

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 503 740**

51 Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.11.2005** **E 10183525 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014** **EP 2298894**

54 Título: **Procedimientos y composiciones que implican miARN y moléculas inhibidoras de miARN**

30 Prioridad:

12.11.2004 US 627171 P

03.02.2005 US 649634 P

23.05.2005 US 683736 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
07.10.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 503 740 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimientos y composiciones que implican miARN y moléculas inhibidoras de miARN

Campo de la invención

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

Descripción de la técnica relacionada

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

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

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

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

Hay unos pocos ejemplos de que los miARN tienen papeles críticos en la diferenciación celular, el desarrollo temprano, y los procesos celulares tales como apoptosis y metabolismo de las grasas. Tanto lin-4 como let-7 regulan el paso de un estado larvario a otro durante el desarrollo de *C. elegans* (Ambros, 2003). El mir-15 y bantam son los miARN de *Drosophila* que regulan la muerte celular, aparentemente regulando la expresión de los genes implicados en la apoptosis (Brennecke y col., 2003; Xu y col., 2003). El miR14 también se ha implicado en el metabolismo graso (Xu y col., 2003). El Lys-6 y miR-273 son miARN de *C. elegans* que regulan la asimetría en las neuronas quimiosensoriales (Chang y col., 2004). Otro miARN animal que regula la diferenciación celular es el miR-181, que dirige la diferenciación de células hematopoyéticas (Chen y col., 2004). Estas moléculas representan el intervalo total de miARN animales con funciones conocidas. Además, el documento WO 03/029459 desvela el miARN miR-126. La mejora del entendimiento de las funciones de los miARN sin duda revelará sistemas reguladores que contribuyen al desarrollo normal, diferenciación, comunicaciones inter e intra celulares, ciclo celular, angiogénesis, apoptosis, y muchos otros procesos celulares. Debido a sus importantes papeles en muchas funciones biológicas, es probable que los miARN ofrezcan puntos importantes para la intervención terapéutica o el análisis diagnóstico.

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

Una limitación del sistema de expresión de miARN basado en plásmidos es que la eficacia de transfección de los plásmidos tiende a ser muy baja, con solo aproximadamente un 50% de células que expresan el ARN del plásmido en las células que son fáciles de transfectar. La eficacia de transfección para los plásmidos en células primarias son mucho más bajas con poco más del 10% de las células típicamente que expresan el ARN deseado. Por lo tanto, existe una necesidad para composiciones alternativas y procedimientos para introducir moléculas de miARN en células de forma que se puedan caracterizar y estudiar.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico miARN sintético que comprende una secuencia con al menos un 80% de identidad de secuencia con la secuencia del miR-147 humano maduro para su uso en una terapia de un cáncer. También se proporciona un ácido nucleico miARN sintético de doble cadena de 17-30 nucleótidos de longitud que comprende un polinucleótido que tiene una secuencia con al menos un 80% de identidad de secuencia con una secuencia de miR-34a maduro que comprende los nucleótidos 22-43 de las SEC ID N° 58, y un segundo polinucleótido por separado cuya secuencia de 5' a 3' es entre un 60% y el 100% complementaria para su uso como un medicamento.

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

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

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

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

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

miARN, secuencia de miARN precursor, o cualquier secuencia complementaria de los mismos. En algunas realizaciones, la secuencia es o se deriva de una secuencia de sonda identificada en el apéndice que se dirige contra el miARN particular (o grupo de miARN) que se puede utilizar con esa secuencia de sonda.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Los procedimientos incluyen identificar una célula o un paciente que tiene la necesidad de inducir esas características celulares. También se entenderá que una cantidad de ácido nucleico sintético que se proporciona a

una célula u organismo es una "cantidad eficaz", lo que se refiere a una cantidad que se necesita para conseguir un objetivo deseado, tal que induzca característica(s) celular(es) particular(es).

En ciertas realizaciones, los procedimientos incluyen proporcionar o introducir en una célula una molécula de ácido nucleico correspondiente con un miARN maduro en una cantidad eficaz para conseguir un resultado fisiológico deseado. Tales procedimientos se desvelan en el presente documento.

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

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

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

La presente invención se refiere a un ácido nucleico miARN sintético para su uso como terapia para el cáncer de próstata o la disminución de la proliferación de las células del cáncer de próstata. En ciertas realizaciones los procedimientos implican proporcionar una cantidad eficaz de miR-147. La presente invención se refiere a un ácido nucleico miARN sintético para su uso en el tratamiento de un cáncer de piel o el descenso de la proliferación de células de cáncer de piel. La presente invención se refiere a un ácido nucleico miARN sintético para su uso en el tratamiento de la leucemia o el descenso de la proliferación celular de los linfocitos T cancerosos (leucemia).

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

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

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

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

La presente invención también cubre un ácido nucleico miARN sintético para su uso en la inhibición de la activación de ERK. Se contempla que una cantidad eficaz de un modulador de miARN puede ser por administración. En realizaciones particulares, hay un beneficio terapéutico conferido a la materia biológica, donde un "beneficio terapéutico" se refiere a una mejoría en una o más afecciones o síntomas asociados con una enfermedad o afección o una mejoría del pronóstico, duración o estado con respecto a una enfermedad. Se contempla que un beneficio terapéutico incluye, pero no se limita a estos, disminución del dolor, un descenso de la morbilidad, un descenso de un síntoma. Por ejemplo, con respecto al cáncer, se contempla que un beneficio terapéutico en el cáncer puede ser la inhibición del crecimiento tumoral, prevención de metástasis, reducción del número de metástasis, inhibición de la proliferación celular cancerosa, inducción de muerte celular en células cancerosas, inhibición de angiogénesis cerca de células cancerosas, inducción de apoptosis en las células cancerosas, reducción del dolor, reducción del riesgo de recurrencia, inducción de quimio o radiosensibilidad en las células cancerosas, prolongación de la vida, y/o retraso de la muerte directa o indirectamente relacionada con el cáncer.

Además, se contempla que las composiciones de miARN se pueden proporcionar para su uso como parte de una terapia para un paciente, en conjunción con terapias tradicionales o agentes preventivos. Además, se contempla que cualquier procedimiento tratado en el contexto de la terapia se puede aplicar preventivamente, particularmente en un paciente identificado como que potencialmente necesita la terapia o en riesgo de la afección o la enfermedad para la que necesita terapia.

Las terapias del cáncer también incluyen una variedad de combinación de terapias con tratamientos tanto químicos como basados en radiación. La combinación de quimioterapias incluyen pero no están limitadas a estas, por ejemplo, bevacizumab, cisplatino (CDDP), carboplatino, inhibidores de EGFR (gefitinib y cetuximab), procarbazona, mecloretamina, ciclofosfamida, camptotecina, inhibidores de COX-2 (por ejemplo, celecoxib) ifosfamida, melfalán, clorambucilo, busulfán, nitrosurea, dactinomicina, daunorrubicina, doxorrubicina (adriamicina), bleomicina, plicomicina, mitomicina, etopósido (VP16), tamoxifeno, raloxifeno, receptor estrogénico agentes de unión, taxol, taxotere, gemcitabina, navelbine, inhibidores de farnesil-proteína transferasa, transplatino, 5-fluorouracilo, vincristina, vinblastina y metotrexato, o cualquier análogo o variante derivado de los anteriores.

Generalmente, se pueden dar inhibidores de los miARN para conseguir el efecto contrario en comparación con cuando se dan las correspondientes moléculas de ácido nucleico miARN maduro. De manera similar, se pueden dar las moléculas correspondientes de ácido nucleico miARN maduro para conseguir el efecto contrario en comparación con cuando se dan los inhibidores de miARN. Por ejemplo, se pueden proporcionar a las células moléculas de miARN que aumentan la proliferación celular para aumentar la proliferación o inhibidores de tales moléculas se pueden proporcionar a las células para disminuir la proliferación celular. La presente invención contempla estas realizaciones en el contexto de los diferentes efectos fisiológicos observados con las distintas moléculas de miARN e inhibidores de miARN desvelados en el presente documento. Estos incluyen, pero no se limitan a estos, los siguientes efectos fisiológicos: aumento y descenso de la proliferación celular, aumento o descenso de la apoptosis, aumento de la transformación, aumento o descenso de la viabilidad celular, activación de ERK, activación/inducción o inhibición de hTert, inhibición de la estimulación de Stat3, reducir o aumentar el número de células viables, y aumento o descenso del número de células en una fase particular del ciclo celular.

A lo largo de la presente solicitud, el término "aproximadamente" se utiliza para indicar que un valor incluye la desviación estándar del error para el dispositivo o procedimiento que se emplea para determinar el valor.

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

Breve descripción de los dibujos

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

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

FIG. 2. Procedimientos para introducir los miARN en las células. Hay tres procedimientos básicos para introducir miARN en las células. En el primero, un ADN que tiene un promotor corriente arriba de una secuencia

que codifica un miARN se introduce en las células donde se transcribe para producir una molécula de ARN que incluye el miARN maduro. El procesamiento y la captación por el complejo proteico para la regulación genética inducida por miARN dan como resultado la activación del miARN. Este procedimiento padece de introducción ineficaz de la construcción de ADN en las células. En el segundo procedimiento, una molécula de ARNs similar ARNsi, que tiene una de las cadenas idénticas al miARN activo se introduce en las células donde es captada por el complejo proteico para la activación del miARN. Este procedimiento proporciona un suministro eficaz, pero a menudo la captación de molécula de ARN complementaria accidental. El tercer procedimiento, descrito en el presente documento, implica la modificación de la cadena complementaria de forma que favorezca la captación y activación de la cadena activa de la construcción de miARN sintético.

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

FIG. 4. Actividad de miARN sintético para varios miARN. Se prepararon miARN con ARNsi y diseño Pre-miR (5' amina) y se transfectaron en células HeLa con una concentración final de 3 y 10 nM. Los miARN sintéticos se co-transfectaron con vectores indicadores que llevaban sitios diana para los miARN maduros. La expresión del indicador luciferasa en las células transfectadas se midió veinticuatro horas tras la transfección y se expresó en la figura como la expresión del indicador con respecto a las células co-transfectadas con miARN sintéticos controles negativos.

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

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

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

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

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

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

FIG. 11. Validación de los resultados de expresión de la matriz de miARN en pacientes con cáncer de pulmón. Se analizaron las muestras de ARN total de dos pacientes con cáncer de pulmón para hallar la expresión de miR-16, miR-21, miR-143, miR-145, y let-7 utilizando el análisis de Northern. Los gráficos muestran

la relativa abundancia de cada miARN (relación de tumor: TNA) a partir del análisis de la matriz y el análisis de la cámara fosforescente de Northern.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Descripción de las realizaciones ilustrativas

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

Los inventores también han creado una biblioteca de moléculas de ARN pequeñas, bicatenarias que se pueden utilizar para introducir los miARN en las células, así como una biblioteca de moléculas antisentido que inhiben las actividades de miARN conocidos que están presentes en las células. Estas bibliotecas se han utilizado para regular positiva o negativamente secuencialmente uno o más miARN en las células para identificar los miARN que son críticos para los procesos celulares como el ciclo celular, apoptosis, diferenciación, viabilidad, angiogénesis,

metabolismo, y otros procesos con potencial terapéutico. Los miARN que regulan la expresión de genes importantes como p53, MYC, y RAS se han identificado y caracterizado también para ubicar más los miARN que pueden proporcionar puntos importantes de intervención para tratar enfermedades. Por ejemplo se ha demostrado que let-7 está implicado con RAS. Véase, Johnson y col, 2005. Estos procesos de modulación seriada de las actividades de miARN y el ensayo de fenotipos celulares se denominan colectivamente como selección funcional de miARN.

I. Moléculas de miARN

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

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

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

miARN sintéticos

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

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

Dos diseños incorporan modificaciones químicas en la cadena complementaria. La primera modificación implica la creación de un ARN complementario con un grupo químico distinto de fosfato o hidroxilo en su extremo 5'. La presencia de la modificación en 5' aparentemente elimina la captación de la cadena complementaria y en consecuencia, favorece la captación de la cadena activa por el complejo proteico de miARN. La modificación en 5' puede ser cualquiera de una variedad de moléculas que incluyan NH_2 , NHCOCH_3 , biotina y otras.

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

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

A. Ácidos nucleicos

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

Tabla 1

Secuencias miARN Humano		
Nombre de miARN	Precursor	Secuencia Procesada Respecto al Precursor
hsa-mir-1-2	SEC ID N° 1	53-73
hsa-mir-1-1	SEC ID N° 2	46-66
hsa-let-7a-1	SEC ID N° 3	6-27
hsa-let-7a-2	SEC ID N° 4	5-26
hsa-let-7a-3	SEC ID N° 5	4-25
hsa-let-7b	SEC ID N° 6	6-27
hsa-let-7c	SEC ID N° 7	11-32
hsa-let-7d	SEC ID N° 8	8-28
hsa-let-7e	SEC ID N° 9	8-28
hsa-let-7f-1	SEC ID N° 10	7-28
hsa-let-7f-2	SEC ID N° 11	8-29
hsa-mir-7-1	SEC ID N° 12	24-44
hsa-mir-7-2	SEC ID N° 13	32-52
hsa-mir-7-3	SEC ID N° 14	31-51
hsa-let-7g	SEC ID N° 15	5-25
hsa-let-7i	SEC ID N° 16	6-24
hsa-mir-9-1	SEC ID N° 17	16-38 y/o 56-76
hsa-mir-9-2	SEC ID N° 18	16-38 y/o 54-74
hsa-mir-9-3	SEC ID N° 19	16-38 y/o 56-76
hsa-mir-10a	SEC ID N° 20	22-44
hsa-mir-10b	SEC ID N° 21	27-48
hsa-mir-15a	SEC ID N° 22	14-35
hsa-mir-15b	SEC ID N° 23	20-41
hsa-mir-16-1	SEC ID N° 24	14-35
hsa-mir-16-2	SEC ID N° 25	10-31
hsa-mir-17	SEC ID N° 26	14-37 y/o 51-70
hsa-mir-18	SEC ID N° 27	6-27

(continuación)

Secuencias miARN Humano		
Nombre de miARN	Precursor	Secuencia Procesada Respecto al Precursor
hsa-mir-19a	SEC ID N° 28	49-71
hsa-mir-19b-1	SEC ID N° 29	54-76
hsa-mir-19b-2	SEC ID N° 30	62-84
hsa-mir-20	SEC ID N° 31	8-29
hsa-mir-21	SEC ID N° 32	8-29
hsa-mir-22	SEC ID N° 33	53-74
hsa-mir-23a	SEC ID N° 34	45-65
hsa-mir-23b	SEC ID N° 35	58-80
hsa-mir-24-1	SEC ID N° 36	6-28 y/o 44-65
hsa-mir-24-2	SEC ID N° 37	50-71
hsa-mir-25	SEC ID N° 38	52-73
hsa-mir-26a-1	SEC ID N° 39	10-31
hsa-mir-26b	SEC ID N° 40	12-32
hsa-mir-26a-2	SEC ID N° 41	14-35
hsa-mir-27a	SEC ID N° 42	51-72
hsa-mir-27b	SEC ID N° 43	61-80
hsa-mir-28	SEC ID N° 44	14-35
hsa-mir-29a	SEC ID N° 45	41-62
hsa-mir-29b-1	SEC ID N° 46	51-70
hsa-mir-29b-2	SEC ID N° 47	52-71
hsa-mir-29c	SEC ID N° 48	54-75
hsa-mir-30a	SEC ID N° 49	47-68
hsa-mir-30c-2	SEC ID N° 50	7-29
hsa-mir-30d	SEC ID N° 51	6-27
hsa-mir-30b	SEC ID N° 52	17-37
hsa-mir-30c-1	SEC ID N° 53	17-39
hsa-mir-30e	SEC ID N° 54	2-21
hsa-mir-31	SEC ID N° 55	9-29
hsa-mir-32	SEC ID N° 56	6-26
hsa-mir-33	SEC ID N° 57	6-24
hsa-mir-34a	SEC ID N° 58	22-43
hsa-mir-34b	SEC ID N° 59	14-35
hsa-mir-34c	SEC ID N° 60	13-34
hsa-mir-92-1	SEC ID N° 61	48-69
hsa-mir-92-2	SEC ID N° 62	48-69
hsa-mir-93	SEC ID N° 63	12-33
hsa-mir-95	SEC ID N° 64	49-70
hsa-mir-96	SEC ID N° 65	9-30
hsa-mir-98	SEC ID N° 66	2-23
hsa-mir-99a	SEC ID N° 67	13-34

(continuación)

Secuencias miARN Humano		
Nombre de miARN	Precursor	Secuencia Procesada Respecto al Precursor
hsa-mir-99b	SEC ID Nº 68	7-28
hsa-mir-100	SEC ID Nº 69	13-34
hsa-mir-101-1	SEC ID Nº 70	47-68
hsa-mir-101-2	SEC ID Nº 71	49-70
hsa-mir-103-2	SEC ID Nº 72	48-70
hsa-mir-103-1	SEC ID Nº 73	48-70
hsa-mir-105-1	SEC ID Nº 74	13-32
hsa-mir-105-2	SEC ID Nº 75	13-32
hsa-mir-106a	SEC ID Nº 76	13-36
hsa-mir-106b	SEC ID Nº 77	12-32
hsa-mir-107	SEC ID Nº 78	50-72
hsa-mir-122a	SEC ID Nº 79	15-37
hsa-mir-124a-1	SEC ID Nº 80	52-73
hsa-mir-124a-2	SEC ID Nº 81	61-82
hsa-mir-124a-3	SEC ID Nº 82	52-73
hsa-mir-125b-1	SEC ID Nº 83	15-36
hsa-mir-125a	SEC ID Nº 84	15-37
hsa-mir-125b-2	SEC ID Nº 85	17-38
hsa-mir-126	SEC ID Nº 86	15-35 y/o 52-72
hsa-mir-127	SEC ID Nº 87	57-78
hsa-mir-128a	SEC ID Nº 88	50-71
hsa-mir-128b	SEC ID Nº 89	52-73
hsa-mir-129-2	SEC ID Nº 90	15-35
hsa-mir-130a	SEC ID Nº 91	55-74
hsa-mir-130b	SEC ID Nº 92	51-72
hsa-mir-132	SEC ID Nº 93	59-80
hsa-mir-133a-1	SEC ID Nº 94	54-75
hsa-mir-133a-2	SEC ID Nº 95	60-81
hsa-mir-133b	SEC ID Nº 96	67-87
hsa-mir-134	SEC ID Nº 97	8-28
hsa-mir-135a-1	SEC ID Nº 98	17-39
hsa-mir-135a-2	SEC ID Nº 99	23-45
hsa-mir-135b	SEC ID Nº 100	16-37
hsa-mir-136	SEC ID Nº 101	15-37
hsa-mir-137	SEC ID Nº 102	60-81
hsa-mir-138-2	SEC ID Nº 103	10-26
hsa-mir-138-1	SEC ID Nº 104	23-39
hsa-mir-139	SEC ID Nº 105	7-24
hsa-mir-140	SEC ID Nº 106	24-44
hsa-mir-141	SEC ID Nº 107	60-80
hsa-mir-142	SEC ID Nº 108	16-35 y/o 52-74

(continuación)

Secuencias miARN Humano		
Nombre de miARN	Precursor	Secuencia Procesada Respecto al Precursor
hsa-mir-143	SEC ID N° 109	61-82
hsa-mir-144	SEC ID N° 110	52-73
hsa-mir-145	SEC ID N° 111	16-39
hsa-mir-146	SEC ID N° 112	21-42
hsa-mir-147	SEC ID N° 113	47-66
hsa-mir-148a	SEC ID N° 114	44-65
hsa-mir-148b	SEC ID N° 115	63-84
hsa-mir-149	SEC ID N° 116	15-36
hsa-mir-150	SEC ID N° 117	16-37
hsa-mir-151	SEC ID N° 118	46-67
hsa-mir-152	SEC ID N° 119	54-74
hsa-mir-153-1	SEC ID N° 120	54-73
hsa-mir-153-2	SEC ID N° 121	53-72
hsa-mir-154	SEC ID N° 122	15-36
hsa-mir-155	SEC ID N° 123	4-25
hsa-mir-181a	SEC ID N° 124	39-61
hsa-mir-181b-1	SEC ID N° 125	36-59
hsa-mir-181c	SEC ID N° 126	27-48
hsa-mir-181b-2	SEC ID N° 127	16-39
hsa-mir-182	SEC ID N° 128	23-44 y/o 67-87
hsa-mir-183	SEC ID N° 129	27-49
hsa-mir-184	SEC ID N° 130	53-74
hsa-mir-185	SEC ID N° 131	15-32
hsa-mir-186	SEC ID N° 132	15-37
hsa-mir-187	SEC ID N° 133	71-91
hsa-mir-188	SEC ID N° 134	15-36
hsa-mir-190	SEC ID N° 135	15-36
hsa-mir-191	SEC ID N° 136	16-37
hsa-mir-192	SEC ID N° 137	24-44
hsa-mir-193	SEC ID N° 138	55-75
hsa-mir-194-1	SEC ID N° 139	15-36
hsa-mir-194-2	SEC ID N° 140	15-36
hsa-mir-195	SEC ID N° 141	15-35
hsa-mir-196-1	SEC ID N° 142	7-27
hsa-mir-196-2	SEC ID N° 143	25-45
hsa-mir-197	SEC ID N° 144	48-69
hsa-mir-198	SEC ID N° 145	6-24
hsa-mir-199a-1	SEC ID N° 146	6-28 y/o 46-67
hsa-mir-199a-2	SEC ID N° 147	31-53 y/o 69-90
hsa-mir-199b	SEC ID N° 148	26-48
hsa-mir-200b	SEC ID N° 149	54-77

(continuación)

Secuencias miARN Humano		
Nombre de miARN	Precursor	Secuencia Procesada Respecto al Precursor
hsa-mir-200c	SEC ID N° 150	45-66
hsa-mir-200a	SEC ID N° 151	54-75
hsa-mir-203	SEC ID N° 152	65-86
hsa-mir-204	SEC ID N° 153	33-54
hsa-mir-205	SEC ID N° 154	34-55
hsa-mir-206	SEC ID N° 155	53-74
hsa-mir-208	SEC ID N° 156	44-65
hsa-mir-210	SEC ID N° 157	66-86
hsa-mir-211	SEC ID N° 158	26-47
hsa-mir-212	SEC ID N° 159	71-91
hsa-mir-213	SEC ID N° 160	24-46 y/o 64-85
hsa-mir-214	SEC ID N° 161	71-91
hsa-mir-215	SEC ID N° 162	27-47
hsa-mir-216	SEC ID N° 163	19-39
hsa-mir-217	SEC ID N° 164	35-58
hsa-mir-218-1	SEC ID N° 165	25-45
hsa-mir-218-2	SEC ID N° 166	25-45
hsa-mir-219-1	SEC ID N° 167	21-41
hsa-mir-219-2	SEC ID N° 168	19-39
hsa-mir-220	SEC ID N° 169	23-43
hsa-mir-221	SEC ID N° 170	65-87
hsa-mir-222	SEC ID N° 171	69-92
hsa-mir-223	SEC ID N° 172	68-88
hsa-mir-224	SEC ID N° 173	8-30
hsa-mir-296	SEC ID N° 174	14-34
hsa-mir-299	SEC ID N° 175	7-28
hsa-mir-301	SEC ID N° 176	51-73
hsa-mir-302	SEC ID N° 177	44-66
hsa-mir-320	SEC ID N° 178	48-70
hsa-mir-321	SEC ID N° 179	10-30
hsa-mir-323	SEC ID N° 180	50-71
hsa-mir-324	SEC ID N° 181	16-38 y/o 51-72
hsa-mir-326	SEC ID N° 182	60-79
hsa-mir-328	SEC ID N° 183	48-69
hsa-mir-330	SEC ID N° 184	57-79
hsa-mir-331	SEC ID N° 185	61-81
hsa-mir-335	SEC ID N° 186	16-38
hsa-mir-337	SEC ID N° 187	56-78
hsa-mir-338	SEC ID N° 188	42-64
hsa-mir-339	SEC ID N° 189	15-35
hsa-mir-340	SEC ID N° 190	58-80

(continuación)

Secuencias miARN Humano		
Nombre de miARN	Precursor	Secuencia Procesada Respecto al Precursor
hsa-mir-342	SEC ID Nº 191	61-84
hsa-mir-345	SEC ID Nº 573	17-37
hsa-mir-346	SEC ID Nº 574	4-26
hsa-mir-367	SEC ID Nº 575	44-65
hsa-mir-368	SEC ID Nº 576	44-65
hsa-mir-369	SEC ID Nº 577	44-64
hsa-mir-370	SEC ID Nº 578	48-68
hsa-mir-371	SEC ID Nº 579	44-64
hsa-mir-372	SEC ID Nº 580	42-64
hsa-mir-373	SEC ID Nº 581	44-66
hsa-mir-374	SEC ID Nº 582	12-33
hsa-mir-375	SEC ID Nº 677	40-61
hsa-mir-376a	SEC ID Nº 678	44-64
hsa-mir-377	SEC ID Nº 679	45-66
hsa-mir-378	SEC ID Nº 680	5-26 y 44-65
hsa-mir-379	SEC ID Nº 681	6-24
hsa-mir-380	SEC ID Nº 682	5-26 y 40-61
hsa-mir-381	SEC ID Nº 683	49-70
hsa-mir-382	SEC ID Nº 684	11-32
hsa-mir-383	SEC ID Nº 685	7-28
hsa-mir-384	SEC ID Nº 686	57-76
hsa-mir-422a	SEC ID Nº 687	11-32
hsa-mir-423	SEC ID Nº 688	53-74
hsa-mir-424	SEC ID Nº 689	11-32
hsa-mir-425	SEC ID Nº 690	55-75
hsa-mir-448	SEC ID Nº 691	71-92
hsa-mir-429	SEC ID Nº 692	51-72
hsa-mir-449	SEC ID Nº 693	16-37
hsa-mir-450-1	SEC ID Nº 694	17-38
hsa-mir-450-2	SEC ID Nº 704	22-43
hsa-mir-451	SEC ID Nº 705	17-39
hsa-mir-452	SEC ID Nº 706	17-38
hsa-mir-453	SEC ID Nº 707	43-64
hsa-mir-455	SEC ID Nº 708	16-37
hsa-mir-483	SEC ID Nº 709	48-70
hsa-mir-484	SEC ID Nº 710	2-23
hsa-mir-485	SEC ID Nº 711	9-30
hsa-mir-486	SEC ID Nº 712	4-25
hsa-mir-487	SEC ID Nº 713	49-70
hsa-mir-488	SEC ID Nº 714	14-34
hsa-mir-489	SEC ID Nº 715	51-73

(continuación)

Secuencias miARN Humano		
Nombre de miARN	Precursor	Secuencia Procesada Respecto al Precursor
hsa-mir-490	SEC ID N° 716	76-97
hsa-mir-491	SEC ID N° 717	16-38
hsa-mir-492	SEC ID N° 718	30-52
hsa-mir-493	SEC ID N° 719	16-37
hsa-mir-494	SEC ID N° 720	48-71
hsa-mir-495	SEC ID N° 721	50-72
hsa-mir-496	SEC ID N° 722	61-77
hsa-mir-497	SEC ID N° 723	24-44
hsa-mir-498	SEC ID N° 724	34-56
hsa-mir-499	SEC ID N° 725	33-55
hsa-mir-500	SEC ID N° 726	52-73
hsa-mir-501	SEC ID N° 727	14-35
hsa-mir-502	SEC ID N° 728	1-21
hsa-mir-503	SEC ID N° 729	6-28
hsa-mir-504	SEC ID N° 730	13-33
hsa-mir-505	SEC ID N° 731	52-73
hsa-mir-506	SEC ID N° 732	71-91
hsa-mir-507	SEC ID N° 733	56-76
hsa-mir-508	SEC ID N° 734	61-83
hsa-mir-509	SEC ID N° 735	55-77
hsa-mir-510	SEC ID N° 736	10-32
hsa-mir-511-1	SEC ID N° 737	16-36
hsa-mir-511-2	SEC ID N° 738	16-36
hsa-mir-512-1	SEC ID N° 739	14-36
hsa-mir-512-2	SEC ID N° 740	20-42
hsa-mir-513-1	SEC ID N° 741	37-58
hsa-mir-513-2	SEC ID N° 742	36-57
hsa-mir-514-1	SEC ID N° 743	39-58
hsa-mir-514-2	SEC ID N° 744	39-58
hsa-mir-514-3	SEC ID N° 745	39-58
hsa-mir-515-1	SEC ID N° 746	14-37
hsa-mir-515-2	SEC ID N° 747	14-37
hsa-mir-516-1	SEC ID N° 748	61-78
hsa-mir-516-2	SEC ID N° 749	61-78
hsa-mir-516-3	SEC ID N° 750	15-37
hsa-mir-516-4	SEC ID N° 751	15-37
hsa-mir-517a	SEC ID N° 752	15-36
hsa-mir-517b	SEC ID N° 753	6-27
hsa-mir-517c	SEC ID N° 754	20-41
hsa-mir-518a-1	SEC ID N° 755	14-34
hsa-mir-518a-2	SEC ID N° 756	15-34

(continuación)

Secuencias miARN Humano		
Nombre de miARN	Precursor	Secuencia Procesada Respecto al Precursor
hsa-mir-518b	SEC ID N° 757	51-72
hsa-mir-518c	SEC ID N° 758	24-46
hsa-mir-518d	SEC ID N° 759	16-36
hsa-mir-518e	SEC ID N° 760	54-75
hsa-mir-518f	SEC ID N° 761	16-38
hsa-mir-519a-1	SEC ID N° 762	15-38
hsa-mir-519a-2	SEC ID N° 763	54-78
hsa-mir-519b	SEC ID N° 764	13-36
hsa-mir-519c	SEC ID N° 765	16-39
hsa-mir-519d	SEC ID N° 766	54-76
hsa-mir-519e	SEC ID N° 767	14-35
hsa-mir-520a	SEC ID N° 768	15-35
hsa-mir-520b	SEC ID N° 769	41-61
hsa-mir-520c	SEC ID N° 770	16-36
hsa-mir-520d	SEC ID N° 771	15-37
hsa-mir-520e	SEC ID N° 772	54-74
hsa-mir-520f	SEC ID N° 773	55-76
hsa-mir-520g	SEC ID N° 774	55-78
hsa-mir-520h	SEC ID N° 775	55-76
hsa-mir-521-1	SEC ID N° 776	54-75
hsa-mir-521-2	SEC ID N° 777	54-75
hsa-mir-522	SEC ID N° 778	16-39
hsa-mir-523	SEC ID N° 779	16-39
hsa-mir-524	SEC ID N° 780	16-37
hsa-mir-525	SEC ID N° 781	15-35
hsa-mir-526a-1	SEC ID N° 782	15-35
hsa-mir-526a-2	SEC ID N° 783	7-27
hsa-mir-526b	SEC ID N° 784	14-37
hsa-mir-527	SEC ID N° 785	14-34
ambi-mir-7100	SEC ID N° 803	
mir-526b*	SEC ID N° 804	
mir-520a*	SEC ID N° 805	

Tabla 2

Secuencias de miARN de ratón		
Nombre de miARN	Precursor	Secuencia Procesada Respecto al Precursor
mmu-mir-1-1	SEC ID N° 192	49-69

(continuación)

Secuencias de miARN de ratón		
Nombre de miARN	Precursor	Secuencia Procesada Respecto al Precursor
mmu-mir-1-2	SEC ID Nº 193	47-67
mmu-let-7g	SEC ID Nº 194	7-27
mmu-let-7i	SEC ID Nº 195	6-24
mmu-let-7d	SEC ID Nº 196	16-36 + 70-91
mmu-let-7a-1	SEC ID Nº 197	13-34
mmu-let-7a-2	SEC ID Nº 198	17-38
mmu-let-7b	SEC ID Nº 199	7-28
mmu-let-7c-1	SEC ID Nº 200	16-37
mmu-let-7c-2	SEC ID Nº 201	14-35
mmu-let-7e	SEC ID Nº 202	15-35
mmu-let-7f-1	SEC ID Nº 203	8-29
mmu-let-7f-2	SEC ID Nº 204	8-29
mmu-mir-7-1	SEC ID Nº 205	24-44
mmu-mir-7-2	SEC ID Nº 206	19-39
mmu-mir-7b	SEC ID Nº 207	30-50
mmu-mir-9-2	SEC ID Nº 208	8-30 y/o 46-66
mmu-mir-9-1	SEC ID Nº 209	16-38 y/o 56-76
mmu-mir-9-3	SEC ID Nº 210	16-38 y/o 56-76
mmu-mir-10b	SEC ID Nº 211	7-28
mmu-mir-10a-1	SEC ID Nº 212	22-44
mmu-mir-10a-2	SEC ID Nº 213	22-44
mmu-mir-15b	SEC ID Nº 214	4-25
mmu-mir-15a	SEC ID Nº 215	15-36
mmu-mir-16-1	SEC ID Nº 216	16-37
mmu-mir-16-2	SEC ID Nº 217	17-38
mmu-mir-17	SEC ID Nº 218	14-37 y/o 51-70
mmu-mir-18	SEC ID Nº 219	17-38
mmu-mir-19b-2	SEC ID Nº 220	54-76
mmu-mir-19a	SEC ID Nº 221	49-71
mmu-mir-19b-1	SEC ID Nº 222	54-76
mmu-mir-20	SEC ID Nº 223	27-49
mmu-mir-21	SEC ID Nº 224	18-39
mmu-mir-22	SEC ID Nº 225	57-78
mmu-mir-23b	SEC ID Nº 226	46-68

(continuación)

Secuencias de miARN de ratón		
Nombre de miARN	Precursor	Secuencia Procesada Respecto al Precursor
mmu-mir-23a	SEC ID N° 227	46-66
mmu-mir-24-1	SEC ID N° 228	6-28 y/o 44-65
mmu-mir-24-2	SEC ID N° 229	61-82
mmu-mir-25	SEC ID N° 230	52-73
mmu-mir-26a-1	SEC ID N° 231	16-37
mmu-mir-26b	SEC ID N° 232	15-36
mmu-mir-26a-2	SEC ID N° 233	14-35
mmu-mir-27b	SEC ID N° 234	49-68
mmu-mir-27a	SEC ID N° 235	56-76
mmu-mir-28	SEC ID N° 236	14-35
mmu-mir-29b-1	SEC ID N° 237	47-68
mmu-mir-29a	SEC ID N° 238	53-74
mmu-mir-29c	SEC ID N° 239	54-75
mmu-mir-29b-2	SEC ID N° 240	52-73
mmu-mir-30a	SEC ID N° 241	47-68
mmu-mir-30b	SEC ID N° 242	2-22
mmu-mir-30e	SEC ID N° 243	2-21
mmu-mir-30c-1	SEC ID N° 244	17-39
mmu-mir-30c-2	SEC ID N° 245	14-36
mmu-mir-30d	SEC ID N° 246	12-33
mmu-mir-31	SEC ID N° 247	28-49
mmu-mir-32	SEC ID N° 248	6-26
mmu-mir-33	SEC ID N° 249	6-24
mmu-mir-34c	SEC ID N° 250	13-35
mmu-mir-34b	SEC ID N° 251	13-35
mmu-mir-34a	SEC ID N° 252	20-42
mmu-mir-92-2	SEC ID N° 253	55-75
mmu-mir-92-1	SEC ID N° 254	50-70
mmu-mir-93	SEC ID N° 255	15-37
mmu-mir-96	SEC ID N° 256	24-46
mmu-mir-98	SEC ID N° 257	2-23
mmu-mir-99a	SEC ID N° 258	6-25
mmu-mir-99b	SEC ID N° 259	7-28
mmu-mir-100	SEC ID N° 260	13-34
mmu-mir-101	SEC ID N° 261	38-57

(continuación)

Secuencias de miARN de ratón		
Nombre de miARN	Precursor	Secuencia Procesada Respecto al Precursor
mmu-mir-101b	SEC ID N° 262	61-82
mmu-mir-103-1	SEC ID N° 263	52-74
mmu-mir-103-2	SEC ID N° 264	52-74
mmu-mir-106a	SEC ID N° 265	5-26
mmu-mir-106b	SEC ID N° 266	12-32
mmu-mir-107	SEC ID N° 267	52-74
mmu-mir-122a	SEC ID N° 268	6-28
mmu-mir-124a-3	SEC ID N° 269	43-64
mmu-mir-124a-1	SEC ID N° 270	52-73
mmu-mir-124a-2	SEC ID N° 271	61-82
mmu-mir-125a	SEC ID N° 272	6-28
mmu-mir-125b-2	SEC ID N° 273	7-28
mmu-mir-125b-1	SEC ID N° 274	15-36
mmu-mir-126	SEC ID N° 275	9-29 y/o 46-66
mmu-mir-127	SEC ID N° 276	43-64
mmu-mir-128a	SEC ID N° 277	44-65
mmu-mir-128b	SEC ID N° 278	48-69
mmu-mir-129-1	SEC ID N° 279	6-27
mmu-mir-129-2	SEC ID N° 280	15-36
mmu-mir-130a	SEC ID N° 281	42-61
mmu-mir-130b	SEC ID N° 282	51-72
mmu-mir-132	SEC ID N° 283	42-63
mmu-mir-133a-1	SEC ID N° 284	44-65
mmu-mir-133a-2	SEC ID N° 285	60-81
mmu-mir-133b	SEC ID N° 286	67-87
mmu-mir-134	SEC ID N° 287	7-27
mmu-mir-135a-1	SEC ID N° 288	17-39
mmu-mir-135b	SEC ID N° 289	16-37
mmu-mir-135a-2	SEC ID N° 290	23-45
mmu-mir-136	SEC ID N° 291	5-27
mmu-mir-137	SEC ID N° 292	46-67
mmu-mir-138-2	SEC ID N° 293	2-18
mmu-mir-138-1	SEC ID N° 294	23-39
mmu-mir-139	SEC ID N° 295	7-24
mmu-mir-140	SEC ID N° 296	7-27

(continuación)

Secuencias de miARN de ratón		
Nombre de miARN	Precursor	Secuencia Procesada Respecto al Precursor
mmu-mir-141	SEC ID N° 297	49-69
mmu-mir-142	SEC ID N° 298	4-23 y/o 40-61
mmu-mir-143	SEC ID N° 299	40-61
mmu-mir-144	SEC ID N° 300	43-64
mmu-mir-145	SEC ID N° 301	7-30
mmu-mir-146	SEC ID N° 302	6-27
mmu-mir-148a	SEC ID N° 303	61-82
mmu-mir-149	SEC ID N° 304	4-25
mmu-mir-150	SEC ID N° 305	6-27
mmu-mir-151	SEC ID N° 306	43-63
mmu-mir-152	SEC ID N° 307	47-67
mmu-mir-153	SEC ID N° 308	44-63
mmu-mir-154	SEC ID N° 309	6-27
mmu-mir-155	SEC ID N° 310	4-25
mmu-mir-181a	SEC ID N° 311	7-29
mmu-mir-181b-1	SEC ID N° 312	12-35
mmu-mir-181c	SEC ID N° 313	17-38
mmu-mir-181b-2	SEC ID N° 314	16-39
mmu-mir-182	SEC ID N° 315	7-28
mmu-mir-183	SEC ID N° 316	6-28
mmu-mir-184	SEC ID N° 317	45-66
mmu-mir-185	SEC ID N° 318	7-24
mmu-mir-186	SEC ID N° 319	7-29
mmu-mir-187	SEC ID N° 320	40-61
mmu-mir-188	SEC ID N° 321	6-27
mmu-mir-190	SEC ID N° 322	6-27
mmu-mir-191	SEC ID N° 323	7-28
mmu-mir-192	SEC ID N° 324	14-31
mmu-mir-193	SEC ID N° 325	41-61
mmu-mir-194-1	SEC ID N° 326	7-28
mmu-mir-194-2	SEC ID N° 327	16-37
mmu-mir-195	SEC ID N° 328	1-21
mmu-mir-196-1	SEC ID N° 329	24-44
mmu-mir-196-2	SEC ID N° 330	16-36
mmu-mir-199a-1	SEC ID N° 331	6-28 y/o 45-66

(continuación)

Secuencias de miARN de ratón		
Nombre de miARN	Precursor	Secuencia Procesada Respecto al Precursor
mmu-mir-199a-2	SEC ID N° 332	31-53 y/o 69-90
mmu-mir-199b	SEC ID N° 333	26-48
mmu-mir-200b	SEC ID N° 334	45-67
mmu-mir-200a	SEC ID N° 335	54-75
mmu-mir-200c	SEC ID N° 336	46-67
mmu-mir-201	SEC ID N° 337	6-26
mmu-mir-202	SEC ID N° 338	45-66
mmu-mir-203	SEC ID N° 339	49-69
mmu-mir-204	SEC ID N° 340	6-28
mmu-mir-205	SEC ID N° 341	7-28
mmu-mir-206	SEC ID N° 342	46-67
mmu-mir-207	SEC ID N° 343	52-74
mmu-mir-208	SEC ID N° 344	50-71
mmu-mir-210	SEC ID N° 345	66-86
mmu-mir-211	SEC ID N° 346	26-47
mmu-mir-212	SEC ID N° 347	56-76
mmu-mir-213	SEC ID N° 348	14-36 y/o 54-75
mmu-mir-214	SEC ID N° 349	71-91
mmu-mir-215	SEC ID N° 350	30-50
mmu-mir-216	SEC ID N° 351	7-27
mmu-mir-217	SEC ID N° 352	34-57
mmu-mir-218-2	SEC ID N° 353	25-45
mmu-mir-219-1	SEC ID N° 354	21-41
mmu-mir-219-2	SEC ID N° 355	19-39
mmu-mir-221	SEC ID N° 356	60-81
mmu-mir-222	SEC ID N° 357	49-71
mmu-mir-223	SEC ID N° 358	68-88
mmu-mir-224	SEC ID N° 359	8-30
mu-miR-290	SEC ID N° 360	15-37
mmu-mir-291	SEC ID N° 361	14-35 y/o 50-72
mmu-mir-292	SEC ID N° 362	12-33 y/o 51-73
mmu-mir-293	SEC ID N° 363	48-69
mmu-mir-294	SEC ID N° 364	51-72
mmu-mir-295	SEC ID N° 365	43-65
mmu-mir-296	SEC ID N° 366	13-33

(continuación)

Secuencias de miARN de ratón		
Nombre de miARN	Precursor	Secuencia Procesada Respecto al Precursor
mmu-mir-297-1	SEC ID N° 367	15-35
mmu-mir-297-2	SEC ID N° 368	36-56
mmu-mir-298	SEC ID N° 369	11-32
mmu-mir-299	SEC ID N° 370	7-28
mmu-mir-300	SEC ID N° 371	51-72
mmu-mir-301	SEC ID N° 372	51-73
mmu-mir-302	SEC ID N° 373	44-66
mmu-mir-320	SEC ID N° 374	48-70
mmu-mir-321	SEC ID N° 375	10-30
mmu-mir-323	SEC ID N° 376	50-71
mmu-mir-324	SEC ID N° 377	18-40 y/o 53-74
mmu-mir-325	SEC ID N° 378	16-38
mmu-mir-326	SEC ID N° 379	60-80
mmu-mir-328	SEC ID N° 380	61-82
mmu-mir-329	SEC ID N° 381	61-82
mmu-mir-330	SEC ID N° 382	61-83
mmu-mir-331	SEC ID N° 383	61-81
mmu-mir-337	SEC ID N° 384	61-83
mmu-mir-338	SEC ID N° 385	61-83
mmu-mir-339	SEC ID N° 386	16-36
mmu-mir-340	SEC ID N° 387	61-83
mmu-mir-341	SEC ID N° 388	61-81
mmu-mir-342	SEC ID N° 389	61-84
mmu-mir-344	SEC ID N° 390	61-83
mmu-mir-345	SEC ID N° 391	16-36
mmu-mir-346	SEC ID N° 392	16-38
mmu-mir-350	SEC ID N° 393	61-84
mmu-mir-351	SEC ID N° 583	16-39
mmu-mir-370	SEC ID N° 584	48-70
mmu-mir-376a	SEC ID N° 585	44-64
mmu-mir-376b	SEC ID N° 586	51-72
mmu-mir-380	SEC ID N° 587	40-61
mmu-mir-409	SEC ID N° 588	47-69
mmu-mir-410	SEC ID N° 589	50-71
mmu-mir-411	SEC ID N° 590	56-78

(continuación)

Secuencias de miARN de ratón		
Nombre de miARN	Precursor	Secuencia Procesada Respecto al Precursor
mmu-mir-412	SEC ID N° 591	50-72
mmu-mir-425	SEC ID N° 695	54-74
mmu-mir-429	SEC ID N° 696	51-72
mmu-mir-448	SEC ID N° 697	72-93
mmu-mir-449	SEC ID N° 698	16-37
mmu-mir-450	SEC ID N° 699	17-38
mmu-mir-451	SEC ID N° 786	17-38
mmu-mir-452	SEC ID N° 787	17-38
mmu-mir-463	SEC ID N° 788	4-24
mmu-mir-464	SEC ID N° 789	47-69
mmu-mir-465	SEC ID N° 790	5-27
mmu-mir-466	SEC ID N° 791	51-73
mmu-mir-467	SEC ID N° 792	50-71
mmu-mir-468	SEC ID N° 793	53-75
mmu-mir-469	SEC ID N° 794	6-31
mmu-mir-470	SEC ID N° 795	9-29
mmu-mir-471	SEC ID N° 796	7-29
mmu-mir-483	SEC ID N° 797	45-67
mmu-mir-484	SEC ID N° 798	2-23
mmu-mir-485	SEC ID N° 799	9-30
mmu-mir-486	SEC ID N° 800	4-25

Tabla 3

Secuencias de miARN de rata		
Nombre de miARN	Precursor	Secuencia Procesada Respecto al Precursor
rno-let-7d	SEC ID N° 394	14-34 y/o 68-89
rno-mir-7-1	SEC ID N° 395	19-39 y/o 61-82
rno-let-7a-1	SEC ID N° 396	13-34
rno-let-7a-2	SEC ID N° 397	17-38
rno-let-7b	SEC ID N° 398	7-28
rno-let-7c-1	SEC ID N° 399	16-37
rno-let-7c-2	SEC ID N° 400	14-35
rno-let-7e	SEC ID N° 401	15-35
rno-let-7f-1	SEC ID N° 402	8-29
rno-let-7f-2	SEC ID N° 403	8-29

(continuación)

Secuencias de miARN de rata		
Nombre de miARN	Precursor	Secuencia Procesada Respecto al Precursor
rno-let-7i	SEC ID Nº 404	6-24
rno-mir-7-2	SEC ID Nº 405	19-39
rno-mir-7b	SEC ID Nº 406	29-49
rno-mir-9-1	SEC ID Nº 407	16-38
rno-mir-9-3	SEC ID Nº 408	16-38
rno-mir-9-2	SEC ID Nº 409	16-38
rno-mir-10a	SEC ID Nº 410	22-44
rno-mir-10b	SEC ID Nº 411	26-47
rno-mir-15b	SEC ID Nº 412	20-41
rno-mir-16	SEC ID Nº 413	17-38
rno-mir-17	SEC ID Nº 414	14-37
rno-mir-18	SEC ID Nº 415	17-38
rno-mir-19b-1	SEC ID Nº 416	54-76
rno-mir-19b-2	SEC ID Nº 417	62-84
rno-mir-19a	SEC ID Nº 418	49-71
rno-mir-20	SEC ID Nº 419	16-38 y/o 52-72
rno-mir-21	SEC ID Nº 420	18-39
rno-mir-22	SEC ID Nº 421	57-78
rno-mir-23a	SEC ID Nº 422	46-66
rno-mir-23b	SEC ID Nº 423	58-80
rno-mir-24-1	SEC ID Nº 424	44-65
rno-mir-24-2	SEC ID Nº 425	61-82
rno-mir-25	SEC ID Nº 426	52-73
rno-mir-26a	SEC ID Nº 427	16-37
rno-mir-26b	SEC ID Nº 428	15-36
rno-mir-27b	SEC ID Nº 429	61-80
rno-mir-27a	SEC ID Nº 430	56-76
rno-mir-28	SEC ID Nº 431	14-35
rno-mir-29b-2	SEC ID Nº 432	52-73
rno-mir-29a	SEC ID Nº 433	53-74
rno-mir-29b-1	SEC ID Nº 434	51-72
rno-mir-29c	SEC ID Nº 435	54-75
rno-mir-30c-1	SEC ID Nº 436	17-39
rno-mir-30e	SEC ID Nº 437	2-21

(continuación)

Secuencias de miARN de rata		
Nombre de miARN	Precursor	Secuencia Procesada Respecto al Precursor
rno-mir-30b	SEC ID N° 438	16-36
rno-mir-30d	SEC ID N° 439	12-33
rno-mir-30a	SEC ID N° 440	47-68
rno-mir-30c-2	SEC ID N° 441	14-36
rno-mir-31	SEC ID N° 442	28-49
rno-mir-32	SEC ID N° 443	6-26
rno-mir-33	SEC ID N° 444	6-24
rno-mir-34b	SEC ID N° 445	13-35
rno-mir-34c	SEC ID N° 446	13-35
rno-mir-34a	SEC ID N° 447	20-42
rno-mir-92-1	SEC ID N° 448	48-68
rno-mir-92-2	SEC ID N° 449	55-75
rno-mir-93	SEC ID N° 450	15-37
rno-mir-96	SEC ID N° 451	24-46
rno-mir-98	SEC ID N° 452	2-23
rno-mir-99a	SEC ID N° 453	13-34
rno-mir-99b	SEC ID N° 454	7-28
rno-mir-100	SEC ID N° 455	13-34
rno-mir-101b	SEC ID N° 456	61-82
rno-mir-101	SEC ID N° 457	47-68
rno-mir-103-2	SEC ID N° 458	52-74
rno-mir-103-1	SEC ID N° 459	52-74
rno-mir-106b	SEC ID N° 460	12-32
rno-mir-107	SEC ID N° 461	52-74
rno-mir-122a	SEC ID N° 462	15-37
rno-mir-124a-3	SEC ID N° 463	52-73
rno-mir-124a-1	SEC ID N° 464	52-73
rno-mir-124a-2	SEC ID N° 465	61-82
rno-mir-125a	SEC ID N° 466	15-37
rno-mir-125b-1	SEC ID N° 467	15-36
rno-mir-125b-2	SEC ID N° 468	17-38
rno-mir-126	SEC ID N° 469	9-29 y/o 46-66
rno-mir-127	SEC ID N° 470	57-78
mo-mir-128a	SEC ID N° 471	50-71
mo-mir-128b	SEC ID N° 472	52-73

(continuación)

Secuencias de miARN de rata		
Nombre de miARN	Precursor	Secuencia Procesada Respecto al Precursor
rno-mir-129-2	SEC ID N° 473	19-40 y/o 61-82
rno-mir-129-1	SEC ID N° 474	6-27
rno-mir-130a	SEC ID N° 475	55-74
rno-mir-130b	SEC ID N° 476	51-72
rno-mir-132	SEC ID N° 477	59-80
rno-mir-133a	SEC ID N° 478	53-74
rno-mir-134	SEC ID N° 479	8-28
rno-mir-135b	SEC ID N° 480	16-37
rno-mir-135a	SEC ID N° 481	23-45
rno-mir-136	SEC ID N° 482	15-37
rno-mir-137	SEC ID N° 483	60-81
rno-mir-138-2	SEC ID N° 484	9-25
rno-mir-138-1	SEC ID N° 485	23-39
rno-mir-139	SEC ID N° 486	7-24
rno-mir-140	SEC ID N° 487	23-43 y/o 61-84
rno-mir-141	SEC ID N° 488	59-79
rno-mir-142	SEC ID N° 489	16-35 y/o 52-74
rno-mir-143	SEC ID N° 490	60-81
rno-mir-144	SEC ID N° 491	50-71
rno-mir-145	SEC ID N° 492	16-39
rno-mir-146	SEC ID N° 493	17-38
rno-mir-148b	SEC ID N° 494	61-82
rno-mir-150	SEC ID N° 495	16-37
rno-mir-151	SEC ID N° 496	16-37 y/o 50-71
rno-mir-152	SEC ID N° 497	53-73
rno-mir-153	SEC ID N° 498	53-72
rno-mir-154	SEC ID N° 499	15-36
rno-mir-181c	SEC ID N° 500	24-45
rno-mir-181a	SEC ID N° 501	39-61
rno-mir-181b-1	SEC ID N° 502	36-59
rno-mir-181b-2	SEC ID N° 503	15-38
rno-mir-183	SEC ID N° 504	27-49
rno-mir-184	SEC ID N° 505	47-68
rno-mir-185	SEC ID N° 506	14-31
rno-mir-186	SEC ID N° 507	15-37

(continuación)

Secuencias de miARN de rata		
Nombre de miARN	Precursor	Secuencia Procesada Respecto al Precursor
rno-mir-187	SEC ID Nº 508	66-86
rno-mir-190	SEC ID Nº 509	15-36
rno-mir-191	SEC ID Nº 510	15-36
rno-mir-192	SEC ID Nº 511	24-44
rno-mir-193	SEC ID Nº 512	54-74
rno-mir-194-1	SEC ID Nº 513	15-36
rno-mir-194-2	SEC ID Nº 514	15-36
rno-mir-195	SEC ID Nº 515	15-35
rno-mir-196	SEC ID Nº 516	25-45
rno-mir-199a	SEC ID Nº 517	31-53
rno-mir-200c	SEC ID Nº 518	46-67
rno-mir-200a	SEC ID Nº 519	54-75
rno-mir-200b	SEC ID Nº 520	54-77
rno-mir-203	SEC ID Nº 521	52-73
rno-mir-204	SEC ID Nº 522	33-54
rno-mir-205	SEC ID Nº 523	33-54
rno-mir-206	SEC ID Nº 524	51-72
rno-mir-208	SEC ID Nº 525	50-71
rno-mir-210	SEC ID Nº 526	66-86
rno-mir-211	SEC ID Nº 527	26-47
rno-mir-212	SEC ID Nº 528	72-92
rno-mir-213	SEC ID Nº 529	55-76
rno-mir-214	SEC ID Nº 530	71-91
rno-mir-216	SEC ID Nº 531	19-39
rno-mir-217	SEC ID Nº 532	32-55
rno-mir-218-2	SEC ID Nº 533	25-45
rno-mir-218-1	SEC ID Nº 534	25-45
rno-mir-219-1	SEC ID Nº 535	21-41
rno-mir-219-2	SEC ID Nº 536	19-39
rno-mir-221	SEC ID Nº 537	65-87
rno-mir-222	SEC ID Nº 538	62-85
rno-mir-223	SEC ID Nº 539	68-88
rno-mir-290	SEC ID Nº 540	14-36
rno-mir-291	SEC ID Nº 541	14-35 y/o 50-72
rno-mir-292	SEC ID Nº 542	12-33 y/o 51-73

(continuación)

Secuencias de miARN de rata		
Nombre de miARN	Precursor	Secuencia Procesada Respecto al Precursor
rno-mir-296	SEC ID N° 543	13-33
rno-mir-297	SEC ID N° 544	26-48
rno-mir-298	SEC ID N° 545	11-32
rno-mir-299	SEC ID N° 546	7-28
rno-mir-300	SEC ID N° 547	51-72
rno-mir-301	SEC ID N° 548	61-85
rno-mir-320	SEC ID N° 549	48-70
rno-mir-321	SEC ID N° 550	10-30
rno-mir-322	SEC ID N° 551	61-80
rno-mir-323	SEC ID N° 552	50-71
rno-mir-324	SEC ID N° 553	16-38 y/o 51-72
rno-mir-325	SEC ID N° 554	16-38
rno-mir-326	SEC ID N° 555	60-80
rno-mir-328	SEC ID N° 556	48-69
rno-mir-329	SEC ID N° 557	61-82
rno-mir-330	SEC ID N° 558	60-82
rno-mir-3 31	SEC ID N° 559	61-81
rno-mir-333	SEC ID N° 560	16-35
rno-mir-336	SEC ID N° 561	16-36
rno-mir-337	SEC ID N° 562	60-82
rno-mir-338	SEC ID N° 563	41-63
rno-mir-339	SEC ID N° 564	16-36
rno-mir-341	SEC ID N° 565	61-81
rno-mir-342	SEC ID N° 566	61-84
rno-mir-344	SEC ID N° 567	61-83
rno-mir-345	SEC ID N° 568	16-36
rno-mir-346	SEC ID N° 569	16-38
rno-mir-349	SEC ID N° 570	61-82
rno-mir-350	SEC ID N° 571	61-84
rno-mir-351	SEC ID N° 572	16-39
rno-mir-352	SEC ID N° 592	61-81
rno-mir-421	SEC ID N° 593	10-30
rno-mir-429	SEC ID N° 700	53-74
rno-mir-448	SEC ID N° 701	72-93
rno-mir-449	SEC ID N° 702	16-37

(continuación)

Secuencias de miARN de rata		
Nombre de miARN	Precursor	Secuencia Procesada Respecto al Precursor
rno-mir-450	SEC ID N° 703	17-38
rno-mir-451	SEC ID N° 801	17-38
rno-mir-483	SEC ID N° 802	45-67

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

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

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

El término "miARN" generalmente se refiere a una molécula de una cadena, pero en realizaciones específicas, las moléculas implementadas en la invención también englobarán una región o una cadena adicional que es parcialmente (entre el 10 y el 50% complementaria a lo largo de la longitud de la cadena), sustancialmente (más del 50% pero menos del 100% complementaria a lo largo de la longitud de la cadena) o totalmente complementaria con otra región de la misma molécula de la cadena única o con otro ácido nucleico. Por lo tanto, los ácidos nucleicos pueden englobar una molécula que comprende una o más cadenas complementarias o autocomplementarias o "complementos" de una secuencia particular que comprende una molécula. Por ejemplo, el precursor de miARN puede tener una región autocomplementaria que es complementaria hasta en el 100%.

Como se utiliza en el presente documento, "hibridación", "se hibrida" o "capaz de hibridarse" se entiende que significa la formación de una molécula de doble o triple cadena o una molécula con naturaleza parcial de doble o triple cadena. El término "templarse" como se utiliza en el presente documento es sinónimo de "hibridarse". El término "hibridación", "se hibrida(n)" o "capaz de hibridarse" engloba los términos "condiciones rigurosas" o "alta rigurosidad" y los términos "baja rigurosidad" o "condiciones de baja rigurosidad".

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

1. Bases nitrogenadas

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

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

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

2. Nucleósidos

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

Se conocen en la técnica diferentes tipos de uniones covalentes de una base nitrogenada a un resto de base nitrogenada engarce. A manera de ejemplo no limitante, un nucleósido que comprende una purina (es decir, A o G) o una base nitrogenada 7-deaza purina se une covalentemente típicamente en la posición 9 de una purina o una 7-deazapurina en la posición 1' de un azúcar en la posición 5. En otro ejemplo no limitante, un nucleósido comprende una base nitrogenada pirimidínica (es decir, C, T, o U) se une covalentemente típicamente con una posición 1 de una pirimidina o una posición 1' de un azúcar de 5 carbonos (Komberg y Baker, 1992).

3. Nucleótidos

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

4. Análogos de ácido nucleico

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

Ejemplos no limitantes adicionales de nucleósidos, nucleótidos o ácidos nucleicos y/o derivados o análogos que comprenden un azúcar de 5 carbonos y/o un resto de estructura, incluyen los de: la Patente de EE. UU. N° 5.681.947, que describe oligonucleótidos que comprenden derivados de purina que forman hélices triples y/o evitan la expresión de ADNds; las Patentes de EE. UU. 5.652.099 y 5.763.167, que describen ácidos nucleicos que incorporan análogos de nucleósidos fluorescentes que se encuentran en ADN o ARN, particularmente para su uso como sondas de ácidos nucleicos fluorescentes; la Patente de EE. UU. 5.614.617, que describe análogos de oligonucleótidos con sustituciones en los anillos de pirimidina que poseen una estabilidad mejorada frente a nucleasas; las Patentes de EE. UU. 5.670.663, 5.872.232 y 5.859.221, que describen análogos de oligonucleótidos con azúcares de 5 carbonos modificados (es decir, restos de 2'-desoxifuranosilo) que se utilizan en la detección de ácidos nucleicos; la Patente de EE. UU. 5.446.137, que describe oligonucleótidos que comprenden al menos un resto de azúcar de 5 carbonos sustituidos en la posición 4' con un sustituyente distinto de hidrógeno que se puede

utilizar en ensayos de hibridación; la Patente de EE. UU. 5.886.165, que describe oligonucleótidos tanto desoxirribonucleótidos con uniones internucleótido 3'-5' como ribonucleótidos con uniones internucleótido 2'-5'; la Patente de EE. UU. 5.714.606, que describe una unión internucleótido modificada en la que un oxígeno en la posición 3' de la unión internucleótido se sustituye con un carbono para mejorar la resistencia a nucleasas de los ácidos nucleicos; la Patente de EE. UU. 5.672.697, que describe oligonucleótidos que contienen una o más uniones internucleótidos 5' metilen fosfonato que aumentan las resistencia a nucleasas; las Patentes de EE. UU. 5.466.786 y 5.792.847, que describen la unión de un resto sustituyente que puede comprender un fármaco o una marca en el carbono 2' de un oligonucleótido para proporcionar una mayor estabilidad frente a nucleasas y la capacidad de suministrar fármacos y restos de detección; la Patente de EE. UU. 5.223.618, que describe análogos de oligonucleótidos con 2 o 3 uniones de carbono estructurales unidas en la posición 4' y posición 3' adyacentes al resto de azúcar de 5 carbonos para mejorar la captación celular, la resistencia a las nucleasas y la hibridación con un ARN diana; la Patente de EE. UU. 5.470.967, que describe oligonucleótidos que comprenden al menos una unión internucleótido sulfamato o sulfamida que son útiles como sondas de hibridación de ácidos nucleicos: las Patentes de EE. UU. 5.378.825, 5.777.092, 5.623.070, 5.610.289 y 5.602.240, que describen oligonucleótidos con restos de engarce de tres o cuatro átomos que sustituyen el medio estructural de fosfodiéster utilizado para mejorar la resistencia a nucleasas, captación celular y regulación de la expresión de ARN; la Patente de EE. UU. 5.858.988, que describe un agente portador hidrofóbico unido en la posición 2'-O de los oligonucleótidos para mejorar su permeabilidad de membrana y la estabilidad; la Patente de EE. UU. 5.214.136, que describe oligonucleótidos conjugados con antraquinona en el extremo 5' que posee una hibridación al ADN, o ARN mejorada, estabilidad frente a nucleasas mejorada; la Patente de EE. UU. 5.700.922, que describe quimeras PAN-ADN-PAN en las que el ADN comprende 2'-desoxi-eritro-pentofuranosil nucleótidos para mejorar la resistencia a las nucleasas, afinidad de unión, y capacidad para activar la RNasa H; y la Patente de EE. UU. 5.708.154, que describe la unión de ARN a un ADN para formar un híbrido ADN-ARN; la Patente de EE. UU. 5.728.525, que describe el marcaje de análogos de nucleósidos con una marca fluorescente universal.

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

El uso de otros análogos se contempla específicamente para su uso en el contexto de la presente invención. Tales análogos se pueden utilizar en moléculas de ácido nucleico sintético de la invención, en toda la molécula o en los nucleótidos seleccionados. Incluyen, pero no se limitan a estos, 1) modificaciones en la ribosa (tal como 2' F, 2' NH₂, 2' N₃, 4' tio, o 2' O-CH₃) y 2) modificaciones fosfato (tales como los que se encuentran en los fosforotioatos, metil fosfonatos, y fosforoboratos). Tales análogos se han creado para conferir una estabilidad a los ARN reduciendo o eliminando su capacidad para ser escindido por ribonucleasas. Cuando estos análogos de nucleótidos están presentes en los ARN, puede tener efectos profundamente positivos en la estabilidad de ARN de animales. Se contempla que el uso de análogos de nucleótidos se pueden utilizar solos o en conjunción con cualquiera de las modificaciones de diseño de un miARN sintético para cualquier ácido nucleico de la invención.

5. Nucleótidos modificados

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

B. Preparación de los ácidos nucleicos

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

La síntesis de ácido nucleico se lleva a cabo de acuerdo con los procedimientos de referencia. Véase, por ejemplo, Itakura y Riggs (1980). Adicionalmente, la Patente de EE. UU. 4.704.362, Patente de EE. UU. 5.221.619, y Patente de EE. UU. 5.583.013 describe cada una varios procedimientos para preparar ácidos nucleicos sintéticos. Ejemplos no limitantes de ácidos nucleicos sintéticos (por ejemplo, un oligonucleótido sintético), incluyen un ácido nucleico hecho por síntesis química *in vitro* utilizando química fosfotriéster, fosfita o fosforamidita y técnicas en fase sólida

tales como las descritas en el documento EP 266.032, incorporado en el presente documento por referencia, o por medio de desoxinucleósidos H-fosfonato intermedios como se describe en Froehler y col., 1986 y Patente de EE. UU. Serie Nº 5.705.629. En los procedimientos de la presente invención, se pueden utilizar uno o más oligonucleótidos. Se han desvelado varios mecanismos diferentes de síntesis de oligonucleótidos en por ejemplo, Patentes de EE. UU. 4.659.774, 4.816.571, 5.141.813, 5.264.566, 4.959.463, 5.428.148, 5.554.744, 5.574.146, 5.602.244.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

C. Diseño de miARN sintéticos

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

10 **Agente bloqueante 5'.** La introducción de un resto estable distinto de fosfato o hidroxilo en el extremo 5' de la cadena complementaria incapacita su actividad en la ruta del miARN. Esto asegura que solo se utilizará la cadena activa del miARN sintético para regular la traducción en la célula. Las modificaciones en 5' incluyen, pero no se limitan a estas, NH₂, biotina, un grupo amino, un grupo alquilamina inferior, un grupo acetilo, 2'-O-Me, DMTO, fluoresceína, un tiol, o acridina o cualquier otro grupo de este tipo de funcionalidad.

15 **Otras modificaciones de cadena en sentido.** La introducción de modificaciones en nucleótidos tales como 2'-OMe, NH₂, biotina, un grupo amino, un grupo alquilamina inferior, un grupo acetilo, DMTO, fluoresceína, un tiol, o acridina o cualquier otro grupo con este tipo de funcionalidad en la cadena complementaria del miARN sintético puede eliminar la actividad de la cadena complementaria y aumenta la captación de la cadena activa del miARN.

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

E. Marcadores y marcas

25 Los miARN sintéticos se pueden marcar con un marcador o marca radioactiva, enzimática, colorimétrica, u otro marcador o marca con fines de detección o aislamiento. Los ácidos nucleicos pueden marcarse con fluorescencia en algunas realizaciones de la invención. Los marcadores fluorescentes que se contemplan para el uso como conjugados incluyen, pero no se limitan a estos, Alexa 350, Alexa 430, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, azul cascada, Cy3, Cy5, 6-FAM, Isotiocianato de fluoresceína, HEX, 6-JOE, Verde Oregón 488, verde Oregón 500, verde Oregón 514, Azul pacífico, REG, verde rodamina, Renografina, ROX, SYPRO, TAMRA, TET, Tetrametilrodamina, y/o Rojo Tejas.

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

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

F. Procedimientos de suministro

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

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

La expresión "vector de expresión" se refiere a un vector que contiene una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una parte de un producto génico capaz de ser transcrito. Los vectores de expresión pueden contener una variedad de "secuencias de control", que se refiere a secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y posible traducción de una secuencia codificante unida operativamente en un organismo huésped en particular.

Además de las secuencias de control que gobiernan la transcripción y la traducción, los vectores y los vectores de expresión pueden contener secuencias de ácido nucleico que sirven también para otras funciones y que se han descrito.

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

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

Otros procedimientos adecuados para el suministro de ácidos nucleicos para efectuar la expresión de composiciones de la presente invención se cree que incluyen virtualmente cualquier procedimiento por los que un ácido nucleico (por ejemplo, ADN, incluyendo vectores víricos y no víricos) se pueden introducir en un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo, como se describe en el presente documento o como podría conocer un experto en la técnica. Tales procedimientos incluyen, pero sin limitarse a estos, suministro directo de ADN tal como por inyección (Patentes de EE. UU. N^{os} 5.994.624, 5.981.274, 5.945.100, 5.780.448, 5.736.524, 5.702.932, 5.656.610, 5.589.466 y 5.580.859), que incluye la microinyección (Harlan y Weintraub, 1985; Patente de EE. UU. N^o 5.789.215); por electroporación (Patente de EE. UU. N^o 5.384.253); por precipitación en fosfato cálcico (Graham y Van Der Eb, 1973; Chen y Okayama, 1987; Rippe y col., 1990); utilizando DEAE-dextrano y después polietilenglicol (Gopal, 1985); por carga sónica directa (Fechheimer y col., 1987); por transfección mediada por liposomas (Nicolau y Sene, 1982; Fraley y col., 1979; Nicolau y col., 1987; Wong y col., 1980; Kaneda y col., 1989; Kato y col., 1991); por bombardeo con microproyectiles (Solicitud PCT N^{os} WO 94/09699 y 95/06128; Patentes de EE. UU. N^{os} 5.610.042, 5.322.783, 5.563.055, 5.550.318, 5.538.877 y 5.538.880); por agitación con fibras de carburo de silicio (Kaepler y col., 1990; Patentes de EE. UU. N^{os} 5.302.523 y 5.464.765); por transformación mediada por *Agrobacterium* (Patentes de EE. UU. N^{os} 5.591.616 y 5.563.055); o por transformación mediada por PEG de protoplastos (Omirulleh y col., 1993; Patentes de EE. UU. Nos. 4.684.611 y 4.952.500); por captación de ADN mediado por inhibición/desecación (Potrykus y col., 1985). A través de la aplicación de técnicas tales como estas, se pueden transformar estable o transitoriamente orgánulos, células, tejidos u organismos.

B. Suministro de miARN sintéticos

Se cree que los procedimientos adecuados para el suministro de ácidos nucleicos de acuerdo con la presente invención incluyen virtualmente cualquiera de los procedimientos por los que un ácido nucleico (por ejemplo, ADN, ARN, incluyendo vectores víricos y no víricos) se puede introducir en un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo, como se describe en el presente documento o como sería conocido por un experto en la técnica. Tales procedimientos incluyen, aunque no se limita a estos, el suministro directo de ácidos nucleicos tales como por inyección (Patente de EE. UU. Nos 5.994.624, 5.981.274, 5.945.100, 5.780.448, 5.736.524, 5.702.932, 5.656.610, 5.589.466 y 5.580.859), que incluye la microinyección (Harlan y Weintraub, 1985; Patente de EE. UU. N^o 5.789.215); por electroporación (Patente de EE. UU. N^o 5.384.253); por precipitación en fosfato cálcico (Graham y Van Der Eb, 1973; Chen y Okayama, 1987; Rippe y col., 1990); utilizando DEAE-dextrano y después polietilenglicol (Gopal, 1985); por carga sónica directa (Fechheimer y col., 1987); por transfección mediada por liposomas (Nicolau y Sene, 1982; Fraley y col., 1979; Nicolau y col., 1987; Wong y col., 1980; Kaneda y col., 1989; Kato y col., 1991); por bombardeo con microproyectiles (Solicitud PCT N^{os} WO 94/09699 y 95/06128; Patentes de EE. UU. N^{os} 5.610.042, 5.322.783, 5.563.055, 5.550.318, 5.538.877 y 5.538.880); por agitación con fibras de carburo de silicio (Kaepler y col., 1990; Patentes de EE. UU. N^{os} 5.302.523 y 5.464.765); por transformación mediada por *Agrobacterium* (Patentes de EE. UU. N^{os} 5.591.616 y 5.563.055); o por transformación mediada por PEG de protoplastos (Omirulleh y col., 1993; Patentes de EE. UU. N^{os} 4.684.611 y 4.952.500); por captación de ADN mediado por

inhibición/desecación (Potrykus y col., 1985). A través de la aplicación de técnicas tales como estas, se pueden transformar estable o transitoriamente orgánulos, células, tejidos u organismos.

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

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

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

Los ARN son moléculas hidrófilas gracias a su estructura de fosfato aniónico y azúcar. Aunque las bases nitrogenadas son hidrofóbicas, domina la hidrofilia debido a la unión extensa de hidrógeno que resulta de los restos de fosfato y azúcar. El carácter hidrófilo y la estructura aniónica reduce la penetración celular. La conjugación con grupos lipófilos como el colesterol (Manoharan, 2002) y los derivados del ácido láurico y litocólico con funcionalidad C32 ha demostrado que (Lorenz y col., 2004), mejoran la captación celular. Además la unión de oligonucleótidos conjugados con esteroides a diferentes lipoproteínas en la corriente sanguínea, tales como el LDL, protegen su integridad y gobiernan su biodistribución (Rump y col., 2000). También se ha demostrado que el colesterol unido a moléculas antisentido (Bijsterbosch y col., 2001) y aptámeros (Rusconi y col., 2004) estabilizan oligonucleótidos permitiendo la unión con lipoproteínas. Se ha demostrado que el colesterol aumenta la captación y la estabilidad en el suero de los ARNs *in vitro* (Lorenz y col., 2004) e *in vivo* (Soutschek y col., 2004). Adicionalmente, varias moléculas pequeñas como SB-435495 (Blackie y col., (2002), Isradipina (Oravcova y col., 1994), amlodipina (Oravcova y col., 1994) y 2,2', 4,4', 5,5'-hexaclorobifenilo (Borlakoglu y col., 1990) podrían aumentar la captación celular, y mejorar la resistencia a las nucleasas favoreciendo la asociación con lipoproteínas.

1. Nucleótidos para marcado

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

Los nucleótidos amino modificados se utilizan en varias realizaciones de la invención. El nucleótido amino modificado es un nucleótido que tiene un grupo amino reactivo para la unión del marcador. Se contempla que cualquier ribonucleótido (G, A, U, o C) o desoxirribonucleótido (G, A, T, o C) se pueden modificar para marcado.

Ejemplos, incluyen, pero no se limitan a estos, los ribo y desoxirribonucleótidos modificados siguientes: 5-(3-aminoalil)-UTP; 8-[(4-amino) butil]-amino-ATP y 8-[(6-amino) butil]-amino-ATP; N6-(4-amino) butil-ATP, N6-(6-amino) butil-ATP, N4-[2,2-oxi-bis-(etilamina)]-CTP; N6-(6-Amino) hexil-ATP; 8-[(6-Amino) hexil]-amino-ATP; 5-propargilamino-CTP, 5-propargilamino-UTP; 5-(3-aminoalil)-dUTP; 8-[(4-amino)butil]-amino-dATP y 8-[(6-amino) butil]-amino-dATP; N6-(4-amino) butil-dATP, N6-(6-amino) butil-dATP, N4-[2,2-oxi-bis-(etilamina)]-dCTP; N6-(6-Amino) hexil-dATP; 8-[(6-Amino) hexil]-amino-dATP; 5-propargilamino-dCTP, y 5-propargilamino-dUTP. Tales nucleótidos se pueden preparar según los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Además, un experto en la técnica podría preparar otras entidades de nucleótidos con la misma modificación amina, tales como un 5-(3-aminoalil)-CTP, GTP, ATP, dCTP, dGTP, dTTP, o dUTP en lugar de un 5-(3-aminoalil)-UTP.

10 2. Técnicas de marcado

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

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

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

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

Las enzimas capaces de añadir tales nucleótidos incluyen, pero sin limitarse a estas, polimerasa poli (A), transferasa terminal, y polinucleótido fosforilasa. En realizaciones específicas de la invención, se contempla que la ligasa NO sea la enzima utilizada para añadir un marcador, y en vez de ello, se utiliza una enzima no ligasa.

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

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

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

3. Marcadores

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

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

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

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

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

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

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

4. Técnicas de visualización

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

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

III. Aplicaciones terapéuticas

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

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

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

- 55 **A. Modos de administración y formulaciones**

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

Para la administración tópica, las proteínas de la invención se pueden formular como soluciones, geles, ungüentos, cremas, suspensiones, etc. como se conocen bien en la técnica. Las formulaciones sistémicas incluyen las designadas para la administración por inyección, por ejemplo, inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratecal o intraperitoneal, así como aquellas designadas para la administración vía transdérmica, transmucosa, inhalatoria, oral o pulmonar. Para inyección, los ácidos nucleicos de la invención se pueden formular en soluciones acuosas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como la solución de Hank, solución de Ringer, o tampón salino fisiológico. La solución puede contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. De manera alternativa, las moléculas de ácido nucleico pueden estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso. Para la administración transmucosa, en la formulación se utilizan penetrantes de barrera apropiados para que se absorban. Tales penetrantes generalmente se conocen en la técnica. Para la administración oral, los ácidos nucleicos se pueden formular fácilmente combinando las moléculas con vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica. Tales vehículos capacitan a los ácidos nucleicos de la invención para formularse como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, pastas, suspensiones y similares. Para las formulaciones sólidas vía oral tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas y comprimidos, los excipientes adecuados incluyen cargas tales como azúcares, por ejemplo, lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; preparaciones de celulosa tales como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma de tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetil-celulosa, carboximetil celulosa sódica, y/o polivinilpirrolidona (PVP); agentes granulantes; y agentes aglutinantes. Si se desea se pueden añadir agentes desintegrantes, tales como polivinilpirrolidona reticular, agar, o ácido alginico o una sal del mismo tal como alginato sódico. Si se desea, las formas de dosificación sólida pueden estar revestidas con azúcar o revestimiento entérico utilizando técnicas de referencia. Para las preparaciones líquidas por vía oral tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones, se pueden añadir, vehículos adecuados, excipientes o diluyentes incluyendo el agua, glicoles, aceites, alcoholes, etc. Adicionalmente se pueden añadir, agentes saborizantes, conservantes, agentes colorantes y similares. Para la administración bucal, las moléculas pueden tomar la forma de comprimidos, comprimidos para chupar, etc. formulados de una manera convencional. Para la administración por inhalación, las moléculas para su uso de acuerdo con la presente invención se suministran convenientemente en forma de un pulverizador en aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado, por ejemplo, diclorofluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluorometano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Las cápsulas y cartuchos de gelatina para su uso en un inhalador o insuflador se pueden formular de forma que contenga una mezcla en polvo de ácidos nucleicos y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón. Las moléculas de ARN también se pueden formular en composiciones rectales o vaginales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contengan las bases para supositorios tales como la manteca de coco u otros glicéridos.

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

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

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

Los ácidos nucleicos se pueden administrar también en combinación con aminos catiónicos tales como la poli (L-lisina). Los ácidos nucleicos se pueden también conjugar con resto químico, tal como transferrina y colesterilos. Además, los oligonucleótidos se pueden dirigir a ciertos orgánulos por unión específica de grupos químicos

específicos al oligonucleótido. Por ejemplo, uniendo el oligonucleótido a una matriz adecuada de restos de manosa dirigirá el oligonucleótido al hígado.

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

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

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

Como se utiliza en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes de retraso de absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizadores de fármacos, geles, aglutinantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes saborizantes, colorantes, tales como materiales y combinaciones de las mismas, como sería conocido por un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Ed. Mack Printing Company, 1990, pp. 1289-1329). Excepto si no es cualquiera de los vehículos compatibles con el principio activo, su uso se contempla en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

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

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

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

aquí, se puede administrar un intervalo de aproximadamente 5 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, aproximadamente 5 microgramos/kg de peso corporal a aproximadamente 500 miligramos/kg de peso corporal, etc., basándose en los números descritos anteriormente.

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

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

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

- En otras realizaciones, se pueden utilizar gotas oftálmicas, soluciones nasales o pulverizadores, aerosoles o inhalantes en la presente invención. Tales composiciones se diseñan generalmente para ser compatibles con el tipo
25 de tejido diana. En un ejemplo no limitante, las soluciones nasales habitualmente son soluciones acuosas diseñadas para administrarse en los conductos nasales en gotas o pulverizadores. Las soluciones nasales se preparan de forma que son similares en muchos aspectos a las secreciones nasales, de forma que se mantenga la acción ciliar normal. Por lo tanto, en realizaciones preferidas las soluciones nasales acuosas son habitualmente isotónicas o ligeramente tamponadas para mantener un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5. Además, se
30 pueden incluir en la formulación conservantes antimicrobianos, similares a los que se utilizan en preparaciones oftálmicas, fármacos, o estabilizantes de fármacos apropiados, si es necesario. Por ejemplo, se conocen varias preparaciones nasales comerciales e incluyen fármacos tales como antibióticos o antihistamínicos.

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

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

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

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

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

B. Dosificaciones eficaces

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

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

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

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

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

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

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

C. Toxicidad

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

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

D. Grupos laterales

- 50 Se puede fijar o conjugar un "grupo lateral" con un ácido nucleico. Los grupos laterales pueden aumentar la captación celular del ácido nucleico. Los grupos laterales se pueden unir a cualquier parte del ácido nucleico pero comúnmente se unen a los extremos de la cadena de oligonucleótido. Ejemplos de grupos laterales incluyen, pero sin limitarse a estos: derivados de acridina (es decir, 2-metoxi-6-cloro-9-aminoacridina); reticulares tales como derivados del psoraleno, azidofenacilo, proflavina, y azidoproflavina; endonucleasas artificiales; complejos de metal

tales como el EDTA-Fe (II), o-fenantrolina-Cu(I), y porfirina-Fe (II): restos alquilantes; nucleasas tales como nucleasa amino-1-hexanolstafilocócica y fosfatasa alcalina; transferasas terminales; abzimas; restos de colesterol; portadores lipofílicos; conjugados peptídicos; alcoholes de cadena larga; ésteres de fosfato; amino; grupos mercapto; marcadores radioactivos; marcadores no radioactivos tales como colorantes; y polilisina u otras poliaminas. En un ejemplo, el ácido nucleico se conjuga con un carbohidrato, carbohidrato sulfatado, o glucano.

Ejemplos

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

Ejemplo 1:

Ensayo para medir la actividad de miARN precursores (indicadores)

Se crearon una serie de vectores indicadores de luciferasa para medir las actividades de los miARN sintéticos en las células. Los vectores indicadores se basaron en plásmidos que se había utilizado para controlar la actividad de miARN endógenos (trabajo de Tuschl). En resumen, se creó un vector de expresión de mamífero con el gen de la luciferasa bajo el control del promotor precoz de CMV. Corriente abajo de la secuencia codificante de luciferasa, en la UTR 3' del gen, se añadieron secuencias complementarias a miR-1-2, miR-10, miR-124, miR-19a, y miR-130 maduros. Los vectores indicadores se co-transfectaron en células HeLa junto con miARN sintéticos diseñados para introducir uno de los cinco miARN enumerados anteriormente. Las transfecciones implicaban la mezcla de 200 ng de vector indicador con 0,3, 1, y 3 pmoles de cada uno de los miARN sintéticos correspondientes. La mezcla indicador/miARN se mezcló con 0,3 µl de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) y se incubó durante 5-15 minutos. Se añadieron aproximadamente 8.000 células a cada complejo miARN/indicador/reactivo de transfección en pocillos individuales de una placa de 96 pocillos. Se cultivaron las células HeLa en D-MEM (GIBCO) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (GIBCO) a 37 °C y un 5% de CO₂. A las 24-48 horas tras la transfección, las células se recolectaron y se ensayaron utilizando el ensayo de Luciferasa como describe el fabricante (Promega). El nivel de expresión de Luciferasa en las poblaciones celulares se comparó con las células transfectadas con el mismo indicador pero con un miARN sintético con una secuencia que no corresponde al vector. A este miARN no dirigido se le designó como el miARN control negativo.

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

Ejemplo 2

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

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

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

Para controlar la eficacia de los miARN sintéticos miR-1-2, se creó un vector indicador en el que la UTR 3' del gen G6PD se situara inmediatamente corriente abajo de la región codificante de la luciferasa. Se ha publicado una

interacción entre miR-1-2 y UTR 3' G6PD (Lewis, 2003). Los diseños de miR-1-2 sintético se co-transfectaron con el vector indicador y se ensayaron como se describe en el Ejemplo 1.

Ejemplo 3

Efectividad de miARN parcialmente complementarios

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

miR-1-2

- secuencia de miR-1-2 maduro* - UGGA AUGUAAAGAAGUAUGUA (53-73 of SEC ID N° 1)
 diseño miARN = CAUACUUCUUUAUAUGCCCAUA (SEC ID N° 594) + UGGA AUGUAAAGAAGUAUGUA (SEC ID N° 595)
 20 diseño sin coincidencia = CAUACUUCUUUAUAUUCUGTT (SEC ID N° 596) + UGGA AUGUAAAGAAGUAUGUA (SEC ID N° 597)
 diseño ARNsi = CAUACUUCUUUAUAUCCATT (SEC ID N° 598) + UGGA AUGUAAAGAAGUAUGUA (SEC ID N° 599)

mir-124a-1

- 25 *secuencia miR-124 maduro* - UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA (52-73 of SEC ID N° 80)
 diseño miARN = GUGUUCACAGCGGACCUUGAUU (SEC ID N° 600) + UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA (SEC ID N° 601)
 diseño sin coincidencia = GCAUUCACGCGGUGCCUUGGTT (SEC ID N° 602) + UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA (SEC ID N° 603)
 30 diseño ARNsi = GCAUUCACGCGGUGCCUUAATT (SEC ID N° 604) + UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA (SEC ID N° 605)

miR-130a

- secuencia miR-130 maduro* - CAGUGCAAUGUAAAAGGGC (55-74 of SEC ID N° 91)
 35 diseño miARN = UCUUUUCACAUUGUGCUAC (SEC ID N° 606) + CAGUGCAAUGUAAAAGGGC (SEC ID N° 607)
 diseño sin coincidencia = UAUUUUAACAUUGCACUGTT (SEC ID N° 608) + CAGUGCAAUGUAAAAGGGC (SEC ID N° 609)
 diseño ARNsi = CCUUUUUAACAUUGCACUGTT (SEC ID N° 610) + CAGUGCAAUGUAAAAGGGC (SEC ID N° 611)

miR-19a

- 40 *secuencia miR-19a maduro* - UGUGCAAUCUAUGCAAAACUGA (49-71 of SEC ID N° 28)
 diseño miARN = AGUUUUGCAUAGUUGCACUA (SEC ID N° 612) + UGUGCAAUCUAUGCAAAACUGA (SEC ID N° 613)
 diseño sin coincidencia = ACAUUUGCAUAGAUUUGCACATT (SEC ID N° 614) + UGUGCAAUCUAUGCAAAACUGA (SEC ID N° 615)
 45 diseño ARNsi = AGUUUUGCAUAGAUUUGCACATT (SEC ID N° 616) + UGUGCAAUCUAUGCAAAACUGA (SEC ID N° 617)

mmu-miR-10a-1 (ratón)

- secuencia miR-10 maduro* - UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUG (22-44 of SEC ID N° 212)
 50 diseño miARN = CAAAUUCGUAUCUAGGGGAUA (SEC ID N° 618) + UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUG (SEC ID N° 619)
 diseño sin coincidencia = AGAAUUCGGAUCUACAGGGUATT (SEC ID N° 620) + UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUG (SEC ID N° 621)
 55 diseño ARNsi = CAAAUUCGGAUCUACAGGGUATT (SEC ID N° 622) + UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUG (SEC ID N° 623)

miR-33

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

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

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

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

let-7b

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

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

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

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

miR-196-2

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

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

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

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

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

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

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

Ejemplo 4**Eficacia de miARN sintéticos modificados químicamente en el extremo 5'**

Aunque el diseño ARNsi se mostró problemático porque mostraba una alta tasa de captación de la cadena complementaria por la ruta miARN, tenía la ventaja de que era fácil de hibridar y fácil de suministrar a las células. Por estas razones, se exploraron las maneras de superar los problemas con la captación de las cadenas complementarias. El diseño ARNsi se utilizó para ensayar los efectos de las modificaciones químicas en los extremos 5' de los miARN sintéticos. Para estos estudios, se sintetizaron varias cadenas complementarias diferentes con extremos 5' únicos. Una de ellas mostraba cuatro nucleótidos desoxirribosa en el extremo 5'; otro era una combinación de cuatro nucleótidos desoxirribosa en el extremo 5' y un NH₂ 5'; otro tenía un NH₂ 5'; otro tenía un 5' NHCOCH₃ (véase posteriormente).

miR-33

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

diseño ARNsi = AUGCAACUACAAUGCACTT (SEC ID N° 642) + GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (SEC ID N° 643)
 diseño 5' amino = (NH₂) AUGCAACUACAAUGCACTT (SEC ID N° 644) + GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (SEC ID N° 645)
 5 diseño 5' acetilo = (CH₃OCNH) AUGCAACUACAAUGCACTT (SEC ID N° 646) + GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (SEC ID N° 647)
 diseño 5' DNA = dAdUdGdCAACUACAAUGCACTT (SEC ID N° 648) + GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (SEC ID N° 649)
 10 diseño 5' amino DNA = (NH₂) dAdUdGdCAACUACAAUGCACTT (SEC ID N° 650) + GUGCAUUGUAGUUGCAUUG (SEC ID N° 651)

let-7b

secuencia let-7b maduro - UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (6-27 of SEC ID N° 6)
 diseño ARNsi = CCACACAACCUACUACCUCATT (SEC ID N° 652) + UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (SEC ID N° 653)
 15 diseño 5' amino = NH₂CCACACAACCUACUACCUCATT (SEC ID N° 654) + UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (SEC ID N° 655)
 diseño 5' DNA = dCdCdAdCACAACCUACUACCUCATT (SEC ID N° 656) + UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (SEC ID N° 657)
 20 diseño 5' amino DNA = NH₂dCdCdAdCACAACCUACUACCUCATT (SEC ID N° 658) + UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU (SEC ID N° 659)

miR-1-2

secuencia miR-1-2 maduro - UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUA (53-73 of SEC ID N° 1)
 diseño ARNsi = CAUACUUCUUUACAUCCATT (SEC ID N° 660) + UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUA (SEC ID N° 661)
 25 diseño 5' amino = NH₂CAUACUUCUUUACAUCCATT (SEC ID N° 662) + UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUA (SEC ID N° 663)

miR-124a-1

secuencia miR-124 maduro - UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA (52-73 of SEC ID N° 80)
 diseño ARNsi = GCAUUCACCGCGUGCCUUAATT (SEC ID N° 664) + UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA (SEC ID N° 665)
 30 diseño 5' amino = NH₂GCAUUCACCGCGUGCCUUAATT (SEC ID N° 666) + UUAAGGCACGCGGUGAAUGCCA (SEC ID N° 667)

miR-130a

secuencia miR-130 maduro - CAGUGCAAUGUUAAGGGC (55-74 of SEC ID N° 91)
 35 diseño ARNsi = CCUUUUACAUCACUGTT (SEC ID N° 668) + CAGUGCAAUGUUAAGGGC (SEC ID N° 669)
 diseño 5' amino = NH₂CCUUUUACAUCACUGTT (SEC ID N° 670) + CAGUGCAAUGUUAAGGGC (SEC ID N° 671)

miR-10a-1

secuencia miR-10 maduro - UACCCUGUAGAUCGGAUUUGUG (22-44 of SEC ID N° 212)
 40 diseño ARNsi = CAAAUUCGGAUCUACAGGGUATT (SEC ID N° 672) + UACCCUGUAGAUCGGAUUUGUG (SEC ID N° 673)
 diseño 5' amino = NH₂CAAAUUCGGAUCUACAGGGUATT (SEC ID N° 674) + UACCCUGUAGAUCGGAUUUGUG (SEC ID N° 675)

45 Los miARN sintéticos miR-33 y let-7b se co-transfectaron en células HeLa y HepG2, respectivamente, con vectores indicadores que tenían sitios diana para las cadenas activa y complementaria de miR-33 y let-7b como se describe en el Ejemplo 1. La expresión de luciferasa de los vectores indicadores específicos de cadena complementaria y activa se midieron según el protocolo del fabricante (Promega). Como se muestra en la FIG.3, los diseños miARN sintéticos con el 5' NH₂ y 5' NHCOCH₃ proporcionaban una actividad mayor de la cadena activa y reducía significativamente la actividad de la cadena complementaria con respecto a los miARN sintéticos sin modificar. Esto es ideal para los miARN sintéticos puesto que los efectos que se ven después de la transfección serán específicos de la actividad de la cadena activa del miARN sintético. Además, la alta eficacia de los diseños modificados en 5' permitirá que se utilicen menores concentraciones en las transfecciones y se reduce la toxicidad que se observa a

menudo cuando se transfectan las células con cantidades mayores de ácido nucleico.

Para confirmar que la modificación 5' amino es superior a los diseños ARNsi de referencia en un amplio grupo de miARN, se midió la eficacia de ambos diseños de miARN sintético en células co-transfectadas con vectores indicadores con sitios diana de miARN. Como se aprecia en la FIG. 4, el 5' NH₂ es superior de manera reproducible al diseño sin modificar de ARNsi.

Ejemplo 5

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

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

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

Ejemplo 6

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

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

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

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

Tabla 4. miARN que afectan la proliferación celular

miARN	Impacto relativo sobre la proliferación celular
miR-31	Regulación positiva
miR-150	Regulación positiva
miR-187	Regulación positiva

(continuación)	
miARN	Impacto relativo sobre la proliferación celular
miR-125a	Regulación positiva
miR-190	Regulación positiva
miR-191	Regulación positiva
miR-193	Regulación positiva
miR-204	Regulación positiva
miR-218	Regulación positiva
miR-21	Regulación negativa
miR-24	Regulación negativa

Ejemplo 7

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

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

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

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

20 Ejemplo 8

Selección de miARN que tienen influencia en la viabilidad celular

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

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

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

miARN	Impacto relativo sobre la viabilidad celular
miR-7	Bajo
miR-19a	Bajo
miR-23	Bajo
miR-24	Bajo
miR-27a	Bajo
miR-31	Bajo
miR-32	Bajo
miR-134	Bajo

(continuación)

miARN Impacto relativo sobre la viabilidad celular

miR-140	Bajo
miR-150	Bajo
miR-192	Bajo
miR-193	Bajo
miR-107	Alto
miR-133	Alto
miR-137	Alto
miR-152	Alto
miR-155	Alto
miR-181a	Alto
miR-191	Alto
miR-203	Alto
miR-215	Alto

Ejemplo 9**Selección de miARN que tienen influencia sobre la apoptosis**

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

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

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

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

Tabla 6. miARN que afectan a la apoptosis

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

	(continuación)
miARN	Impacto relativo sobre la proliferación celular
miR-296	Alto
miR-321	Alto

Ejemplo 10

Análisis de expresión utilizando ARN sintéticos

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

Ejemplo 11

Expresión diferencial de miARN oncogénicos y regulación en el cáncer

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

Expresión de miARN en cáncer de pulmón

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

Expresión de miARN en cáncer de colon

Se analizaron veinticinco muestras de tumores y TNA de pacientes de cáncer de colon utilizando el proceso de matrices de miARN de la invención. Como en las comparaciones en el cáncer de pulmón, se agruparon distintos miARN basándose en su expresión relativa en los tumores en los diferentes pacientes de cáncer de colon (FIG. 14). Se expresaban cinco miARN (miR-143, 145, 195, 130a, y miR-331) a niveles significativamente más bajos en los tumores de más del 70% de los pacientes. Se expresaban cinco miARN (miR-223, 21, 31, 17, y 106) a niveles significativamente más altos en los tumores de más del 70% de los pacientes.

miARN como marcadores de cáncer

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

miARN como reguladores de la expresión de oncogenes

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

(1) Complementariedad perfecta entre las posiciones 2-9 del miARN y el oncogén. Esta secuencia central de miARN se ha identificado como crítica para las actividades de los miARN y los sitios diana de miARN tienen esencialmente un 100% de complementariedad en este sitio (Doench y col., 2004).

(2) Interacción total de Tm del miARN/ARNm. Además de la secuencia central, la estabilidad total de unión entre los miARN y los ARNm ha demostrado ser un indicador importante de la actividad del miARN (Doench y col., 2004).

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

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

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

Ejemplo 12

15 Medición del efecto de los miARN sobre la expresión oncogénica

La confirmación de las predicciones de sitios diana de miARN se pueden hacer de varias maneras. En *Drosophila* y *C. elegans*, se han aplicado estrategias genéticas en las que se hicieron mutaciones en el miARN y los supuestos sitios diana de miARN y mostraron un resultado de fenotipos similares (Ha y col., 1996; Vella y col., 2004). En las células de mamíferos, en las que las estrategias genéticas son mucho más difíciles, se han utilizado construcciones

20 indicadoras para mostrar que las UTR 3' de los supuestos genes diana están regulados en las células a niveles que están desproporcionadas con respecto a los vectores indicadores de control que contienen mutaciones en los supuestos sitios de unión de miARN (Lewis y col., 2003). Además, se han utilizado vectores y oligonucleótidos para introducir o inhibir miARN en las células para determinar efectos sobre los niveles endógenos de los supuestos genes diana (Lewis y col., 2003; Kiriakidou y col. 2004). La última estrategia se ha emprendido para validar las

25 predicciones de los sitios diana de miARN.

Se han desarrollado miARN e inhibidores de miARN que pueden transfectarse en células de mamíferos para introducir miARN en las células o para inhibir la actividad de miARN en las células, respectivamente. Véase USSN

60/627.171. Un miARN sintético y un inhibidor de miARN que corresponden al let-7b se utilizaron para determinar si la predicciones del sitio diana eran correctas. En estos experimentos, las células cultivadas que expresan niveles indetectables del miARN se transfectaron con el miARN sintético utilizando células siPORT™ NeoF_x™. Las proteínas de ambos oncogenes se expresaban a niveles casi tres veces más bajos en las células transfectadas con el miARN sintético que en las células transfectadas con el miARN negativo de control (Ambion). En un experimento recíproco, las células que expresan naturalmente altos niveles del miARN se transfectaron con el inhibidor del miARN let-7. Como se esperaba, las proteínas de ambos oncogenes eran mayores en las células transfectadas con el inhibidor del miARN que en las células transfectadas con el inhibidor negativo de control (Ambion). Estos resultados son coherentes con el modelo de que el miARN regula la expresión de los dos oncogenes. Estos datos sugieren que la mala regulación de un miARN clave podría participar en la progresión del cáncer por el fallo en la regulación de la expresión de uno o más oncogenes.

Ejemplo 13

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

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

Las células HeLa (cáncer ovárico humano) y A549 (cáncer de pulmón humano) se transfectaron por triplicado con 150 miARN sintéticos utilizando siPORT NeoF_x (Ambion) según las instrucciones del fabricante. Los 150 son los siguientes: let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7g, miR-1, miR-7, miR-9, miR-10a, miR-10b, miR-15a, miR-16, miR-18, miR-19a, miR-17-3p, miR-20, miR-21, miR-22, miR-23a, miR-23b, miR-24, miR-25, miR-26a, miR-27a, miR-28, miR-29a, miR-31, miR-32, miR-30a-3p, miR-34a, miR-92, miR-95, miR-96, miR-98, miR-99a, miR-100, miR-101, miR-103, miR-105, miR-107, miR-108, miR-122, miR-124, miR-125a, miR-125b, miR-126, miR-128, miR-129, miR-132, miR-133A, miR-133B, miR-134, miR-135, miR-136, miR-137, miR-139, miR-140, miR-141, miR-142, miR-143, miR-144, miR-145, miR- 46, miR-147, miR-148, miR-149, miR-150, miR-151, miR-152, miR-153, miR-155, miR-181a, miR-182, miR-83, miR-184, miR-186, miR-187, miR-188, miR-190, miR-191, miR-192, miR-193, miR-194, miR-195, miR-196, miR-197, miR-198, miR-199, miR-201, miR-203, miR-204, miR-205, miR-206, miR-207, miR-208, miR-210, miR-211, miR-212, miR-214, miR-215, miR-216, miR-217, miR-218, miR-219, miR-220, miR-21, miR-223, miR-224, miR-299, miR-301, miR-302, miR-320, miR-322, miR-323, miR-325, miR-324-3p, miR-328, miR-330, miR-331, miR-335, miR-337, miR-338, miR-339, miR-340, miR-345, miR-346, miR-367, miR-368, miR-369, miR-370, miR-371, miR-372, miR-373, miR-374, miR-290, mu-miR-291, mu-miR-92-3p, mu-miR-293, mu-miR-294, mu-miR-295, mu-miR-297, mu-miR-298, mu-miR-329, mu-miR-341, mu-miR-344, mu-miR-351, mu-miR-376b, mu-miR-380-3p, mu-miR-409, mu-miR-411, mu-miR-412.

Los miARN sintéticos eran moléculas de ácido nucleico de cadena doble, compuestos por una cadena activa y una cadena complementaria. La cadena activa contenía una secuencia que era idéntica al correspondiente miARN maduro. La cadena complementaria contenía una secuencia que era un 100% complementaria con la región relevante de la secuencia de miARN maduro, pero 1) carecía de dos nucleótidos en su extremo 3' que fueran complementarios con la secuencia de miARN maduro (en el extremo 5' de la cadena activa) y 2) tenía un dinucleótido protuberante en su extremo 5' con respecto a la cadena activa. En otras palabras, las dos cadenas eran completamente complementarias entre sus secuencias excepto en que cada cadena tenía un dinucleótido 5' protuberante con respecto a la otra cadena. Se utilizó el mismo tipo de miARN para los siguientes Ejemplo(s) también. Se describen posteriormente algunas excepciones. Los miARN indicados en las tablas identifican el miARN que se corresponde con la secuencia sintética proporcionada.

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

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

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

TABLA 9
miARN que reducen significativamente la viabilidad celular de células HeLa

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

TABLA 10
miARN que reducen el número de células viables de células HeLa

	Células Totales	desv. estándar.
Let-7b	16,2	8,1
Let-7g	22,7	8,2
Let-7c	24,1	7,2
miR-124	24,5	3,4
Let-7a	25,4	1,2
Let-7d	37,3	2,3
miR-337	37,5	16,9
miR-1	38,7	2,2
miR-299	38,9	4,2
miR-34a	40,5	13,3
mmu-miR-292	41,2	8,3
miR-122	41,2	6,5
miR-346	41,9	4,3
miR-101	43,4	6,4
miR-210	47,1	8,4
miR-147	47,7	8,2
miR-98	50,6	2,6
miR-345	51,8	6,8
miR-92	52,4	6,8
miR-96	53,2	0,9
miR-7	54,0	5,3
miR-133b	55,9	3,1
miR-206	56,0	12,4
mmu-miR-297	56,0	5,7
miR-19a	57,2	20,6
mmu-miR-344	57,5	14,1
miR-205	58,9	18,7

(continuación)

miARN que reducen el número de células viables de células HeLa

	Células Totales	desv. estándar.
miR-208	60,5	11,1

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

	Células Totales	desv. estándar.
miR-32	142,9	25,4
mu-miR-290	143,5	17,6
miR-212	143,5	10,4
miR-92	144,7	16,8
miR-323	147,3	25,9
miR-145	148,1	22,2
miR-324	148,2	9,0
miR-198	152,1	67,8
miR-27a	156,2	13,4
miR-369	158,4	27,3
miR-31	159,3	16,1
miR-335	161,7	20,8
mmu-miR-351	162,3	6,9
miR-370	164,3	4,5
miR-325	169,6	19,8
miR-331	172,5	24,0
miR-139	181,3	11,2

5

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

	% de Viabilidad	desv. Estánd.
miR-193	92,4	2,5
miR-224	92,5	1,4
miR-96	92,6	0,1
miR-346	93,9	1,6
mmu-miR-293	94,9	0,7
miR-34a	95	0,2
miR-216	95,1	1,0
mmu-miR-380	95,2	0,8
miR-182	95,6	0,8
miR-301	95,6	1,0
mmu-miR-344	95,8	0,2
mmu-miR-409	95,8	0,6
miR-369	95,9	0,7

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

	Número de células	desv. Estánd.
miR-124	44,3	2,2
miR-16	52,9	1,3
miR-337	54,7	7,0

(continuación)

miARN que reducen significativamente el número de células viables en células A549

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

TABLA 14

miARN que aumentan significativamente el número de células viables en A549

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

TABLA 15

miARN que reducen significativamente la viabilidad celular de los linfocitos Jurkat

	% de Viabilidad	desv. estándar.
let-7a	20,54	0,70
miR-10b	35,98	2,92
let-7b	48,79	5,08
miR-17-3p	61,55	15,63
miR-30a-3p	64,36	26,60
miR-34a	65,45	20,44
miR-122	65,63	17,80
miR-29a	66,44	7,14
miR-101	67,44	29,56
miR-133a	71,51	17,82
miR-19a	71,77	23,79
miR-32	75,59	11,69

(continuación)

miARN que reducen significativamente la viabilidad celular de los linfocitos Jurkat

	% de Viabilidad	desv. estándar.
miR-1	75,74	12,92
miR-132	76,32	16,22
miR-28	77,07	16,58
miR-20	77,60	15,23
miR-134	78,96	1,75

TABLA 16**miARN que aumentan significativamente la viabilidad celular de linfocitos Jurkat**

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

TABLA 17**miARN que reducen significativamente la viabilidad celular en linfocitos T primarios**

	% de Viabilidad	desv. estándar.
miR-184	61,04	12,16
miR-145	68,98	11,23
miR-186	69,64	6,99
miR-139	69,85	0,29
miR-134	71,90	22,42
miR-190	75,59	2,43
miR-144	77,13	4,18
miR-183	77,71	2,86
miR-147	78,09	0,33
miR-140	78,70	5,81
miR-155	79,26	10,68

TABLA 18**miARN que aumentan significativamente la viabilidad celular de linfocitos T primarios**

	% de Viabilidad	desv. estándar.
miR-126	120,81	40,08

(continuación)

miARN que aumentan significativamente la viabilidad celular de linfocitos T primarios

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

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

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

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

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

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

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

TABLA 20**miARN que aumentan significativamente el porcentaje de células apoptóticas**

	Cambio relativo en células apoptóticas	desv. estánd.
miR-338	773.46	69.82

(continuación)

miARN que aumentan significativamente el porcentaje de células apoptóticas
Cambio relativo en células apoptóticas desv. estándar.

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

TABLA 21

miARN que disminuyen significativamente el porcentaje de células apoptóticas

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

5 **Ejemplo 15**

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

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

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

Let-7a
 Let-7a
 miR-1
 miR-1

(continuación)

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

5 A las 24 horas post-transfección, la mitad de las células BJ de cada pocillo se trasladaron a un medio reciente. A las 72 horas post-transfección, las células se fijaron con de paraformaldehído al 4% con una concentración final del 2%. Las células fijadas se tiñeron con yoduro de propidio (protocolo de TTP LabTech) y se evaluaron utilizando el escáner celular TTP LabTech. El yoduro de propidio tiñe el ADN y el contenido relacionado con ADN en una célula corresponde con su posición en el ciclo celular. El escáner celular medía la tinción de yoduro de propidio en cada célula y asignaba su posición en el ciclo celular. El porcentaje de células en cada estado del ciclo celular se calculó y se comparó con las células transfectadas con los miARN sintéticos de control negativo. El cambio relativo en las células en cada estado se calculó para cada miARN que se utilizó. Los miARN sintéticos que inducían un cambio significativo hacia o en contra de un estado específico del ciclo celular se enumeran a continuación. Estos

10

representan los miARN que regulan puntos clave en el ciclo celular y ofrecen puntos clave de intervención para el desarrollo de terapias relacionadas con el cáncer.

TABLA 23

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

miARN	% Dif de Células en G1	desv. estándar.
miR-miR-21	54,4	4,2
miR-miR-20	63,6	9,3
miR-miR-1	65,3	9,5
miR-miR-206	66,8	9,0
miR-miR-373	72,6	5,7
miR-miR-26a	78,0	4,0

TABLA 24

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

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

5

TABLA 25

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

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

TABLA 26

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

miARN	% Dif de Células en G1	desv. estándar.
miR-miR-92	132,0	14,7
miR-miR-15a	134,8	13,9

(continuación)

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

miARN	% Dif de Células en G1	desv. estándar.
miR-miR-191	135,9	29,1
miR-miR-26a	136,0	7,6
miR-miR-20	139,7	17,6
mmu-290	141,0	11,7
let-7a	141,1	19,9
miR-miR-345	143,3	45,8
miR-miR-16	150,1	24,8
miR-miR-224	150,6	9,8

TABLA 26**miARN que reducen significativamente el porcentaje de células BJ en fase G2/M del ciclo celular**

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

TABLA 27**miARN que aumentan significativamente el porcentaje de células BJ en fase G2/M del ciclo celular**

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

TABLA 28**miARN que aumentan significativamente el porcentaje de células BJ con una cantidad mayor de 2x de ADN**

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TABLA 29

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

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

Tabla 30

Mama				
	Cancerosas		No Cancerosas	
<u>miARN</u>	%CN	% desv. estándar.	%CN	% desv. estándar.
miR-201	79	14	103	17
miR-192	81	3	95	17
miR-92	85	11	104	24
Piel				
	Cancerosas		Normales	
<u>pre-MIR</u>	% CN	% desv. estándar.	% CN	% desv. estándar.
miR-154	51	5	93	10
miR-195	58	3	87	5
mu-miR-376b	65	3	99	8
miR-201	67	8	106	4
miR-26a	69	12	97	17
miR-193	69	4	105	10
Linfocitos T				
	Leucemia		Normales	
	%CN	% desv. estándar.	%CN	% desv. estándar.
let-7a	21	1	137	15
let-7b	50	5	136	13
miR-101	69	30	95	5
miR-10b	37	3	115	18
miR-122	67	18	104	18
miR-17-3p	63	16	116	4
miR-29a	68	7	111	8
miR-30a-3p	66	27	97	18
miR-34a	67	21	100	1

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

5 Ejemplo 17

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ejemplo 18

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

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

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

(1) Se añadió a cada pocillo Reactivo ViaCount Flex (Guava), que incluye un colorante que solamente penetra en células muertas y que es fluorescente cuando interactúa con ADN, y se cuantificó la fluorescencia utilizando el Guava PCA-96 según las instrucciones del fabricante. El porcentaje de células viables se halló dividiendo el número de células no muertas y no apoptóticas en la muestra por el número total de células en el pocillo y multiplicándolo por 100.

(2) Se añadió a cada pocillo yoduro de propidio, un colorante que es fluorescente cuando interactúa con ADN. Cada célula se analizó utilizando el Escáner Celular TTP LabTech según las instrucciones del fabricante para detectar células con patrones de tinción que concuerdan con muerte celular o apoptosis. El porcentaje de células viables se midió dividiendo el número de células no muertas y no apoptóticas en la muestra por el número total de células en el pocillo y multiplicando por 100.

En la FIG. 19 se presentan miARN sintéticos que disminuyen o aumentan significativamente la viabilidad en los varios tipos celulares que se analizaron. En una comparación de la viabilidad entre linfocitos Jurkat y linfocitos T primarios, que representan las formas leucemia y normal de los linfocitos T, let-7, miR-10, miR-101, miR-17-3p, miR-19, y miR-34a reducían mucho la viabilidad de las células de leucemia sin afectar a los linfocitos T normales.

Ejemplo 19

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

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

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

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

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

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

Ejemplo 20

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

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

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

Tabla 31

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

Ejemplo 21

miARN que afectan la eficacia de compuestos terapéuticos

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

Se transfectaron por triplicado aproximadamente 8.000 células de cuello uterino (HeLa) y de pulmón (A549, HTB-57, y CRL-5826) por pocillo con miARN sintéticos de la biblioteca de los inventores utilizando siPORT™ NeoFx™

(Ambion). Se cambió el medio a las 24 h y se introdujeron el etopósido y el TRIAL a una concentración final de aproximadamente 25 μ M después de 48 horas. Las células se inspeccionaron visualmente bajo el microscopio para inspeccionar cualitativamente la muerte celular 64 horas tras la transfección.

Se midió la apoptosis de las células tratadas con etopósido midiendo la actividad de la caspasa 3 de la manera siguiente: 1) Se lavaron las células una vez con PBS y se congelaron a -80 °C. 2) Las células se lisaron añadiendo 40 μ l de tampón de lisado frío (50 mM HEPES pH 7.2, 40 mM NaCl, 0.5% NP40, 0.5 mM EDTA) a los pocillos y se incubaron durante 20 min a 4 °C. 3) Se añadieron 160 μ l de tampón ICE (50 mM HEPES pH 7.4, 0.1% CHAPS, 0.1 mM EDTA, 10% sacarosa) + 5 mM DTT que contenía 20 μ M de sustrato DEVDafc. 4) Se midió el aumento de fluorescencia en una hora a 400 ex., 505 em. También se analizaron las muestras para hallar el número de células utilizando un ensayo general de esterasa para normalizar los resultados de caspasa 3. El sustrato FDA (0.4 mg/ml de diacetato de fluoresceína (FDA) en acetonitrilo) se diluyó 1:19 en un tampón de dilución (40 mM TrisCl pH 7.5, 20 mM NaCl, 0.5% NP-40, concentración final 0.02 mg/ml). Se añadieron 40 μ l de tampón (40 mM TrisCl pH 7.5, 0.5% NP-40) a cada pocillo de muestra. Las muestras se incubaron 10 min en hielo. Se añadieron 160 μ l de sustrato FDA diluido a cada pocillo. Se midió la fluorescencia durante 30 minutos a 37 grados (ex = 488, em = 529). La pendiente del aumento de fluorescencia en el tiempo es una función del número de células en la placa.

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

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

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

Ejemplo 22

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

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

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

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

Ejemplo 23

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

- La telomerasa es un complejo de proteínas y ARN que mantiene los extremos de los cromosomas agregando telómeros. Con raras excepciones, las células diferenciadas terminalmente carecen de telomerasa activa. Una de las excepciones son las células cancerosas. Más del 90% de las muestras humanas de cáncer tienen telomerasa activa (revisado en Dong y col., 2005). El gen hTert codifica el dominio catalítico de telomerasa. La expresión de hTert se correlaciona con la actividad de la telomerasa en las células lo que le hace un buen sustituto de la actividad telomerasa. Los inventores han desarrollado y utilizado un ensayo basado en RT-PCR para controlar la expresión de ARNm hTert en células negativas a telomerasa para identificar los miARN que participan en la regulación de la telomerasa. Los miARN que regulan la actividad telomerasa representan puntos de intervención para terapias contra el cáncer.
- Las células BJ son fibroblastos normales del prepucio que carecen de actividad de ARNm hTert y telomerasa. Las células BJ se tripsinizaron y se diluyeron hasta 13.000 células/ml en medio de cultivo normal. Se diluyeron 0,3 µl de agente lipofectamina 2000 en 40 µl de OPTIMEM y se incubaron durante cinco minutos. Se añadió reactivo de transfección diluido a los pocillos de placas de 96 pocillos que contenían 151 miARN sintéticos así como dos controles negativos de miARN diferentes. Cada pocillo albergaba un miARN sintético diferente. Los miARN sintéticos y el agente de transfección se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y luego se añadieron 200 µl (2.600 células) sobre el complejo lípido/miARN. Las células se colocaron en una incubadora y se aisló el ARN 72 horas más tarde. El ARN se aisló de las células de cada pocillo utilizando el protocolo de referencia del kit de Aislamiento de ARN Total RNAqueous™-MagMAX96 (nº de catálogo 1830) (lisis de las células en los pocillos). Se hizo la transcripción inversa utilizando una reacción RETROscript añadiendo 11 µl de ARN total (20-100 ng/µl) a 1 µl de decámeros aleatorios e incubándolos en baño de agua a 70 °C durante 3 minutos y luego colocándolos en hielo. Después, se le añadieron 8 µl del cóctel que contenía 3,8 µl de agua libre de Nucleasa, 2,0 µl de 10x de tampón de transcripción inversa, 2,0 µl de dNTPs 2,5 mM, Proteína inhibidora de RNasa (40 U/µl), 0,1 µl de MMLV-RT (100 U/µl), y se incubaron a 42 °C durante 1 hora, y después a 92 °C durante 10 minutos.
- Se ensamblaron reacciones PCR en tiempo real para cuantificar el ARNm hTert y el ARNr 18S en cada una de las muestras. Se colocaron en un tubo de PCR: Agua libre de nucleasa, 10x tampón completo de PCR/SYBR, MgCl₂ 25 mM, 2,5 mM de dNTPs, 50x de ROX, cebadores específicos de 18S o hTert (mezcla de directos e inversos 3 µM), el ADNc de la distintas muestras, y polimerasa Súper taq. Se calentó la reacción a 95 °C durante 5 minutos y luego se sometió a 40 ciclos a 95 °C durante 15 segundos, 60 °C durante 30 segundos, 72 °C durante 30 segundos. Los productos de amplificación se controlaron utilizando ABI 7600 (Applied Biosystems). Las células BJ normalmente no producen productos de amplificación con los cebadores de hTert. También se analizaron las muestras transfectadas con miARN que daban lugar a productos de PCR hTert para hallar niveles de ARNr 18S para asegurar de que no hubiera significativamente más células en las muestras que pudieran haber contribuido a la cantidad de hTert en las muestras.
- Se detectó el ARNm hTert en transfecciones duplicadas de cada uno de los miARN enumerados posteriormente. Estos miARN presumiblemente afectan las rutas que regulan la expresión del gen hTert. La sobre-expresión de cualquiera de estos miARN podría contribuir al cáncer por activación de la telomerasa. La regulación de las actividades de estos miARN en las células cancerosas podría limitar su transformación y superar la oncogénesis.

Tabla 33

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

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

Tabla 34

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

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

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

Referencias

- 15 Agrawal y Zamecnik, Nucleic Acids Research, 18(18):5419-5423,1990.
 Allen y col., Biochemistry, 28:4601-4607, 1989.
 Ambros, Cell, 107(7):823-826,2001.
 Baglioni y Nilson, Interferon, 5:23-42, 1983.
 Bayer y Wilchek, Methods of Biochemical Analysis, 26:1-45, 1980.
- 20 Bayer y col, Analytical Biochemistry, 149:529-536, 1985.
 Beaucage, y Lyer, Tetrahedron, 48:2223-2311, 1992.
 Bernstein y col, Nature, 409: 363-366, 2001.
 Bijsterbosch y col, Biochem. Pharmacol., 62(5):627-633, 2001.
 Blackie y col., Bioorg. Med Chem. Lett., 12(18):2603-2606, 2002.
- 25 Bobo y col, En: Diagnosis of Chlamydia trachomatis Cervical Infection by Detection of Amplified DNA with an Enzyme Immunoassay, 1990.
 Borlakoglu y col., Biochem. Pharmacol., 40(2):265-272, 1990.
 Boshier y Labouesse, Nat. Cell Biol., 2:E31-E36, 2000.
 Brennecke y col., Cell, 113:25-36, 2003.
- 30 Brumbaugh y col., Proc Natl Acad-Sci USA, 85(15):5610-5614,1988.
 Brummelkamp y col., Science, 296(5567):550-553, 2002

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

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

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

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> ASURAGEN, INC.
15
<120> PROCEDIMIENTOS Y COMPOSICIONES QUE IMPLICAN MOLÉCULA DE MIARN MODIFICADAS Y
MOLECULAS INHIBIDORAS DE MIARN
<130> R 57140
20
<140> DESCONOCIDO
<141> 14-11-2005
<150> 60/683.736
25 <151> 23-05-2005
<150> 60/649.634
<151> 03-02-2005
<150> 60/627.171
30 <151> 12-22-2004
<160> 803
<170> PatentIn Ver. 2.1
35
<210> 1
<211> 85
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
40
<400> 1

accuacucag aguacauacu ucuuuuagua ccgauugaa cauacaugc uauggaugu 60
aaagaaguau guuuuuugg uaggc 85
45
<210> 2
<211> 71
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
50
<400> 2

ugggaaacau acuucuuuau augcccauau ggaccugcua agcuauaggaa uguaaagaag 60
uaguaucuc a 71
55
<210> 3
<211> 80
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*
60
<400> 3

ugggaugagg uaguagguug uauaguuuua gggucacacc caccacuggg agauaacuau 60
acaauacu gucuuccua 80

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

ES 2 503 740 T3

<212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 10
 5
 ucagagugag guaguagauu guauaguugu gggguaguga uuuuacccug uucaggagau 60
 aacuaauacaa ucuauugccu ucccuga 87
 <210> 11
 <211> 83
 10
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 11
 15
 ugugggauga gguaguagau uguauaguuu uagggucuaa ccccaucuug gagauaacua 60
 uacagucuaac ugucuuuccc acg 83
 <210> 12
 <211> 110
 20
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 12
 25
 uuggauguug gccuaguucu guguggaaga cuagugauuu uguuguuuuu agauaacuaa 60
 aucgacaaca aaucacaguc ugccauaugg cacaggccau gccucuacag 110
 <210> 13
 <211> 110
 30
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 13
 35
 cuggauacag aguggaccgg cuggccccau cuggaagacu agugauuuug uuguugucuu 60
 acugcgcuca acaacaaauc ccagucuaacc uaauggugcc agccaucgca 110
 <210> 14
 <211> 110
 40
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 14
 45
 agauuagagu ggcugugguc uagugcugug uggaagacua gugauuuugu uguucugaug 60
 uacuacgaca acaagucaca gccggccuca uagcgcagac ucccuucgac 110
 <210> 15
 <211> 84
 50
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 15
 55
 aggcugaggu aguaguuuugu acaguuuugag ggucuaugau accacccggu acaggagaua 60
 acuguacagg ccacugccuu gcca 84
 <210> 16
 <211> 84
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 16

cuggcugagg uaguaguug ugcuguuggu cggguuguga cauugcccgc uguggagaua 60
acugcgcaag cuacugccuu gcua 84

5 <210> 17
<211> 89
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 17

cgggguuggu uguuauuuu gguuauauag cuguauagau gguguggagu cuucauaaag 60
cuagauaacc gaaagaaaaa auaacccca 89

15 <210> 18
<211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 18

ggaagcgagu uguuauuuu gguuauauag cuguauagau guauuggucu ucauaaagcu 60
agauaaccga aagaaaaaac uccuua 87

25 <210> 19
<211> 90
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 19

30 ggagggccgu uucucucuuu gguuauauag cuguauagau gccacagagc cgucuaaag 60
cuagauaacc gaaaguagaa augauucua 90

35 <210> 20
<211> 110
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 20

gaucugucug ucuucuguau auacccugua gaucggaauu uguguaagga auuuuguggu 60
cacaauucg uaucuagggg aaauaguagu ugacauaaac acuccgcucu 110

40 <210> 21
<211> 110
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 21

ccagagguug uaacguuguc uauauauacc cuguagaacc gaauuugugu gguaucggu 60
uagucacaga uucgauucua ggggaauuaa uggucgaugc aaaaacuua 110

50 <210> 22
<211> 83
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

55 <400> 22

ccuuggagua aaguagcagc acauaauggu uuguggauuu ugaaaaggug caggccauau 60
 ugugcugccu caaaaauaca agg 83

<210> 23
 <211> 98
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 23

uugaggccuu aaaguacugu agcagcacau caugguuuac augcuacagu caagaucgca 60
 aucauuuuuu gcugcucuag aaauuuuagg aaauucau 98

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

<400> 24

gucagcagug ccuuagcagc acguaaaauu uggcguaag auucuaaaaau uaucuccagu 60
 auuaacugug cugcugaagu aagguugac 89

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

<400> 25

guuccacucu agcagcacgu aaauauuggc guagugaaau auauauuaaa caccaauauu 60
 acugugcugc uuuaguguga c 81

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

<400> 26

gucagaauaa ugucaaagug cuuacagugc agguagugau augugcaucu acugcaguga 60
 aggcacuugu agcauuugg ugac 84

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

<400> 27

uguucuaagg ugcaucuagu gcagauagug aaguagauua gcaucuacug cccuaagugc 60
 uccuucuggc a 71

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

<400> 28

gcaguccucu guuaguuuug cauaguugca cuacaagaag aauguaguug ugcaaaucua 60
 ugcaaaacug augguggccu gc 82

<210> 29
 <211> 87
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 29

 cacuguucua ugguuaguuu ugcagguuug cauccagcug ugugauauuc ugcugugcaa 60
 auccaugcaa aacugacugu gguagug 87
 10
 <210> 30
 <211> 96
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 30

 acauugcuac uuacaauuag uuuugcaggu uugcauuuca gcguauauau guauaugugg 60
 cugugcaaaau ccaugcaaaa cugauuguga uaaugu 96
 20
 <210> 31
 <211> 71
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 31

 guagcacuaa agugcuuaua gugcagguag uguuuaguua ucuacugcau uaugagcacu 60
 uaaaguacug c 71
 30
 <210> 32
 <211> 72
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 35
 <400> 32

 ugucggguag cuuauagac ugauguugac uguugaauuc cauggcaaca ccagucgaug 60
 ggcugucuga ca 72
 40
 <210> 33
 <211> 85
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 45
 <400> 33

 ggcugagccg caguaguucu ucaguggcaa gcuuuuguc cugacccagc uaaagcugcc 60
 aguugaagaa cuguugcccu cugcc 85
 50
 <210> 34
 <211> 73
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 55
 <400> 34

 ggccggcugg gguuccuggg gaugggauuu gcuuccuguc acaaaucaca uugccaggga 60
 uuuccaaccg acc 73

<213> *Homo sapiens*

<400> 35

5 **cucaggugcu cuggcugcuu ggguuuccugg caugcugauu ugugacuuaa gauuaaaauc 60**
acauugccag ggauuaccac gcaaccacga ccuuggc 97

<210> 36
 <211> 68
 <212> ARN
 10 <213> *Homo sapiens*

<400> 36

15 **cuccggugcc uacugagcug auaucaguuc ucauuuuaca cacuggcuca guucagcagg 60**
aacaggag 68

<210> 37
 <211> 73
 <212> ARN
 20 <213> *Homo sapiens*

<400> 37

25 **cucugccucc cgugccuacu gagcugaaac acaguugguu uguguacacu ggcucaguuc 60**
agcaggaaca ggg 73

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

30 <400> 38

35 **ggccaguguu gagaggcgga gacuugggca auugcuggac gcugcccugg gcauugcacu 60**
ugucucgguc ugacagugcc ggcc 84

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

<400> 39

40 **guggccucgu ucaaguaauc caggauaggc ugugcagguc ccaauugggcc uauucuuggu 60**
uacuugcacg gggacgc 77

<210> 40
 <211> 77
 <212> ARN
 45 <213> *Homo sapiens*

<400> 40

50 **ccgggaccca guucaaguaa uucaggauag guugugugcu guccagccug uucuccauua 60**
cuuggcucgg ggaccgg 77

<210> 41
 <211> 84
 <212> ARN
 55 <213> *Homo sapiens*

<400> 41

ggcuguggcg ggauucaagu aauccaggau aggcuguuuc caucugugag gccuauucuu 60
gauuacuugu uucuggaggc agcu 84

5 <210> 42
<211> 78
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 42

cugaggagca gggcuuagcu gcuugugagc aggguccaca ccaagucgug uucacagugg 60
cuaaguuccg cccccag 78

15 <210> 43
<211> 97
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 43

20 accucucuaa caaggugcag agcuuagcug auuggugaac agugauuggu uuccgcuuug 60
uucacagugg cuaaguucug caccugaaga gaaggug 97

25 <210> 44
<211> 86
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 44

30 gguccuugcc cucaaggagc ucacagucua uugaguuacc uuucugacuu ucccacuaga 60
uugugagcuc cuggagggca ggcacu 86

35 <210> 45
<211> 64
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 45

40 augacugauu uuuuuuggug uucagaguca auauuuuuu cuagcaccau cugaaaucgg 60
uuau 64

45 <210> 46
<211> 81
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 46

50 cuucaggaag cugguuucac auggugguuu agauuuuuu agugauuguc uagcaccau 60
ugaaaucagu guucuugggg g 81

55 <210> 47
<211> 81
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<210> 47

cuucuggaag cugguuucac augguggcuu agauuuuuu aucuuuguau cuagcaccau 60
uugaaaucag uguuuuagga g 81

5 <210> 48
 <211> 88
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 48
 aucucuuaa caggcugacc gauuucuccu gguguucaga gucuguuuuu gucuagcacc 60
 auuugaaauc gguuaugaug uaggggga 88
 10 <210> 49
 <211> 71
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 49
 gcgacuguaa acauccuac cuggaagcug ugaagccaca gaugggcuuu cagucggaug 60
 uuugcagcug c 71
 20 <210> 50
 <211> 72
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 50
 agauacugua acauccuac acucucagcu guggaaagua agaaagcugg gagaaggcug 60
 uuacucuuu cu 72
 30 <210> 51
 <211> 70
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 51
 guuguuguaa acauccccga cuggaagcug uaagacacag cuaagcuuuc agucagaugu 60
 uugcugcuac 70
 40 <210> 52
 <211> 88
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 52
 45 accaaguuuu aguugaugua acauccuac acucagcugu aauacaugga uuggcuggga 60
 gguggauguu uacuucagcu gacuugga 88
 50 <210> 53
 <211> 89
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 53
 55 accaugcugu agugugugua acauccuac acucucagcu gugagcucaa gguggcuggg 60
 agaggguguu uuacuccuuc ugccaugga 89
 <210> 54
 <211> 64

ES 2 503 740 T3

<212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 54
 5
 cuguaaacaau ccuugacugg aagcuguaag guguucagag gagcuuucag ucggauguuu 60
 acag 64
 <210> 55
 <211> 71
 10
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 55
 15
 ggagaggagg caagaugcug gcauagcugu ugaacuggga accugcuauug ccaacauauu 60
 gccaucuuuc c 71
 <210> 56
 <211> 70
 20
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 56
 25
 ggagauauug cacauuacua aguugcaugu ugucacggcc ucaaugcaau uuagugugug 60
 ugauauuuuc 70
 <210> 57
 <211> 69
 30
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 57
 35
 cuguggugca uuguaguugc auugcauguu cuggugguac ccaugcaaug uuuccacagu 60
 gcaucacag 69
 <210> 58
 <211> 110
 40
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 58
 45
 ggccagcugu gaguguuucu uuggcagugu cuuagcuggu uguugugagc aaugaguaagg 60
 aagcaaucag caaguauacu gcccuagaag ugcugcacgu uguggggccc 110
 <210> 59
 <211> 84
 50
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 59
 55
 gugcucgguu uguaggcagu gucauuagcu gauuguacug uggugguuac aaucacuaac 60
 uccacugcca ucaaaacaag gcac 84
 <210> 60
 <211> 77
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

	<400> 60	
	agucuaguua cuaggcagug uaguuagcug auugcuaaua guaccaauca cuaaccacac 60 ggccagguaa aaagauu 77	
5	<210> 61 <211> 78 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<400> 61	
	cuuucuaCac agguugggau cgguugcaau gcuguguuuc uguaugguau ugcacuuguc 60 ccggccuguu gaguuugg 78	
15	<210> 62 <211> 75 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<400> 62	
	ucauucccugg guggggauuu guugcauuac uuguguucua uauaaaguau ugcacuuguc 60 ccggccugug gaaga 75	
25	<210> 63 <211> 80 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 63	
30	cugggggcuc caaagugcug uucgugcagg uagugugauu acccaaccua cugcugagcu 60 agcacuuccc gagcccccg 80	
35	<210> 64 <211> 81 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 64	
40	aacacagugg gcacucaaua aaugucuguu gaauugaaa gcguuacauu caacggguau 60 uuauugagca cccacucugu g 81	
45	<210> 65 <211> 78 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 65	
	uggccgauuu uggcacuagc acauuuuugc uugugucucu ccgcucugag caaucaugug 60 cagugccaau augggaaa 78	
50	<210> 66 <211> 80 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
55	<400> 66	

		gugagguagu aaguuguauu guuguggggu agggauauua ggccccaauu agaagauaac	60
		uauacaacuu acuacuuucc	80
5		<210> 67 <211> 81 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
		<400> 67	
10		cccauuggca uaaacccgua gauccgaucu uguggugaag uggaccgcac aagcucgcuu	60
		cuaugggguu gugucagugu g	81
15		<210> 68 <211> 70 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
		<400> 68	
20		ggcacccacc cguagaaccg accuugcggg gccuucgccg cacacaagcu cgugucugug	60
		gguccguguc	70
25		<210> 69 <211> 80 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
		<400> 69	
30		ccuguugcca caaacccgua gauccgaacu ugugguauua guccgcacaa gcuuguauu	60
		auagguaugu gucuguuagg	80
35		<210> 70 <211> 75 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
		<400> 70	
40		ugcccuuggcu caguuaucac agugcugaug cugucuauuc uaaagguaca guacugugau	60
		aacugaagga uggca	75
45		<210> 71 <211> 79 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
		<400> 71	
50		acuguccuuu uucgguuuau augguaccga ugcuguauau cugaaaggua caguacugug	60
		auaacugaag aaugguggu	79
55		<210> 72 <211> 78 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
		<400> 72	
		uugugcuuuc agcuucuuua cagugcugcc uuguagcauu caggucaagc agcauuguac	60
		agggcuauga aagaacca	78

<210> 73
 <211> 78
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 73

 uacugcccuc ggcuuuuu cagugcugcc uuguugcaua uggaucaagc agcauuguac 60
 agggcuaua aggcuuu
 78
 10
 <210> 74
 <211> 81
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 74

 ugugcaucgu ggucaaaugc ucagacuccu gugguggcug cucaugcacc acggauguuu 60
 gagcaugugc uacggugucu a
 81
 20
 <210> 75
 <211> 81
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 75

 ugugcaucgu ggucaaaugc ucagacuccu gugguggcug cuuauugcacc acggauguuu 60
 gagcaugugc uauugugucu a
 81
 30
 <210> 76
 <211> 81
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 35
 <400> 76

 ccuuggccau guaaaagugc uuacagugca gguagcuuuu ugagaucuaac ugcaauguaa 60
 gcacuuuuu cauuaccaug g
 81
 40
 <210> 77
 <211> 82
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 45
 <400> 77

 ccugccgggg cuaaagugcu gacagugcag auaguggucc ucuccgugcu accgcacugu 60
 gguacuugc ugcuccagca gg
 82
 50
 <210> 78
 <211> 81
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 55
 <400> 78

 cucucugcuu ucagcuucu uacaguguug ccuuguggca uggaguuaa gcagcauugu 60
 acagggcuau caaagcacag a
 81

<213> *Homo sapiens*

<400> 79

5 ccuuagcaga gcuguggagu gugacaaugg uguuuuguguc uaaacuauc aacgccauua 60
 ucacacuaaa uagcuacugc uaggc 85

<210> 80

<211> 85

<212> ARN

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 80

15 aggccucucu cuccguguuc acagcggacc uugauuuuaa uguccauaca auuaaggcac 60
 gcgguugaau gcaagaauug ggcug 85

<210> 81

<211> 109

<212> ARN

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 81

25 aucaagauua gaggcucugc ucuccguguu cacagcggac cuugauuuua ugucuuuaca 60
 uuuaggcacg cgguugaauug caagagcgga gccuacggcu gcacuugaa 109

<210> 82

<211> 87

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

30 <400> 82

35 ugagggcccc ucugcguguu cacagcggac cuugauuuua ugucuuuaca auuaaggcac 60
 gcgguugaau gcaagagagg cgccucc 87

<210> 83

<211> 88

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 83

40 ugcgcuccuc ucagucccug agaccuuuac uugugauguu uaccguuuua auccacgggu 60
 uaggcucuuu ggagcugcga gucgugcu 88

<210> 84

<211> 86

45 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 84

50 ugccagucuc uaggucccug agaccuuuua accugugagg acauccaggg ucacagguga 60
 gguuuuuugg agccuggcgu cuggcc 86

<210> 85

<211> 89

<212> ARN

55 <213> *Homo sapiens*

<400> 85

accagacuuu uccuaguccc ugagacccua acuugugagg uauuuuagua acaucacaag 60
ucaggcucuu gggaccuagg cggagggga 89

<210> 86
<211> 85
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 86

cgugggcgac gggacauuau uacuuuuggu acgcgugug acacuucaaa cucguaccgu 60
gaguaauaaau ggcggucca cggca 85

<210> 87
<211> 97
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 87

ugugaucacu gucuccagcc ugcugaagcu cagagggcuc ugauucagaa agaucaucgg 60
auccgucuga gcuuggcugg ucggaagucu caucauc 97

<210> 88
<211> 82
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 88

ugagcuguug gauucggggc cguagcacug ucugagaggu uuacauuucu cacagugaac 60
cggucucuuu uucagcugcu uc 82

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

<400> 89

ugugcagugg gaaggggggc cguuacacug uacgagagug aguagcaggu cucacaguga 60
accggucucu uucccuacug uguc 84

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

<400> 90

ugcccuucgc gaauuuuuu gcggucuggg cuugcuguac auaacucaau agccggaagc 60
ccuuacccca aaaagcauuu gcggagggcg 90

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

<400> 91

ugcugcuggc cagagcucuu uucacauugu gcuacugucu gcaccuguca cuagcagugc 60
aauguuaaaa gggcauuggc cguguagug 89

5 <210> 92
 <211> 82
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 92
 ggccugcccg acacucuuuc ccuguugcac uacuauaggc cgcugggaag cagugcaaug 60
 augaaagggc aucggucagg uc 82
 10 <210> 93
 <211> 101
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 93
 ccgccccgc gucuccaggg caaccguggc uuucgauugu uacuguggga acuggaggua 60
 acagucuaca gccauggucg ccccgagca cgcccacgcg c 101
 20 <210> 94
 <211> 88
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 94
 acaaugcuuu gcuagagcug guaaaaugga accaaaucgc cucuucaaug gauuuggucc 60
 ccuucaacca gcuguagcua ugcauuga 88
 30 <210> 95
 <211> 102
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 95
 gggagccaaa ugcuuugcua gagcugguaa aauggaacca aaucgacugu ccaauggauu 60
 ugguccccuu caaccagcug uagcugugca uugauggcgc cg 102
 40 <210> 96
 <211> 119
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 96
 45 ccucagaaga aaugugcccc cugcucuggc uggucaaacg gaaccaaguc cgucuuccug 60
 agagguuugg ucccuucaa ccagcuacag cagggcuggc aaugcccagu ccuuggaga 119
 50 <210> 97
 <211> 73
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 97
 55 cagggugugu gacugguuga ccagaggggc augcacugug uucaccugug gggccaccua 60
 gucaccaacc cuc 73
 <210> 98
 <211> 90

ES 2 503 740 T3

<212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 98
 5
 aggccucgcu guucucuaug gcuuuuuauu ccuaugugau ucuacugcuc acucauauag 60
 ggauugggagc cguggcgcac ggcggggaca 90
 <210> 99
 <211> 100
 10 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 99
 15 agauaaaauuc acucuagugc uuuauuggcuu uuuauuccua ugugauagua auaaagucuc 60
 auguagggau ggaagccaug aaauacauug ugaaaaauca 100
 <210> 100
 <211> 97
 20 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 100
 25 cacucugcug uggccuaugg cuuuucauuc cuaugugauu gcugucccaa acucauguag 60
 ggcuaaaaagc caugggcuac agugaggggc gaggcucc 97
 <210> 101
 <211> 82
 30 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 101
 35 ugagcccucg gaggacucca uuuguuuuga ugauggauuc uuaugcucca ucaucgucuc 60
 aaauagagucu ucagaggguu cu 82
 <210> 102
 <211> 102
 40 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 102
 45 gguccucuga cucucuucgg ugacggguau ucuugggugg auaaauacgga uuacguuguu 60
 auugcuuaag aaauacgcgua gucgaggaga guaccagcgg ca 102
 <210> 103
 <211> 84
 50 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 103
 55 cguugcugca gcugguguug ugaauacaggc cgacgagcag cgcauccucu uacccggcua 60
 uuucacgaca ccagggguug auca 84
 <210> 104
 <211> 99
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 104

cccuggcaug gugugguggg gcagcuggug uugugaauca ggccguugcc aaucagagaa 60
cgguacuuc acaacaccag ggccacacca cacuacagg 99

5 <210> 105
<211> 68
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 105

guguauucua cagugcacgu gucuccagug uggcucggag gcuggagacg cggcccuguu 60
ggaguaac 68

15 <210> 106
<211> 100
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 106

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

25 <210> 107
<211> 95
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 107

30 cggccggccc ugguccauc uuccaguaca guguuggaug gucuaauugu gaagcuccua 60
acacugucug guaaagaugg cucccgggug gguuc 95

35 <210> 108
<211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 108

gacagugcag ucacccaaua aguagaaagc acuacuaaca gcacuggagg guguauguu 60
uccuacuuua uggaugagug uacugug 87

40 <210> 109
<211> 106
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 109

gcgcagcgcc cugucuccca gccugaggug cagugcugca ucucugguca guugggaguc 60
ugagaugaag cacuguagcu caggaagaga gaaguuguuc ugcagc 106

50 <210> 110
<211> 86
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

55 <400> 110

	uggggcccug gcugggauau caucauauac uguaaguug cgaugagaca cuacaguaua 60 gaugauguac uaguccgggc accccc 86
5	<210> 111 <211> 88 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 111
10	caccuugucc ucacggucca guuuucccag gaaucccuua gaugcuaaga uggggauucc 60 uggaaauacu guucuugagg ucaugguu 88
15	<210> 112 <211> 99 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 112
20	ccgaugugua uccucagcuu ugagaacuga auuccauggg uugugucagu gucagaccuc 60 ugaaauucag uucuucagcu gggauaucuc ugucaucgu 99
25	<210> 113 <211> 72 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 113
30	aaucuaaaga caacauuucu gcacacacac cagacuauagg aagccagugu guggaaaugc 60 uucugcuaga uu 72
35	<210> 114 <211> 68 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 114
40	gaggcaagu ucugagacac uccgacucug aguaugauag aagucagugc acuacagaac 60 uuugucuc 68
45	<210> 115 <211> 99 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 115
50	caagcacgau uagcauuuga ggugaaguuc uguuauacac ucaggcugug gcucucugaa 60 agucagugca ucacagaacu uugucucgaa agcuuucua 99
55	<210> 116 <211> 89 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 116
	gccggcgccc gagcucuggc uccgugucuu cacucccgug cuuguccgag gagggagggg 60 gggacggggg cugugcuggg gcagcugga 89

<210> 117
 <211> 84
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 117

 cuccccaugg cccugucucc caaccuuugu accagugcug ggcucagacc cugguacagg 60
 ccugggggac aggaccugg ggac 84
 10
 <210> 118
 <211> 90
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 118

 uuuccugccc ucgaggagcu cacagucuag uaugucucau ccccuacuag acugaagcuc 60
 cuugaggaca gggauuguca uacucaccuc 90
 20
 <210> 119
 <211> 87
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 119

 ugucuuuuuu ggcccagguu cugugauaca cuccgacucg ggcucuggag cagucagucg 60
 augacagaac uugggcccgg aaggacc 87
 30
 <210> 120
 <211> 90
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 35
 <400> 120

 cucacagcug ccagugucau uuuugugauc ugcagcuagu auucucacuc caguugcaua 60
 gucacaaaag ugaucuuagg cagguguggc 90
 40
 <210> 121
 <211> 87
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 45
 <400> 121

 agcgguggcc agugucauuu uugugauguu gcagcuagua auaugagccc aguugcauag 60
 ucacaaaagu gaucauugga aacugug 87
 50
 <210> 122
 <211> 84
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 55
 <400> 122

 gugguacuug aagauagguu auccguguug ccuucgcuuu auuugugacg aaucuuacac 60
 gguugaccua uuuuucagua ccaa 84
 55
 <210> 123
 <211> 65
 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 123

5 **cuguuaaUGC uaaucgugau agggguuuuu gccuccaacu gacuccuaca uauuagcauu 60**
aacag 65

<210> 124

<211> 110

<212> ARN

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 124

15 **agaagggcua ucaggccagc cuucagagga cuccaaggaa cauucaacgc ugucggugag 60**
uuugggauuu gaaaaaacca cugaccguug acuguaccuu gggguccua 110

<210> 125

<211> 110

<212> ARN

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 125

25 **ccugugcaga gauuauuuuu uaaaaggua caaucaacau ucauugcugu cgguggguug 60**
aacugugugg acaagcucac ugaacaauga augcaacugu ggccccgcuu 110

<210> 126

<211> 110

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

30 <400> 126

35 **cggaaaauuu gccaaagguu ugggggaaca uucaaccugu cggugaguuu gggcagcuca 60**
ggcaaaccau cgaccguuga guggaccug aggcuggaa uugccauccu 110

<210> 127

<211> 89

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 127

40 **cugauggcug cacucaacau ucauugcugu cgguggguuu gagucugaau caacucacug 60**
aucaaugaau gcaaacugcg gaccaaaca 89

<210> 128

<211> 110

45 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 128

50 **gagcugcuug ccucggggcg uuuuuggcaa ugguagaacu cacacuggug agguaacagg 60**
auccgguggu ucuagacuug ccaacuauug ggcgaggacu cagccggcac 110

<210> 129

<211> 110

<212> ARN

55 <213> *Homo sapiens*

<400> 129

ccgcagagug ugacuccugu ucuguguauug gcacugguag aauucacugu gaacagucuc 60
agucagugaa uuaccgaagg gccauaaaca gagcagagac agauccacga 110

5 <210> 130
<211> 84
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 130

10 ccagucacgu ccccuuauca cuuuuccagc ccagcuuugu gacuguaagu guuggacgga 60
gaacugauaa gguagguga uuga 84

15 <210> 131
<211> 82
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 131

20 agggggcgag ggauuggaga gaaaggcagu uccugauggu cccuucccca ggggcuggcu 60
uuccucuggu ccuucccucc ca 82

25 <210> 132
<211> 86
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 132

30 ugcuuuaac uuuccaaaga auucuccuuu ugggcuuucu gguuuuuuuu uaagcccaa 60
ggugaauuuu ugggaaguu ugagcu 86

35 <210> 133
<211> 109
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 133

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

45 <210> 134
<211> 86
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 134

50 ugcucccucu cucacauccc uugcauggug gagggugagc uuucugaaaa cccuuccac 60
augcaggguu ugcaggaugg cgagcc 86

55 <210> 135
<211> 85
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 135

60 ugcaggccuc ugugugauau guuugauua uuagguuguu auuuaucca acuauauac 60
aaacauauuc cuacaguguc uugcc 85

5 <210> 136
 <211> 92
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 136
 cggcuggaca gcgggcaacg gaaucccaaa agcagcuguu gucuccagag cauuccagcu 60
 gcgcuuuggau uucguccccc gcucuccugc cu 92
 10 <210> 137
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 137
 gccgagaccg agugcacagg gcucugaccu augaaugac agccagugcu cucgucuccc 60
 cucuggcugc caauuccaau ggucacaggu auguucgccu caaugccagc 110
 20 <210> 138
 <211> 88
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 138
 cgaggauagg agcugagggc ugggucuuug cgggcgagau gagggugucg gaucaacugg 60
 ccuacaaagu cccaguucuc ggcccccg 88
 30 <210> 139
 <211> 85
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 139
 augguguuau caaguguaac agcaacucca uguggacugu guaccaauuu ccaguggaga 60
 ugcuguuacu uuugaugguu accaa 85
 40 <210> 140
 <211> 85
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 140
 45 ugguucccgc cccuguaac agcaacucca uguggaagug cccacugguu ccaguggggc 60
 ugcuguuau c uggggcgagg gccag 85
 50 <210> 141
 <211> 87
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 141
 55 agcuucccug gcucuagcag cacagaaaua uggcacagg gaagcgaguc ugccaauauu 60
 ggcugugcug cuccaggcag gguggug 87
 <210> 142
 <211> 70

ES 2 503 740 T3

<212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 142
 5 gugaauuagg uaguuucaug uuguugggcc uggguuucug aacacaacaa cauuaaacca 60
 cccgaauucac 70
 <210> 143
 <211> 110
 10 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 143
 15 ugcucgcuca gcugaucugu ggcuuaggua guuucauguu guugggauug aguuuugaac 60
 ucggcaacaa gaaacugccu gaguuacauc agucgguuuu cgucgagggc 110
 <210> 144
 <211> 75
 20 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 144
 25 ggcugugccg gguagagagg gcagugggag guaagagcuc uucacccuuc accaccuucu 60
 ccacccagca uggcc 75
 <210> 145
 <211> 62
 30 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 145
 35 ucauugggucc agaggggaga uagguuuccug ugauuuuuucc uucuucucua uagaauaaaau 60
 ga 62
 <210> 146
 <211> 71
 40 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 146
 45 gccaaaccag uguucagacu accuguucag gaggcucuca auguguacag uagucugcac 60
 auuggguagg c 71
 <210> 147
 <211> 110
 50 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 147
 55 aggaagcuuc uggagauccu gcuccgucgc cccaguguuc agacuaccug uucaggacaa 60
 ugccguugua caguagucug cacauugguu agacugggca agggagagca 110
 <210> 148
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 148

ccagaggaca ccuccacucc gucuacccag uguuuagacu aucuguucag gacucccaaa 60
uuguacagua gucugcacau ugguuaggcu gggcuggguu agacccucgg 110

5 <210> 149
<211> 95
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 149

ccagcucggg cagccguggc caucuucacug ggcagcauug gauggaguca ggucucuaau 60
acugccuggu aaugaugacg gcggagcccu gcacg 95

15 <210> 150
<211> 68
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 150

cccucgucuu acccagcagu guuugggugc gguugggagu cucuaauacu gccggguaau 60
gauggagg 68

25 <210> 151
<211> 90
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 151

30 ccggggcccu gugagcaucu uaccggacag ugcuggauuu cccagcuuga cucuaacacu 60
gucugguaac gauguucaa ggugacccgc 90

35 <210> 152
<211> 110
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 152

40 guguugggga cugcgcgcu ggguccagug guucuuaaca guucaacagu ucuguagcgc 60
aaugugaaa uguuuaggac cacuagacc ggcgggcgcg gcgacagcga 110

45 <210> 153
<211> 110
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 153

ggcuacaguc uuucuucaug ugacucgugg acuucccuuu gucauccuau gccugagaau 60
auaugaagga ggcugggaag gcaaaggac guucaauugu caucacuggc 110

50 <210> 154
<211> 110
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

55 <400> 154

ES 2 503 740 T3

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

<210> 155
 <211> 86
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 155

5

ugcuucccga ggccacaugc uucuuuauau ccccauauagg auuacuugc uauggaaugu 60
 aaggaagugu gugguuucgg caagug 86

10

<210> 156
 <211> 71
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 156

15

ugacgggcca gcuuuuggcc cggguuauac cugaugcuca cguauaagac gagcaaaaag 60
 cuuguugguc a 71

20

<210> 157
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 157

25

acccggcagu gccuccaggc gcagggcagc cccugcccac cgcacacugc gcugccccag 60
 acccacugug cgugugacag cggcugaucu gugccugggc agcgcgaccc 110

30

<210> 158
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 158

35

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

40

<210> 159
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 159

45

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

50

<210> 160
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 160

55

ugaguuuuga gguugcuuca gugaacauuc aacgcugucg gugaguuuug aauuaaaauuc 60
 aaaaccaucg accguugauu guaccuauug gcuuaaccau aucuacucca 110

<210> 161
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 161

 ggccuggcug gacagaguug ucaugugucu gccugucuac acuugcugug cagaacaucc 60
 gcucaccugu acagcaggca cagacaggca gucacaugac aaccagccu 110
 10
 <210> 162
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 162

 aucauucaga aaugguauac aggaaauga ccuaugaaau gacagacaau auagcugagu 60
 uugucuguca uuucuuuagg ccaauauucu guaugacugu gcuacuucua 110
 20
 <210> 163
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 163

 gauggcugug aguuggcuua aucucagcug gcaacuguga gauguucaua caaucccuca 60
 caguggucuc uggaauuag cuaaacagag caauuuccua gcccucacga 110
 30
 <210> 164
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 35
 <400> 164

 aguauaaaua uuacauaguu uuugaugucg cagauacugc aucaggaacu gauuggauaa 60
 gaaucaguca ccaucaguuc cuaaugcauu gccuucagca ucuaaacaag 110
 40
 <210> 165
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 45
 <400> 165

 gugauaaugu agcgagauuu ucuguugucg uugaucuaac caugugguug cgagguauga 60
 guaaaacaug guuccgucaa gcaccaugga acgucacgca gcuuucuaca 110
 50
 <210> 166
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 55
 <400> 166

 gaccagucgc ugcggggcuu uccuuugucg uugaucuaac cauguggugg aacgauggaa 60
 acggaacaug guucugucua gcaccgcgga aagcaccgug cucuccugca 110

ES 2 503 740 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 167

5 ccgccccggg ccgcggcucc ugauugucca aacgcaauuc ucgagucuau ggcuccggcc 60
 gagaguugag ucuggacguc ccgagccgcc gcccccaaac cucgagcggg 110

<210> 168

<211> 97

<212> ARN

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 168

15 acucaggggc uucgccacug auuguccaaa cgcaauucuu guacgagucu gcgccaacc 60
 gagaauugug gcuggacauc uguggcugag cuccggg 97

<210> 169

<211> 110

<212> ARN

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 169

25 gacagugugg cauuguaggg cuccacaccg uaucugacac uuugggcgag ggcaccaugc 60
 ugaagguguu caugaugcgg ucugggaacu ccucacggau cuuacugaug 110

<210> 170

<211> 110

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

30 <400> 170

35 ugaacaucca ggucuggggc augaaccugg cauacaauugu agauuucugu guucguuagg 60
 caacagcuac auugucugcu ggguuucagg cuaccuggaa acauguucuc 110

<210> 171

<211> 110

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 171

40 gcugcuggaa gguguaggua cccucaaugg cucaguagcc aguguagauc cugucuuucg 60
 uaaucagcag cuacaucugg cuacuggguc ucugauggca ucuucuaagcu 110

<210> 172

<211> 110

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 172

50 ccuggccucc ugcagugcca cgcuccgugu auuugacaag cugaguugga cacuccaugu 60
 gguagagugu caguuuuguca aaauacccaa gugcggcaca ugcuuaccag 110

<210> 173

<211> 81

<212> ARN

55 <213> *Homo sapiens*

<400> 173

gggcuuucaa gucacuagug guuccguuuu guagaugauu gugcauuguu ucaaaauggu 60
 gcccuaguga cuacaaagcc c 81

5 <210> 174
 <211> 80
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 174

aggacccuuc cagagggccc ccccucaauc cuguugugcc uaaucagag gguugggugg 60
 aggcucuccu gaagggcucu 80

15 <210> 175
 <211> 63
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 175

20 aagaaauggu uuaccguccc acauacauuu ugaauaugua ugugggaugg uaaaccgcuu 60
 cuu 63

25 <210> 176
 <211> 86
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 176

30 acugcuaacg aaugcucuga cuuuauugca cuacuguacu uuacagcuag cagugcaaua 60
 guauuguca agcaucugaa agcagg 86

35 <210> 177
 <211> 69
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 177

40 ccaccacuua aacguggaug uacuugcuuu gaaacuaaag aaguaagugc uucaauguuu 60
 uggugaugg 69

45 <210> 178
 <211> 82
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 178

50 gcuucgcucc ccuccgccuu cucuucccg g uucuuucccg agucgggaaa agcuggguug 60
 agagggcgaa aaagggaug gu 82

55 <210> 179
 <211> 59
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 179

55 uuggccuccu aagccaggga uuguggguuc gagucccacc cgggguaaag aaaggccga 59

<210> 180

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

5 <400> 180

uugguacuug gagagaggug guccguggcg cguucgcuu auuuauaggcg cacauuacac 60
 ggucgaccuc uuugcaguau cuaauc 86

10 <210> 181
 <211> 83
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 181

cugacuauug cuccccgcau ccccuagggc auugguguaa agcuggagac ccacugcccc 60
 aggugcugcu gggguugua guc 83

20 <210> 182
 <211> 95
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 182

25 <210> 183
 <211> 75
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 183

cucaucuguc uguugggucg gaggcagggc cuuugugaag gcggguggug cucagaucgc 60
 cucugggccc uuccuccagc cccgaggcgg auuca 95

35 <210> 184
 <211> 94
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 184

uggagugggg gggcaggagg ggcucagggg gaaagugcau acagccccug gcccucucug 60
 cccuuccguc ccug 75

45 <210> 185
 <211> 94
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 185

cuuuggcgau cacugccucu cugggcccugu gucuuaggcu cugcaagauc aaccgagcaa 60
 agcacacggc cugcagagag gcagcgcucu gccc 94

55 <210> 186
 <211> 94
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

gaguuugguu uuuguugggu uuguucuagg uauuggucca gggaucccag aucaaaccag 60
 gccccugggc cuauccuaga accaaccuaa gcuc 94

<400> 186

5 **uguuuugagc gggggucaag agcaauaacg aaaaauguuu gucauaaacc guuuuucauu 60**
auugcuccug accuccucuc auuugcuaua uuca 94

<210> 187
<211> 93
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 187

15 **guagucagua guuggggggu gggaacggcu ucauacagga guugaugcac aguuauccag 60**
cuccuauaug augccuuucu ucauuccccuu caa 93

<210> 188
<211> 67
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 188

25 **ucuccaacia uauccuggug cugagugaug acucaggcga cuccagcauc agugauuuug 60**
uugaaga 67

<210> 189
<211> 94
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 189

35 **cggggcggcc gcucucccug uccuccagga gcucacgugu gccugccugu gagcgccucg 60**
acgacagagc cggcgccugc cccagugucu gcgc 94

<210> 190
<211> 95
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

40 <400> 190

45 **uuguaccugg ugugauuaa aagcaaugag acugauuguc auaugucguu ugugggaucc 60**
gucucaguua cuuuauagcc auaccuggua ucuua 95

<210> 191
<211> 99
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

50 <400> 191

55 **gaaacugggc ucaaggugag gggugcuauc ugugauugag ggacaugguu aauggaauug 60**
ucucacacag aaaucgcacc cgucaccuug gccuacuua 99

<210> 192
<211> 77
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 192

	gcuuggggaca cauacuucuu uauaugccca uaugaaccug cuaagcuaug gaauguaaaag 60 aaguauguau uucaggc 77
5	<210> 193 <211> 72 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 193
10	ucagagcaca uacuucuuua uguacccaaua ugaacauuca gugcuaugga auguaaagaa 60 guauguauuu ug 72
15	<210> 194 <211> 88 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 194
20	ccaggcugag guaguaguuu guacaguuuug agggucuaug auaccacccg guacaggaga 60 uaacuguaca ggccacugcc uugccagg 88
25	<210> 195 <211> 85 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 195
30	cuggcugagg uaguaguuuug ugcuguuugu cggguuguga cauugcccgc uguggagaua 60 acugcgcaag cuacugccuu gcuag 85
35	<210> 196 <211> 103 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 196
40	aauggguucc uaggaagagg uaguagguug cauaguuuua gggcagagau uuugcccaca 60 aggaguuaac uauacgaccu gcugccuuuc uuagggccuu auu 103
45	<210> 197 <211> 94 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 197
50	uucacugugg gaugagguag uagguuguau aguuuuaggg ucacacccac cacugggaga 60 uaacuauaca aucuacuguc uuuccuaagg ugau 94
55	<210> 198 <211> 96 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 198
	cugcauguuc ccagguugag guaguagguu guauaguuuu gaguuacauc aagggagaua 60 acuguacagc cuccuagcuu uccuugggac uugcac 96

<210> 199
 <211> 85
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 199

 gcagggugag guaguagguu gugugguuuc agggcaguga uguugccccc ccgaagauaa 60
 cuauacaacc uacugccuuc ccuga 85
 10
 <210> 200
 <211> 94
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 200

 ugugugcauc cggguugagg uaguagguug uauuguuuag aguacacccc ugggaguuaa 60
 cuguacaacc uucugcuuu ccuuggagca cacu 94
 20
 <210> 201
 <211> 95
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 201

 acggccuuug gggugaggua guagguugua ugguuuuggg cucugccccg cucugcggua 60
 acuauacaau cuacugucu uccugaagug gccgc 95
 30
 <210> 202
 <211> 93
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 35
 <400> 202

 cgcgcccccc gggcugaggu aggagguugu auaguugagg aagacacccg aggagauac 60
 uauacggccu ccuagcuuuc cccaggcugc gcc 93
 40
 <210> 203
 <211> 89
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 45
 <400> 203

 aucagaguga gguaguagau uguauaguug uggguuagug auuuuacccu guuuaggaga 60
 uacuauaca aucuauugcc uucccugag 89
 50
 <210> 204
 <211> 83
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 55
 <400> 204

 ugugggauga gguaguagau uguauaguuu uagggucaua ccccaucuug gagauaacua 60
 uacagucuac ugucuuucc acg 83

<213> *Homo sapiens*

<400> 205

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

<210> 206

<211> 97

<212> ARN

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 206

15 ggucgggcca gccccguuug gaagacuagu gaaaauguug uugugucucu guauccaaca 60
acaaguccca gucugccaca uggugcuggu cauuuca 97

<210> 207

<211> 111

<212> ARN

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 207

25 aggagcggag uacgugagcc agugcuagu ggaagacuug ugaaaauguu guucugauau 60
gauaugacaa caagucacag ccagccucau agcguggacu ccuaucaccu u 111

<210> 208

<211> 72

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

30 <400> 208

guuguuauucu uugguuauucu agcuguauga guguauggu cuucauaaag cuagauaacc 60
gaaaguaaaa ac 72

<210> 209

<211> 89

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 209

40 cggggguuggu uguuauuuu gguuaucuag cuguaugagu gguguggagu cuucauaaag 60
cuagauaacc gaaaguaaaa auuacccca 89

<210> 210

<211> 90

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 210

50 ggaggcccggu uucucucuuu gguuaucuag cuguaugagu gccacagagc cgucuaaag 60
cuagauaacc gaaaguagaa augacucua 90

<210> 211

<211> 68

<212> ARN

55 <213> *Homo sapiens*

<400> 211

uauauacccu guagaaccga auuugugugg uaccacaua gucacagauu cgauucuagg 60
 ggaauaua 68

5 <210> 212
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 212

10 gaucugucug ucuucuguau auaccugua gaucgaaau uguguaagga auuuguggu 60
 caaaauucg uaucuagggg aaauuguagu ugacauaaac acuccgcua 110

15 <210> 213
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 213

20 gaccugucug ucuucuguau auaccugua gaucgaaau uguguaagga auuuguggu 60
 caaaauucg uaucuagggg aaauuguagu ugacauaaac acuccgcua 110

25 <210> 214
 <211> 64
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 214

30 cuguagcagc acaucauggu uuacauacua cagucaagau gcgaaucauu auuugcugcu 60
 cuag 64

35 <210> 215
 <211> 84
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 215

40 cccuuggagu aaaguagcag cacauaugg uuuguggaug uugaaaaggu gcaggccaau 60
 cugugcugcc ucaaaauaca agga 84

45 <210> 216
 <211> 93
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 216

50 augucagcgg ugccuuagca gcacguaaau auuggcguua agauucugaa auuaccucca 60
 guauugacug ugcugcugaa guaagguugg caa 93

55 <210> 217
 <211> 95
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 217

	caugcuuguu ccacucuagc agcacguaaa uauuggcgua gugaaauaaa uauuaaacac 60 caauauuuuu gugcugcuuu agugugacag ggaua 95
5	<210> 218 <211> 84 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 218
10	gucagaauaa ugucaaagug cuuacagugc agguagugau gugugcaucu acugcaguga 60 gggcacuugu agcauuauugc ugac 84
15	<210> 219 <211> 96 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 219
20	ugcgugcuuu uuguucuaag gugcaucuag ugcagauagu gaaguagacu agcaucuacu 60 gcccuaagug cuccuucugg cauaagaagu uauguc 96
25	<210> 220 <211> 84 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 220
30	acuuacgauu aguuuugcag auuugcaguu cagcguaauu gugaauauau ggcugugcaa 60 auccaugcaa aacugauugu gggga 84
35	<210> 221 <211> 82 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 221
40	gcagcccucu guuaguuuug cauaguugca cuacaagaag aauguaguug ugcaaaucua 60 ugcaaaacug augguggccu gc 82
45	<210> 222 <211> 87 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 222
50	cacuggucua ugguuaguuu ugcagguuug cauccagcug uauaaauuuc ugcugugcaa 60 auccaugcaa aacugacugu gguggug 87
55	<210> 223 <211> 107 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 223
	gugugaugug acagcuucug uagcacuaaa gugcuuauag ugcagguagu guguagccau 60 cuacugcauu acgagcacuu aaaguacugc cagcuguaga acuccag 107

<210> 224
 <211> 92
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 224

 uguaccaccu ugucggauag cuuauacagac ugauguugac uguugaaucu cauggcaaca 60
 gcagucgauug ggcugucuga cauuuuggua uc 92
 10
 <210> 225
 <211> 95
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 225

 accuggcuga gccgcaguag uucuucagug gcaagcuuua uguccugacc cagcuaaagc 60
 ugccaguuga agaacuguug cccucugccc cuggc 95
 20
 <210> 226
 <211> 74
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 226

 ggcugcuugg guuccuggca ugcugauuug ugacuugaga uuaaaauacac auugccaggg 60
 auuaccacgc aacc 74
 30
 <210> 227
 <211> 75
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 35
 <400> 227

 cggacggcug gggguuccugg ggaugggauu ugaugccagu cacaaauacac auugccaggg 60
 auuuccaacu gacct 75
 40
 <210> 228
 <211> 68
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 45
 <400> 228

 cuccggugcc uacugagcug auaucaguuc ucauuucaca cacuggcuca guucagcagg 60
 aacaggag 68
 50
 <210> 229
 <211> 107
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 55
 <400> 229

 gccucucucc gggcuuccgcc ucccuguccu acugagcuga aacaguugau uccagugcac 60
 uggcucaguu cagcaggaac aggaguccag ccccuagga gcuggca 107

<213> *Homo sapiens*

<400> 230

5 ggccaguguu gagaggcgga gacuugggca auugcuggac gcugcccugg gcauugcacu 60
 ugucucgguc ugacagugcc ggcc 84

<210> 231

<211> 90

<212> ARN

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 231

15 aaggccgugg ccucguuca gaaauccagg auaggcugug cagguccaa ggggccuauu 60
 cuugguuacu ugcacgggga cgcgggcccug 90

<210> 232

<211> 85

<212> ARN

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 232

25 ugcccgggac ccaguucaag uaaauccagg uagguugugg ugcugaccag ccuguucucc 60
 auuacuuggc ucgggggccc gugcc 85

<210> 233

<211> 84

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

30 <400> 233

 ggcugcggcu ggauucaagu aauccaggau aggcuguguc cguccaugag gccuguucuu 60
 gauuacuugu uucuggaggc agcg 84

<210> 234

<211> 73

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 234

40 aggugcagag cuuagcugau uggugaacag ugauugguuu ccgcuuuguu cacaguggcu 60
 aaguucugca ccu 73

<210> 235

<211> 87

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 235

50 uggccugagg agcagggcuu agcugcuugu gagcaagguc cacagcaaag ucguguucac 60
 aguggcuuag uuccgccccc uggaccc 87

<210> 236

<211> 86

<212> ARN

55 <213> *Homo sapiens*

<400> 236

ggucccuacc uucaaggagc ucacagucua uugaguugcc uuucugauuc ucccacuaga 60
 uugugagcug cuggagggca ggcacu 86

5 <210> 237
 <211> 71
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 237

aggaagcugg uuucauaugg ugguuuagau uuaauagug auugucuagc accauuugaa 60
 aucaguguuc u 71

15 <210> 238
 <211> 88
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 238

20 accccuuaga ggaugacuga uuucuuuugg uguucagagu caauagaauu uucuaagcacc 60
 aucugaaauc gguuauaug auugggga 88

25 <210> 239
 <211> 88
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 239

30 aucucuuaa caggcugacc gauuucuccu gguguucaga gucuguuuuu gucuagcacc 60
 auuugaaauc gguuauaug uaggggga 88

35 <210> 240
 <211> 81
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 240

40 cuucuggaag cugguuucac augguggcuu agauuuuucc aucuuuguau cuagcaccau 60
 uugaaaucag uguuuuagga g 81

45 <210> 241
 <211> 71
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 241

50 gcgacuguaa acauccucga cuggaagcug ugaagccaca aaugggcuuu cagucggau 60
 uuugcagcug c 71

55 <210> 242
 <211> 60
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 242

60 auguaaaca ccuacacuca gcugucauac augcguuggc uggaugugg auguuacgu 60

<210> 243

	<211> 64	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
5	<400> 243	
	cuguaaacaau ccuugacugg aagcuguaag guguugagag gagcuuucag ucggauguuu	60
	acag	64
10	<210> 244	
	<211> 89	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
15	<400> 244	
	accauguugu agugugugua aacauccuac acucucagcu gugagcucaa gguggcuggg	60
	agaggguguu uuacuccuuc ugccaugga	89
20	<210> 245	
	<211> 84	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
25	<400> 245	
	gagugacaga uauuguaaac auccuacacu cucagcugug aaaaguaaga aagcugggag	60
	aaggcuguuu acucucucug ccuu	84
30	<210> 246	
	<211> 82	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 246	
35	aagucugugu cuguaaacaau ccccgacugg aagcuguaag ccacagccaa gcuuucaguc	60
	agauguuugc ugcuacuggc uc	82
40	<210> 247	
	<211> 106	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 247	
45	ugcuccugua acucggaacu ggagaggagg caagaugcug gcuaugcugu ugaacugaga	60
	accugcuauug ccaacauauu gccaucuuuc cugucugaca gcagcu	106
50	<210> 248	
	<211> 70	
	<212> ARN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 248	
55	ggagauauug cacauuacua aguugcaugu ugucacggcc ucaaugcaau uuagugugug	60
	ugauauuuuc	70
	<210> 249	
	<211> 69	

<212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 249
 5
 cuguggugca uuguaguugc auugcauguu cuggcaauac cugugcaaug uuuccacagu 60
 gcaucacgg 69
 <210> 250
 <211> 77
 10
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 250
 15
 agucuaguua cuaggcagug uaguuagcug auugcuaaua guaccaauca cuaaccacac 60
 agccagguaa aaagacu 77
 <210> 251
 <211> 84
 20
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 251
 25
 gugcucgguu uguaggcagu gaaauuagcu gauuguagug cggugcugac aaucacuaac 60
 uccacugcca ucaaaacaag gcac 84
 <210> 252
 <211> 102
 30
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 252
 35
 ccagcuguga gaaauucuuu ggcagugucu uagcugguug uugugaguau uagcuaagga 60
 agcaaucagc aaguauacug ccuagaagu gcugcacauu gu 102
 <210> 253
 <211> 91
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 40
 <400> 253
 45
 ugcccauua uccacaggug gggauuggug gcauuacuug uguuagauau aaaguauugc 60
 acuugucccg gccugaggaa gaaagagggg u 91
 <210> 254
 <211> 80
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 50
 <400> 254
 55
 cuuucuaacac agguugggau uugucgcaau gcuguguuuc ucuguauggu auugcacuug 60
 ucccgccug uugaguugg 80
 <210> 255
 <211> 88
 <212> ARN

ES 2 503 740 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 255

5 agucaugggg gcuccaaagu gcuguucgug cagguagugu aaauaccuga ccuacugcug 60
 agcuagcacu ucccgagccc ccaggaca 88

<210> 256
 <211> 106
 <212> ARN
 10 <213> *Homo sapiens*

<400> 256

15 ccaguaccau cugcuuggcc gauuuuggca cuagcacauu uuugcuugug ucucuccgcu 60
 gugagcaauc auguguagug ccaauauggg aaaagcgggc ugcugc 106

<210> 257
 <211> 80
 <212> ARN
 20 <213> *Homo sapiens*

<400> 257

25 gugagguagu aaguuguauu guuguggggu agggauuuua ggccccagua agaagauaac 60
 uauacaaCUU acuacuuucc 80

<210> 258
 <211> 65
 <212> ARN
 30 <213> *Homo sapiens*

<400> 258

35 cauaaacCCg uagauccgau cuugugguga aguggaccgc gcaagcucgu uucuaugggu 60
 cugug 65

<210> 259
 <211> 70
 <212> ARN
 40 <213> *Homo sapiens*

<400> 259

45 ggcacccacc cguagaaccg accuugcggg gccuucgccg cacacaagcu cgugucugug 60
 gguccguguc 70

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

50 <400> 260

55 ccuguugcca caaacCCgua gauccgaacu ugugcugauu cugcacacaa gcuugugucu 60
 auagguaugu gucuguuagg 80

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

<400> 261
ucaguuaucagugcugau gcuguccauu cuaaagguac aguacuguga uacuga 57

5 <210> 262
<211> 97
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 262

aucugagacu gaacugcccu uuuucgguaa ucaugguacc gaugcuguag cucugaaagg 60
uacaguacug ugauagcuga agaauaggcg ugccauc 97

15 <210> 263
<211> 86
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 263

uucuuacugc ccucggcuuc uuuacagugc ugccuuguug cauauuggauc aagcagcauu 60
guacagggcu augaaggcau ugagac 86

25 <210> 264
<211> 86
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 264

gucuuacugc uuucagcuuc uuuacagugc ugccuuguag cauucagguc aagcagcauu 60
guacagggcu augaaagaac caagaa 86

35 <210> 265
<211> 65
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

40 <400> 265

augucaaagu gcuaacagug cagguagcuu uuugaguucu acugcagugc cagcacuucu 60
uacau 65

45 <210> 266
<211> 82
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

50 <400> 266

ccugcuggga cuaaagugcu gacagugcag auaguggucc ucucugugcu accgcacugu 60
ggguacuugc ugcuccagca gg 82

55 <210> 267
<211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 267

uucucugugc uuucagcuuc uuuacagugu ugccuugugg cauggaguuc aagcagcauu 60
guacagggcu aucaaagcac agagagc 87

<210> 268
 <211> 66
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 268
 agcuguggag ugugacaauug guguuugugu ccaaaccauc aaacgccauu aucacacuaa 60
 auagcu 66
 10
 <210> 269
 <211> 68
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 269
 cucugcgugu ucacagcgga ccuugauuuu augucuauac aaauaaggca cgcggugaau 60
 gccaagag 68
 20
 <210> 270
 <211> 85
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 270
 aggccucucu cuccguguuc acagcggacc uugauuuuuu uguccauaca auuaaggcac 60
 gcggugaauug ccaagaauug ggcug 85
 30
 <210> 271
 <211> 109
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 35
 <400> 271
 aucaagauga gagacucugc ucuccguguu cacagcggac cuugauuuuu ugucauacaa 60
 uuaaggcacg cggugaauug caagagcgga gccuacggcu gcacuugaa 109
 40
 <210> 272
 <211> 68
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 45
 <400> 272
 cugggucccu gagacccuuu aaccugugag gacguccagg gucacaggug agguucuugg 60
 gagccugg 68
 50
 <210> 273
 <211> 71
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 55
 <400> 273
 gccuaguccc ugagaccua acuugugagg uauuuuagua acaucacaag ucagguucuu 60
 gggaccuagg c 71

<213> *Homo sapiens*

<400> 274

5 **ugcgucuccc ucagucccug agācccuac uugugauguu uaccguuuā auccacgggu 60**
uaggcucuug ggagcug 77

<210> 275
 <211> 73
 <212> ARN
 10 <213> *Homo sapiens*

<400> 275

15 **ugacagcaca uuauuacuuu ugguacgcgc ugugacacuu caaacucgua ccgugaguāā 60**
uaaugcgcgg uca 73

<210> 276
 <211> 70
 <212> ARN
 20 <213> *Homo sapiens*

<400> 276

25 **ccagccugcu gaagcucaga gggcucugau ucagaaagau caucggaucc gucugagcuu 60**
ggcuggucgg 70

<210> 277
 <211> 70
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 277

35 **guuggauucg gggccguagc acugucugag agguuuacau uucucacagu gaaccggucu 60**
cuuuuucagc 70

<210> 278
 <211> 76
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 278

40 **cagugggaag gggggccgau gcacuguaag agagugagua gcaggucuca cagugaaccg 60**
gucucuūūcc cuacug 76

<210> 279
 <211> 73
 <212> ARN
 45 <213> *Homo sapiens*

<400> 279

50 **uggaucuuuu ugcggucugg gcuugcuguu cucucgacag uagucaggāā gcccuuaccc 60**
cāāāāaguāu cua 73

<210> 280
 <211> 90
 <212> ARN
 55 <213> *Homo sapiens*

<400> 280

ugccuuucgc gaauuuuuu gcggucuggg cuugcuguac auaacucaau agccggaagc 60
ccuuacccca aaaagcauuc gcggagggcg 90

5 <210> 281
<211> 64
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 281

gagcucuuiu cacauugugc uacugucuaa cguguaccga gcagugcaau guuaaaaggg 60
cauc 64

15 <210> 282
<211> 82
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 282

20 ggcuuguugg acacucuuc ccuguugcac uacugugggc cucugggaag cagugcaaug 60
augaaagggc aucugucggg cc 82

25 <210> 283
<211> 66
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 283

30 gggcaaccgu ggcuuucgau uguuacugug ggaaccggag guaacagucu acagccaugg 60
ucgccc 66

35 <210> 284
<211> 68
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 284

40 gcuaaagcug guaaaaugga accaaaucgc cucuucaaug gauuuggucc ccuucaccca 60
gcuguagc 68

45 <210> 285
<211> 104
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 285

50 agaagccaaa ugcuuugcug aagcugguaa aauggaacca aaucagcugu uggauggauu 60
ugguucccuu caaccagcug uagcugcgca uugaucacgc cgca 104

55 <210> 286
<211> 119
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 286

ccuccaaagg gaguggcccc cugcucuggc uggucaaagc gaaccaaguc cgucuuccug 60
agagguuugg ucccuucaaa ccagcuacag cagggcuggc aaagcucaau auuuggaga 119

5 <210> 287
 <211> 71
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 287
 10 **agggugugug acugguugac cagaggggcg ugcacucugu ucaccugug ggccaccuag 60**
ucaccaaccc u 71
 <210> 288
 <211> 90
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 288
 20 **agggcucacu guucucuaug gcuuuuuuuu ccuaugugau ucuauugcuc gcucauauag 60**
ggauuggagc cguggcguac ggugaggaua 90
 <210> 289
 <211> 97
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 289
 30 **cgucucugcug uggccuaugg cuuuuucuuu cuauugugau gcugcuccga acucauguag 60**
ggcuaaaagc caugggcuac agugaggggc aagcucc 97
 <210> 290
 <211> 100
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 290
 40 **agauaaaauuc acucuagugc uuuauggcuu uuuaauuccua ugugaucgua auaaagucuc 60**
auguagggau ggaagccaug aaauacauug ugaaaauuca 100
 <210> 291
 <211> 62
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 45 <400> 291
 50 **gaggacucca uuuguuuuga ugauggauuc uuaagcucca ucaucgucuc aaaugagucu 60**
uc 62
 <210> 292
 <211> 73
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 55 <400> 292
 60 **cuucggugac ggguaauucu ggguggauaa uacggauuac guuguuauug cuuaagaaua 60**
cgcguagucg agg 73
 <210> 293
 <211> 71

ES 2 503 740 T3

<212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 293
 5
 cagcuggugu ugugaaucag gccgacgagc agcgcauccu cuuacccggc uauuucacga 60
 caccaggguu g 71
 <210> 294
 <211> 99
 10
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 294
 15
 cucuagcaug guguuguggg acagcuggug uugugaauca ggccguugcc aaucagagaa 60
 cgguacuuc acaacaccag ggccacacug cacugcaag 99
 <210> 295
 <211> 68
 20
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 295
 25
 guguaauucua cagugcacgu gucuccagug uggcucggag gcuggagacg cggcccuguu 60
 ggaguaac 68
 <210> 296
 <211> 70
 30
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 296
 35
 ccugccagug guuuuacccu augguagguu acgucaugcu guucuaccac aggguagaac 60
 cacggacagg 70
 <210> 297
 <211> 72
 40
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 297
 45
 ggguccaucu uccagugcag uguuggaugg uugaaguaug aagcuccuaa cacugucugg 60
 uaaagauggc cc 72
 <210> 298
 <211> 64
 50
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 298
 55
 acccauaaag uagaaagcac uacuaacagc acuggagggg guaguguuuc cuacuuuau 60
 gaug 64
 <210> 299
 <211> 63
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

	<400> 299	
	ccugaggugc agugcugcau cucuggucag uugggagucu gagaugaagc acuguagcuc	60
	agg	63
5	<210> 300 <211> 66 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<400> 300	
	ggcuggggaua ucaucauaua cuguaaguuu gugaugagac acuacaguau agaugaugua	60
	cuaguc	66
15	<210> 301 <211> 70 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<400> 301	
	cucacgggucc aguuuuucca ggaaucuccuu ggaugcuaag auggggauuc cuggaaauac	60
	uguucuugag	70
25	<210> 302 <211> 65 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 302	
30	agcucugaga acugaauucc augggguaua ucaaugucag accugugaaa uucaguucuu	60
	cagcu	65
35	<210> 303 <211> 99 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 303	
40	agccaguuuug gucuuuugag acaaaguucu gagacacucc gacucugagu augauagaag	60
	ucagugcacu acagaacuuu gucucuagag gcugugguc	99
45	<210> 304 <211> 66 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 304	
	ggcucuggcu ccgugucuuc acucccgugu uuguccgagg agggagggag ggacgggggc	60
	ggugcu	66
50	<210> 305 <211> 65 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
55	<400> 305	

	cccugucucc caacccuugu accagugcug ugccucagac ccugguacag gccuggggga uaggg	60 65
5	<210> 306 <211> 68 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 306	
10	ccugcccucg aggagcucac agucuaguau gucuuccucc uacuagacug aggcuccuug aggacagg	60 68
15	<210> 307 <211> 73 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 307	
20	ccgggccuag guucugugau acacuccgac ucgggcucug gagcagucag ugcaugacag aacuugggcc cgg	60 73
25	<210> 308 <211> 69 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 308	
30	cggugucauu uuugugacgu ugcagcuagu aaauagagcc caguugcaua gucacaaaag ugaucuuug	60 69
35	<210> 309 <211> 66 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 309	
40	gaagauaggu uauccguguu gccuucgcuu uauucgugac gaaucauaca cgguugaccu auuuuu	60 66
45	<210> 310 <211> 65 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 310	
50	cuguuaaugc uauuugugau agggguuuug gccucugacu gacuccuacc uguuagcauu aacag	60 65
55	<210> 311 <211> 76 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 311	
	ccauggaaca uucaacgcug ucggugaguu ugggauucaa aaacaaaaaa accaccgacc guugacugua ccuugg	60 76

<210> 312
 <211> 80
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 312
 aggucacaau caacauucau ugcugucggu ggguuugaacu guguagaaaa gcucacugaa 60
 caaugaauugc aacuguggcc 80
 10
 <210> 313
 <211> 89
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 313
 gccaaaggguu ugggggaaca uucaaccugu cggugaguuu gggcagcuca gacaaaccuau 60
 cgaccguuga guggaccccg aggccugga 89
 20
 <210> 314
 <211> 89
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 314
 uugauggcug cacucaacau ucauugcugu cgguggguuu gaaugucaac caacucacug 60
 aucaaugaau gcaaacugcg ggccaaaaa 89
 30
 <210> 315
 <211> 75
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 315
 35
 accauuuuug gcaaugguag aacucacacc gguaagguua ugggaccccg ugguucuaga 60
 cuugccaacu auggu 75
 40
 <210> 316
 <211> 70
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 316
 45
 cuguguaugg cacugguaga auucacugug aacagucuca gucagugaau uaccgaaggg 60
 ccuaaaacag 70
 50
 <210> 317
 <211> 69
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 317
 55
 ccuuuccuua ucacuuuucc agccagcuuu gugacucuua guguuggacg gagaacugau 60
 aaggguaagg 69

<213> *Homo sapiens*

<400> 318

5 **agggauugga gagaaaggca guuccugaug guccccuccc aggggcuggc uuuccucugg 60**
 uccuu 65

<210> 319

<211> 71

<212> ARN

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 319

15 **acuuuccaaa gaauucuccu uuugggcuuu cucauuuuau uuuaagcccu aaggugaauu 60**
 uuuugggaag u 71

<210> 320

<211> 61

<212> ARN

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 320

25 **ucaggcuaca acacaggacc cgggcgcugc ucugaccccu cgugucuugu guugcagccg 60**
 g 61

<210> 321

<211> 68

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

30 <400> 321

ucucacaucc cuugcauggu ggaggugag cucucugaaa accccuccca caugcagggg 60
 uugcagga 68

<210> 322

<211> 67

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 322

40 **cugugugaua uguuugauau auuagguugu uauuuauucc aacuaauau caagcavauu 60**
 ccuacag 67

<210> 323

<211> 74

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 323

50 **agcgggcaac ggaaucccaa aagcagcugu ugucuccaga gcauuccagc ugcacuugga 60**
 uuucguuccc ugcu 74

<210> 324

<211> 89

<212> ARN

55 <213> *Homo sapiens*

<400> 324

cgugcacagg gcucugaccu augaaugac agccaguacu cuuucucuc cucuggcugc 60
caauuccaau ggucacaggu auguacac 89

5 <210> 325
<211> 66
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 325

gagagcuggg ucuuugcggg caagaugaga gugucaguuc aacuggccua caaagucca 60
guccuc 66

15 <210> 326
<211> 67
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 326

20 aucgggugua acagcaacuc cauguggacu gugcucggau uccaguggag cugcuguuac 60
uucugau 67

25 <210> 327
<211> 86
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 327

30 guggcuucca ccucuguaa cagcaacucc auguggaagu gccacuggu uccaguggg 60
cugcuguuau cugggguggc ggcua 86

35 <210> 328
<211> 58
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 328
uagcagcaca gaaauauugg cauggggaag ugagucugcc aauauuggcu gugcugcu 58

40 <210> 329
<211> 102
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

45 <400> 329

ugagccggga cuguugagug aaguagguag uucauguug uugggccugg cuuucugaac 60
acaacgacau caaaccaccu gauucauggc aguucugcu uc 102

50 <210> 330
<211> 85
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 330

55 agcugaucug uggcuuaggu aguuucaugu uguugggauu gaguuuugaa cucggcaaca 60
agaaacugcc ugaguuaacau caguc 85

<210> 331

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

5 <400> 331

gccaucccag uguucagacu accuguucag gaggcuggga cauguacagu agucugcaca 60
 uugguuaggc 70

10 <210> 332
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 332

uggaagcuuc aggagauccu gcuccgucgc cccaguguuc agacuaccug uucaggacaa 60
 ugccguugua caguagucug cacauugguu agacugggca agggccagca 110

20 <210> 333
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 333

ccagaggaua ccuccacucc gucuacccag uguuuagacu accuguucag gacucccaaa 60
 uuguacagua gucugcacau ugguuaggcu gggcuggguu agaccucgg 110

30 <210> 334
 <211> 70
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 334

gccguggcca ucuuacuggg cagcauugga uagugucuga ucucuaauac ugccugguaa 60
 ugaugacggc 70

40 <210> 335
 <211> 90
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 335

cuggggccucu gugggcaucu uaccggacag ugcuggauuu cuuggcuuga cucuaacacu 60
 gucugguaac gauguucaa ggugacccac 90

50 <210> 336
 <211> 69
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

55 <400> 336

cccucgucuu acccagcagu guuugggugc ugguugggag ucucuaauac ugccggguuaa 60
 ugauggagg 69

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

	<400> 337	
5	uaccuuacuc aguaaggcau uguucuucua uauuaauaaa ugaacagugc cuuucugugu agggua	60 66
	<210> 338 <211> 72 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<400> 338	
	guuccuuuuu ccuaugcaua uacuucuuug uggaucuggu cuaaagaggu auagcgcaug ggaagaugga gc	60 72
15	<210> 339 <211> 76 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<400> 339	
	gccuggucca gugguucuuug acaguucaac aguucuguag cacaauugug aaauguuuag gaccacuaga cccggc	60 76
25	<210> 340 <211> 68 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
30	<400> 340	
	uggacuuccc uuugucaucc uaugccugag aauauaugaa ggaggcuggg aaggcaaagg gacguuca	60 68
35	<210> 341 <211> 68 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 341	
40	cucuuguccu ucauuccacc ggagucuguc uuaugccaac cagauuucag uggagugaag cucaggag	60 68
45	<210> 342 <211> 73 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 342	
50	ccaggccaca ugcuucuuua uauccucaua gauaucucag cacuauggaa uguaaggaag ugugugguuu ugg	60 73
55	<210> 343 <211> 79 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 343	

aaggcagggg ugaggggug cgggaggagc cgggcggagg cugcggcuug cgcuuuccu 60
ggcucuccuc ccucucuuu 79

<210> 344
<211> 83
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 344

uuccuuugac gggugagcuu uuggcccggg uuauaccuga cacucacgua uaagacgagc 60
aaaaagcuug uuggucagag gag 83

<210> 345
<211> 110
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 345

ccggggcagu ccuuccaggc ucaggacagc cacugcccac cgcacacugc guugcuccgg 60
accacugug cgugugacag cggcugaucu gucccugggc agcgcgaacc 110

<210> 346
<211> 106
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 346

cugcuuggac cugugaccug ugggcuuccc uuugucaucc uuugccuagg ccucugagug 60
aggcaaggac agcaaagggg ggcucagugg ucaccucuac ugcaga 106

<210> 347
<211> 91
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 347

gggcagcgcg ccggcaccuu ggcucuagac ugcuuacugc ccgggccgcc uucaguaaca 60
gucuccaguc acggccaccg acgccuggcc c 91

<210> 348
<211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 348

gguugcuuca gugaacauuc aacgcugucg gugaguugg aaaucaaaau aaaaccaucg 60
accguugauu guaccuaua gcuaacc 87

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

<400> 349

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

<210> 350
 <211> 112
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 350

 agcucucagc aucaacggug uacaggagaa ugaccuauga uuugacagac cgugcagcug 60
 uguaugucug ucauucugua ggccaauauu cuguauguca cugcuacuua aa 112
 10
 <210> 351
 <211> 72
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 351

 uugguuuaau cucagcuggc aacugugaga ugucccuauc auuccucaca guggucucug 60
 ggauuaugcu aa 72
 20
 <210> 352
 <211> 108
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 352

 aaacauaguc auuacaguuu uugauguugc agauacugca ucaggaacug acuggauaag 60
 acuuaauccc caucaguucc uaaugcauug ccuucagcau cuaaacaa 108
 30
 <210> 353
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 35
 <400> 353

 gaccaguugc cgcggggcuu uccuuugugc uugaucuaac cauguggugg aacgauggaa 60
 acggaacaug guucugucaaa gcaccgcgga aagcaucgcu cucuccugca 110
 40
 <210> 354
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 45
 <400> 354

 ccgucccggg ccgcggcucc ugauugucca aacgcaauuc ucgagucucu ggcuccggcc 60
 gagauugcg ucuggacguc ccgagccgcc gcccccaaac cucgaggggg 110
 50
 <210> 355
 <211> 97
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 55
 <400> 355

 acucagggggc uucgccacug auuguccaaa cgcaauucuu guacgagucu gcggccaacc 60
 gagaauugug gcuggacauc ugugguugag cuccggg 97

<213> *Homo sapiens*

<400> 356

5 auccagggucu ggggcaugaa ccuggcauac aauguagauu ucuguguuug uuaggcaaca 60
 gcuacauugu cugcuggguu ucaggcuacc uggaa 95

<210> 357
 <211> 79
 <212> ARN
 10 <213> *Homo sapiens*

<400> 357

15 cccucagugg cucaguagcc aguguagauc cugucuuugg uaaucagcag cuacaucugg 60
 cuacuggguc ucugguggc 79

<210> 358
 <211> 110
 <212> ARN
 20 <213> *Homo sapiens*

<400> 358

25 ucuggccauc ugcaguguca cgcuccgugu auuugacaag cugaguugga cacucugugu 60
 gguagagugu caguuuguca aauaccccaa guguggcuca ugccuaucag 110

<210> 359
 <211> 82
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

30 <400> 359

35 gggcuuuuaa gucacuagug guuccguuaa guagaugguu ugugcauugu uucaaaaugg 60
 ugcccuagug acuacaaagc cc 82

<210> 360
 <211> 83
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 360

40 cucaucuugc gguacuaaa cuaugggggc acuuuuuuuu uucuuuaaaa agugccgccu 60
 aguuuuaagc cccgccgguu gag 83

<210> 361
 <211> 82
 <212> ARN
 45 <213> *Homo sapiens*

<400> 361

50 ccuauguagc ggccauaaa guggaggccc ucucuugagc cugaaugaga aagugcuucc 60
 acuuugugug ccacugcaug gg 82

<210> 362
 <211> 82
 <212> ARN
 55 <213> *Homo sapiens*

<400> 362

cagccuguga uacucaaa cu gggggcucu uuggauuuuc aucggaagaa aagugccgcc 60
agguuuugag ugucaccggu ug 82

5 <210> 363
<211> 80
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 363

uucaaucugu gguacucaaa cugugugaca uuuuguucuu uguaagaagu gccgcagagu 60
uuguaguguu gccgauugag 80

15 <210> 364
<211> 84
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 364

uuccauauag ccuacucuaa aauggaggcc cuaucuaagc uuuuaagugg aaagugcuuc 60
ccuuuugugu guugccaugu ggag 84

25 <210> 365
<211> 69
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 365

ggugagacuc aaaugugggg cacacuucug gacugucacu agaaagugcu acuacuuuug 60
agucucucc 69

35 <210> 366
<211> 79
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

40 <400> 366

gggccuuuuc ggagggcccc ccucaaacc uguugugcuc gcuucagagg guugggugga 60
ggcucuccug aaggugucc 79

45 <210> 367
<211> 76
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

50 <400> 367

auauguau auguauau gugugcaugu gcaugugcau guaugcauau ugauguaua 60
uauuaucau acaugu 76

55 <210> 368
<211> 64
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

60 <400> 368

uguauugca ugcauauug cucaugugug uguacaugua ugugugcaug ugcauguaua 60
uauug 64

5 <210> 369
 <211> 82
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 369
 ccaggccuuu ggcagaggag ggcuguucuu cccuugagu uuaugacugg gaggaacuag 60
 ccuucucuca gcuuaggagu gg 82
 10 <210> 370
 <211> 63
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 370
 aagaaauggu uuaccguccc acauacauuu ugaguaugua ugugggacgg uaaaccgcuu 60
 cuu 63
 20 <210> 371
 <211> 79
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 371
 guacuugaa gagagguuau ccuugugug uuugcuuac gcgaaaugaa uaugcaaggg 60
 caagcucucu ucgaggagc 79
 30 <210> 372
 <211> 86
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 372
 ccugcuaacg gcugcucuga cuuuauugca cuacuguacu uuacagcgag cagugcaaua 60
 guauuguca agcauccgcg agcagg 86
 40 <210> 373
 <211> 69
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 373
 45 ccaccacuua aacgugguug uacuugcuuu agaccuaaga aaguaagugc uucauguuu 60
 uggugaugg 69
 50 <210> 374
 <211> 82
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 374
 55 gccucgccgc ccuccgccuu cucuucccg g uucuuucccg agucgggaaa agcuggguug 60
 agagggcgaa aaaggaugug gg 82
 <210> 375
 <211> 59

<212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 375
 5 uggccuccu aagccaggga uuguggguuc gagucccacc cgggguaaug agguguuuu 59

 <210> 376
 <211> 86
 <212> ARN
 10 <213> *Homo sapiens*

 <400> 376

 uugguacuug gagagaggug guccguggcg cguucgcuuc auuuauaggcg cacauuacac 60
 ggucgaccuc uuugcgguau cuaauc 86
 15
 <210> 377
 <211> 89
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 20
 <400> 377

 aacugacuau gccuccucgc aucccuagg gcauuggugu aaagcuggag acccacugcc 60
 ccaggugcug cuggggguug uagucugac 89
 25
 <210> 378
 <211> 98
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 30
 <400> 378

 auauagugcu ugguccuag uaggugcuca guaaguguuu gugacauaau ucguuuauug 60
 agcaccuccu aucaaucaag cacugugcua ggcucugg 98
 35
 <210> 379
 <211> 95
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 40
 <400> 379

 cucaucuguc uguugggcug ggggcagggc cuuugugaag gcggguuauug cucagaucgc 60
 cucugggccc uuccuccagu cccgaggcag auuuu 95
 45
 <210> 380
 <211> 97
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 380

 cugucucgga gccuggggca ggggggcagg aggggcucag ggagaaagua ucuacagccc 60
 cuggcccuu uugcccuucc gucccuguc cccaagu 97
 50
 <210> 381
 <211> 97
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 55
 <400> 381

uguuucgcuuc ugguaccgga agagagguuu ucugggucuc uguuucuuug augagaauga 60
 aacacaccca gcuaaccuuu uuuucaguau caaaucc 97

<210> 382
 <211> 98
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 382

5

gacccuuugg cgaucucugc cucucugggc cugugucuua ggcucucaa gauccaacga 60
 gcaaagcaca gggccugcag agagguagcg cucugcuc 98

10

<210> 383
 <211> 96
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 383

15

gagucugguu uuguuugggu uuguucuagg uaugguccca gggaucccag aucaaaccag 60
 gccccugggc cuauccuaga accaaccuaa acccgu 96

20

<210> 384
 <211> 97
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 384

25

caguguagug agaaguuggg gggugggaac ggcgucaugc aggaguugau ugcacagcca 60
 uucagcuccu auaugaugcc uuucuucacc cccuua 97

30

<210> 385
 <211> 98
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 385

35

caacgcugca caggccgucc uccccaacaa uauccuggug cugagugggu gcacagugac 60
 uccagcauca gugauuuugu ugaagagggc agcugcca 98

40

<210> 386
 <211> 96
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 386

45

acgggguggc cacuaucccu guccuccagg agcucacgua ugccugccug ugagcgccuc 60
 ggcgacagag ccggugucca cccugcacu guccac 96

50

<210> 387
 <211> 98
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 387

55

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

<210> 388
 <211> 96
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 388

 aaaaugauga ugucaguugg ccggucggcc gaucgcucgg ucugucaguc agucggucgg 60
 ucgaucgguc ggucggucag ucggcuuccu gucuuc 96
 10
 <210> 389
 <211> 99
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 389

 gaaaaugggc ucaaggugag gggugcuauc ugugauugag ggacaugguc aauggaauug 60
 ucucacacag aaaucgcacc cgucaccuug gccucguga 99
 20
 <210> 390
 <211> 95
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 390

 cugcagccag gguuuuuacc agucagggcuc cuggcuagau uccagguacc agcugguacc 60
 ugaucuaagg aaagccugac uguaagcccu gaaca 95
 30
 <210> 391
 <211> 96
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 35
 <400> 391

 acccaagucc aggccugcug accccuaguc cagugcuugu gguggcuacu gggcccugaa 60
 cuaggggucg ggagaccugg guuugaucuc cacagg 96
 40
 <210> 392
 <211> 98
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 45
 <400> 392

 ucuguguugg gcgucugucu gcccagaguc cugccucucu guugcucuga aggaggcagg 60
 ggcugggccu gcagcugccu gggcagagcu gcuccuuc 99
 50
 <210> 393
 <211> 99
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 55
 <400> 393

 agaugccuug cuccuacaag aguaaagugc augcgcuuug ggacagugag gaaaauaaug 60
 uucacaaagc ccuacacuu ucacccuuua ggagaguug 99

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 394

5 ugggcuccua ggaagaggua guagguugca uaguuuuagg gcagagauuu ugcccacaag 60
 gaguaaacia uacgaccugc ugccuuucuu agggccuu 98

<210> 395

<211> 97

<212> ARN

10 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 395

15 uguuggccua guucugugug gaagacuagu gaaaauguug uuuuuagaua acuaagacga 60
 caacaaauca cagucugcca uauggcacag gccaccu 97

<210> 396

<211> 94

<212> ARN

20 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 396

25 uucacugugg gaugagguag uagguuguau aguuuuaggg ucacaccac cacugggaga 60
 uaacuaauaca aucuacuguc uuuccuaagg ugau 94

<210> 397

<211> 96

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

30 <400> 397

 cggcaugcuc ccaggcugag guaguagguu guauaguuaa gaguacaac aaggagaua 60
 acuguacagc cuccuagcuu uccuugggac uugcac 96

<210> 398

35 <211> 85

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 398

40 gcggggugag guaguagguu gugugguuuc agggcaguga ugucgccccu ccgaagauaa 60
 cuauacaacc uacugccuuc ccuga 85

<210> 399

<211> 94

45 <212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 399

50 ugugugcauc cggguugagg uaguagguug uaugguuuag aguuacaccc ugaggauaa 60
 cuguacaacc uucuaagcuu ccuuggagca cacu 94

<210> 400

<211> 95

<212> ARN

55 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 400

acggccuuug gggugaggua guagguugua ugguuuuggg cucugccccg cucugcggua 60
acuauacaau cuacugucu uccugaagug gccgc 95

5 <210> 401
<211> 93
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 401

10 cgcgcccccc gggcugaggu aggagguugu auaguugagg aagacacccg aggagauac 60
uauacggccu ccuagcuuuc cccaggcugc gcc 93

15 <210> 402
<211> 89
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 402

20 aucagaguga gguaguagau uguauaguug ugguuguagug auuuuacccu guuuaggaga 60
uaacuauaca aucuauugcc uuuccugag 89

25 <210> 403
<211> 83
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 403

30 ugugggauga gguaguagau uguauaguuu uagggucaua ccccaucuug gagauaacua 60
uacagucuac ugucuuuccc acg 83

35 <210> 404
<211> 85
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 404

40 cuggcugagg uaguaguug ugcuguuggu cggguuguga cauugcccg cuggagaua 60
acugcgcaag cuacugccu gcuag 85

45 <210> 405
<211> 95
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 405

50 ggacagacca gccugucug gaagacuagu gauuuuguug uugugucugu guccaacaac 60
aagucccagu cugccacaug gugguuguca cauca 95

55 <210> 406
<211> 110
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 406

aggccagaac acaugagcca augcuauug gaagacuugu gauuuuguug uucugauaug 60
auaugacaac aagucacagc cagccucaua gaguggacuc ccaucaccu 110

<210> 407
 <211> 89
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 407

5
 cgggguuggu uguuauuuu gguuauauag cuguauagu gguguggagu cuuauaaaag 60
 cuagauaacc gaaaguaaaa auuacccca 89

10
 <210> 408
 <211> 90
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

15
 <400> 408

ggaggcccg uucucuuuu gguuauauag cuguauagu gccacagagc cuuauaaaag 60
 cuagauaacc gaaaguagaa augacucuaa 90

20
 <210> 409
 <211> 87
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

25
 <400> 409

ggaagcgagu uguuauuuu gguuauauag cuguauagu guauuggucu uauaaaagcu 60
 agauaaccga aaguaaaaac uccuua 87

30
 <210> 410
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

35
 <400> 410

gaccugucug ucuucuguau auaccugua gaucggaauu uguguaagga auuuuguggu 60
 cacaauucg uauauagggg aauauguagu ugacauaaac acuccgcua 110

40
 <210> 411
 <211> 109
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 411

45
 ccaaaguugu aacguugucu auauauaccg uguagaaccg aauuugugug guaccacau 60
 agucacagau ucgauucua ggaauauau ggucgaugca aaaacuua 109

50
 <210> 412
 <211> 98
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 412

55
 uuggaaccuu aaaguacugu agcagcacau caugguuuac auacuacagu caaugcgca 60
 auauuuuuu gcugcucuag aaauuuuagg aaauucau 98

<210> 413
 <211> 95

<212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 413
 5
 cauacuuguu ccgcucuagc agcacguaaa uauuggcgua gugaaauaaa uauuaaacac 60
 caauauuuuu gugcugcuuu agugugacag ggaua 95
 <210> 414
 <211> 84
 10
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 414
 15
 gucaggauaa ugucaaagug cuuacagugc agguaguggu gugugcaucu acugcaguga 60
 aggcacuugu ggcauugugc ugac 84
 <210> 415
 <211> 96
 20
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 415
 25
 ugcgugcuuu uuguucuaag gugcaucuag ugcagauagu gaaguagacu agcaucuacu 60
 gcccuaagug cuccuucugg cauaagaagu uauguc 96
 <210> 416
 <211> 87
 30
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 416
 35
 cacuggucua ugguuaguuu ugcagguuug cauccagcug uauaauuuuc ugcugugcaa 60
 auccaugcaa aacugacugu gguggug 87
 <210> 417
 <211> 96
 40
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 417
 45
 acauugcuac uuacgguuag uuuugcagau uugcaguuca gcguauaugu ggauauaugg 60
 cugugcaau ccaugcaaaa cugauuguga ugaugu 96
 <210> 418
 <211> 82
 50
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 418
 55
 gcagcccucu guucguuuug cauaguugca cuacaagaag aauguaguug ugcaaaucua 60
 ugcaaaacug augguggccu gc 82
 <210> 419
 <211> 85
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

	<400> 419	
	cagcuucugu agcacuaaag ugcuuauagu gcagguagug ugucgucauc uacugcauua 60	
	cgagcacuua caguacugcc agcug 85	
5	<210> 420	
	<211> 92	
	<212> ARN	
	<213> <i>Rattus norvegicus</i>	
10	<400> 420	
	uguaccaccu ugucggguag cuuauacagac ugauguugac uguugaauuc cauggcaaca 60	
	gcagucgaug ggcugucuga cauuuuggua uc 92	
15	<210> 421	
	<211> 95	
	<212> ARN	
	<213> <i>Rattus norvegicus</i>	
20	<400> 421	
	accuggcuga gccgcaguag uucuucagug gcaagcuua uguccugacc cagcuaaagc 60	
	ugccaguuga agaacuguug cccucugcca cuggc 95	
25	<210> 422	
	<211> 75	
	<212> ARN	
	<213> <i>Rattus norvegicus</i>	
30	<400> 422	
	cggccggcug gggguuccug ggaugggauu ugaugccagu cacaaucac auugccaggg 60	
	auuuccaacu gaccc 75	
35	<210> 423	
	<211> 97	
	<212> ARN	
	<213> <i>Rattus norvegicus</i>	
40	<400> 423	
	cucaccugcu cuggcugcuu gggguuccug caugcugauu ugugacuuga gauuaaaauc 60	
	acauugccag ggauuaccac gcaaccauga ccuuggc 97	
45	<210> 424	
	<211> 68	
	<212> ARN	
	<213> <i>Rattus norvegicus</i>	
50	<400> 424	
	cuccggugcc uacugagcug auaucaguuc ucauuucaca cacuggcuca guucagcagg 60	
	aacaggag 68	
55	<210> 425	
	<211> 108	
	<212> ARN	
	<213> <i>Rattus norvegicus</i>	
55	<400> 425	

gccucuccu gggcuccgcc uccugugccu acugagcuga aacaguugau uccagugcac 60
 uggcucaguu cagcaggaac aggaguccag cccccaauagg agcuggca 108

<210> 426
 <211> 84
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 426

5

10

ggcaguguu gagaggcgga gacacgggca auugcuggac gcugcccugg gcauugcacu 60
 ugucucgguc ugacagugcc ggcc 84

<210> 427
 <211> 90
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 427

15

20

aaggccgugg ccuuguucaa guaauccagg auaggcugug caggucccaa ggggccuauu 60
 cuugguuacu ugcacgggga cgcggggccug 90

<210> 428
 <211> 85
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 428

25

30

ugcccgggac ccaguucaag uaauucagga uagguugugg ugcuggccag ccuguucucc 60
 auuacuuggc ucggggggccg gugcc 85

<210> 429
 <211> 97
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 429

35

40

accucucuaa caaggugcag agcuuagcug auuggugaac agugauuggu uuccgcuuug 60
 uuacagugg cuaaguucug caccugaaga gaaggug 97

<210> 430
 <211> 87
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 430

45

uggccugugg agcagggcuu agcugcuugu gagcaagguc uacagcaaag ucguguucac 60
 aguggcuuag uuccgcccc uggaccc 87

<210> 431
 <211> 86
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 431

50

55

ggucccuacc cgcaaggagc ucacagucua uugaguuccu uuucugauuc ucccacuaga 60
 uuugagagcuc cuggagggca ggcacu 86

<210> 432
 <211> 81
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 5
 <400> 432

 cuucuggaag cugguuucac augguggcuu agauuuuucc aucuuuguau cuagcaccau 60
 uugaaaucag uguuuuagga g 81
 10
 <210> 433
 <211> 88
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 15
 <400> 433

 accccuuaga ggaugacuga uuucuuuugg uguucagagu caauagaauu uucuaagcacc 60
 aucugaaauc gguuauaaug auugggga 88
 20
 <210> 434
 <211> 81
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 25
 <400> 434

 cuucaggaag cugguuucau auggugguuu agauuuuuuu agugauuguc uagcaccuuu 60
 ugaaucagu guucuuggug g 81
 30
 <210> 435
 <211> 88
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 35
 <400> 435

 aucucuuaa caggcugacc gauuucuccu gguguucaga gucuguuuuu gucuagcacc 60
 auuugaaauc gguuauaug uaggggga 88
 40
 <210> 436
 <211> 89
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 45
 <400> 436

 accauguugu agugugugua aacaucuuac acucucagcu gugagcucaa gguggcuggg 60
 agagggguugu uuacuccuuc ugccaugga 89
 50
 <210> 437
 <211> 64
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 55
 <400> 437

 cuguaaaacau ccuugacugg aagcuguaag guguuagag gagcuuucag ucggauguuu 60
 acag 64

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 438

5 ccgaguuuca guucauguaa acauccuaca cucagcuguc auacaugagu uggcugggau 60
 guggauguuu acgucagcug ucuugga 87

<210> 439

<211> 82

<212> ARN

10 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 439

15 aagucugugu cuguaaacau ccccgcuggg aagcuguaag ccacagccaa gcuucaguc 60
 agauguuugc ugcucagggc uc 82

<210> 440

<211> 71

<212> ARN

20 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 440

25 gcaacuguaa acauccucga cuggaagcug ugaagccaca aaugggcuuu cagucggau 60
 uuugcagcug c 71

<210> 441

<211> 84

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

30 <400> 441

 gagugacaga uacuguaaac auccuacacu cucagcugug aaaaguaaga aagcugggag 60
 aaggcuguuu acucucucug ccuu 84

<210> 442

35 <211> 106

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 442

40 ugcuccugaa acuuggaacu ggagaggagg caagaugcug gcuaugcugu ugaacugaga 60
 accugcuau gccaacauuu gccaucuuuc cugucugaca gcagcu 106

<210> 443

<211> 70

<212> ARN

45 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 443

50 ggggauauug cacauuacua aguugcaugu ugucacggcc ucaaugcaau uuagugugug 60
 ugauauucuc 70

<210> 444

<211> 69

<212> ARN

55 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 444

ccguggugca uuguaguugc auugcauguu cuggcaguac cugugcaaug uuuccacagu 60
gcaucacgg 69

5 <210> 445
<211> 84
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

10 <400> 445

gugcucgguu uguaggcagu guaaauagcu gauuguagug cggugcugac aaucacuaac 60
uccacugcca ucaaaacaag gcac 84

15 <210> 446
<211> 77
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 446

20 agucuaguua cuaggcagug uaguuagcug auugcuaaua guaccaauca cuaaccacac 60
agccagguaa aaagacu 77

25 <210> 447
<211> 102
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 447

30 ccggcuguga guaaauuuuu ggcagugucu uagcugguug uugugaguau uagcuaagga 60
agcaaucagc aaguauacug ccuagaagu gcugcacguu gu 102

35 <210> 448
<211> 78
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 448

40 cuuucuacac agguugggau uugucgcaau gcuguguuuc uguauaguau ugcacuuguc 60
ccggccuguu gaguuugg 78

45 <210> 449
<211> 92
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 449

50 ugcccuuuca uccacaggug gggauuagug ccuuuacuug uguuagauaa aaaguauugc 60
acuugucccg gccugaggaa gaaaagaggg uu 92

55 <210> 450
<211> 87
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 450

agucaugggg gcuccaaagu gcuguucgug cagguagugc auugccugac cuacugcuga 60
 gcuagcacuu cccgagcccc caggaca 87

<210> 451
 <211> 106
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 451

ccaguaccuu cugcuuggcc gauuuuggca cuagcacauu uuugcuugug ucucuccgcu 60
 cugagcaauc augugcagug ccaauauggg aaaagcgggc ugcugc 106

<210> 452
 <211> 80
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 452

gugagguagu aaguuguauu guuguggggu agggauuuua ggccccaaua agaagauaac 60
 uauacaacuu acuacuuucc 80

<210> 453
 <211> 81
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 453

cccauuggca uaaacccgua gauccgaucu uguggugaag uggaccgcac aagcucguuu 60
 cuauggggucu guggcagugu g 81

<210> 454
 <211> 70
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 454

ggcacccacc cguagaaccg accuugcggg gccuucgccg cacacaagcu cgugucugug 60
 gguccguguc 70

<210> 455
 <211> 80
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 455

ccuguugcca caaacccgua gauccgaacu ugugcugacc augcacacaa gcuugugucu 60
 auagguaugu gucuguuagg 80

<210> 456
 <211> 97
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 456

aucugagacu gaacuguccu uuuucggua ucaugguacc gaugcuguag aucugaaagg 60
 uacaguacug ugauagcuga agaauaggug ugccauc 97

<210> 457
 <211> 75
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 5
 <400> 457
 ugcccuggcu caguauacac agugcugaug cuguccauuc uaaagguaca guacugugau 60
 aacugaagga uggca 75
 10
 <210> 458
 <211> 86
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 15
 <400> 458
 gucuucgugc uuucagcuuc uuucacagugc ugccuuguag cauucagguc aagcagcauu 60
 guacagggcu augaaagaac caagaa 86
 20
 <210> 459
 <211> 86
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 25
 <400> 459
 uuuuuacugc ccucggcuuc uuucacagugc ugccuuguug cauauuggauc aagcagcauu 60
 guacagggcu augaaggcau ugagac 86
 30
 <210> 460
 <211> 82
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 460
 35
 ccugcuggga cuaaagugcu gacagugcag auaguggucc ucucugugcu accgcacugu 60
 gguacuugc ugcuccagca gg 82
 40
 <210> 461
 <211> 87
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 461
 45
 uuucucucugc uuuaagcuuc uuucacagugu ugccuugugg cauggaguuc aagcagcauu 60
 guacagggcu aucaaagcac agagagc 87
 50
 <210> 462
 <211> 85
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 462
 55
 ccuuagcaga gcucuggagu gugacaaugg uguuuguguc caaaacauca aacgccauca 60
 ucacacuaaa cagcuacugc uaggc 85
 <210> 463
 <211> 87
 <212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 463

5 **ugagggcccc ucugcguguu cacagcggac cuugauuuuaa ugucuauaca auuaaggcac 60**
 gcggugaaug ccaagagagg cgccucc 87

<210> 464
 <211> 85
 <212> ARN
 10 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 464

15 **agggcucucu cuccguguuc acagcggacc uugauuuuaa uguccauaca auuaaggcac 60**
 gcggugaaug ccaagaauug ggcug 85

<210> 465
 <211> 109
 <212> ARN
 20 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 465

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

<210> 466
 <211> 85
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

30 <400> 466

35 **ugccggccuc ugguuccug agaccuuua accugugagg acguccaggg ucacagguga 60**
 gguuccuugg agccuggcgc cuggc 85

<210> 467
 <211> 87
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 467

40 **ugcguccccc ucaguccug agaccuaac uugugauguu uaccguuuua auccacgggu 60**
 uaggcucuuu ggagcugcga gucgugc 87

<210> 468
 <211> 88
 <212> ARN
 45 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 468

50 **accagacuuu uccuagucc ugagaccua acuugugagg uauuuuagua acaucacaag 60**
 ucaggcucuu gggaccuagg cggagagg 88

<210> 469
 <211> 73
 <212> ARN
 55 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 469

ugacagcaca uuauuacuuu ugguacgcgc ugugacacuu caaacucgua ccgugaguaa 60
 uaaugcgugg uca 73

5 <210> 470
 <211> 97
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

10 <400> 470

uuugaucacu gucuccagcc ugcugaagcu cagagggcuc ugauucagaa agaucaucgg 60
 auccgucuga gcuuggcgugg ucggaagucu caucauc 97

15 <210> 471
 <211> 82
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 471

20 ugagcuguug gauucggggc cguagcacug ucugagaggu uuacauuucu cacagugaac 60
 cggucucuuu uucagcugcu uc 82

25 <210> 472
 <211> 84
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 472

30 ugugcagugg gaaggggggc cgaugcacug uaagagagug aguagcaggu cucacaguga 60
 accggucucu uucccuacug uguc 84

35 <210> 473
 <211> 97
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 473

40 agacugcccu ucgcgaauu uuuugcgguu ugggcuugcu guacauaacu caauagccgg 60
 aagcccuuac cccaaaaagc auucgcggag ggcgcgc 97

45 <210> 474
 <211> 72
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 474

50 ugggucuuuu ugcggucugg gcuugcuguu cucuccacag uagucaggaa gcccuuacc 60
 caaaaaguau cu 72

55 <210> 475
 <211> 88
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 475

55 ugucgcuggc cggagcucuu uucacauugu gcuacugucu acacguguac cgagcagugc 60
 aauguuuuuu gggcaucggc cuuguagu 88

5 <210> 476
 <211> 82
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 476
 ggcuugcugg acacucuuc ccuguugcac uacugugggc cucugggaag cagugcaaug 60
 augaaagggc auccgucagg cc 82
 10 <210> 477
 <211> 101
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 15 <400> 477
 ccgccccgc gucuccaggg caaccguggc uuucgauugu uacuguggga accggaggua 60
 acagucuaca gccauggucg ccccgagca cgcccacgcu c 101
 20 <210> 478
 <211> 87
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 25 <400> 478
 caaugcuuug cuaaagcugg uaaaauggaa ccaaauccgc ucuucaaugg auuugguccc 60
 cuucaaccag cuguagcuau gcauuga 87
 30 <210> 479
 <211> 73
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 35 <400> 479
 cagggugugu gacugguuga ccagaggggc gugcacuuug uucaccugug gggccaccua 60
 gucaccaacc cuc 73
 40 <210> 480
 <211> 97
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 480
 45 cgcucugcug uggccuauug cuuuucauuc cuaugugauu gcuguuccga acucauguag 60
 ggcuaaaagc caugggcuac agugaggggc aagcucc 97
 50 <210> 481
 <211> 100
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 481
 55 agauaaaauuc acucuagugc uuuauggcuu uuuaauuccua ugugaucgua auaaagucuc 60
 auguagggau ggaagccaug aaauacauug ugaaaauua 100
 <210> 482
 <211> 82

<212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 482
 5
 ugagcccucg gaggacucca uuuguuuuga ugauggauuc uuaagcucca ucaucgucuc 60
 aaaugagucu ucagaggguu cu 82
 <210> 483
 <211> 102
 10 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 483
 15 ggcccucuga cucucuucgg ugacggguau ucuuggggugg auaauacgga uuacguuguu 60
 auugcuuaag aauacgcgua gucgaggaga guaccagcgg ca 102
 <210> 484
 <211> 82
 20 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 484
 25 guugcugcag cugguguugu gaauacggcc gacgagcaac gcauccucuu acccggcuau 60
 uucacgacac cagggguugca cc 82
 <210> 485
 <211> 99
 30 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 485
 35 cucuggcaug guguguuggg acagcuggug uugugaauca ggccguugcc aaucagagaa 60
 cggcuacuuc acaacaccag ggucucacug cacugcagg 99
 <210> 486
 <211> 68
 40 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 486
 45 guguaauucia cagugcacgu gucuccagug uggcucggag gcuggagacg cggcccuguu 60
 ggaguaac 68
 <210> 487
 <211> 99
 50 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 487
 55 gugucucucu cuguguccug ccagugguuu uaccuauagg uagguuacau caugcuguuc 60
 uaccacaggg uagaaccacg gacaggauac uggagcacc 99
 <210> 488
 <211> 94
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 488

ggcugacucu gaguccaucu uccagugcag uguuggaugg uugaaguacg aagcuccuaa 60
cacugucugg uaaagauggc ccccgguca guuc 94

5 <210> 489
<211> 87
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

10 <400> 489

gacagugcag ucacccauaa aguagaaagc acuacuaaca gcacuggagg guguguguu 60
uccuacuuua uggaugagug uacugug 87

15 <210> 490
<211> 105
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

20 <400> 490

gcgagcgcc ugucucccag ccugaggugc agugcugcau cucuggucag uugggagucu 60
gagaugaagc acuguagcuc aggaagggag aagauguucu gcagc 105

25 <210> 491
<211> 83
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 491

30 gggccuuggc uggaauauca ucauauacug uaaguugug augagacacu acaguauaga 60
ugauguacua gucuggguac ccc 83

35 <210> 492
<211> 88
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 492

40 caccuugucc ucacggucca guuuucccag gaaucccuug gaugcuaaga uggaauucc 60
uggaaauacu guucuugagg ucauggcu 88

45 <210> 493
<211> 95
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 493

uguguauccu cagcucugag aacugaauc cauggguuau agcaauguca gaccugugaa 60
guucaguucu uuagcuggga uagcucuauc gucau 95

50 <210> 494
<211> 97
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

55 <400> 494

caggcacucu uagcauuuga ggugaaguuc uguuauacac ucaggcugug gcucugaaag 60
 ucagugcauc acagaacuuu gucucgaaag cuuucua 97

 <210> 495
 <211> 85
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

 <400> 495

 5

 cuucucaagg cccugucucc caaccuuugu accagugcug ugccucagac ccugguacag 60
 gccuggggga cagggaauug gggac 85

 <210> 496
 <211> 97
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

 <400> 496

 10

 15

 agcgcuuucc ugcccucgag gagcucacag ucuaguaugu cuccuccua cuagacugag 60
 gcuccuugag gacagggau c gucauacua ccuccc 97

 <210> 497
 <211> 85
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

 <400> 497

 20

 25

 uguuucccg gcccagguuc ugugauacac uccgacucgg gcucuggagc agucagugca 60
 ugacagaacu ugggcccggg aggac 85

 <210> 498
 <211> 87
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

 <400> 498

 30

 35

 agcgguggcc agugucauuu uugugaugu gcagcuagua auaugagccc aguugcauag 60
 ucacaaaagu gacauugga aacugug 87

 <210> 499
 <211> 84
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

 <400> 499

 40

 45

 gcgguugcuug aagauagguu auccguguug ccuucgcuu auucgugacg aaucuaacac 60
 gguugaccua uuuuucagua ccaa 84

 <210> 500
 <211> 106
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

 <400> 500

 50

 55

 agaacuugcc aaggguuugg gggaacauuc aaccugucgg ugaguuuggg cagcucagac 60
 aaaccaucga ccguugagug gaccccagg ccuggaacug ccaacc 106

<210> 501
 <211> 117
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 5
 <400> 501

 agaugggcaa ccaaggcagc cuuaagagga cuccauggaa cauucaacgc ugucggugag 60
 uuugggauuc aaaaacaaaa aaaaccacca accguugacu guaccuuggg auucuua 117
 10
 <210> 502
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 15
 <400> 502

 ccugugcaga gaugauguuu acaaagguca caaucaacau ucauugcugu cgguggguug 60
 aacuguguag aaaagcucac ugaacaauga augcaacugu ggccccgcuu 110
 20
 <210> 503
 <211> 88
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 25
 <400> 503

 ugaugggcugc acucaacauu cauugcuguc gguggguuug aaugucaacc aacucacugg 60
 ucaaugaaug caaacugcgg gccaaaaa 88
 30
 <210> 504
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 504

 ccagagagug ugacuccugu ccuguguauug gcacugguag aaucacugu gaacagucuc 60
 ggucagugaa uuaccgaagg gccauaaaca gagcagagac agauccgcga 110
 35
 <210> 505
 <211> 77
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 40
 <400> 505

 cacuuucccu uaucaguuuu ccagccagcu uugugacugu aauguugga cggagaacug 60
 auaaggguaa gugacug 77
 45
 <210> 506
 <211> 80
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 50
 <400> 506

 gggggugagg gauuggagag aaaggcaguu ccugaugguc cccucccagg ggcuggcuuu 60
 ccucuggucc uucucuccca 80
 55
 <210> 507
 <211> 86
 <212> ARN

ES 2 503 740 T3

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 507

5 ugcuuacaac uuuccaaaga auucuccuuu ugaggcuuuu cauuuuauuu uaagcccaaa 60
ggugaauuuu uuugggaaguu ugagcu 86

<210> 508

<211> 104

<212> ARN

10 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 508

gggcucacag gacacaauGC ggauccucag gcuacaacac aggaccCGgg cgcugcucug 60
acccCucgug ucuuguguug cagccgGagg gacgcagguc ugca 104

<210> 509

<211> 85

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

20

<400> 509

ugcaggccuc ugugugauau guuugauaua uuagguuguu auuuuaacca acuauauauc 60
 aagcauauuc cuacaguguc uugcc 85

25

$\langle 210 \rangle$ 510

<211> 91

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

30

$\langle 400 \rangle$ 510

```
ggcuggacag cgggcaacgg aaucccaaaa gcagcuguug ucuccagagc auuccagcug 60
cacuugggau ucguucccug cucuccugcc u                               91
```

<210> 511

$\langle 211 \rangle$ 110

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 511

40

gucaagaugg	agugcaacagg	gcucugaccu	augaauugac	agccaguacu	cugaucucgc	60
cucugggcgc	caguuccaua	ggucacaggu	auguucgccu	caaugccagc		110

<210> 512

<211> 86

45

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 512

50 gcggacggga gcugagagcu gggucuuugc gggcaagaug agggugucag uucaacuggc 60
cuacaaaguc ccaguccucg gcuccc 86

<210> 513

<211> 83

<212> ARN

55 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 513

auggagucau cacguguaac agcaacucca .uguggacugu gcacagaucc caguggagcu 60
 gcuguuacuu uugauggccu cca 83

<210> 514
 <211> 85
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 514

10 uggcucccac ccccuguaac agcaacucca uguggaagug cccacugauu ccaguggggc 60
 ugcuguuauc ugggguggag gcug 85

<210> 515
 <211> 87
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 515

20 aacucuccug gcucuagcag cacagaaua uggcacggg uaagugaguc ugccaauauu 60
 ggcugugcug cuccaggcag gguggug 87

<210> 516
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 516

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

<210> 517
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 517

40 uggaagcuc uggagauccu gcuccgucg cccaguguuc agacuaccug uucaggacaa 60
 ugccguugua caguagucug cacauugguu agacugggca agggccagca 110

<210> 518
 <211> 69
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 518

50 cccucgucuu acccagcagu guuugggugc ugguugggag ucucuauac ugccggguaa 60
 ugauggag 69

<210> 519
 <211> 89
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 519

55 cugggccuc uggggcauc uaccggacag ugcuggauuu cuuggcuuga cucuaacacu 60
 gucugguaac gauguucaaa ggugaccca 89

<210> 520
 <211> 95
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 5
 <400> 520
 ccaacuuggg cagccguggc caucuacug ggcagcaug gauagugucu gaucucuaau 60
 acugccuggu aaugaugacg gcggagcccu gcacg 95
 10
 <210> 521
 <211> 97
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 15
 <400> 521
 gcgcgccugg uccagugguu cuuaacaguu caacaguucu guagcgcaau ugugaaaugu 60
 uuaggaccac uagaccggc gcgcacggca gcggcga 97
 20
 <210> 522
 <211> 110
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 25
 <400> 522
 ggcuacagcc cuucucaug ugacucgugg acuucccuuu gucauccuau gccugagaau 60
 auaugaagga ggcugggaag gcaaaggac guucaauugu caucacuggc 110
 30
 <210> 523
 <211> 108
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 35
 <400> 523
 aaacagcccc agacaaucca uggguccucc uguccuucan uccaccggag ucugucuau 60
 gccaaccaga uuucagugga gugaagcuca ggaggcaugg agcugcca 108
 40
 <210> 524
 <211> 84
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 524
 cuuccccagg ccacaugcuu cuuuauaucc ucauagauau cacugcgua uggaauguaa 60
 ggaagugugu gguuuuggca agug 84
 45
 <210> 525
 <211> 83
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 50
 <400> 525
 uuccuuugac gggugagcuu uuggcccggg uuauaccuga cucucacgua uaagacgagc 60
 aaaaagcuug uuggucagag gag 83
 55
 <210> 526
 <211> 110

<212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 526
 5
 ccggggcagu cccuccaggc ucaggacagc cacugcccac agcacacugc guugcuccgg 60
 acccacugug cgugugacag cggcugaucu gucccugggc agcgcgaacc 110
 <210> 527
 <211> 106
 10
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 527
 15
 cagcuuggac cugugaccuc ugggcuuccc uuugucaucc uuugccuagg ccucugagug 60
 gggcaaggac agcaaagggg ggcucagugg ucaccucuac ugcaga 106
 <210> 528
 <211> 111
 20
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 528
 25
 cgggauaucc ccgcccgggc agcgcgccgg caccuuggcu cuagacugcu uacugcccgg 60
 gccgcccuca guaacagucu ccagucacgg ccaccgacgc cuggccccgc c 111
 <210> 529
 <211> 100
 30
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 529
 35
 agguugcuuc agugaacauu caacgcuguc ggugaguuuu gaauucaaau aaaaaccauc 60
 gaccguugau uguacccuau agcuaaccu uaucuacucc 100
 <210> 530
 <211> 110
 40
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 530
 45
 guccuggaug gacagaguug ucaugugucu gccugucuac acuugcugug cagaacaucc 60
 gcucaccugu acagcaggca cagacaggca gucacaugac aaccagccu 110
 <210> 531
 <211> 106
 50
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 531
 55
 guuagcuau aguuaguua aucucagcug gcaacuguga gauguccua ucauuccua 60
 caguggucuc ugggauuau cuaaacagag cauuuuccuu gaccuc 106
 <210> 532
 <211> 105
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*

<400> 532

accacaguca uuguaguuuu gaugucgcag auacugcauc aggaacugac uggauaagac 60
ucagucacca ucaguuccua augcauugcc uucagcaucu aaaca 105

5 <210> 533
<211> 110
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

10 <400> 533

gaccaguugc cgcggggcuu uccuuugugc uugaucuaac cauguggugg aacgauggaa 60
acggaacaug guucugucua gcaccgcgga aagcaucgcu cucuccugca 110

15 <210> 534
<211> 110
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

20 <400> 534

gugauaacgu agcgagauuu ucuguugugc uugaucuaac caugugcuug cgagguauga 60
guaaaacaug guuccgucaa gcaccaugga acgucacgca gcuuuuacua 110

25 <210> 535
<211> 110
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 535

30 cugucccggg ccgcgggcucc ugauugucca aacgcaauuc ucgagucucu ggcuccggcc 60
gagaguugcg ucuggacguc ccgagccgcc gcccccaaac cucgaggggg 110

35 <210> 536
<211> 96
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 536

40 acucagggggc uucaccacug auuguccaaa cgcaauucuu guacgagucu gcggccaacc 60
gagaauugug gcuggacauc ugugguugag cuccgg 96

45 <210> 537
<211> 109
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 537

50 ugaauaucca ggucuggggc augaaccugg cauacaauug agauuucugu guuuguuagg 60
caacagcuac auugucugcu ggguuucagg cuaccuggaa gcauuucuc 109

55 <400> 538

aaggauuagg gugccucag uggcucagua gccaguguag auccugucuu ugguaaucag 60
cagcuacauc uggcuacugg gucucugaug gcaucaucua gcu 103

<210> 539
<211> 110
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 539

ucuggccuuc ugcaguguua cgcuccgugu auuugacaag cugaguugga cacucugugu 60
gguagagugu caguuuugua aaauacccaa guguggcua ugcuuaucag 110

<210> 540
<211> 81
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 540

ucaucuugcg guucucaaa uaugggggca cuuuuuuuuu cuuuaaaaag ugccgccagg 60
uuuuagggcc ugccggguaga g 81

<210> 541
<211> 82
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 541

ccgguguagu agccaucaaa guggaggccc ucucuugggc ccgagcuaga aagugcuucc 60
acuuugugug ccacugcaug gg 82

<210> 542
<211> 82
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 542

caaccuguga uacucaaa cu gggggcucuu uuuggguuuu uuuggaagaa aagugccgcc 60
agguuuugag uguuaccgau ug 82

<210> 543
<211> 78
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 543

ggaccuuucu ggagggcccc cccucaaucc uguugugcuc gcuucagagg guugggugga 60
ggcucuccug aagguguc 78

<210> 544
<211> 68
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 544

uauugaugua uguauguaug uaugcaugua ugugugcaug uaugcaugca ugcauguaug 60
uauugaug 68

<210> 545
 <211> 82
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 5
 <400> 545
 ccaggccuuc ggcagaggag ggcuguucuu cccuuggguu uuaugacugg gaggaacuag 60
 ccuucucucu gcuuaggagu gg 82
 10
 <210> 546
 <211> 63
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 15
 <400> 546
 aagaaauggu uuaccguccc acauacauuu ugaguaugua ugugggacgg uaaaccgcuu 60
 cuu 63
 20
 <210> 547
 <211> 79
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 25
 <400> 547
 gcuacuugaa gagagguuau cccuugugug uuugcuuuac gcgaaaugaa uaugcaaggg 60
 caagcucucu ucgaggagc 79
 30
 <210> 548
 <211> 100
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 548
 35
 ccugcuggcu acugcugacg acugcucuga cuuuauugca cuacuguacu guacagcuag 60
 cagugcaaua guauugucaaa agcauccggg agcaggcuac 100
 40
 <210> 549
 <211> 82
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 549
 45
 gccucgcugu ccuccgccuu cucuucccg g uucuuucccg agucgggaaa agcuggguug 60
 agagggcgaa aaaggauaug gg 82
 50
 <210> 550
 <211> 59
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 550
 uuggccuccu aagccaggga uuguggguuc gagucccacc cgggguaaga gguuguguu 59
 55
 <210> 551
 <211> 95
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 551

ccucgcugac uccgaaggga ugcagcagca auucauguuu uggaguauug ccaagguuca 60
aaacaugaag cgcugcaaca ccccuucgug ggaaa 95

5 <210> 552
<211> 86
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

10 <400> 552

uugguacuug gagagaggug guccguggcg cguucgcuuc auuuauuggcg cacauuacac 60
ggucgaccuc uuugcgguau cuaauc 86

15 <210> 553
<211> 83
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

20 <400> 553

cugacuauug cuccucgcau ccccuagggc auugguguaa agcuggagac ccacugcccc 60
aggugcugcu gggggguugua guc 83

25 <210> 554
<211> 98
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

30 <400> 554

auauagugcu ugguuccuag uaggugcuca guaaguguuu gugacauaa ucguuuauug 60
agcaccuccu aucaaucaag cacugugcua ggcucugg 98

35 <210> 555
<211> 95
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

40 <400> 555

cucaucuguc uguggggcug ggggcagggc cuuugugaag gcggguuauug cucagaucgc 60
cucugggccc uuccuccagu cccgaggcag auuuu 95

45 <210> 556
<211> 84
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

50 <400> 556

uggggcaggg gggcaggagg ggcucagggg gaaagcaucu acagccccug gcccucucug 60
cccuuccguc cccugucccc aaau 84

55 <210> 557
<211> 97
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

60 <400> 557

uguucgcuuc ugguaccgga agagagguuu ucugggucuc uguuucuuug augagaauga 60
aacacaccca gcuuaccuuu uuuucaguau caaaucc 97

5 <210> 558
 <211> 97
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 558
 acccuuuggc gaucucugcc ucucugggcc ugugucuuaag gcucuucaag aucuaacgag 60
 caaagcacag ggccugcaga gagguagcgc ucugcuc 97
 10 <210> 559
 <211> 96
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 15 <400> 559
 gagucugguc uuguuugggu uuguucuagg uaugguccca gggaucccag aucaaaccag 60
 gccccugggc cuauccuaga accaaccuaa acccau 96
 20 <210> 560
 <211> 95
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 25 <400> 560
 ccccguguga accacguggu gugcuaguua cuuuugggcu ggagagacgg cucagggguu 60
 aagagcacag acugcucuuc cagagguccu gaguu 96
 30 <210> 561
 <211> 96
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 35 <400> 561
 augugaccgu gccucucacc cuuccauauc uagucucuga gaaaaaugaa gacuggauuc 60
 caugaaggga ugugaggccu ggaaacugga gcuuua 96
 40 <210> 562
 <211> 97
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 562
 45 aguguaguga gaaguugggg ggugggaacg gcgucaugca ggaguugauu gcacagccau 60
 ucagcuccua uaugaugccu uucuucaccc ccuuaa 97
 50 <210> 563
 <211> 66
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 563
 55 uccccaacaa uauccuggug cugagugggu gcacagugac uccagcauca gugauuuugu 60
 ugaaga 66
 <210> 564
 <211> 96

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 564

5

acgggggugga caccgucccu guccuccagg agcucacgua ugccugccug ugagcgccuc 60
gacgacagag ccagagucca cccugcacu gcccaa 96

<210> 565

<211> 96

10

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 565

15

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

<210> 566

<211> 99

20

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 566

25

gaaaauaggc ucaaggugag gggugcuau ucugauugag ggacaugguc aauggaauug 60
ucucacacag aaucgcacc cgucaccuug gccucguga 99

<210> 567

<211> 98

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

30

<400> 567

cugcagccag aguuuuuacc agucaggcuc cuggcuagau uccagguacc aacugguacc 60
ugaucuagcc aaagccugac cguagcugc aaaagaaa 98

35

<210> 568

<211> 96

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

40

<400> 568

acccaagucc aggccugcug accccuaguc cagugcuugu gguggcuacu gggcccugaa 60
cuaggggucu ggagaccugg guuugaucuc cacagg 96

45

<210> 569

<211> 98

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 569

50

ucuguguugg gcaucugucu gccugagugc cugccucucu guugcucuga aggaggcagg 60
ggcugggccu gcagcugccu gggcagagcu gcuccuuc 98

55

<210> 570

<211> 97

<212> ARN

<213> *Rattus norvegicus*

<400> 570

gaagacucua gcauguaagg uugggggagg gggcuguguc uagcaagucu ucuuccccca 60
cagcccugcu gucuuaaccu cuagguguuc cggcucc 97

5 <210> 571
<211> 99
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

10 <400> 571

agaugccuug cuccuacaag aguaaaagugc acgugcuuug ggacagugag gaaaauaaug 60
uucacaaagc ccuacacuu ucacccuuua ggagaguug 99

15 <210> 572
<211> 81
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

20 <220>
<223> Descripción de molécula de ADN/ARN combinada:c

<400> 572

cauggcacccu ccuuuucccu gaggagcccu uugagccuga ggugaaaaaa aaacagguca 60
agaggcgccu gggaacugga g 81

25 <210> 573
<211> 98
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 573

acccaaaccc uaggucugcu gacuccuagu ccagggcucg ugauggcugg ugggccuga 60
acgagggguc uggaggccug gguuugaaua ucgacagc 98

35 <210> 574
<211> 86
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

40 <400> 574

gucugucugc ccgcaugccu gccucucugu ugcucugaag gaggcagggg cugggccugc 60
agcugccugg gcagagcggc uccugc 86

45 <210> 575
<211> 68
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 575

50 ccuuuacugu ugcuaauaug caacucuguu gaauauaaa uggaaauugca cuuuagcaau 60
ggugaugg 68

55 <210> 576
<211> 66
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

	<400> 576	
	aaaaggugga uauuccuucu auguuuauugu uauuuauuggu uaaacauaga ggaaauucca cguuuu	60 66
5	<210> 577 <211> 70 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
10	<400> 577	
	uugaagggag aucgaccgug uuauauucgc uuuaugacu ucgaauaaua caugguugau cuuuucucag	60 70
15	<210> 578 <211> 75 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
20	<400> 578	
	agacagagaa gccaggucac gucucugcag uuacacagcu cacgagugcc ugcuggggug gaaccugguc ugucu	60 75
25	<210> 579 <211> 67 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 579	
30	guggcacuca aacugugggg gcacuuucug cucucuggug aaagugccgc caucuuuuga guguuac	60 67
35	<210> 580 <211> 67 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 580	
40	gugggccuca aauguggagc acuaauucuga uguccaagug gaaagugcug cgacauuuga gcgucac	60 67
45	<210> 581 <211> 69 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 581	
50	gggauacuca aaaugggggc gcuuuccuuu uugucuguac ugggaagugc uucgauuuug ggguguccc	60 69
55	<210> 582 <211> 72 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 582	

uacaucggcc auuauaauc aaccugauaa guguuauagc acuuauacaga uuguauugua 60
auugucugug ua 72

<210> 583
<211> 99
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 583

cauggcaccu ccguuuccu gaggagcccu uugagccugg agugaaaaa aaaaacaggu 60
caagaggcgc cugggaacug gagaagagug uuaaacuuc 99

<210> 584
<211> 79
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 584

agacggagag accaggucac gucucugcag uuacacagcu caugagugcc ugcuggggug 60
gaaccugguu ugucugucu 79

<210> 585
<211> 68
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 585

uaaaagguag auucuccuuc uaugaguaca auauuauga cuaaucguag aggaaaaucc 60
acguuuuc 68

<210> 586
<211> 82
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 586

ugguauuuua aagguggaua uuccuucuau gguuacgugc uuccuggaua aucauagagg 60
aacauccacu uuucaguau ca 82

<210> 587
<211> 61
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 587

aagaugguug accauagaac augcgcuacu ucugugucgu auguaguaug guccacaucu 60
u 61

<210> 588
<211> 79
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 588

ugguacucgg agagagguua cccgagcaac uuugcaucug gaggacgaau guugcucggu 60
gaaccccuu ucgguauc 79

5 <210> 589
 <211> 81
 <212> ARN
 <213> *Mus musculus*
 <400> 589
 gggguacuuga ggagagguug ucugugauga guucgcuua uaaugacga auauaacaca 60
 gauggccugu uucaauacc a 81
 10 <210> 590
 <211> 82
 <212> ARN
 <213> *Mus musculus*
 15 <400> 590
 uggguacuugg agagauagua gaccguauag cguacgcuu aucugugacg uauguaacac 60
 gguccacuaa ccucaguau ca 82
 20 <210> 591
 <211> 80
 <212> ARN
 <213> *Mus musculus*
 <400> 591
 25 ggguauggga cggauugucg accagcugga aaguaauugu uucuaaugua cuucaccugg 60
 uccacuagcc gucggugccc 80
 30 <210> 592
 <211> 96
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 592
 35 guacauaugu ugaagauuau uaaauauauag aguggguguu guggugguag uaugauaugu 60
 agaguaguag guugcauagu acgauguagu guauga 96
 40 <210> 593
 <211> 79
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <220>
 <223> Descripción de molécula de ADN/ARN combinada:c
 45 <400> 593
 cacacuguag gccucauuua auguuuguug aaugaaaaa ugaaucauca acagacauua 60
 auugggcgcc ugcucugug 79
 50 <210> 594
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 594
 cauacuucuu uauaugccca ua 22

5 <210> 595
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <220>
 10 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 595
 uggaauguaa agaaguaugu a 21
 15 <210> 596
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 25 <400> 596
 cauacuucuu uacauucugt t 21
 30 <210> 597
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 40 <400> 597
 uggaauguaa agaaguaugu a 21
 45 <210> 598
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <220>
 50 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 598
 cauacuucuu uacauuccat t 21
 55 <210> 599
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 65 <400> 599
 uggaauguaa agaaguaugu a 21

5
 <210> 600
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 10
 <400> 600
 guguucacag cggaccuuga uu 22
 15
 <210> 601
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 25
 <400> 601
 uuaaggcacg cggugaaugc ca 22
 30
 <210> 602
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 602
 gcauucaccg cgugccuugg tt 22
 40
 <210> 603
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 50
 <400> 603
 uuaaggcacg cggugaaugc ca 22
 55
 <210> 604
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 604
 gcauucaccg cgugccuuaa tt 22
 65
 <210> 605

<211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 10 <400> 605
 uuaaggcacg cggugaaugc ca 22
 <210> 606
 <211> 19
 15 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 606
 25 uuuuuucaca uugugcuac 19
 <210> 607
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 35 <400> 607
 cagugcaaug uuaaaagggc 20
 <210> 608
 40 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 608
 50 uauuuuaaca uugcacugtt 20
 <210> 609
 <211> 20
 <212> ARN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <220>
 60 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 609
 cagugcaaug uuaaaagggc 20
 65 <210> 610
 <211> 20

	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético	
10	<400> 610	
	ccuuuuuaca uugcacugtt	20
	<210> 611	
	<211> 20	
15	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 611	
	cagugcaaug uuaaaagggc	20
25	<210> 612	
	<211> 20	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético	
35	<400> 612	
	aguuuugcau aguugcacua	20
	<210> 613	
40	<211> 23	
	<212> ARN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
45	<220>	
	<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 613	
50	ugugcaaauc uaugcaaaac uga	23
	<210> 614	
	<211> 23	
	<212> ARN	
55	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<220>	
60	<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 614	
	acauuugcau agauuugcac att	23
65	<210> 615	
	<211> 23	
	<212> ARN	

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 615
ugugcaaauc uaugcaaaac uga 23

10 <210> 616
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

15 <220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

20 <400> 616
aguuuugcau agauuugcac att 23

25 <210> 617
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

30 <220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

35 <400> 617
ugugcaaauc uaugcaaaac uga 23

40 <210> 618
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

45 <400> 618
caaauucgua ucuaggggaa ua 22

50 <210> 619
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

55 <220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

60 <400> 619
uaccguag auccgaauuu gug 23

<210> 620
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

65

<220>

5 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 620
agaauucgga ucuacaggu att 23

10 <210> 621
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

15 <220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

20 <400> 621
uaccuguag auccgaauuu gug 23

25 <210> 622
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

30 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 622
caaauucgga ucuacaggu att 23

35 <210> 623
<211> 23
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

40 <220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

45 <400> 623
uaccuguag auccgaauuu gug 23

50 <210> 624
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

55 <220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

60 <400> 624
auguuuccac agugcauca 19

<210> 625
<211> 19
<212> ARN
65 <213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

5

<400> 625
gugcauugua guugcauug 19

10

<210> 626
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

15

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

20

<400> 626
guccaacuac aaugcactt 19

25

<210> 627
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

30

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

35

<400> 627
gugcauugua guugcauug 19

40

<210> 628
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

45

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

50

<400> 628
augcaacuac aaugcactt 19

55

<210> 629
<211> 19
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

60

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

65

<400> 629
gugcauugua guugcauug 19

<210> 630
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 630
cuauacaacc uacugccuuc c 21

10 <210> 631
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

20 <400> 631
ugagguagua gguugugugg uu 22

25 <210> 632
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

35 <400> 632
ccacacaacc uacuaucua tt 22

40 <210> 633
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

50 <400> 633
ugagguagua gguugugugg uu 22

55 <210> 634
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

65 <400> 634
ccacacaacc uacuaccua tt 22

70 <210> 635
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

75 <220>

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

5 <400> 635
 ugagguagua gguugugugg uu 22

10 <210> 636
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>

15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 636
 aacaacauga aacuaccuat t 21

20 <210> 637
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

30 <400> 637
 uagguaguuu cauguuguug g 21

35 <210> 638
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>

40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 638
 caauucgua ucuaggggaa ua 22

45 <210> 639
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

55 <400> 639
 uagguaguuu cauguuguug g 21

60 <210> 640
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial

<220>

65 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 640
 aauaacauga aacuaccuat t 21
 5
 <210> 641
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 10
 <220>
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 15
 <400> 641
 uagguaguuu cauguuguug g 21
 <210> 642
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 25
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 642
 augcaacuac aaugcactt 19
 30
 <210> 643
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 40
 <400> 643
 gugcauugua guugcauug 19
 45
 <210> 644
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 55
 <400> 644
 augcaacuac aaugcactt 19
 <210> 645
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 60
 <220>
 65
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

	<400> 645 gugcauugua guugcauug	19
5	<210> 646 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <220> <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético	
15	<400> 646 augcaacuac aaugcactt	19
20	<210> 647 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial <220>	
25	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético	
30	<400> 647 gugcauugua guugcauug	19
35	<210> 648 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial <220> <220> <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético	
40	<400> 648 augcaacuac aaugcactt	19
45	<210> 649 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial <220>	
50	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético	
55	<400> 649 gugcauugua guugcauug	19
60	<210> 650 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial <220> <220> <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético	
65		

	<400> 650 augcaacuac aaugcactt	19
5	<210> 651 <211> 19 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <220> <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético	
15	<400> 651 gugcauugua guugcauug	19
20	<210> 652 <211> 22 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <220> <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético	
30	<400> 652 ccacacaacc uacuaccuca tt	22
35	<210> 653 <211> 22 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <220> <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético	
45	<400> 653 ugagguagua gguugugugg uu	22
50	<210> 654 <211> 22 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <220> <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético	
60	<400> 654 ccacacaacc uacuaccuca tt	22
65	<210> 655 <211> 22 <212> ARN <213> Secuencia artificial	
	<220> <220> <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 655	

	ugagguagua gguugugugg uu	22
5	<210> 656 <211> 22 <212> ARN <213> Secuencia artificial <220>	
10	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético	
15	<400> 656 ccacacaacc uacuaccuca tt	22
20	<210> 657 <211> 22 <212> ARN <213> Secuencia artificial <220>	
25	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético	
30	<400> 657 ugagguagua gguugugugg uu	22
35	<210> 658 <211> 22 <212> ARN <213> Secuencia artificial <220>	
40	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético	
45	<400> 658 ccacacaacc uacuaccuca tt	22
50	<210> 659 <211> 22 <212> ARN <213> Secuencia artificial <220>	
55	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético	
60	<400> 659 ugagguagua gguugugugg uu	22
65	<210> 660 <211> 21 <212> ARN <213> Secuencia artificial <220>	
	<220> <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético	
	<400> 660 cauacuucuu uacauuccat t	21

5 <210> 661
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
10 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 661
uggaauguaa agaaguaugu a 21

15 <210> 662
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

20 <220>

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

25 <400> 662
cauacuucuu uacauccat t 21

30 <210> 663
<211> 21
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

35 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 663
40 uggaauguaa agaaguaugu a 21

45 <210> 664
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

<220>
50 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 664
gc auucac cg cgugccuuaa tt 22

55 <210> 665
<211> 22
<212> ARN
<213> Secuencia artificial

<220>

60 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 665
65 uuaaggcacg cggugaugc ca 22

5
 <210> 666
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 10
 <400> 666
 gcuuuacacg cgugccuuaa tt 22
 15
 <210> 667
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 25
 <400> 667
 uuaaggcacg cggugaaugc ca 22
 30
 <210> 668
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 35
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 668
 ccuuuuuaca uugcacugtt 20
 40
 <210> 669
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 50
 <400> 669
 cagugcaaug uuaaaagggc 20
 55
 <210> 670
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 670
 ccuuuuuaca uugcacugtt 20
 65
 <210> 671

<211> 20
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 10 <400> 671
 cagugcaaug uaaaaagggc 20
 <210> 672
 <211> 23
 15 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 672
 caaaauucgga ucuacagggg att 23
 25 <210> 673
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 35 <400> 673
 uaccuguag auccgaauuu gug 23
 <210> 674
 40 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 674
 50 caaaauucgga ucuacagggg att 23
 <210> 675
 <211> 23
 <212> ARN
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <220>
 60 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 675
 uaccuguag auccgaauuu gug 23
 65 <210> 676
 <211> 21

<212> ARN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 5
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético
 <400> 676
 10 uauacaagag augaaauccu c 21
 <210> 677
 <211> 64
 <212> ARN
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 677
 ccccgcgacg agccccucgc acaaaccgga ccugagcguu uuguucguuc ggcucgcgug 60
 aggc 64
 20
 <210> 678
 <211> 68
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 678
 uaaaagguag auucuccuuc uaugaguaca uuauuuuga uuaaucuag aggaaaaucc 60
 acguuuuc 68
 30
 <210> 679
 <211> 69
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 35
 <400> 679
 uugagcagag guugcccuug gugaauucgc uuauuuuug uugaucaca caaaggcaac 60
 uuuuuguug 69
 40
 <210> 680
 <211> 66
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 680
 45
 agggcuccug acuccagguc cuguguguua ccuagaaaaua gcacuggacu uggagucaga 60
 aggccu 66
 <210> 681
 <211> 67
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 681
 50
 agagauggua gacuauggaa cguaggcguu augauuucug accuauguua caugguccac 60
 uaacucu 67
 55
 <210> 682
 <211> 61
 <212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 682

5 aagaugguug accauagaac augcgcuau ucugugucgu auguaauaug guccacaucu 60
u 61

<210> 683

<211> 75

<212> ARN

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 683

15 uacuuaaagc gagguugccc uuuguauauu cgguuuauug acauggaaua uacaagggca 60
agcucucugu gagua 75

<210> 684

<211> 76

<212> ARN

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 684

25 uacuugaaga gaaguuguuc gugguggauu cgcuuuacuu augacgaauc auucacggac 60
aacacuuuuu ucagua 76

<210> 685

<211> 73

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

30 <400> 685

cuccucagau cagaagguga uuguggcuuu ggguggauau uaaucagcca cagcacugcc 60
uggucagaaa gag 73

<210> 686

<211> 88

<212> ARN

35 <213> *Homo sapiens*

<400> 686

40 uguuaaaauca ggaauuuuaa acaauuccua gacaauaugu auaauguua uaagucuuuc 60
cuagaaauug uucauaaugc cuguaaca 88

<210> 687

<211> 90

<212> ARN

45 <213> *Homo sapiens*

<400> 687

50 gagagaagca cuggacuuag ggucagaagg ccugagucuc ucugcugcag augggcucuc 60
ugucccugag ccaagcuuug uccucccugg 90

<210> 688

<211> 94

<212> ARN

55 <213> *Homo sapiens*

<400> 688

auaaaggaag uuaggcugag gggcagagag cgagacuuuu cuauuuucca aaagcucggu 60
 cugaggcccc ucagucuugc uuccuaaccc gcgc 94
 <210> 689
 <211> 98
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 689
 cgaggggaua cagcagcaau ucauguuuug aaguguucua aaugguuca aacgugaggc 60
 gcugcuauac cccucgugg ggaagguaga aggugggg 98
 <210> 690
 <211> 87
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 690
 gaaagcgcuu uggaaugaca cgaucacucc cguugagugg gcacccgaga agccaucggg 60
 aaugucgugu ccgcccagug cucuuuc 87
 <210> 691
 <211> 111
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 691
 gccgggaggu ugaacaucuu gcavagugcu gccaggaaau cccuauuuca uauaagaggg 60
 ggcuggcgugg uugcauauu aggauguccc aucucccagc ccacuucguc a 111
 <210> 692
 <211> 83
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 692
 cgccggccga uggcgucuu accagacaug guuagaccug gccucuguc uauvacuguc 60
 ugguaaaacc guccaucgc ugc 83
 <210> 693
 <211> 91
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 693
 cuguguguga ugagcuggca guguauguu agcugguuga auaugugaau ggcaucggcu 60
 aacaugcaac ugcugucuua uugcauauac a 91
 <210> 694
 <211> 91
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 694
 aaacgauacu aaacuguuuu ugcgaugugu uccuaauaug cacuaauaa auauugggaa 60
 cauuuugcau guauaguuuu guaucaauau a 91

<210> 695
 <211> 85
 <212> ARN
 5 <213> *Mus musculus*

 <400> 695

 aaagugcuuu ggaugacac gaucacuccc guugaguggg caccaagaa gccaucggga 60
 augucguguc cgcccagugc ucuuu 85
 10

 <210> 696
 <211> 112
 <212> ARN
 15 <213> *Mus musculus*

 <400> 696

 acgaggaggu ugaacauccu gcuaugugcu gccaggaaau ccuacuucac uacuaagagg 60
 gggcuggcug guugcauauug uaggauugucc caucuccugg ccacuucgu ca 112
 20

 <210> 697
 <211> 83
 <212> ARN
 25 <213> *Mus musculus*

 <400> 697

 ccugcugaug gaugucuac cagacauggu ugaucugga ugcaucuguc uauuacuguc 60
 ugguaaugcc guccauccac ggc 83
 30

 <210> 698
 <211> 91
 <212> ARN
 35 <213> *Mus musculus*

 <400> 698

 cuguguguga uggcuuggca guguauguu agcugguuga guaugugagc ggcaccagcu 60
 aacaugcgac ugcucuccua uugcacacac a 91
 40

 <210> 699
 <211> 91
 <212> ARN
 45 <213> *Mus musculus*

 <400> 699

 gagagauacu gagcuguuuu ugcgaugugu uccuaauaug ugcuaauauu auauugggaa 60
 cauuuugcau aaauagcuuu gugucaauac a 91
 50

 <210> 700
 <211> 112
 <212> ARN
 55 <213> *Rattus norvegicus*

 <400> 700

 acggggaggu ugaacauccu gcuaugugcu gccaggaaau ccuacuucac uacuaagagg 60
 gggcuggcug guugcauauug uaggauugucc caucucccg ccacuucgu ca 112
 55

 <210> 701
 <211> 85

ES 2 503 740 T3

<212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 701
 5
 ugccugcuga uggaugucuu accagacaug guuagaucug gauguaucug ucuaauacug 60
 ucugguaaag ccguccaucc auggc 85
 <210> 702
 <211> 91
 10
 <212> ARN
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 702
 15
 cugugugcga ugguuuggca guguauguu agcugguuga guaanguaaa ggcaccagcu 60
 aacaugcaac ugcucuccua uugcacauac a 91
 <210> 703
 <211> 91
 <212> ARN
 20
 <213> *Rattus norvegicus*
 <400> 703
 25
 gagagaugcg gagcuguuuu ugcgaugugu uccuaaugug ugcuaacaauu auauugggaa 60
 cauuuugcau aaauaguuuu acaucgacac a 91
 <210> 704
 <211> 100
 <212> ARN
 30
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 704
 35
 ccaaagaaag augcuaaacu auuuuugcga uguguuccua auauguaaua uaaauguaau 60
 ggggacauuu ugcauucaua guuuuuguauc aauaauaugg 100
 <210> 705
 <211> 72
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 40
 <400> 705
 45
 cuugggaaug gcaaggaaac cguuaccauu acugaguuaa guaauagguaa ugguucucuu 60
 gcuauaccca ga 72
 <210> 706
 <211> 85
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 50
 <400> 706
 55
 gcuaagcacu uacaacuguu ugcagaggaa acugagacuu uguaacuaug ucucagucuc 60
 aucugcaaag aaguaagugc uuugc 85
 <210> 707
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 707
 gagguugucc guggugaguu cg 22

 <210> 708
 <211> 96
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 708

 ucccuggcggu gaggguaugu gccuuuggac uacaucgugg aagccagcac caugcagucc 60
 augggcgauau acacuugccu caaggccuau gucauc 96

 <210> 709
 <211> 76
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 709

 gagggggaag acgggaggaa agaagggagu gguuccauca cgccuccuca cuccucuccu 60
 cccgucuucu ccucuc 76

 <210> 710
 <211> 63
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 710

 gucaggcuca gucccccucc gauaaacccc uaaauagggg cuuucccggg gggugacccu 60
 ggc 63

 <210> 711
 <211> 73
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 711

 acuuggagag aggcuggccg ugaugaauc gauucauca agcgagucan acacggcucu 60
 ccucucuuuu agu 73

 <210> 712
 <211> 68
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 712

 guauccugua cugagcugcc ccgagcuggg cagcaugaag ggccucgggg cagcucagua 60
 caggaugc 68

 <210> 713
 <211> 80
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 713

 gguacuugaa gagugguuau cccugcugug uucgcuaau uuaugacgaa ucauacaggg 60
 acauccaguu uuucaguauc 80

<210> 714
 <211> 83
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 714

 gagaaucauc ucucccagau aauggcacuc ucaaacaagu uuccaaaauug uuugaaaggc 60
 uauuucuugg ucagaugacu cuc 83
 10
 <210> 715
 <211> 84
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 715

 guggcagcuu gguggucgua ugugugacgc cauuuacuug aaccuuuagg agugacauca 60
 cauauacggc agcuaaacug cuac 84
 20
 <210> 716
 <211> 128
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 716

 uggaggccuu gcugguuugg aaaguucauu guucgacacc auggaucucc agguggguca 60
 aguuuagaga ugcaccaacc uggaggacuc caugcuguug agcuguucac aagcagcgga 120
 cacuucca 128
 30
 <210> 717
 <211> 84
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 717

 uugacuuagc uggguagugg ggaacccuuc caugaggagu agaacacucc uuaugcaaga 60
 uucccuucua ccuggcuggg uugg 84
 35
 <210> 718
 <211> 116
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 40
 <400> 718

 caacuacagc cacuacuaca ggaccaucga ggaccugcgg gacaagauuc uuggugccac 60
 cauugagaac gccaggauug uccugcagau caacaaugcu caacuggcug cagaug 116
 45
 <210> 719
 <211> 89
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 50
 <400> 719

 cuggccucca gggcuuugua caugguaggc uuucauucau ucguuugcac auucggugaa 60
 ggucuacugu gugccaggcc cugugccag 89
 55
 <210> 720
 <211> 24

<212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 720
 5 ugaacauac acgggaaacc ucuu 24

 <210> 721
 <211> 82
 <212> ARN
 10 <213> *Homo sapiens*

 <400> 721

 ugguaccuga aaagaaguug cccauguuau uuucgcuua uaugugacga aacaaacaug 60
 gugcacuucu uuucgguau ca 82
 15
 <210> 722
 <211> 17
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 20
 <210> 722
 auuacauggc caaucuc 17

 <210> 723
 25 <211> 21
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 723
 30 cagcagcaca cugugguuug u 21

 <210> 724
 <211> 124
 <212> ARN
 35 <213> *Homo sapiens*

 <400> 724

 aaccuccuu gggaagugaa gcucaggcug ugauuucag ccagggggcg uuuuucuaa 60
 acuggaugaa aagcaccucc agagcuugaa gcucacaguu ugagagcau cgucuaagga 120
 aguu 124
 40
 <210> 725
 <211> 122
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 45
 <400> 725

 gccuguccc cugugccuug ggcggggcgc uguuaagacu ugcagugaug uuuaacuccu 60
 cuccacguga acaucacagc aagucugugc ugcuucccg cccuacgcug ccugggcagg 120
 gu 122
 50
 <210> 726
 <211> 84
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 55
 <400> 726

 gcucucccuc ucuaauccuu gcuaccuggg ugagagugcu gucugaaugc aaugcaccug 60
 ggcaaggauu cugagagcga gagc 84

5 <210> 727
 <211> 84
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 727
 gcucuuccuc ucuaauccuu ugucccuggg ugagagugcu uucugaaugc aaugcacccg 60
 ggcaaggauu cugagagggg gagc 84
 10 <210> 728
 <211> 55
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 728
 auccuugcua ucugggugcu agugcuggcu caaugcaug caccugggca aggau 55
 20 <210> 729
 <211> 71
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 729
 25 ugcccuagca gcggaacag uucugcagug agcgauccgu gcucuggggg auuguuuuccg 60
 cugccagggu a 71
 30 <210> 730
 <211> 83
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 730
 35 gcugcuguug ggagaccug gucugcacuc uaucuguauu cuuacugaag ggagugcagg 60
 gcagggguuuc ccauacagag ggc 84
 40 <210> 731
 <211> 84
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 731
 45 gaugcaccca gugggggagc caggaaguau ugauguuucu gccaguuuag cgucaacacu 60
 ugcugguuuc cucucuggag cauc 84
 50 <210> 732
 <211> 124
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 732
 55 gccaccacca ucagccauac uauguguagu gccuuauuca ggaagguguu acuuauuaga 60
 uuaauuuug uaaggcacc uucugaguag aguaugugc aacauaggaca acuuuugugg 120
 uggc 124
 <210> 733
 <211> 94
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 733

gugcugugug uagugcuuca cuucaagaag ugccaugcau gugucuagaa auauguuuug 60
caccuuuugg agugaaauaa ugcacaacag auac 94

5 <210> 734
<211> 115
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 734

ccaccuucag cugaguguag ugcccuacuc cagagggcgug cacucaugua aacuaaaaca 60
ugauuguagc cuuuuggagu agaguaauac acaucacgua acgcauuuu ggugg 115

15 <210> 735
<211> 94
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 735

caugcugugu gugguacccu acugcagaca guggcaauca uguauaaaua aaaaugauug 60
guacgucugu ggguagagua cugcaugaca caug 94

25 <210> 736
<211> 74
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 736

30 gugguguccu acucaggaga guggcaauca cauguaauua ggugugauug aaaccucuaa 60
gaguggagua acac 74

35 <210> 737
<211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 737

40 caauagacac ccaucguguc uuuugcucug cagucaguaa auauuuuuuu gugaauugugu 60
agcaaaagac agaugggugg uccaauug 87

45 <210> 738
<211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 738

50 caauagacac ccaucguguc uuuugcucug cagucaguaa auauuuuuuu gugaauugugu 60
agcaaaagac agaugggugg uccaauug 87

55 <210> 739
<211> 84
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 739

	ucucagucug uggcacucag ccuugagggc acuuucuggu gccagaauga aagugcuguc 60 auagcugagg uccaugacu gagg 84	
5	<210> 740 <211> 98 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 740	
10	gguacuucuc agucuguggc acucagccuu gagggcacuu ucuggugcca gaaugaaagu 60 gcugucauag cugaggucca augacugagg cgagcacc 98	
15	<210> 741 <211> 129 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 741	
20	gggaugccac auucagccau ucagcguaca gugccuuuca cagggaggug ucauuuangu 60 gaacuaaaau auaaaauuca ccuuucugag aaggguaaug uacagcaugc acugcauau 120 ugguguccc 129	
25	<210> 742 <211> 127 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 742	
30	gggaugccaca uucagccauu cagugugcag ugccuuucac agggaggugu cauuuangu 60 aacuaaaaua uaaauuucac cuuucugaga aggguaaugu acagcaugca cugcauangu 120 ggugucc 127	
35	<210> 743 <211> 58 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 743 cuacucugga gagugacaau cauguauaau uaaauuugau ugacacuucu gugaguag 58	
40	<210> 744 <211> 58 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 744 cuacucugga gagugacaau cauguauaac uaaauuugau ugacacuucu gugaguag 58	
45	<210> 745 <211> 58 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i> <400> 745 cuacucugga gagugacaau cauguauaac uaaauuugau ugacacuucu gugaguag 58	
50	<210> 746 <211> 83 <212> ARN <213> <i>Homo sapiens</i>	

<400> 746

ucucaugcag ucauucucca aaagaaagca cuuucuguug ucugaaagca gagugccuuc 60
uuuuggagcg uuacuguuug aga 83

5 <210> 747
<211> 83
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 747

ucucaugcag ucauucucca aaagaaagca cuuucuguug ucugaaagca gagugccuuc 60
uuuuggagcg uuacuguuug aga 83

15 <210> 748
<211> 90
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 748

ucucaggcug ugaccuucuc gaggaaagaa gcacuuucug uugucugaaa gaaaagaaag 60
ugcuuccuuu cagaggguaa cgguuugaga 90

25 <210> 749
<211> 90
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 749

30 ucucagguug ugaccuucuc gaggaaagaa gcacuuucug uugucugaaa gaaaagaaag 60
ugcuuccuuu cagaggguaa cgguuugaga 90

35 <210> 750
<211> 85
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 750

40 ucucaugaug ugaccaucug gagguaagaa gcacuuugug uuuugugaaa gaaagugcuu 60
ccuuucagag gguuacucuu ugaga 85

45 <210> 751
<211> 90
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 751

ucucaggcug ugaccaucug gagguaagaa gcacuuucug uuuugugaaa gaaaagaaag 60
ugcuuccuuu cagaggguaa cucuuugaga 90

50 <210> 752
<211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

55 <400> 752

ucucagggcag ugacccucua gauggaagca cugucuguug uauaaaagaa aagaucgugc 60
aucccuuuag aguguuacug uuugaga 87

<210> 753
<211> 67
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 753

gugacccucu agauggaagc acugucuguu gucuaagaaa agaucgugca ucccuuuaga 60
guguuac 67

<210> 754
<211> 95
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 754

gaagaucuca ggcagugacc cucuagaugg aagcacuguc uguugucuaa gaaaagaucg 60
ugcauccuuu uagaguguua cuguuugaga aaauc 95

<210> 755
<211> 85
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 755

ucucaagcug ugacugcaaa ggggaagcccu uucuguuguc ugaaagaaga gaaagcgcuu 60
cccuuugcug gauuacgguu ugaga 85

<210> 756
<211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 756

ucucaagcug ugggucugca aaggggaagcc cuuucuguug ucuaaaagaa gagaaagcgc 60
uucccuuugc uggauuacgg uuugaga 87

<210> 757
<211> 83
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 757

ucaugcugug gcccuccaga ggggaagcgcu uucuguuguc ugaaagaaaa caaagcgcu 60
cccuuuagag guuuacgguu uga 83

<210> 758
<211> 101
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 758

gcgagaagau cucaugcugu gacucucugg aggggaagcac uuucuguugu cugaaagaaa 60
acaaagcgcu ucucuuuaga guguuacgg uugagaaaaag c 101

<210> 759
 <211> 87
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 759
 ucccaugcug ugaccucua gagggaagca cuuucuguug ucugaaagaa accaaagcgc 60
 ucccuuugg agcguuacgg uuugaga 87
 10
 <210> 760
 <211> 88
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 760
 ucucaggcug ugaccucua gagggaagcg cuuucuguug gcuaaaagaa aagaaagcgc 60
 ucccuuucag aguguuaacg cuuugaga 88
 20
 <210> 761
 <211> 87
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 761
 ucucaggcug ugaccucua gagggaagca cuuucucuug ucuaaaagaa aagaaagcgc 60
 uucucuuuag aggauuacuc uuugaga 87
 30
 <210> 762
 <211> 85
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 35
 <400> 762
 cucaggcugu gacacucuag agggaagcgc uuucuguugu cugaaagaaa ggaaagugca 60
 uccuuuuaga guguuacugu uugag 85
 40
 <210> 763
 <211> 87
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 45
 <400> 763
 ucucaggcug uguccucua cagggaagcg cuuucuguug ucugaaagaa aggaaagugc 60
 auccuuuuag aguguuacug uuugaga 87
 50
 <210> 764
 <211> 81
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 55
 <400> 764
 caugcuguga ccucucagag ggaagcgcuu ucuguugucu gaaagaaaag aaagugcauc 60
 cuuuuagagg uuucucuguu g 81

<213> *Homo sapiens*

<400> 765

5 **ucucagccug ugaccucua gagggaagcg cuuucuguug ucugaaagaa aagaaagugc 60**
aucuuuuuag aggauuacag uuugaga 87

<210> 766

<211> 88

<212> ARN

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 766

15 **ucccaugcug ugaccucca aaggggaagcg cuuucuguuu guuuucucu aaacaaagug 60**
ccuccuuua gaguguuacc guuuggga 88

<210> 767

<211> 84

<212> ARN

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 767

25 **ucucaugcag ucauucucca aaagggagca cuuucuguuu gaaagaaaac aaagugccuc 60**
cuuuagagu guuacuguuu gaga 84

<210> 768

<211> 85

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

30 <400> 768

35 **cucagggcug gaccuccag aggggaaguac uuucuguugu cugagagaaa agaaagugcu 60**
ucccuuugga cuguuucggu uugag 85

<210> 769

<211> 61

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 769

40 **cccucuacag ggaagcgcuu ucuguugucu gaaagaaaag aaagugcuuc cuuuuagagg 60**
g 61

<210> 770

<211> 87

<212> ARN

<213> *Homo sapiens*

<400> 770

45 **ucucagggcug ucguccucua gagggaagca cuuucuguug ucugaaagaa aagaaagugc 60**
uuccuuuuag aggguuaccg uuugaga 87

<210> 771

<211> 87

<212> ARN

55 <213> *Homo sapiens*

<400> 771

ucucaagcug ugagucuaca aaggggaagcc cuuucuguug ucuaaaagaa aagaaagugc 60
uucucuuugg uggguuacgg uuugaga 87

5 <210> 772
<211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 772

ucuccugcug ugaccucuaa gauggaagca guuucuguug ucugaaagga aagaaagugc 60
uuccuuuuug agggguuacug uuugaga 87

15 <210> 773
<211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 773

ucucagggcug ugaccucuaa aaggggaagcg cuuucugugg ucagaaagaa aagcaagugc 60
uuccuuuuuag agggguuacgg uuuggga 87

25 <210> 774
<211> 90
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

30 <400> 774

ucccaugcug ugaccucuaa gaggaagcac uuucuguuug uugucugaga aaaaacaaag 60
ugcuucccuu uagaguguua ccguuuggga 90

35 <210> 775
<211> 88
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

40 <400> 775

ucccaugcug ugaccucuaa gaggaagcac uuucuguuug uugucugaga aaaaacaaag 60
ugcuucccuu uagaguuacu guuuggga 88

45 <210> 776
<211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

50 <400> 776

ucucagggcug ugaccucuaa aaggggaagaa cuuucuguug ucuaaaagaa aagaacgcac 60
uucccuuuuag aguguuacgg ugugaga 87

55 <210> 777
<211> 87
<212> ARN
<213> *Homo sapiens*

<400> 777

ucucggggcug ugacucucca aaggggaagaa uuuucucuug ucuaaaagaa aagaacgcac 60
uucccuuuuag aguguuacgg ugugaga 87

5 <210> 778
 <211> 87
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 778
 ucucagggcug ugucccucua gagggaagcg cuuucuguug ucugaaagaa aagaaaaugg 60
 uucccuuuag aguguuacgc uuugaga 87
 10 <210> 779
 <211> 87
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 15 <400> 779
 ucucaugcug ugacccucua gagggaagcg cuuucuguug ucugaaagaa aagaacgcgc 60
 uucccuauag agguuaccc uuugaga 87
 20 <210> 780
 <211> 87
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 780
 ucucaugcug ugacccuaca aagggaagca cuuucucuug uccaaaggaa aagaaggcgc 60
 uucccuuug aguguuacgg uuugaga 87
 30 <210> 781
 <211> 85
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 781
 cucaagcugu gacucuccag agggauagcac uuucucuau gugaaaaaaa agaaggcgcu 60
 ucccuuuaga gcguuacgg uuugg 85
 40 <210> 782
 <211> 85
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 782
 45 cucagggcugu gaccucuaag agggauagcac uuucuguugc uugaaagaag agaaagcgcu 60
 uccuuuuaga ggauuacucu uugag 85
 50 <210> 783
 <211> 65
 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 783
 55 gugaccucuc agagggaagc acuuucuguu gaaagaaaag acaugcauc cuuucagagg 60
 guuac 65
 <210> 784
 <211> 83

ES 2 503 740 T3

<212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 784
 5
 ucaggcugug acccucuuga ggggaagcacu uucuguuguc ugaaagaaga gaaagugcuu 60
 ccuuuuagag gcuuacuguc uga 83
 <210> 785
 <211> 85
 10 <212> ARN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 785
 15 ucucaagcug ugacugcaaa ggggaagcccu uucuguuguc uaaaagaaaa gaaagugcuu 60
 cccuuugug aauuacgguu ugaga 85
 <210> 786
 <211> 72
 20 <212> ARN
 <213> *Mus musculus*
 <400> 786
 25 cuugggaug gcgaggaaac cguuaccuu acugaguua guaaugguua cgguucucu 60
 gcugcucca ca 72
 <210> 787
 <211> 85
 30 <212> ARN
 <213> *Mus musculus*
 <400> 787
 35 gcuaagcagu uacaacuguu ugcagaggaa acugagacuu uauaacuau ucucagucuc 60
 aucugcaaag agguaagugc uuugc 85
 <210> 788
 <211> 75
 40 <212> ARN
 <213> *Mus musculus*
 <400> 788
 45 cuuuaccuaa uuuguugucc aucauguaaa acauaaauga ugauagacac cauauaaggu 60
 agaggaaggu ucacu 75
 <210> 789
 <211> 71
 50 <212> ARN
 <213> *Mus musculus*
 <400> 789
 55 accuuguuau gggggucugg gguaaggagu ggucaucagg gggguacuacc aaguuuauuc 60
 ugugagauag a 71
 <210> 790
 <211> 74
 55 <212> ARN
 <213> *Mus musculus*

<400> 790

gcccuaauua gaauggcacu gaugugauaa aaauaaaaau ugaucagggc cuuucuaagu 60
agaguaaggc uuac 74

5 <210> 791
<211> 73
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

10 <400> 791

uauauguguu uaugugugug uacauguaca uaugugaaua ugauauccau auacauacac 60
gcacacauaa gac 73

15 <210> 792
<211> 71
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

20 <400> 792

gugccugugu gcguaagugc cugcauguau augcguguau auuuuugca uauacauaca 60
cacaccuaca c 71

25 <210> 793
<211> 78
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 793

30 auaagaaacu uggcgugucg ugacugaugu acugauaaga aacucagugu gauaugacug 60
augugcgugu gucugucu 78

35 <210> 794
<211> 74
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 794

40 cgcggugccu cuuucuuuga ucuugguguc cucaaauuga aagccaagga agaggugggg 60
ggcgugguag ccuu 74

45 <210> 795
<211> 75
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 795

cagugcucuu cuuggacugg cacuggugag uuaaacuaaa uacaaccagu accuuucuga 60
gaagaguaaa gcuca 75

50 <210> 796
<211> 67
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

55 <400> 796

gugcuuuacg uaguauagug cuuuucacau uaaacaaaaa gugaaaggug ccuacuaug 60
uauagga 67

<210> 797
<211> 73
5 <212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 797

gagggggaag acgggagaag agaagggagu gguuuuuggg ugccucacuc cucccccucc 60
gucuuguucu cuc 73

<210> 798
<211> 58
15 <212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 798
gucaggcuca gucccccucc gauaaaccuc aaaauaggu cuuaccuagg gggcuggc 58

<210> 799
<211> 73
20 <212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 799

acuuggagag aggcuggccg ugaugaauc gauucaucua aacgagucan acacggcucu 60
ccucucuucu agu 73

<210> 800
30 <211> 65
<212> ARN
<213> *Mus musculus*

<400> 800

gcauccugua cugagcugcc ccgagcugag cacagugaag gaccucgggg cagcucagua 60
cagga 65

<210> 801
40 <211> 72
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 801

uuugggaaug gcgaggaaac cguuaccuu acugaguuaa guaaugguaa ugguucucu 60
gcugcuccca ca 72

<210> 802
50 <211> 73
<212> ARN
<213> *Rattus norvegicus*

<400> 802

gagggggaag acgggagaag agaagggagu gguuuuuggg ugccucacuc cucccccucc 60
gucuuguucu cuc 73

<210> 803
55 <211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético

<400> 803

tcatcgtctc aaatgagtct 20

10

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de ácido nucleico miARN sintético que comprende una secuencia con una identidad de secuencia al menos un 80% con la secuencia del miR-147 maduro humano para su uso en la terapia de un cáncer.
- 5 2. Un ácido nucleico miARN sintético para su uso en una terapia de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 1 que además se define como una molécula de ácido nucleico de entre 17 y 125 restos de longitud, que comprende
 - una región de miARN cuya secuencia de 5' a 3' es al menos idéntica en un 80% a un miARN maduro miR-147, y
 - una región complementaria cuya secuencia de 5' a 3' es complementaria entre un 60% y el 100% a la región de miARN.
- 10 3. Un ácido nucleico miARN sintético para su uso en una terapia de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que comprende una región de miARN cuya secuencia de 5' a 3' es idéntica en al menos un 85% a una secuencia de miR-147 maduro.
4. Un ácido nucleico miARN sintético para su uso en una terapia de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 3, que comprende una región de miARN cuya secuencia de 5' a 3' es idéntica en al menos un 90% a una secuencia de
 15 miR-147 maduro.
5. Un ácido nucleico miARN sintético para su uso en una terapia de un cáncer de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, que comprende una región de miARN cuya secuencia de 5' a 3' es idéntica a una secuencia de miR-147 maduro.
6. Un ácido nucleico miARN sintético para su uso en una terapia de un cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el ácido nucleico comprende dobles cadenas separadas.
- 20 7. Un ácido nucleico miARN sintético para su uso en una terapia de un cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el ácido nucleico es una molécula en horquilla.
8. Un ácido nucleico miARN sintético para su uso en una terapia de un cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para su administración a una célula o a un paciente que tiene la célula identificada como que necesita una terapia de un cáncer.
- 25 9. Un ácido nucleico miARN sintético para su uso en una terapia de un cáncer de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en una terapia de tratamiento de un cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, o cáncer de piel.
10. Un ácido nucleico miARN sintético de cadena doble de 17-30 nucleótidos de longitud que comprende un primer polinucleótido que tiene una secuencia con al menos una identidad de secuencia de un 80% con una secuencia de
 30 miR-147 maduro que comprende los nucleótidos 47-66 de la SEC ID N° 113, y un segundo polinucleótido separado cuya secuencia de 5' a 3' es complementaria entre un 60% y el 100% con el primer polinucleótido, para su uso como un medicamento.
11. Un ácido nucleico miARN sintético para su uso como un medicamento de acuerdo con la reivindicación 10, **que se caracteriza porque** el ácido nucleico está definido además como en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7.
- 35 12. Un ácido nucleico miARN sintético para su uso como un medicamento de acuerdo con la reivindicación 10 u 11 que comprende además uno o más de los siguientes:
 - (i) un grupo de sustitución del fosfato o el hidroxilo del nucleótido en el extremo 5' de la cadena complementaria de la molécula de ARN;
 - (ii) una o más modificaciones en los azúcares de los primeros o últimos 1 a 6 restos de la región complementaria;
 - 40 o
 - (iii) una no complementariedad entre uno o más nucleótidos de los últimos 1 a 5 restos del extremo 3' de la región complementaria y los correspondientes nucleótidos de la región miARN.
13. Un ácido nucleico miARN sintético para su uso como un medicamento de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, que comprende i) al menos un nucleótido modificado que bloquea el OH 5' o fosfato en el extremo 5', en el que la
 45 modificación del al menos un nucleótido es un NH₂, biotina, un grupo amino, un grupo alquilamino inferior, un grupo acetilo o una modificación 2' oxígeno-metilo (2' O-Me), o ii) al menos una modificación de la ribosa seleccionada de entre 2'F, 2'NH₂, 2'N₃, 4'tio, o 2' O-CH₃.
14. Un ácido nucleico miARN sintético para su uso como un medicamento de acuerdo con las reivindicaciones 10 a 13 que es un polinucleótido de cadena sencilla, o un polinucleótido de cadena doble.
- 50 15. El uso de un ácido nucleico miARN sintético como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para la reducción de la viabilidad celular o la proliferación celular, con la condición de que se excluyan los procedimientos para el tratamiento del cuerpo humano o animal por medio de cirugía o terapia.

Fig. 1

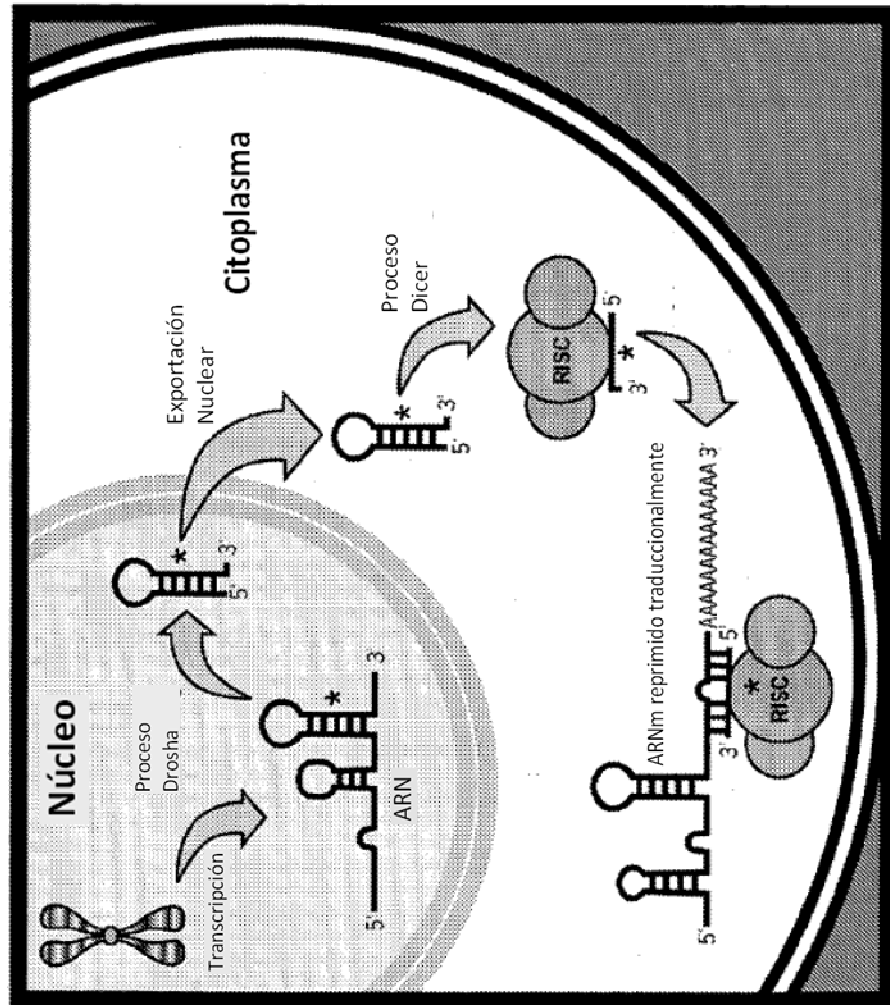


Fig. 2

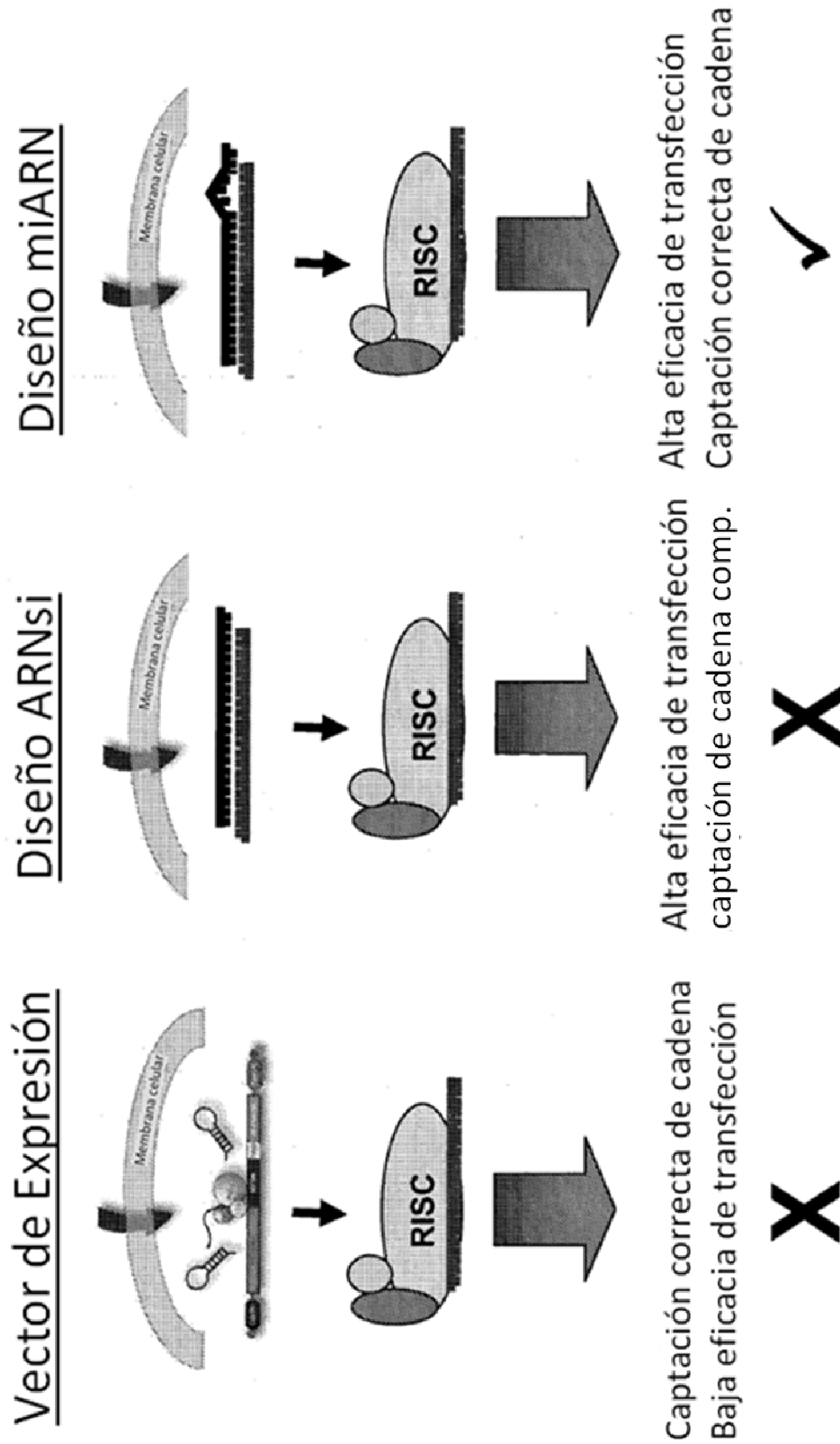


Fig. 3

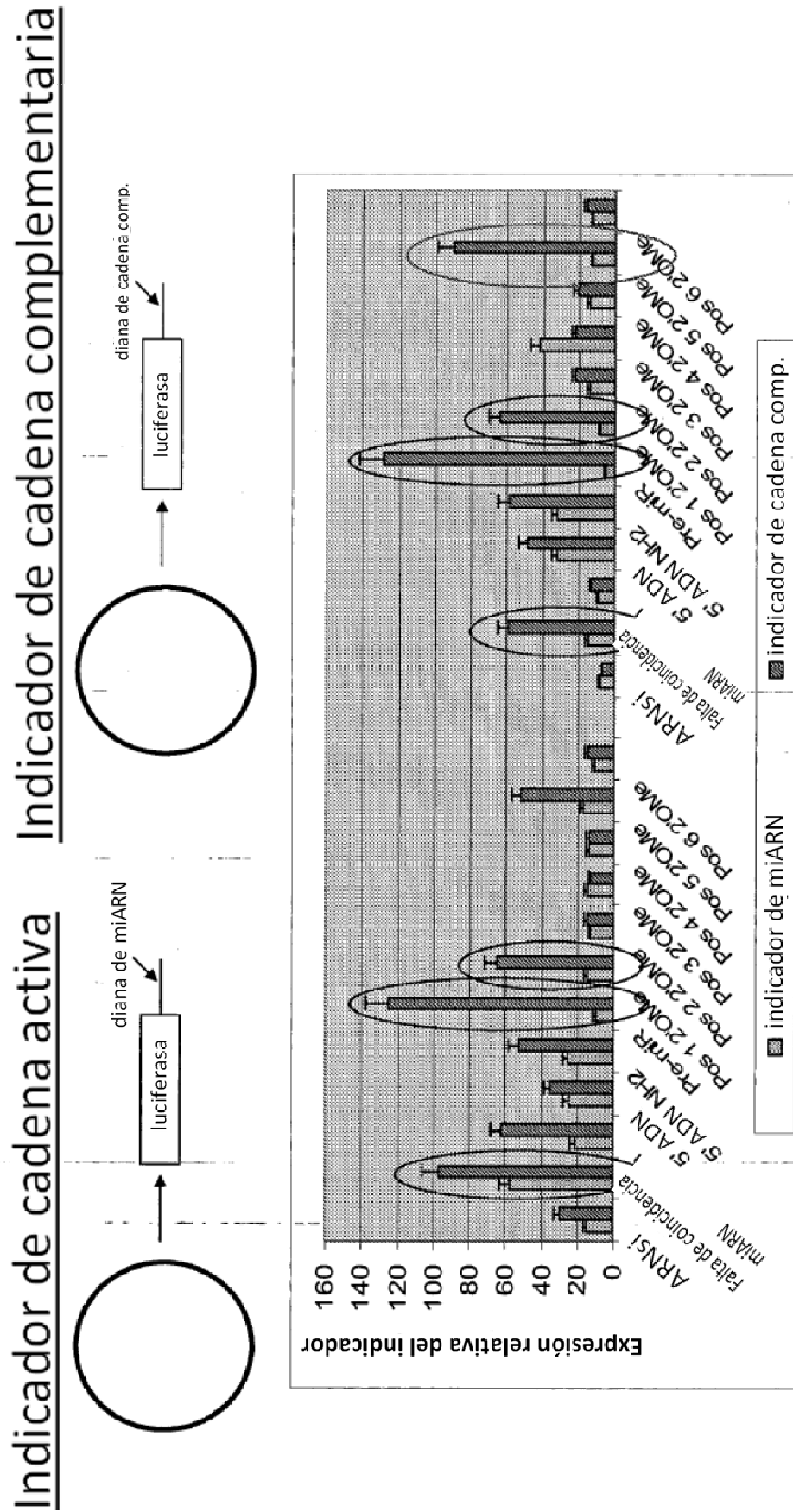


Fig. 4

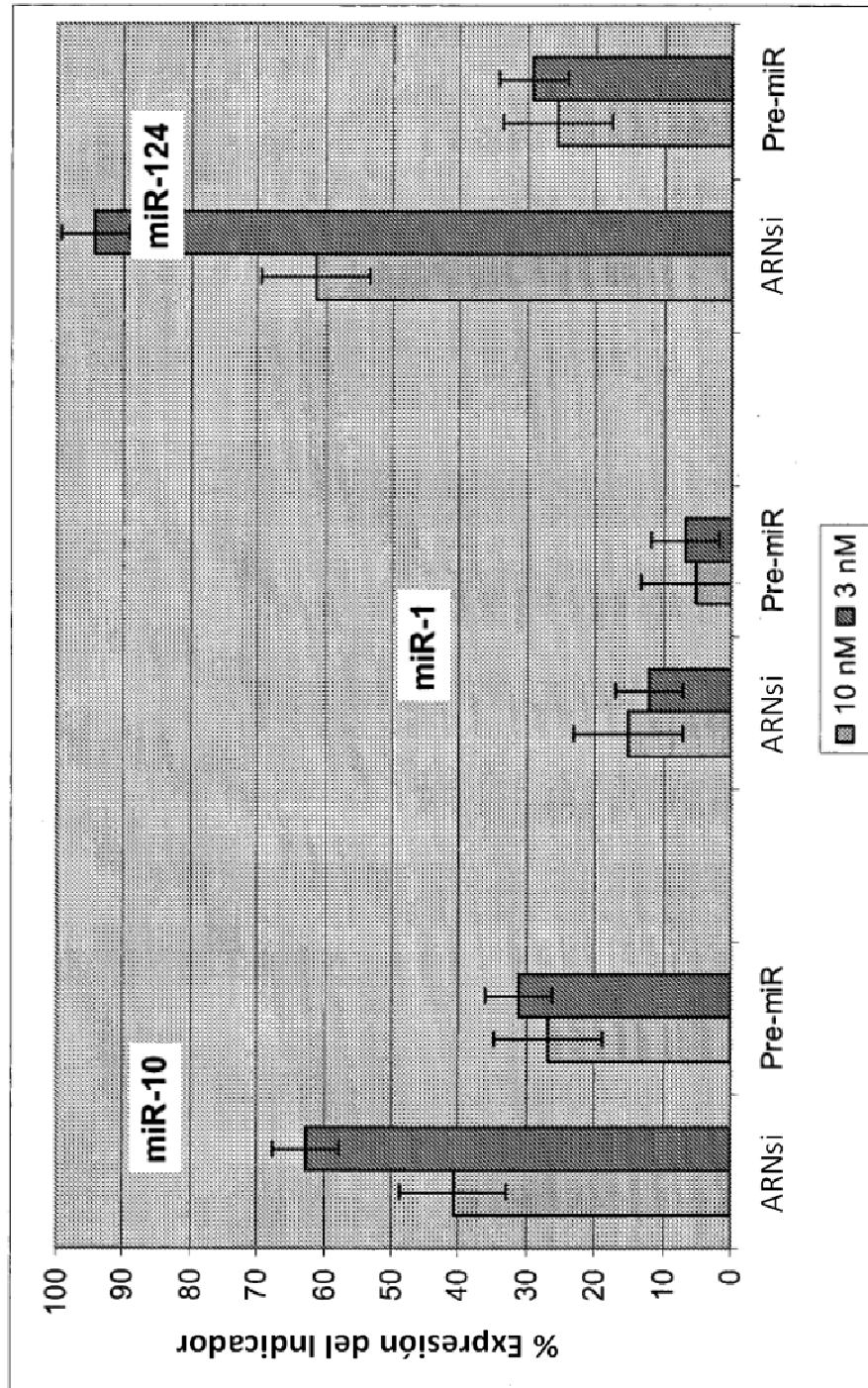
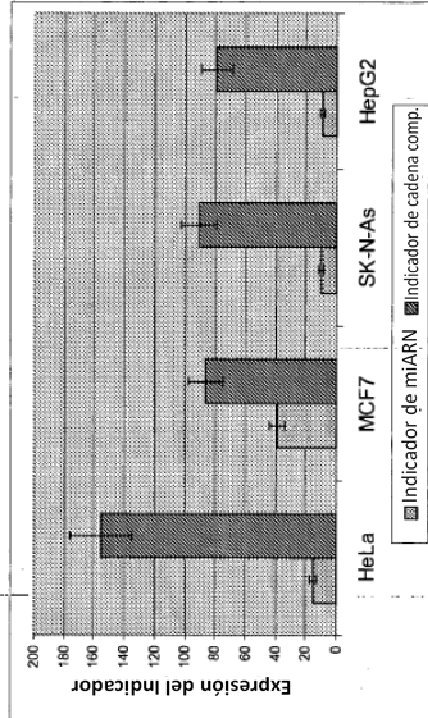


Fig. 5

**miARN sintéticos en
múltiples tipos celulares**



**Efecto de miARN sintéticos
sobre dianas endógenas**

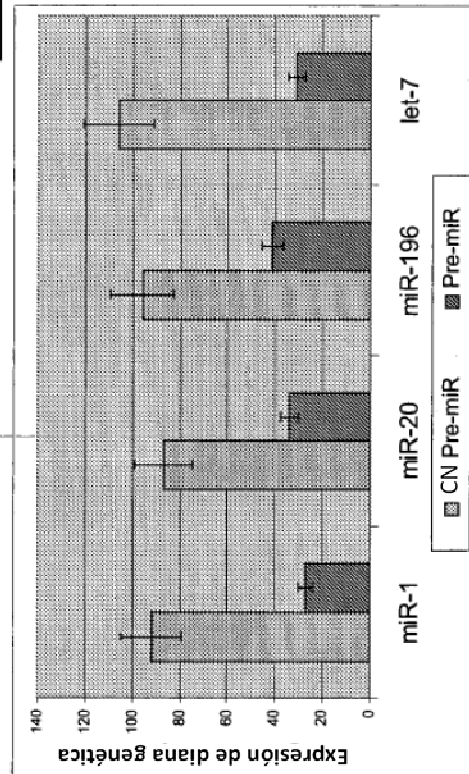


Fig. 6

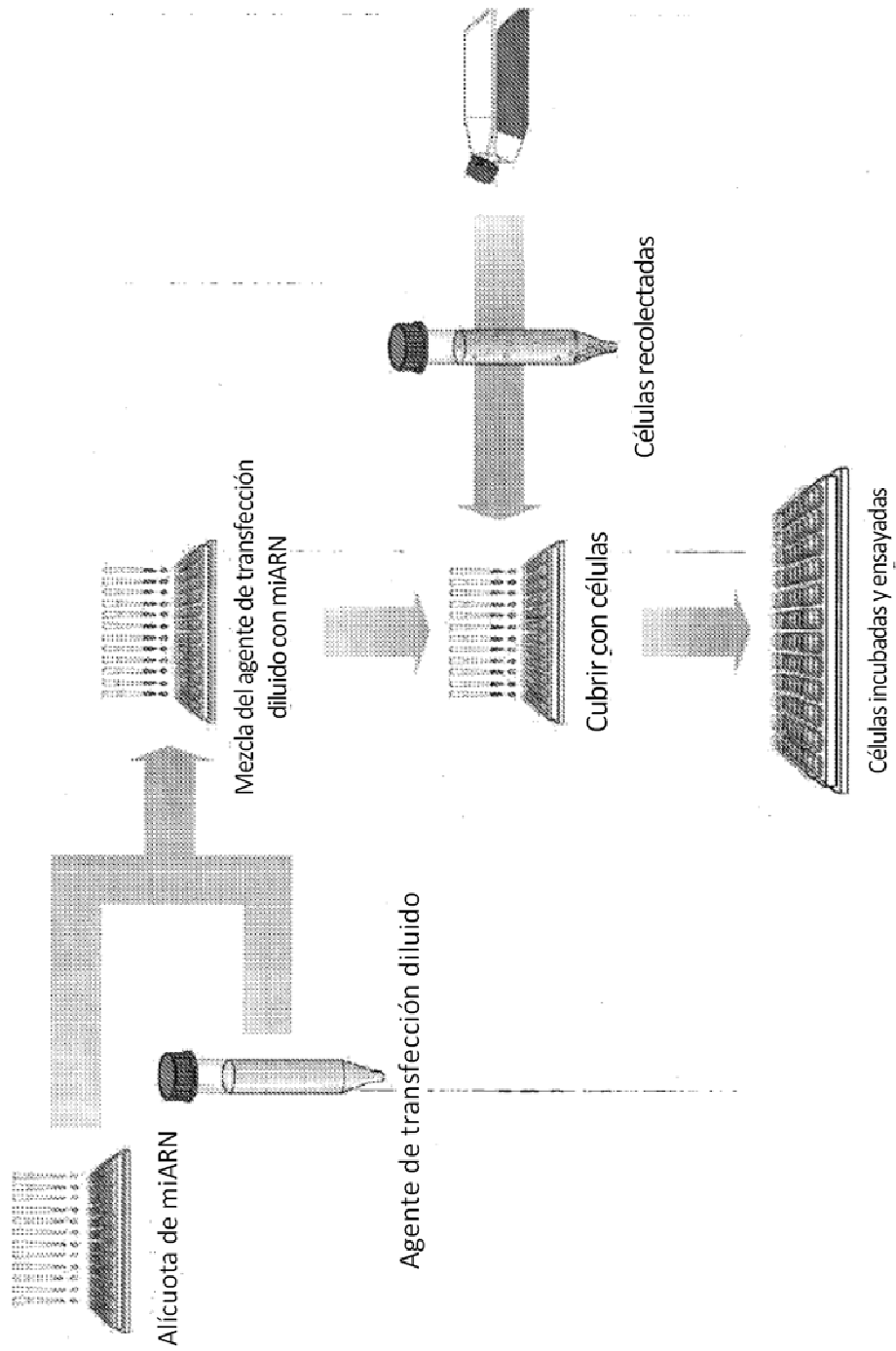


Fig. 7

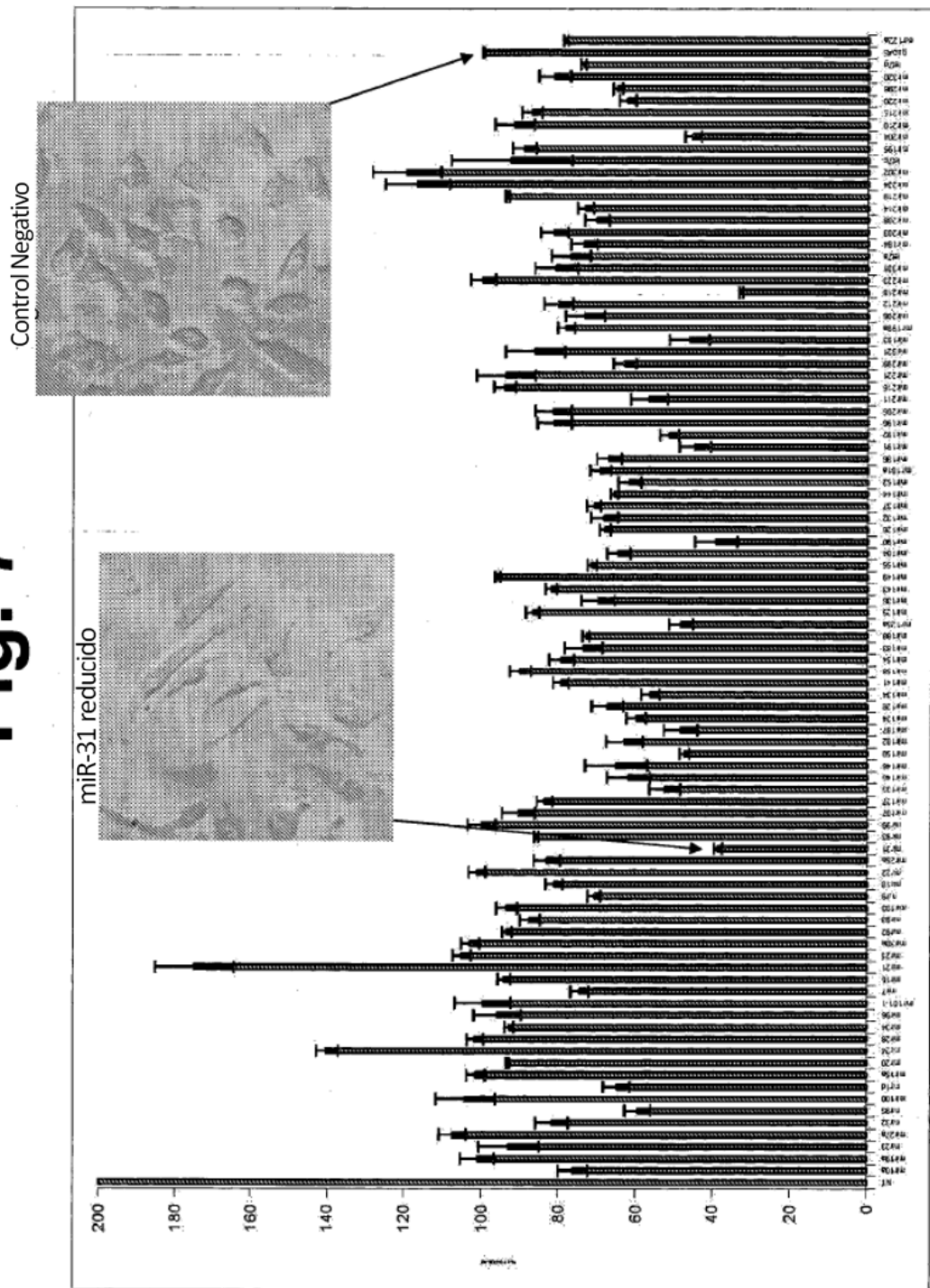


Fig. 8

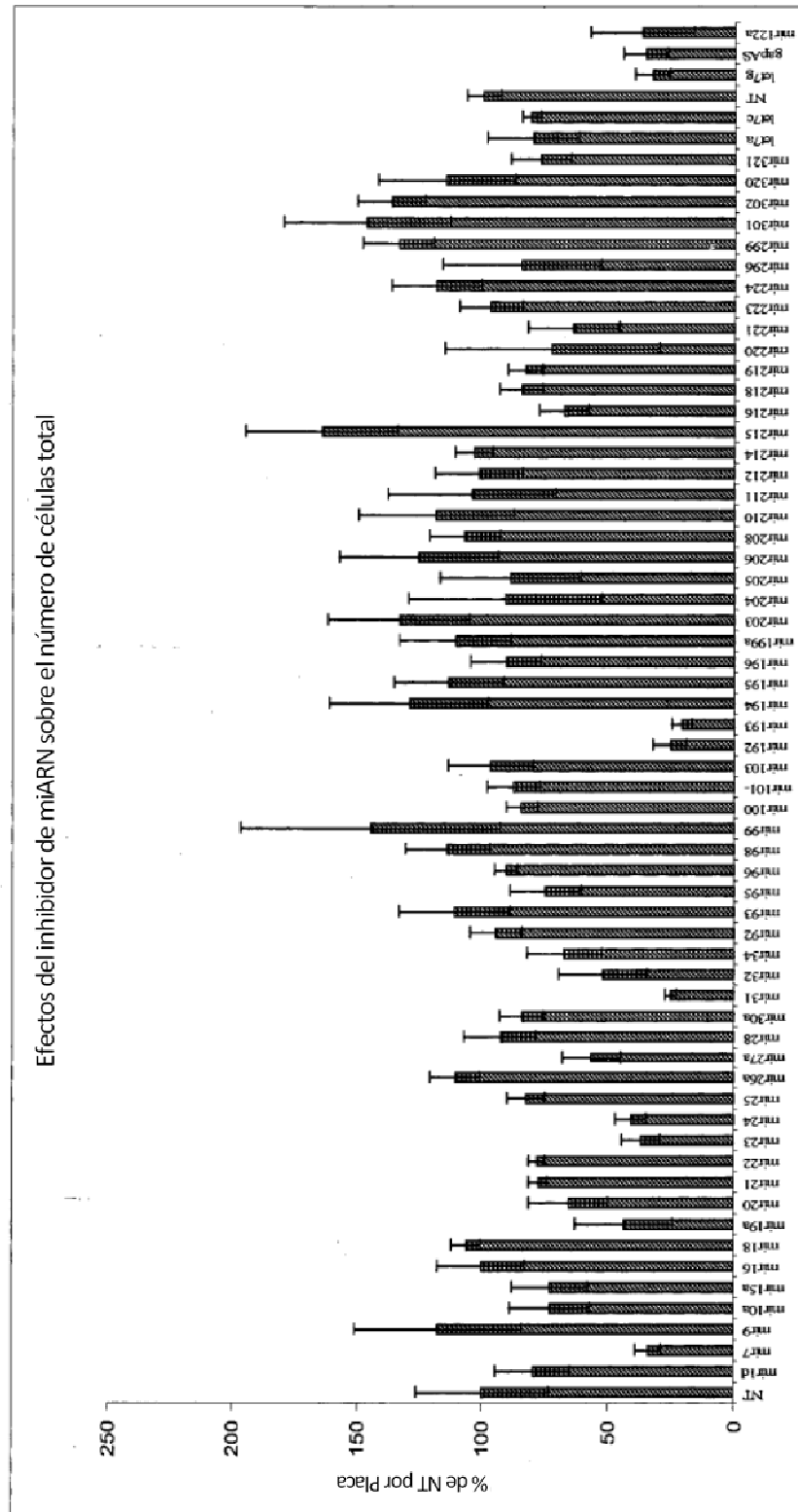
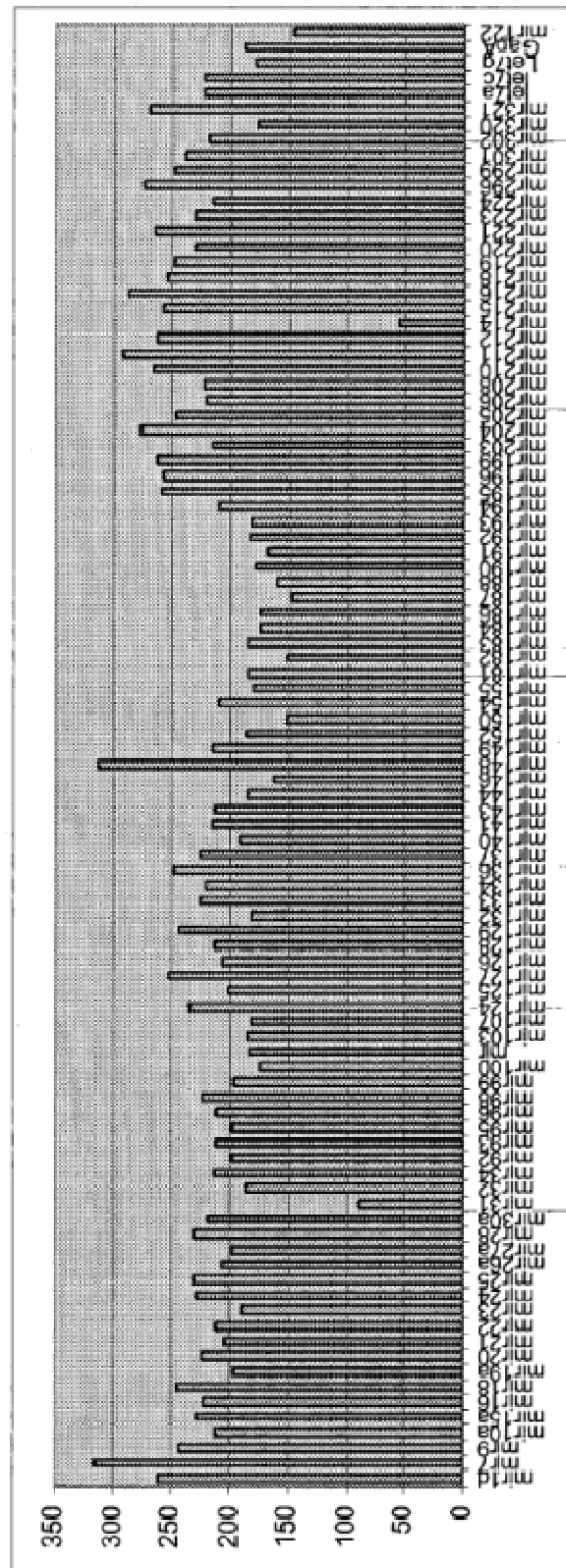


Fig. 9



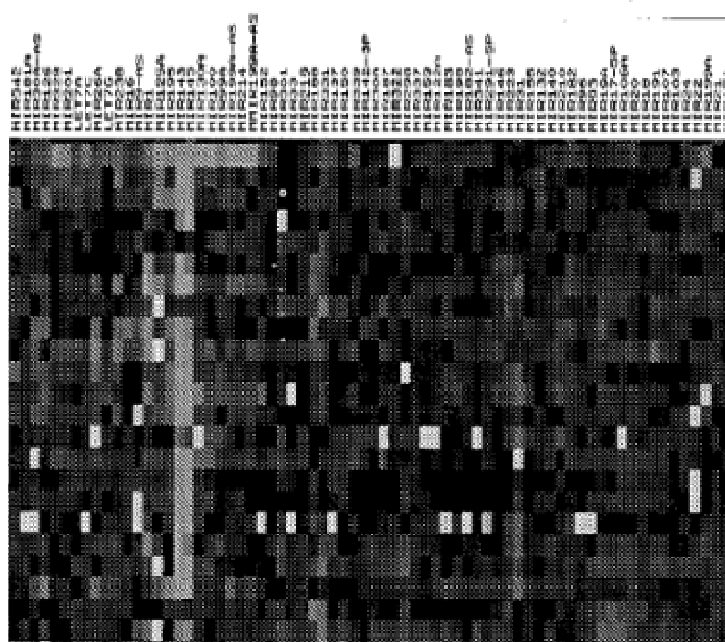
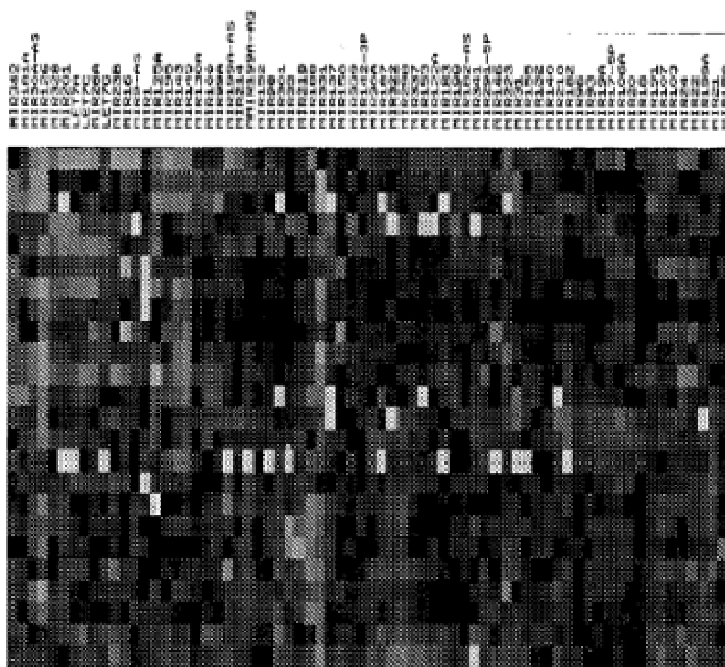


FIG. 10



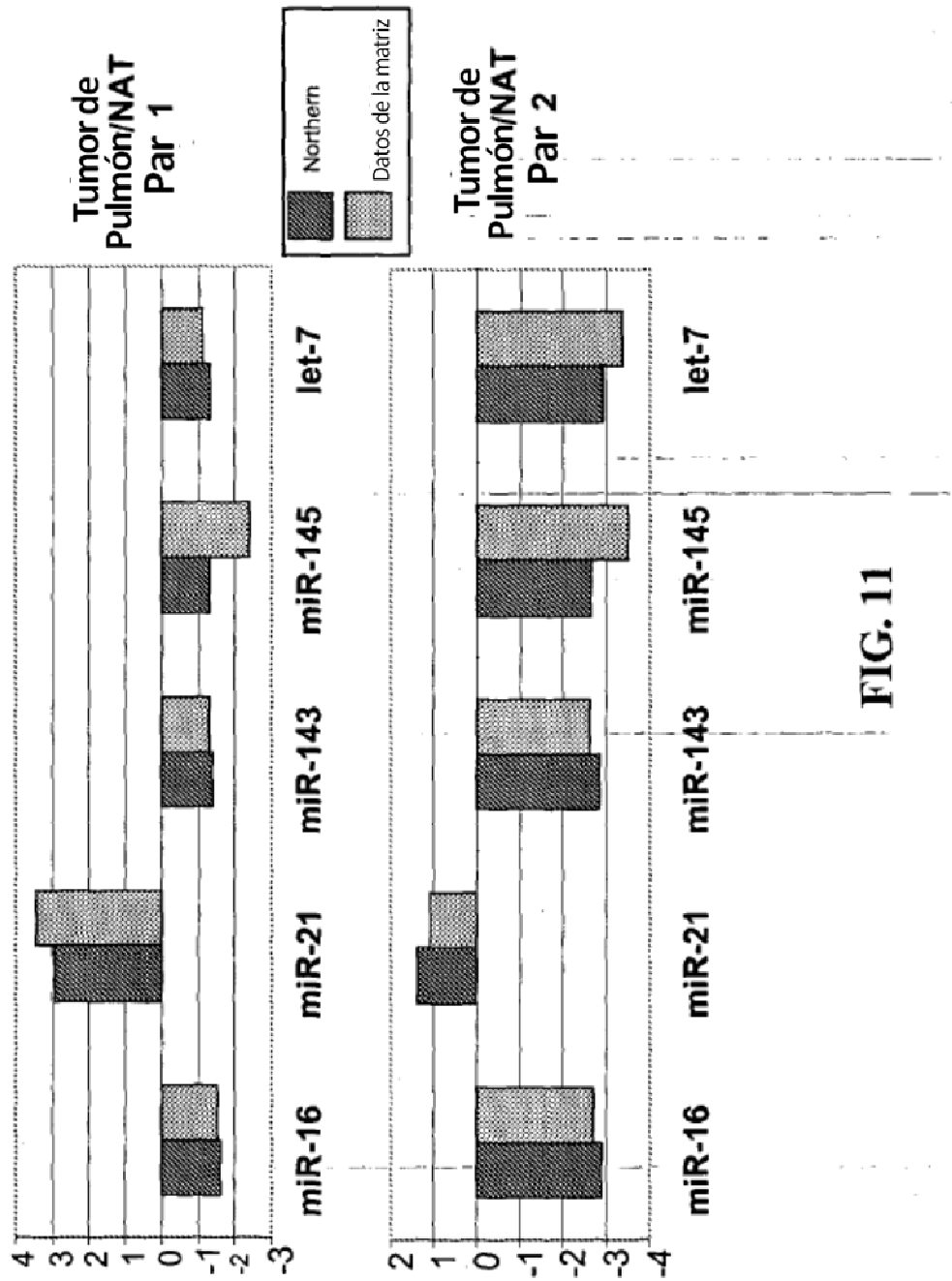


FIG. 11

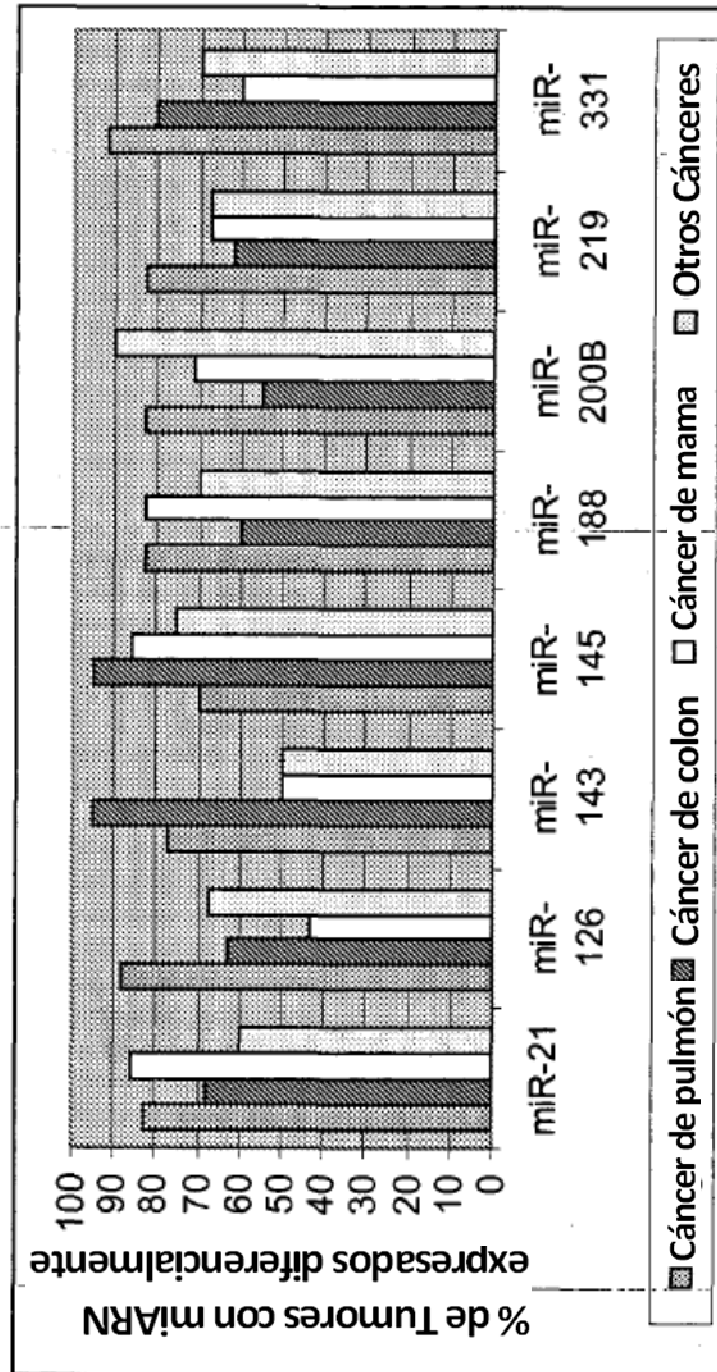


FIG. 12

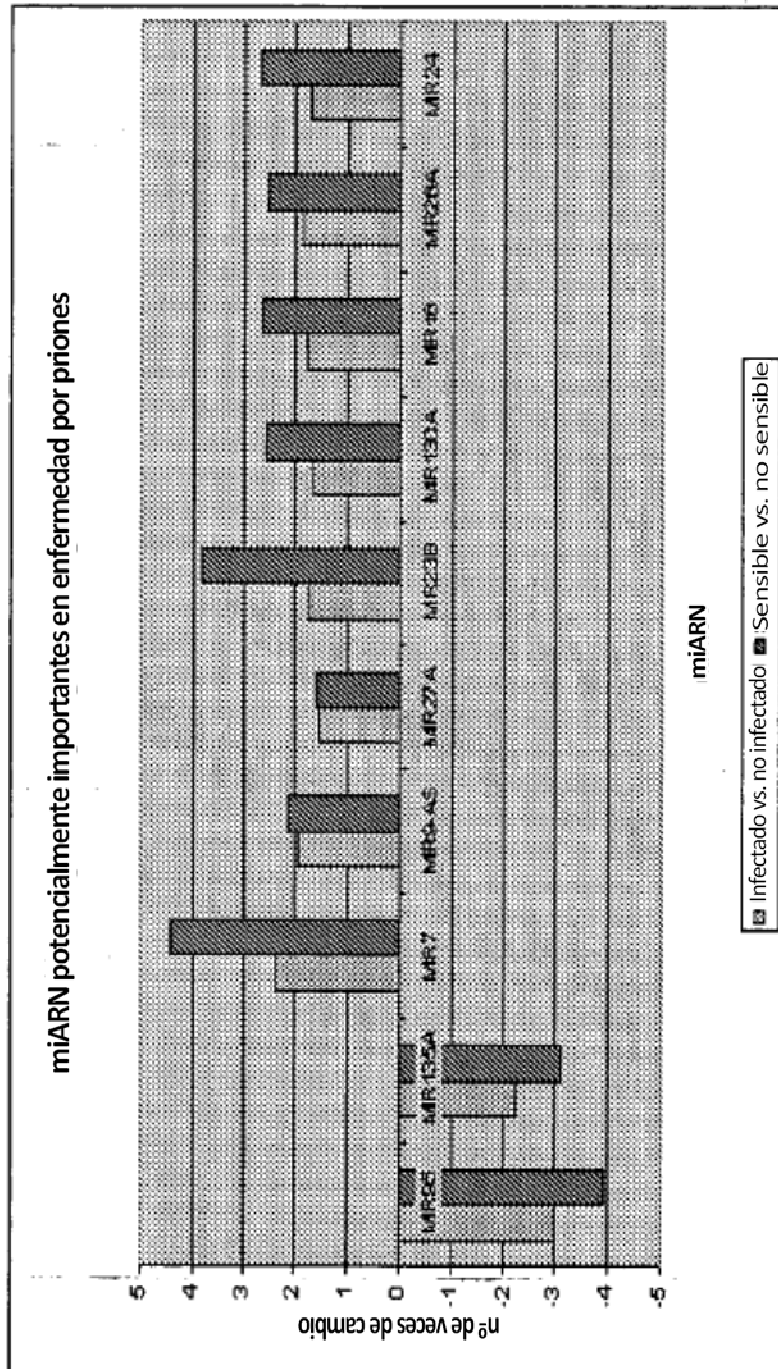


FIG. 13

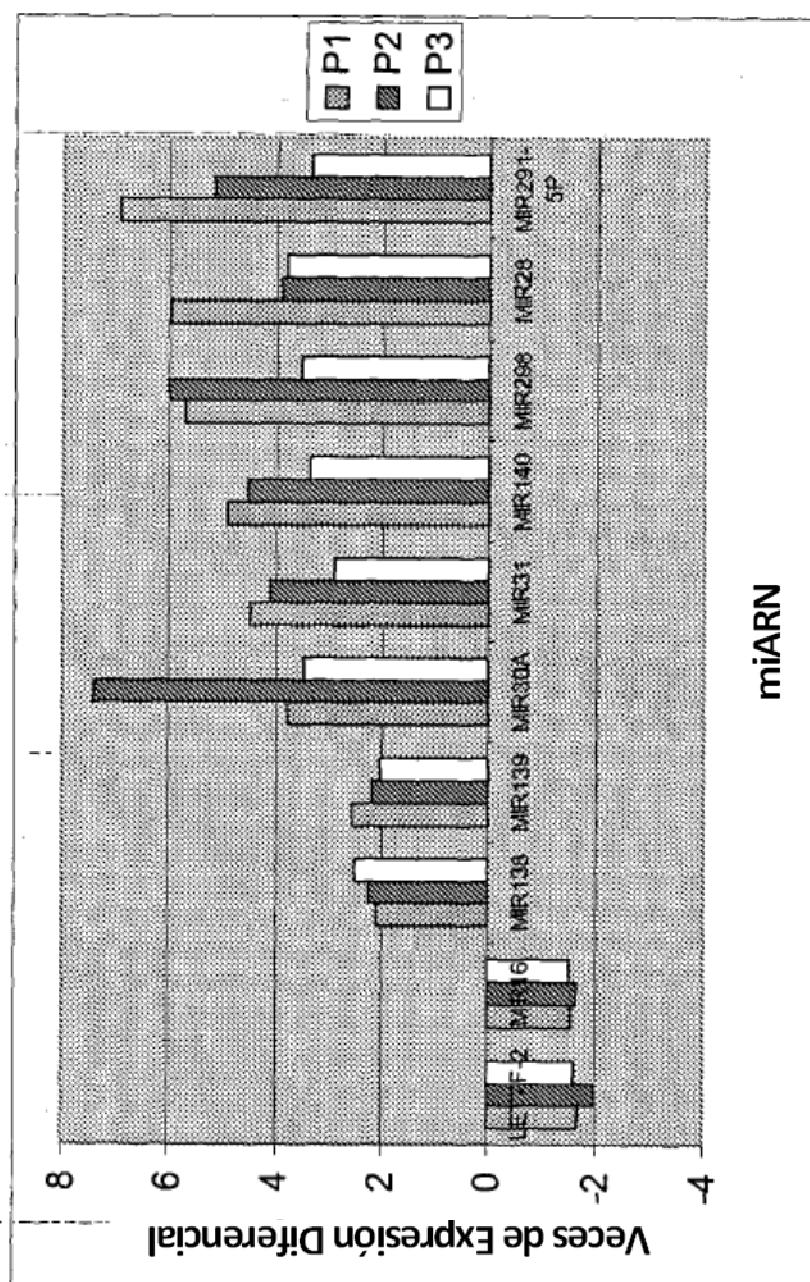


FIG. 14

Mama BT549			Mama MCF12A			Cuello uterino HeLa			Próstata 22 Rv1		
miARN	% de cont neg	Desv. Estánd	miARN	% de cont neg	Desv. Estánd	miARN	% de cont neg	Desv. Estánd	miARN	% de cont neg	Desv. Estánd
mir-101	87	3	mir-126	88	32	mir-1	20	2	mir-126	63	3
mir-105	88	2	mir-142	87	27	mir-101	12	2	mir-101	77	9
mir-124	88	5	mir-147	87	33	mir-124	16	4	mir-103	75	10
mir-126	82	2	mir-206	86	12	mir-192	13	3	mir-105	75	12
mir-129	85	1	mir-208	87	12	mir-193	5	2	mir-107	84	22
mir-132	87	4	mir-210	86	11	mir-195	21	7	mir-124	77	6
mir-142	87	4	mir-211	83	7	mir-201	26	7	mir-128	81	4
mir-192	81	3	mir-214	85	19	mir-206	12	6	mir-129	81	4
mir-201	79	14	mir-215	70	10	mir-208	21	12	mir-132	84	10
mir-215	82	1	mir-219	88	10	mir-210	23	4	mir-135	79	4
mir-27a	87	4	mir-220	85	7	mir-215	33	21	mir-137	81	4
mir-346	88	1	mir-221	88	7	mir-299	20	18	mir-141	85	2
mir-92	85	11	mir-223	87	10	mir-337	18	3	mir-142	69	4
mir-96	87	9	mir-331	88	12	mir-339	31	2	mir-147	66	4
mir-98	87	1	mir-345	88	10	mir-340	31	7	mir-15a	85	9
mir-99a	88	1	mir-346	82	12	mir-345	31	21	mir-16	74	6
			mir-297	78	15	mir-34a	35	7	mir-27a	83	7
			mir-329	82	17	mir-367	31	12	mir-28	82	9
			mir-409	86	11	mir-292-3p	29	21	mir-30a-3p	80	8
			mir-411	86	7	mir-293	26	30	mir-34a	72	8
						mir-297	19	16	mir-297	84	5
						mir-344	32	1			
						mir-409	30	16			

FIG.15A

Piel TE354T			Piel TE353SK			Células BJ			Pulmón A549		
miARN	% de cont neg	Desv. Estánd	miARN	% de cont neg	Desv. Estánd	miARN	% de cont neg	Desv. Estánd	miARN	% de cont neg	Desv. Estánd
mir-1	53	7	mir-101	63	11	miR-206	19	7	mir-124	44	0
mir-101	49	6	mir-105	42	40	let7a	69	10	Let-7b	70	0
mir-124	64	10	mir-124	70	8	mir1	38	2,65	Let-7d	71	0
mir-136	59	4	mir-126	56	8	mi R-105	65	5	Let-7g	62	1
mir-154	51	5	mir-128	53	46	miR-147	35	7	mir-126	68	0
mir-15a	63	4	mir-132	66	8	mi R-15a	43	8	mir-129	67	1
mir-16	58	5	mir-133A	56	49	miR-16	51	4	mir-137	64	0
mir-192	62	7	mir-136	27	24	miR-195	48	10	mir-147	65	0
mir-193	69	4	mir-137	55	13	miR-297	46	6,85	mir-15a	61	0
mir-195	58	3	mir-141	62	23	miR-324-3p	68	8,84	mir-16	53	1
mir-201	67	8	mir-142	60	19	miR-337	27	7,26	mir-192	70	2
mir-206	51	4	mir-144	65	22	miR-376b	63	6,53	mir-193	64	3
mir-215	59	6	mir-15a	57	20				mir-195	59	0
mir-221	62	8	mir-16	59	9				mir-22	68	1
mir-26a	69	12	mir-181 a	65	23				mir-28	61	0
mir-28	60	18	mir-20	47	41				mir-292-3p	62	0
			mir-206	67	15				mir-29a	67	1
			mir-215	68	11				mir-337	55	0
			mir-223	56	49				mir-344	63	0
			mir-302	63	1				mir-345	69	1
			mir-330	66	59				mir-34a	61	0
			mir-346	59	52				mir-7	63	1
			mir-373	66	7						
			mir-96	65	16						
			mir-291	48	17						
			mir-329	68	62						
			mir-380-3p	64	55						
			mir-411	54	47						

FIG.15B

Pulmón CRL5826			Pulmón HTB-57			Jurkats			Linfocitos T primarios		
miARN	% de CN	Desv. Estánd	miARN	% de CN	Desv. Estánd	miARN	% de cont neg	Desv. Estánd	miARN	% de cont neg	Desv. Estánd
ambi-mir7100	63	21	mir-108	79		let-7a	21	1	miR-107	89	15
mir-101	70	20	mir-122	79		let-7b	50	5	miR-134	75	23
mi r-105	74	11	mir-124	79		miR-101	69	30	miR-135	88	13
mi r-124	63	8	mir-125a	77	11	miR-10b	37	3	miR-139	87	0
mir-125b	74	11	mir-126	78	2	miR-122	67	18	miR-141	89	1
mir-126	61	3	mir-132	59	7	mi R-133a	73	18	miR-145	86	12
mir-128	71	13	mir-133A	77	7	miR-17-3p	63	16			
mi r-132	73	18	mi r-136	78	13	miR-29a	68	7			
mir-141	74	5	mir-147	72	4	miR-30a-3p	66	27			
mir-142	67	5	mir-151	67	10	miR-34a	67	21			
mir-147	75	7	mir-152	73	13						
mi r-149	71	9	mir-16	79	6						
mi r-188	67	11	mir-182	63	9						
mir-223	68	14	mir-183	72	9						
mir-28	74	19	mir-186	69	17						
mir-29a	74	14	mir-188	67	20						
mir-337	74	17	mir-28	79	16						
mir-346	72	13	mir-377	79	3						
mir-96	74	6	mir-526b*	79	0						
			mir-96	76	10						

FIG.15C

Cuello uterino HeLa			Próstata 22 Rv1			Piel TE354T			Piel TE353SK		
miARN	% de cont neg	Desv. Estánd	miARN	% de cont neg	Desv. Estánd	miARN	% de cont neg	Desv. Estánd	miARN	% de cont neg	Desv. Estánd
Let-7a	119	15	Let-7a	124	6	mir-412	117	11	mir-138	126	7
Let-7b	124	12	Let-7b	127	27	mir-141	120	52	mir-196	134	7
Let-7c	114	21	mir-127	127	11	mir-143	125	35	mir-197	135	8
Let-7d	113	29	mir-154	123	10	mir-145	156	71	mir-198	144	4
Let-7g	114	27	mir-181a	124	11	mir-146	143	85	mir-199	135	9
mir-145	111	29	mir-194	132	16	mir-188	117	37	mir-204	125	6
mir-155	114	17	mir-198	126	10	mir-190	131	55	mir-216	136	13
mir-181a	113	21	mir-199	146	18	mir-198	119	3	mir-410	134	7
mir-186	111	29	mir-201	125	24	mir-204	125	8			
mir-190	114	21	mir-369	130	9	mir-410	133	3			
mir-191	116	22	mir-93	129	16	mir-139	122	20			
mir-199	118	14				mir-412	117	11			
mir-9	112	27									

Células BJ			Cáncer de Pulmón A549			Jurkats			Linfocitos T primarios		
miARN	% de cont neg	Desv. Estánd	miARN	% de cont neg	Desv. Estánd	miARN	% de cont neg	Desv. Estánd	miARN	% de cont neg	Desv. Estánd
miR-26a	130	17	mir-25	112	0	miR-100	7	15	let-7a	151	17
miR-128	131	24	mir-294	112	1	miR-125b	134	4	let-7b	150	14
miR-223	134	14	mir-32	121	0	miR-126	132	19	let-7c	159	4
miR-188	139	19	mir-92	122	0	miR-129	134	10	let-7d	142	10
miR-125a	140	10				miR-140	150	4	let-7g	141	7
miR-201	153	18				miR-143	139	2	miR-10a	130	10
miR-291-3p	155	30				miR-155	162	23	miR-10b	127	20
miR-145	161	2				miR-15a	146	12	miR-125a	131	5
miR-294	165	21				miR-23b	146	4	miR-126	126	42
miR-150	171	7				miR-25	135	18	miR-15a	135	11
miR-322	268	19,93				miR-26a	154	14	miR-17-3p	128	4
miR-295	215	40,78							miR-18	138	2
miR-187	246	19							miR-182	126	18
miR-373	212	41,39							miR-19a	126	5
									miR-20	130	14
									miR-7	126	1

CRL5826			HTB-57		
miARN	% de CN	Desv. Estánd	miARN	% de CN	Desv. Estánd
mir-130a	126	27	mir-135	121	8
mir-145	112	8	mir-216	126	7
mir-30e-5p	122	11	mir-293	121	4
mir-333	112	35	mir-338	122	14
mir-335	114	33	mir-341	118	22
mir-369	111	8			
mir-350	111	5			
mir-412	123	14			

FIG. 16

Próstata 22Rv1			Piel TE354T			Mama MCF12a			Pulmón A549		
miARN	% CN	Desv. Estánd	miARN	% CN	Desv. Estánd	miARN	% CN	Desv. Estánd	miARN	% CN	Desv. Estánd
mir-100	59	26	mir-210	67	13	mir-216	92	9	mir-129	90	5
mir-130a	58	16	mir-216	53	1	mir-217	95	14	mir-326	88	2
mir-211	54	7				mir-294	93	23	mir-331	92	2
mir-212	58	1							mir-338	91	2
mir-213	57	11							mir-341	89	5
mir-215	59	8							mir-370	91	0
mir-224	49	30							mir-92	88	0
mir-292	59	4									
mir-320	58	6									
mir-324	55	6									
mir-325	59	10									
mir-330	58	28									
mir-338	55	10									
mir-369	57	6									
mir-370	54	16									
mir-99a	58	15									

FIG. 17

Próstata 22Rv1			Piel TE354T			Mama MCF12a			Pulmón A549		
miARN	% CN	Desv. estánd.	miARN	% CN	Desv. estánd.	miARN	% CN	Desv. estánd.	miARN	% CN	Desv. estánd.
mir-10b	104	27	Let-7a	139	9	let7a	180	35	let7a-1	116	5
mir-152	111	20	Let-7b	148	8	let7b-1	176	36	mir-133a-2	126	2
			Let-7g	133	8	let7c	177	21	mir-142	112	4
			mir-10a	135	10	let7d	172	37	mir-187	110	6
			mir-10b	140	10	mir-10a	178	22	mir-199a-1	111	4
			mir-133B	135	8	mir-10b	190	18	mir-206	110	4
			mir-155	138	3	mir-133a	182	33	mir-211	110	6
			mir-15a	142	12	mir-152	175	33	mir-222	111	2
			mir-16	134	8	mir-153	178	27	mir-223	112	2
			mir-181a	138	6	mir-155	186	24	mir-23b	118	6
			mir-182	133	9	mir-16	174	30	mir-298	111	1
			mir-193	134	12	mir-181a	172	26	mir-328	115	1
			mir-194	137	28	mir-183	184	15	mir-342	118	0
			mir-196	133	6	mir-184	177	14	mir-371	122	2
			mir-204	135	9	mir-186	176	16			
			mir-23a	133	16	mir-191	174	11			
			mir-24	132	11	mir-200b	179	8			
			mir-25	142	13	mir-412	174	24			
			mir-92	132	11	mir-9	178	24			
			mir-95	137	5						

FIG.18

Jurkat			Linfocitos T primarios			HeLa			A549		
Viabilidad celular			Viabilidad celular			Viabilidad celular			Viabilidad celular		
miARN	% CN	% DE	miARN	% CN	% DE	miARN	% CN	% DE	miARN	% CN	% DE
miARN que disminuyen la Viabilidad celular											
let-7a	21	1	miR-107	89	15	mir-1	20	2	mir-193	80	15
let-7b	50	5	miR-134	75	23	mir-101	12	2	mir-206	80	7
miR-101	69	30	miR-135	88	13	mir-124	16	4	mir-210	86	5
miR-108	75	18	miR-139	87	0	mir-192	13	3	mir-292-3p	86	3
miR-10b	37	3	miR-141	89	1	mir-193	5	2	mir-293	83	2
miR-122	67	18	miR-145	86	12	mir-195	21	7	mir-299	84	4
miR-133a	73	18				mir-206	12	6	mir-329	85	5
miR-17-3p	63	16				mir-208	21	12	mir-337	81	3
mi R-19a	73	24				mir-210	23	4	mir-345	75	6
miR-29a	68	7				mir-297	19	16	mir-346	78	8
miR-30a-3p	66	27				mir-299	20	18	mir-409	86	3
miR-34a	67	21				mir-337	18	3			
miARN que aumentan la Viabilidad celular											
miR-129	150	10	let-7a	151	17	mir-128	128	18			
miR-143	162	2	let-7b	150	14	mir-139	133	12			
miR-155	146	23	let-7c	159	4	mir-23a	159	13			
miR-15a	146	12	let-7d	142	10	mir-23b	155	12			
miR-25	154	18	let-7g	141	7	mir-24	132	20			
miR-26a	170	14	miR-10a	130	10	mir-32	133	20			
			miR-10b	127	20	mir-331	128	13			
			miR-125a	131	5						
			miR-126	126	42						
			mi R-15a	135	11						
			miR-17-3p	128	4						
			miR-18	138	2						
			miR-182	126	18						
			miR-19a	126	5						
			miR-20	130	14						

FIG.19

Próstata 22Rv1			Piel TE354T			Jurkat			HeLa		
miARN sintéticos que Aumentan la Apoptosis											
miARN	% CN	Desv Estánd	miARN	% CN	Desv. Estánd	miARN	% CN	Desv. Estánd	miARN	% CN	Desv. Estánd
Let-7g	164	17	mir-149	179	22	let-7b	201	41	let-7b	369	89
mir-1	192	20	mir-154	252	15	let-7g	152	19	let-7g	594	260
mir-10a	205	15	mir-195	174	16	miR-1	170	11	miR-1	410	65
mir-149	169	14	mir-208	189	18	miR-10b	198	24	miR-10b	378	28
mir-184	166	19	mir-214	187	14	miR-122	154	29	miR-122	303	44
mir-186	166	23	mir-217	177	21	miR-17-3p	171	12	miR-17-3p	346	68
mir-188	197	12	mir-293	234	19	miR-19a	153	6	miR-19a	312	7
mir-192	182	26	mir-299	193	12	miR-28	154	20	miR-28	347	56
			mir-328	198	17	miR-29a	155	15	miR-29a	439	63
			mir-344	204	8	miR-32	156	30	miR-32	473	209
						miR-34a	181	39	miR-34a	361	82
									let-7b	317	63
									let-7g	607	150
									miR-1	355	47
									miR-10b	404	53
									miR-122	374	61
									miR-17-3p	443	101
									miR-19a	773	70
									miR-28	402	42
miARN sintéticos que Disminuyen la Apoptosis											
mir-128	54	27	Let-7b	56	10	miR-125b	75	2	miR-32	8	7
mir-21	47	23	mir-100	55	11	miR-126	66	11	mir-105	40	9
mir-216	48	37	mir-101	44	9	miR-143	68	3	mir-108	39	12
mir-223	54	36	mir-126	38	11	miR-155	67	22	mir-126	29	4
mir-23b	46	44	mir-207	59	8	miR-23b	70	14	mir-137	13	12
mir-328	22	29	mir-25	59	9	miR-26a	68	11	mir-292-3p	31	4
mir-335	40	26	mir-28	41	7	miR-98	74	27	mir-34a	38	8
mir-340	51	11	mir-29a	39	8				mir-96	32	13
mir-367	37	34	mir-30a-3p	30	6						
mir-368	53	36									
mir-380-3p	30	42									
mir-410	50	47									
mir-341	53	0									

FIG. 20

A549 +/- TRAIL		A549 +/- etopósido		HTB-57 +/- etopósido		CRL-5826 +/- etopósido		HeLa +/- etopósido	
miARN que reducen la viabilidad celular en presencia de un agente terapéutico									
miARN	% CN	miARN	% CN	miARN	% CN	miARN	% CN	miARN	% CN
mir-101	135	mir-28	319	mir-126	171	mir-132	142	mir-124	162
mir-124	158	mir-124	139	mir-132	201	mir-182	134	mir-126	161
mir-125a	134	mir-126	141	mir-28	176	mir-28	154	mir-132	170
mir-132	147	mir-147	120	mir-337	217	mir-292-3p	212	mir-147	171
mir-136	178	mir-216	108	mir-292-3p	268			mir-216	199
mir-155	181	mir-292-3p	489	miR-7100	227			mir-28	169
mir-182	153	mir-337	251					mir-292-3p	208
mir-186	176							mir-337	285
mir-202	152								
mir-206	138								
mir-221	143								
mir-224	129								
mir-28	136								
mir-291	145								
mir-292-3p	169								
mir-297	140								
mir-302	134								
mir-372	125								
mir-373	169								
mir-376b	145								
miARN que aumentan la viabilidad celular en presencia de un agente terapéutico									
mir-125b	83								
mir-152	73								
mir-16	90								
mir-194	78								
mir-197	82								
mir-214	82								
mir-24	87								
mir-30a-3p	63								
mir-331	73								

FIG. 21

miARN	secuencia	Proliferación A549 (% NC)	Proliferación Jurkats (%CN)
let-7a	ugagguaguagguuguauaguu	119	21
let-7b	ugagguaguagguugugugguu	124	50
let-7c	ugagguaguagguuguauagguu	114	85
let-7d	agagguaguagguugcauagu	113	97
let-7g	ugagguaguaguuuguacagu	114	105

FIG. 23

miARN

miR 26a

miR-147

miR-195

miR-368

Genes asociados con Oxidación

GPX1, 2, y 4: Familia de Glutación peroxidasa ligada a extensión de la vida en gusanos y moscas

COX5b, 6, y 7b: Citocromo C oxidasa. Componente Terminal de la cadena respiratoria.

MTCOI: Citocromo C oxidasa. Subunidad codificada por Mitochondria.

NOX3 y 5: NADPH oxidasa generadora de superóxido.

DUOX2. Oxidasa-2 Dual Homólogos de NOX2

Genes asociados RAS

MAPK 1 y 4

AKT1

PRKC A y D

FIG. 24