B2	58	210	-6	>AK160921_1778_1909 _+_B3	
NM_030714	2153	2335	-62	+	B3	SINE/B2	40	216	0	>AK165234_2153_2335 _+_B3	
NM_025825	945	1052	-383	RC	B2_Mm1a	SINE/B2	-85	108	1	>AK014613_945_1052_ RC_B2_Mm1a	
NM_133756	1102	1289	-246	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-4	191	1	>AK016234_1102_1289 _RC_B2_Mm2	
NM_183294	1565	1750	-1384	RC	B2_Mm1a	SINE/B2	-8	185	4	>AK029702_1565_1750 _RC_B2_Mm1a	
NM_009446	531	710	-2730	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-6	189	2	>AK030803_531_710_R C_B2_Mm2	
NM_025788	1687	1839	-963	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-11	184	1	>AK039409_1687_1839 _RC_B2_Mm2	
NM_177785	1626	1682	-1130	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-4	191	137	>AK040275_1626_1682 _RC_B2_Mm2	
NM_177785	1682	1739	-1073	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-94	101	46	>AK040275_1682_1739 _RC_B2_Mm2	
NM_177785	1776	1952	-1036	RC	B2_Mm1t	SINE/B2	-13	180	2	>AK040275_1776_1952 _RC_B2_Mm1t	
NM_007485	1137	1341	-192	RC	B2_Mm2	SINE/B2	0	195	2	>AK044205_1137_1341 _RC_B2_Mm2	

# ES 2 855 577 T3

NM_175273	537	714	-1793	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-5	190	1		>AK048762_537_714_R C_B2_Mm2
NM_029409	1005	1172	-2204	RC	B2_Mm1t	SINE/B2	-14	179	1		>AK049449_1005_1172_RC_B2_Mm1t
NM_007836	282	407	-2067	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-67	128	2		>AK054076_282_407_R C_B2_Mm2
NM_007836	1764	1860	-614	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-97	98	2		>AK054076_1764_1860_RC_B2_Mm2
NR_002891	1	181	-2344	RC	B2_Mm1a	SINE/B2	-10	183	2		>AK076350_1_181_RC_B2_Mm1a
NM_026500	984	1157	-1501	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-14	181	1		>AK076438_984_1157_RC_B2_Mm2
NM_052994	2158	2323	-1225	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-4	191	8		>AK079094_2158_2323_RC_B2_Mm2
NM_153100	1870	2057	-1774	RC	B2_Mm2	SINE/B2	0	195	1		>AK086953_1870_2057_Rc_B2_Mm2
NM_175313	2088	2261	-2958	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-9	186	14		>AK132441_2088_2261_Rc_B2_Mm2
NM_001114_140	5305	5461	-1145	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-38	157	2		>AK133162_5305_5461_Rc_B2_Mm2
NM_009579	1059	1251	-2941	RC	B2_Mm2	SINE/B2	0	195	1		>AK137370_1059_1251_Rc_B2_Mm2
NM_010567	1613	1794	-1882	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-2	193	1		>AK138181_1613_1794_Rc_B2_Mm2
NM_001008_423	2088	2222	-57	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-60	135	1		>AK141165_2088_2222_RC_B2_Mm2
NM_199027	935	1064	-63	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-65	130	1		>AK141411_935_1064_RC_B2_Mm2
NM_001033_316	3103	3283	-440	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-5	190	2		>AK145736_3103_3283_Rc_B2_Mm2
NR_003492	748	810	-977	RC	B2_Mm1a	SINE/B2	-6	187	123		>AK147092_748_810_R C_B2_Mm1a
NM_010567	935	1129	-78	RC	B2_Mm2	SINE/B2	0	195	2		>AK148373_935_1129_RC_B2_Mm2
NM_026115	3593	3791	-204	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-1	194	1		>AK155374_3593_3791_Rc_B2_Mm2
NM_010398	1080	1265	-909	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-8	187	1		>AK157261_1080_1265_Rc_B2_Mm2
NM_007893	764	820	-1012	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-94	101	47		>AK163105_764_820_RC_B2_Mm2
NM_007893	894	1062	-938	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-13	182	1		>AK163105_894_1062_RC_B2_Mm2
NM_007893	1390	1436	-564	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-5	190	137		>AK163105_1390_1436_Rc_B2_Mm2
NM_007893	1436	1490	-510	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-94	101	47		>AK163105_1436_1490_Rc_B2_Mm2

# ES 2 855 577 T3

NM_007893	1543	1701	-299	RC	B2_Mm1t	SINE/B2	-24	169	1	>AK163105_1543_1701 _RC_B2_Mm1t	
NM_177186	1783	1964	-258	RC	B2_Mm1t	SINE/B2	-7	186	2	>AK163831_1783_1964 _RC_B2_Mm1t	
NM_030714	1401	1588	-809	RC	B2_Mm2	SINE/B2	0	195	3	>AK165234_1401_1588 _RC_B2_Mm2	
NM_001110 101	1253	1420	-1139	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-22	173	2	>AK169421_1253_1420 _RC_B2_Mm2	
NM_007601	387	544	-1715	RC	B3A	SINE/B2	-22	176	1	>AK016423_387_544_R C_B3A	
NM_027346	1459	1690	-74	RC	B3	SINE/B2	-2	214	1	>AK019925_1459_1690_RC_B3	
NM_138664	1382	1411	-1334	RC	B3A	SINE/B2	-148	50	21	>AK028982_1382_1411_RC_B3A	
NM_013840	160	290	-556	RC	B3	SINE/B2	-79	137	9	>AK029359_160_290_R C_B3	
NM_013840	774	960	-72	RC	B3	SINE/B2	-7	209	1	>AK029359_774_960_R C_B3	
NM_153591	769	982	-1569	RC	B3	SINE/B2	-6	210	1	>AK032194_769_982_R C_B3	
NM_028794	1926	2130	-654	RC	B3	SINE/B2	-12	204	2	>AK032215_1926_2130_RC_B3	
NM_001012 311	1317	1437	-1013	RC	B3	SINE/B2	-44	172	38	>AK034331_1317_1437_RC_B3	
NM_001012 311	1335	1437	-1013	RC	B3A	SINE/B2	-54	144	38	>AK034331_1335_1437_RC_B3A	
NM_134122	1094	1205	-719	RC	B3	SINE/B2	-88	128	1	>AK035015_1094_1205_RC_B3	
NM_153579	1443	1617	-577	RC	B3	SINE/B2	-2	214	45	>AK035406_1443_1617_RC_B3	
NM_153579	1483	1633	-561	RC	B3A	SINE/B2	-18	180	27	>AK035406_1483_1633_RC_B3A	
NM_001081 014	1615	1715	-218	RC	B3A	SINE/B2	-88	110	1	>AK039704_1615_1715_RC_B3A	
NM_018747	432	531	-1672	RC	B3A	SINE/B2	-31	167	49	>AK040672_432_531_R C_B3A	
NM_176841	1677	1886	-64	RC	B3	SINE/B2	0	216	2	>AK041236_1677_1886_RC_B3	
NM_133878	1676	1882	-314	RC	B3	SINE/B2	-7	209	1	>AK041654_1676_1882_RC_B3	
NM_145215	2334	2533	-484	RC	B3	SINE/B2	0	216	3	>AK041742_2334_2533_RC_B3	
NM_145369	1132	1336	-593	RC	B3	SINE/B2	-7	209	5	>AK042861_1132_1336_RC_B3	
NM_172691	248	442	-151	RC	B3A	SINE/B2	-18	180	10	>AK043958_248_442_R C_B3A	
NM_007485	938	1127	-202	RC	B3	SINE/B2	-37	179	2	>AK044205_938_1127_RC_B3	
NM_007485	989	1127	-202	RC	B3A	SINE/B2	-57	141	2	>AK044205_989_1127_RC_B3A	
NM_007925	592	713	-719	RC	B3	SINE/B2	-54	162	39	>AK045677_592_713_R C_B3	

# ES 2 855 577 T3

NM_177006	3566	3620	-1104	RC	B3	SINE/B2	-160	56	2		>AK046828_3566_3620_RC_B3
NM_010633	431	640	-591	RC	B3	SINE/B2	-4	212	8		>AK047213_431_640_R C_B3
NM_010633	457	640	-591	RC	B3A	SINE/B2	-7	191	8		>AK047213_457_640_R C_B3A
NM_008842	1460	1636	-53	RC	B3A	SINE/B2	-4	194	10		>AK047301_1460_1636_RC_B3A
NM_199476	2716	2780	-1664	RC	B3A	SINE/B2	-36	162	98		>AK047540_2716_2780_RC_B3A
NM_013514	1203	1416	-311	RC	B3	SINE/B2	0	216	1		>AK048309_1203_1416_RC_B3
NM_080793	2342	2396	-1333	RC	B3A	SINE/B2	-5	193	144		>AK048747_2342_2396 RC_B3A
NM_080793	2430	2530	-1199	RC	B3A	SINE/B2	-55	143	47		>AK048747_2430_2530_RC_B3A
NM_001038 621	159	275	-1447	RC	B3	SINE/B2	-56	160	34		>AK053130_159_275_R C_B3
NM_007836	1747	1860	-614	RC	B3	SINE/B2	-97	119	2		>AK054076_1747_1860_RC_B3
NM_010878	1134	1337	-1192	RC	B3	SINE/B2	0	216	1		>AK078161_1134_1337_RC_B3
NM_011670	521	690	-995	RC	B3	SINE/B2	-60	156	1		>AK078321_521_690_R C_B3
NM_026086	882	1046	-355	RC	B3A	SINE/B2	-18	180	1		>AK079515_882_1046_RC_B3A
NM_025396	1081	1179	-370	RC	B3	SINE/B2	-27	189	75		>AK080749_1081_1179_RC_B3
NM_007923	2420	2567	-582	RC	B3A	SINE/B2	-48	150	4		>AK086589_2420_2567_RC_B3A
NM_028427	1420	1597	-495	RC	B3	SINE/B2	-5	211	2		>AK090347_1420_1597_RC_B3
NM_026157	1871	2066	-1227	RC	B3A	SINE/B2	0	198	5		>AK132393_1871_2066_RC_B3A
NM_026157	2342	2408	-885	RC	B3A	SINE/B2	-131	67	1		>AK132393_2342_2408_RC_B3A
NM_026157	2473	2606	-687	RC	B3A	SINE/B2	-25	173	28		>AK132393_2473_2606_RC_B3A
NM_175313	2113	2261	-2958	RC	B3	SINE/B2	-40	176	14		>AK132441_2113_2261_RC_B3
NM_175313	4127	4308	-948	RC	B3	SINE/B2	-6	210	28		>AK132441_4127_4308_RC_B3
NM_024282	1137	1290	-91	RC	B3A	SINE/B2	-39	159	1		>AK132990_1137_1290_RC_B3A
NM_177328	277	358	-1283	RC	B3A	SINE/B2	-56	142	66		>AK134874_277_358_R C_B3A
NM_177328	405	484	-1157	RC	B3A	SINE/B2	-133	65	1		>AK134874_405_484_R C_B3A
NM_177328	545	713	-928	RC	B3A	SINE/B2	-4	194	14		>AK134874_545_713_R C_B3A
NM_177328	787	971	-670	RC	B3A	SINE/B2	-4	194	7		>AK134874_787_971_R C_B3A
NM_021899	161	307	-1092	RC	B3A	SINE/B2	-46	152	1		>AK135206_161_307_R C_B3A
NM_010332	228	409	-1967	RC	B3	SINE/B2	-28	188	2		>AK135599_228_409_R C_B3

# ES 2 855 577 T3

NM_172407	1470	1683	-74	RC	B3	SINE/B2	-5	211	2	>AK143014_1470_1683_RC_B3
NM_001009 935	1389	1495	-157	RC	B3	SINE/B2	-96	120	1	>AK143784_1389_1495_RC_B3
NM_019827	2953	3143	-1064	RC	B3	SINE/B2	-1	215	1	>AK145079_2953_3143_RC_B3
NM_011212	2131	2283	-1263	RC	B3A	SINE/B2	-47	151	2	>AK148045_2131_2283_RC_B3A
NM_010567	984	1129	-78	RC	B3A	SINE/B2	-60	138	2	>AK148373_984_1129_RC_B3A
NM_001110 504	1406	1594	-400	RC	B3A	SINE/B2	-10	188	2	>AK149403_1406_1594_RC_B3A
NM_026036	2270	2439	0	RC	B3	SINE/B2	-4	212	27	>AK149843_2270_2439_RC_B3
NM_010398	1292	1476	-698	RC	B3A	SINE/B2	-11	187	3	>AK157261_1292_1476_RC_B3A
NM_001110 504	1292	1362	-572	RC	B3A	SINE/B2	-112	86	11	>AK160921_1292_1362_RC_B3A
NM_007893	1080	1254	-746	RC	B3	SINE/B2	0	216	21	>AK163105_1080_1254_RC_B3
NM_007893	1427	1491	-509	RC	B3A	SINE/B2	-82	116	46	>AK163105_1427_1491_RC_B3A
NM_030714	1954	2064	-333	RC	B3	SINE/B2	-95	121	2	>AK165234_1954_2064_RC_B3
NM_001110 101	853	1043	-1516	RC	B3	SINE/B2	-5	211	6	>AK169421_853_1043_RC_B3
NM_001110 101	1742	1936	-623	RC	B3	SINE/B2	-2	214	8	>AK169421_1742_1936_RC_B3

; o

(5) un ARN que es al menos 95% similar al ARN de (1), (2), (3) o (4) y tiene la función de incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas.

5 2. Una molécula de ácido nucleico funcional que actúa en trans según la reivindicación 1, en donde la secuencia determinante de la diana está ubicada entre un extremo 5' terminal y la secuencia reguladora en la molécula de ácido nucleico funcional.

10 3. Una molécula de ácido nucleico funcional que actúa en trans según la reivindicación 1 o 2, en donde la secuencia determinante de la diana tiene al menos 60% de similitud con una secuencia complementaria a una secuencia correspondiente en el ARN que codifica la proteína o una secuencia alrededor del primer codón de inicio 5' terminal de la secuencia que codifica la proteína.

4. Una molécula de ácido nucleico funcional que actúa en trans según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la secuencia reguladora de la molécula de ácido nucleico funcional está orientada en una dirección inversa con respecto a la dirección de traducción.

15 5. Una molécula de ácido nucleico funcional que actúa en trans según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la secuencia determinante de la diana está diseñada para ser hibridable con una 5'-UTR (región no traducida) del ARN que codifica la proteína o una secuencia alrededor de la primera codón de inicio 5'-terminal de la secuencia que codifica la proteína.

6. Un método para producir una molécula de ácido nucleico funcional que actúa en trans de la reivindicación 1, comprendiendo dicho método la etapa de preparar una molécula de ARN que comprende:

- 20 (a) una secuencia determinante de la diana que comprende una secuencia antisentido para una secuencia diana en el ARN que codifica la proteína para el que se va a incrementar la eficacia de síntesis de proteínas; y  
 (b) una secuencia reguladora que comprende:

# ES 2 855 577 T3

- (1) un ARN, que está codificado por un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEC ID NO: 1;
- (2) un ARN, que está codificado por un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID NO: 2;
- 5 (3) un ARN, que está codificado por un ADN que consiste en la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 3;
- (4) un ARN codificado por un ADN que consiste en una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias que se muestran en la siguiente tabla:

Gen con AS_refseq	inicio B2	fin B2		hebra	subtipo					Leyenda; ID clon ADNc_posición de Inicio del alineamiento_Final de alineamiento_tipo de elemento de Repetición
NM_177182	973	1013	-2766	+	B2_Mm2	SINE/B2	2	42	-153	>AK032380_973_1013+_B2_Mm2
NM_009351	859	1044	-1470	+	B2_Mm1t	SINE/B2	2	185	-8	>AK033525_859_1044+_B2_Mm1t
NM_144515	1564	1718	-761	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	158	-37	>AK033993_1564_1718+_B2_Mm2
NM_198300	520	712	-1160	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	188	-7	>AK039361_520_712+_B2_Mm2
NM_028428	1801	1997	-245	+	B2_Mm1t	SINE/B2	1	193	0	>AK042841_1801_1997+_B2_Mm1t
NM_010661	946	1111	-1515	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	195	0	>AK043817_946_1111+_B2_Mm2
NM_007485	722	912	-417	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	194	-1	>AK044205_722_912+_B2_Mm2
NM_010633	971	1164	-67	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	195	0	>AK047213_971_1164+_B2_Mm2
NM_030207	714	787	-446	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	88	-107	>AK079217_714_787+_B2_Mm2
NM_145470	1498	1697	-1057	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	193	-2	>AK081722_1498_1697+_B2_Mm2
NM_024282	1379	1555	-2	+	B2_Mm2	SINE/B2	2	187	-8	>AK132990_1379_1555+_B2_Mm2
NM_133994	1001	1057	-86	+	B2_Mm2	SINE/B2	2	58	-137	>AK133457_1001_1057+_B2_Mm2
NM_133994	1057	1137	-6	+	B2_Mm2	SINE/B2	91	171	-24	>AK133457_1057_1137+_B2_Mm2
NM_178244	2323	2513	-45	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	195	0	>AK133632_2323_2513+_B2_Mm2

# ES 2 855 577 T3

NM_008997	734	923	-3	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	18 6	-9	>AK133808_734_923_+_B2_Mm2
NM_080555	286	382	-4	+	B2_Mm1t	SINE/B2	75	17 1	-22	>AK134674_286_382_+_B2_Mm1t
NM_010332	2428	2606	-1	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	18 3	-12	>AK135599_2428_2606_+_B2_Mm2
NM_172467	2948	3108	-3	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	16 2	-33	>AK137583_2948_3108_+_B2_Mm2
NM_175115	81	274	-2006	+	B2_Mm2	SINE/B2	2	19 5	0	>AK138675_81_274_+_B2_Mm2
NM_010071	3150	3339	-54	+	B2_Mm2	SINE/B2	1	19 5	0	>AK155102_3150_3339_+_B2_Mm2
NM_183014	288	442	-20	+	B3A	SINE/B2	48	19 8	0	>AK015655_288_442_+_B3A
NM_026555	277	435	-24	+	B3A	SINE/B2	40	19 8	0	>AK021299_277_435_+_B3A
NM_033077	1109	1295	-1732	+	B3A	SINE/B2	5	18 9	-9	>AK029689_1109_1295_+_B3A
NM_019789	1052	1211	-1195	+	B3	SINE/B2	33	19 6	-20	>AK030353_1052_1211_+_B3
NM_178891	2403	2558	-3	+	B3	SINE/B2	20	17 6	-40	>AK030551_2403_2558_+_B3
NM_145579	2546	2719	-346	+	B3	SINE/B2	2	20 6	-10	>AK031007_2546_2719_+_B3
NM_008510	2255	2404	-429	+	B3A	SINE/B2	57	19 8	0	>AK034030_2255_2404_+_B3A
NM_153579	1071	1262	-798	+	B3	SINE/B2	1	21 4	-2	>AK035406_1071_1262_+_B3
NM_145942	1006	1219	-681	+	B3	SINE/B2	2	21 6	0	>AK037188_1006_1219_+_B3
NM_025788	1871	2045	-757	+	B3	SINE/B2	1	21 5	-1	>AK039409_1871_2045_+_B3
NM_008019	877	1044	-1057	+	B3	SINE/B2	2	21 1	-5	>AK040162_877_1044_+_B3
NM_001081 475	1431	1582	-6	+	B3	SINE/B2	69	21 6	0	>AK040401_1431_1582_+_B3
NM_001081 475	1586	1745	-2	+	B3	SINE/B2	3	20 6	-10	>AK040401_1586_1745_+_B3
NM_007485	722	810	-519	+	B3	SINE/B2	1	89	- 12 7	>AK044205_722_810_+_B3

# ES 2 855 577 T3

NM_007485	835	912	-417	+	B3	SINE/B2	13 8	21 5	-1	>AK044205_835_912_+_B3
NM_178794	826	959	-986	+	B3A	SINE/B2	2	12 9	-69	>AK045196_826_959_+_B3A
NM_008915	737	940	-298	+	B3	SINE/B2	8	20 1	-15	>AK046652_737_940_+_B3
NM_010633	971	1096	-135	+	B3	SINE/B2	1	12 9	-87	>AK047213_971_1096_+_B3
NM_199476	3267	3405	-1039	+	B3	SINE/B2	2	14 9	-67	>AK047540_3267_3405_+_B3
NM_144795	2052	2248	-546	+	B3	SINE/B2	2	21 0	-6	>AK048854_2052_2248_+_B3
#N/A	1858	2028	-5	+	B3A	SINE/B2	1	17 6	-22	>AK049524_1858_2028_+_B3A
NM_001038 621	1207	1363	-359	+	B3A	SINE/B2	2	16 0	-38	>AK053130_1207_1363_+_B3A
NM_181423	1666	1733	-71	+	B3A	SINE/B2	2	72	- 12 6	>AK054359_1666_1733_+_B3A
NM_153515	1403	1520	-470	+	B3A	SINE/B2	63	18 3	-15	>AK078013_1403_1520_+_B3A
NM_198415	403	623	-1212	+	B3	SINE/B2	1	21 6	0	>AK078328_403_623_+_B3
NM_152220	1794	1979	-561	+	B3	SINE/B2	3	21 3	-3	>AK078537_1794_1979_+_B3
NM_025729	1	165	-203	+	B3	SINE/B2	15	17 7	-39	>AK079403_1_165_+_B3
NM_016693	1307	1517	-13	+	B3	SINE/B2	2	21 6	0	>AK080235_1307_1517_+_B3
NM_010151	814	1024	-451	+	B3	SINE/B2	2	21 6	0	>AK082108_814_1024_+_B3
NM_009713	1690	1882	-5	+	B3	SINE/B2	1	19 9	-17	>AK082325_1690_1882_+_B3
NM_001029 985	221	280	-1179	+	B3	SINE/B2	10 8	16 8	-48	>AK084376_221_280_+_B3
NM_009737	1805	2005	-406	+	B3	SINE/B2	1	20 7	-9	>AK085337_1805_2005_+_B3
NM_027081	984	1130	-1155	+	B3	SINE/B2	1	16 2	-54	>AK086470_984_1130_+_B3
NM_018779	876	1062	-530	+	B3A	SINE/B2	2	18 8	-10	>AK089148_876_1062_+_B3A

# ES 2 855 577 T3

NM_027919	1468	1667	-185	+	B3	SINE/ B2	1 3	21 3	-3	>AK090182_1468_1667_+_B3
NM_011034	434	608	-12	+	B3	SINE/ B2	2 6	21 6	0	>AK131819_434_608_+_B3
NM_175551	1802	1895	-513	+	B3A	SINE/ B2	64	17 6	-22	>AK132737_1802_1895_+_B3A
NM_175551	1829	1928	-480	+	B3	SINE/ B2	10 1	21 3	-3	>AK132737_1829_1928_+_B3
NM_007921	951	1134	-1650	+	B3A	SINE/ B2	3	18 7	-11	>AK133325_951_1134_+_B3A
NM_001039 042	1220	1315	-292	+	B3A	SINE/ B2	48	14 2	-56	>AK134755_1220_1315_+_B3A
NM_177328	1378	1504	-285	+	B3	SINE/ B2	85	21 6	0	>AK134874_1378_1504_+_B3
NM_021899	1172	1259	-140	+	B3	SINE/ B2	1	95	- 12 1	>AK135206_1172_1259_+_B3
NM_008705	1521	1717	-572	+	B3A	SINE/ B2	1	19 7	-1	>AK136279_1521_1717_+_B3A
NM_001079 932	2116	2299	-702	+	B3	SINE/ B2	6	20 8	-8	>AK137643_2116_2299_+_B3
NM_001079 932	3059	3253	-2	+	B3	SINE/ B2	4	20 5	-11	>AK137643_3059_3253_+_B3
NM_001033 286	2524	2698	-63	+	B3A	SINE/ B2	4	18 1	-17	>AK138296_2524_2698_+_B3A
NM_008962	928	1095	-375	+	B3	SINE/ B2	1	15 3	-63	>AK138521_928_1095_+_B3
NM_175349	2151	2347	-181	+	B3A	SINE/ B2	11	19 6	-2	>AK139254_2151_2347_+_B3A
NM_177003	1277	1466	0	+	B3	SINE/ B2	1	20 0	-16	>AK139647_1277_1466_+_B3
NM_007965	1338	1488	-5	+	B3	SINE/ B2	51	21 6	0	>AK140072_1338_1488_+_B3
NM_010192	1808	1933	-45	+	B3	SINE/ B2	1	12 6	-90	>AK140346_1808_1933_+_B3
NM_027446	1871	1983	-2794	+	B3A	SINE/ B2	1	13 0	-68	>AK140616_1871_1983_+_B3A
NM_027446	2318	2342	-2435	+	B3A	SINE/ B2	13 1	15 6	-42	>AK140616_2318_2342_+_B3A
NM_177186	2061	2142	-351	+	B3	SINE/ B2	13 0	21 1	-5	>AK142359_2061_2142_+_B3

# ES 2 855 577 T3

NM_145134	2963	3148	-1292	+	B3	SINE/B2	28	21 0	-6	>AK142507_2963_3148 _+_B3
NM_009890	2740	2968	-135	+	B3	SINE/B2	1	21 6	0	>AK142879_2740_2968 _+_B3
NM_146055	5202	5272	-94	+	B3	SINE/B2	60	14 1	-75	>AK143143_5202_5272 _+_B3
NM_008977	1344	1513	-645	+	B3	SINE/B2	11	20 5	-11	>AK143279_1344_1513 _+_B3
NM_026036	2001	2167	-272	+	B3A	SINE/B2	1	16 9	-29	>AK149843_2001_2167 _+_B3A
NM_001159 519	1440	1548	-1422	+	B3A	SINE/B2	55	16 3	-35	>AK157402_1440_1548 + B3A
NM_001159 519	2503	2556	-558	+	B3	SINE/B2	1	56 -	16 0	>AK157402_2503_2556 _+_B3
NM_001159 519	2544	2616	-498	+	B3	SINE/B2	10 9	17 7	-39	>AK157402_2544_2616 _+_B3
NM_001159 519	2702	2896	-412	+	B3A	SINE/B2	1	19 8	0	>AK157402_2702_2896 _+_B3A
NM_001110 504	1778	1909	-25	+	B3	SINE/B2	58	21 0	-6	>AK160921_1778_1909 _+_B3
NM_030714	2153	2335	-62	+	B3	SINE/B2	40	21 6	0	>AK165234_2153_2335 _+_B3
NM_025825	945	1052	-383	RC	B2_Mm1a	SINE/B2	-85	10 8	1	>AK014613_945_1052_RC_B2_Mm1a
NM_133756	1102	1289	-246	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-4	19 1	1	>AK016234_1102_1289_RC_B2_Mm2
NM_183294	1565	1750	-1384	RC	B2_Mm1a	SINE/B2	-8	18 5	4	>AK029702_1565_1750_RC_B2_Mm1a
NM_009446	531	710	-2730	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-6	18 9	2	>AK030803_531_710_RC_B2_Mm2
NM_025788	1687	1839	-963	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-11	18 4	1	>AK039409_1687_1839_RC_B2_Mm2
NM_177785	1626	1682	-1130	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-4	19 1	13 7	>AK040275_1626_1682_RC_B2_Mm2
NM_177785	1682	1739	-1073	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-94	10 1	46	>AK040275_1682_1739_RC_B2_Mm2
NM_177785	1776	1952	-1036	RC	B2_Mm1t	SINE/B2	-13	18 0	2	>AK040275_1776_1952_RC_B2_Mm1t
NM_007485	1137	1341	-192	RC	B2_Mm2	SINE/B2	0	19 5	2	>AK044205_1137_1341_RC_B2_Mm2

# ES 2 855 577 T3

NM_175273	537	714	-1793	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-5	19 0	1		>AK048762_537_714_R C_B2_Mm2
NM_029409	1005	1172	-2204	RC	B2_Mm1t	SINE/B2	-14	17 9	1		>AK049449_1005_1172_RC_B2_Mm1t
NM_007836	282	407	-2067	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-67	12 8	2		>AK054076_282_407_R C_B2_Mm2
NM_007836	1764	1860	-614	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-97	98	2		>AK054076_1764_1860_RC_B2_Mm2
NR_002891	1	181	-2344	RC	B2_Mm1a	SINE/B2	-10	18 3	2		>AK076350_1_181_RC_B2_Mm1a
NM_026500	984	1157	-1501	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-14	18 1	1		>AK076438_984_1157_RC_B2_Mm2
NM_052994	2158	2323	-1225	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-4	19 1	8		>AK079094_2158_2323_RC_B2_Mm2
NM_153100	1870	2057	-1774	RC	B2_Mm2	SINE/B2	0	19 5	1		>AK086953_1870_2057_RC_B2_Mm2
NM_175313	2088	2261	-2958	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-9	18 6	14		>AK132441_2088_2261_RC_B2_Mm2
NM_001114_140	5305	5461	-1145	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-38	15 7	2		>AK133162_5305_5461_RC_B2_Mm2
NM_009579	1059	1251	-2941	RC	B2_Mm2	SINE/B2	0	19 5	1		>AK137370_1059_1251_RC_B2_Mm2
NM_010567	1613	1794	-1882	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-2	19 3	1		>AK138181_1613_1794_RC_B2_Mm2
NM_001008_423	2088	2222	-57	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-60	13 5	1		>AK141165_2088_2222_RC_B2_Mm2
NM_199027	935	1064	-63	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-65	13 0	1		>AK141411_935_1064_RC_B2_Mm2
NM_001033_316	3103	3283	-440	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-5	19 0	2		>AK145736_3103_3283_RC_B2_Mm2
NR_003492	748	810	-977	RC	B2_Mm1a	SINE/B2	-6	18 7	12 3		>AK147092_748_810_R C_B2_Mm1a
NM_010567	935	1129	-78	RC	B2_Mm2	SINE/B2	0	19 5	2		>AK148373_935_1129_RC_B2_Mm2
NM_026115	3593	3791	-204	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-1	19 4	1		>AK155374_3593_3791_RC_B2_Mm2
NM_010398	1080	1265	-909	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-8	18 7	1		>AK157261_1080_1265_RC_B2_Mm2
NM_007893	764	820	-1012	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-94	10 1	47		>AK163105_764_820_RC_B2_Mm2

# ES 2 855 577 T3

NM_007893	894	1062	-938	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-13	18 2	1	>AK163105_894_1062_RC_B2_Mm2
NM_007893	1390	1436	-564	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-5	19 0	13 7	>AK163105_1390_1436_RC_B2_Mm2
NM_007893	1436	1490	-510	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-94	10 1	47	>AK163105_1436_1490_RC_B2_Mm2
NM_007893	1543	1701	-299	RC	B2_Mm1t	SINE/B2	-24	16 9	1	>AK163105_1543_1701_RC_B2_Mm1t
NM_177186	1783	1964	-258	RC	B2_Mm1t	SINE/B2	-7	18 6	2	>AK163831_1783_1964_RC_B2_Mm1t
NM_030714	1401	1588	-809	RC	B2_Mm2	SINE/B2	0	19 5	3	>AK165234_1401_1588_RC_B2_Mm2
NM_001110 101	1253	1420	-1139	RC	B2_Mm2	SINE/B2	-22	17 3	2	>AK169421_1253_1420_RC_B2_Mm2
NM_007601	387	544	-1715	RC	B3A	SINE/B2	-22	17 6	1	>AK016423_387_544_R_C_B3A
NM_027346	1459	1690	-74	RC	B3	SINE/B2	-2	21 4	1	>AK019925_1459_1690_RC_B3
NM_138664	1382	1411	-1334	RC	B3A	SINE/B2	-14 8	50	21	>AK028982_1382_1411_RC_B3A
NM_013840	160	290	-556	RC	B3	SINE/B2	-79	13 7	9	>AK029359_160_290_R_C_B3
NM_013840	774	960	-72	RC	B3	SINE/B2	-7	20 9	1	>AK029359_774_960_R_C_B3
NM_153591	769	982	-1569	RC	B3	SINE/B2	-6	21 0	1	>AK032194_769_982_R_C_B3
NM_028794	1926	2130	-654	RC	B3	SINE/B2	-12	20 4	2	>AK032215_1926_2130_RC_B3
NM_001012 311	1317	1437	-1013	RC	B3	SINE/B2	-44	17 2	38	>AK034331_1317_1437_RC_B3
NM_001012 311	1335	1437	-1013	RC	B3A	SINE/B2	-54	14 4	38	>AK034331_1335_1437_RC_B3A
NM_134122	1094	1205	-719	RC	B3	SINE/B2	-88	12 8	1	>AK035015_1094_1205_RC_B3
NM_153579	1443	1617	-577	RC	B3	SINE/B2	-2	21 4	45	>AK035406_1443_1617_RC_B3
NM_153579	1483	1633	-561	RC	B3A	SINE/B2	-18	18 0	27	>AK035406_1483_1633_RC_B3A
NM_001081 014	1615	1715	-218	RC	B3A	SINE/B2	-88	11 0	1	>AK039704_1615_1715_RC_B3A

# ES 2 855 577 T3

NM_018747	432	531	-1672	RC	B3A	SINE/B2	-31	16 7	49	>AK040672_432_531_R C_B3A
NM_176841	1677	1886	-64	RC	B3	SINE/B2	0	21 6	2	>AK041236_1677_1886_RC_B3
NM_133878	1676	1882	-314	RC	B3	SINE/B2	-7	20 9	1	>AK041654_1676_1882_RC_B3
NM_145215	2334	2533	-484	RC	B3	SINE/B2	0	21 6	3	>AK041742_2334_2533_RC_B3
NM_145369	1132	1336	-593	RC	B3	SINE/B2	-7	20 9	5	>AK042861_1132_1336_RC_B3
NM_172691	248	442	-151	RC	B3A	SINE/B2	-18	18 0	10	>AK043958_248_442_R C_B3A
NM_007485	938	1127	-202	RC	B3	SINE/B2	-37	17 9	2	>AK044205_938_1127_RC_B3
NM_007485	989	1127	-202	RC	B3A	SINE/B2	-57	14 1	2	>AK044205_989_1127_RC_B3A
NM_007925	592	713	-719	RC	B3	SINE/B2	-54	16 2	39	>AK045677_592_713_R C_B3
NM_177006	3566	3620	-1104	RC	B3	SINE/B2	-16 0	56	2	>AK046828_3566_3620_RC_B3
NM_010633	431	640	-591	RC	B3	SINE/B2	-4	21 2	8	>AK047213_431_640_R C_B3
NM_010633	457	640	-591	RC	B3A	SINE/B2	-7	19 1	8	>AK047213_457_640_R C_B3A
NM_008842	1460	1636	-53	RC	B3A	SINE/B2	-4	19 4	10	>AK047301_1460_1636_RC_B3A
NM_199476	2716	2780	-1664	RC	B3A	SINE/B2	-36	16 2	98	>AK047540_2716_2780_RC_B3A
NM_013514	1203	1416	-311	RC	B3	SINE/B2	0	21 6	1	>AK048309_1203_1416_RC_B3
NM_080793	2342	2396	-1333	RC	B3A	SINE/B2	-5	19 3	14 4	>AK048747_2342_2396_RC_B3A
NM_080793	2430	2530	-1199	RC	B3A	SINE/B2	-55	14 3	47	>AK048747_2430_2530_RC_B3A
NM_001038 621	159	275	-1447	RC	B3	SINE/B2	-56	16 0	34	>AK053130_159_275_R C_B3
NM_007836	1747	1860	-614	RC	B3	SINE/B2	-97	11 9	2	>AK054076_1747_1860_RC_B3
NM_010878	1134	1337	-1192	RC	B3	SINE/B2	0	21 6	1	>AK078161_1134_1337_RC_B3

# ES 2 855 577 T3

NM_011670	521	690	-995	RC	B3	SINE/B2	-60	15 6	1	>AK078321_521_690_R C_B3
NM_026086	882	1046	-355	RC	B3A	SINE/B2	-18	18 0	1	>AK079515_882_1046_RC_B3A
NM_025396	1081	1179	-370	RC	B3	SINE/B2	-27	18 9	75	>AK080749_1081_1179_RC_B3
NM_007923	2420	2567	-582	RC	B3A	SINE/B2	-48	15 0	4	>AK086589_2420_2567_RC_B3A
NM_028427	1420	1597	-495	RC	B3	SINE/B2	-5	21 1	2	>AK090347_1420_1597_RC_B3
NM_026157	1871	2066	-1227	RC	B3A	SINE/B2	0	19 8	5	>AK132393_1871_2066_RC_B3A
NM_026157	2342	2408	-885	RC	B3A	SINE/B2	-13 1	67	1	>AK132393_2342_2408_RC_B3A
NM_026157	2473	2606	-687	RC	B3A	SINE/B2	-25	17 3	28	>AK132393_2473_2606_RC_B3A
NM_175313	2113	2261	-2958	RC	B3	SINE/B2	-40	17 6	14	>AK132441_2113_2261_RC_B3
NM_175313	4127	4308	-948	RC	B3	SINE/B2	-6	21 0	28	>AK132441_4127_4308_RC_B3
NM_024282	1137	1290	-91	RC	B3A	SINE/B2	-39	15 9	1	>AK132990_1137_1290_RC_B3A
NM_177328	277	358	-1283	RC	B3A	SINE/B2	-56	14 2	66	>AK134874_277_358_R C_B3A
NM_177328	405	484	-1157	RC	B3A	SINE/B2	-13 3	65	1	>AK134874_405_484_R C_B3A
NM_177328	545	713	-928	RC	B3A	SINE/B2	-4	19 4	14	>AK134874_545_713_R C_B3A
NM_177328	787	971	-670	RC	B3A	SINE/B2	-4	19 4	7	>AK134874_787_971_R C_B3A
NM_021899	161	307	-1092	RC	B3A	SINE/B2	-46	15 2	1	>AK135206_161_307_R C_B3A
NM_010332	228	409	-1967	RC	B3	SINE/B2	-28	18 8	2	>AK135599_228_409_R C_B3
NM_172407	1470	1683	-74	RC	B3	SINE/B2	-5	21 1	2	>AK143014_1470_1683_RC_B3
NM_001009 935	1389	1495	-157	RC	B3	SINE/B2	-96	12 0	1	>AK143784_1389_1495_RC_B3
NM_019827	2953	3143	-1064	RC	B3	SINE/B2	-1	21 5	1	>AK145079_2953_3143_RC_B3

# ES 2 855 577 T3

NM_011212	2131	2283	-1263	RC	B3A	SINE/B2	-47	15 1	2	>AK148045_2131_2283_RC_B3A
NM_010567	984	1129	-78	RC	B3A	SINE/B2	-60	13 8	2	>AK148373_984_1129_RC_B3A
NM_001110 504	1406	1594	-400	RC	B3A	SINE/B2	-10	18 8	2	>AK149403_1406_1594_RC_B3A
NM_026036	2270	2439	0	RC	B3	SINE/B2	-4	21 2	27	>AK149843_2270_2439_RC_B3
NM_010398	1292	1476	-698	RC	B3A	SINE/B2	-11	18 7	3	>AK157261_1292_1476_RC_B3A
NM_001110 504	1292	1362	-572	RC	B3A	SINE/B2	-11 2	86	11	>AK160921_1292_1362_RC_B3A
NM_007893	1080	1254	-746	RC	B3	SINE/B2	0	21 6	21	>AK163105_1080_1254_RC_B3
NM_007893	1427	1491	-509	RC	B3A	SINE/B2	-82	11 6	46	>AK163105_1427_1491_RC_B3A
NM_030714	1954	2064	-333	RC	B3	SINE/B2	-95	12 1	2	>AK165234_1954_2064_RC_B3
NM_001110 101	853	1043	-1516	RC	B3	SINE/B2	-5	21 1	6	>AK169421_853_1043_RC_B3
NM_001110 101	1742	1936	-623	RC	B3	SINE/B2	-2	21 4	8	>AK169421_1742_1936_RC_B3

; 0

(5) un ARN (i) que es al menos 95% similar al ARN de (1), (2), (3) o (4) y tiene la función de incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas.

- 5      7. Una molécula de ADN que codifica una molécula de ácido nucleico funcional que actúa en trans según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
8. Un Vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico funcional que actúa en trans según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una molécula de ADN según la reivindicación 7.
9. Una composición para incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas, que comprende una molécula de ácido nucleico funcional que actúa en trans según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, una molécula de ADN según la reivindicación 7, o un vector de expresión según la reivindicación 8.
10. Un método para incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas, que comprende la paso de (a) permitir que una molécula de ácido nucleico funcional que actúa en trans según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 coexista con un ARN que codifica una proteína, cuya secuencia parcial del ARN que codifica la proteína tiene similitud con la secuencia determinante diana de la molécula de ARN funcional.
- 15     11. El método según la reivindicación 10, en donde la etapa (a) comprende transfectar a una célula la molécula de ácido nucleico funcional que actúa en trans o una molécula de ADN según la reivindicación 7.
12. Un método para producir una proteína, que comprende la etapa de incrementar la eficacia de la síntesis de proteínas mediante un método para incrementar la eficiencia de síntesis de proteínas según la reivindicación 10 o la reivindicación 11.

F I G. 1

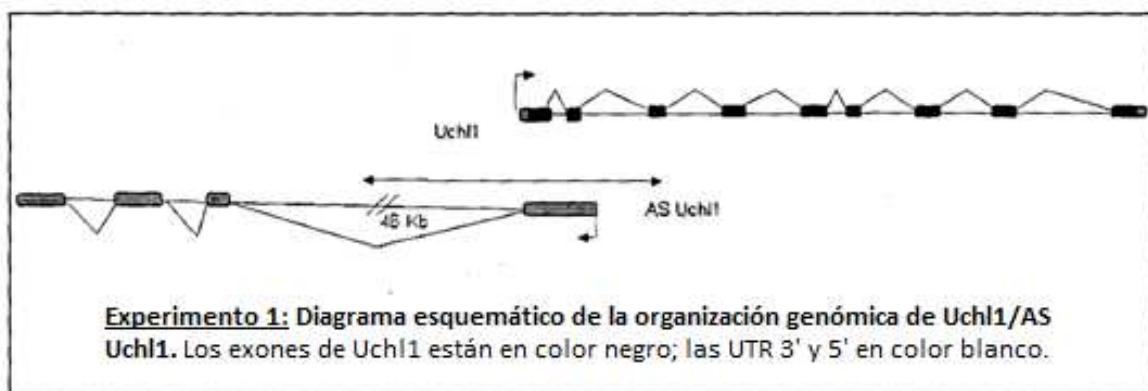


FIG. 2

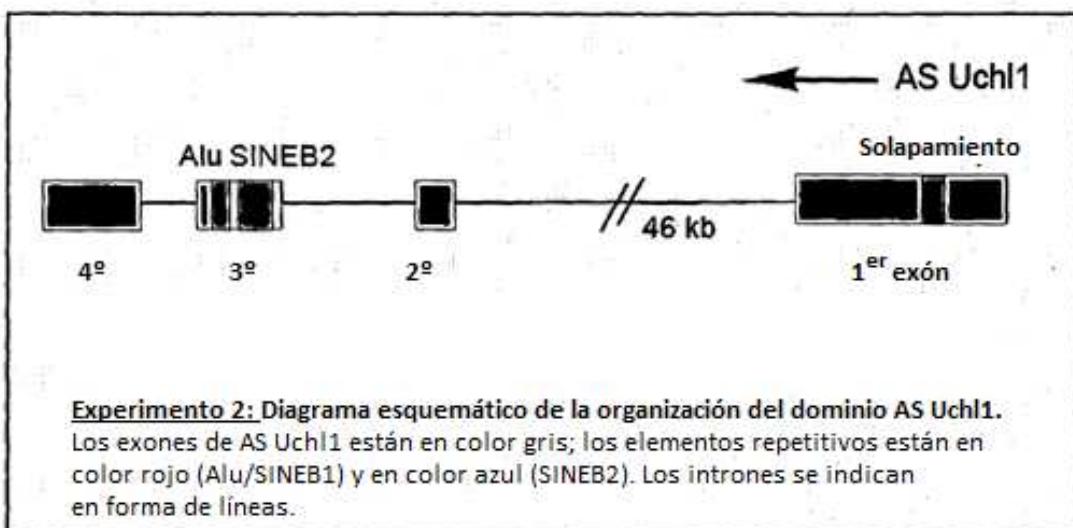


FIG. 3

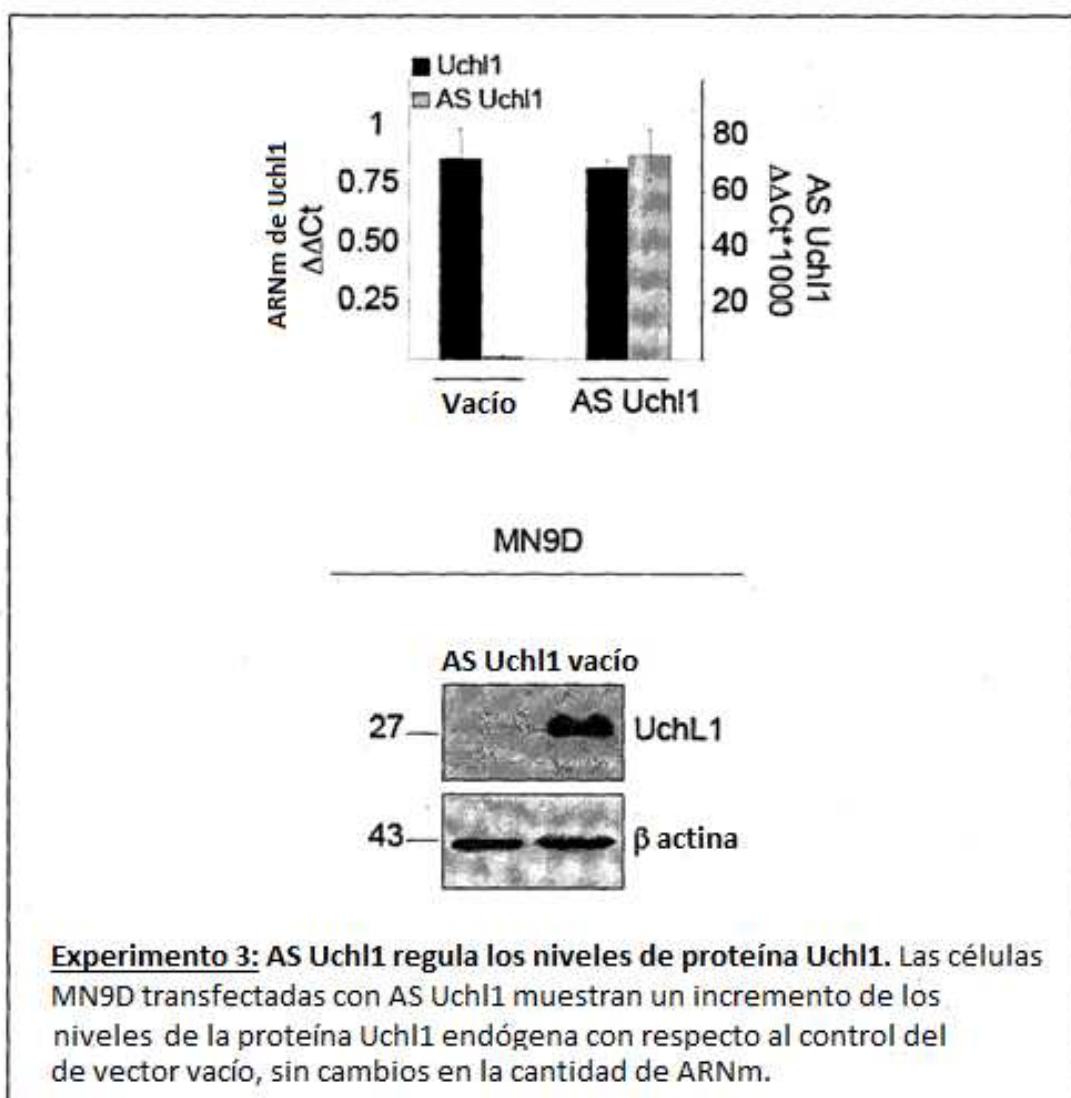


FIG. 4

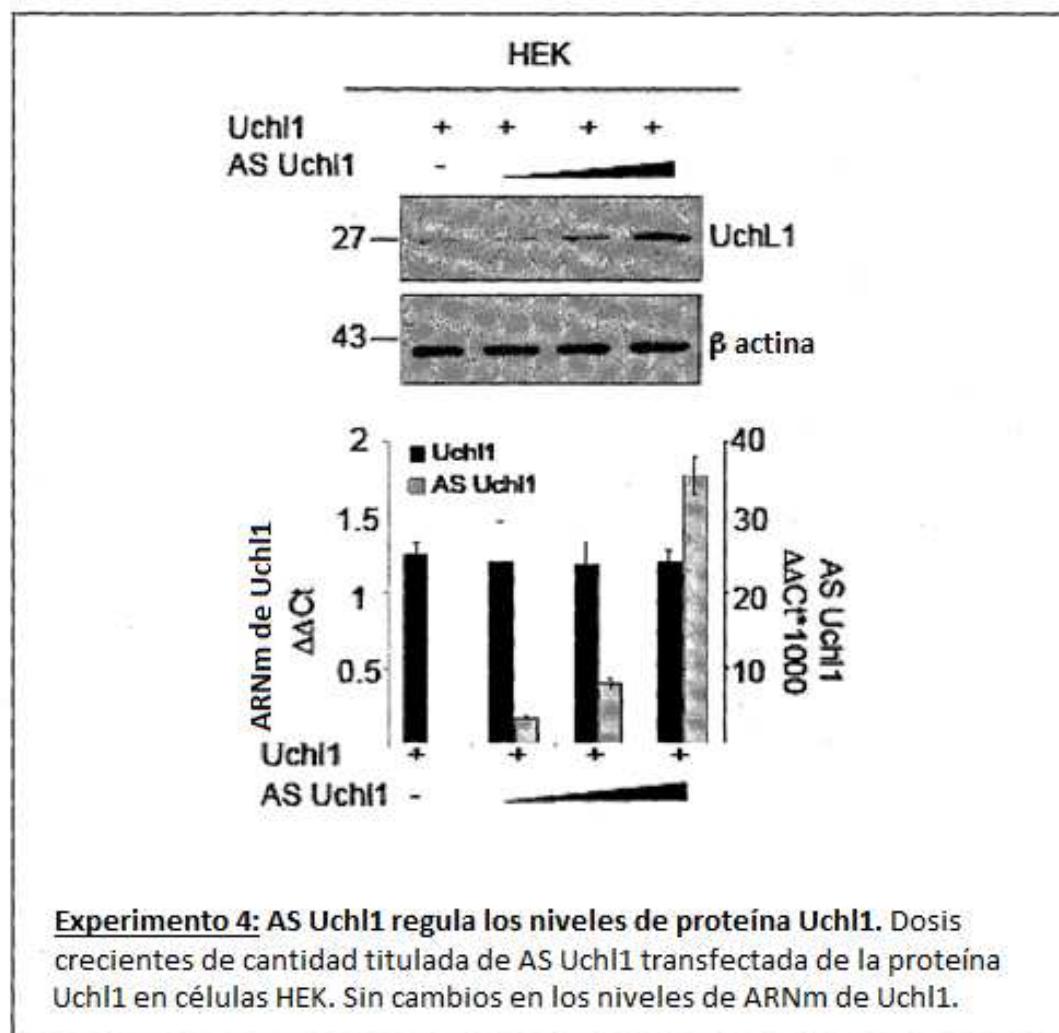


FIG. 5

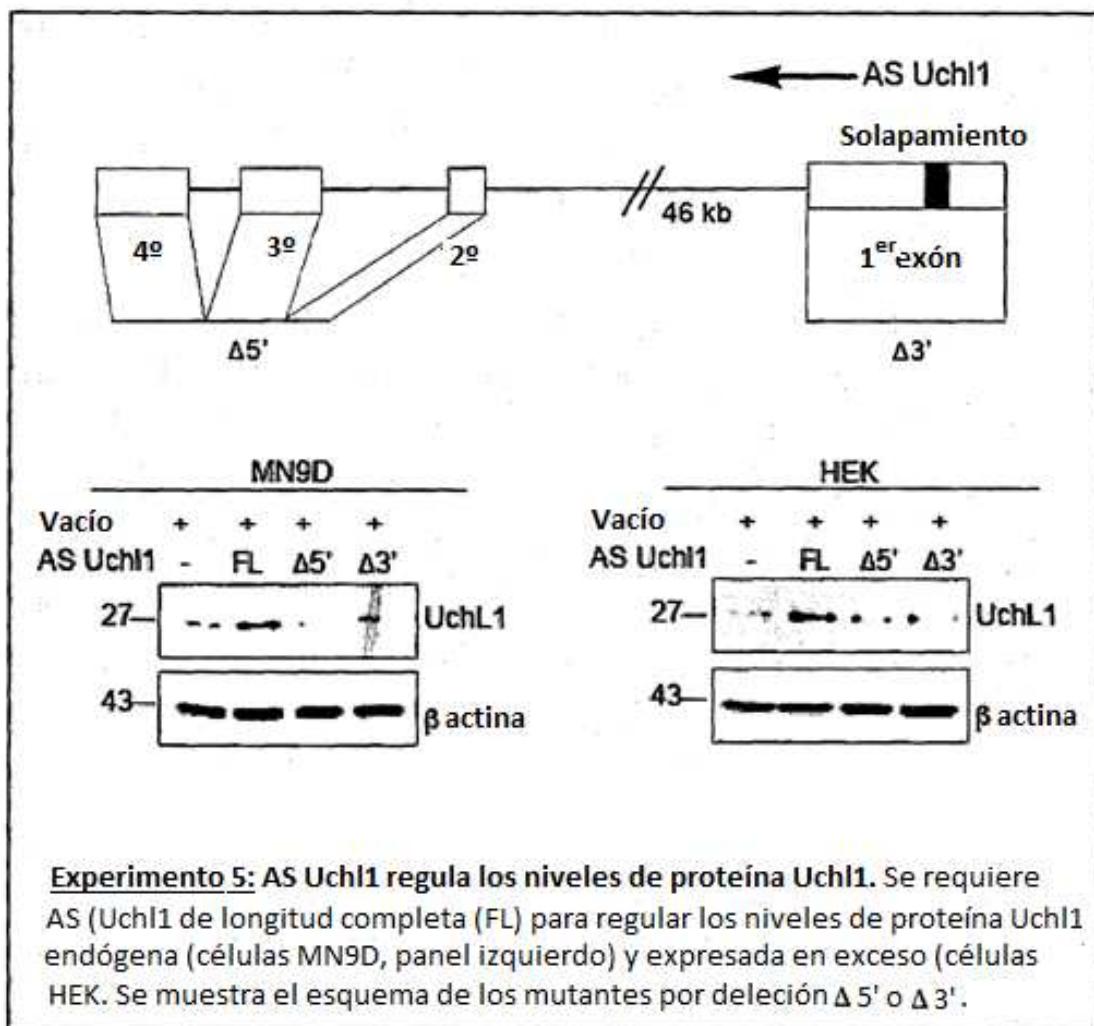


FIG. 6

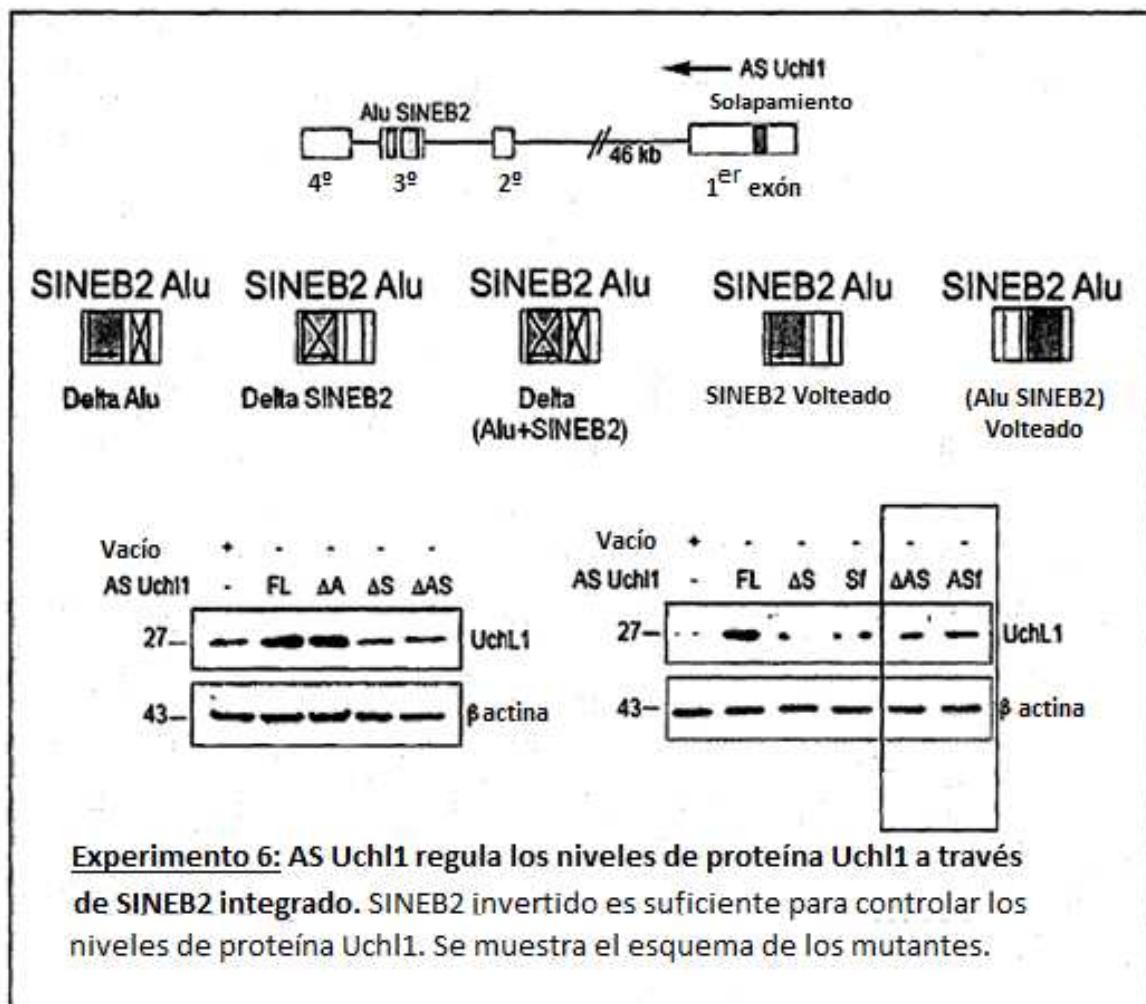


FIG. 7

<i>Acc. Riken</i>	<i>AS para gen</i>	<i>Acc. NCBI</i>	<i>Orientación</i>	<i>Tipo</i>
AK019925	Codo44	NM_027348	RC	SINE/B2 núm. B3
AK029359	Uxt	NM_013840	RC	SINE/B2 núm. B3
AK032194	Nars2	NM_153591	RC	SINE/B2 núm. B3
AK032215	Nudt9	NM_028794	RC	SINE/B2 núm. B3
AK034331	n/a	NM_001012311	RC	SINE/B2 núm. B3
AK035015	Nrm	NM_134122	RC	SINE/B2 núm. B3
AK035408	Sv2b	NM_153578	RC	SINE/B2 núm. B3
AK041238	Ccdc88a	NM_176841	RC	SINE/B2 núm. B3
AK041654	Rcc	NM_133878	RC	SINE/B2 núm. B3
AK041742	Abhd11	NM_145215	RC	SINE/B2 núm. B3
AK042881	Wfdc5	NM_145389	RC	SINE/B2 núm. B3
AK044205	Rhod	NM_007485	RC	SINE/B2 núm. B3
AK045677	Eln	NM_007925	RC	SINE/B2 núm. B3
AK046828	n/a	NM_177006	RC	SINE/B2 núm. B3
AK047213	Uhmk1	NM_010833	RC	SINE/B2 núm. B3
AK048309	Epb4.9	NM_013514	RC	SINE/B2 núm. B3
AK053130	Rabgap1l	NM_001038621	RC	SINE/B2 núm. B3
AK054076	Gadd45a	NM_007836	RC	SINE/B2 núm. B3
AK078161	Nck1	NM_010878	RC	SINE/B2 núm. B3
AK078321	Uchl1	NM_011670	RC	SINE/B2 núm. B3
AK080749	Pgls	NM_025396	RC	SINE/B2 núm. B3
AK090347	3110005G23Rik	NM_028427	RC	SINE/B2 núm. B3
AK132441	A130022J15Rik	NM_175313	RC	SINE/B2 núm. B3
AK135599	Ednra	NM_010332	RC	SINE/B2 núm. B3
AK143014	Cdkn2aip	NM_172407	RC	SINE/B2 núm. B3
AK143784	Txnip	NM_001009935	RC	SINE/B2 núm. B3
AK145079	Gsk3b	NM_019827	RC	SINE/B2 núm. B3
AK149843	Cmtm8	NM_026036	RC	SINE/B2 núm. B3
AK183105	E4f1	NM_007893	RC	SINE/B2 núm. B3
AK185234	Dbc3	NM_030714	RC	SINE/B2 núm. B3
AK189421	n/a	NM_001110101	RC	SINE/B2 núm. B3

**Experimento 7: Familia de transcritos de AS con SINEB2 integrado.**  
 Familia de clones no codificantes de FANTOM 3 que son AS para los genes que codifican la proteína y contienen SINEB2 integrado en orientación invertida.

FIG. 8

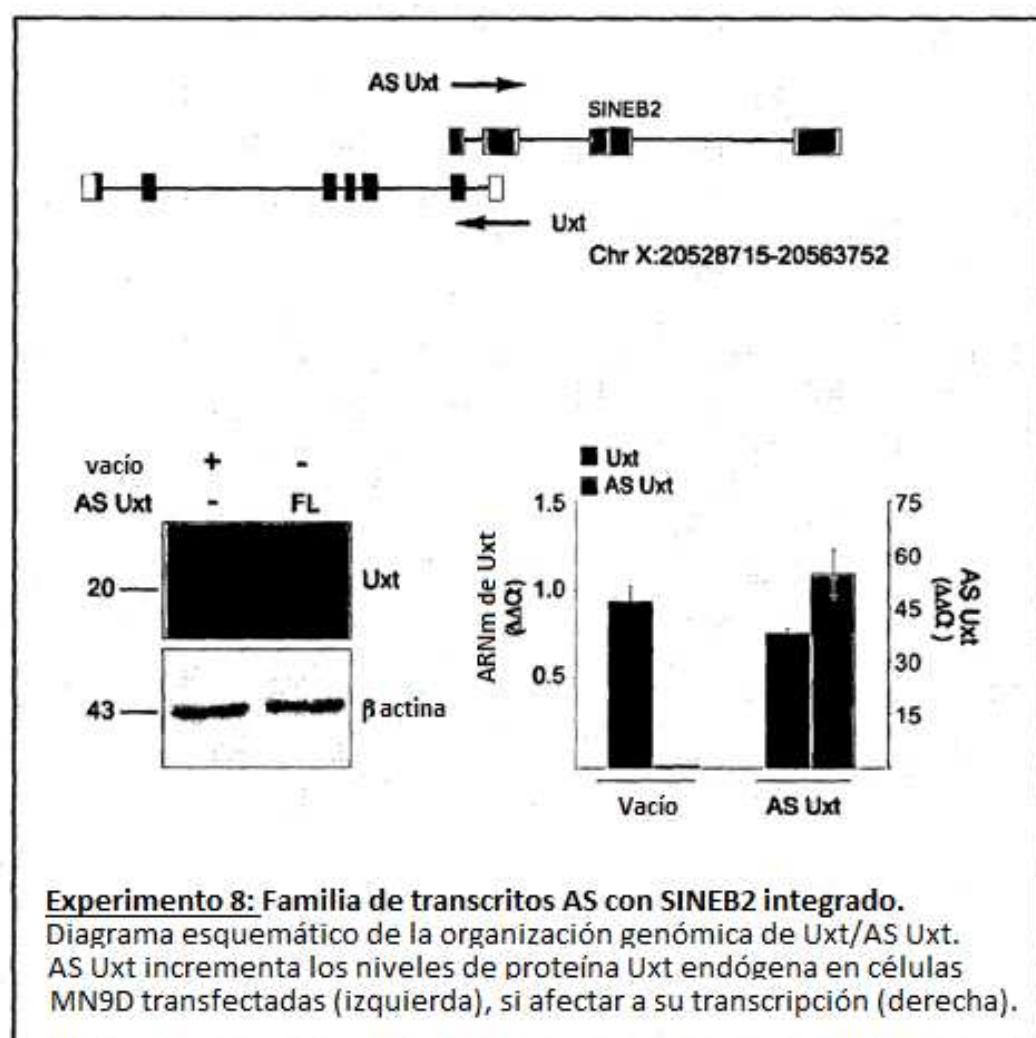
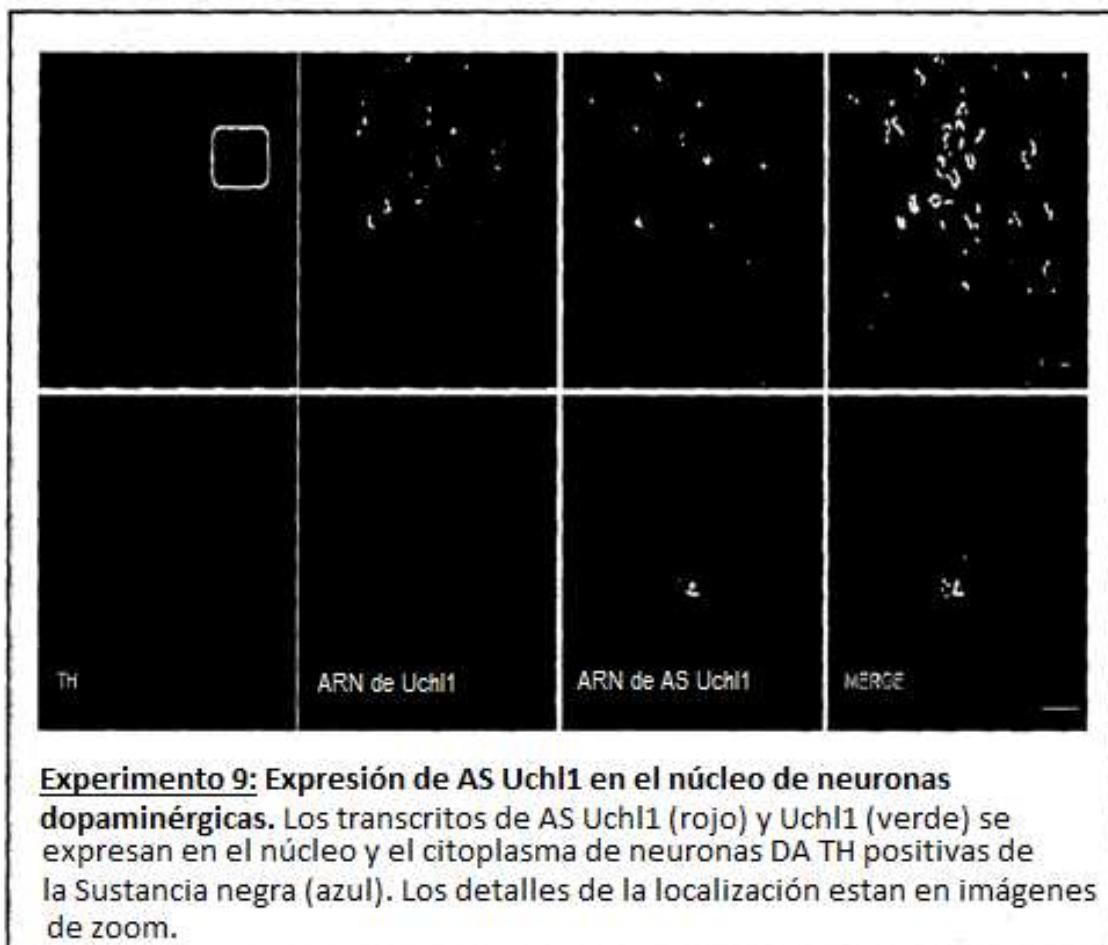


FIG. 9



**Experimento 9: Expresión de AS Uchl1 en el núcleo de neuronas dopaminérgicas.** Los transcritos de AS Uchl1 (rojo) y Uchl1 (verde) se expresan en el núcleo y el citoplasma de neuronas DA TH positivas de la Sustancia negra (azul). Los detalles de la localización están en imágenes de zoom.

FIG. 10

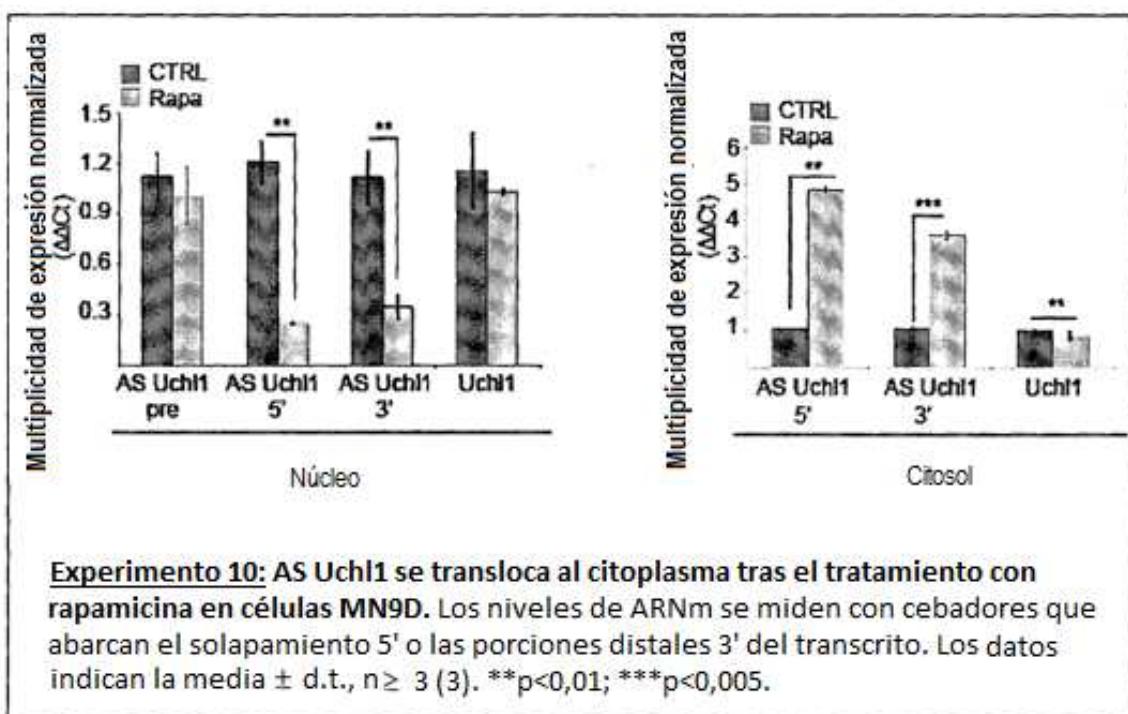


FIG. 11

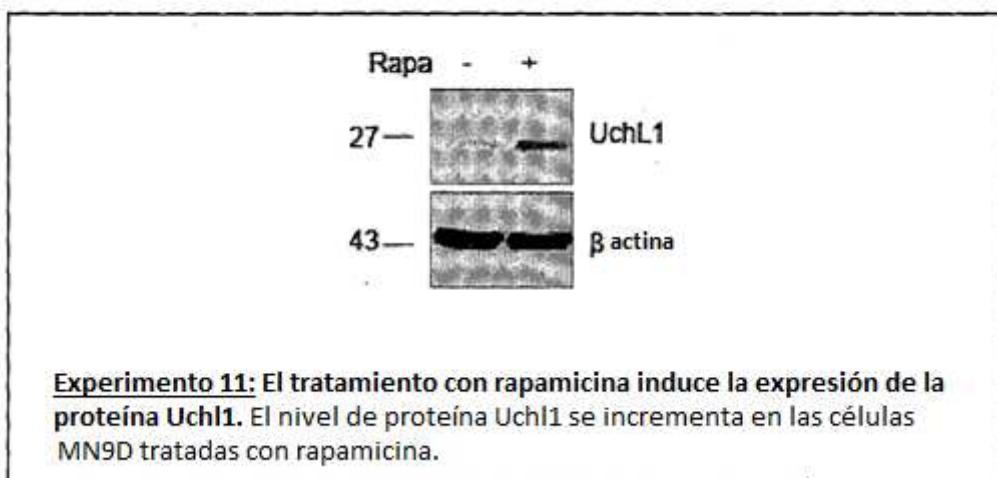


FIG. 12

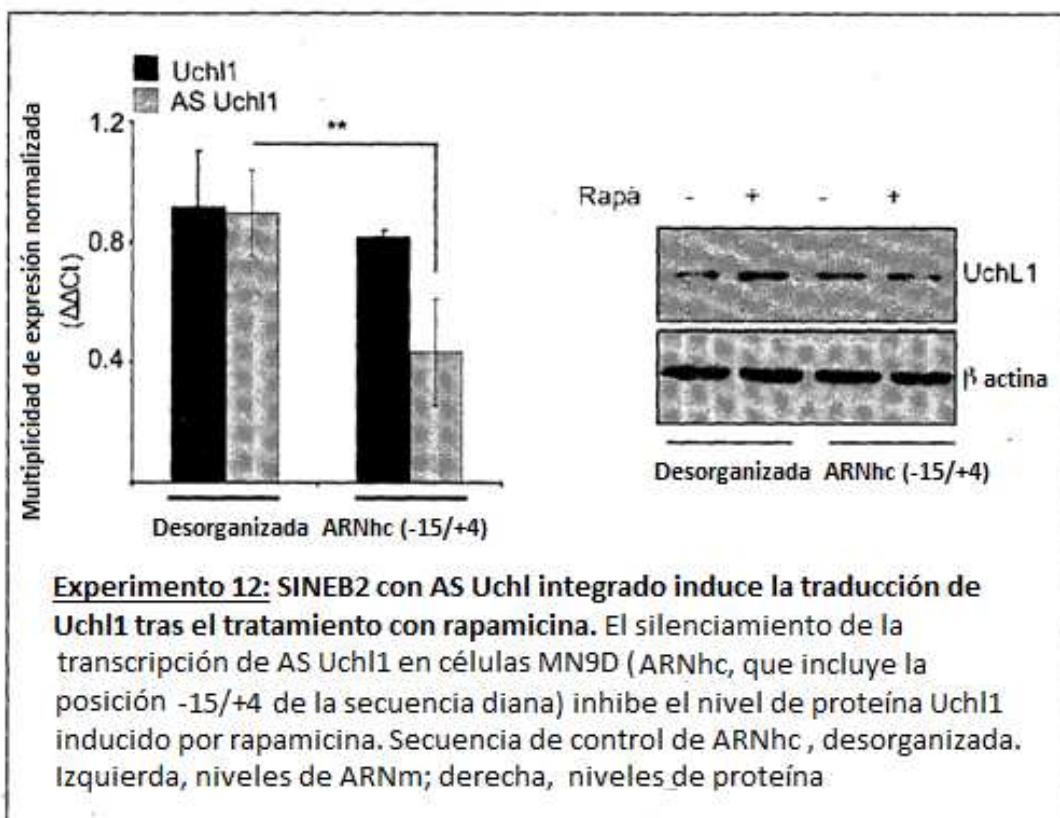
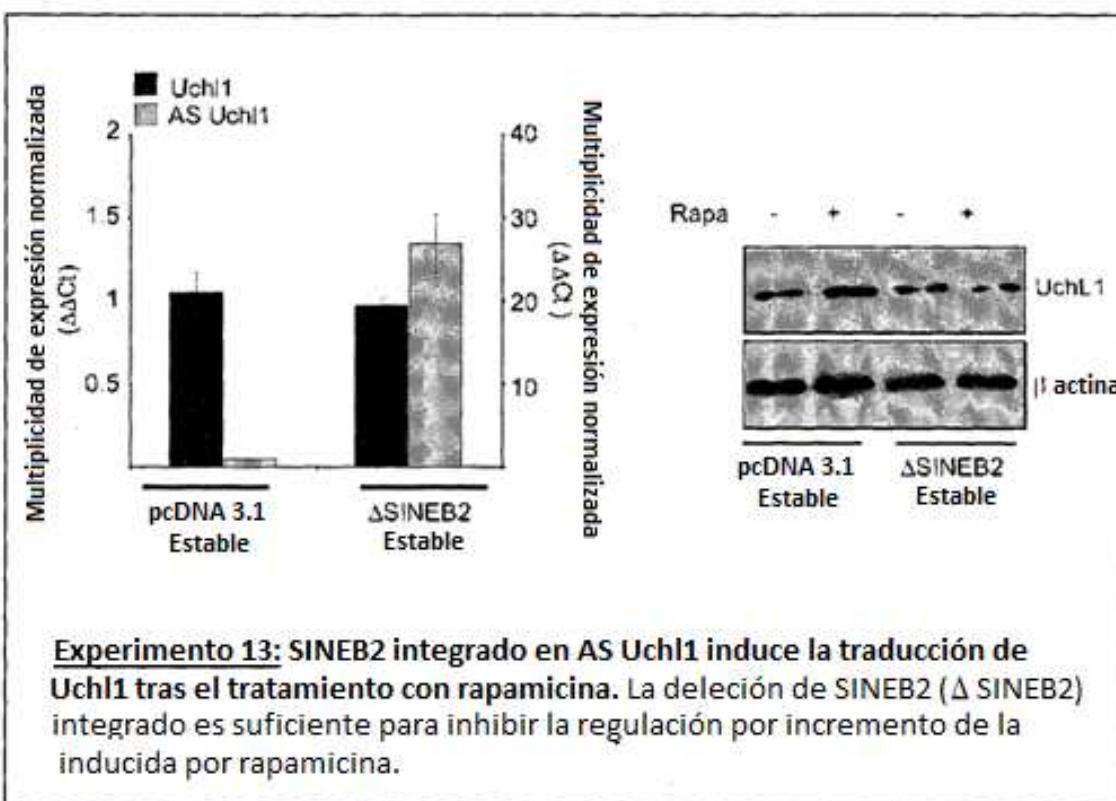


FIG. 13



**Experimento 13: SINEB2 integrado en AS Uchl1 induce la traducción de Uchl1 tras el tratamiento con rapamicina. La delección de SINEB2 ( $\Delta$  SINEB2) integrado es suficiente para inhibir la regulación por incremento de la inducida por rapamicina.**

FIG. 14

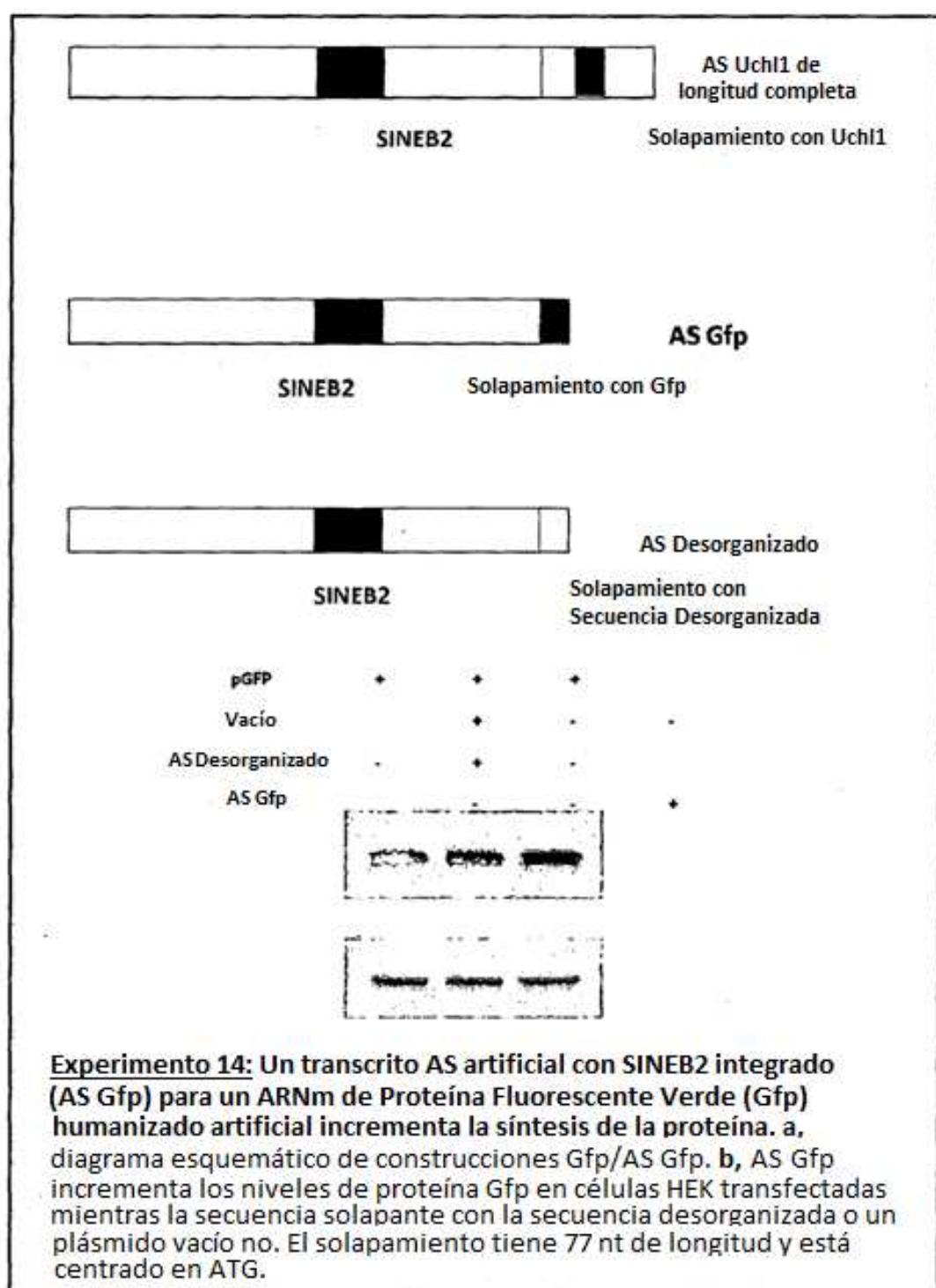
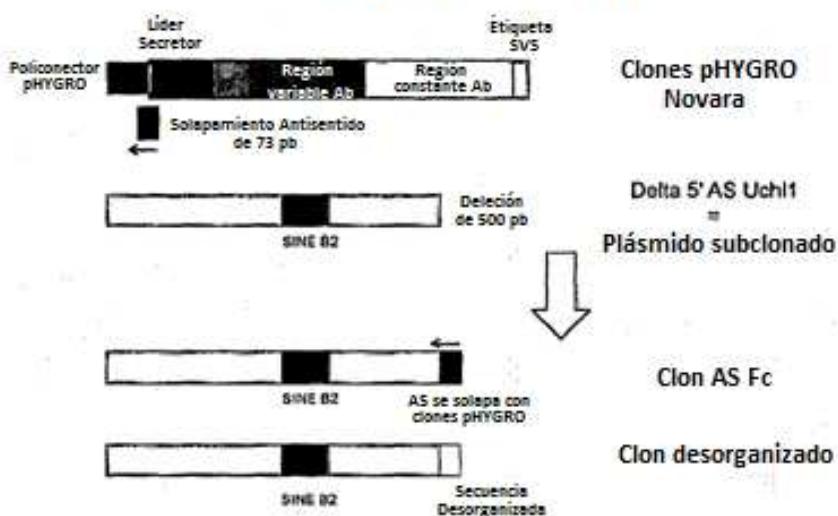


FIG. 15

**a.****CONSTRUCCIÓN DEL CLON AS Fc**

Limitación del solapamiento de 73 pb entre el ARNm de AS Uchl1 y Uchl1  
 $\Rightarrow$  solapamiento antisentido con clones pHYGRO = 40 pb pre-ATG + 33 pb post-ATG

**b.****CONTRANSFECCIÓN EN CÉLULAS HEK**

Los clones pHYGRO y AS Fc se co-transfectan a células HEK con una proporción de vector efector con respecto a antisentido de 1:6

Muestra de control:  
 clon pHYGRO 2.8 + clon desorganizado



**Experimento 15:** Un transcripto AS artificial con SINEB2 integrado (clón AS Fc) en clones pHYGRO Novara (pHYGRO) incrementa la síntesis de la proteína codificada en pHYGRO. **a.** Diagrama esquemático de las construcciones pHYGRO/AS Fc. **b.** AS Fc incrementa los niveles de proteína codificada en células HEK transfectadas mientras una secuencia solapante desorganizada o un plásmido vacío no, detectado a través de la etiqueta SV5.

FIG. 16

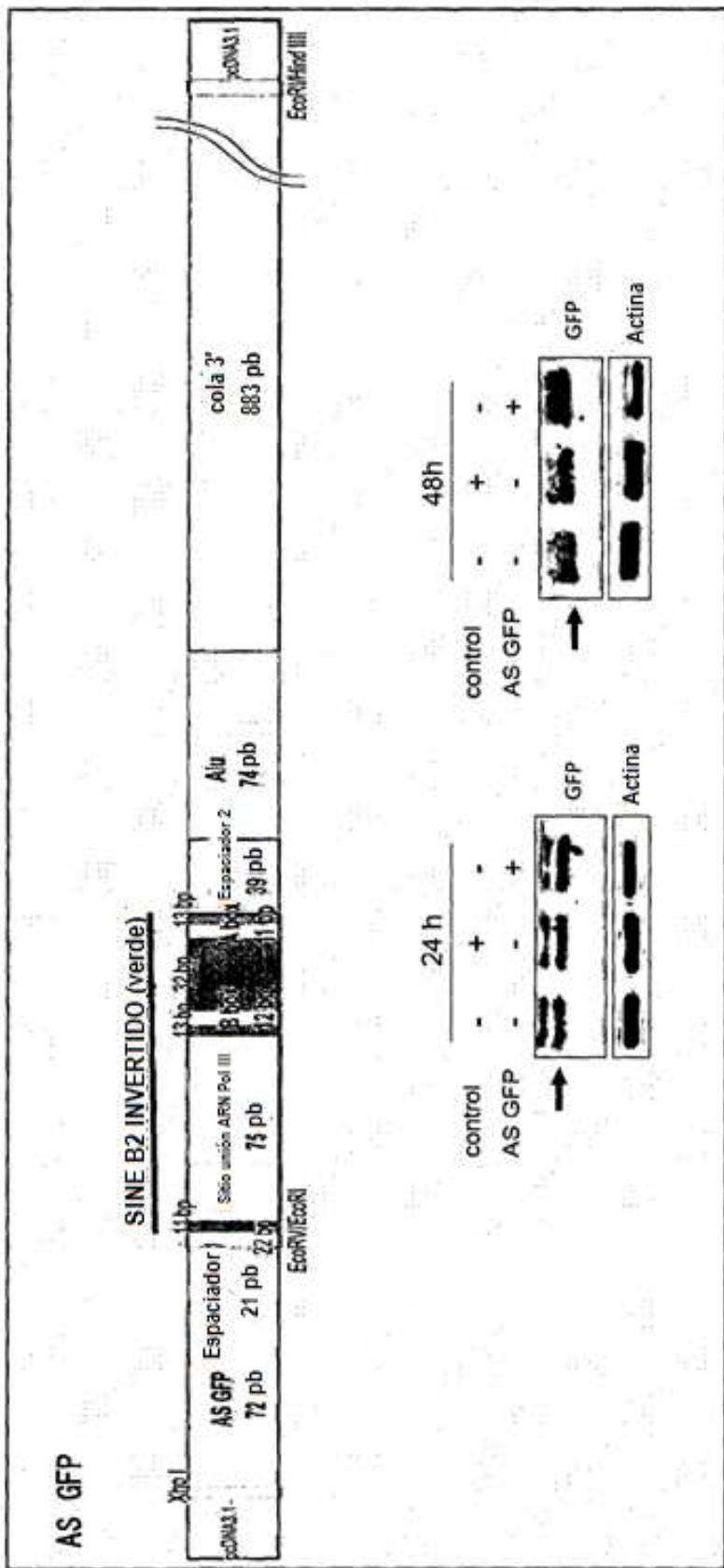


FIG. 17

