

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 419 129**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/68**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.09.2008 E 08830849 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2013 EP 2190992**

54 Título: **Expresión de miARN en microvesículas de sangre periférica humana y usos del mismo**

30 Prioridad:

**14.09.2007 US 993809 P**  
**22.05.2008 US 55178**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.08.2013**

73 Titular/es:

**THE OHIO STATE UNIVERSITY RESEARCH  
FOUNDATION (100.0%)  
1960 KENNY ROAD  
COLUMBUS, OH 43210-1063, US**

72 Inventor/es:

**MARSH, CLAY, B.;  
PIPER, MELISSA, G. y  
ISMAIL, NOURA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 419 129 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

Expresión de miARN en microvesículas de sangre periférica humana y usos del mismo

**Antecedentes de la invención**

5 Los microARN (miARN o miR) son ARN no codificantes pequeños expresados en animales y plantas. Regulan la función celular, supervivencia celular, activación celular y diferenciación celular durante el desarrollo.

10 Los microARN son una familia no codificante pequeña de ARN de 19-25 nucleótidos que regulan la expresión génica dirigiendo ARN mensajeros (ARNm) de una manera específica de secuencia, induciendo la represión de la traducción o degradación de ARNm dependiendo del grado de complementariedad entre los miARN y sus dianas (Bartel, D.P. (2004) Cell 116, 281- 297; Ambros, V. (2004) Nature 431, 350-355). Muchos miR están conservados en secuencia entre organismos relacionados de forma distante, lo que sugiere que estas moléculas participan en procesos esenciales. De hecho, los miR están implicados en la regulación de la expresión génica durante el desarrollo (Xu, P., y col. (2003) Curr. Biol. 13, 790-795), proliferación celular (Xu, P., y col. (2003) Curr. Biol. 13, 790-795), apoptosis (Cheng, A.M., y col. (2005) Nucl. Acids Res. 33, 1290-1297), metabolismo de la glucosa (Poy, M.N., y col. (2004) Nature 432, 226-230), resistencia a tensión (Dresios, J., y col. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 1865-1870) y cáncer (Calin, G.A, y col. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 1554-15529; Calin, G.A., y col. (2004) Proc. Natl Acad. ScL USA 101, 11755-11760; He, L., y col. (2005) Nature 435, 828-833; y Lu, J., y col. (2005) Nature 435: 834-838).

20 Hay pruebas sólidas de que los miR desempeñan un papel en la hematopoyesis de los mamíferos. En ratones, miR-181, miR-223 y miR-142 se expresan de forma diferencial en tejidos hematopoyéticos, y su expresión está regulada durante la hematopoyesis y compromiso de linaje (Chen, C.Z., y col. (2004) Science 303, 83-86). La expresión ectópica de miR-181 en células progenitoras hematopoyéticas murinas condujo a proliferación en el compartimento de linfocitos B (Chen, C.Z., y col. (2004) Science 303, 83-86). La realización de perfiles génicos de miR sistemática en células del sistema hematopoyético murino reveló diferentes patrones de expresión de miR en el sistema hematopoyético en comparación con tejidos neuronales e identificó cambios de expresión de miR individuales que se producen durante la diferenciación celular (Monticelli, S., y col. (2005) Genome Biology 6, R71). Un estudio reciente ha identificado la modulación negativa de miR-221 y miR-222 en cultivos eritropoyéticos humanos de células progenitoras de sangre del cordón umbilical CD34<sup>+</sup> (Felli, N., y col. (2005) Proc. Natl. Acad. ScL USA. 102, 18081-18086). Se descubrió que estos miR se dirigían al oncogén c-Kit. Los estudios funcionales adicionales indicaron que la reducción de estos dos miR en cultivos eritropoyéticos desbloquea la producción de proteína Kit al nivel de traducción lo que conduce a la expansión de células eritroides tempranas (Felli, N., y col. (2005) Proc. Natl. Acad. ScL USA. 102, 18081-18086). En concordancia con la hipótesis de que los miR regulan la diferenciación celular, se descubrió que miR-223 es un miembro clave de un circuito regulador que implica C/EBPα y NFI-A, que controla la diferenciación granulocítica en líneas celulares leucémicas promielocíticas agudas tratadas con ácido retinoico todo trans (Fazi, F., y col. (2005) Cell 123, 819-831). Iorio, N.V. y col. han presentado la desregulación de la expresión génica de microARN en cáncer de mama humano en Cancer Research 2005; 65: (16), 15 de agosto de 2005. Se identificaron miARN cuya expresión se correlacionaba con características biopatológicas de cáncer de mama específicas tales como expresión del receptor de estrógenos y progesterona, estadio tumoral, invasión vascular o índice de proliferación.

40 Taylor, D. D. y col. han informado sobre exosomas asociados al embarazo y su modulación de la señalización de linfocitos T en el Journal of Immunology, 2006, 176: 1535-1542. Los resultados demuestran que los exosomas de embarazos con parto a término en última instancia están presentes a concentraciones significativamente mayores que los de embarazos con parto prematuro; sin embargo, los exosomas de embarazos con parto a término también muestran supresión significativamente mayor de CD3-ζ y JAK3.

45 Se ha identificado una delección frecuente y expresión reducida de dos miR en leucemia linfocítica crónica de linfocitos B<sup>9</sup>. Este descubrimiento estimuló numerosos artículos que documentaban la expresión aberrante de miR en carcinomas de cabeza y cuello, cánceres pulmonares de células pequeñas, glioblastomas, cánceres de mama, leucemia linfocítica crónica y linfoma de Burkitt<sup>9-12</sup>. Más recientemente, se ha presentado una relación entre la información y los miR en macrófagos<sup>13</sup>.

50 Para ensayar tales trastornos, se han obtenido muestras tisulares para confirmar la presencia de dichos macrófagos. Además, hasta ahora, no ha habido ningún informe que demuestre que las microvesículas que circulan en la sangre contengan miR.

55 En parte se expondrán ventajas, objetos y características adicionales de la invención en la descripción a continuación y en parte resultarán evidentes para los expertos habituales en la técnica tras el examen de lo siguiente o pueden aprenderse a partir de la práctica de la invención. Los objetos y ventajas de la invención pueden realizarse y obtenerse como se apunta particularmente en las reivindicaciones adjuntas.

**Sumario de la invención**

En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para diagnosticar o pronosticar cáncer de próstata en un sujeto, que comprende:

- 5 i) aislar microvesículas de la sangre periférica del sujeto;
- ii) determinar el nivel de al menos un producto génico de miR en las microvesículas aisladas; y
- iii) comparar el nivel del al menos un producto génico de miR en la muestra con un control, en el que un aumento del nivel del al menos un producto génico de miR en la muestra del sujeto, en relación con el del control, es diagnóstico o pronóstico del cáncer de próstata;

en el que se determina el nivel de miR-21 y al menos los siguientes miR: miR-15a, miR-16-1, miR-143 y miR-145.

10 También se desvela en el presente documento un procedimiento para diagnosticar o pronosticar una enfermedad o trastorno en un sujeto, que comprende:

- 15 i) aislar microvesículas de la sangre periférica del sujeto;
- ii) determinar el nivel de al menos un producto génico de miR en las microvesículas aisladas; y
- iii) comparar el nivel del al menos un producto génico de miR en la muestra con un control, en el que un aumento en el nivel del al menos un producto génico de miR en la muestra del sujeto, en relación con el del control, es diagnóstico o pronóstico de la enfermedad o trastorno;

en el que la enfermedad es adenocarcinoma de colon y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-20a, miR-21, miR-106a, miR-181b y miR-203;

20 en el que la enfermedad es cáncer colorrectal y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-19a, miR-21, miR-127, miR-31, miR-96, miR-135b y miR-183; y al menos los siguientes miR están regulados negativamente: miR-30c, miR-133a, miR-143, miR-133b y miR-145;

en el que la enfermedad es cáncer de pulmón y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-17-92, miR-19a, miR-21, miR-92, miR-155, miR-191, miR-205 y miR-210; y al menos los siguientes miR están regulados negativamente: miR-let-7;

25 en el que la enfermedad es cáncer de mama y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-21 y miR-155; y al menos los siguientes miR están regulados negativamente: miR-125b y miR-145;

en el que la enfermedad es linfoma de linfocitos B y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-155, miR-17-92, miR-19a, miR-92, miR-142 miR-155, miR-221 miR-17-92, miR-19a, miR-21, miR-92, miR-155, miR-191, miR205 y miR-210;

30 en el que la enfermedad es cáncer pancreático y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-103, miR-107, miR-18a, miR-31, miR-93, miR-221, miR-224 y miR-155; y al menos los siguientes miR están regulados negativamente: miR-133a, miR-216 miR-217;

en el que la enfermedad es BCL grande difusa y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-155 y miR-17-92;

35 en el que la enfermedad es leucemia linfocítica crónica y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-23b, miR-24-1, miR-146, miR-155, miR-195, miR-221, miR-331, miR-29a, miR-195, miR-34a y miR-29c; y al menos los siguientes miR están regulados negativamente: miR-15a, miR-16-1, miR-29 y miR-223;

en el que la enfermedad es cáncer de vejiga y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-223, miR-26b, miR-221, miR-103-1, miR-185, miR-23b, miR-203, miR-17-5p, miR-23a y miR-205;

40 en el que la enfermedad es cáncer renal y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-28, miR-185, miR-27 y miR-let-7f-2;

en el que la enfermedad es tumor de hipoxia y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-23, miR-24, miR-26, miR-27, miR-103, miR-107, miR-181, miR-210 y miR-213;

45 en el que la enfermedad es leiomioma uterino y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: familia miR let-7, miR-21, miR-23b, miR-29b y miR-197;

en el que la enfermedad es cáncer ovárico y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-199\*, miR-200a y miR-214; y al menos los siguientes miR están regulados negativamente: miR-100, grupo miR- let-7 y miR-125b;

50 en el que la enfermedad es carcinoma hepatocelular asociado con virus de la hepatitis C y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-122, miR-100 y miR-10a; y al menos los siguientes miR están regulados negativamente: miR-198 y miR-145;

en el que la enfermedad es leucemia linfoblástica aguda (ALL) y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-128b, miR-204, miR-218, miR-331, miR-181b-1 y miR-17-92; o

55 en el que la enfermedad es enfermedad de Alzheimer y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-9 y miR-128; y al menos los siguientes miR están regulados negativamente: miR-107;

en el que la enfermedad es mielofibrosis y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-190; y al menos los siguientes miR están regulados negativamente: miR-31, miR-150 y miR-95;

en el que la enfermedad es una o más de mielofibrosis, policitemia vera o trombocitemia y al menos los siguientes MiR están regulados negativamente miR-34a, miR-342, miR-326, miR-105, miR-149 y miR-147;

60 en el que la enfermedad es VIH y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-29a, miR-29b, miR-149, miR-378 y miR-324-5p; o

en el que la enfermedad es latencia de VIH-1 y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-28, miR-125b, miR-150, miR-223 y miR-382.

Las microvesículas facilitan la comunicación entre células. Muchas células incluyendo macrófagos, plaquetas, linfocitos T y tumores liberan microvesículas pequeñas que contienen ácidos nucleicos y/o proteínas<sup>1-5</sup>. Los factores contenidos dentro de las microvesículas regulan angiogénesis, crecimiento celular y diferenciación celular<sup>1;3</sup>.

En otro aspecto, la invención también proporciona el uso de microvesículas aisladas como un biomarcador para cáncer de próstata, en el que el biomarcador se aísla de microvesículas en sangre periférica de un sujeto que tiene cáncer de próstata, y al menos los siguientes miR están regulados positivamente: miR-21; y al menos los siguientes miR están regulados negativamente: miR-15a, miR-16-1, miR-143 y miR-145.

También se desvela en el presente documento el uso de microvesículas aisladas como un biomarcador para etiología de enfermedad y mediadores sistémicos de la respuesta inmune innata, en el que el biomarcador se aísla de microvesículas en sangre periférica;

en el que la enfermedad es adenocarcinoma de colon y al menos uno de los siguientes MiR está regulado positivamente: miR-20a, miR-21, miR-106a, miR-181b y miR-203;

en el que la enfermedad es cáncer colorrectal y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-19a, miR-21, miR-127, miR-31, miR-96, miR-135b y miR-183; y al menos los siguientes miR están regulados negativamente: miR-30c, miR-133a, miR-143, miR-133b y miR-145;

en el que la enfermedad es cáncer de pulmón y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-17-92, miR-19a, miR-21, miR-92, miR-155, miR-191, miR-205 y miR-210; y al menos los siguientes miR están regulados negativamente: miR-let-7;

en el que la enfermedad es cáncer de mama y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-21 y miR-155; y al menos los siguientes miR están regulados negativamente: miR-125b y miR-145;

en el que la enfermedad es linfoma de linfocitos B y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-155, miR-17-92, miR-19a, miR-92, miR-142, miR-155, miR-221, miR-17-92, miR-19a, miR-21, miR-92, miR-155, miR-191, miR-205 y miR-210;

en el que la enfermedad es cáncer pancreático y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-103, miR-107, miR-18a, miR-31, miR-93, miR-221, miR-224 y miR-155; y al menos los siguientes miR están regulados negativamente: miR-133a, miR-216, miR-217;

en el que la enfermedad es BCL grande difusa y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-155 y miR-17-92;

en el que la enfermedad es leucemia linfocítica crónica y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-23b, miR-24-1, miR-146, miR-155, miR-195, miR-221, miR-331, miR-29a, miR-195, miR-34a y miR-29c; y al menos los siguientes miR están regulados negativamente: miR-15a, miR-16-1, miR-29 y miR-223;

en el que la enfermedad es cáncer de vejiga y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-223, miR-26b, miR-221, miR-103-1, miR-185, miR-23b, miR-203, miR-17-5p, miR-23a y miR-205;

en el que la enfermedad es cáncer renal y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-28, miR-185, miR-27 y miR-let-7f-2;

en el que la enfermedad es tumor de hipoxia y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-23, miR-24, miR-26, miR-27, miR-103, miR-107, miR-181, miR-210 y miR-213;

en el que la enfermedad es leiomioma uterino y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: familia miR let-7, miR-21, miR-23b, miR-29b y miR-197;

en el que la enfermedad es cáncer ovárico y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-199\*, miR-200a y miR-214; y al menos los siguientes miR están regulados negativamente: miR-100, grupo miR-let-7 y miR-125b;

en el que la enfermedad es carcinoma hepatocelular asociado con virus de la hepatitis C y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-122, miR-100 y miR-10a; y al menos los siguientes miR están regulados negativamente: miR-198 y miR-145;

en el que la enfermedad es leucemia linfoblástica aguda (ALL) y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-128b, miR-204, miR-218, miR-331, miR-181b-1 y miR-17-92;

en el que la enfermedad es enfermedad de Alzheimer y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-9 y miR-128; y al menos los siguientes miR están regulados negativamente: miR-107;

en el que la enfermedad es mielofibrosis y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-190; y al menos los siguientes miR están regulados negativamente: miR-31, miR-150 y miR-95;

en el que la enfermedad es una o más de mielofibrosis, policitemia vera o trombocitemia y al menos los siguientes MiR están regulados negativamente: miR-34a, miR-342, miR-326, miR-105, miR-149 y miR-147;

en el que la enfermedad es VIH y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-29a, miR-29b, miR-149, miR-378 y miR-324-5p; o

en el que la enfermedad es latencia de VIH-1 y al menos los siguientes MiR están regulados positivamente: miR-28, miR-125b, miR-150, miR-223 y miR-382.

En otro aspecto de la presente divulgación, se determina la presencia de los miR en fluidos tales como sangre periférica de pacientes que padecen trastornos particulares.

En otro aspecto de la presente divulgación, se determina la presencia de los miR en tejido pulmonar de pacientes que padecen fibrosis pulmonar.

5 En otro aspecto más de la presente divulgación, se proporciona en el presente documento un procedimiento para diagnosticar o pronosticar un trastorno particular en un sujeto (por ejemplo, un ser humano). De acuerdo con un procedimiento particular de la presente divulgación, el nivel de al menos un producto génico de miR en una muestra de ensayo del sujeto se compara con el nivel de un producto génico de miR correspondiente en una muestra de control. Una alteración (por ejemplo, un aumento, una reducción) del nivel del producto génico de miR en la muestra de ensayo, en relación con el nivel de un producto génico de miR correspondiente en la muestra de control, es indicativa de que el sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar un trastorno inflamatorio agudo.

10 En una realización de la presente divulgación, el nivel del producto génico de miR en la muestra de ensayo del sujeto es mayor que el del control. En otra realización de la presente divulgación, el al menos un producto génico de miR se selecciona del grupo que consiste en los miARN como se muestra en el presente documento.

En realizaciones particulares de la presente divulgación, el trastorno que se diagnostica o pronostica es uno que provoca que los fagocitos mononucleares y/o células THP-1 liberen microvesículas.

15 En realizaciones particulares de la presente divulgación, el trastorno que se diagnostica o pronostica es uno que provoca una respuesta inflamatoria.

En otra realización, la divulgación incluye un procedimiento para tratar un cáncer y/o un trastorno inflamatorio en un sujeto (por ejemplo, un ser humano).

20 En una realización particular de la presente invención, se administra una cantidad eficaz de un compuesto para inhibir la expresión de al menos un producto génico de miR seleccionado de uno o más de los grupos hallados en las Tablas I-VI al sujeto.

En la presente divulgación el compuesto para inhibir la expresión de al menos un producto génico de miR inhibe la expresión de un producto génico de miR seleccionado de uno o más de los grupos hallados en las Tablas I-VI.

25 La presente divulgación proporciona además composiciones farmacéuticas para tratar cáncer y/o un trastorno inflamatorio. En una realización, las composiciones farmacéuticas comprenden al menos un compuesto de inhibición de la expresión de miR y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización particular, el al menos un compuesto de inhibición de la expresión de miR es específico para un producto génico de miR cuya expresión es mayor en sangre de pacientes enfermos en comparación con normales.

30 En otra realización más de la presente divulgación, la composición farmacéutica comprende además al menos un agente anti-inflamatorio.

35 En una realización de la presente divulgación, la divulgación es una composición farmacéutica para tratar un cáncer asociado con la sobre-expresión de un producto génico de miR y/o trastorno pulmonar asociado con la sobre-expresión de un producto génico de miR. Tales composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad eficaz de al menos un producto génico de miR y un vehículo farmacéuticamente aceptable, uniéndose el al menos un producto génico de miR con, y reduciendo la expresión de, el producto génico de miR. En otra realización de la presente divulgación, el al menos un producto génico de miR comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una secuencia de nucleótidos en el producto génico de miR. En otra realización más de la presente divulgación, el al menos un producto génico de miR es miR o una variante o fragmento biológicamente activo del mismo. En otra realización más de la presente divulgación, la composición farmacéutica comprende además al menos un agente anti-neoplásico.

Diversos objetos y ventajas de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la siguiente descripción detallada de la realización preferida, cuando se lea a la vista de los dibujos adjuntos.

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

45 La **Figura 1** muestra la liberación inducida por diferenciación de microvesículas de macrófagos. Los monocitos de sangre periférica (PBM) se dejaron sin tratar (claro) o se trataron con GM-CSF (oscuro) durante 24 horas. Se recogió sobrenadante sin células y se ultracentrifugó. Las vesículas se resuspendieron en PBS y se analizaron con respecto a tamaño en una citometría de flujo. Antes del análisis, los parámetros FSS y SSC se ajustaron usando perlas convencionales de 2 µm (no mostradas). Se muestran datos representativos de tres donantes diferentes.

50 Las **Figuras 2A-2C** muestran que las microvesículas median en la diferenciación de macrófagos. Se recogieron microvesículas de células THP1 tratadas con PMA, después se añadieron a células THP1 indiferenciadas (**Figura 2B**) o monocitos (**Figura 2C**). Como control, se dejaron sin tratar células THP1 (**Figura 2A**). Las células se fotografiaron diariamente. Se muestran las células el día 3.

Las **Figuras 3A-3C** muestran el aislamiento de microvesículas de sangre periférica. Después del consentimiento informado, se obtuvo plasma de 20 cm<sup>3</sup> de sangre de donantes voluntarios normales. Las microvesículas de 0,5 cm<sup>3</sup>

se incubaron con anticuerpos CD206-FITC o MHCII-FITC y se analizaron en BD FACS Calibur con respecto a tamaño usando dispersión frontal frente a lateral (**Figura 3A**) y expresión de antígenos en superficie (**Figura 3B**). El porcentaje de expresión de CD206 o MHC II en comparación con el control de isotipos se determinó para la región seleccionada mostrada en la **Figura 3A (Figura 3C)**. Se muestra la media  $\pm$  ETM de dos donantes.

5 **Figura 4. Análisis del origen de las microvesículas de sangre periférica.** Se analizaron microvesículas de sangre periférica de donantes sanos (n=10) por citometría de flujo. Para determinar el origen celular, las microvesículas se tiñeron con respecto a CD3, CD202b (Tie-2), CD66b, CD79a o CD41a para determinar las que se originaron de linfocitos T, células endoteliales, neutrófilos, linfocitos B o plaquetas. Las microvesículas derivadas de fagocitos mononucleares fueron positivas para CD14, CD206, CCR3, CCR2 o CCR5. Se muestra el porcentaje  
10 medio máximo de acontecimientos seleccionados totales  $\pm$  E.T.M.

**Figuras 5A - 5B. Expresión de miARN de microvesículas de sangre periférica y PBMC. (Figura 5A)** Se muestra el análisis por grupos jerárquico con respecto a microvesículas y PBMC basándose en criterios de filtración. Se generaron mapas de calor que demostraban el perfil de expresión para microvesículas (**Figura 5B**) y **PBMC (Figura 5C)**. (**Figura 5D**). Se muestra el número de compartidos y específicos para cada grupo de muestra.

15 **Figura 6: Tabla I** que muestra diversas enfermedades y se enumeran miR regulados positiva y negativamente asociados con las mismas, microARN que son importantes en el tejido de enfermedades humanas, incluyendo aplicaciones de cáncer y no de cáncer. Comparando miARN que son indetectables en el plasma del conjunto de datos de los inventores (Figura 7, Tabla II) con miARN que se sabe que aumentan en el tejido de enfermedades específicas, los inventores creen ahora que predicen que varios miARN pueden actuar como biomarcadores en el  
20 plasma (véase miARN en negrita en la Figura 6, Tabla I Columna de Expresión Aumentada).

**Figura 7: Tabla II** que muestra miR que se expresan en el plasma y los que son indetectables.

**Figura 8:** La **Tabla III** enumera miR y muestra los diez miARN más expresados en las microvesículas del plasma y las PBMC de todos los individuos.

25 **Figura 9: Tabla IV** que muestra que las rutas canónicas implicadas en el metabolismo y regulación del sistema inmune adquirido estaban altamente reguladas por las expresiones de estos miARN usando Sanger miRBase solamente (parte superior) o dianas comunes de Sanger miRBase y TargetScan (parte inferior).

**Figura 10: Tabla V** que muestra que 20 miARN tenían un aumento mayor de tres veces en la expresión en la fracción de PBMC en comparación con las muestras de plasma de la microvesículas así como la proporción de cambio de las microvesículas de plasma en comparación con PBMC (última columna).

30 **Figura 11: Tabla VI** que muestra los datos de expresión normalizados para todos los miR detectados: nombre del detector, media -MNC, et-MNC, nombre de detector, media-suero, et-suero.

#### **Descripción detallada de la realización preferida**

La presente invención se basa, en parte, en la identificación de microARN específicos (miARN) que están implicados en una respuesta inflamatoria y/o tienen niveles de expresión alterados en sangre. La invención se basa además, en  
35 parte, en la asociación de estos miARN con elementos de diagnóstico, pronóstico y terapéuticos particulares.

Como se describe y ejemplifica en el presente documento los miARN particulares están regulados positiva o negativamente durante la lesión tisular y/o inflamación.

40 Como se usa en el presente documento de forma intercambiable, un "producto génico de miR", "microARN", "miR", "miR" o "miARN" se refiere al transcrito de ARN procesado o no procesado de un gen de miR. Como los productos génicos de miR no se traducen en proteína, el término "productos génicos de miR" no incluye proteínas. El transcrito génico de miR no procesado también se llama un "precursor de miR" y normalmente comprende un transcrito de ARN de aproximadamente 70-100 nucleótidos de longitud. El precursor de miR puede procesarse por digestión con una RNasa (por ejemplo, Dicer, Argonaut, RNasa III (por ejemplo, RNasa III de *E. coli*) en una molécula de ARN de 19-25 nucleótidos activa. Esta molécula de ARN de 19-25 nucleótidos activa también se llama el transcrito génico de  
45 miR "procesado" o miARN "maduro".

La molécula de ARN de 19-25 nucleótidos activa puede obtenerse del precursor de miR a través de rutas de procesamiento naturales (por ejemplo, usando células intactas o lisados celulares) o mediante rutas de procesamiento sintéticas (por ejemplo, usando enzimas de procesamiento aisladas, tales como Dicer, Argonaut o RNasa III aisladas). Se entiende que la molécula de ARN de 19-25 nucleótidos activa también puede producirse  
50 directamente por síntesis biológica o química, sin tener que procesarse a partir del precursor de miR. Cuando se hace referencia a un microARN en el presente documento por nombre, el nombre corresponde a las formas tanto precursora como madura, a no ser que se indique de otro modo.

La presente invención abarca procedimientos para diagnosticar o pronosticar si un sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, un trastorno en el que se liberen microvesículas.

Los procedimientos comprenden determinar el nivel de al menos un producto génico de miR en una muestra del sujeto y comparar el nivel del producto génico de miR en la muestra con un control. Como se usa en el presente documento, un "sujeto" puede ser cualquier mamífero que tenga, o se sospeche que tiene, dicho trastorno. En una realización preferida, el sujeto es un ser humano que tiene, o se sospecha que tiene, dicho trastorno.

5 El nivel de al menos un producto génico de miR puede medirse en células de una muestra biológica obtenida del sujeto.

En otra realización, puede retirarse una muestra del sujeto, y puede extraerse ADN y aislarse por técnicas convencionales. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la muestra puede obtenerse del sujeto antes del inicio de la radioterapia, quimioterapia u otro tratamiento terapéutico. Puede obtenerse una muestra de control correspondiente, o una muestra de referencia de control (por ejemplo, obtenida de una población de muestras de control), a partir de muestras no afectadas del sujeto, de un individuo humano normal o población de individuos normales, o de células cultivadas correspondientes a la mayoría de células en la muestra del sujeto. La muestra de control puede procesarse después junto con la muestra del sujeto, de modo que los niveles de producto génico de miR producido de un gen miR dado en células de la muestra del sujeto pueden compararse con los niveles de producto génico de miR correspondientes de células de la muestra de control. Como alternativa, puede obtenerse una muestra de referencia y procesarse por separado (por ejemplo, en un momento diferente) a partir de la muestra de ensayo y el nivel de un producto génico de miR producido a partir de un gen de miR dado en células de la muestra de ensayo puede compararse con el nivel de producto génico de miR correspondiente de la muestra de referencia.

En una realización, el nivel del al menos un producto génico de miR en la muestra de ensayo es mayor que el nivel del producto génico de miR correspondiente en la muestra de control (es decir, la expresión del producto génico de miR está regulada "positivamente"). Como se usa en el presente documento, la expresión de un producto génico de miR está "regulada positivamente" cuando la cantidad de producto génico de miR en una muestra de un sujeto es mayor que la cantidad del mismo producto génico en un control (por ejemplo, un patrón de referencia, una muestra celular de control, una muestra tisular de control).

En otra realización, el nivel del al menos un producto génico de miR en la muestra de ensayo es menor que el nivel del producto génico de miR correspondiente en la muestra de control (es decir, la expresión del producto génico de miR está "regulada negativamente"). Como se usa en el presente documento, la expresión de un gen de miR está "regulada negativamente" cuando la cantidad del producto génico de miR producido a partir de ese gen en una muestra de un sujeto es menor que la cantidad producida a partir del mismo gen en una muestra de control. La expresión génica de miR relativa en el control y muestras normales puede determinarse con respecto a uno o más patrones de expresión de ARN. Los patrones pueden comprender, por ejemplo, un nivel de expresión génica de miR cero, el nivel de expresión génica de miR en una línea celular convencional, el nivel de expresión génica de miR en muestras no afectadas del sujeto, o el nivel medio de la expresión génica de miR previamente obtenido para una población de controles humanos normales (por ejemplo, un patrón de referencia de control).

El nivel del al menos un producto génico de miR puede medirse usando una diversidad de técnicas que se conocen bien por los expertos en la materia (por ejemplo, RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa, análisis de transferencia de Northern, detección por hibridación de solución). En una realización particular, el nivel de al menos un producto génico de miR se mide por transcripción inversa de ARN a partir de una muestra de ensayo obtenida del sujeto para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana, hibridando los oligodesoxinucleótidos diana con uno o más oligonucleótidos sonda específicos de miARN (por ejemplo, una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN) para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de ensayo, y comparar el perfil de hibridación de la muestra de ensayo con un perfil de hibridación generado a partir de una muestra de control. Una alteración de la señal de al menos un miARN en la muestra de ensayo en relación con la muestra de control es indicativa de que el sujeto tiene, o está en riesgo de un trastorno particular.

Además, puede prepararse una micromatriz a partir de sondas oligonucleotídicas específicas de gen generadas a partir de secuencias de miARN conocidas. La matriz puede contener dos sondas oligonucleotídicas diferentes para cada miRNA, conteniendo una la secuencia activa madura y siendo la otra específica para el precursor del miARN. La matriz también puede contener controles, tales como una o más secuencias de ratón que difieren de ortólogos humanos en solamente unas pocas bases, que pueden actuar como controles para condiciones de rigurosidad de hibridación, ARNt y otros ARN (por ejemplo, ARNr, ARNm) de ambas especies también pueden imprimirse en la microplaca, proporcionando un control interno, relativamente estable, positivo para hibridación específica. También puede incluirse uno o más controles apropiados para hibridación no específica en la microplaca. Para este fin, se seleccionan secuencias basándose en la ausencia de cualquier homología con cualquier miARN conocido.

La micromatriz puede fabricarse usando técnicas conocidas en este campo. Por ejemplo, oligonucleótidos sonda de una longitud apropiada, por ejemplo, 40 nucleótidos, se modifican con 5'-amina en la posición C6 y se imprimen usando sistemas de micromatriz disponibles en el mercado, por ejemplo, el Microarrayer GeneMachine OmniGrid™ 100 y portaobjetos activados Amersham CodeLink™. Se prepara oligómero de ADNc marcado correspondiente a los ARN diana por transcripción inversa del ARN diana con cebador marcado. Después de la síntesis de primera cadena, los híbridos de ARN/ADN se desnaturalizan para degradar los moldes de ARN. Los ADNc diana marcados preparados de este modo se hibridan después con la microplaca de micromatriz en condiciones de hibridación, por

ejemplo, SSPE 6X/formamida 30 % a 25 °C durante 18 horas, seguido de lavado en TNT 0,75X a 37 °C durante 40 minutos. En posiciones en la matriz en las que el ADN sonda inmovilizado reconoce un ADNc diana complementario en la muestra, se produce hibridación. El ADNc diana marcado señala la posición exacta en la matriz en la que se produce unión, permitiendo la detección y cuantificación automática. El resultado consiste en una lista de acontecimientos de hibridación, que indica la abundancia relativa de secuencias de ADNc específicas, y por lo tanto la abundancia relativa de los miR complementarios correspondientes, en la muestra del paciente. De acuerdo con una realización, el oligómero de ADNc marcado es un ADNc marcado con biotina, preparado a partir de un cebador marcado con biotina. La micromatriz se procesa después por detección directa de los transcritos que contienen biotina usando, por ejemplo, conjugado de estreptavidina-Alexa647, y se explora usando procedimientos de exploración convencionales. Las intensidades de imagen de cada punto en la matriz son proporcionales a la abundancia del miR correspondiente en la muestra del paciente.

El uso de la matriz tiene varias ventajas para la detección de la expresión de miARN. En primer lugar, la expresión global de varios cientos de genes puede identificarse en la misma muestra en un punto temporal. En segundo lugar, mediante un diseño cuidadoso de las sondas oligonucleotídicas, puede identificarse la expresión de moléculas tanto maduras como precursoras. En tercer lugar, en comparación con el análisis de transferencia de Northern, la microplaca requiere una cantidad pequeña de ARN, y proporciona resultados reproducibles usando 2,5 µg de ARN total. El número relativamente limitado de miARN (algunos cientos por especie) permite la construcción de una micromatriz común para varias especies, con sondas oligonucleotídicas distintas para cada una. Dicha herramienta posibilita el análisis de expresión entre especies para cada miR conocido en diversas condiciones.

Además de su uso para ensayos de nivel de expresión cuantitativa de miR específicos, puede emplearse una microplaca que contenga oligonucleótidos sonda específicos de miARN correspondientes a una parte sustancial del miRNoma, preferentemente el miRNoma completo, para llevar a cabo el perfil de expresión génica de miR, para análisis de los patrones de expresión de miR. Pueden asociarse firmas de miR distintas con marcadores de enfermedad establecidos, o directamente con una patología.

De acuerdo con los procedimientos de realización de perfiles de expresión descritos en el presente documento, el ARN total de una muestra de un sujeto que se sospecha que tiene un trastorno particular se transcribe de forma inversa cuantitativamente para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana marcados complementarios del ARN en la muestra. Los oligodesoxinucleótidos diana se hibridan después con una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra. El resultado es un perfil de hibridación para la muestra que representa el patrón de expresión de miARN en la muestra. El perfil de hibridación comprende la señal de la unión de los oligodesoxinucleótidos diana de la muestra con los oligonucleótidos sonda específicos de miARN en la micromatriz. El perfil puede registrarse como la presencia o ausencia de unión (señal frente a señal cero). Más preferentemente, el perfil registrado incluye la intensidad de la señal de cada hibridación. El perfil se compara con el perfil de hibridación generado a partir de una muestra de control normal o muestra de referencia. Una alteración en la señal es indicativa de la presencia de, o tendencia a desarrollar, el trastorno particular en el sujeto.

Otras técnicas para medir la expresión génica de miR también están dentro de la experiencia de la técnica, e incluyen diversas técnicas para medir velocidades de transcripción y degradación de ARN.

La presente divulgación también proporciona procedimientos para diagnosticar si un sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, un trastorno particular con un pronóstico adverso. En este procedimiento, el nivel de al menos un producto génico de miR, que se asocia con un pronóstico adverso en un trastorno particular, se mide por transcripción inversa de ARN a partir de una muestra de ensayo obtenida del sujeto para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana. Los oligodesoxinucleótidos diana se hibridan después con uno o más oligonucleótidos sonda específicos de miARN (por ejemplo, una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN) para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de ensayo, y el perfil de hibridación de la muestra de ensayo se compara con un perfil de hibridación generado a partir de una muestra de control. Una alteración en la señal de al menos un miARN en la muestra de ensayo en relación con la muestra de control es indicativa de que el sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, un trastorno particular con un pronóstico adverso.

En algunos casos, puede ser deseable determinar simultáneamente el nivel de expresión de una pluralidad de diferentes productos génicos de miR en una muestra. En otros casos, puede ser deseable determinar el nivel de expresión de los transcritos de todos los genes de miR conocidos correlacionados con un trastorno particular. Evaluar los niveles de expresión específicos para cientos de genes o productos génicos de miR consume tiempo y requiere una gran cantidad de ARN total (por ejemplo, al menos 20 µg para cada transferencia de Northern) y técnicas autorradiográficas que requieren isótopos radiactivos.

Para superar estas limitaciones, puede construirse una oligobiblioteca, en formato de microplaca (es decir, una micromatriz), que contenga un conjunto de sondas oligonucleotídicas (por ejemplo, oligodesoxinucleotídica) que sean específicas para un conjunto de genes de miR. Usando dicha micromatriz, el nivel de expresión de múltiples microARN en una muestra biológica puede determinarse por transcripción inversa de los ARN para generar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana, e hibridarlos para explorar los oligonucleótidos en la micromatriz para generar un perfil de hibridación o expresión. El perfil de hibridación de la muestra de ensayo puede compararse

después con el de una muestra de control para determinar qué microARN tienen un nivel de expresión alterado. Como se usa en el presente documento, “oligonucleótido sonda” o “oligodesoxinucleótido sonda” se refiere a un oligonucleótido que es capaz de hibridar con un oligonucleótido diana. “Oligonucleótido diana” u “oligodesoxinucleótido diana” se refiere a una molécula para detectar (por ejemplo, mediante hibridación). Por “oligonucleótido sonda específico de miR” u “oligonucleótido sonda específico para un miR” se entiende un oligonucleótido sonda que tiene una secuencia seleccionada para hibridar con un producto génico de miR específico, o con un transcrito inverso del producto génico de miR específico.

Un “perfil de expresión” o “perfil de hibridación” de una muestra particular es esencialmente una identificación del estado de la muestra; mientras que dos estados pueden tener cualquier gen particular expresado de forma similar, la evaluación de varios genes simultáneamente permite la generación de un perfil de expresión génica que es único para el estado de la célula. Es decir, pueden distinguirse muestras normales de muestras que presentan trastorno correspondiente. Dentro de dichas muestras que presentan trastorno, pueden determinarse diferentes estados de pronóstico (por ejemplo, buenas o malas perspectivas de supervivencia a largo plazo). Comparando los perfiles de expresión de muestras que presentan trastorno en diferentes estados, se obtiene información con respecto a qué genes son importantes (incluyendo tanto regulación positiva como regulación negativa de genes) en cada uno de estos estados.

La identificación de secuencias que se expresan de forma diferencial en muestras que presentan trastorno, así como la expresión diferencial que da diferentes resultados de pronóstico, permite el uso de esta información de varias maneras. Por ejemplo, puede evaluarse un régimen de tratamiento particular (por ejemplo, para determinar si un fármaco quimioterapéutico actúa para mejorar el pronóstico a largo plazo en un sujeto particular). De forma similar, puede realizarse o confirmarse el diagnóstico comparando muestras de un sujeto con perfiles de expresión conocidos. Además, estos perfiles de expresión génica (o genes individuales) permiten la exploración de candidatos farmacológicos que suprimen el perfil de expresión del trastorno particular o convierten un perfil de pronóstico malo en un perfil de mejor pronóstico.

Las alteraciones en el nivel de uno o más productos génicos de miR en células pueden dar como resultado la desregulación de una o más dianas pretendidas para estos miR, lo que puede conducir a un trastorno particular. Por lo tanto, alterar el nivel del producto génico de miR (por ejemplo, reduciendo el nivel de un miR que está regulado positivamente en células que muestran un trastorno, aumentando el nivel de un miR que está regulado negativamente en células que presentan trastorno) puede tratar exitosamente el trastorno.

En consecuencia, la presente divulgación abarca procedimientos para tratar un trastorno en un sujeto, en el que al menos un producto génico de miR está desregulado (por ejemplo, regulado negativamente, regulado positivamente) en las células del sujeto. En una realización, el nivel de al menos un producto génico de miR en una muestra de ensayo es mayor que el nivel del producto génico de miR correspondiente en una muestra de control o referencia. En otra realización, el nivel de al menos un producto génico de miR en una muestra de ensayo es menor que el nivel del producto génico de miR correspondiente en una muestra de control. Cuando el al menos un producto génico de miR aislado está regulado negativamente en la muestra de ensayo, el procedimiento comprende administrar una cantidad eficaz del al menos un producto génico de miR aislado, o una variante aislada o fragmento biológicamente activo del mismo, de modo que se inhiba la proliferación de las células que presentan trastorno en el sujeto.

Por ejemplo, cuando un producto génico de miR está regulado negativamente en una célula cancerosa en un sujeto, administrar una cantidad eficaz de un producto génico de miR aislado al sujeto puede inhibir la proliferación de la célula cancerosa. El producto génico de miR aislado que se administra al sujeto puede ser idéntico a un producto génico de miR natural endógeno que está regulado negativamente en la célula cancerosa o puede ser una variante o fragmento biológicamente activo del mismo.

Como se define en el presente documento, una “variante” de un producto génico de miR se refiere a un miARN que tiene menos del 100 % de identidad con un producto génico de miR natural correspondiente y posee una o más actividades biológicas del producto génico de miR natural correspondiente. Los ejemplos de dichas actividades biológicas incluyen, pero sin limitación, inhibición de la expresión de una molécula de ARN diana (por ejemplo, inhibir la traducción de una molécula de ARN diana, modular la estabilidad de una molécula de ARN diana, inhibir el procesamiento de una molécula de ARN diana) e inhibición de un proceso celular asociado con cáncer y/o un trastorno mieloproliferativo (por ejemplo, diferenciación celular, crecimiento celular, muerte celular). Estas variantes incluyen variantes de especie y variantes que son la consecuencia de una o más mutaciones (por ejemplo, una sustitución, una delección, una inserción) en un gen de miR. En ciertas realizaciones, la variante es al menos aproximadamente el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a un producto génico de miR natural correspondiente.

Como se define en el presente documento, un “fragmento biológicamente activo” de un producto génico de miR se refiere a un fragmento de ARN de un producto génico de miR que posee una o más actividades biológicas de un producto génico de miR natural correspondiente. Como se ha descrito anteriormente, los ejemplos de dichas actividades biológicas incluyen, pero sin limitación, inhibición de la expresión de una molécula de ARN diana e inhibición de un proceso celular asociado con cáncer y/o un trastorno mieloproliferativo. En ciertas realizaciones, el fragmento biológicamente activo es de al menos aproximadamente 5, 7, 10, 12, 15 o 17 nucleótidos de longitud. En

una realización particular, puede administrarse un producto génico de miR aislado a un sujeto en combinación con uno o más tratamientos antineoplásicos adicionales. Los tratamientos antineoplásicos adecuados incluyen, pero sin limitación, quimioterapia, radioterapia y combinaciones de los mismos (por ejemplo, quimiorradiación).

5 Cuando el al menos un producto génico de miR aislado está regulado positivamente en las células cancerosas, el procedimiento comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe la expresión del al menos un producto génico de miR, de modo que se inhiba la proliferación de las células que muestran trastorno. Dichos compuestos se denominan en el presente documento compuestos de inhibición de la expresión génica de miR. Los ejemplos de compuestos de inhibición de la expresión génica de miR adecuados incluyen, pero sin limitación, los descritos en el presente documento (por ejemplo, ARN bicatenario, ácidos nucleicos antisentido y moléculas de ARN enzimático).

En una realización particular, un compuesto que inhibe la expresión génica de miR puede administrarse a un sujeto en combinación con uno o más tratamientos antineoplásicos adicionales. Los tratamientos antineoplásicos adecuados incluyen, pero sin limitación, quimioterapia, radioterapia y combinaciones de los mismos (por ejemplo, quimiorradiación).

15 Como se ha descrito en el presente documento, cuando el al menos un producto génico de miR aislado está regulado positivamente en células cancerosas, el procedimiento comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un compuesto para inhibir la expresión del al menos un producto génico de miR, de modo que se inhiba la proliferación de células cancerosas.

20 Los términos “tratar”, “tratando” y “tratamiento”, como se usan en el presente documento, se refieren a aliviar síntomas asociados con una enfermedad o afección, por ejemplo, cáncer y/u otra afección o trastorno, incluyendo prevenir o retardar la aparición de los síntomas de la enfermedad y/o reducir la gravedad o frecuencia de síntomas de la enfermedad, trastorno o afección. Los términos “sujeto”, “paciente” e “individuo” se define en el presente documento que incluyen animales, tales como mamíferos, incluyendo, pero sin limitación, primates, vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, cobayas, ratas, ratones u otras especies bovinas, ovinas, equinas, caninas, felinas, roedores o murinas. En una realización preferida, el animal es un ser humano.

30 Como se usa en el presente documento, un producto génico de miR “aislado” es uno que se sintetiza, o altera o retira del estado natural mediante intervención humana. Por ejemplo, se considera que un producto génico de miR sintético, o un producto génico de miR parcial o completamente separado de los materiales coexistentes de su estado natural, está “aislado”. Un producto génico de miR aislado puede existir en una forma sustancialmente purificada, o puede existir en una célula en la que se ha suministrado el producto génico de miR. Por lo tanto, un producto génico de miR que se suministra deliberadamente a, o se expresa en, una célula se considera un producto génico de miR “aislado”. Se considera que un producto génico de miR producido dentro de una célula a partir de una molécula precursora de miR también es una molécula “aislada”. De acuerdo con la invención, los productos génicos de miR aislados descritos en el presente documento pueden usarse para la fabricación de un medicamento para tratar a un sujeto (por ejemplo, un ser humano).

35 Pueden obtenerse productos génicos de miR aislados usando varias técnicas convencionales. Por ejemplo, los productos génicos de miR pueden sintetizarse de forma química o producirse de forma recombinante usando procedimientos conocidos en la técnica. En una realización, los productos génicos de miR se sintetizan químicamente usando ribonucleósido fosforamiditas protegidas de forma apropiada y un sintetizador de ADN/ARN convencional. Los proveedores comerciales de moléculas de ARN sintéticas o reactivos de síntesis incluyen, por ejemplo, Proligo (Hamburgo, Alemania), Dharmacon Research (Lafayette, CO, Estados Unidos), Pierce Chemical (parte de Perbio Science, Rockford, IL, Estados Unidos), Glen Research (Sterling, VA, Estados Unidos), ChemGenes (Ashland, MA, Estados Unidos) y Cruachem (Glasgow, Reino Unido).

40 Como alternativa, los productos génicos de miR pueden expresarse a partir de plásmidos de ADN circulares o lineales recombinantes usando cualquier promotor adecuado. Los promotores adecuados para expresar ARN a partir de un plásmido incluyen, por ejemplo, las secuencias promotoras U6 o H1 ARN pol III, o los promotores de citomegalovirus. La selección de otros promotores adecuados está dentro de la experiencia de la técnica. Los plásmidos recombinantes de la invención también pueden comprender promotores inducibles o regulables para expresión de los productos génicos de miR en células (por ejemplo, células cancerosas, células que muestran un trastorno mieloproliferativo).

45 Los productos génicos de miR que se expresan a partir de plásmidos recombinantes pueden aislarse de sistemas de expresión de células cultivadas por técnicas convencionales. Los productos génicos de miR que se expresan a partir de plásmidos recombinantes también pueden suministrarse a, y expresarse directamente en, células.

50 Los productos génicos de miR pueden expresarse a partir de un plásmido recombinante separado, o pueden expresarse a partir del mismo plásmido recombinante. En una realización, los productos génicos de miR se expresan como moléculas precursoras de ARN a partir de un plásmido único, y las moléculas precursoras se procesan en el producto génico de miR funcional por un sistema de procesamiento adecuado, incluyendo, pero sin limitación, sistemas de procesamiento existentes dentro de una célula cancerosa.

La selección de plásmidos adecuados para expresar los productos génicos de miR, procedimientos para insertar secuencias de ácido nucleico en el plásmido para expresar los productos génicos, y procedimientos para suministrar el plásmido recombinante a las células de interés están dentro de la experiencia de la técnica. Véase, por ejemplo, Zeng y col. (2002), *Molecular Cell* 9:1327-1333; Tuschl (2002), *Nat. Biotechnol.* 20:446-448; Brummelkamp y col. (2002), *Science* 296:550-553; Miyagishi y col. (2002), *Nat. Biotechnol.* 20:497-500; Paddison y col. (2002), *Genes Dev.* 16:948-958; Lee y col. (2002), *Nat. Biotechnol.* 20:500-505; y Paul y col. (2002), *Nat. Biotechnol.* 20:505-508, cuyas divulgaciones completas se incorporan en el presente documento por referencia. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, un plásmido que expresa los productos génicos de miR puede comprender una secuencia que codifica un ARN precursor de miR bajo el control del promotor intermedio-temprano de CMV. Como se usa en el presente documento, "bajo el control" de un promotor significa que las secuencias de ácido nucleico que codifican el producto génico de miR se localiza en 3' del promotor, de modo que el promotor puede iniciar la transcripción de las secuencias codificantes del producto génico de miR.

Los productos génicos de miR también pueden expresarse a partir de vectores virales recombinantes. Se contempla que los productos génicos de miR pueden expresarse a partir de dos vectores virales recombinantes separados, o a partir del mismo vector viral. El ARN expresado a partir de los vectores virales recombinantes puede aislarse de sistemas de expresión de células cultivadas por técnicas convencionales, o puede expresarse directamente en células (por ejemplo, células cancerosas, células que muestran un trastorno mieloproliferativo).

En otras realizaciones de los procedimientos de tratamiento de la presente divulgación, puede administrarse al sujeto una cantidad eficaz de al menos un compuesto que inhiba la expresión de miR. Como se usa en el presente documento "inhibir la expresión de miR" significa que la producción del precursor y/o forma activa, madura del producto génico de miR después del tratamiento es menor que la cantidad producida antes del tratamiento. Un experto en la materia puede determinar fácilmente si la expresión de miR se ha inhibido en células usando, por ejemplo, las técnicas para determinar el nivel de transcrito de miR analizado en el presente documento. Puede producirse inhibición en el nivel de la expresión génica (es decir, inhibiendo la transcripción de un gen de miR que codifica el producto génico de miR) o en el nivel de procesamiento (por ejemplo, inhibiendo el procesamiento de un precursor de miR en un miR maduro, activo).

Como se usa en el presente documento, una "cantidad eficaz" de un compuesto que inhibe la expresión de miR es una cantidad suficiente para inhibir la proliferación de células en un sujeto que padece cáncer y/o un trastorno mieloproliferativo. Un experto en la materia puede determinar fácilmente una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe la expresión de miR para administrar a un sujeto dado, teniendo en cuenta factores tales como la talla y peso del sujeto; el alcance de la penetración de la enfermedad; la edad, salud y sexo del sujeto; la vía de administración; y si la administración es regional o sistémica.

Un experto en la materia también puede determinar fácilmente un régimen de dosificación apropiado para administrar un compuesto que inhiba la expresión de miR a un sujeto dado, como se describe en el presente documento. Los compuestos adecuados para inhibir la expresión génica de miR incluyen ARN bicatenario (tal como ARN de interferencia corto o pequeño o "ARNip"), ácidos nucleicos antisentido y moléculas de ARN enzimáticas, tales como ribozimas. Cada uno de estos compuestos puede dirigirse a un producto génico de miR dado e interferir con la expresión (por ejemplo, inhibiendo la traducción, induciendo la escisión y/o degradación) del producto génico de miR diana.

Por ejemplo, la expresión de un gen de miR dado puede inhibirse induciendo una interferencia de ARN del gen de miR con una molécula de ARN bicatenario ("ARNbc") aislada que tiene al menos el 90 %, por ejemplo, al menos el 95 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % de homología de secuencia con al menos una parte del producto génico de miR. En una realización particular, la molécula de ARNbc es un "ARN de interferencia corto o pequeño" o "ARNip".

La administración de al menos un producto génico de miR, o al menos un compuesto para inhibir la expresión de miR, inhibirá la proliferación de células (por ejemplo, células cancerosas, células que muestren un trastorno mieloproliferativo) en un sujeto que tiene un cáncer y/o un trastorno mieloproliferativo. Como se usa en el presente documento, "inhibir la proliferación de células cancerosas o células que muestren un trastorno mieloproliferativo" significa destruir las células, o detener permanente o temporalmente o ralentizar el crecimiento de las células. La inhibición de la proliferación celular puede inferirse si el número de tales células en el sujeto permanece constante o se reduce después de la administración de los productos génicos de miR o compuestos que inhiben la expresión del gen de miR. También puede inferirse una inhibición de la proliferación de células cancerosas o células que muestren un trastorno mieloproliferativo si el número absoluto de tales células aumenta, pero la velocidad de crecimiento tumoral se reduce.

Un producto génico de miR o compuesto que inhibe la expresión génica de miR también puede administrarse a un sujeto por cualquier vía de administración entérica o parenteral adecuada. Las vías de administración entéricas adecuadas para los presentes procedimientos incluyen, por ejemplo, suministro oral, rectal o intranasal. Las vías de administración parenterales adecuadas incluyen, por ejemplo, administración intravascular (por ejemplo, inyección de embolada intravenosa, infusión intravenosa, inyección de embolada intra-arterial, infusión intra-arterial e instilación por catéter en la vasculatura); inyección peri e intra-tisular (por ejemplo, inyección peri-tumoral e intra-

tumoral, inyección intra-retiniana o inyección subretiniana); inyección o deposición subcutánea, incluyendo infusión subcutánea (tal como por bombas osmóticas); aplicación directa al tejido de interés, por ejemplo, por un catéter u otro dispositivo de colocación (por ejemplo, un microgránulo retiniano o un supositorio o un implante que comprende un material poroso, no poroso o gelatinoso); e inhalación. Son vías de administración particularmente adecuadas 5 inyección, infusión e inyección directa en el tumor.

Los productos génicos de miR o compuestos de inhibición de la expresión génica de miR pueden formularse como composiciones farmacéuticas, en ocasiones denominadas "medicamentos", antes de administrarlos a un sujeto, de acuerdo con técnicas conocidas en este campo. En consecuencia, la presente divulgación abarca composiciones farmacéuticas para tratar cáncer y/o un trastorno mieloproliferativo.

10 Las presentes composiciones farmacéuticas comprenden al menos un producto génico de miR o compuesto de inhibición de la expresión génica de miR (o al menos un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el producto génico de miR o compuesto de inhibición de la expresión génica de miR) (por ejemplo, de 0,1 a 90 % en peso), o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, mezclado con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica de la invención comprende adicionalmente uno o más agentes antineoplásicos (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos). Las formulaciones farmacéuticas de la invención también 15 pueden comprender al menos un producto génico de miR o compuesto de inhibición de la expresión génica de miR (o al menos un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el producto génico de miR o compuesto de inhibición de la expresión génica de miR), que se encapsula por liposomas y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden comprender excipientes y/o aditivos farmacéuticos convencionales. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen estabilizadores, antioxidantes, agentes de ajuste de la osmolalidad, tampones y agentes de ajuste del pH. Los aditivos adecuados incluyen, por ejemplo, tampones fisiológicamente biocompatibles (por ejemplo, clorhidrato de trometamina), adiciones de quelantes (tales como, por ejemplo, DTPA o DTPA-bisamida) o complejos de quelado cálcico (tales como, por 25 ejemplo, DTPA de calcio, CaNaDTPA-bisamida) o, opcionalmente, adiciones de sales de calcio o sodio (por ejemplo, cloruro cálcico, ascorbato cálcico, gluconato cálcico o lactato cálcico). Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden envasarse para su uso en forma líquida, o pueden liofilizarse.

30 Para composiciones farmacéuticas sólidas de la invención, pueden usarse vehículos convencionales no tóxicos sólidos farmacéuticamente aceptables; por ejemplo, usos farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio y similares.

35 Por ejemplo, una composición farmacéutica sólida para administración oral puede comprender cualquiera de los vehículos y excipientes enumerados anteriormente y el 10-95 %, preferentemente el 25 %-75 %, del al menos un producto génico de miR o compuesto de inhibición de la expresión génica de miR (o al menos un ácido nucleico que comprende secuencias que los codifican). Una composición farmacéutica para administración para aerosol (inhalación) puede comprender el 0,01-20 % en peso, preferentemente el 1 %-10 % en peso, del al menos un producto génico de miR o compuesto de inhibición de la expresión génica de miR (o al menos un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el producto génico de miR o compuesto de inhibición de la expresión génica de miR) encapsulado en un liposoma como se ha descrito anteriormente y un propulsor. También puede incluirse un vehículo según se desee; por ejemplo, lecitina para suministro intranasal.

40 Las composiciones farmacéuticas pueden comprender además uno o más agentes antineoplásicos. En una realización particular, las composiciones comprenden al menos un producto génico de miR o un compuesto de inhibición de la expresión génica de miR (o al menos un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el producto génico de miR o un compuesto de inhibición de la expresión génica de miR) y al menos un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos que son adecuados para los procedimientos de la presente 45 divulgación incluyen, pero sin limitación, agentes alquilantes de ADN, agentes antibióticos anti-tumorales, agentes anti-metabólicos, agentes estabilizadores de tubulina, agentes desestabilizadores de tubulina, agentes antagonistas de hormonas, inhibidores de topoisomerasa, inhibidores de proteína quinasa, inhibidores de HMG-CoA, inhibidores de CDK, inhibidores de ciclina, inhibidores de caspasa, inhibidores de metaloproteinasa, ácidos nucleicos antisentido, ADN de triple hélice, aptámeros de ácidos nucleicos y agentes virales, bacterianos y exotóxicos modificados molecularmente. Los ejemplos de agentes adecuados para las composiciones de la presente invención incluyen, pero sin limitación, citidina arabinósido, metotrexato, vincristina, etopósido (VP-16), doxorubicina (adriamicina), cisplatino (CDDP), dexametasona, arglabina, ciclofosfamida, sarcolisina, metilnitrosourea, fluorouracilo, 5-fluorouracilo (5FU), vinblastina, camptotecina, actinomomicina D, mitomicina C, peróxido de hidrógeno, oxaliplatino, irinotecán, topotecán, leucovorina, carmustina, estreptozocina, CPT-II, taxol, tamoxifeno, dacarbazina, 55 rituximab, daunorrubicina, 1-[beta]-D-arabinofuranosilcitosina, imatinib, fludarabina, docetaxel y FOLFOX4.

60 En una realización, el procedimiento comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico de miR asociado con niveles de expresión reducidos en células cancerosas. Un aumento del nivel del producto génico de miR en la célula, en relación con un control adecuado (por ejemplo, el nivel del producto génico de miR en una célula de control), es indicativo de que el agente de ensayo es un agente antineoplásico.

Los agentes adecuados incluyen, pero sin limitación, fármacos (por ejemplo, moléculas pequeñas, péptidos) y macromoléculas biológicas (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos). El agente puede producirse de forma recombinante, sintética o puede aislarse (es decir, purificarse) de una fuente natural. Se conocen bien en la técnica diversos procedimientos para proporcionar dichos agentes a una célula (por ejemplo, transfección), y se han descrito anteriormente en el presente documento varios de tales procedimientos. También se conocen bien en la técnica procedimientos para detectar la expresión de al menos un producto génico de miR (por ejemplo, transferencia de Northern, hibridación *in situ*, RT-PCR, realizaciones de perfiles de expresión). Varios de estos procedimientos también se describen en el presente documento.

### Ejemplos

La invención puede entenderse mejor por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes, que sirven para ilustrar pero no limitar la presente invención.

Los datos del presente documento muestran que los fagocitos mononucleares humanos activados y células THP-1 liberan microvesículas que inducen la supervivencia y diferenciación de monocitos recién aislados. Sin desear quedar ligado a la teoría, los inventores del presente documento creen que en enfermedades inflamatorias específicas, el contenido de las microvesículas puede alterarse para inducir rápidamente una respuesta. Los datos también muestran que las microvesículas circulan en sangre periférica humana. Las microvesículas en circulación regulan la homeostasis celular normal y distribuyen instrucciones a células distantes durante la lesión tisular y la inflamación.

Las microvesículas pueden actuar como biomarcadores para etiología de enfermedad y mediadores sistémicos de la respuesta inmune innata. Es por lo tanto beneficioso poder obtener información similar a través del aislamiento de microvesículas en la sangre periférica en lugar de obtener tejido mediante procedimientos invasivos. Además, el entendimiento de la firma normal de las microvesículas en la sangre periférica proporciona una base para entender acontecimientos durante los acontecimientos inflamatorios agudos.

Como se muestra en el presente documento, la diferenciación de macrófagos aberrantes contribuye a la alteración de la homeostasis inmune. Puesto que la maduración de los monocitos está inducida por GM-CSF o M-CSF, los inventores iniciaron estudios para entender los mecanismos y diferencias entre la diferenciación mediada por GM-CSF y M-CSF. El compromiso para diferenciarse en respuesta a GM-CSF pero no M-CSF fue rápido e irreversible (datos no mostrados). No se requirió estimulación por GM-CSF continua para este efecto ya que solo 4 horas de tratamiento indujeron diferenciación de macrófagos. Se obtuvieron observaciones similares en células THP1 tratadas con PMA usadas como un modelo de diferenciación de macrófagos.

Por lo tanto, los inventores determinaron que se secretó al menos un factor tras inducir la diferenciación que mantuvo las señales o activó otras células para diferenciarse. Por lo tanto, los monocitos o células THP1 se expusieron a GM-CSF durante 4 horas o PMA durante 1 hora, respectivamente, después de lo cual las células se lavaron y se situaron en medio mínimo sin estímulo. Después de 24 horas, los sobrenadantes de cultivo se recogieron y se añadieron a monocitos indiferenciados o células THP1. Notablemente, los sobrenadantes de células THP1 tratadas con PMA o monocitos tratados con GM-CSF diferenciaron monocitos y células THP1 (datos no mostrados).

Usando el sistema de matrices en suspensión Bioplex para detectar hasta 27 citocinas diferentes en los sobrenadantes de cultivo, los inventores no pudieron detectar una citocina responsable. Puesto que los inventores diferenciaron la línea celular THP1 independiente de factor de crecimiento con sobrenadantes de monocitos estimulados por GM-CSF, los inventores concluyeron que una citosina/factor de crecimiento no era responsable de este efecto. Los inventores investigaron a continuación la posibilidad de que se secretaran microvesículas en el sobrenadante de cultivo para mediar en la maduración mieloide.

Como se muestra en la **Figura 1**, los monocitos tratados con GM-CSF durante 24 horas liberaron cantidades significativas de microvesículas (puntos oscuros) en el sobrenadante de cultivo en comparación con monocitos no tratados (puntos claros).

De forma similar, las células THP1 tratadas con PMA también secretaron microvesículas durante la diferenciación (datos no mostrados). En particular, la **Figura 1** muestra la liberación inducida por diferenciación de microvesículas de macrófagos. Los monocitos de sangre periférica (PBM) se dejaron sin tratar (claro) o se trataron con GM-CSF (oscuro) durante 24 horas. Se recogió sobrenadante sin células y se ultracentrifugó. Las vesículas se resuspendieron en PBS y se analizaron con respecto a tamaño en una citometría de flujo. Antes del análisis, se ajustaron los parámetros FSS y SSC usando perlas convencionales de 2  $\mu\text{m}$  (no mostradas). Se muestran datos representativos de tres donantes diferentes.

Las microvesículas de células THP1 tratadas con PMA se purificaron y se añadieron a monocitos recién aislados o células THP1 indiferenciadas. Las microvesículas por sí solas indujeron diferenciación de macrófagos en ambos tipos celulares como se indica por morfología (véase **Figuras 2A-2C**) y expresión de antígenos superficiales (datos no mostrados).

El contenido de estas microvesículas se ha analizado. Los inventores detectaron la presencia de miARN en las microvesículas de células THP1 tratadas con PMA (datos no mostrados).

5 Los inventores también evaluaron microvesículas en circulación y miARN en la sangre periférica de voluntarios normales. Basándose en el tamaño, los inventores hallaron tres subpoblaciones de microvesículas en la circulación (**Figura 3A**). Se detectaron microvesículas derivadas de macrófagos usando anticuerpos que detectan receptor de manosa (CD206) y MHC II (**Figura 3B**). Aproximadamente el 40 % de las microvesículas totales (región seleccionada) en el plasma derivan de macrófagos basándose en la expresión de CD206 o MHCII (**Figura 3C**).

10 Los inventores determinaron además si microvesículas de sangre periférica contienen miARN. Los inventores detectaron la expresión de numerosos miARN. Los mayores miARN detectados se muestran en la **Figura 8** que muestra la **Tabla III** (n = 51).

Notablemente, miR-146 es indetectable en la sangre periférica mientras que la expresión de miR-155 era 80 veces menor que el miARN de mayor expresión. Puesto que tanto miR-146 como miR-155 estaban elevados en las muestras de pacientes de IPF de los inventores, pero eran de bajos a indetectables en sangre periférica de donantes normales, el examen de miARN en circulación puede actuar como un biomarcador de enfermedad.

15 Se muestra ahora en el presente documento que las microvesículas en circulación contienen miARN y que las microvesículas en circulación pueden proporcionar una ruta para que los miARN induzcan comunicación entre células. Las microvesículas que albergan miARN también pueden proporcionar información sobre la base genética de la enfermedad y pueden actuar como biomarcadores predictivos.

20 Además, las microvesículas liberadas durante la diferenciación de macrófagos pueden mediar en la maduración de células inmaduras. Las microvesículas recogidas durante la maduración de macrófagos median en la diferenciación y supervivencia de monocitos humanos y contienen ARN. Tanto miARN como ARNm procesado son responsables de las señales de maduración transmitidas en células inmaduras.

#### Ejemplo - Plasma

25 Se aíslan microvesículas del plasma de individuos sanos normales. Se aísla ARN tanto de las microvesículas como de células mononucleares coincidentes y se realiza el perfil para 420 miARN maduros conocidos por PCR en tiempo real. El análisis de grupos jerárquico de los conjuntos de datos indicó diferencias significativas en la expresión de miARN entre células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y microvesículas de plasma.

30 Los inventores observaron 104 y 75 miARN expresados significativamente en las microvesículas y PBMC, respectivamente. Notablemente, 33 miARN se expresaron específicamente en microvesículas en comparación con las PBMC. El miARN se sometió a modelo computacional para determinar las rutas biológicas reguladas por los miARN detectados. Se predijo que la mayoría de los microARN expresados en las microvesículas de la sangre regularían la diferenciación celular de células sanguíneas y rutas metabólicas. Resulta interesante que se ha predicho que unos pocos microARN específicos son moduladores importantes de la función inmunitaria.

35 Este ejemplo es el primero en identificar y definir la expresión de miARN en microvesículas de plasma en circulación de sujetos normales.

40 Pruebas recientes revelan que puede producirse intercambio genético de ARNm y miARN entre células mediante transferencia mediada por exosomas (PMID: 17486113). Las microvesículas son exosomas pequeños/vesículas de origen endocítico liberados por tipos celulares dañados o sanos normales (PMID: 17337785, PMID: 17409393, PMID: 16791265). Las microvesículas se desprenden de la membrana plasmática al ambiente extracelular para facilitar la comunicación entre células. A pesar de su pequeño tamaño (50 nm a 1 µm) las microvesículas están enriquecidas en moléculas bioactivas y se sospecha que contienen ácido nucleico y/o proteína; estas partículas celulares desempeñan un papel en el crecimiento, diferenciación y progresión del cáncer (PMID: 16453000). En la sangre periférica, dos tercios de las microvesículas derivan de plaquetas. Las microvesículas derivadas de plaquetas desempeñan un papel en la angiogénesis y la proliferación metastásica de cánceres tales como cáncer de pulmón (PMID: 15499615). Las microvesículas derivadas de plaquetas inducen una respuesta inmune tras la regulación de la expresión génica en células hematopoyéticas, endoteliales y monocíticas (PMID: 17378242, PMID: 17127485).

50 Resulta interesante que se ha realizado recientemente una conexión entre microvesículas y miARN. Recientemente, Valadi y colaboradores indicaron que las vesículas liberadas de líneas de mastocitos humanos y murinos contienen más de 1200 ARNm y aproximadamente 121 moléculas de miARN (PMID: 17486113). Por el contrario, la presente invención se refiere a microvesículas de sangre y plasma humano de origen natural que contienen microARN que conduce a efectos biológicos *ex vivo*.

55 La **Figura 8 - Tabla I** muestra que los microARN son importantes en enfermedades humanas, incluyendo aplicaciones de cáncer y no de cáncer. Las moléculas de microARN asociadas con aumento de la expresión en tejido enfermo pero normalmente con expresión nativa baja o indetectable en microvesículas de plasma humano (**Tabla I**, mostrada en la **Figura 6**) proporcionan la oportunidad de definir cambios en la salud y enfermedad y pueden ser biomarcadores eficaces (en negrita, Columna de Aumento de la Expresión). De forma similar, los

microARN normalmente abundantes pueden reducirse en microvesículas de plasma humano para reflejar la reducción observada en el tejido (en negrita, Columna de Reducción de la Expresión).

Pruebas considerables demuestran la importancia de miARN como un fundamento inevitable del sistema genético humano. El empleo de microvesículas para transferir material genético sería un procedimiento de transferencia eficaz dentro del cuerpo humano. El transporte microvesicular de miARN permitiría la comunicación a larga distancia.

## PROCEDIMIENTOS

**Recogida de sangre y aislamiento de microvesículas.** Se recogió sangre periférica (40 cm<sup>3</sup>) en tubos de EDTA de 24 mujeres y 27 hombres donantes caucásicos no fumadores sanos después del consentimiento informado. La recogida de la sangre se realizó entre la mañana y primera hora de la tarde. La mediana de la edad para donantes mujeres fue 29 así como para donantes hombre. La sangre periférica se diluyó 1:1 con PBS de endotoxina baja estéril, estratificado sobre ficoll-hypaque (d=1,077), y se centrifugó como se ha descrito previamente (PMID: 16931806). La fracción de células mononucleares se lavó una vez en PBS. Las microvesículas se purificaron del plasma. Brevemente, las vesículas se concentraron por centrifugación a 160.000 x g durante 1 hora a 4 °C (PMID: 10648405).

**Extracción de ARN.** Se aisló ARN total por procedimiento de extracción con Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA). Para aumentar la producción de ARN pequeños, el ARN se precipitó durante una noche. Se determinó la concentración de ARN y se determinó la integridad de ARN por electroforesis capilar en un bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies, Inc, Santa Clara, CA). Para ARN aislado de células mononucleares, se usó solamente un número de integridad de ARN (RIN)  $\geq$  a 9. Puesto que el ARNr 18s y 28s intacto era variable en las microvesículas, el RIN no fue una restricción para estas muestras.

**Realización de perfiles de miARN por PCR cuantitativa.** Se realizó el perfil de la expresión de 420 miARN humanos maduros por PCR en tiempo real. Se convirtió ARN (50 ng) a ADNc usando como cebadores una mezcla de cebadores en bucle para 420 miARN maduros humanos conocidos (kit Mega Plex, Applied Biosystems, Foster City, CA) usando condiciones de transcripción inversa previamente publicados (PMID: 18158130). Puesto que no se conoce ningún miARN de control en las microvesículas, se examinaron varios controles internos. Los cebadores para los controles internos, ARN nucleolar pequeño (sno) U38B, ARNsno U43, ARN nuclear pequeño (np) U6 así como ARNr 18S y 5S se incluyeron en la mezcla de cebadores.

Se realizó el perfil de la expresión usando un instrumento de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7900HT equipado con una placa de reacción 384 pocillos. Se usaron robots de manipulación de líquidos y el robot Zymak Twister para aumentar el rendimiento y reducir el error. Se realizó PCR en tiempo real usando condiciones convencionales.

**Citometría de flujo.** Las microvesículas de sangre periférica se inmunotñieron directamente del plasma sin concentración por centrifugación. Para determinar el origen celular, se inmunotñieron 0,5 cc de plasma por panel de anticuerpos. El panel I contenía anticuerpos que reconocían CD66b-FITC (neutrófilo), CD202b (Tie2)-PE (endotelial), CD206 PE-Cy5 (macrófago/dendrítico), CD79a-APC (linfocitos B) y CD14 Pe-Cy7 (monocitos). El panel II contenía anticuerpos para CD41a-PE-Cy5 (plaquetas), CCR2-APC (monocitos), CCR3-PE (células dendríticas), CCR5-PE-Cy7 (macrófagos) y CD3-Alexa 610 (linfocitos T). El panel III contenía anticuerpos de control de isotipo. Las muestras se analizaron en citómetro de flujo BD Aria (BD Biosciences San Jose, CA). Los datos se expresaron como porcentaje de células seleccionadas.

**Análisis estadístico.** Para reducir el ruido de fondo, los miARN en los que el 80 % de las observaciones individuales tenían una puntuación CT en bruto mayor de 35 no se consideraron durante el análisis de los datos. Los controles internos (18S, 5S, ARNsno U38B, ARNsno U43 y ARNnp U6) eran altamente variables en las microvesículas de plasma así como niveles de expresión significativamente diferentes en microvesículas de plasma frente a células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Por lo tanto, para reducir el sesgo provocado por el uso de un cierto miARN como un factor de corrección de normalización y para reducir las variaciones de muestras entre matrices de RT-PCR, los miARN se compararon entre microvesículas de plasma y PBMC basándose en su expresión relativa con la expresión de miARN global en cada matriz usando análisis de normalización de la mediana (PMID: 16854228). Controlando el sexo y edad de los donantes, se usaron modelos mixtos lineales para estimar la diferencia de miARN específico entre microvesículas de plasma y PBMC. La proporción de cambio se calculó basándose en la diferencia de la media estimada.

Se generaron mapas de calor usando el miARN que pasó los criterios de filtración para cada tejido y los mARN se sometieron a agrupación jerárquica basándose en su expresión media relativa. La expresión de miARN también se clasificó basándose en su puntuación de CT en bruto para microvesículas de plasma y PBMC. Se realizó análisis estadístico adicional tal como ANOVA para determinar los miARN que son significativos expresados entre los dos grupos de tratamiento.

**Análisis de ruta y predicción.** Las dianas de miARN predichas se determinaron usando miRanda

(microma.sanger.ac.uk/targets/v5/). Basándose en el algoritmo de miRanda, se genera una puntuación para cada diana, solo se analizaron adicionalmente puntuaciones mayores de 17 usando software Ingenuity Pathway Analysis (Ingenuity Systems, Redwood City, CA). Usando este software, se determinaron las rutas canónicas basándose en dianas de los miARN. El conjunto de datos se examinó para determinar rutas asociadas basándose en la ontología génica de dianas de miARN.

## RESULTADOS

### Subpoblaciones microvesiculares de sangre periférica

Inicialmente, los inventores examinaron el origen celular de las microvesículas dentro de la sangre periférica de individuos sanos normales. Usando citometría de flujo, los inventores descubrieron que la mayoría de las microvesículas de sangre periférica derivaban de plaquetas (**Figura 4**), como se ha indicado previamente (PMID: 10648405).

Los inventores también observaron una segunda población grande de microvesículas que derivaban de linaje fagocítico de células mononucleares. Esta población se inmunotizó con anticuerpos que detectaban antígenos de superficie en fagocitos mononucleares. Notablemente, solo un pequeño porcentaje de las microvesículas de sangre periférica derivó de linfocitos T y neutrófilos. Los inventores no consiguieron detectar vesículas que se originaran en linfocitos B (datos no mostrados). Resulta de interés que los inventores detectaron una subpoblación pequeña de microvesículas que expresaban antígenos de superficie a partir de células endoteliales.

### Expresión de miARN en microvesículas de plasma y PBMC

Para ensayar si los miARN están contenidos en el compartimiento de las microvesículas dentro de la sangre periférica para permitir la comunicación e influir en cambios genéticos entre diferentes tejidos dentro del cuerpo, los inventores realizaron perfiles de miARN en las microvesículas purificadas del plasma. Los inventores analizaron todas las subpoblaciones de microvesículas de 51 individuos sanos no fumadores que comprendían 27 hombres y 24 mujeres. Para determinar si habría diferencias en la expresión de miARN entre microvesículas y PBMC, los inventores también purificaron las PBMC de cada donante. Se realizó análisis de PCR en tiempo real para examinar la expresión de 420 miARN. Los datos filtrados se sometieron a análisis de grupos jerárquico que comparaba el perfil de expresión de miARN entre las PBMC y muestras de plasma (**Figura 5A**).

Todas menos tres de las muestras de PBMC se agruparon por separado de las muestras de microvesículas, lo que indica que el perfil de expresión de miARN entre los dos grupos era significativamente diferente. Basándose en los criterios de filtración para reducir el ruido de fondo, los inventores descubrieron que 104 y 75 miARN se expresaron en las microvesículas y muestras de PBMC, respectivamente (**Figuras 5B y 5C**).

De estos miARN, 71 estaban compartidos entre cada grupo de muestra (**Figura 5D**). Notablemente, solamente dos miARN miR-031 y 29c se expresaron exclusivamente en las muestras de PBMC mientras que cuatro miARN (miR-127, -134, -485-5p y -432) se expresaban únicamente en la fracción de plasma. Se muestran los 104 miARN que normalmente se expresan en el plasma (**Tabla II**, mostrada en la **Figura 7**).

### Efectos de la edad y el sexo

Los inventores no observaron efectos de la edad y/o el sexo en la expresión de miARN de ninguno de los grupos de muestra. Notablemente, la mediana de la edad para donantes tanto hombres como mujeres fue de 29 años. El individuo de más edad tenía 58 años, mientras que el más joven tenía 21 años. Por lo tanto, los inventores estratificaron adicionalmente los datos para examinar diferencias. El examen entre muestras de edad coincidente no reveló ningún efecto significativo en la expresión de miARN entre muestras de PBMC y microvesículas. Controlando el sexo, los inventores también compararon el cuartil superior de la edad con el cuartil inferior de la edad, la media de edad para cada grupo fue de  $48,9 \pm 6,2$  y  $21,9 \pm 1,2$ , respectivamente. Sin embargo, los inventores no consiguieron detectar diferencias significativas en la expresión de miARN entre los conjuntos de muestras basándose en la edad (datos no mostrados).

### Comparación de la expresión de miARN en PBMC y microvesículas

En la **Tabla III**, **Figura 8**, se muestran los diez miARN más expresados en las microvesículas de plasma y las PBMC de todos los individuos. Para el plasma los diez miARN más expresados en orden descendente son miR-223, -484, -191, -146a, -016, -026a, -222, -024, -126 y -32. A su vez, miR-223, -150, -146b, -016, -484, -146a, -191, -026a, -019b y 020a se expresaban en gran medida en las PBMC. Los diez miARN más expresados en las microvesículas se detectaron en el 100 % de los individuos. Sin embargo, en las muestras de PBMC, todos excepto miR-150 (98 % de donantes) y miR-484 (89 % de donantes) se observaron en el 100 % de los individuos.

Los inventores también descubrieron que seis de estos miR (miR-223, miR-484, miR-191, miR-146a, miR-26a y miR-16) están compartidos entre los diez superiores tanto en PBMC como en microvesículas. Notablemente, miR-223 es el miR expresado de forma más prominente en ambos compartimentos. Basándose en análisis de clasificación para cada donante individual para determinar la frecuencia en la que apareció el miARN específico en los diez miARN

más expresados, miR-223 tuvo una frecuencia del 100 % tanto en PBMC como en microvesículas. A pesar de que la expresión de miR-486 está en los diez miARN más expresados en las microvesículas de plasma, se descubrió que este miARN se expresaba en los diez superiores de solamente el 20 % de los individuos para los que se realizó perfil. Resulta interesante que los miARN altamente expresados en las microvesículas de plasma no se identificaron como miR específicos de tejido.

Los inventores examinaron adicionalmente la función colectiva de los miR en microvesículas y PBMC con una puntuación de clasificación mayor que los valores arbitrarios de > 66 % y > 88 %, respectivamente (puntos de cortes naturales del conjunto de datos). Basándose en este criterio, los inventores examinaron adicionalmente los 9 miR de mayor clasificación de las muestras de microvesículas y PBMC. Por lo tanto, los inventores analizaron la función combinada de miR-223, -484, -191, -146a, -016, -026a, -222, -024 y -126 hallados en el plasma. Para PBMC, los inventores examinaron la función combinada de los siguientes miARN, miR-223, -150, -146b, -016, -484, -146a, -191, -026a y 019b. Usando el Sanger miRBase Target versión 5, los inventores descubrieron 1578 dianas predichas de los miR combinados para las microvesículas de plasma (datos no mostrados). Estas dianas combinadas se sometieron a análisis computacional para determinar las rutas que regulan colectivamente. Usando el software Ingenuity Pathway Analysis (IPA), los inventores descubrieron que las rutas canónicas implicadas en el metabolismo y regulación del sistema inmunitario adquirido estaban altamente reguladas por la expresión de las mostradas en miARN (**Tabla IV**, mostrada en la **Figura 9**, parte superior).

De los nueve miARN examinados de la fracción de PBMC, los inventores descubrieron 1857 dianas de ARNm predichas (datos no mostrados). En última instancia las cinco rutas canónicas superiores reguladas por estos miARN son diversas rutas metabólicas de aminoácidos y lípidos, entre otras (**Tabla IV**, mostrada en la **Figura 9**, parte superior). Los inventores también descubrieron dianas predichas de Sanger miRBase y TargetScan y determinaron su función (**Tabla IV**, mostrada en la **Figura 9**, parte inferior).

A continuación los inventores examinaron qué miARN se expresaban diferencialmente entre microvesículas y PBMC. Los inventores descubrieron que 20 miARN tenían un aumento de más de tres veces de la expresión en la fracción de PBMC en comparación con las muestras de microvesículas (**Tabla V**, mostrada en la **Figura 10**). Por el contrario, se expresaron de forma significativa 15 miARN en las microvesículas de plasma en comparación con PBMC.

**Figura 11:** La **Tabla VI** muestra los datos normalizados promedio para todos los miARN (nombre del detector) expresados en las PBMC y el plasma con la desviación típica para cada uno.

## DISCUSIÓN

En estos ejemplos, los inventores muestran ahora que los miR circulan en microvesículas en condiciones homeostáticas normales en la sangre periférica. En el presente documento, los inventores demuestran que 104 miR expresados en microvesículas de plasma y la expresión de miR eran significativamente diferentes de PBMC. Hasta la fecha, numerosos estudios demuestran la capacidad de los miR para regular muchas funciones celulares. Sin embargo, estos estudios implican en gran medida que el miR se queda dentro de su célula huésped para inducir un efecto (PMID: 17923084). Nuestros datos indican que los miARN contenidos en las microvesículas pueden ser señales de comunicación a células distantes para regular la homeostasis celular.

Estos miARN en las microvesículas pueden circular a diferentes dianas tisulares. Un examen adicional de los miARN de mayor expresión en las microvesículas de plasma, demuestra que muchos de estos actúan para regular la hematopoyesis y programas de diferenciación celular (**Tabla III**, mostrada en la **Figura 8**). Por ejemplo, la expresión de miR-223 regula la diferenciación mieloide, granulocítica y de osteoclastos (PMID: 18278031, PMID: 17471500, PMID: 16325577). También parece tener un papel en la proliferación de células madre hematopoyéticas (PMID: 18278031). Resulta interesante que miR-223 no está presente en leucemia mielógena aguda (AML) (MID: 18056805). Por el contrario, se produce regulación negativa de miR-126 durante la diferenciación de megacariocitos (PMID: 16549775). Notablemente, la expresión de miR-24 está regulada por TGF- $\beta$  que es un regulador positivo y negativo potente de la hematopoyesis (PMID: 16123808, PMID: 18353861). Tanto miR-24 como miR-16 expresados en las microvesículas regulan la producción de glóbulos rojos (PMID: 17906079, PMID: 17976518), mientras que miR-16 también modula el desarrollo linfóide (PMID: 16616063). La pérdida de expresión de miR-16 se ha examinado exhaustivamente en leucemia linfocítica crónica (CLL) (PMID: 17327404, PMID: 17351108).

Muchos miR expresados en las microvesículas de plasma también regulan la progresión de las proteínas del ciclo celular (PMID: 18365017 PMID: 17914108). MiR-222 se dirige a p27Kip1 (PMID: 17914108) mientras que miR-24 suprime p16 (INK4a) (PMID: 18365017). El aumento de la expresión de miR-16 da como resultado la acumulación de células en fase G0/G1 del ciclo celular (PMID: 16123808). Por el contrario, la expresión de miR-126 en células de cáncer de mama aumenta la proliferación celular y el crecimiento tumoral pero inhibe las metástasis (PMID: 18185580). Esto se produce mediante la regulación de molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM1) (PMID: 18227515).

A diferencia de los otros miR altamente expresados en las microvesículas de plasma, miR-146a parece actuar a un nivel diferente. Aunque se ha sugerido que miR-146a actúa como un supresor tumoral y la pérdida de este miR se

asocia con el desarrollo de cáncer de próstata (PMID: 18174313), miR-146a también modula la función inmunitaria (PMID: 16885212, PMID: 18057241). Es posible que la expresión de este miR en las microvesículas de plasma defina la función reguladora inmune (**Tabla IV**, mostrada en la **Figura 9**).

5 Basándose en el análisis de IPA que examina la ontología génica de las dianas, las redes asociadas superiores que se ha predicho que están influidas por la expresión de miR-146a son la proliferación celular, desarrollo y función del sistema inmunitario linfático. Además, se predice que este miR regula respuestas inmunitarias innatas. A partir del análisis, los inventores descubrieron que LPS/IL-1 y la señalización del receptor de tipo toll están entre las cinco rutas canónicas superiores que se ha predicho que están reguladas por este miR-146a.

10 Hasta la fecha, no hay ninguna función conocida para miR-484 o miR-486. De forma similar a miR-146a, miR-484 y miR-486 parecen actuar como un modulador de sensibilidad inmunitaria. Notablemente, miR-484 es el segundo miR de mayor expresión en la fracción de microvesículas basándose en la expresión relativa. La realización de modelos de predicción indica que este miR tiene múltiples funciones. Como muchos de los otros miR expresados en las microvesículas, se predice que miR-484 regula la hematopoyesis. En particular, se predice que las rutas de señalización de células NK y señalización de IL-4 son dianas de miR-484, mientras que se ha propuesto que miR-486 regula la presentación de antígenos. Además, parece que miR-486 regula la diferenciación, proliferación y crecimiento celular.

15 Aunque los inventores detectaron 104 miR en las microvesículas de plasma, había muchos que eran indetectables de los miR totales de los que se realizó perfil. Los miR indetectables en las microvesículas de plasma también pueden actuar como biomarcadores de enfermedad. Recientemente, Lawrie y col. indicaron que los miR se detectaban en el plasma de pacientes con linfoma de linfocitos B (PMID: 18318758). Este estudio indicó que miR-155, miR-210 y miR-21 estaban elevados en el plasma de estos pacientes y miR-21 se correlacionaba con recaída. Basándose en este estudio, los inventores detectaron miR-155 y miR-21 en individuos normales, pero no encontraron miR-210. Resulta interesante que los inventores descubrieron que el 75 % de los individuos expresaba miR-155 y el 60 % expresaba miR-21 en el plasma (datos no mostrados).

25 Por lo tanto, para que estos miR se usen como marcadores predictivos de enfermedad, cada individuo requeriría una línea basal antes de la detección de enfermedad. Por lo tanto, la expresión de miR-210 puede actuar como un mejor marcador de linfoma de linfocitos B. Pueden existir relaciones adicionales. Por ejemplo, miR-203 era indetectable en microvesículas de plasma. La expresión elevada de este miR se asocia con carcinoma de vejiga y adenocarcinoma de colon y puede por lo tanto usarse como un biomarcador (PMID: 18230780, PMID: 17826655).

30 Puede existir una relación inversa para miR de plasma que normalmente se expresan y después se pierden con enfermedad. Por ejemplo, en leucemia linfocítica aguda (ALL), miR-223 está regulado negativamente (PMID: 18056805). Puesto que miR-223 es el miR más prominente expresado en las microvesículas de plasma, su expresión reducida puede ser útil como un marcador de diagnóstico en ALL. Además, miR-15a/16 se pierden o se regulan negativamente en leucemia linfocítica crónica (CLL) (PMID: 18362358). Aunque los inventores descubrieron que miR-16 se expresaba en todos los individuos sanos que se examinaron, miR-15a solo se expresaba en el 44 % de los individuos de los que se realizó perfil (datos no mostrados).

35 Resulta de interés que los inventores no detectaron miARN específicos de tejido en la sangre de individuos normales (PMID: 18025253). La mayoría de las microvesículas de individuos normales derivan de células sanguíneas. Los inventores detectaron un pequeño porcentaje de microvesículas derivadas de células endoteliales. Las microvesículas derivadas de endotelio pueden aumentar tras el daño celular endotelial. De forma similar, la detección de miR específicos de tejido y microvesículas en la sangre periférica puede ser un acontecimiento frecuente tras el daño tisular. Puesto que los tumores producen microvesículas (PMID: 16283305), éstas pueden detectarse en la sangre periférica.

45 Aunque se ha indicado que se detectan miR en el plasma (PMID: 18318758), este es el primer estudio que caracteriza todos los miR conocidos del plasma. En este estudio, los inventores controlaron la raza como un factor.

Ensayar la presencia, ausencia o las alteraciones de los niveles de miR en fluidos periféricos y/o sangre puede ser útil como biomarcador para examinar diversas enfermedades, para identificar perfiles de miARN únicos, y para ser un predictor de enfermedad. Los miR en circulación contenidos en las microvesículas tienen una función vital en la regulación de la producción de homeostasis de células sanguíneas así como funciones metabólicas.

50 Las enseñanzas relevantes de todas las publicaciones citadas en el presente documento que no se han incorporado de forma explícita por referencia, se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad. Aunque la presente invención se ha mostrado particularmente y se ha descrito con referencia a realizaciones preferidas de la misma, se entenderá por los expertos en la materia que pueden realizarse diversos cambios de forma y detalles de la misma sin alejarse del alcance de la invención abarcado por las reivindicaciones adjuntas.

55 Aunque la invención se ha descrito con referencia a realizaciones diversas y preferidas, debería entender los expertos en la materia que pueden realizarse diversos cambios y pueden sustituirse elementos de la misma con equivalentes sin alejarse del alcance esencial de la invención. Además, pueden realizarse muchas modificaciones para adaptar una situación o material particular a las enseñanzas de la invención sin alejarse del alcance esencial de

la misma. Por lo tanto se pretende que la invención no se limite a la realización particular desvelada en el presente documento contemplada para llevar a cabo la presente invención, sino que la invención incluirá todas las realizaciones que queden dentro del alcance de las reivindicaciones.

5 Los miR de interés se enumeran en bases de datos públicas. En ciertas realizaciones preferidas, la base de datos pública puede ser un depósito central proporcionado por el Instituto Sanger [www.http://microma.sanger.ac.uk/sequences/](http://microma.sanger.ac.uk/sequences/) al que se remiten las secuencias de miR para asignación de nomenclatura y nombre, así como colocación de las secuencias en una base de datos para su archivo y para su recuperación en línea a través de internet. En general, los datos recogidos en las secuencias de miR por el Instituto Sanger incluyen especie, fuente, secuencias genómicas correspondientes y localización genómica (coordenadas cromosómicas), así como productos de transcripción de longitud completa y secuencias para el miARN maduro completamente procesado (miARN con un grupo fosfato terminal 5'). Otra base de datos puede ser la base de datos GenBank a la que se accede a través del sitio web del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI), mantenido por los Institutos Nacionales de Salud y la Biblioteca Nacional de Medicina.

Productos secundarios de biogénesis de miR* que están a nivel bajo, función desconocida	Nº de referencia de la secuencia madura de miRBase	Secuencia madura	SEC ID Nº
hsa-let-7a*	MIMAT0004481	CUAUACAAUCUACUGUCUUUC	1
hsa-let-7a-1	MIMAT0000062	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	2
hsa-let-7a-2	MIMAT0000062	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	3
hsa-let-7a-3	MIMAT0000062	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU	4
hsa-let-7b	MIMAT0000063	UGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUU	5
hsa-let-7b*	MIMAT0004482	CUAUACAACCUACUGCCUCC	6
hsa-let-7c	MIMAT0000064	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	7
hsa-let-7c*	MIMAT0004483	UAGAGUUACACCCUGGGAGUUA	8
hsa-let-7d	MIMAT0000065	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUU	9
hsa-let-7d*	MIMAT0004484	CUAUACGACCUGCUGCCUUUCU	10
hsa-let-7e	MIMAT0000066	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU	11
hsa-let-7e*	MIMAT0004485	CUAUACGGCCUCCUAGCUUUC	12
hsa-let-7f-1	MIMAT0000067	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	13
hsa-let-7f-1*	MIMAT0004486	CUAUACAAUCUAUUGCCUCC	14
hsa-let-7f-2	MIMAT0000067	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU	15
hsa-let-7f-2*	MIMAT0004487	CUAUACAGUCUACUGUCUUUC	16
hsa-let-7g	MIMAT0000414	UGAGGUAGUAGUUUGUACAGUU	17
hsa-let-7g*	MIMAT0004584	CUGUACAGGCCACUGCCUUGC	18
hsa-let-7i	MIMAT0000415	UGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUU	19
hsa-let-7i*	MIMAT0004585	CUGCGCAAGCUACUGCCUUGC	20
hsa-mir-009-1	MIMAT0000441	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	21
hsa-mir-009-1*	MIMAT0000442	AUAAAGCUAGUAACCGAAAGU	22
hsa-mir-009-2	MIMAT0000441	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	23

ES 2 419 129 T3

hsa-mir-009-3	MIMAT0000441	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	24
hsa-mir-010a	MIMAT0000253	UACCCUGUAGAUCGAAUUUGUG	25
hsa-mir-010a*	MIMAT0004555	CAAAUUCGUAUCUAGGGGAAUA	26
hsa-mir-015a	MIMAT0000068	UAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG	27
hsa-mir-015b	MIMAT0000417	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA	28
hsa-mir-015b*	MIMAT0004586	CGAAUCAUUUUUGCUGCUCUA	29
hsa-mir-016-1	MIMAT0000069	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	30
hsa-mir-016-1*	MIMAT0004489	CCAGUAUUACUGUGCUGCUGA	31
hsa-mir-016-2	MIMAT0000069	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG	32
hsa-mir-016-2*	MIMAT0004518	CCAAUAUUACUGUGCUGCUUUA	33
hsa-mir-017-3-p	MIMAT0000071	ACUGCAGUGAAGGCACUUGUAG	34
hsa-mir-017-5-p	MIMAT0000070	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	35
hsa-mir-018a	MIMAT0000072	UAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAG	36
hsa-mir-018a*	MIMAT0002891	ACUGCCCUAAGUGCUCUUCUGG	37
hsa-mir-019a	MIMAT0000073	UGUGCAAUUCUAUGCAAACUGA	38
hsa-mir-019b-1	MIMAT0000074	UGUGCAAUCCAUGCAAACUGA	39
hsa-mir-019b-1*	MIMAT0004491	AGUUUUGCAGGUUUGCAUCCAGC	40
hsa-mir-019b-2	MIMAT0000074	UGUGCAAUCCAUGCAAACUGA	41
hsa-mir-019b-2*	MIMAT0004492	AGUUUUGCAGGUUUGCAUUUCA	42
hsa-mir-020a	MIMAT0000075	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG	43
hsa-mir-020a*	MIMAT0004493	ACUGCAUUAUGAGCACUJAAAG	44
hsa-mir-020b	MIMAT0001413	CAAAGUGCUCAUAGUGCAGGUAG	45
hsa-mir-021	MIMAT0000076	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA	46
hsa-mir-021*	MIMAT0004494	CAACACCAGUCGAUGGGCUGU	47
hsa-mir-023a	MIMAT0000078	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC	48
hsa-mir-023a*	MIMAT0004496	GGGGUUCUGGGGAUGGGAUUU	49
hsa-mir-023b	MIMAT0004587	UGGGUUCUGGCAUGCUGAUUU	50
hsa-mir-024-1	MIMAT0000080	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	51
hsa-mir-024-1*	MIMAT0000079	UGCCUACUGAGCUGAUUUCAGU	52
hsa-mir-024-2	MIMAT0000080	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	53
hsa-mir-024-2*	MIMAT0004497	UGCCUACUGAGCUGAAACACAG	54
hsa-mir-025	MIMAT0000081	CAUUGCACUUGUCUGGGUCUGA	55
hsa-mir-025*	MIMAT0004498	AGGCGGAGACUUGGGCAAUUG	56

ES 2 419 129 T3

hsa-mir-026a-1	MIMAT0000082	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	57
hsa-mir-026a-1*	MIMAT0004499	CCUAUUCUUGGUUACUUGCACG	58
hsa-mir-026a-2	MIMAT0000082	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	59
hsa-mir-026a-2*	MIMAT0004681	CCUAUUCUUGAUUACUUGUUUC	60
hsa-mir-026b	MIMAT0000083	UUCAAGUAAUUCAGGAUAGGU	61
hsa-mir-026b*	MIMAT0004500	CCUGUUCUCCAUAUACUUGGCUC	62
hsa-mir-027a	MIMAT0000084	UUCACAGUGGCUAAGUUCCGC	63
hsa-mir-027a*	MIMAT0004501	AGGGCUUAGCUGCUUGUGAGCA	64
hsa-mir-027b	MIMAT0000419	UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC	65
hsa-mir-027b*	MIMAT0004588	AGAGCUUAGCUGAUUGGUGAAC	66
hsa-mir-028-3p	MIMAT0004502	CACUAGAUUGUGAGCUCCUGGA	67
hsa-mir-028-5p	MIMAT0000085	AAGGAGCUCACAGUCUAUUGAG	68
hsa-mir-029a	MIMAT0000086	UAGCACCAUCUGAAAUCGGUUA	69
hsa-mir-029a*	MIMAT0004503	ACUGAUUUCUUUUGGUGUUCAG	70
hsa-mir-029b-1	MIMAT0000100	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU	71
hsa-mir-029b-1*	MIMAT0004514	GCUGGUUUCAUAUGGUGGUUAGA	72
hsa-mir-029b-2	MIMAT0000100	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU	73
hsa-mir-029b-2*	MIMAT0004515	CUGGUUUCACAUGGUGGCUUAG	74
hsa-mir-029b-3	MIMAT0000100	UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU	75
hsa-mir-029c	MIMAT0000681	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA	76
hsa-mir-030a	MIMAT0000087	UGUAAACAUCCUCGACUGGAAG	77
hsa-mir-030a*	MIMAT0000088	CUUUCAGUCGGAUGUUUGCAGC	78
hsa-mir-030b	MIMAT0000420	UGUAAACAUCCUACACUCAGCU	79
hsa-mir-030b*	MIMAT0004589	CUGGGAGGUGGAUGUUUACUUC	80
hsa-mir-030c-1	MIMAT0000244	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC	81
hsa-mir-030c-2	MIMAT0000244	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC	82
hsa-mir-030c-2*	MIMAT0004550	CUGGGAGAAGGCUGUUUACUCU	83
hsa-mir-030d	MIMAT0000245	UGUAAACAUCCCGACUGGAAG	84
hsa-mir-030d*	MIMAT0004551	CUUUCAGUCAGAUGUUUGCUGC	85
hsa-mir-031	MIMAT0000089	AGGCAAGAUUGCUGCAUAGCU	86
hsa-mir-031*	MIMAT0004504	UGCUAUGCCAACAUUUGCCAU	87
hsa-mir-032	MIMAT0000090	UAUUGCACAUUACUAAGUUGCA	88
hsa-mir-032*	MIMAT0004505	CAAUUUAGUGUGUGUAUUUU	89

ES 2 419 129 T3

hsa-mir-034a	MIMAT0000255	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU	<b>90</b>
hsa-mir-034a*	MIMAT0004557	CAAUCAGCAAGUAUACUGCCCU	<b>91</b>
hsa-mir-092a-1	MIMAT0000092	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU	<b>92</b>
hsa-mir-092a-1*	MIMAT0004507	AGGUUGGGAUCGGUUGCAAUGCU	<b>93</b>
hsa-mir-093	MIMAT0000093	CAAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAG	<b>94</b>
hsa-mir-093*	MIMAT0004509	ACUGCUGAGCUAGCACUUCGG	<b>95</b>
hsa-mir-095	MIMAT0000094	UUCAACGGGUUUUUUJUGAGCA	<b>96</b>
hsa-mir-096	MIMAT0000095	UUUGGCACUAGCACAUUUUUGCU	<b>97</b>
hsa-mir-096*	MIMAT0004510	AAUCAUGUGCAGUGCCAAUAUG	<b>98</b>
hsa-mir-098	MIMAT0000096	UGAGGUAGUAAGUUGUAUUGUU	<b>99</b>
hsa-mir-099b	MIMAT0000689	CACCCGUAGAACCGACCUUGCG	<b>100</b>
hsa-mir-099b*	MIMAT0004678	CAAGCUCGUGUCUGUGGGUCCG	<b>101</b>
hsa-mir-100	MIMAT0000098	AACCCGUAGAUCGAAACUUGUG	<b>102</b>
hsa-mir-100*	MIMAT0004512	CAAGCUUGUAUCUAUAGGUAUG	<b>103</b>
hsa-mir-103-1	MIMAT0000101	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	<b>104</b>
hsa-mir-103-2	MIMAT0000101	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA	<b>105</b>
hsa-mir-105-1	MIMAT0000102	UCAAAUGCUCAGACUCCUGUGGU	<b>106</b>
hsa-mir-105-1*	MIMAT0004516	ACGGAUGUUUGAGCAUGUGCUA	<b>107</b>
hsa-mir-105-2	MIMAT0000102	UCAAAUGCUCAGACUCCUGUGGU	<b>108</b>
hsa-mir-105-2*	MIMAT0004516	ACGGAUGUUUGAGCAUGUGCUA	<b>109</b>
hsa-mir-106a	MIMAT0000103	AAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG	<b>110</b>
hsa-mir-106a*	MIMAT0004517	CUGCAAUGUAAGCACUUCUAC	<b>111</b>
hsa-mir-106b	MIMAT0000680	UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU	<b>112</b>
hsa-mir-106b*	MIMAT0004672	CCGCACUGUGGUACUUGCUGC	<b>113</b>
hsa-mir-107	MIMAT0000104	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUCA	<b>114</b>
hsa-mir-122	MIMAT0000421	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	<b>115</b>
hsa-mir-122*	MIMAT0004590	AACGCCAUUAUCACACUAAAUA	<b>116</b>
hsa-mir-125a-3p	MIMAT0004602	ACAGGUGAGGUUCUUGGGAGCC	<b>117</b>
hsa-mir-125a-5p	MIMAT0000443	UCCUGAGACCCUUUAACCUUGUGA	<b>118</b>
hsa-mir-125b-1	MIMAT0000423	UCCUGAGACCCUAACUUGUGA	<b>119</b>
hsa-mir-125b-1*	MIMAT0004592	ACGGGUUAGGCUCUUGGGAGCU	<b>120</b>
hsa-mir-125b-2	MIMAT0000423	UCCUGAGACCCUAACUUGUGA	<b>121</b>
hsa-mir-125b-2*	MIMAT0004603	UCACAAGUCAGGCUCUUGGGAC	<b>122</b>

ES 2 419 129 T3

hsa-mir-126	MIMAT0000445	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG	123
hsa-mir-126*	MIMAT0000444	CAUUUUUACUUUUUGGUACGCG	124
hsa-mir-127-3p	MIMAT0000446	UCGGAUCCGUCUGAGCUUGGCU	125
hsa-mir-127-5p	MIMAT0004604	CUGAAGCUCAGAGGGCUCUGAU	126
hsa-mir-128-1	MIMAT0000424	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU	127
hsa-mir-128-2	MIMAT0000424	UCACAGUGAACCGGUCUCUUU	128
hsa-mir-130	MIMAT0000425	CAGUGCAAUGUUAAAAGGGCAU	129
hsa-mir-130*	MIMAT0004593	UUCACAUUGUGCUACUGUCUGC	130
hsa-mir-130b	MIMAT0000691	CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU	131
hsa-mir-130b*	MIMAT0004680	ACUCUUUCCCUGUUGCACUAC	132
hsa-mir-132	MIMAT0000426	UACAGUCUACAGCCAUGGUCG	133
hsa-mir-132*	MIMAT0004594	ACCGUGGCUUUCGAUUGUUACU	134
hsa-mir-133a-1	MIMAT0000427	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG	135
hsa-mir-133a-2	MIMAT0000427	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUG	136
hsa-mir-133b	MIMAT0000770	UUUGGUCCCCUUAACCAGCUA	137
hsa-mir-134	MIMAT0000447	UGUGACUGGUUGACCAGAGGGG	138
hsa-mir-135b	MIMAT0000758	UAUGGCUUUUCAUCCUAUGUGA	139
hsa-mir-135b*	MIMAT0004698	AUGUAGGGCUAAAAGCCAUGGG	140
hsa-mir-140-3p	MIMAT0004597	UACCACAGGGUAGAACCACGG	141
hsa-mir-140-5p	MIMAT0000431	CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG	142
hsa-mir-142-3p	MIMAT0000434	UGUAGUGUUUCCUACUUUAUGGA	143
hsa-mir-142-5p	MIMAT0000433	CAUAAAGUAGAAAGCACUACU	144
hsa-mir-143	MIMAT0000435	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC	145
hsa-mir-143*	MIMAT0004599	GGUGCAGUGCUGCAUCUCUGGU	146
hsa-mir-145	MIMAT0000437	GUCCAGUUUCCCAGGAAUCCCU	147
hsa-mir-145*	MIMAT0004601	GGAUUCCUGGAAAUACUGUUCU	148
hsa-mir-146a	MIMAT0000449	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU	149
hsa-mir-146a*	MIMAT0004608	CCUCUGAAAUUCAGUUCUUCAG	150
hsa-mir-146b-3p	MIMAT0004766	UGCCCUGUGGACUCAGUUCUGG	151
hsa-mir-146b-5p	MIMAT0002809	UGAGAACUGAAUCCAUGGCU	152
hsa-mir-147	MIMAT0000251	GUGUGUGGAAAUGCUUCUGC	153
hsa-mir-148a	MIMAT0000243	UCAGUGCACUACAGAACUUUGU	154
hsa-mir-148a*	MIMAT0004549	AAAGUUCUGAGACACUCCGACU	155

ES 2 419 129 T3

hsa-mir-148b	MIMAT0000759	UCAGUGCAUCACAGAACUUUGU	156
hsa-mir-148b*	MIMAT0004699	AAGUUCUGUUUAUACACUCAGGC	157
hsa-mir-149	MIMAT0000450	UCUGGCUCCGUGUCUUCACUCCC	158
hsa-mir-149*	MIMAT0004609	AGGGAGGGACGGGGGCUGUGC	159
hsa-mir-150	MIMAT0000451	UCUCCCAACCCUUGUACCAGUG	160
hsa-mir-150*	MIMAT0004610	CUGGUACAGGCCUGGGGGACAG	161
hsa-mir-151-3p	MIMAT0000757	CUAGACUGAAGCUCCUUGAGG	162
hsa-mir-151-5p	MIMAT0004697	UCGAGGAGCUCACAGUCUAGU	163
hsa-mir-155	MIMAT0000646	UUAAUGC UAAUCGUGAUAGGGGU	164
hsa-mir-155*	MIMAT0004658	CUCCUACAUUUAGCAUUAACA	165
hsa-mir-181-1	MIMAT0000256	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	166
hsa-mir-181a-1*	MIMAT0000270	ACCAUCGACCGUUGAUUGUACC	167
hsa-mir-181a-2	MIMAT0000256	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	168
hsa-mir-181a-2*	MIMAT0004558	ACCACUGACCGUUGACUGUACC	169
hsa-mir-181b-1	MIMAT0000257	AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU	170
hsa-mir-181b-2	MIMAT0000257	AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGU	171
hsa-mir-181d	MIMAT0002821	AACAUUCAUUGUUGUCGGUGGGU	172
hsa-mir-182	MIMAT0000259	UUUGGCAAUGGUAGAACUCACACU	173
hsa-mir-182*	MIMAT0000260	UGGUUCUAGACUUGCCAACUA	174
hsa-mir-183	MIMAT0000261	UAUGGCACUGGUAGAAUUCACU	175
hsa-mir-183*	MIMAT0004560	GUGAAUUACCGAAGGGCCAUA	176
hsa-mir-185	MIMAT0000455	UGGAGAGAAAGGCAGUUCUGA	177
hsa-mir-185*	MIMAT0004611	AGGGGCUGGCUUCCUCUGGUC	178
hsa-mir-186	MIMAT0000456	CAAAGAAUUCUCCUUUUGGGCU	179
hsa-mir-186*	MIMAT0004612	GCCCAAAGGUGAAUUUUUUGGG	180
hsa-mir-190	MIMAT0000458	UGAUUAUGUUUGAUUAUUAGGU	181
hsa-mir-191	MIMAT0000440	CAACGGAAUCCCAAAGCAGCUG	182
hsa-mir-191*	MIMAT0001618	GCUGCGCUUGGAUUUCGUCCCC	183
hsa-mir-192	MIMAT0000222	CUGACCUAUGAAUUGACAGCC	184
hsa-mir-192*	MIMAT0004543	CUGCCAAUCCAUAAGGUCACAG	185
hsa-mir-193a-3p	MIMAT0000459	AACUGGCCUACAAAGUCCCAGU	186
hsa-mir-193a-5p	MIMAT0004614	UGGGUCUUUGCGGGCGAGAUGA	187
hsa-mir-193b	MIMAT0002819	AACUGGCCCUCAAAGUCCCUCU	188

ES 2 419 129 T3

hsa-mir-193b*	MIMAT0004767	CGGGGUUUUGAGGGCGAGAUGA	189
hsa-mir-195	MIMAT0000461	UAGCAGCACAGAAAUAUUGGC	190
hsa-mir-195*	MIMAT0004615	CCAAUAUUGGCUGUGCUGCUCC	191
hsa-mir-196a*	MIMAT0004562	CGGCAACAAGAAACUGCCUGAG	192
hsa-mir-196a-1	MIMAT0000226	UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGGG	193
hsa-mir-196a-2	MIMAT0000226	UAGGUAGUUUCAUGUUGUUGGG	194
hsa-mir-196b	MIMAT0001080	UAGGUAGUUUCCUGUUGUUGGG	195
hsa-mir-197	MIMAT0000227	UUCACCACCUUCUCCACCCAGC	196
hsa-mir-198	MIMAT0000228	GGUCCAGAGGGGAGAUAGGUUC	197
hsa-mir-199a-3p	MIMAT0000232	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA	198
hsa-mir-199a-5p	MIMAT0000231	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC	199
hsa-mir-199a-5p	MIMAT0000231	CCCAGUGUUCAGACUACCUGUUC	200
hsa-mir-199b-3p	MIMAT0004563	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA	201
hsa-mir-199b-5p	MIMAT0000263	CCCAGUGUUUAGACUAUCUGUUC	202
hsa-mir-200a	MIMAT0000682	UAACACUGUCUGGUAACGAUGU	203
hsa-mir-200a*	MIMAT0001620	CAUCUUACCGGACAGUGCUGGA	204
hsa-mir-200b	MIMAT0000318	UAAUACUGCCUGGUAUGAUGA	205
hsa-mir-200b*	MIMAT0004571	CAUCUUACUGGGCAGCAUUGGA	206
hsa-mir-200c	MIMAT0000617	UAAUACUGCCGGUAAUGAUGGA	207
hsa-mir-200c*	MIMAT0004657	CGUCUUACCCAGCAGUGUUUGG	208
hsa-mir-203	MIMAT0000264	GUGAAAUGUUUAGGACCACUAG	209
hsa-mir-204	MIMAT0000265	UCCCCUUUGUCAUCCUAUGCCU	210
hsa-mir-205	MIMAT0000266	UCCUUCAUCCACCGGAGUCUG	211
hsa-mir-210	MIMAT0000267	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA	212
hsa-mir-213	MIMAT0000256	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	213
hsa-mir-214	MIMAT0000271	ACAGCAGGCACAGACAGGCAGU	214
hsa-mir-214*	MIMAT0004564	UGCCUGUCUACACUUGCUGUGC	215
hsa-mir-216a	MIMAT0000273	UAAUCUCAGCUGGCAACUGUGA	216
hsa-mir-216b	MIMAT0004959	AAAUCUCUGCAGGCAAAUGUGA	217
hsa-mir-217	MIMAT0000274	UACUGCAUCAGGAACUGAUUGGA	218
hsa-mir-218-1	MIMAT0000275	UUGUGCUUGAUCUAACCAUGU	219
hsa-mir-218-1*	MIMAT0004565	AUGGUUCCGUCAAGCACCAUGG	220
hsa-mir-218-2	MIMAT0000275	UUGUGCUUGAUCUAACCAUGU	221

ES 2 419 129 T3

hsa-mir-218-2*	MIMAT0004566	CAUGGUUCUGUCAAGCACCGCG	222
hsa-mir-221	MIMAT0000278	AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC	223
hsa-mir-221*	MIMAT0004568	ACCUGGCAUACAAUGUAGAUUU	224
hsa-mir-222	MIMAT0000279	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	225
hsa-mir-222*	MIMAT0004569	CUCAGUAGCCAGUGUAGAUCU	226
hsa-mir-223	MIMAT0000280	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA	227
hsa-mir-223*	MIMAT0004570	CGUGUAUUUGACAAGCUGAGUU	228
hsa-mir-224	MIMAT0000281	CAAGUCACUAGUGGUUCCGUU	229
hsa-mir-302a	MIMAT0000684	UAAGUGCUUCCAUGUUUUGGUGA	230
hsa-mir-302a*	MIMAT0000683	ACUUAACGUGGAUGUACUUGCU	231
hsa-mir-302b	MIMAT0000715	UAAGUGCUUCCAUGUUUAGUAG	232
hsa-mir-302b*	MIMAT0000714	ACUUUAACAUGGAAGUGCUUUC	233
hsa-mir-302c	MIMAT0000717	UAAGUGCUUCCAUGUUUCAGUGG	234
hsa-mir-302c*	MIMAT0000716	UUUAACAUGGGGGUACCUGCUG	235
hsa-mir-302d	MIMAT0000718	UAAGUGCUUCCAUGUUUGAGUGU	236
hsa-mir-302d*	MIMAT0004685	ACUUUAACAUGGAGGCACUUGC	237
hsa-mir-302e	MIMAT0005931	UAAGUGCUUCCAUGCUU	238
hsa-mir-302f	MIMAT0005932	UAAUUGCUUCCAUGUUU	239
hsa-mir-320a	MIMAT0000510	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGA	240
hsa-mir-320b-1	MIMAT0005792	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCAA	241
hsa-mir-320b-2	MIMAT0005792	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGCAA	242
hsa-mir-320c-1	MIMAT0005793	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGU	243
hsa-mir-320c-2	MIMAT0005793	AAAAGCUGGGUUGAGAGGGU	244
hsa-mir-320d-1	MIMAT0006764	AAAAGCUGGGUUGAGAGGA	245
hsa-mir-320d-2	MIMAT0006764	AAAAGCUGGGUUGAGAGGA	246
hsa-mir-324-3p	MIMAT0000762	ACUGCCCCAGGUGCUGCUGG	247
hsa-mir-324-5p	MIMAT0000761	CGCAUCCCCUAGGGCAUUGGUGU	248
hsa-mir-326	MIMAT0000756	CCUCUGGGCCCUUCCUCCAG	249
hsa-mir-328	MIMAT0000752	CUGGCCUCUCUGCCCUUCCGU	250
hsa-mir-330-3p	MIMAT0000751	GCAAAGCACACGGCCUGCAGAGA	251
hsa-mir-330-5p	MIMAT0004693	UCUCUGGGCCUGUGUCUUAGGC	252
hsa-mir-331-3p	MIMAT0000760	GCCCCUGGGCCUUAUCCUAGAA	253
hsa-mir-331-5p	MIMAT0004700	CUAGGUAUGGUCCAGGGAUCC	254

ES 2 419 129 T3

hsa-mir-335	MIMAT0000765	UCAAGAGCAAUAACGAAAAAUGU	255
hsa-mir-335*	MIMAT0004703	UUUUUCAUUUUUGCUCUGACC	256
hsa-mir-339-3p	MIMAT0004702	UGAGCGCCUCGACGACAGAGCCG	257
hsa-mir-339-5p	MIMAT0000764	UCCCUGUCCUCCAGGAGCUCACG	258
hsa-mir-340	MIMAT0004692	UUAUAAAGCAAUGAGACUGAUU	259
hsa-mir-340*	MIMAT0000750	UCCGUCUCAGUUACUUUUAUAGC	260
hsa-mir-342-3p	MIMAT0000753	UCUCACACAGAAAUCGCACCCGU	261
hsa-mir-342-5p	MIMAT0004694	AGGGGUGCUAUCUGUGAUUGA	262
hsa-mir-345	MIMAT0000772	GCUGACUCCUAGUCCAGGGCUC	263
hsa-mir-361-3p	MIMAT0004682	UCCCCAGGUGUGAUUCUGAUUU	264
hsa-mir-361-5p	MIMAT0000703	UUAUCAGAAUCUCCAGGGGUAC	265
hsa-mir-370	MIMAT0000722	GCCUGCUGGGUGGAACCUGGU	266
hsa-mir-374a	MIMAT0000727	UUAUAAUACAACCUGUAAGUG	267
hsa-mir-374b	MIMAT0004955	AUAUAAUACAACCUGCUAAGUG	268
hsa-mir-376a*	MIMAT0003386	GUAGAUUCUCCUUCUAUGAGUA	269
hsa-mir-376a-1	MIMAT0000729	AUCAUAGAGGAAAAUCCACGU	270
hsa-mir-376a-2	MIMAT0000729	AUCAUAGAGGAAAAUCCACGU	271
hsa-mir-376b	MIMAT0002172	AUCAUAGAGGAAAAUCCAUGUU	272
hsa-mir-376c	MIMAT0000720	AACAUAGAGGAAAUUCCACGU	273
hsa-mir-378	MIMAT0000732	ACUGGACUUGGAGUCAGAAGG	274
hsa-mir-378*	MIMAT0000731	CUCCUGACUCCAGGUCCUGUGU	275
hsa-mir-382	MIMAT0000737	GAAGUUGUUCGUGGUGGAUUCG	276
hsa-mir-411	MIMAT0003329	UAGUAGACCGUAUAGCGUACG	277
hsa-mir-411*	MIMAT0004813	UAUGUAACACGGUCCACUAACC	278
hsa-mir-423	MIMAT0004748	UGAGGGGCAGAGAGCGAGACUUU	279
hsa-mir-423*	MIMAT0001340	AGCUCGGUCUGAGGCCCCUCAGU	280
hsa-mir-425-3p	MIMAT0001343	AUCGGGAAUGUCGUGUCCGCC	281
hsa-mir-425-5p	MIMAT0003393	AAUGACACGAUCACUCCCGUUGA	282
hsa-mir-432	MIMAT0002814	UCUUGGAGUAGGUCAUUGGGUGG	283
hsa-mir-432*	MIMAT0002815	CUGGAUGGCUCCUCCAUGUCU	284
hsa-mir-433	MIMAT0001627	AUCAUGAUGGGCUCCUCGGUGU	285
hsa-mir-484	MIMAT0002174	UCAGGCUCAGUCCCUCCCGAU	286
hsa-mir-485-3p	MIMAT0002176	GUCAUACACGGCUCUCCUCUCU	287

ES 2 419 129 T3

hsa-mir-485-5p	MIMAT0002175	AGAGGCUGGCCGUGAUGAAUUC	<b>288</b>
hsa-mir-486-3p	MIMAT0004762	CGGGGCAGCUCAGUACAGGAU	<b>289</b>
hsa-mir-486-5p	MIMAT0002177	UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG	<b>290</b>
hsa-mir-487a	MIMAT0002178	AAUCAUACAGGGACAUC CAGUU	<b>291</b>
hsa-mir-487b	MIMAT0003180	AAUCGUACAGGGUCAUCCACUU	<b>292</b>
hsa-mir-532	MIMAT0002888	CAUGCCUUGAGUGUAGGACCGU	<b>293</b>
hsa-mir-532-5p	MIMAT0004780	CCUCCCACACCCAAGGCUUGCA	<b>294</b>
hsa-mir-539	MIMAT0003163	GGAGAAUUAUCCUUGGUGUGU	<b>295</b>
hsa-mir-574-3p	MIMAT0003239	CACGCUCAUGCACACCCACA	<b>296</b>
hsa-mir-574-5p	MIMAT0004795	UGAGUGUGUGUGUGUGAGUGUGU	<b>297</b>
hsa-mir-584	MIMAT0003249	UUAUGGUUUGCCUGGGACUGAG	<b>298</b>
hsa-mir-628-3p	MIMAT0003297	UCUAGUAAGAGUGGCAGUCGA	<b>299</b>
hsa-mir-628-5p	MIMAT0004809	AUGCUGACAUUUUACUAGAGG	<b>300</b>
hsa-mir-643	MIMAT0003313	ACUUGUAUGCUAGCUCAGGUAG	<b>301</b>
hsa-mir-660	MIMAT0003338	UACCCAUUGCAUAUCGGAGUUG	<b>302</b>

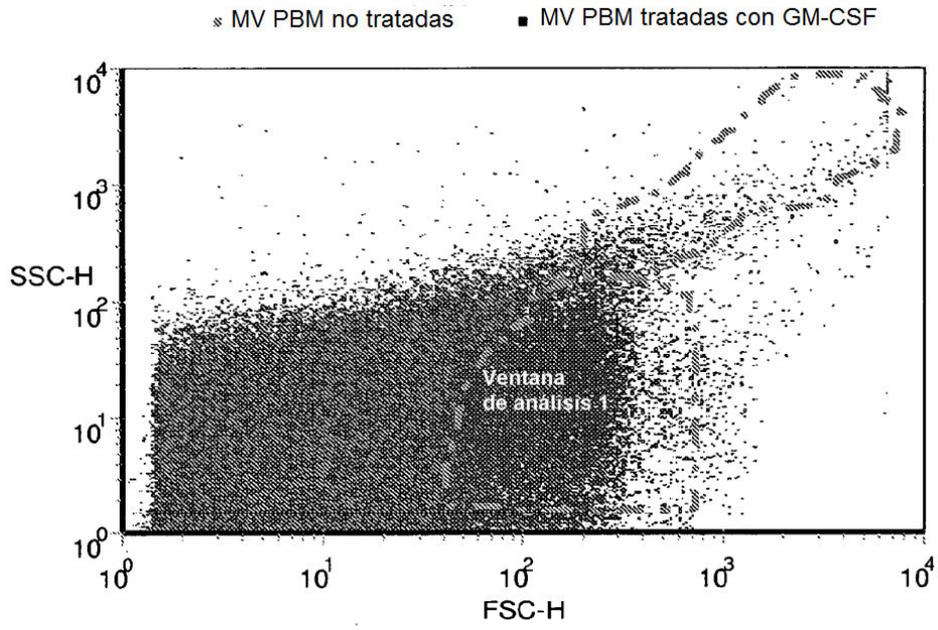
## Referencias

1. Baj-Krzyworzeka M, Szatanek R, Weglarczyk K, Baran 7, Urbanowicz B, Branski P, Ratajczak MZ, Zembala M. Tumour-derived microvesicles carry several surface determinants and mRNA of tumour cells and transfer some of these determinants to monocytes. *Cancer Immunol Immunother*. 2006; 55:808818.
- 5 2. Rauch U, Bonderman D, Bohrmann B, Badimon JJ, Himber J, Riederer MA, Nemerson Y. Transfer of tissue factor from leukocytes to platelets is mediated by CD15 and tissue factor. *Blood*. 2000; 96:170-175.
3. Jungi TW, Spycher MO, Nydegger UE, Barandun S. Platelet-leukocyte interaction: selective binding of thrombin-stimulated platelets to human monocytes, polymorphonuclear leukocytes, and related cell lines. *Blood*. 1986; 67:629-636.
- 10 4. Lyberg T, Nakstad B, Hetland O, Boye NP. Procoagulant (thromboplastin) activity in human bronchoalveolar lavage fluids is derived from alveolar macrophages. *Eur Respir J*. 1990; 3:61-67.
5. Thiagarajan P, Le A, Benedict CR. Beta(2)-glycoprotein I promotes the binding of anionic phospholipid vesicles by macrophages. *Arterioscler Thromb Vase Biol*. 1999;19:2807-2811.
- 15 6. Setzer F, Oberle V, Blass M, Moller E, Russwurm S, Deigner HP, Claus RA, Bauer M, Reinhart K, Losche W. Platelet-derived microvesicles induce differential gene expression in monocytic cells: a DNA microarray study. *Platelets*. 2006;17:571-576.
7. Plasterk RH. Micro RNAs in animal development. *Cell*. 2006;124:877-881.
8. Willingham AT, Gingeras TR. TUF love for "junk" DNA. *Cell*. 2006;125:1215-1220.
- 20 9. Liu CG, Calin GA, Meloon B, Gamliel N, Sevignani C, Ferracin M, Dumitru CD, Shimizu M, Zupo S, Dono M, Alder H, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101:9740-9744.
10. Calin GA, Croce CM. Genomics of chronic lymphocytic leukemia microRNAs as new players with clinical significance. *Semin Oncol*. 2006;33:167-173.
- 25 11. Hebert C, Norris K, Scheper MA, Nikitakis N, Sauk B. High mobility group A2 is a target for miRNA-98 in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer*. 2007;6:5.
12. Voorhoeve PM, Agami R. Classifying microRNAs in cancer: The good, the bad and the ugly. *Biochim Biophys Acta*. 2006.
- 30 13. Taganov KD, Boldin MP, Chang KJ, Baltimore D. NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci US A*. 2006;103:12481-12486.

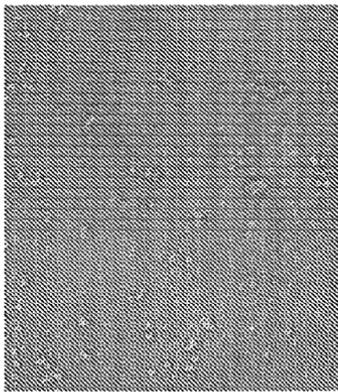
**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para diagnosticar o pronosticar cáncer de próstata en un sujeto, que comprende:
  - i) aislar microvesículas de una muestra de sangre periférica del sujeto;
  - ii) determinar el nivel de al menos un producto génico de miR en las microvesículas aisladas, y
  - iii) comparar el nivel del al menos un producto génico de miR en la muestra con un control, en donde un aumento del nivel del al menos un producto génico de miR en la muestra del sujeto, en relación con el del control, es diagnóstico o pronóstico del cáncer de próstata;en el que se determina el nivel de miR-21 y al menos uno de los siguientes miR: miR-15a, miR-16-1, miR-143 y miR-145.
2. Uso de microvesículas aisladas como un biomarcador para cáncer de próstata, en el que el biomarcador se aísla de microvesículas en sangre periférica de un sujeto que tiene el cáncer de próstata, y al menos los siguientes miR están regulados positivamente en la microvesícula aislada en relación con los del sujeto de control: miR -21, y al menos los siguientes miR están regulados negativamente en la microvesícula aislada en relación con los del sujeto de control: miR-15a, miR-16-1, miR-143 y miR-145.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el control se selecciona del grupo que consiste en:
  - i) un patrón de referencia;
  - ii) el nivel del al menos un producto génico de miR en microvesículas aisladas de un sujeto que no tiene el trastorno; y
  - iii) el nivel del al menos un producto génico de miR en microvesículas aisladas de una muestra del sujeto que no presenta dicho trastorno.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la muestra del sujeto comprende plasma.
5. El procedimiento de la reivindicación 1 o 4, en el que el nivel del al menos un producto génico de miR se mide por RT-PCR, análisis de transferencia de Northern, detección de hibridación en solución y/o análisis de micromatrices.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, 4 o 5, en el que el aislamiento de microvesículas comprende centrifugación.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, 4, 5 o 6, en el que miR-21 está regulado positivamente en la microvesícula aislada en relación con el del sujeto de control; y al menos uno de los siguientes miR está regulado negativamente en la microvesícula aislada en relación con el del sujeto de control: miR-15a, miR16-1, miR-143 y miR-145.

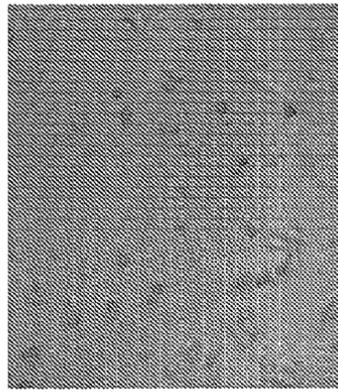
**Superposición de FSC frente a SSC**



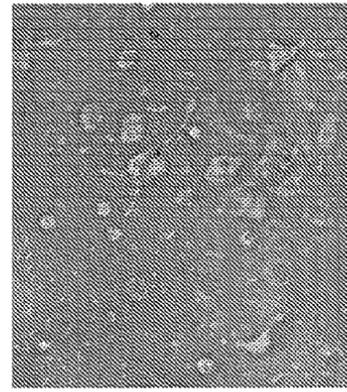
**Figura 1**



**Fig. 2a**



**Fig. 2b**



**Fig. 2c**

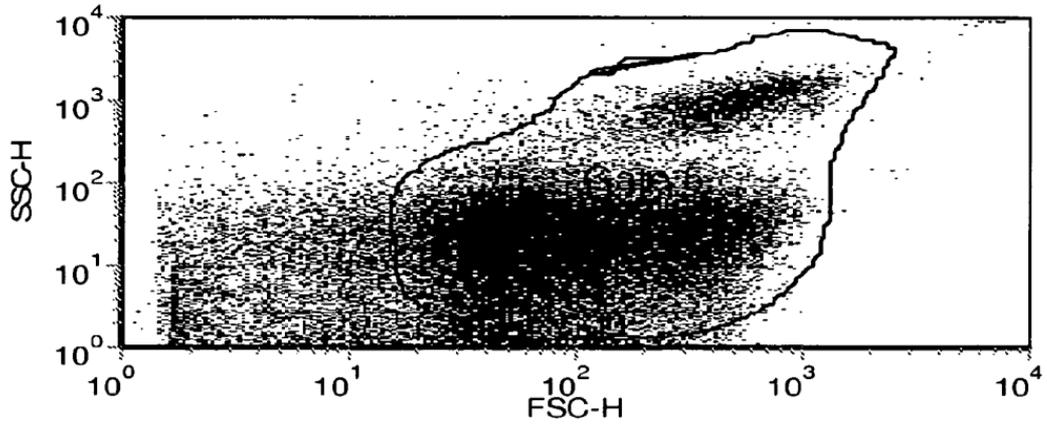


Figura 3a

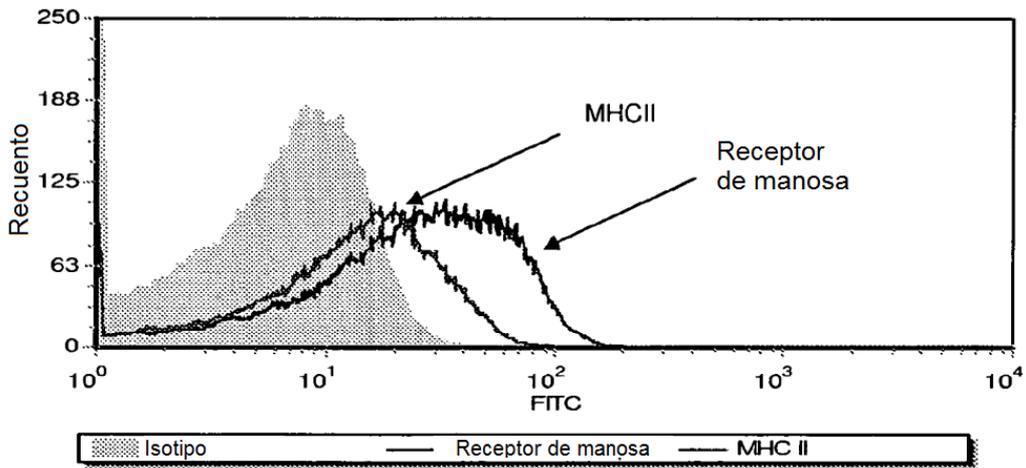


Figura 3b

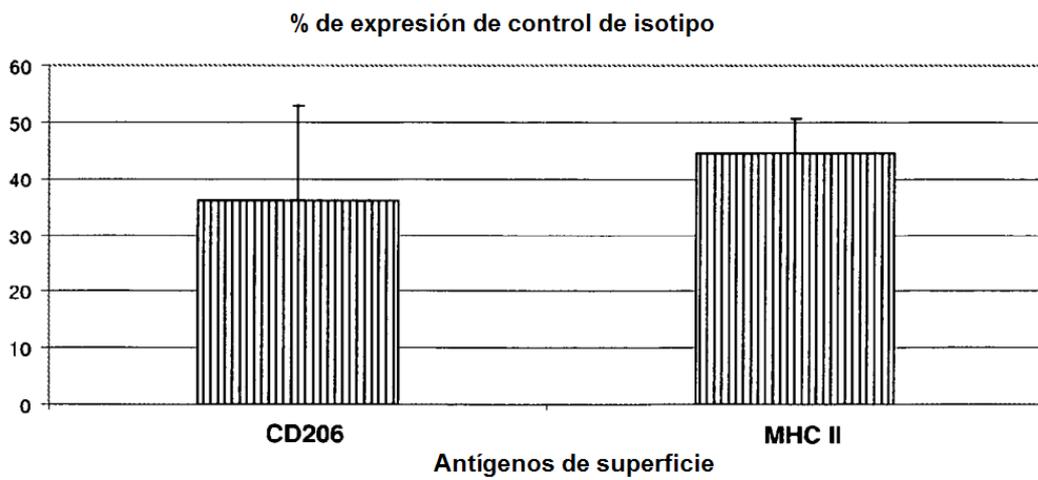


Figura 3c

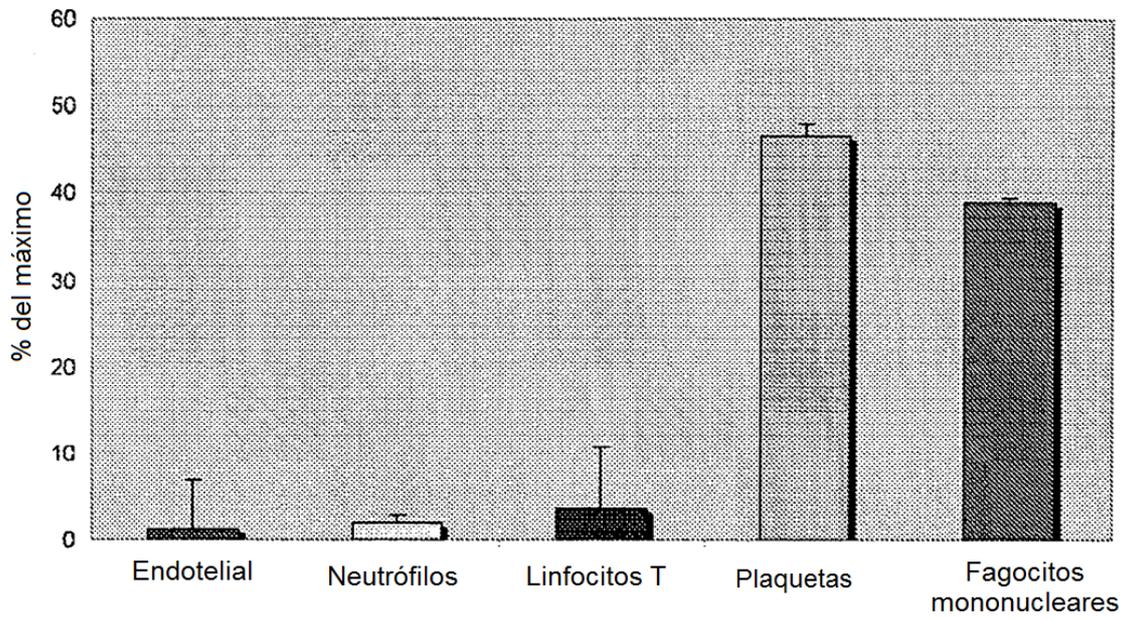


Figura 4

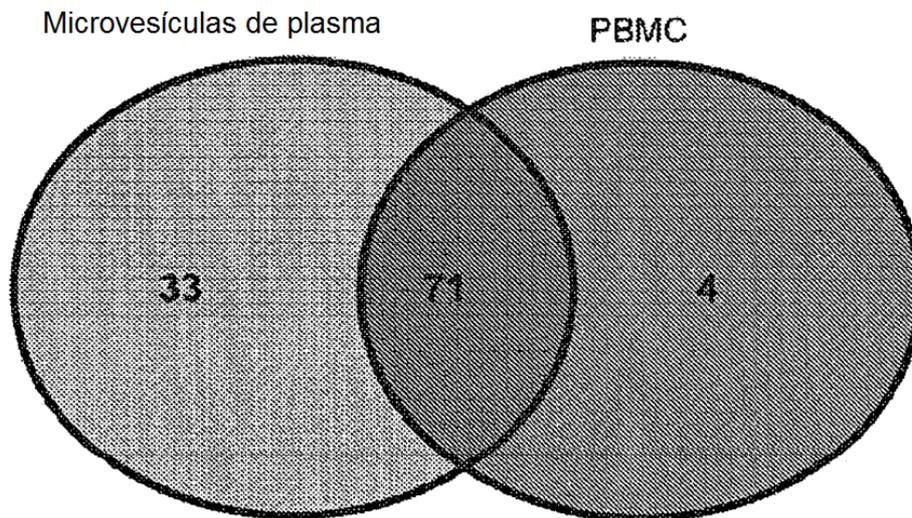


Figura 5D

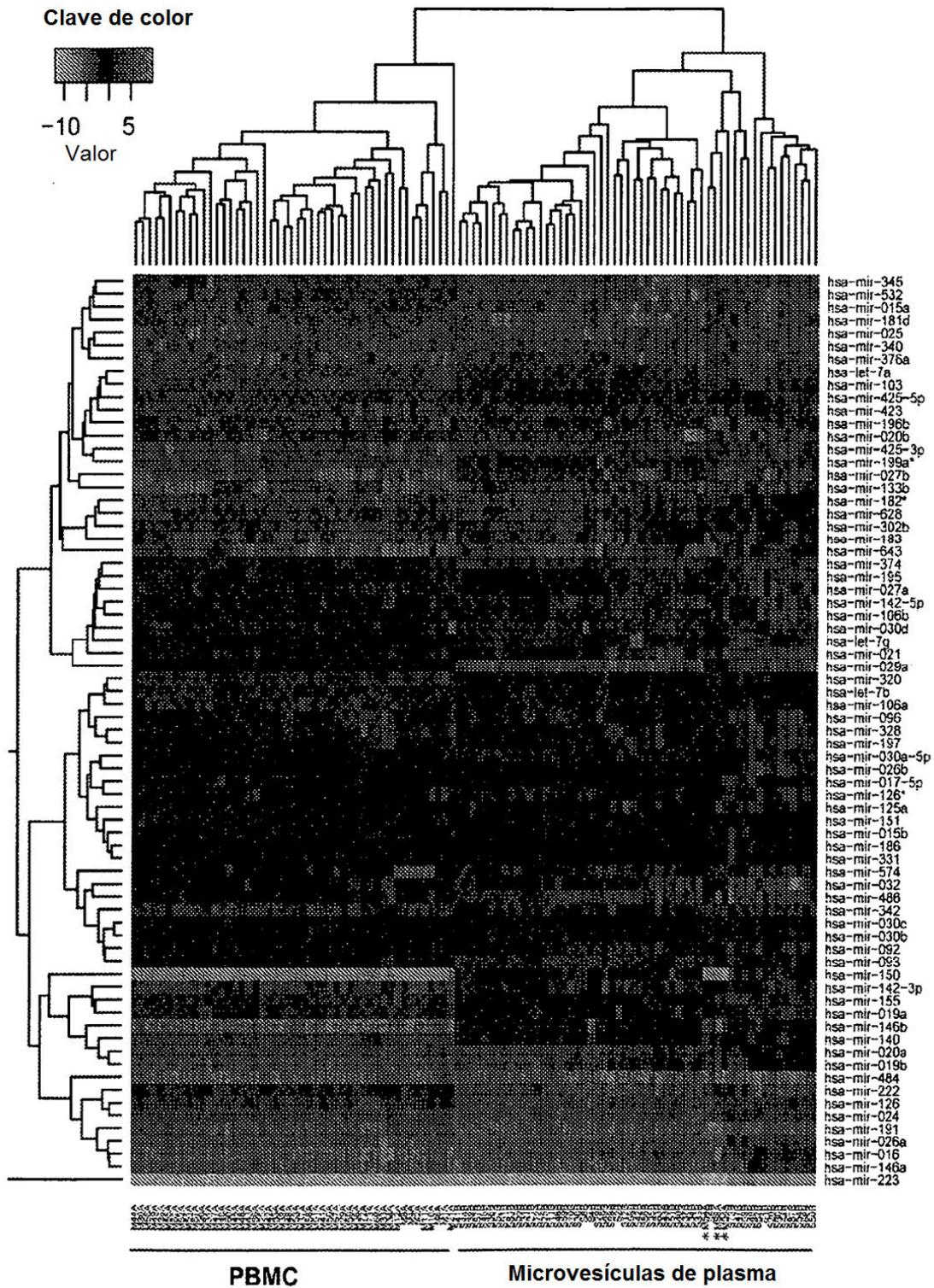


Figura 5A

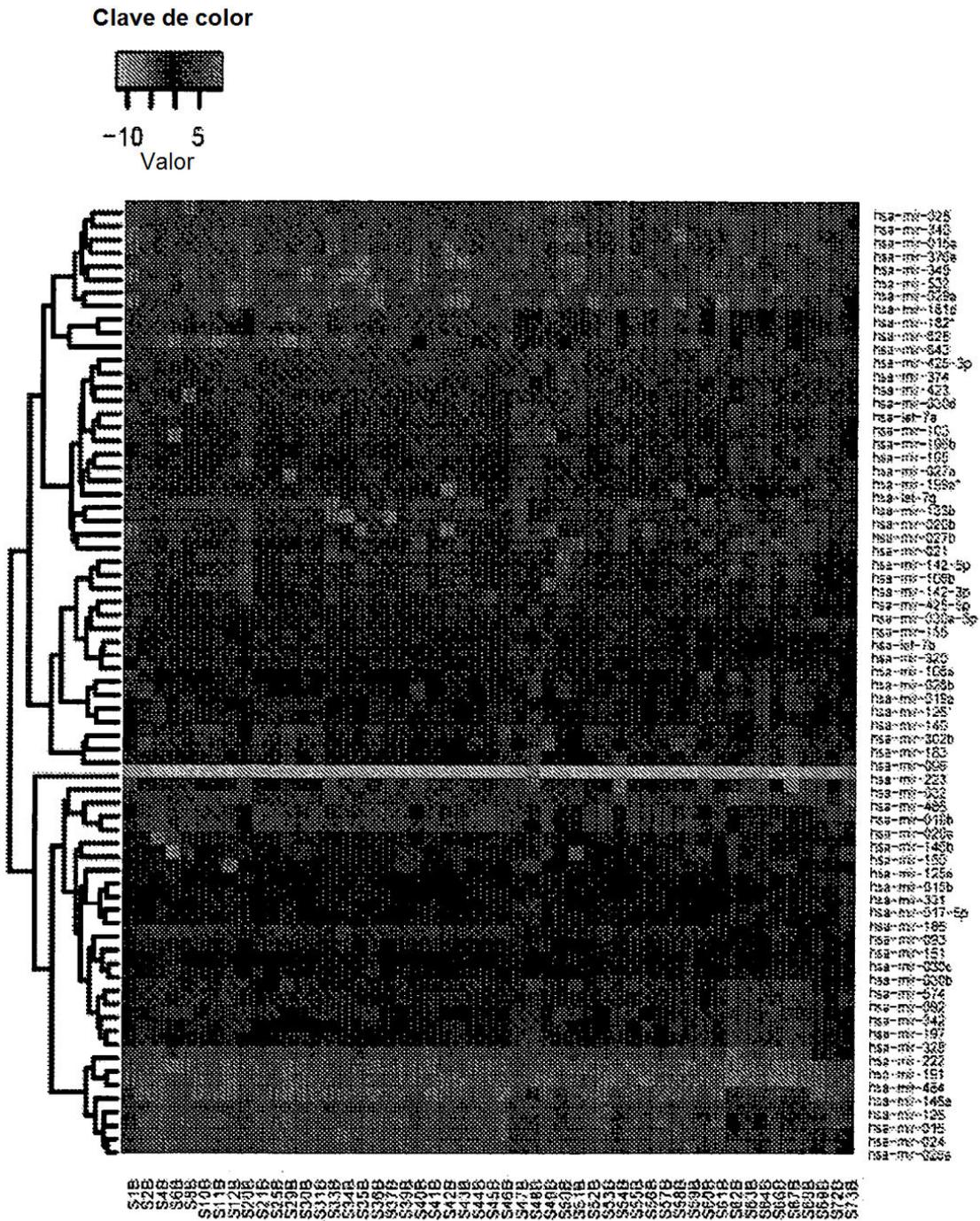


Figura 5B

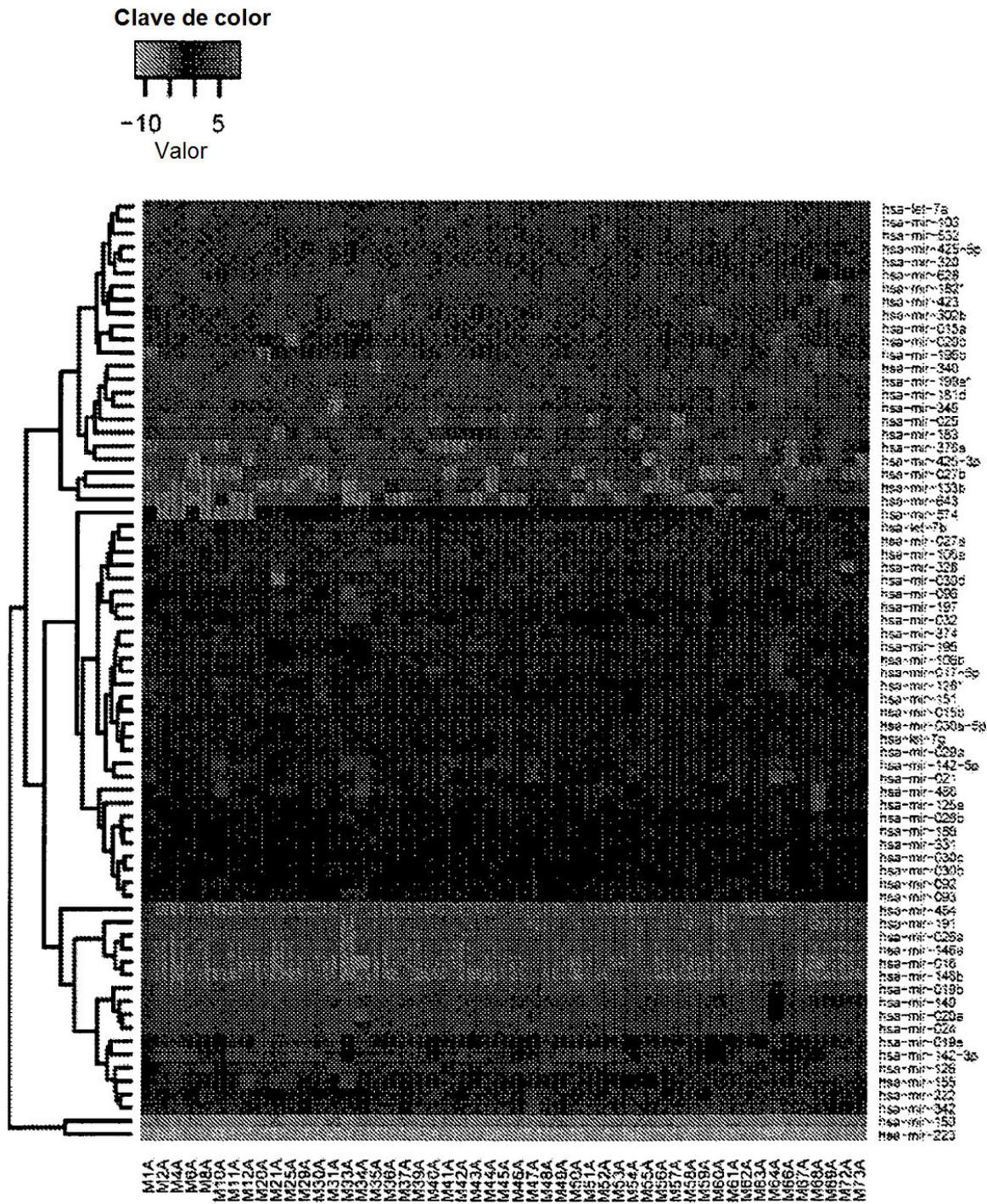


Figura 5C

Tabla 1			
Enfermedad	Aumento de la expresión en tejido enfermo	Reducción de la expresión en tejido enfermo	Referencia
Adenocarcinoma de colon	miR-20a, miR-21, miR-106a, miR-181b, <b>miR-203</b>		JAMA. 30 ene 2008; 299(4):425-36; Int J Cancer. 1 mar 2008 1; 122(5): 969-77.
Colorrectal	miR-19a, miR-21, miR-127, <b>miR-31</b> , miR-96, <b>miR-135b</b> y miR-183,	<b>miR-30c</b> , miR-133a, miR-143, <b>miR-133b</b> y <b>miR-145</b>	Int J Cancer. 1 mar 2008; 122(5):969-77; Cancer. 19 jul 2006; 5:29; Braz J Med Biol Res. nov 2007; 40(11):1435-40.
Cáncer de próstata	miR-21	<b>miR-15a</b> , miR-16-1, miR-143, <b>miR-145</b>	Int J Cancer. 1 mar 2008; 122(5): 969-77.
Cáncer de pulmón	miR-17-92, miR-19a, miR-21, miR-92, miR-155, miR-191, <b>miR-205</b> , miR- <b>miR-210</b>	<b>miR-let-7</b>	Int J Cancer. 1 mar 2008; 122(5): 969-77.
Cáncer de mama	miR-21, miR-155	miR-125b, <b>miR-145</b>	Int J Cancer. 1 mar 2008; 122(5): 969-77.
Linfoma de linfocitos B	miR-155, miR-17-92, miR-19a, miR-92, miR-142, miR-155, miR-221		Int J Cancer. 1 mar 2008; 122 (5): 969-77.
Pancreático	miR-103 y <b>miR-107</b> , miR-18a, <b>miR-31</b> , miR-93, miR-221 y miR-224, miR-155	miR-133a, miR-216, miR-217	J Clin Oncol. 10 oct 2006; 24(29): 4677-84; Oncogene. 28 jun 2007; 26(30): 4442-52
BCL grande difuso	miR-155, miR-17-92		Int J Cancer. 1 mar 2008; 122 (5): 969-77.
CLL	<b>miR-23b</b> , miR-24-1, miR-146, miR-155, miR-195, miR-221, miR-331, miR-29a, miR-195, <b>miR-34a</b> y <b>miR-29c</b>	<b>miR-15a</b> , <b>miR-16-1</b> , miR-29, miR-223	Int J Cancer. 1 mar 2008; 122 (5):969-77; Braz J Med Biol Res. nov 2007; 40(11):1435-40.
Cáncer de vejiga	miR-223, miR-26b, miR-221, miR-103-1, miR-185, miR-23b, <b>miR-203</b> , miR-17-5p, <b>miR-23a</b> y <b>miR-205</b>		Urol Oncol. sep-oct 2007; 25(5): 387-92
Cáncer renal	<b>miR-28</b> , <b>miR-185</b> , miR-27 y miR-let-7f-2		Urol Oncol. sep-oct 2007; 25(5): 387-92
Tumor-hipoxia	<b>miR-23</b> , miR-24, miR-26, miR-27, miR-103, <b>miR-107</b> , <b>miR-181</b> , <b>miR-210</b> y miR-213		Mol Cell Biol. mar 2007; 27(5): 1859-67.
Leiomiomas uterinos	familia miR-let-7, miR-21, <b>miR-23b</b> , <b>miR-29b</b> y miR-197		Genes Chromosomes Cancer. abr 2007;46(4): 336-47
Ovárico	miR-199*, <b>miR-200a</b> , <b>miR-214</b>	miR-100, <b>grupo de miR-let-7</b> , miR-125b	Cancer Res. 15 ene 2008; 15; 68(2); 425-33
Carcinoma hepatocelular asociado con virus de la hepatitis C	<b>miR-122</b> , <b>miR-100</b> y <b>miR-10a</b>	miR-198 y <b>miR-145</b>	Hepatology. 19 dic 2007 [Epub antes de la impresión]
ALL	<b>miR-128b</b> , <b>miR-204</b> , <b>miR-218</b> , miR-331 y miR-181b-1, miR-17-92		Braz J Med Biol Res. nov 2007; 40(11): 1435-40.
Enfermedad de Alzheimer	<b>miR-9</b> , <b>miR-128</b>	miR-107	J Neurosci. 30 ene 2008; 28(5): 1213-23 Neuroreport. 12 feb 2007; 18(3): 297-300
Mielofibrosis	<b>miR-190</b>	miR-31, <b>miR-150</b> y miR-95	Exp Hematol. nov 2007;35(11): 1708-18
Mielofibrosis, policetemia vera, trombocitemia		miR-34a, <b>-342</b> , -326, -105,-149 y-147	Exp Hematol. nov 2007;35(11): 1708-18
VIH	miR-29a, <b>miR-29b</b> , <b>miR-149</b> , <b>miR-378</b> , miR-324-5p		Biochem Biophys Res Commun. 2 dic 2005; 337(4): 1214-8.
Latencia de VIH-1	<b>miR-28</b> , <b>miR-125b</b> , miR-150, miR-223 y miR-382		Nat Med. Oct 2007; 13(10):1241-7

Figura 6 - Tabla I

**Tabla II**

miARN en plasma expresados después de filtración		Nombre de detector Indetectable			
Nombre_detector	filtro				
hsa-let-7a	0,333333333	<b>hsa-let-7e</b>	<b>hsa-mir-346</b>	<b>hsa-mir-520c</b>	<b>hsa-mir-629</b>
hsa-let-7b	0,058823529	<b>hsa-mir-001</b>	<b>hsa-mir-362</b>	<b>hsa-mir-520d</b>	<b>hsa-mir-630</b>
hsa-let-7c	0,725490196	<b>hsa-mir-007</b>	<b>hsa-mir-363</b>	<b>hsa-mir-520d*</b>	<b>hsa-mir-631</b>
hsa-let-7d	0,529411765	<b>hsa-mir-009</b>	<b>hsa-mir-363*</b>	<b>hsa-mir-520e</b>	<b>hsa-mir-632</b>
hsa-let-7f	0,745098039	<b>hsa-mir-009*</b>	<b>hsa-mir-365</b>	<b>hsa-mir-520f</b>	<b>hsa-mir-633</b>
hsa-let-7g	0,215686275	<b>hsa-mir-010a</b>	<b>hsa-mir-367</b>	<b>hsa-mir-520g</b>	<b>hsa-mir-634</b>
hsa-mir-015a	0,568627451	<b>hsa-mir-010b</b>	<b>hsa-mir-368</b>	<b>hsa-mir-520h</b>	<b>hsa-mir-635</b>
hsa-mir-015b	0,078431373		<b>hsa-mir-369-3p</b>	<b>hsa-mir-521</b>	<b>hsa-mir-636</b>
hsa-mir-016	0	<b>hsa-mir-017-3p</b>			
hsa-mir-017-5p	0,117647059	<b>hsa-mir-018b</b>	<b>hsa-mir-369-5p</b>	<b>hsa-mir-522</b>	<b>hsa-mir-637</b>
hsa-mir-018a	0,784313726	<b>hsa-mir-022</b>	<b>hsa-mir-371</b>	<b>hsa-mir-523</b>	<b>hsa-mir-638</b>
hsa-mir-018a*	0,784313726	<b>hsa-mir-023a</b>	<b>hsa-mir-372</b>	<b>hsa-mir-524</b>	<b>hsa-mir-639</b>
hsa-mir-019a	0,176470588	<b>hsa-mir-023b</b>	<b>hsa-mir-373</b>	<b>hsa-mir-525</b>	<b>hsa-mir-641</b>
hsa-mir-019b	0,058823529	<b>hsa-mir-028</b>	<b>hsa-mir-373*</b>	<b>hsa-mir-525*</b>	<b>hsa-mir-642</b>
hsa-mir-020a	0	<b>hsa-mir-029b</b>	<b>hsa-mir-375</b>	<b>hsa-mir-526a</b>	
hsa-mir-020b	0,37254902	<b>hsa-mir-029c</b>	<b>hsa-mir-376a*</b>	<b>hsa-mir-526b</b>	<b>hsa-mir-644</b>
hsa-mir-021	0,411764706	<b>hsa-mir-031</b>	<b>hsa-mir-376b</b>	<b>hsa-mir-526b*</b>	<b>hsa-mir-645</b>
hsa-mir-024	0	<b>hsa-mir-033</b>	<b>hsa-mir-377</b>	<b>hsa-mir-526c</b>	<b>hsa-mir-646</b>
hsa-mir-025	0,647058824	<b>hsa-mir-034a</b>	<b>hsa-mir-378</b>	<b>hsa-mir-527</b>	<b>hsa-mir-647</b>
hsa-mir-026a	0	<b>hsa-mir-034b</b>	<b>hsa-mir-379</b>		<b>hsa-mir-648</b>
hsa-mir-026b	0,176470588	<b>hsa-mir-034c</b>	<b>hsa-mir-380-3p</b>	<b>hsa-mir-542-3p</b>	<b>hsa-mir-649</b>
hsa-mir-027a	0,254901961	<b>hsa-mir-095</b>	<b>hsa-mir-380-5p</b>	<b>hsa-mir-542-5p</b>	<b>hsa-mir-650</b>
hsa-mir-027b	0,352941177	<b>hsa-mir-099a</b>	<b>hsa-mir-381</b>	<b>hsa-mir-544</b>	<b>hsa-mir-651</b>
hsa-mir-029a	0,764705882	<b>hsa-mir-100</b>	<b>hsa-mir-383</b>	<b>hsa-mir-545</b>	<b>hsa-mir-652</b>
hsa-mir-030a-3p	0,37254902	<b>hsa-mir-101</b>	<b>hsa-mir-409-5p</b>	<b>hsa-mir-548a</b>	<b>hsa-mir-653</b>
hsa-mir-030a-5p	0,098039216	<b>hsa-mir-105</b>	<b>hsa-mir-410</b>	<b>hsa-mir-548b</b>	<b>hsa-mir-654</b>
hsa-mir-030b	0,039215686	<b>hsa-mir-107</b>	<b>hsa-mir-412</b>	<b>hsa-mir-548c</b>	<b>hsa-mir-655</b>
hsa-mir-030c	0,019607843	<b>hsa-mir-122a</b>	<b>hsa-mir-422a</b>	<b>hsa-mir-548d</b>	<b>hsa-mir-656</b>
hsa-mir-030d	0,274509804	<b>hsa-mir-124a</b>	<b>hsa-mir-422b</b>	<b>hsa-mir-549</b>	<b>hsa-mir-657</b>
hsa-mir-032	0	<b>hsa-mir-125b</b>	<b>hsa-mir-424</b>	<b>hsa-mir-550</b>	<b>hsa-mir-658</b>
hsa-mir-092	0	<b>hsa-mir-126</b>	<b>hsa-mir-429</b>	<b>hsa-mir-551a</b>	<b>hsa-mir-659</b>
hsa-mir-093	0,058823529	<b>hsa-mir-128a</b>	<b>hsa-mir-432*</b>	<b>hsa-mir-551b</b>	<b>hsa-mir-660</b>
hsa-mir-096	0	<b>hsa-mir-128b</b>	<b>hsa-mir-448</b>	<b>hsa-mir-552</b>	<b>hsa-mir-661</b>
hsa-mir-098	0,784313726	<b>hsa-mir-129</b>	<b>hsa-mir-449</b>	<b>hsa-mir-553</b>	<b>hsa-mir-662</b>
hsa-mir-099b	0,549019608	<b>hsa-mir-133a</b>	<b>hsa-mir-449b</b>	<b>hsa-mir-554</b>	
			<b>hsa-mir-450</b>		

**Figura 7 - Tabla II**

hsa-mir-103	0,235294118	hsa-mir-135a	hsa-mir-451	hsa-mir-555
hsa-mir-106a	0,058823529	hsa-mir-135b	hsa-mir-452	hsa-mir-556
hsa-mir-106b	0,215686275	hsa-mir-136	hsa-mir-452*	hsa-mir-557
hsa-mir-125a	0,078431373	hsa-mir-137	hsa-mir-453	hsa-mir-558
hsa-mir-126	0	hsa-mir-138	hsa-mir-455	hsa-mir-559
hsa-mir-126*	0,117647059	hsa-mir-139	hsa-mir-483	hsa-mir-561
hsa-mir-127	0,176470588	hsa-mir-141	hsa-mir-485-5p	hsa-mir-562
hsa-mir-130a	0,666666667	hsa-mir-143	hsa-mir-487a	hsa-mir-563
hsa-mir-130b	0,705882353	hsa-mir-147	hsa-mir-488	hsa-mir-564
hsa-mir-132	0,705882353	hsa-mir-148a	hsa-mir-489	hsa-mir-565
hsa-mir-133b	0,529411765	hsa-mir-149	hsa-mir-491	hsa-mir-566
hsa-mir-134	0,235294118	hsa-mir-152	hsa-mir-492	hsa-mir-567
hsa-mir-140	0,078431373	hsa-mir-153	hsa-mir-493-3p	hsa-mir-569
hsa-mir-142-3p	0,196078431	hsa-mir-154	hsa-mir-493-5p	hsa-mir-570
hsa-mir-142-5p	0,254901961	hsa-mir-154*	hsa-mir-494	hsa-mir-571
hsa-mir-145	0,705882353	hsa-mir-181a	hsa-mir-495	hsa-mir-572
hsa-mir-146a	0	hsa-mir-181a*	hsa-mir-496	hsa-mir-573
hsa-mir-146b	0,078431373	hsa-mir-181c	hsa-mir-497	
hsa-mir-148b	0,784313726	hsa-mir-182	hsa-mir-498	hsa-mir-575
hsa-mir-150	0,019607843	hsa-mir-184	hsa-mir-499	hsa-mir-576
hsa-mir-151	0,019607843	hsa-mir-185	hsa-mir-500	hsa-mir-578
hsa-mir-155	0,176470588	hsa-mir-187	hsa-mir-501	hsa-mir-579
hsa-mir-181d	0,725490196	hsa-mir-189	hsa-mir-502	hsa-mir-580
hsa-mir-182*	0,196078431	hsa-mir-190	hsa-mir-503	hsa-mir-583
hsa-mir-183	0,058823529	hsa-mir-192	hsa-mir-504	
hsa-mir-186	0,039215686	hsa-mir-193b	hsa-mir-505	hsa-mir-585
hsa-mir-191	0	hsa-mir-194	hsa-mir-506	hsa-mir-586
hsa-mir-193a	0,666666667	hsa-mir-196a	hsa-mir-507	hsa-mir-587
hsa-mir-195	0,31372549	hsa-mir-198	hsa-mir-508	hsa-mir-588
hsa-mir-196b	0,254901961	hsa-mir-199a	hsa-mir-509	hsa-mir-589
hsa-mir-197	0,019607843	hsa-mir-199b	hsa-mir-510	hsa-mir-591
hsa-mir-199a*	0,254901961	hsa-mir-200a	hsa-mir-511	hsa-mir-592
hsa-mir-221	0,784313726	hsa-mir-200a*	hsa-mir-512-3p	hsa-mir-593
hsa-mir-222	0	hsa-mir-200b	hsa-mir-512-5p	hsa-mir-594
hsa-mir-223	0	hsa-mir-200c	hsa-mir-513	hsa-mir-596
hsa-mir-224	0,529411765	hsa-mir-202	hsa-mir-514	hsa-mir-597
hsa-mir-302b	0,078431373	hsa-mir-202*	hsa-mir-515-3p	hsa-mir-599
hsa-mir-320	0,098039216	hsa-mir-203	hsa-mir-515-5p	hsa-mir-600
hsa-mir-324-3p	0,705882353	hsa-mir-204	hsa-mir-516-5p	hsa-mir-601
hsa-mir-324-5p	0,470588235	hsa-mir-205	hsa-mir-517*	hsa-mir-603
hsa-mir-328	0	hsa-mir-206	hsa-mir-517a	hsa-mir-604

Figura 7 - Tabla II (cont.)

hsa-mir-330	0,666666667	<b>hsa-mir-208</b>	<b>hsa-mir-517b</b>	<b>hsa-mir-606</b>
hsa-mir-331	0,039215686	<b>hsa-mir-210</b>	<b>hsa-mir-517c</b>	<b>hsa-mir-607</b>
hsa-mir-335	0,725490196	<b>hsa-mir-211</b>	<b>hsa-mir-518a</b>	<b>hsa-mir-608</b>
hsa-mir-339	0,607843137	<b>hsa-mir-214</b>	<b>hsa-mir-518b</b>	<b>hsa-mir-609</b>
hsa-mir-340	0,529411765	<b>hsa-mir-215</b>	<b>hsa-mir-518c</b>	<b>hsa-mir-610</b>
hsa-mir-342	0,019607843	<b>hsa-mir-216</b>	<b>hsa-mir-518c*</b>	<b>hsa-mir-612</b>
hsa-mir-345	0,705882353	<b>hsa-mir-217</b>	<b>hsa-mir-518d</b>	<b>hsa-mir-613</b>
hsa-mir-361	0,725490196	<b>hsa-mir-218</b>	<b>hsa-mir-518e</b>	<b>hsa-mir-614</b>
hsa-mir-370	0,549019608	<b>hsa-mir-219</b>	<b>hsa-mir-518f</b>	<b>hsa-mir-615</b>
hsa-mir-374	0,37254902	<b>hsa-mir-220</b>	<b>hsa-mir-519a</b>	<b>hsa-mir-616</b>
hsa-mir-376a	0,450980392	<b>hsa-mir-296</b>	<b>hsa-mir-519b</b>	<b>hsa-mir-617</b>
hsa-mir-382	0,607843137	<b>hsa-mir-299-3p</b>	<b>hsa-mir-519c</b>	<b>hsa-mir-618</b>
hsa-mir-411	0,607843137	<b>hsa-mir-299-5p</b>	<b>hsa-mir-519d</b>	<b>hsa-mir-619</b>
hsa-mir-423	0,215686275	<b>hsa-mir-301</b>	<b>hsa-mir-519e</b>	<b>hsa-mir-621</b>
hsa-mir-425-3p	0,31372549	<b>hsa-mir-302a</b>	<b>hsa-mir-519e*</b>	<b>hsa-mir-622</b>
hsa-mir-425-5p	0,215686275	<b>hsa-mir-302a*</b>	<b>hsa-mir-520a</b>	<b>hsa-mir-624</b>
hsa-mir-432	0,392156863	<b>hsa-mir-302b*</b>	<b>hsa-mir-520a*</b>	<b>hsa-mir-626</b>
hsa-mir-433	0,470588235	<b>hsa-mir-302c</b>	<b>hsa-mir-520b</b>	<b>hsa-mir-627</b>
hsa-mir-484	0	<b>hsa-mir-302c*</b>		
hsa-mir-485-3p	0,31372549	<b>hsa-mir-302d</b>		
hsa-mir-486	0	<b>hsa-mir-323</b>		
hsa-mir-487b	0,529411765	<b>hsa-mir-325</b>		
hsa-mir-532	0,62745098	<b>hsa-mir-326</b>		
hsa-mir-539	0,588235294	<b>hsa-mir-329</b>		
hsa-mir-574	0	<b>hsa-mir-337</b>		
hsa-mir-584	0,784313726	<b>hsa-mir-338</b>		
hsa-mir-628	0			
hsa-mir-643	0,568627451			

Figura 7 - Tabla II (cont.)

Tabla III. Diez miARN más expresados en microvesículas de plasma y PBMC.							
Microvesículas de plasma				PBMC			
miARN	Expresión normalizada (± D.T.)	Frecuencia expresada entre donantes (%)	10 frecuencias de mayor clasificación (%)	miARN	Expresión normalizada (± D.T.)	Frecuencia expresada entre donantes (%)	10 frecuencias de mayor clasificación (%)
<b>mir-223</b>	1589 ± 653	100	100	<b>mir-223</b>	2143 ± 499	100	100
<b>mir-484</b>	50,9 ± 22,9	100	96	<b>mir-150</b>	241 ± 94,6	98	98
<b>mir-191</b>	46,4 ± 14,9	100	100	<b>mir-146b</b>	57,5 ± 21,1	100	100
<b>mir-146a</b>	39,5 ± 19	100	88	<b>mir-016</b>	54,7 ± 32,9	100	100
<b>mir-016</b>	25,4 ± 13,3	100	78	<b>mir-484</b>	40,6 ± 18,8	89	88
<b>mir-026a</b>	25,2 ± 9,95	100	90	<b>mir-146a</b>	39,6 ± 13,0	100	98
<b>mir-222</b>	24,5 ± 12,4	100	76	<b>mir-191</b>	32,4 ± 15,6	100	94
<b>mir-024</b>	22,7 ± 10,5	100	80	<b>mir-026a</b>	30 ± 8,92	100	100
<b>mir-126</b>	18,2 ± 8,04	100	66	<b>mir-019b</b>	21,7 ± 7,49	100	80
<b>mir-032</b>	15,3 ± 32,6	100	31	<b>mir-020a</b>	15 ± 5,11	100	4

**Figura 8 - Tabla III**

Rutas predichas reguladas por miARN expresados en las microvesículas de plasma y fracciones de PBMC basándose en análisis de IPA solamente de dianas predichas por Sanger miRBase			
Microvesículas de plasma	p-valor	PBMC	p-valor
Metabolismo de glicerofosfolípidos	3,29E-03	Señalización de orientación axonal	1,47E-02
Metabolismo de inositol fosfato	5,77E-03	Potenciación a largo plazo sináptica	2,07E-02
Degradación de fosfolípidos	9,17E-03	Señalización de receptores de estrógenos	2,23E-02
Metabolismo de alanina y aspartato	1,96E-02	Metabolismo de glicerofosfolípidos	2,45E-02
Señalización del receptor de estrógenos	2,14E-02	Metabolismo de D-glutamina y D-glutamato	2,78E-02
Rutas predichas reguladas por miARN expresados en las microvesículas de plasma y fracciones de PBMC de dianas combinadas de TargetScan y Sanger miRBase			
Microvesículas de plasma	p-valor	PBMC	p-valor
Ruta de presentación de antígenos	1,28E-03	Metabolismo de glicina, serina, treonina	3,63E-03
metabolismo de glicerofosfolípidos	9,05E-03	Metabolismo de glicerofosfolípidos	2,38E-02
Metabolismo de glicina, serina, treonina	1,56E-02	Metabolismo de D-glutamina y D-glutamato	2,54E-02
Señalización de linfocitos citotóxicos naturales	1,57E-02	Metabolismo de glioxilato, dicarboxilato	4,37E-02

**Figura 9 - Tabla IV**

plasma\_media es la media de Ct en bruto en las 51 observaciones para plasma

PBMC es la media de la Ct en bruto en las 51 observaciones para PBMC

"Plasma-PBMC" es la diferencia de datos normalizados entre plasma y PBMC

Plasma-MNC "+": el nivel de miR es mayor en PBMC, y "-": el nivel de miR es menor en plasma

"Factor de cambio" es  $2^{\Delta}$  la diferencia. Para miR 29a:  $40,3 = 2^{\Delta(5,33)}$ . Lo que significa que el nivel de miR en PBMC es 40 veces mayor que en suero

"p-valor" se consideró significativo si el p-valor  $< 0,05/72 = 0,0006$

Nombre_detector	Plasma_media	PBMC_media	Plasma-MNC	factor de cambio	p-valor	Factor de cambio para plasma
hsa-mir-029a	37,12771586	31,87566924	5,3333	40,31654208	9,70E-28	0,024803715
18S (CT)	12,71460766	9,451029281	3,3449	10,16050356	9,84E-25	0,098420319
hsa-mir-155	32,77301951	29,64446324	3,2098	9,252222752	6,61E-23	0,108082136
hsa-mir-146b	30,87718855	26,44380422	4,5147	22,85915231	1,81E-22	0,043746154
hsa-mir-142-3p	33,45027482	28,97701498	4,5545	23,49855274	1,91E-22	0,042555812
hsa-mir-222	27,69255453	29,77206378	-1,9982	0,250312111	1,18E-21	3,995012452
hsa-mir-328	30,15998382	32,9642692	-2,723	0,151459083	1,64E-21	6,602443268
hsa-mir-151	30,40933518	32,29093225	-1,8003	0,287114879	2,24E-21	3,482926432
hsa-mir-150	30,47592494	24,6518619	5,9053	59,93388544	7,01E-21	0,016685052
hsa-mir-486	28,73173943	31,56628224	-2,7533	0,148311256	4,31E-20	6,74257657
hsa-mir-197	30,22004439	32,22121169	-1,9199	0,264272828	5,34E-18	3,783968293
hsa-mir-140	30,80686384	28,81119314	2,077	4,219289268	2,87E-17	0,237006741
hsa-mir-320	32,3865371	33,86695527	-1,3991	0,379165604	1,63E-16	2,637370031
hsa-mir-374	34,51049488	32,67750663	1,9143	3,76930882	8,01E-15	0,265300629
hsa-mir-019a	32,11311761	29,96710463	2,2273	4,682568177	2,86E-12	0,213558022
hsa-mir-019b	29,4539469	27,85115537	1,6841	3,213398715	7,12E-12	0,311196988
hsa-mir-126	28,07632355	29,10031739	-0,9427	0,520258307	2,61E-11	1,922122121
hsa-mir-016	27,74576263	26,5689361	1,2581	2,391805375	1,35E-10	0,418094219
hsa-mir-532	36,36702118	34,20639555	2,2419	4,730196117	6,15E-10	0,211407725
hsa-mir-092	29,75216725	30,55396618	-0,7205	0,606887075	1,17E-09	1,647753003
hsa-mir-199a*	33,58726049	35,4571252	-1,7886	0,289452796	3,21E-09	3,454794744
hsa-let-7g	33,60687451	31,98889118	1,6993	3,247433539	4,99E-09	0,307935478
hsa-mir-032	29,54416735	31,80526606	-2,1798	0,220706343	8,52E-09	4,530907381
hsa-mir-345	36,51374094	34,71916814	1,8759	3,670305114	1,26E-08	0,272456913
hsa-mir-103	33,43298386	34,64525506	-1,131	0,456599125	1,99E-08	2,190104942
hsa-mir-021	34,3396759	32,34668429	2,0743	4,211400264	4,23E-08	0,237450714
hsa-mir-183	32,45422284	35,11564953	-2,5801	0,167229352	7,17E-08	5,979811469
hsa-mir-142-5p	33,80914806	32,4729949	1,4174	2,671037073	9,83E-08	0,374386417
hsa-mir-017-5p	31,31194325	32,41959375	-1,0264	0,490933663	1,26E-07	2,03693508
hsa-mir-106b	33,74281576	32,50763722	1,3165	2,490611501	1,28E-07	0,401507822
hsa-mir-342	30,04861659	29,34785373	0,782	1,719512972	3,06E-07	0,581560021

**Figura 10 - Tabla V**

ES 2 419 129 T3

hsa-mir-015a	36,02643541	34,41777394	1,6899	3,226343396	3,25E-07	0,309948408
hsa-mir-106a	32,27341998	33,310393	-0,9557	0,515591362	4,92E-07	1,939520467
hsa-mir-030a-5p	32,84903206	32,11457514	0,8157	1,760151976	4,98E-07	0,56813276
hsa-mir-181d	36,91248884	35,10117465	1,8926	3,713037794	5,30E-07	0,269321255
hsa-mir-574	29,77877718	31,99443544	-2,1344	0,227762162	3,05E-06	4,390544899
hsa-mir-020a	29,10969835	28,36665692	0,8243	1,770675693	3,74E-06	0,564756157
hsa-mir-133b	35,04172861	36,86655569	-1,7435	0,298644281	4,05E-06	3,348465259
hsa-let-7b	32,39289143	33,23120741	-0,757	0,591725511	4,25E-06	1,689972769
hsa-mir-026b	32,29385324	31,16910598	1,206	2,30697121	5,44E-06	0,433468782
hsa-mir-027b	34,97319163	37,12771071	-2,0732	0,23763183	1,20999E-05	4,208190455
hsa-mir-223	21,63665394	21,16179467	0,5561	1,470289246	2,99379E-05	0,680138281
hsa-mir-195	33,54064118	32,45677802	1,1652	2,242643031	0,000055077	0,44590244
hsa-mir-024	27,78702461	28,36258525	-0,4943	0,709906043	0,000137267	1,408637114
hsa-mir-030d	33,8831652	32,98623929	0,9782	1,970005968	0,000154741	0,507612675
hsa-mir-015b	31,44832671	32,07442065	-0,5448	0,685486424	0,000371404	1,458818095
hsa-mir-096	31,46980261	32,73422363	-1,1831	0,44040416	0,000386324	2,270641588
hsa-mir-191	26,63890682	27,27556098	-0,7068	0,612677595	0,00047708	1,632179808
hsa-mir-425-3p	34,77417378	35,82356186	-0,9681	0,511178832	0,00084906	1,95626254
hsa-mir-020b	34,97815304	33,84422814	1,2152	2,321729667	0,000852341	0,430713366
hsa-mir-643	35,6734501	37,16658316	-1,4118	0,375842469	0,00130314	2,660689207
hsa-mir-126*	31,16681945	32,1345669	-0,8865	0,54092482	0,001314585	1,84868574
hsa-mir-423	33,93739253	34,82278949	-0,8041	0,57271925	0,001362239	1,746056205
hsa-mir-425-5p	33,23637712	33,88098071	-0,5633	0,676752398	0,00179719	1,477645299
hsa-mir-026a	27,61150875	27,32677761	0,366	1,28877463	0,003310506	0,775930854
hsa-mir-302b	33,23113157	34,33434284	-1,0219	0,492467356	0,003731969	2,030591447
hsa-mir-484	26,55751618	28,13046808	-1,4917	0,355593289	0,009046242	2,812201558
hsa-mir-125a	30,94104939	31,63410639	-0,6118	0,654379746	0,02785181	1,528164657
hsa-let-7a	34,16573733	34,66154112	-0,4145	0,750279477	0,031855987	1,332836671
hsa-mir-628	33,65892745	34,23451988	-0,4943	0,709906043	0,033363855	1,408637114
hsa-mir-182*	34,51246341	35,19580641	-0,6021	0,65879431	0,04206113	1,517924464
hsa-mir-093	29,92991163	30,33080725	-0,3196	0,801292012	0,043597802	1,247984486
hsa-mir-376a	35,49479343	36,2218518	-0,6458	0,639138279	0,048003434	1,564606648
hsa-mir-196b	33,89190492	34,56216867	-0,589	0,664803554	0,052904716	1,504203751
hsa-mir-025	36,27231106	35,85259422	0,501	1,41519416	0,069149461	0,706616822
hsa-mir-027a	33,33901471	32,99540369	0,4249	1,342479446	0,101287776	0,744890362
hsa-mir-146a	27,051654	26,95885476	0,1741	1,12826034	0,241458101	0,886320262
hsa-mir-340	35,71472961	35,53800265	0,258	1,195819797	0,297093531	0,8362464
hsa-mir-030b	30,55810765	30,72009382	-0,0807	0,945598728	0,389875101	1,057531033
hsa-mir-186	31,31177086	31,45367741	-0,06062	0,958851963	0,659198081	1,042913858
hsa-mir-331	31,20308243	31,25979306	0,02458	1,017183525	0,843135202	0,983106761
hsa-mir-030c	30,93719829	31,01586004	0,002625	1,001821168	0,97816881	0,998182143

Figura 10 - Tabla V (cont.)

Tabla VI					
Nombre_detector	Expresión normalizada media PBMC	Desviación típica de PBMC	Nombre_detector	Expresión normalizada media plasma	Desviación típica de plasma
hsa-mir-223	2143,797514	499,6723532	hsa-mir-223	1589,265353	653,1441
hsa-mir-150	241,3339986	94,6316509	hsa-mir-484	50,93154102	22,91411
hsa-mir-146b	57,51515588	21,17347322	hsa-mir-191	46,44422571	14,98219
hsa-mir-016	54,79023342	32,92864759	hsa-mir-146a	39,5631478	19,02017
hsa-mir-484	40,62828652	18,89513879	hsa-mir-016	25,45043823	13,32435
hsa-mir-146a	39,66536453	13,01422255	hsa-mir-026a	25,2068328	9,956682
hsa-mir-191	32,44104295	15,62493155	hsa-mir-222	24,51626706	12,42177
hsa-mir-026a	30,05789737	8,928309461	hsa-mir-024	22,79169634	10,53596
hsa-mir-019b	21,72111133	7,496587814	hsa-mir-126	18,20923598	8,04666
hsa-mir-020a	15,03972998	5,117918017	hsa-mir-032	15,32305403	32,61654
hsa-mir-024	14,49037987	2,924884427	hsa-mir-486	12,89548349	11,97428
hsa-mir-142-3p	11,61802275	7,535807778	hsa-mir-020a	10,12067658	5,597534
hsa-mir-140	11,15286241	3,933184767	hsa-mir-019b	9,158209689	6,76422
hsa-mir-126	9,209558485	3,825687483	hsa-mir-150	8,165508668	25,08223
hsa-mir-342	7,803100549	3,388772813	hsa-mir-574	5,939301367	3,722014
hsa-mir-155	6,584151232	4,579272166	hsa-mir-092	5,700980896	3,157407
hsa-mir-222	5,715723219	2,105344287	hsa-mir-093	5,436799962	2,417329
hsa-mir-019a	5,53562668	2,957936571	hsa-mir-342	5,114543492	3,297305
hsa-mir-093	3,756090874	1,000518353	hsa-mir-197	4,9808586	4,507
hsa-mir-092	3,215354275	0,85390195	hsa-mir-328	4,707858075	3,592588
hsa-mir-486	3,096228853	7,676887526	hsa-mir-096	3,674085488	5,965292
hsa-mir-030b	2,865611791	0,76538861	hsa-mir-151	3,452172299	1,08377
hsa-mir-574	2,458205492	1,894539696	hsa-mir-146b	3,272000368	2,101495
hsa-mir-030c	2,335820956	0,663949738	hsa-mir-140	3,196516876	1,71678
hsa-mir-026b	2,129402092	0,705755408	hsa-mir-030b	3,134519745	1,142809
hsa-mir-331	1,985929854	0,609153141	hsa-mir-125a	3,080410769	1,975409
hsa-mir-125a	1,808127477	1,087896802	hsa-mir-126*	3,023376204	2,068206
hsa-mir-186	1,720577641	0,419612713	hsa-mir-183	2,854264163	6,494415
hsa-mir-032	1,716467503	1,338128537	hsa-mir-030c	2,412532336	0,863587
hsa-mir-029a	1,323099465	0,533548819	hsa-mir-017-5p	2,13024101	0,998316
hsa-mir-126*	1,269368187	0,759421276	hsa-mir-331	2,087433557	0,81255
hsa-let-7g	1,199246639	0,349725473	hsa-mir-186	2,022411766	0,916917
hsa-mir-021	1,161213483	0,674584117	hsa-mir-015b	1,808314178	0,81048
hsa-mir-197	1,149407136	0,647186919	hsa-mir-019a	1,697172987	1,453897

Figura 11 - Tabla VI

hsa-mir-015b	1,14628446	0,432407565	hsa-mir-302b	1,339313335	2,387044
hsa-mir-030a-5p	1,094683149	0,306485271	hsa-mir-026b	1,292369054	0,824158
hsa-mir-195	1,017673959	0,797387672	hsa-mir-106a	1,186157531	1,293289
hsa-mir-151	1,007960478	0,397967603	hsa-let-7b	0,97666637	0,625536
hsa-mir-142-5p	0,962665368	0,492490733	hsa-mir-320	0,911092198	0,420503
hsa-mir-017-5p	0,941159371	0,360846484	hsa-mir-155	0,808867743	0,52866
hsa-mir-106b	0,910164376	0,403715009	hsa-mir-030a-5p	0,727538734	0,549257
hsa-mir-096	0,875989336	0,559638262	hsa-mir-628	0,713396354	1,263219
hsa-mir-374	0,764917256	0,274388929	hsa-mir-027a	0,641903058	0,448917
hsa-mir-328	0,720096352	0,412158586	hsa-mir-142-3p	0,627217683	0,607184
hsa-mir-030d	0,662654685	0,22361572	hsa-mir-195	0,564628001	0,392046
hsa-mir-027a	0,622821419	0,251240619	hsa-mir-425-5p	0,554428361	0,275865
hsa-mir-106a	0,542577626	0,312616405	hsa-let-7g	0,515997707	0,337364
hsa-let-7b	0,534079686	0,25068168	hsa-mir-021	0,51383279	0,491008
hsa-mir-020b	0,410435233	0,262371622	hsa-mir-199a*	0,503454664	0,327551
hsa-mir-320	0,344918355	0,140441973	hsa-mir-142-5p	0,485752905	0,504504
hsa-mir-425-5p	0,334114444	0,131686276	hsa-mir-103	0,469571039	0,215895
hsa-mir-628	0,323074686	0,328272174	hsa-mir-106b	0,455236625	0,295268
hsa-mir-302b	0,31107497	0,233922375	hsa-mir-182*	0,450866408	0,779637
hsa-mir-532	0,30283697	0,175299492	hsa-mir-196b	0,424682779	0,283318
hsa-mir-196b	0,291839926	0,203868959	hsa-mir-643	0,410079866	0,934729
hsa-mir-015a	0,263528933	0,156658681	hsa-mir-030d	0,360317322	0,195419
hsa-mir-183	0,223615225	0,225419033	hsa-mir-423	0,355300524	0,267033
hsa-mir-345	0,222589939	0,14617654	hsa-let-7a	0,316043353	0,197157
hsa-mir-423	0,213547231	0,136842846	hsa-mir-027b	0,252490316	0,182518
hsa-mir-103	0,205412359	0,093491856	hsa-mir-374	0,251770179	0,197212
hsa-let-7a	0,198065472	0,082808812	hsa-mir-020b	0,227198431	0,167979
hsa-mir-181d	0,170055022	0,109234879	hsa-mir-133b	0,201227753	0,178372
hsa-mir-182*	0,151155794	0,079789533	hsa-mir-425-3p	0,183808363	0,094868
hsa-mir-340	0,128492001	0,08303611	hsa-mir-376a	0,166829158	0,161986
hsa-mir-425-3p	0,127886265	0,097067479	hsa-mir-340	0,113550436	0,088995
hsa-mir-199a*	0,127527328	0,079775882	hsa-mir-015a	0,110336695	0,095621
hsa-mir-376a	0,124903907	0,160137603	hsa-mir-181d	0,093074354	0,212993
hsa-mir-643	0,116164417	0,195641411	hsa-mir-532	0,086633253	0,064244
hsa-mir-025	0,11319355	0,079644761	hsa-mir-025	0,072911126	0,043857
hsa-mir-133b	0,100108157	0,121551814	hsa-mir-345	0,071420142	0,054899
hsa-mir-027b	0,07101679	0,067406886	hsa-mir-029a	0,058322216	0,093625

Figura 11 - Tabla VI (cont.)