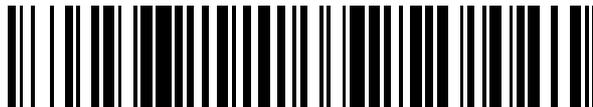


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 404**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.01.2007 E 07717734 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2013 EP 1978986**

54 Título: **Procedimientos basados en los microARN para el diagnóstico y el pronóstico del cáncer de pulmón**

30 Prioridad:

**05.01.2006 US 756400 P**

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

**14.11.2013**

73 Titular/es:

**THE OHIO STATE UNIVERSITY RESEARCH  
FOUNDATION (100.0%)  
1524 North High Street  
Columbus, OH 43201, US**

72 Inventor/es:

**CROCE, CARLO, M.;  
YANAIHARA, NOZOMU y  
HARRIS, CURTIS, C.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 429 404 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimientos basados en los microARN para el diagnóstico y el pronóstico del cáncer de pulmón

**Apoyo Gubernamental**

5 Esta invención se llevó a cabo con el apoyo, en su totalidad o en parte, con la subvención CA76259 y los fondos propios de CCR/NCI/NIH y por los fondos Federales de NCI/NIH bajo el Contrato N° NO1-CO-12400. El Gobierno tiene ciertos derechos en esta invención.

**Antecedente de la invención**

10 El cáncer de pulmón causa más muertes en todo el mundo que cualquier otra forma de cáncer (Goodman, G.E., Thorax 57: 994-999 (2002)). En los Estados Unidos, el cáncer de pulmón es la primera causa de muerte por cáncer tanto entre hombres como entre mujeres. En 2002, la tasa de mortalidad por cáncer de pulmón se estimó en 134.900 muertes. El cáncer de pulmón también encabeza las muertes por cáncer en todos los países europeos y el número de muertes relacionadas con el cáncer de pulmón está aumentando rápidamente en los países en desarrollo.

15 La tasa de supervivencia a los cinco años entre todos los pacientes de cáncer de pulmón, sin tener en cuenta el estadio de la enfermedad en el momento del diagnóstico, es solo de aproximadamente el 13 %. Esto contrasta con una tasa de supervivencia a los cinco años del 46 % entre los casos detectados cuando la enfermedad está aún localizada. Sin embargo, solo el 16 % de los cánceres de pulmón se descubren antes de que la enfermedad se haya extendido. La detección precoz es difícil porque los síntomas clínicos a menudo no se observan hasta que la enfermedad alcanza un estadio avanzado. Normalmente, el diagnóstico se ayuda del uso de radiografías de tórax, el análisis del tipo de células que contiene el esputo y el examen del tracto bronquial con fibra óptica. Los regímenes de tratamiento se determinan por el tipo y estadio del cáncer, e incluyen la cirugía, la radioterapia y/o la quimioterapia. A pesar de las considerables investigaciones en terapias para este y otros tipos de cáncer, el cáncer de pulmón sigue siendo difícil de diagnosticar y tratar eficazmente. Por lo tanto, existe una gran necesidad de mejores procedimientos para detectar y tratar tales cánceres.

25 Carbone, J Clin. Oncol. 23: 3219-3226 (2005); Granville y Dennis, Cell Mol. Biol. 32: 169-176 (2005)). Por ejemplo, son comunes los defectos en las rutas *p53* y *RB/p16* en el cáncer de pulmón. Varios genes distintos, tales como *K-ras*, *PTEN*, *FHIT* and *MYO18B*, están alterados genéticamente en los cánceres de pulmón, aunque menos frecuentemente (Minna y col., Cancer Cell 1: 49-52 (2002); Sekido y col., Annu. Rev. Med. 54:73-87 (2003); Yokota y Kohno, Cancer Sci. 95: 197-204 (2004)). Aunque centrarse en los genes y proteínas conocidos ha dado una información útil, también se puede prestar atención a marcadores de cáncer de pulmón desconocidos previamente en la biología del cáncer de pulmón.

30 Los microARN (miARN) son una clase de ARN pequeños, no codificantes que controlan la expresión génica hibridándose con y desencadenando la represión traduccional o, menos frecuentemente, la degradación de un ARN mensajero (ARNm) diana. El descubrimiento y estudio de los miARN han revelado mecanismos génicos reguladores mediados por miARN que tienen papeles importantes en el desarrollo de organismos y varios procesos celulares, tales como diferenciación celular, crecimiento celular y muerte celular (Cheng, A.M. y col., Nucleic Acids Res. 33: 1290-1297 (2005)). Los estudios recientes sugieren que la expresión aberrante de miARN particulares puede estar implicada en enfermedades humanas, tales como trastornos neurológicos (Ishizuka, A. y col., Genes Dev. 16: 2497-2508 (2002)) y cáncer. Los genes microARN están altamente asociados con las características cromosómicas implicadas en la etiología de distintos cánceres. Por lo tanto la evaluación de la expresión génica del miR puede utilizarse para indicar la presencia de una lesión cromosómica causante de cáncer en un sujeto. Como el cambio en el nivel de la expresión génica del miR producido por una característica cromosómica asociada con el cáncer puede contribuir también a cancerogénesis, un determinado cáncer se puede tratar restaurando el nivel de la expresión génica a los valores normales (documento WO 2005/078139). En particular, se ha descubierto una expresión errónea de miR-16-1 y/o miR-15a en leucemias linfocíticas crónicas (Calin, G.A. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99: 15524-15529 (2002)). Además, la expresión reducida del microARN let-7 en cánceres de pulmón humanos se correlacionó con la supervivencia tras la resección potencialmente curativa (Takamizawa J. y col., Cancer Research 64, 3753-3756, June 1 (2004)). La familia de los microARN let-7 regula negativamente el let-60/RAS. La expresión de let-7 es menor en tumores pulmonares que en el tejido pulmonar normal, al tiempo que la proteína RAS es significativamente más alta en los tumores pulmonares (Johnson S.M. y col., Cell 120, 635-647, March 11 (2005)).

50 El desarrollo y uso de micromatrices que contienen todos los microARN conocidos ha permitido un análisis simultáneo de la expresión de cada miARN en una muestra (Liu, C.G. y col., Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101: 9740-9744 (2004)). Estas micromatrices de microARN no sólo se han utilizado para confirmar que el miR-16-1 está mal regulado en las células humanas de LLC, sino también para generar firmas de expresión de miARN que se asocian con cuadros clinicopatológicos bien definidos de LLC humanas (Calin, G.A. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101: 1175-11760 (2004)). Se puede utilizar el aislamiento, el enriquecimiento y/o el marcado de moléculas de miARN para preparar matrices u otras técnicas de detección para el análisis de miARN. Los perfiles de miARN se pueden emplear en aplicaciones terapéuticas, diagnósticas y pronósticas (documento WO 2005/118806).

La identificación de microARN que se expresan diferencialmente en las células del cáncer de pulmón ayudaría al diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento del cáncer de pulmón. Además, la identificación de las supuestas dianas de estos miARN ayudaría a desvelar su papel patogénico. La presente invención proporciona procedimientos nuevos y composiciones para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer de pulmón.

## 5 **Sumario de la invención**

La presente invención se basa, en parte, en la identificación de los miARN específicos asociados con niveles de expresión alterados en las células del cáncer de pulmón.

En consecuencia, la invención engloba procedimientos para diagnosticar si un sujeto tiene un cáncer de pulmón. Según los procedimientos de la invención, el nivel de al menos un producto génico del miR en una muestra de ensayo del sujeto se compara con el nivel de un correspondiente producto génico del miR en una muestra control. Una alteración (por ejemplo, un aumento, un descenso) del nivel del producto génico del miR en la muestra de ensayo, con respecto al nivel de un correspondiente producto génico del miR en la muestra control, es indicativa de que el sujeto tiene cáncer de pulmón. El al menos un producto génico del miR de los procedimientos de diagnóstico de la presente invención se selecciona entre el grupo que consiste en miR-155.

15 También se desvelan los miR-21, miR-191, miR-126\*, miR-210, miR-143, miR-205, miR-192-prec, miR-224, miR-126, miR-24-2, miR-30a-5p, miR-212, miR-140, miR-9, miR-214, miR-17-3p, miR-124a-1, miR-218-2, miR-95, miR-145, miR-198, miR-216-prec, miR-219-1, miR-106a, miR-197, miR-192, miR-125a-prec, miR-26a-1-prec, miR-146, miR-203, miR-199b-prec, let-7a-2-prec, miR-27b, miR-32, miR-29b-2, miR-220, miR-33, miR-181c-prec, miR-150, miR-101-1, miR-124a-3, miR-125a y let-7f-1. En una divulgación en particular, el al menos un producto génico del miR se seleccionan entre el grupo que consiste en miR-21, miR-191, miR-155, miR-210, miR-126\* y miR-224. En otra divulgación, el al menos un producto génico del miR se selecciona entre el grupo que consiste miR-21, miR-205 y miR-216. En otra divulgación más, el cáncer de pulmón es un adenocarcinoma de pulmón y el al menos un producto génico del miR se selecciona entre el grupo que consiste en miR-21, miR-191, miR-155, miR-210, miR-126\*, miR-126, miR-24-2, "miR-219-1, miR-95, miR-192-prec, miR-220, miR-216-prec, miR-204-prec, miR-188, miR-198, miR-145 y miR-224.

El nivel del al menos un producto génico del miR se puede medir utilizando varias técnicas que son bien conocidas por los expertos en la técnica (por ejemplo, RT-PCR semicuantitativa o cuantitativa, análisis de transferencia de Northern, detección de hibridación en solución). En una realización particular, el nivel de al menos un producto génico del miR se mide haciendo la transcripción inversa del ARN de una muestra de ensayo obtenida de un sujeto, que proporciona una serie de oligodesoxinucleótidos diana, hibridando los oligodesoxinucleótidos diana con uno o más oligonucleótidos sonda específicos de miARN (por ejemplo, en una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN) que proporciona un perfil de hibridación para la muestra de ensayo y comparando el perfil de hibridación de la muestra de ensayo con un perfil de hibridación generado a partir de una muestra control. Una alteración en la señal de al menos un miARN seleccionado entre el grupo que consiste en miR-155 en la muestra de ensayo con respecto a la muestra control es indicativa de que el sujeto o tiene o está en riesgo de desarrollar un cáncer de pulmón. En una divulgación particular, la micromatriz comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN de una parte sustancial de todos los miARN humanos conocidos. En una realización, la micromatriz comprende al menos un oligonucleótido sonda específico de miARN seleccionado entre el grupo que consiste en miR-155. También se desvelan oligonucleótidos sonda específicos de miARN para uno o más de los miARN seleccionados entre el grupo que consiste en miR-21, miR-191, miR-126\*, miR-210, miR-143, miR-205, miR-192-prec, miR-224, miR-126, miR-24-2, miR-30a-5p, miR-212, miR-140, miR-9, miR-214, miR-17-3p, miR-124a-1, miR-218-2, miR-95, miR-145, miR-198, miR-216-prec, miR-219-1, miR-106a, miR-197, miR-192, miR-125a-prec, miR-26a-1-prec, miR-146, miR-203, miR-199b-prec, let-7a-2-prec, miR-27b, miR-32, miR-29b-2, miR-220, miR-33, miR-181c-prec, miR-150, miR-101-1, miR-124a-3, miR-125a y let-7f-1.

45 La invención también proporciona procedimientos para determinar el pronóstico de un sujeto con cáncer de pulmón, que comprenden la medición del nivel de al menos un producto génico del miR en una muestra de ensayo del sujeto, que se asocia con un pronóstico adverso en el cáncer de pulmón. De acuerdo con estos procedimientos, una alteración en el nivel de un producto génico de un miR, que se asocia con un pronóstico adverso, en la muestra de ensayo, cuando se compara con el nivel de un correspondiente producto génico del miR en una muestra control, es indicativa de pronóstico adverso. El al menos un producto génico del miR de los procedimientos de determinación del pronóstico de un sujeto con cáncer de pulmón de la presente invención, se selecciona entre el grupo que consiste en miR-155; en el que el cáncer de pulmón puede ser un adenocarcinoma de pulmón. En ciertas divulgaciones, el al menos un producto génico del miR se selecciona entre el grupo que consiste en miR-17-3p, miR-106a, miR-93, let-7a-2, miR-145, let-7b, miR-20 y miR-21. En una divulgación en particular, el cáncer de pulmón es un adenocarcinoma de pulmón y el al menos un producto génico del miR se selecciona entre el grupo que consiste en let-7a-2.

El nivel del al menos un producto génico del miR se puede medir como se describe en el presente documento (por ejemplo, por RT-PCR semicuantitativa o cuantitativa, análisis de transferencia de Northern, detección de hibridación en solución, análisis por micromatrices). Una alteración en la señal de al menos un miARN en la muestra de ensayo, con respecto a la muestra control es indicativa de que el sujeto o tiene o está en riesgo de desarrollar un cáncer de

pulmón con un pronóstico adverso. En una divulgación en particular, una alteración en la señal de miR-125a, miR-125b-1, miR-224 y/o miR-21 es indicativa de que el sujeto o tiene o está en riesgo de desarrollar un cáncer de pulmón con un pronóstico adverso. En otra divulgación, una alteración de la señal de miR-155 y let-7a-2 en una muestra de un sujeto con adenocarcinoma de pulmón es indicativa de un pronóstico adverso. En cierta divulgación, la micromatriz comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN para uno o más de los miARN seleccionados entre el grupo que consiste en miR-21, miR-191, miR-126\*, miR-210, miR-155, miR-143, miR-205, miR-192-prec, miR-224, miR-126, miR-24-2, miR-30a-5p, miR-212, miR-140, miR-9, miR-214, miR-17-3p, miR-124a-1, miR-218-2, miR-95, miR-145, miR-198, miR-216-prec, miR-219-1, miR-106a, miR-197, miR-192, miR-125a-prec, miR-26a-1-prec, miR-146, miR-203, miR-199b-prec, let-7a-2-prec, miR-27b, miR-32, miR-29b-2, miR-220, miR-33, miR-181c-prec, miR-150, miR-101-1, miR-124a-3, miR-125a y let-7f-1.

También se desvelan procedimientos para el tratamiento del cáncer de pulmón en un sujeto, en el que al menos un producto génico del miR está desregulado (por ejemplo, regulado negativamente, regulado positivamente) en las células cancerosas del sujeto. Cuando al menos un producto génico del miR aislado está regulado negativamente en las células del cáncer de pulmón, el procedimiento comprende la administración de una cantidad eficaz de un producto génico aislado del miR o una variante aislada o un fragmento biológicamente activo del mismo, de forma que se inhiba la proliferación de las células cancerosas en el sujeto. Cuando al menos un producto génico del miR aislado está regulado positivamente en las células cancerosas, el procedimiento comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de al menos un compuesto para inhibir la expresión del al menos un producto génico del miR, de forma que se inhiba la proliferación de las células del cáncer de pulmón.

En una divulgación relacionada, los procedimientos para el tratamiento del cáncer de pulmón en un sujeto comprenden adicionalmente la etapa de determinar en primer lugar la cantidad de al menos un producto génico del miR en las células del cáncer de pulmón del sujeto y comparar ese nivel con el nivel del correspondiente producto génico del miR en las células control. Si la expresión del producto génico del miR está desregulado (por ejemplo, regulado negativamente, regulado positivamente) en las células del cáncer de pulmón, los procedimientos además comprenden la alteración de la cantidad del al menos un producto génico del miR expresado por las células del cáncer de pulmón. En una divulgación, la cantidad del producto génico del miR expresado en las células cancerígenas es menor que la cantidad del producto génico del miR expresado en las células control y se administra al sujeto una cantidad eficaz del producto génico del miR o una variante aislada o un fragmento biológicamente activo del mismo. En otra divulgación, la cantidad del producto génico del miR expresado en las células cancerosas es mayor que la cantidad del producto génico del miR expresado en las células control y se administra al sujeto una cantidad eficaz de al menos un compuesto que inhibe la expresión del al menos un gen miR.

También se desvelan composiciones farmacéuticas para el tratamiento del cáncer de pulmón. En una divulgación, las composiciones farmacéuticas comprenden al menos un producto génico del miR aislado o una variante aislada o un fragmento biológicamente activo del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una divulgación particular, el al menos un producto génico del miR corresponde a un producto génico del miR que tiene un nivel de expresión disminuido en las células del cáncer de pulmón con respecto al de las células control adecuadas. En ciertas divulgaciones el producto génico del miR aislado se selecciona entre el grupo que consiste en miR-126\*, miR-143, miR-192, miR-224, miR-126, miR-30a-5p, miR-140, miR-9, miR-124a-1, miR-218-2, miR-95, miR-145, miR-198, miR-216, miR-219-1, miR-125a, miR-26a-1, miR-199b, let-7a-2, miR-27b, miR-32, miR-29b-2, miR-220, miR-33, miR-181c, miR-101-1, miR-124a-3, let-7f-1 y una combinación de los mismos.

En otra divulgación, las composiciones farmacéuticas de la invención comprenden al menos un compuesto inhibidor de la expresión del miR. En una divulgación particular, el al menos un compuesto inhibidor de la expresión del miR es específico para un producto génico del miR cuya expresión es mayor en las células del cáncer de pulmón que en las células control. En ciertas divulgaciones, el compuesto inhibidor la expresión del miR es específico para uno o más productos génicos del miR seleccionados entre el grupo que consiste en miR-21, miR-191, miR-210, miR-155, miR-205, miR-24-2, miR-212, miR-214, miR-17-3p, miR-106a, miR-197, miR-192, miR-146, miR-203, miR-150 y una combinación de los mismos.

La divulgación también engloba procedimientos para identificar un agente anticáncer de pulmón, que comprenden proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico del miR en la célula. En una divulgación, el procedimiento comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico del miR asociado con niveles de expresión disminuidos en las células del cáncer de pulmón. Un incremento en el nivel del producto génico del miR en la célula, con respecto a una célula control adecuada, es indicativo de que el agente de ensayo es un agente anticáncer de pulmón. En una divulgación particular, el al menos un producto génico del miR asociado con niveles de expresión disminuidos en las células del cáncer de pulmón se seleccionan entre el grupo que consiste en miR-126\*, miR-143, miR-192, miR-224, miR-126, miR-30a-5p, miR-140, miR-9, miR-124a-1, miR-218-2, miR-95, miR-145, miR-198, miR-216, miR-219-1, miR-125a, miR-26a-1, miR-199b, let-7a-2, miR-27b, miR-32, miR-29b-2, miR-220, miR-33, miR-181c, miR-101-1, miR-124a-3, let-7f-1 y una combinación de los mismos.

En otras divulgaciones, el procedimiento comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico del miR asociado con niveles de expresión aumentados en las células del cáncer de pulmón. Un descenso en la célula del nivel del producto génico del miR asociado con niveles de expresión

aumentados en el cáncer de pulmón, con respecto a una célula control adecuada, es indicativo de que el agente de ensayo es un agente anticáncer de pulmón. En una divulgación particular, el al menos un producto génico del miR asociado con niveles de expresión aumentados en las células del cáncer de pulmón se seleccionan entre el grupo que consiste en miR-21, miR-191, miR-210, miR-155, miR-205, miR-24-2, miR-212, miR-214, miR-17-3p, miR-106a, miR-197, miR-192, miR-146, miR-203, miR-150 y una combinación de los mismos.

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

El documento de patente o solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado en color. Las copias de esta publicación de patente o solicitud de patente con dibujos en color se proporcionarán por la Oficina bajo pedido y pago de las tasas necesarias.

La FIG. 1 muestra unos gráficos que representan el nivel de expresión relativa del miR-21 precursor humano (*hsa-mir-21*; paneles superiores), del miR-126\* precursor humano (*hsa-mir-126\**; paneles medios) y del miR-205 precursor humano (*hsa-mir-205*; paneles inferiores) en tejidos con cáncer de pulmón (Ca) y no cancerosos (N), que se determinaron por análisis RT-PCR en tiempo real. Las muestras de cáncer fueron de adenocarcinoma o de carcinoma de células escamosas (SCC). Se llevó a cabo un ensayo t pareado para asegurar la significación estadística entre los niveles de expresión en tejidos de cáncer de pulmón y tejidos no cancerosos de pulmón.

La FIG. 2 representa la expresión de los miARN maduros para miR-21 (*hsa-mir-21*), miR-126\* (*hsa-mir-126\**) y miR-205 (*hsa-mir-205*) en muestras de cáncer de pulmón (es decir, adenocarcinomas (Adeno) y carcinomas de células escamosas (SCC)), detectados por hibridación en solución. Ca representa tejidos cancerosos de pulmón y N representa tejidos de pulmón no cancerosos. El ARNr 5S sirvió como un control de carga.

La FIG. 3A es un dendrograma que representa un agrupamiento jerárquico que se basa en los perfiles de expresión de microARN de 13 líneas celulares de cáncer de pulmón que representan carcinomas de pulmón de células pequeñas (SCLC) y carcinomas de pulmón de células no pequeñas (NSCLC).

La FIG. 3B describe una vista de grupo de la expresión de un miARN de 13 líneas celulares de cáncer de pulmón (arriba), que corresponde a los que se enumeraron en la FIG. 3A. Los niveles de expresión de varios miARN, enumerados a la derecha de la figura, se indican según el color. El azul indica los niveles de expresión por debajo de la media, el negro indica los niveles de expresión que son aproximadamente iguales a la media y el naranja indica los niveles de expresión que son mayores que la media. El gris indica puntos de datos perdidos.

La FIG. 4 es una curva de supervivencia de Kaplan-Meier para pacientes con adenocarcinoma. Los casos de adenocarcinoma en los que la intensidad de hibridación era diferente de los antecedentes (véase el Ejemplo 4) se clasificaron de acuerdo con la expresión de *hsa-mir-155* y los datos de supervivencia se compararon utilizando un ensayo de intervalo logarítmico. La relación de expresión media se define como la relación de expresión media = media de la expresión del tumor / media de la expresión del tejido no canceroso. El grupo de alta expresión del *hsa-mir-155* (es decir, el grupo con una relación de expresión  $\geq$  la relación de expresión media (1,42); n=27) se comparó con los correspondientes tejidos de pulmón no cancerosos. El grupo de baja expresión del *hsa-mir-155* (es decir, el grupo con una relación de expresión  $<$  la relación de expresión media (1,42); n=28) se comparó con los correspondientes tejidos pulmonares no cancerosos. Las relaciones representan la intensidad de la señal de hibridación en la muestra de cáncer de pulmón con respecto a los controles no cancerosos.

La FIG. 5 es una curva de supervivencia de Kaplan-Meier para pacientes con adenocarcinoma. Los casos de adenocarcinoma en los que la intensidad de la hibridación fue diferente del antecedente (véase el Ejemplo 4) se clasificaron de acuerdo con la expresión del *hsa-let-7a-2* y los datos de supervivencia se compararon utilizando un ensayo de intervalo logarítmico. La relación de expresión media se definió como relación de expresión media = media de expresión del tumor / media de la expresión del tejido no canceroso. El grupo de alta expresión del *hsa-let-7a-2* (es decir, el grupo con una relación de expresión  $\geq$  que la relación de expresión media (0,95); n=34) se comparó con los tejidos pulmonares no cancerosos correspondientes. El grupo de baja expresión del *hsa-let-7a-2* (es decir, el grupo con una relación de expresión  $<$  relación de expresión media (0,95); n=18) se comparó con los tejidos pulmonares no cancerosos correspondientes.

La FIG. 6 es una curva de supervivencia de Kaplan-Meier para pacientes con adenocarcinoma. Treinta y dos casos de adenocarcinoma de una cohorte original se clasificaron de acuerdo con la expresión del *hsa-miR-155* precursor y los datos de supervivencia se compararon utilizando un ensayo de intervalo logarítmico. La relación de expresión media se definió como relación de expresión media = media de expresión tumoral / media de expresión del tejido no canceroso. El grupo de expresión alta del precursor *hsa-miR-155* (es decir el grupo con una relación de expresión  $\geq$  que la relación de expresión media (1,19); n=19) se comparó con los tejidos de pulmón no cancerosos correspondientes.

La FIG. 7 es una curva de supervivencia de Kaplan-Meier para pacientes con adenocarcinoma. Treinta y dos casos de adenocarcinoma de una cohorte original se clasificaron de acuerdo con la expresión del precursor del *hsa-let-7a-2* y los datos de supervivencia se compararon utilizando un ensayo de intervalo logarítmico. La relación media de expresión se definió como relación de expresión media = media de la expresión tumoral / media de la expresión del tejido no canceroso. El grupo de expresión alta del precursor del *hsa-let-7a-2* (es decir, el grupo con una relación de

expresión  $\geq$  la relación de expresión media (0,92); n=18) se comparó con los correspondientes tejidos pulmonares no cancerosos. El grupo de expresión baja del *hsa-let-7a-2* precursor (es decir, el grupo con una relación de expresión  $<$  la relación de expresión media (0,92); n=14) se comparó con los correspondientes tejidos pulmonares no cancerosos.

5 La FIG. 8 es una curva de supervivencia de Kaplan-Meier para pacientes con adenocarcinoma. Treinta y dos casos de una cohorte adicional independiente se clasificaron de acuerdo con la expresión del *hsa-mir-155* precursor y los datos de supervivencia se compararon utilizando el ensayo de intervalo logarítmico. El grupo de alta expresión del *hsa-mir-155* precursor (n=14); el grupo de baja expresión del *hsa-mir-155* precursor (n=18).

10 La FIG. 9 es una curva de supervivencia de Kaplan-Meier para pacientes con adenocarcinoma. Treinta y dos casos de adenocarcinoma de una cohorte adicional independiente se clasificaron de acuerdo con la expresión del *hsa-let-7a-2* precursor y los datos de supervivencia se compararon utilizando el ensayo de intervalo logarítmico. El grupo de alta expresión del precursor *hsa-let-7a-2* (n=15); el grupo de baja expresión del precursor *hsa-let-7a-2* (n=17).

15 La FIG. 10 es una curva de supervivencia de Kaplan-Meier para pacientes con adenocarcinoma. Sesenta y cuatro casos de la combinación de 2 cohortes independientes se clasificaron de acuerdo con la expresión del *hsa-mir-155* precursor, estimado por el análisis RT-PCR en tiempo real. Los datos de supervivencia se compararon utilizando el ensayo de intervalo logarítmico. La relación de expresión media se definió como relación de expresión media = media de la expresión tumoral / media de expresión de los tejidos no cancerosos. El grupo de alta expresión del *hsa-mir-155* precursor (es decir el grupo con una relación de expresión  $\geq$  relación de la media de expresión (1,19); n=27) se comparó con los correspondientes tejidos pulmonares no cancerosos. El grupo de baja expresión del *hsa-mir-155* precursor (es decir el grupo con una relación de expresión  $<$  la relación de expresión media (1,19); n=37) se comparó con los correspondientes tejidos tumorales no cancerosos.

25 La FIG. 11 es una curva de supervivencia de Kaplan-Meier para pacientes con adenocarcinoma. Sesenta y cuatro casos de adenocarcinoma de una combinación de 2 cohortes independientes se clasificaron de acuerdo con la expresión del *hsa-let-7a-2* precursor, como se estimó por análisis RT-PCR en tiempo real. Los datos de supervivencia se compararon utilizando el ensayo de intervalo logarítmico. La relación de expresión media se definió como la relación de expresión media = media de la expresión tumoral / media de la expresión de tejido no canceroso. El grupo de alta expresión del *hsa-let-7a-2* precursor (es decir, el grupo con una relación de expresión  $\geq$  relación de expresión media (0,92); n=33) se comparó con los correspondientes tejidos pulmonares no cancerosos. El grupo de baja expresión del *hsa-let-7a-2* precursor (es decir, el grupo con una relación de expresión  $<$  la relación de expresión media (0,92); n=31) se comparó con los correspondientes tejidos pulmonares no cancerosos.

35 La FIG. 12 describe la expresión de ARNm *MYO18B* tras el tratamiento con 5-aza-dC y/o TSA en dos líneas celulares de cáncer de pulmón (H157, A549), como se determinó por análisis RT-PCR. Calle 1, sin tratamiento; Calle 2, tratamiento con 5-aza-dC 1,0  $\mu$ M durante 72 h; Calle 3, tratamiento con TSA 1,0  $\mu$ M durante 24 h; Calle 4, tratamiento con 5-aza-dC 1,0  $\mu$ M durante 72 horas, seguido por tratamiento con TSA 1,0  $\mu$ M durante 24 h. La expresión de *GAPDH* sirvió como control de carga.

### **Descripción detallada de la invención**

La presente invención se basa, en parte, en la identificación de microARN particulares que tienen alterada la expresión en células de cáncer de pulmón con respecto a células normales de control y en la asociación de estos microARN con características diagnósticas, pronósticas y terapéuticas particulares.

40 Como se usa en el presente documento de manera intercambiable, un "producto génico del miR", "microARN", "miR" o "miARN" se refiere al ARN procesado o sin procesar transcrito a partir de un gen miR. Como los productos génicos del miR no se traducen en proteínas, la expresión "productos génicos del miR" no incluye proteínas. El gen miR transcrito no procesado también se llama "miR precursor" y normalmente comprende un ARN transcrito de una longitud aproximada de 70-100 nucleótidos. El miR precursor se puede procesar por digestión con ARNasa (por ejemplo, Dicer, Argonaut, ARNasa III (por ejemplo ARNasa III de *E. coli*)) en una molécula de ARN activa con 19-25 nucleótidos. Esta molécula activa de ARN de 19-25 nucleótidos también se llama gen transcrito de miR "procesado" o miARN "maduro".

50 La molécula activa de ARN con 19-25 nucleótidos se pueden obtener a partir del miR precursor por medio de rutas de procesamiento natural (por ejemplo, utilizando células intactas o lisados celulares) o por rutas de procesamiento sintético (por ejemplo utilizando enzimas de procesamiento aisladas, tales como Dicer, Argonaut o ARNasa III aisladas). Se entiende que la molécula activa de ARN de 19-25 nucleótidos también se puede producir directamente por síntesis biológica o química, sin tener que procesarse a partir del miR precursor. Cuando en el presente documento se llama a un microARN por su nombre, el nombre corresponde tanto a la forma de precursor como a la madura, a menos que se indique otra cosa.

55 La presente invención engloba procedimientos para diagnosticar si un sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, comprendiendo la medición del nivel de al menos un producto génico del miR en una muestra de ensayo del sujeto y comparando el nivel del producto génico del miR en la muestra de ensayo con el nivel del correspondiente producto génico del miR en una muestra de control. Como se utiliza en el presente documento, un

“sujeto” puede ser cualquier mamífero que tenga o sea sospechoso de tener un cáncer de pulmón.

El cáncer de pulmón puede ser cualquier forma de cáncer de pulmón, por ejemplo, cánceres de pulmón de diferentes histologías (por ejemplo, adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas). Además, el cáncer de pulmón se puede asociar con un pronóstico particular (por ejemplo, tasa baja de supervivencia, progresión rápida).

- 5 Las Tablas 1a y 1b describen las secuencias de nucleótidos de microARN humanos precursores y maduros.

Tabla 1a- Secuencias de precursores de microARN humano

Nombre del Precursor	Secuencia (de 5' a 3')*	SEC ID N°
<i>let-7a-1</i>	<b>CACUGUGGG<u>AUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUU</u> AGGGUCACACCCACCACUGGGAGUAACUAUACA AUCUACUGUCUUCCUAACGUG</b>	1
<i>let-7a-2</i>	<b>AGGUUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUAGAAUUA CAUCAAGGGAGUAACUGUACAGCCUCCUAGCUU UCCU</b>	2
<i>let-7a-3</i>	<b>GGGUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUUGGGGCUCU GCCUGCUAUGGGUAACUAUACAAUCUACUGUC UUCCU</b>	3
<i>let-7a-4</i>	<b>GUGACUGCAUGCUC<b>CCAGGUUGAGGUAGUAGGUU</b> <b>GU</b>AUAGUUAGAAUACACAAGGGAGUAACUGU ACAGCCUCCUAGCUUCCUUGGGUCUUGCACUAA ACAAC</b>	4
<i>let-7b</i>	<b>GGCGGGGUGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUUUCAGG GCAGUGAUGUUGCCCCUCGGAAGUAACUAUACA ACCUACUGCCUCCCUG</b>	5
<i>let-7c</i>	<b>GCAUCCGGGUUGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUUUA GAGUUACACCCUGGGAGUUAACUGUACAACCUUC UAGCUUCCUUGGAGC</b>	6
<i>let-7d</i>	<b>CCUAGGAAGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUUUUAGG GCAGGGAUUUUGCCCACAAGGAGGUAAACUAUACG ACCUGCUGCCUUCUAGG</b>	7
<i>let-7d-v1</i>	<b>CUAGGAAGAGGUAGUAGUUUGCAUAGUUUUAGGG CAAAGAUUUUGCCCACAAGUAGUUAGCUAUACGA CCUGCAGCCUUUUGUAG</b>	8
<i>let-7d-v2</i>	<b>CUGGCUGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUUGGUCGGG UUGUGACAUUGCCCGCUGUGGAGUAACUGCGCA AGCUACUGCCUUGCUG</b>	9
<i>let-7e</i>	<b>CCCGGGCUGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUUGAGGA GGACACCCAAGGAGAUACUAUACGGCCUCCUAG CUUCCCCAGG</b>	10

<i>let-7f-1</i>	UCAGAGUGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUUGUGGGG UAGUGAUUUUACCCUGUUCAGGAGAUAAACUAUAC AAUCUAUUGCCUCCUGA	11
<i>let-7f-2-1</i>	CUGUGGGAUGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUUGUGG GGUAGUGAUUUUACCCUGUUCAGGAGAUAAACUAU ACAAUCUAUUGCCUCCUGA	12
<i>let-7f-2-2</i>	CUGUGGGAUGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUUUUAG GGUCAUACCCCAUCUUGGAGAUAAACUAUACAGUC UACUGUCUUUCCACGG	13
<i>let-7g</i>	UUGCCUGAUUCCAGGCUGAGGUAGUAGUUUGUAC AGUUUGAGGGUCUAUGAUACCACCCGGUACAGGA GAUAAUCUGUACAGGCCACUGCCUUGCCAGGAACA GCGCGC	14
<i>let-7i</i>	CUGGCUGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUUGGUCGGG UUGUGACAUUGCCCUGCUGUGGAGAUAAACUGCGCA AGCUACUGCCUUGCUG	15
<i>miR-1b-1-1</i>	ACCUACUCAGAGUACAUAUCUUCUUUAUGUACCCA UAUGAACAUACAAUGCUAUGGAAUGUAAAGAAGU AUGUAUUUUUGGUAGGC	16
<i>miR-1b-1-2</i>	CAGCUAACAACUUAGUAAUACCUACUCAGAGUAC AUACUUCUUUAUGUACCCAUAUGAACAUACAAUG CUAUGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAUUUUUGGUAG GCAAUA	17
<i>miR-1b-2</i>	GCCUGCUUGGGAAACAUAUCUUCUUUAUAUGCCCA UAUGGACCUGCUAAGCUAUGGAAUGUAAAGAAGU AUGUAUCUCAGGCCGGG	18
<i>miR-1b</i>	UGGGAAACAUAUCUUCUUUAUAUGCCCAUAUGGAC CUGCUAAGCUAUGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAUC UCA	19
<i>miR-1d</i>	ACCUACUCAGAGUACAUAUCUUCUUUAUGUACCCA UAUGAACAUACAAUGCUAUGGAAUGUAAAGAAGU AUGUAUUUUUGGUAGGC	20
<i>miR-7-1a</i>	UGGAUGUUGGCCUAGUUCUGUGUGGAAGACUAGU GAUUUUGUUGUUUUUAGAUAAACUAAAUCGACAAC AAAUCACAGUCUGCCAUAUGGCACAGGCCAUGCC UCUACA	21
<i>miR-7-1b</i>	UUGGAUGUUGGCCUAGUUCUGUGUGGAAGACUAG UGAUUUUGUUGUUUUUAGAUAAACUAAAUCGACAA CAAUCACAGUCUGCCAUAUGGCACAGGCCAUGC CUCUACAG	22

<i>miR-7-2</i>	<u>CUGGAUACAGAGUGGACCGGCUGGCCCCCAUCUGG</u> <u>AAGACUAGUGAUUUUGUUGUUCUACUGCGCU</u> CAACAACAAAUCCCAGUCUACC <sup>U</sup> AAUGGUGCCAG CCAUCGCA	23
<i>miR-7-3</i>	<u>AGAUUAGAGUGGCUGUGGUCUAGUGCUGUGUGGA</u> <u>AGACUAGUGAUUUUGUUGUUCUGAUGUACUACGA</u> CAACAAGUCACAGCCGGCCUCAUAGCGCAGACUCC CUUCGAC	24
<i>miR-9-1</i>	<u>CGGGGUUGGUUGUUAUCUUUGGUUAUCUAGCUGU</u> <u>AUGAGUGGUGUGGAGUCUUCAUAAAGCUAGAUAA</u> CCGAAAGUAAAAUAACCCCA	25
<i>miR-9-2</i>	<u>GGAAGCGAGUUGUUAUCUUUGGUUAUCUAGCUGU</u> <u>AUGAGUGUAUUGGUCUUCAUAAAGCUAGAUAA</u> <u>GAAAGUAAAAACUCCUUCA</u>	26
<i>miR-9-3</i>	<u>GGAGGCCCGUUUCUCUCUUUGGUUAUCUAGCUGU</u> <u>AUGAGUGCCACAGAGCCGUCAUAAAGCUAGAUAA</u> CCGAAAGUAGAAAUGAUUCUCA	27
<i>miR-10a</i>	<u>GAUCUGUCUGUCUUCUGUAUAUACCCUGUAGAUC</u> <u>CGAAUUUGUGUAAGGAAUUUUGUGGUCACAAAUU</u> CGUAUCUAGGGGAAUAUGUAGUUGACAUAACAC UCCGCUCU	28
<i>miR-10b</i>	<u>CCAGAGGUUGUAACGUUGUCUAUAUAUACCCUGU</u> <u>AGAACC<sup>G</sup>AAUUUGUGUGGUUAUCCGUUAUAGUCACA</u> GAUUCGAUUCUAGGGGAAUAUAUGGUCGAUGCAA AAACUUCA	29
<i>miR-15a-2</i>	<u>GCGCGAAUGUGUGUUUAAAAAAAAAUAAAACCUUG</u> <u>GAGUAAAGUAGCAGCACAUAAUGGUUUUGUGGAUU</u> UUGAAAAGGUGCAGGCCAUUUGUGCUGCCUCA AAAUAC	30
<i>miR-15a</i>	<u>CCUUGGAGUAAAGUAGCAGCACAUAAUGGUUUUGU</u> <u>GGAUUUUGAAAAGGUGCAGGCCAUUUGUGCUGC</u> CUCAAAAAUACAAGG	31
<i>miR-15b-1</i>	<u>CUGUAGCAGCACAUCAUGGUUUACAUGCUACAGU</u> CAAGAUGCGAAUCAUUAUUUGCUGCUCUAG	32
<i>miR-15b-2</i>	<u>UUGAGGCCUUAAGUACUGUAGCAGCACAUCAUG</u> <u>GUUUACAUGCUACAGUCAAGAUGCGAAUCAUUAU</u> UUGCUGCUCUAGAAAUUUAAGGAAAUUCAU	33
<i>miR-16-1</i>	<u>GUCAGCAGUGCCUAGCAGCACGUAAAUAUUGGC</u> <u>GUUAAGAUUCUAAAAUUAUCUCCAGUAUUAACUG</u> UGCUGCUGAAGUAAGGUUGAC	34

<i>miR-16-2</i>	<u>GUUCCACUCUAGCAGCACGUAAAUAUUGGCGUAG</u> <u>UGAAAUAUAUAUUAACACCAAUAUUACUGUGCU</u> <u>GCUUUAGUGUGAC</u>	35
<i>miR-16-13</i>	<u>GCAGUGCCUJAGCAGCACGUAAAUAUUGGCGUUA</u> <u>AGAUUCUAAAAUUAUCUCCAGUAUUAACUGUGCU</u> <u>GCUGAAGUAAGGU</u>	36
<i>miR-17</i>	<u>GUCAGAAUA AUGUCA AAGUGCUUACAGUGCAGGU</u> <u>AGUGAU AUGUGCAUCUACUGCAGUGAAGGCACUU</u> <u>GUAGCAUUAUGGUGAC</u>	37
<i>miR-18</i>	<u>UGUUCUAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAGUGAAGU</u> <u>AGAUUAGCAUCUACUGCCCUAAGUGCUCCUUCUG</u> <u>GCA</u>	38
<i>miR-18-13</i>	<u>UUUUUGUUCUAAGGUGCAUCUAGUGCAGAUAGUG</u> <u>AAGUAGAUUAGCAUCUACUGCCCUAAGUGCUCCU</u> <u>UCUGGCAUAAGAA</u>	39
<i>miR-19a</i>	<u>GCAGUCCUCUGUAGUUUUGCAUAGUUGCACUAC</u> <u>AAGAAGAAUGUAGUUGUGCAAUCUAUGCAAAAC</u> <u>UGAUGGUGGCCUGC</u>	40
<i>miR-19a-13</i>	<u>CAGUCCUCUGUAGUUUUGCAUAGUUGCACUACA</u> <u>AGAAGAAUGUAGUUGUGCAAUCUAUGCAAAACU</u> <u>GAUGGUGGCCUG</u>	41
<i>miR-19b-1</i>	<u>CACUGUUCUAUGGUUAGUUUUGCAGGUUUGCAUC</u> <u>CAGCUGUGUGAUAUUCUGCUGUGCAAUCCAUGC</u> <u>AAACUGACUGUGGUAGUG</u>	42
<i>miR-19b-2</i>	<u>ACAUUGCUCUACUACA AUUAGUUUUGCAGGUUUGC</u> <u>AUUUCAGCGUAUAUAUGUAUAUGUGGCUGUGCAA</u> <u>AUCCAUGCAAACUGAUUGUGAUAAUGU</u>	43
<i>miR-19b-13</i>	<u>UUCUAUGGUUAGUUUUGCAGGUUUGCAUCCAGCU</u> <u>GUGUGAUAUUCUGCUGUGCAAUCCAUGCAAAC</u> <u>UGACUGUGGUAG</u>	44
<i>miR-19b-X</i>	<u>UUACAAUJAGUUUUGCAGGUUUGCAUUUCAGCGU</u> <u>AUAUAUGUAUAUGUGGCUGUGCAAUCCAUGCAA</u> <u>AACUGAUUGUGAU</u>	45
<i>miR-20 (miR-20a)</i>	<u>GUAGCACUAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAGUGUU</u> <u>UAGUUAUCUACUGCAUUAUGAGCACUAAAGUAC</u> <u>UGC</u>	46
<i>miR-21</i>	<u>UGUCGGGUAGCUUAUCAGACUGAUGUUGACUGUU</u> <u>GAAUCUCAUGGCAACACCAGUCGAUGGGCUGUCU</u> <u>GACA</u>	47

<i>miR-21-17</i>	ACCUUGUCGGGUAGCUUAUCAGACUGAUGUUGAC UGUUGAAUCUCAUGGCAACACCAGUCGAUGGGCU GUCUGACAUUUUG	48
<i>miR-22</i>	GGCUGAGCCGCAGUAGUUCUUCAGUGGCAAGCUU UAUGUCCUGACCCAGCUAAAGCUGCCAGUUGAAG AACUGUUGCCCUCUGCC	49
<i>miR-23a</i>	GGCCGGCUGGGGUUCCUGGGGAUUGGAUUUGCUU CCUGUCACAAUUCACAUUGCCAGGGAUUCCAAC CGACC	50
<i>miR-23b</i>	CUCAGGUGCUCUGGCUGCUUGGGUUCCUGGCAUG CUGAUUUGUGACUUAAGAUUAAAUCACAUUGCC AGGGAUUACCACGCAACCACGACCUUGGC	51
<i>miR-23-19</i>	CCACGGCCGGCUGGGGUUCCUGGGGAUUGGAUUU GCUUCCUGUCACAAUUCACAUUGCCAGGGAUUUC CAACCGACCCUGA	52
<i>miR-24-1</i>	CUCCGGUGCCUACUGAGCUGAUUUCAGUUCUCAU UUUACACACUGGCUCAGUUCAGCAGGAACAGGAG	53
<i>miR-24-2</i>	CUCUGCCUCCCGUGCCUACUGAGCUGAAACACAGU UGGUUUGUGUACACUGGCUCAGUUCAGCAGGAAC AGGG	54
<i>miR-24-19</i>	CCUGGGCUCUGCCUCCCGUGCCUACUGAGCUGAA ACACAGUUGGUUUGUGUACACUGGCUCAGUUCAG CAGGAACAGGGG	55
<i>miR-24-9</i>	CCUCCGGUGCCUACUGAGCUGAUUUCAGUUCUC AUUUUACACACUGGCUCAGUUCAGCAGGAACAGC AUC	56
<i>miR-25</i>	GGCCAGUGUUGAGAGGCGGAGACUUGGGCAAUUG CUGGACGCUGCCCUGGGCAUUGCACUUGUCUCGG UCUGACAGUGCCGGCC	57
<i>miR-26a</i>	AGGCCGUGGCCUCGUUCAAGUAAUCCAGGAUAGG CUGUGCAGGUCCCAUGGGCCUAUCUUGGUUACUU GCACGGGGACGCGGGCCU	58
<i>miR-26a-1</i>	GUGGCCUCGUUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCUGU CAGGUCCCAUGGGCCUAUUCUUGGUUACUUGC CGGGGACGC	59
<i>miR-26a-2</i>	GGCUGUGGCUGGAUUCAAGUAAUCCAGGAUAGGC UGUUUCCAUCUGUGAGGCCUAUUCUUGAUUACUU GUUUCUGGAGGCAGCU	60

<i>miR-26b</i>	CCGGGACCCAGU <u>UCAAGUAAUUCAGGAUAGGUUG</u> UGUGCUGUCCAGCCUGUUCUCCA <u>UACUUGGCUC</u> GGGGACCGG	61
<i>miR-27a</i>	CUGAGGAGCAGGGCUUAGCUGCUUGUGAGCAGGG UCCACACCAAGUCGUGU <u>UCACAGUGGCUAAGUUC</u> CGCCCCCAG	62
<i>miR-27b-1</i>	AGGUGCAGAGCUUAGCUGAUUGGUGAACAGUGAU UGGUUCCGCUUUGU <u>UCACAGUGGCUAAGUUCUG</u> CACCU	63
<i>miR-27b-2</i>	ACCUCUCUAACAAGGUGCAGAGCUUAGCUGAUUG GUGAACAGUGAUUGGUUCCGCUUUGU <u>UCACAGU</u> GGCUAAGUUCUGCACCUGAAGAGAAGGUG	64
<i>miR-27-19</i>	CCUGAGGAGCAGGGCUUAGCUGCUUGUGAGCAGG GUCCACACCAAGUCGUGU <u>UCACAGUGGCUAAGUU</u> CCGCCCCCAGG	65
<i>miR-28</i>	GGUCCUUGCCCUCAAGGAGCUCACAGUCUAUUGA GUUACCUUUCUGACU <u>UCCACUAGAUUGUGAGC</u> UCCUGGAGGGCAGGCACU	66
<i>miR-29a-2</i>	CCUUCUGUGACCCCUUAGAGGAUGACUGAUUUCU UUUGGUGUUCAGAGUCAAUAAU <u>UUUCUAGCAC</u> <u>CAUCUGAAAUCGGUU</u> AUAAUGAUUGGGGAAGAGC ACCAUG	67
<i>miR-29a</i>	AUGACUGAUUUCU <u>UUGGUGUUCAGAGUCAAUAU</u> AAU <u>UUUCUAGCACCAUCUGAAAUCGGUU</u> AU	68
<i>miR-29b-1</i>	CUUCAGGAAGCUGGUUUCAUAUGGUGGUUUAGAU UUAAAUAGUGAUUGUCUAGCACCAU <u>UUGAAAUCA</u> GUGUUCUUGGGGG	69
<i>miR-29b-2</i>	CUUCUGGAAGCUGGUUUCACAUGGUGGC <u>UUAGAU</u> UUUCCAUCUUGUAUCUAGCACCAU <u>UUGAAAUC</u> AGUGU <u>UUUAGGAG</u>	70
<i>miR-29c</i>	ACCACUGGCCCAUCUCUACACAGGCUGACCGAUU UCUCCUGGUGUUCAGAGUCUGUUUUUGUCUAGCA <u>CAUUUGAAAUCGGUU</u> AUGAUGUAGGGGGAAAAG CAGCAGC	71
<i>miR-30a</i>	GCGACUGUAAACA <u>UCCUCGACUGGAAGCUGUGAA</u> GCCACAGAUGGGCU <u>UUCAGUCGGAUGUUUGCAGC</u> UGC	72
<i>miR-30b-1</i>	AUGUAAACA <u>UCCUACACUCAGCUGUAAUACAUGG</u> AUUGGCUGGGAGGUGGAUGUUACGU	73

<i>miR-30b-2</i>	<u>ACCAAGUUUCAGUUCAUGUAAACAUCCUACACUC</u> <u>AGCUGUAAUACAUGGAUUGGCUGGGAGGUGGAUG</u> UUUACUUCAGCUGACUUGGA	74
<i>miR-30c</i>	<u>AGAUACUGUAAACAUCCUACACUCUCAGCUGUGG</u> AAAGUAAGAAAGCUGGGAGAAGGCUGUUUACUCU UUCU	75
<i>miR-30d</i>	<u>GUUGUUGUAAACAUCCCGACUGGAAGCUGUAAG</u> ACACAGCUAAGCUUUCAGUCAGAUGUUUGCUGCU AC	76
<i>miR-30e</i>	<u>CUGUAAACAUCCUUGACUGGAAGCUGUAAGGUGU</u> UCAGAGGAGCUUUCAGUCGGAUGUUUACAG	77
<i>miR-31</i>	<u>GGAGAGGAGGCAAGAUGCUGGCAUAGCUGUUGAA</u> CUGGGAACCUGCUAUGCCAACAUAUUGCCAUCUU UCC	78
<i>miR-32</i>	<u>GGAGAUUUGCACAUUACUAAGUUGCAUGUUGUC</u> ACGGCCUCAUUGCAAUUUAGUGUGUGUGAUUUU UC	79
<i>miR-33b</i>	<u>GGGGCCGAGAGAGGCGGGCGGCCCCGCGGUGCA</u> <u>UUGCUGUUGCAUUGCACGUGUGAGGGCGGGUGC</u> AGUGCCUCGGCAGUGCAGCCCGGAGCCGGCCCCUG GCACCAC	80
<i>miR-33b-2</i>	<u>ACCAAGUUUCAGUUCAUGUAAACAUCCUACACUC</u> <u>AGCUGUAAUACAUGGAUUGGCUGGGAGGUGGAUG</u> UUUACUUCAGCUGACUUGGA	81
<i>miR-33</i>	<u>CUGUGGUGCAUUGUAGUUGCAUUGCAUGUUCUGG</u> UGGUACCCAUGCAAUGUUUCCACAGUGCAUCACA G	82
<i>miR-34-a</i>	<u>GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUA</u> <u>GCUGGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUC</u> AGCAAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGCACGUUG UGGGGCCC	83
<i>miR-34-b</i>	<u>GUGCUCGGUUUGUAGGCAGUGUCAUUAGCUGAUU</u> <u>GUACUGUGGUGGUUACAAUCACUAACUCCACUGC</u> CAUCAAAACAAGGCAC	84
<i>miR-34-c</i>	<u>AGUCUAGUUACUAGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUG</u> CUAAUAGUACCAAUCACUAACCACACGGCCAGGU AAAAGAUAU	85
<i>miR-91-13</i>	<u>UCAGAAUAAUGUCAAAAGUGCUUACAGUGCAGGUA</u> <u>GUGAUUAGUGCAUCUACUGCAGUGAAGGCACUUG</u> UAGCAUUAUGGUGA	86

<i>miR-92-1</i>	<u>CUUUCUACACAGGUUGGGAU</u> <u>CGGUUGCAAUGCUG</u> <u>UGUUUCUGUAUGGUAUUGCACUUGUCCCGGCCUG</u> <u>UUGAGUUUGG</u>	87
<i>miR-92-2</i>	<u>UCAUCCCUGGGUGGGGAUUUGUUGCAUUACUUGU</u> <u>GUUCUAUAUAAAGUAUUGCACUUGUCCCGGCCUG</u> <u>UGGAAGA</u>	88
<i>miR-93-1 (miR-93-2)</i>	<u>CUGGGGGCUCCA</u> <u>AAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAGU</u> <u>GUGAUUACCCAACCUACUGCUGAGCUAGCACUUC</u> <u>CCGAGCCCCCGG</u>	89
<i>miR-95-4</i>	<u>AACACAGUGGGCACUCAAUAAAUGUCUGUUGAAU</u> <u>UGAAAUGCGUACA<u>UUC</u>AACGGGU<u>AUUUAUUGAG</u></u> <u>CACCCACUCUGUG</u>	90
<i>miR-96-7</i>	<u>UGGCCGAUUUUGGCACUAGCACAUUUUUGCUUGU</u> <u>GUCUCUCCGCUCUGAGCAAUCAUGUGCAGUGCCA</u> <u>AUAUGGGAAA</u>	91
<i>miR-97-6 (miR-30*)</i>	<u>GUGAGCGACUGUAAACA</u> <u>UCCUCGACUGGAAGCUG</u> <u>UGAAGCCACAGAUGGGCUUUCAGUCGGAUGUUUG</u> <u>CAGCUGCCUACU</u>	92
<i>miR-98</i>	<u>GUGAGGUAGUAAGUUGUAUUGUUGUGGGGUAGGG</u> <u>AUAUUAGGCCCCAAUJAGAAGAUAAUAUACAAC</u> <u>UUACUACUUCC</u>	93
<i>miR-99b</i>	<u>GGCACCCACCCGUAGA</u> <u>ACCGACCUUGCGGGGCCUU</u> <u>CGCCGCACACAAGCUCGUGUCUGUGGGUCCGUGU</u> <u>C</u>	94
<i>miR-99a</i>	<u>CCCAUUGGCAUAAACCCGUAGA</u> <u>UCCGAUCUUGUG</u> <u>GUGAAGUGGACCGCACAAAGCUCGCUUCUAUGGGU</u> <u>CUGUGUCAGUGUG</u>	95
<i>miR-100-1/2</i>	<u>AAGAGAGAAGAUAUUGAGGCCUGUUGCCACAAAC</u> <u>CCGUAGA</u> <u>UCCGAACUUGUGGU</u> <u>AUUAGUCCGCACA</u> <u>AGCUUGUAUCUAUAGGU</u> <u>AUGUGUCUGUUAGGCAA</u> <u>UCUCAC</u>	96
<i>miR-100-11</i>	<u>CCUGUUGCCACAAACCCGUAGA</u> <u>UCCGAACUUGUG</u> <u>GUAUUAGUCCGCACAAGCUUGUAUCUAUAGGU</u> <u>AU</u> <u>GUGUCUGUUAGG</u>	97
<i>miR-101-1/2</i>	<u>AGGCUGCCCUGGCUCAGUUAUCACAGUGCUGAUG</u> <u>CUGUCUAUUCUAAAGGU</u> <u>ACAGUACUGUGAUAAAU</u> <u>GAAGGAUGGCAGCCAUCU</u> <u>UACCUUCCAUCAGAGG</u> <u>AGCCUCAC</u>	98
<i>miR-101</i>	<u>UCAGUUAUCACAGUGCUGAUGCUGUCCAUCUAA</u> <u>AGGUACAGUACUGUGAUAAACUGA</u>	99

<i>miR-101-1</i>	UGCCCUGGCUCAGUUAUCACAGUGCUGAUGCUGU CUAUUCUAAAGGUACAGUACUGUGAUAACUGAAG GAUGGCA	100
<i>miR-101-2</i>	ACUGUCCUUUUUCGGUUAUCAUGGUACCGAUGCUGU GUUAUAUCUGAAAGGUACAGUACUGUGAUAACUGA AGAAUGGUGGU	101
<i>miR-101-9</i>	UGUCCUUUUUCGGUUAUCAUGGUACCGAUGCUGU AUUAUCUGAAAGGUACAGUACUGUGAUAACUGAAG AAUGGUG	102
<i>miR-102-1</i>	CUUCUGGAAGCUGGUUUCACAUGGUGGCCUUAGAU UUUUCCAUCUUUGUAUCUAGCACCAUUUGAAAUC AGUGUUUUAGGAG	103
<i>miR-102-7.1</i> ( <i>miR-102-7.2</i> )	CUUCAGGAAGCUGGUUUCAUUAUGGUGGUUUAGAU UUAAAUAGUGAUUGUCUAGCACCAUUUGAAAUCA GUGUUCUUGGGGG	104
<i>miR-103-2</i>	UUGUGCUUUCAGCUUCUUUACAGUGCUGCCUUGU AGCAUUCAGGUC AAGCAACAUUGUACAGGGCUAU GAAAGAACCA	105
<i>miR-103-1</i>	UACUGCCCUCGGCUUCUUUACAGUGCUGCCUUGU UGCAUAUGGAUCAAGCAGCAUUGUACAGGGCUAU GAAGGCAUUG	106
<i>miR-104-17</i>	AAAUGUCAGACAGCCCAUCGACUGGUGUUGCCAU GAGAUUCAACAGUCAACAUCAGUCUGAUAAGCUA CCCGACAAGG	107
<i>miR-105-1</i>	UGUGCAUCGUGGUCAA AUGCUCAGACUCCUGUGG UGGCUGCUC AUGCACCACGGAUGUUUGAGCAUGU GCUACGGUGUCUA	108
<i>miR-105-2</i>	UGUGCAUCGUGGUCAA AUGCUCAGACUCCUGUGG UGGCUGCUC AUGCACCACGGAUGUUUGAGCAUGU GCUAUGGUGUCUA	109
<i>miR-106-a</i>	CCUUGGCCAUGUAAAAGUGCUUACAGUGCAGGUA GCUUUUUGAGAUCUACUGCAAUGUAAGCACUUCU UACAUUACCAUGG	110
<i>miR-106-b</i>	CCUGCCGGGGCUAAAAGUGCUGACAGUGCAGAUAG UGGUCCUCUCCGUGCUACCGCACUGUGGGUACUU GCUGCUCCAGCAGG	111
<i>miR-107</i>	CUCUCUGCUUUCAGCUUCUUUACAGUGUUGCCUU GUGGCAUGGAGUUAAGCAGCAUUGUACAGGGCU AUCAAAGCACAGA	112

<i>miR-108-1-pequeño</i>	ACACUGCAAGAACAUAAGGAUUUUUAGGGGCAU UAUGACUGAGUCAGAAAACACAGCUGCCCCUGAA AGUCCCUCAUUUUUCUUGCUGU	113
<i>miR-108-2-pequeño</i>	ACUGCAAGAGCAAUAAGGAUUUUUAGGGGCAUUA UGAUAGUGGAAUGGAAACACAUCUGCCCCAAAA GUCCCUCAUUU	114
<i>miR-122a-1</i>	<u>CCUAGCAGAGCUGUGGAGUGUGACAAUGGUGUU</u> <u>UGUGUCUAAACUAUCAACGCCAUUAUCACACUA</u> AAUAGCUACUGCUAGGC	115
<i>miR-122a-2</i>	<u>AGCUGUGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGUGUCCAA</u> ACUAUCAACGCCAUUAUCACACUAAAUAGCU	116
<i>miR-123</i>	<u>ACAUUAUUACUUUUGGUACGCGCUGUGACACUUC</u> AAACUCGUACCGUGAGUAAUAAUGCGC	117
<i>miR-124a-1</i>	<u>AGGCCUCUCUCUCCGUGUUCACAGCGGACCUUGA</u> <u>UUUAAAUGUCCAUACAAUUAAGGCACGCGGUGAA</u> UGCCAAGAAUGGGGUG	118
<i>miR-124a-2</i>	<u>AUCAAGAUUAGAGGCUCUGCUCUCCGUGUUCACA</u> <u>GCGGACCUUGAUUUAAUGUCAUACAAUUAAGGCA</u> <u>CGCGGUGAAUGCCAAGAGCGGAGCCUACGGCUGC</u> ACUUGAAG	119
<i>miR-124a-3</i>	<u>UGAGGGCCCCUCUGCGUGUUCACAGCGGACCUUG</u> <u>AUUUAAUGUCUUAUACAAUUAAGGCACGCGGUGAA</u> UGCCAAGAGAGGGCGCCUCC	120
<i>miR-124a</i>	<u>CUCUGCGUGUUCACAGCGGACCUUGAUUUAAUGU</u> CUAUACAAUUAAGGCACGCGGUGAAUGCCAAGAG	121
<i>miR-124b</i>	<u>CUCUCCGUGUUCACAGCGGACCUUGAUUUAAUGU</u> CAUACAAUUAAGGCACGCGGUGAAUGCCAAGAG	122
<i>miR-125a-1</i>	<u>UGCCAGUCUCUAGGUCCCUGAGACCCUUUAACCU</u> <u>GUGAGGACAUCCAGGGUCACAGGUGAGGUUCUUG</u> GGAGCCUGGCGUCUGGCC	123
<i>miR-125a-2</i>	<u>GGUCCCUGAGACCCUUUAACCUUGUGAGGACAUCC</u> AGGGUCACAGGUGAGGUUCUUGGGAGCCUGG	124
<i>miR-125b-1</i>	<u>UGCGCUCCUCUCAGUCCCUGAGACCCUAACUUGUG</u> <u>AUGUUUACCGUUUAAAUCCACGGGUUAGGCUCUU</u> GGGAGCUGCGAGUCGUGCU	125
<i>miR-125b-2</i>	<u>ACCAGACUUUCCUAGUCCCUGAGACCCUAACUU</u> <u>GUGAGGUUUUUAGUAACAUCACAAGUCAGGCUC</u> UUGGGACCUAGGCGGAGGGGA	126

<i>miR-126-1</i>	<u>CGCUGGCGACGGGACAUAUAUACUUUUGGUACGC</u> <u>GCUGUGACACUUCAAACUCGUACCGUGAGUAAUA</u> AUGCGCCGUCCACGGCA	127
<i>miR-126-2</i>	<u>ACAUAUAUACUUUUGGUACGCGCUGUGACACUUC</u> AAACUCGUACCGUGAGUAAUAAUGCGC	128
<i>miR-127-1</i>	UGUGAUCACUGUCUCCAGCCUGCUGAAGCUCAGA GGGCUCUGAUUCAGAAAGAUCAUCGGAUCCGUCU GAGCUUGGCUGGUCGGAAGUCUCAUCAUC	129
<i>miR-127-2</i>	CCAGCCUGCUGAAGCUCAGAGGGCUCUGAUUCAG AAAGAUCAUCGGAUCCGUCUGAGCUUGGCUGGUC GG	130
<i>miR-128a</i>	UGAGCUGUUGGAUUCGGGGCCGUAGCACUGUCUG AGAGGUUAACAUAUUCUCACAGUGAACCGGUCUCU UUUCAGCUGCUUC	131
<i>miR-128b</i>	GCCCGGCAGCCACUGUGCAGUGGGAAGGGGGGCC GAUACACUGUACGAGAGUGAGUAGCAGGUCUCAC <u>AGUGAACCGGUCUCUUUCCUACUGUGUCACACU</u> CCUAAUGG	132
<i>miR-128</i>	GUUGGAUUCGGGGCCGUAGCACUGUCUGAGAGGU UUACAUAUUCUCACAGUGAACCGGUCUCUUUUA GC	133
<i>miR-129-1</i>	UGGAUCUUUUUGCGGUCUGGGCUUGCUGUCCUC UCAACAGUAGUCAGGAAGCCCUUACCCCAAAAAG UAUCUA	134
<i>miR-129-2</i>	UGCCCUUCGCGAAUCUUUUUGCGGUCUGGGCUUG <u>CUGUACAUAACUCAAUAGCCGGAAGCCCUUACCCC</u> AAAAGCAUUGCGGAGGGCG	135
<i>miR-130a</i>	UGCUGCUGGCCAGAGCUCUUUUCACAUUGUGCUA CUGUCUGCACCUGUCACUAGCAGUGCAAUGUAA AAGGGCAUUGGCCGUGUAGUG	136
<i>miR-131-1</i>	GCCAGGAGGCGGGGUUGGUUGUUAUCUUUGGUUA UCUAGCUGUAUGAGUGGUGUGGAGUCUUCAUAAA <u>GCUAGAUAAACCGAAAGUAAAAUAACCCCAUACA</u> CUGCGCAG	137
<i>miR-131-3</i>	CACGGCGCGGCAGCGGCACUGGCCUAAGGGAGGCC CGUUUCUCUCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGAGUG CCACAGAGCCGUCAUAAAGCUAGAUAAACCGAAAG UAGAAAUG	138
<i>miR-131</i>	GUUGUUAUCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGAGUGU AUUGGUCUUCAUAAAGCUAGAUAAACCGAAAGUAA AAAC	139

<i>miR-132-1</i>	CCGCCCCCGCGUCUCCAGGGCAACCGUGGCUUUCG AUUGUUACUGUGGGAAACUGGAGGU <u>AA</u> CAGUCUAC AGCCAUGGUCGCCCCGCAGCACGCCACGCGC	140
<i>miR-132-2</i>	GGGCAACCGUGGCUUUCGAUUGUUACUGUGGGAA CUGGAGGU <u>AA</u> CAGUCUACAGCCAUGGUCGCC	141
<i>miR-133a-1</i>	ACAAUGCUUUGCUAGAGCUGGUAAAAUGGAACCA AAUCGCCUCUCAAUGGAUUUGGUC <u>CCCU</u> UCAAC CAGCUGUAGCUAUGCAUUGA	142
<i>miR-133a-2</i>	GGGAGCCAAAUGCUUUGCUAGAGCUGGUAAAAUG GAACCAAUUCGACUGUCCAUGGAUUUGGUC <u>CCC</u> UUCAACCAGCUGUAGCUGUGCAUUGAUGGCGCCG	143
<i>miR-133</i>	GCUAGAGCUGGUAAAAUGGAACCAAUUCGCCUCU UCAAUUGGAUUUGGUC <u>CCCU</u> UCAACCAGCUGUAGC	144
<i>miR-133b</i>	CCUCAGAAGAAAGAUGCCCCUGCUCUGGCUGGU CAAACGGAACCAAGUCCGUCUCCUGAGAGGU <u>UU</u> GGU <u>CCCU</u> UCAACCAGCUACAGCAGGGCUGGCAA UGCCAGUCCUUGGAGA	145
<i>miR-133b-pequeño</i>	GCCCCUGCUCUGGCUGGUCAAACGGAACCAAGUC CGUCUCCUGAGAGGUUUGGUC <u>CCCU</u> UCAACCAG CUACAGCAGGG	146
<i>miR-134-1</i>	CAGGGUGUGUGACUGGUUGACCAGAGGGGCAUGC ACUGUGUUCACCCUGUGGGCCACCUAGUCACCAAC CCUC	147
<i>miR-134-2</i>	AGGGUGUGUGACUGGUUGACCAGAGGGGCAUGCA CUGUGUUCACCCUGUGGGCCACCUAGUCACCAACC CU	148
<i>miR-135a-1</i>	AGGCCUCGCUGUUCUCUAUGGCUUUUUUAUCCUA UGUGAUUUCUACUGCUCACUCAUAUAGGGAUUGGA GCCGUGGCGCACGGCGGGGACA	149
<i>miR-135a-2 (miR-135-2)</i>	AGAUAUUUCACUCUAGUGCUUU <u>AA</u> UGGCUUUUUA UCCUAUGUGAUAGUAAUAAAGUCUCAUGUAGGG AUGGAAGCCAUGAAAUACAUUGUGAAAAUCA	150
<i>miR-135</i>	CUAUGGCUUUUUUAUCCUAUGUGAUUUCUACUGCU CACUCAUAUAGGGAUUGGAGCCGUGG	151
<i>miR-135b</i>	CACUCUGCUGUGGCCUAUGGCUUUUCAUCCUAU GUGAUUGCUGUCCCAAACUCAUGUAGGGCUAAAA GCCAUGGGCUACAGUGAGGGGCGAGCUCC	152
<i>miR-136-1</i>	UGAGCCUCGGAGGACUCCAUUUGUUUGAUGAU GGAUUCUUAUGCUCCAUCAUCGUCUCAAUGAGU CUUCAGAGGGUUCU	153

<i>miR-136-2</i>	<b>GAGGACUCCA<u>UUUGUUUGAUGAUGGAUUCUU</u>AU GCUCCAUCAUCGUCUCAAAUGAGUCUUC</b>	154
<i>miR-137</i>	<b>CUUCGGUGACGGGUA<u>UUCUUGGGUGGAUAAU</u>ACG GAU<u>UACGUUGUUAUUGCUUAAGAAUACGCGU</u>AGU CGAGG</b>	155
<i>miR-138-1</i>	<b>CCCUGGCAUGGUGUGGUGGGGCAGCUGGUGU<u>UGU</u> GAAUCAGGCCGUUGCCA<u>AUCAGAGAACGGCU</u>ACU UCACAACACCAGGGCCACACCACACUACAGG</b>	156
<i>miR-138-2</i>	<b>CGUUGCUGCAGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCGAC GAGCAGCGCAUCCUCU<u>UACCCGGCUAUUUCAC</u>GAC ACCAGGGUUGCAUCA</b>	157
<i>miR-138</i>	<b>CAGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCGACGAGCAGCG CAUCCUCU<u>UACCCGGCUAUUUCACGACACCAG</u>GGU UG</b>	158
<i>miR-139</i>	<b>GUGUAUUCUACAGUGCACGUGUCUCCAGUGUGGC UCGGAGGCUGGAGACGCGGCCCU<u>GUUGGAGUA</u>AC</b>	159
<i>miR-140</i>	<b>UGUGUCUCUCUCUGUGUCCUGCCAGUGGUUUAC CCUAUGGUAGGUUACGUCAUGCUGUUCUACCACA GGGUAGAACCACGGACAGGAUACCGGGGCACC</b>	160
<i>miR-140as</i>	<b>UCCUGCCAGUGGUUUUACCCUAUGGUAGGUUACG UCAUGCUGUUCUACCACAGGGUAGAACCACGGAC AGGA</b>	161
<i>miR-140s</i>	<b>CCUGCCAGUGGUUUUACCCUAUGGUAGGUUACGU CAUGCUGUUCUACCACAGGGUAGAACCACGGACA GG</b>	162
<i>miR-141-1</i>	<b>CGGCCGGCCCUGGGUCCAUCUCCAGUACAGUGU UGGAUGGUCUAAUUGUGAAGCUC<u>CUAACACUGUC</u> UGGUAAAGAUGGCUC<u>CCGGGUGGGUUC</u></b>	163
<i>miR-141-2</i>	<b>GGGUCCAUCUCCAGUACAGUGUUGGAUGGUCUA AUUGUGAAGCUC<u>CUAACACUGUCUGGUAAAGA</u>UG GCCC</b>	164
<i>miR-142</i>	<b>ACCCAUAAGUAGAAAGCACUACUAACAGCACUG GAGGGUGUAGUGU<u>UCCUACUUUAUGGAUG</u></b>	165
<i>miR-143-1</i>	<b>GCGCAGCGCCCUGUCUCCAGCCUGAGGUGCAGUG CUGCAUCUCUGGUCAGUUGGGAGUCUGAGAUGAA GCACUGUAGCUCAGGAAGAGAGAAGUUGUUCUGC AGC</b>	166
<i>miR-143-2</i>	<b>CCUGAGGUGCAGUGCUGCAUCUCUGGUCAGUUGG GAGUCUGAGAUGAAGCACUGUAGCUCAGG</b>	167

<i>miR-144-1</i>	UGGGGCCCUGGCUGGGGAUAUCAUCAUAUACUGUA AGUUUGCGAUGAGACACU <u>ACAGUAUAGAUGAUGU</u> ACUAGUCCGGGCACCCCC	168
<i>miR-144-2</i>	GGCUGGGGAUAUCAUCAUAUACUGUAAGUUUGCGA UGAGACACUACAGUAUAGAUGAUGUACUAGUC	169
<i>miR-145-1</i>	CACCUUGUCCUCACGG <u>UCCAGUUU</u> UCCCAGGAAUC CCU <u>UAGAUGC</u> AAGAUGGGGAU <u>UCCUGGAAU</u> AC UGUUCUUGAGGUCAUGGUU	170
<i>miR-145-2</i>	CUCACGGUCCAGUUU <u>UCCCAGGAAU</u> CCCUAGAU GCUAAGAUGGGGAU <u>UCCUGGAAU</u> ACUGUUCUUG AG	171
<i>miR-146-1</i>	CCGAUGUGUAUCCUCAGCUU <u>UGAGAACUGAAU</u> UC CAUGGGUUGUGUCAGUGUCAGACCUCUGAAUUC AGUUCUUCAGCUGGGGAUAUCUCUGUCAUCGU	172
<i>miR-146-2</i>	AGCUUUGAGAA <u>CUGAAU</u> UCCAUGGGUUGUGUCAG UGUCAGACCUGUGAAUUCAGUUCUUCAGCU	173
<i>miR-147</i>	AAUCUAAAGACAACA <u>UUCUGCACACACACCAGA</u> CUAUGGAAGCCAGUGUGUGGAAU <u>UGCUCUGCUA</u> GAUU	174
<i>miR-148a (miR-148)</i>	GAGGCAAAGUUCUGAGACACUCCGACUCUGAGUA UGAUAGAAGUCAGUGCACUACAGAACUUGUCUC	175
<i>miR-148b</i>	CAAGCACGAUUAGCAUUUGAGGUGAAGUUCUGUU AUACACUCAGGCUGUGGCUCUCUGAAAGU <u>CAGUG</u> CAUCACAGAACUUGUCUCGAAAGCUUUCUA	176
<i>miR-148b-pequeño</i>	AAGCACGAUUAGCAUUUGAGGUGAAGUUCUGUUA UACACUCAGGCUGUGGCUCUCUGAAAGUCAGUGC AU	177
<i>miR-149-1</i>	GCCGGCGCCCGAGCUCUGGC <u>UCCGUGUCUUCACUC</u> CCGUGCUUGUCCGAGGAGGGAGGGAGGGACGGGG GCUGUGCUGGGGCAGCUGGA	178
<i>miR-149-2</i>	GCUCUGGCUCCGUGUCU <u>UCACUCC</u> CGUGCUUGUCC GAGGAGGGAGGGAGGGAC	179
<i>miR-150-1</i>	CUCCCCAUGGCCUGUCUCCCAACCCUUGUACCAG UGCUGGGCUCAGACCUGGUACAGGCCUGGGGGA CAGGGACCUGGGGAC	180
<i>miR-150-2</i>	CCUGUCUCCCAACCCUUGUACCAGUGCUGGGCUC AGACCUGGUACAGGCCUGGGGGACAGGG	181

<i>miR-151</i>	UUUCCUGCCCUCGAGGAGCUCACAGUCUAGUAUG UCUCAUCCCCUACUAGACUGAAGCUCCUUGAGGA CAGG	182
<i>miR-151-2</i>	CCUGUCCUCAAGGAGCUUCAGUCUAGUAGGGGAU GAGACAUACUAGACUGUGAGCUCCUCGAGGGCAG G	183
<i>miR-152-1</i>	UGUCCCCCCCCGGCCCAGGUUCUGUGAUACACUCCG ACUCGGGCUCUGGAGCAGUCAGUGCAUGACAGAA CUUGGGCCCCGGAAGGACC	184
<i>miR-152-2</i>	GGCCCAGGUUCUGUGAUACACUCCGACUCGGGCU CUGGAGCAGUCAGUGCAUGACAGAACUUGGGCCC CGG	185
<i>miR-153-1-1</i>	CUCACAGCUGCCAGUGUCAUUUUUGUGAUCUGCA GCUAGUAUUCUCACUCCAGUUGCAUAGUCACAAA AGUGAUCAUUGGCAGGUGUGGC	186
<i>miR-153-1-2</i>	UCUCUCUCUCCCUCACAGCUGCCAGUGUCAUUGUC <u>ACAAAAGUGAUCAUUGGCAGGUGUGGCUCUGCA</u> UG	187
<i>miR-153-2-1</i>	AGCGGUGGCCAGUGUCAUUUUUGUGAUGUUGCAG CUAGUAAUAUGAGCCCAGUUGCAUAGUCACAAAA GUGAUCAUUGGAAACUGUG	188
<i>miR-153-2-2</i>	CAGUGUCAUUUUUGUGAUGUUGCAGCUAGUAAUA UGAGCCCAGUUGCAUAGUCACAAAAGUGAUCAUU G	189
<i>miR-154-1</i>	GUGGUACUUGAAGAUAGGUUAUCCGUGUUGCCU <u>CGCUUUAUUUGUGACGAAUCAUACACGGUUGACC</u> UAUUUUUCAGUACCAA	190
<i>miR-154-2</i>	GAAGAUAGGUUAUCCGUGUUGCCUUCGCUUUAUU UGUGACGAAUCAUACACGGUUGACCUAUUUUU	191
<i>miR-155</i>	CUGUAAAUUGC UAAUCGUGAUAGGGGUUUUUGCCU CCAACUGACUCCUACAUAUUAGCAUUAACAG	192
<i>miR-156 = miR-157=solapamiento miR-141</i>	CCUAACACUGUCUGGUAAAGAUGGCUCCCGGGUG GGUUCUCUCGGCAGUAACCUUCAGGGAGCCUGA AGACCAUGGAGGAC	193
<i>miR-158-pequeño = miR-192</i>	GCCGAGACCGAGUGCACAGGGCUCUGACCUAUGA <u>AUUGACAGCCAGUGCUCUCGUCUCCCCUCUGGCUG</u> CCAAUCCAUAGGUCACAGGU AUGUUCGCCUCAA UGCCAGC	194

<i>miR-159-1-pequeño</i>	UCCCGCCCCUGUAACAGCAACUCCAUGUGGAAGU GCCACUGGGUCCAGUGGGGCUGCUGUUAUCUGG GGCGAGGGCCA	195
<i>miR-161-pequeño</i>	AAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAAAAAGGAUGAGGU GACUGGUCUGGGCUACGCUAUGCUGCGGCGCUCG GG	196
<i>miR-163-1b-pequeño</i>	CAUUGGCCUCCUAAGCCAGGGAUUGUGGGUUCGA GUCCACCCGGGGUAAAGAAAGGCCGAAUU	197
<i>miR-163-3-pequeño</i>	CCUAAGCCAGGGAUUGUGGGUUCGAGUCCCACCU GGGGUAGAGGUGAAAGUCCUUUUACGGAAUUUU UU	198
<i>miR-162</i>	CAAUGUCAGCAGUGCCU <u>UAGCAGCACGUAAAUAU</u> <u>UGGCGUUAAGA</u> UUCUAAAAUUAUCUCCAGUAUUA ACUGUGCUGCUGAAGUAAGGUUGACCAUACUCUA CAGUUG	199
<i>miR-175-pequeño =miR-224</i>	GGGCUUUC AAGUCACUAGUGGUUCCGUUUAGUAG AUGAUUGUGCAUUGUUUCAAAAUGGUGCCCUAGU GACUACAAAGCCC	200
<i>miR-177-pequeño</i>	ACGCAAGUGUCCUAAGGUGAGCUCAGGGAGCACA GAAACCUCCAGUGGAACAGAAGGGCAAAGCUCU UU	201
<i>miR-180-pequeño</i>	CAUGUGUCACUUUCAGGUGGAGUUUCAAGAGUCC CUUCCUGGUUCACCGUCUCCUUUGCUCUCCACAA C	202
<i>miR-181a</i>	AGAAGGGCUAUCAGGCCAGCCUUCAGAGGACUCC AAGGAACA <u>UUCAACGCUGUCGGUGAGUUUGGGAU</u> UUGAAAAACCACUGACCGUUGACUGUACCUUGG GGUCCUUA	203
<i>miR-181b-1</i>	CCUGUGCAGAGAUUAUUUUUUAAAAGGUCACAAU CAACA <u>UUCAUUGCUGUCGGUGGGUUGAACUGUGU</u> GGACAAGCUCACUGAACAAUGAAUGCAACUGUGG CCCCGCUU	204
<i>miR-181b-2</i>	CUGAUGGCUGCACUCA <u>ACAUAUCAUUGCUGUCGGU</u> <u>GGGUUUGAGUCUGAAUCAACUCACUGAUCAAUGA</u> AUGCAAACUGCGGACCAAACA	205
<i>miR-181c</i>	CGGAAAAUUUGCCAAGGGUUUGGGGGGA <u>ACAUUCA</u> <u>ACCUGUCGGUGAGUUUGGGCAGCUCAGGCAAACC</u> AUCGACCGUUGAGUGGACCCUGAGGCCUGGAAUU GCCAUCCU	206

<i>miR-182-as</i>	<u>GAGCUGCUUGCCUCCCCCGUUUUUGGCAAUGGU</u> <u>AGAACUCACACUGGUGAGGUAACAGGAUCCGGUG</u> <u>GUUCUAGACUUGCCAACUAUGGGGCGAGGACUCA</u> GCCGGCAC	207
<i>miR-182</i>	UUUUUGGCAAUGGUAGAACUCACACUGGUGAGGU AACAGGAUCCGGUGGUUCUAGACUUGCCAACUAU GG	208
<i>miR-183</i>	CCGCAGAGUGUGACUCCUGUUCUGUGUAUGGCAC <u>UGGUAGAAUUCACUGUGAACAGUCUCAGUCAGUG</u> <u>AAUUAACCGAAGGGCCAUA AACAGAGCAGAGACAG</u> AUCCACGA	209
<i>miR-184-1</i>	CCAGUCACGUCCCCUUAUCACUUUCCAGCCCAGC UUUGUGACUGUAAGUGUUGGACGGAGAACUGAUA AGGGUAGGUGAUUGA	210
<i>miR-184-2</i>	CCUUAUCACUUUCCAGCCCAGCUUUGUGACUGU AAGUGUUGGACGGAGAACUGAUAAGGGUAGG	211
<i>miR-185-1</i>	AGGGGGCGAGGGAUUGGAGAGAAAGGCAGUCCU GAUGGUCCCCUCCCCAGGGGCUGGCUUUCCUCUGG UCCUUCUCCUCCA	212
<i>miR-185-2</i>	AGGGAUUGGAGAGAAAGGCAGUCCUGAUGGUCC CCUCCCCAGGGGCUGGCUUUCCUCUGGUCCU	213
<i>miR-186-1</i>	UGC UUGUAACUUCCAAGAAUUCUCCUUUUGGG <u>CUUUCUGGUUUUAUUUAAGCCCAAAGGUGAAUU</u> UUUUGGGAAGUUUGAGCU	214
<i>miR-186-2</i>	ACUUCCAAGAAUUCUCCUUUUGGGCUUUCUGG UUUUAUUUAAGCCCAAAGGUGAAUUUUUUGGGA AGU	215
<i>miR-187</i>	GGUCGGGCUCACCAUGACACAGUGUGAGACUCGG GCUACAACACAGGACCCGGGGCGCUGCUCUGACCC <u>CUCGUGUCUUGUGUUGCAGCCGGAGGGACGCAGG</u> UCCGCA	216
<i>miR-188-1</i>	UGC UCCCUCUCUCACAUCCCUUGCAUGGUGGAGG <u>GUGAGCUUUCUGAAAACCCUCCCAUGCAGGG</u> UUUGCAGGAUGGCGAGCC	217
<i>miR-188-2</i>	UCUCACAUCCCUUGCAUGGUGGAGGGUGAGCUUU CUGAAAACCCUCCCAUGCAGGGUUUGCAGGA	218
<i>miR-189-1</i>	CUGUCGAUUGGACCCGCCUCCGGUGCCUACUGAG <u>CUGAU AUCAGUUCUCAUUUUACACACUGGCUCAG</u> UUCAGCAGGAACAGGAGUCGAGCCCUUGAGCAA	219

<i>miR-189-2</i>	<u>CUCCGGUGCCUACUGAGCUGAUUCAGUUCUCAU</u> UUUACACACUGGCUCAGUUCAGCAGGAACAGGAG	220
<i>miR-190-1</i>	<u>UGCAGGCCUCUGUGUGAU AUGUUUGAUUAUUAG</u> <u>GUUGUUAAUUAAUCCAACUAUAUAUCAAAACAUAU</u> UCCUACAGUGUCUUGCC	221
<i>miR-190-2</i>	<u>CUGUGUGAU AUGUUUGAUUAUUAGGUUGUUAUU</u> UAAUCCAACUAUAUAUCAAAACAUAUUCCUACAG	222
<i>miR-191-1</i>	<u>CGGCUGGACAGCGGGCAACGGAAUCCCAAAGCA</u> <u>GCUGUUGUCUCCAGAGCAUCCAGCUGCGCUUGG</u> AUUUCGUCCCCUGCUCUCCUGCCU	223
<i>miR-191-2</i>	<u>AGCGGGCAACGGAAUCCCAAAGCAGCUGUUGUC</u> UCCAGAGCAUCCAGCUGCGCUUGGAUUUCGUCC CCUGCU	224
<i>miR-192-2/3</i>	<u>CCGAGACCGAGUGCACAGGGCUCUGACCUAUGAA</u> <u>UUGACAGCCAGUGCUCUCGUCUCCCCUCUGGCUGC</u> CAAUCCAUAAGGUCACAGGUAUGUUCGCCUCAU GCCAG	225
<i>miR-192</i>	<u>GCCGAGACCGAGUGCACAGGGCUCUGACCUAUGA</u> <u>AUUGACAGCCAGUGCUCUCGUCUCCCCUCUGGCUG</u> CAAUCCAUAAGGUCACAGGUAUGUUCGCCUCA UGCCAGC	226
<i>miR-193-1</i>	<u>CGAGGAUGGGAGCUGAGGGCUGGGUCUUUGCGGG</u> CGAGAUGAGGGUGUCGGAUCAACUGGCCUACAAA GUCCAGUUCUCGGCCCCCG	227
<i>miR-193-2</i>	<u>GCUGGGUCUUUGCGGGCGAGAUGAGGGUGUCGGA</u> UCAACUGGCCUACAAAGUCCAGU	228
<i>miR-194-1</i>	<u>AUGGUGUUAUCAAGUGUAACAGCAACUCCAUGUG</u> <u>GACUGUGUACCAAUUUCCAGUGGAGAUGCUGUUA</u> CUUUUGAUGGUUACCAA	229
<i>miR-194-2</i>	<u>GUGUAACAGCAACUCCAUGUGGACUGUGUACCAA</u> UUUCCAGUGGAGAUGCUGUUACUUUGAU	230
<i>miR-195-1</i>	<u>AGCUUCCCUGGCUCUAGCAGCACAGAAUAUUGG</u> <u>CACAGGGAAGCGAGUCUGCCAUAUUGGCUGUGC</u> UGCUCAGGCAGGGUGGUG	231
<i>miR-195-2</i>	<u>UAGCAGCACAGAAUAUUGGCACAGGGAAGCGAG</u> UCUGCCAUAUUGGCUGUGCUGCU	232
<i>miR-196-1</i>	<u>CUAGAGCUUGAAUUGGAACUGCUGAGUGAAUUG</u> <u>GUAGUUUCAUGUUGUUGGGCCUGGGUUUCUGAAC</u> ACAACAACAUUAAACCACCCGAUUCACGGCAGUU ACUGCUC	233

<i>miR-196a-1</i>	<u>GUGAAUUAGGUAGUUCAUGUUGUUGGGCCUGGG</u> <u>UUUCUGAACACAACAACAUA</u> <u>AAACCCGAUUC</u> <u>AC</u>	234
<i>miR-196a-2 (miR-196-2)</i>	<u>UGCUCGCUCAGCUGAUCUGUGGCCUUAGGUAGUUU</u> <u>CAUGUUGUUGGGAUUGAGUUUUGAACUCGGCAAC</u> <u>AAGAAACUGCCUGAGUUACAUCAGUCGGUUUUCG</u> <u>UCGAGGGC</u>	235
<i>miR-196</i>	<u>GUGAAUUAGGUAGUUCAUGUUGUUGGGCCUGGG</u> <u>UUUCUGAACACAACAACAUA</u> <u>AAACCCGAUUC</u> <u>AC</u>	236
<i>miR-196b</i>	<u>ACUGGUCGGUGAUUUAGGUAGUUCCUGUUGUUG</u> <u>GGAUCCACCUUUCUCUCGACAGCACGACACUGCCU</u> <u>UCAUUACUUCAGUUG</u>	237
<i>miR-197</i>	<u>GGCUGUGCCGGGUAGAGAGGGCAGUGGGAGGUAA</u> <u>GAGCUCUUCACCCUUCACCACCUUCUCCACCCAGC</u> <u>AUGGCC</u>	238
<i>miR-197-2</i>	<u>GUGCAUGUGUAUGUAUGUGUGCAUGUGCAUGUGU</u> <u>AUGUGUAUGAGUGCAUGCGUGUGGC</u>	239
<i>miR-198</i>	<u>UCAUUGGUCCAGAGGGGAGAUAGGUUCCUGUGAU</u> <u>UUUCCUUCUUCUCUAUAGAAUAAAUGA</u>	240
<i>miR-199a-1</i>	<u>GCCAACCCAGUGUUCAGACUACCUGUUCAGGAGG</u> <u>CUCUCA AUGUGUACAGUAGUCUGCACA</u> <u>UUGGUUA</u> <u>GGC</u>	241
<i>miR-199a-2</i>	<u>AGGAAGCUUCUGGAGA UCCUGCUC CGUCCCA</u> <u>GUGUUCAGACUACCUGUUCAGGACAAUGCCGUUG</u> <u>UACAGUAGUCUGCACA UUGGUUAGACUGGGCAAG</u> <u>GGAGAGCA</u>	242
<i>miR-199b</i>	<u>CCAGAGGACACCUCACUCCGUCUACCCAGUGUUU</u> <u>AGACUAUCUGUUCAGGACUCCCAAUUGUACAGU</u> <u>AGUCUGCACA UUGGUUAGGCUGGGCUGGGUUAGA</u> <u>CCCUCGG</u>	243
<i>miR-199s</i>	<u>GCCAACCCAGUGUUCAGACUACCUGUUCAGGAGG</u> <u>CUCUCA AUGUGUACAGUAGUCUGCACA</u> <u>UUGGUUA</u> <u>GGC</u>	244
<i>miR-200a</i>	<u>GCCGUGGCCAUUCUACUGGGCAGCAUUGGAUGGA</u> <u>GUCAGGUCUCUAAUACUGCCUGGUAAUGAUGACG</u> <u>GC</u>	245
<i>miR-200b</i>	<u>CCAGCUCGGGCAGCCGUGGCCAUUCUACUGGGCA</u> <u>GCAUUGGAUGGAGUCAGGUCUCUAAUACUGCCUG</u> <u>GUA AUGAUGACGGCGGAGCCCUGCACG</u>	246

<i>miR-200c</i>	CCCUCGUCUUACCCAGCAGUGUUUGGGUGCGGUU GGGAGUCUCUAAUACUGCCGGGUA AUGAUGGAGG	247
<i>miR-202</i>	GUUCCUUUUUCCUAUGCAUAUACUUCUUUGAGGA UCUGGCCUAAAGAGGUAUAGGGCAUGGGAAGAUG GAGC	248
<i>miR-203</i>	GUGUUGGGGACUCGCGCGCUGGGUCCAGUGGUUC UUAACAGUUCAACAGUUCUGUAGCGCAAUUGUGA <u>AAUGUUUAGGACCACUAGACCCGGCGGGCGCGGC</u> GACAGCGA	249
<i>miR-204</i>	GGCUACAGUCUUUCUUCUAUGUGACUCGUGGACUU <u>CCCUUUGUCAUCCUAUGCCUGAGAAUAUAUGAAG</u> GAGGCUGGGAAGGCAAAGGGACGUUCAAUUGUCA UCACUGGC	250
<i>miR-205</i>	AAAGAUCCUCAGACAAUCCAUGUGCUUCUCUUGU <u>CCUUCAUUCCACCGGAGUCUGUCUCAUACCCAACC</u> AGA UUCAGUGGAGUGAAGUUCAGGAGGCAUGGA GCUGACA	251
<i>miR-206-1</i>	UGC U U C C C G A G G C C A C A U G C U U C U U U A U A U C C C C A U A U G G A U U A C U U U G C U A U G G A A U G U A A G G A A G U G U G U G G U U C G G C A A G U G	252
<i>miR-206-2</i>	AGGCCACAUGCUUCUUUAUAUCCCCAU AUGGAUU ACUUUGCUAUGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGGUUU U	253
<i>miR-208</i>	UGACGGGCGAGCUUUUGGCCCGGGUUAUACCUGA UGCUCACGU <u>AUAAGACGAGCAAAAAGCUUGUUGG</u> UCA	254
<i>miR-210</i>	ACCCGGCAGUGCCUCCAGGCGCAGGGCAGCCCCUG CCCACCGCACACUGCGCUGCCCCAGACCACUGUG <u>CGUGUGACAGCGGCUGAUCUGUGCCUGGGCAGCG</u> CGACCC	255
<i>miR-211</i>	UCACCUGGCCAUGUGACUUGUGGGCUUCCCUUUG <u>UCAUCCUUCGCCUAGGGCUCUGAGCAGGGCAGGG</u> ACAGCAAAGGGGUGCUCAGUUGUCACUCCCACA GCACGGAG	256
<i>miR-212</i>	CGGGGCACCCCGCCCGGACAGCGCGCCGGCACCUU GGCUCUAGACUGCUUACUGCCCGGGCCGCCUCAG <u>U AACAGUCUCCAGUCACGGCCACCGACGCCUGGCC</u> CCGCC	257

<i>miR-213-2</i>	CCUGUGCAGAGAUUAUUUUUAAAAGGUCACAAU CAACA <u>UUCAUUGCUGUCGGUGGGUUGAACUGUGU</u> GGACAAGCUCACUGAACAAUGAAUGCAACUGUGG CCCCGCUU	258
<i>miR-213</i>	GAGUUUUGAGGGUUGCUCAGUGAACAUUCAACGC UGUCGGUGAGUUUGGAAUUAAA <u>UCAAACAUC</u> <u>GACCGUUGAUUGUACCCUAUGGCUAACCAUCAUC</u> UACUCC	259
<i>miR-214</i>	GGCCUGGCUGGACAGAGUUGUCAUGUGUCUGCCU GUCUACACUUGCUGUGCAGAACA <u>UCCGCUCACCU</u> GUACAGCAGGCACAGACAGGCAGUCACAUGACAA CCAGCCU	260
<i>miR-215</i>	AUCAUUCAGAAUGGUUAUACAGGAAA <u>UGACCUA</u> <u>UGAAUUGACAGACAUAUAGCUGAGUUUGUCUGU</u> CAUUUCUUAGGCCAAUAUUCUGUAUGACUGUGC UACUCAA	261
<i>miR-216</i>	GAUGGCUGUGAGUUGGCUAA <u>AUCUCAGCUGGCAA</u> <u>CUGUGAGAUGUUCAUACA<u>UCCUCACAGUGGUC</u></u> UCUGGGAUUAUGCUAAACAGAGCAAUU <u>UCCUAGC</u> CCUCACGA	262
<i>miR-217</i>	AGUAUAAUUAUUACA <u>UAGUUUUUGAUGUCGCAGA</u> <u>UACUGCAUCAGGAACUGAUUGGAUAAGAAUCAGU</u> CACCAUCAGUCCUA <u>AUGCAUUGCCUUCAGCAUC</u> UAAACAAG	263
<i>miR-218-1</i>	GUGAUAAUGUAGCGAGAUUUUCUGUUGUGCUUGA UCUA <u>ACCAUGUGGUUGCGAGGUAUGAGUAAAACA</u> UGGUUCCGUC <u>AAGCACC</u> AUGGAACGUCACGCAGC UUUCUACA	264
<i>miR-218-2</i>	GACCAGUCGCUGCGGGGCUUCCU <u>UUGUGCUUGA</u> <u>UCUAACCAUGUGGUGGAACGAUGGAAACGGAACA</u> UGGUUCUGUCAAGCACC <u>GCGGAAAGCACC</u> GUGCU CUCCUGCA	265
<i>miR-219</i>	CCGCCCCGGGCGCGGCUC <u>CUUGAUUGUCCAAACGC</u> <u>AAUUCUCGAGUCUAUGGCUCGGCCGAGAGUUGA</u> GUCUGGACGUCCGAGCCGCGCCCCCAA <u>ACCUCG</u> AGCGGG	266
<i>miR-219-1</i>	CCGCCCCGGGCGCGGCUC <u>CUUGAUUGUCCAAACGC</u> <u>AAUUCUCGAGUCUAUGGCUCGGCCGAGAGUUGA</u> GUCUGGACGUCCGAGCCGCGCCCCCAA <u>ACCUCG</u> AGCGGG	267

<i>miR-219-2</i>	<u>ACUCAGGGGCUUCGCCACUGAUUGUCCAAACGCA</u> <u>AUUCUUGUACGAGUCUGCGGCCAACCGAGAAUUG</u> UGGCUGGACAUCUGUGGCUGAGCUCGGG	268
<i>miR-220</i>	<u>GACAGUGUGGCAUUGUAGGGCUCCACACCGUAUC</u> <u>UGACACUUUGGGCGAGGGCACCAUGCUGAAGGUG</u> UUCAUGAUGCGGUCUGGGAACUCCUCACGGAUCU UACUGAUG	269
<i>miR-221</i>	<u>UGAACAUCCAGGUCUGGGGCAUGAACCGGCAUA</u> <u>CAAUGUAGA UUCUGUGUUCGUUAGGCAACAGCU</u> <u>ACAUUGUCUGCUGGGUUCAGGCUACCUGGAAAC</u> AUGUUCUC	270
<i>miR-222</i>	<u>GCUGCUGGAAGGUGUAGGUACCCUCA AUGGCUCA</u> <u>GUAGCCAGUGUAGA UCCUGUCUUUCGUA AUCAGC</u> <u>AGCUACAUCUGGCUACUGGGUCUCUGAUGGCAUC</u> UUCUAGCU	271
<i>miR-223</i>	<u>CCUGGCCUCCUGCAGUGCCACGCUCCGUGUAUUUG</u> <u>ACAAGCUGAGUUGGACACUCCAUGUGGUAGAGUG</u> <u>UCAGUUUGUCAAAUACCCCAAGUGCGGCACAUGC</u> UUACCAG	272
<i>miR-224</i>	<u>GGGCUUUC AAGUCACUAGUGGUUCCGUUUAGUAG</u> <u>AUGAUUGUGCAUUGUUUCAAAAUGGUGCCCUAGU</u> GACUACAAAGCCC	273
<i>miR-294-1 (chr16)</i>	<u>CAAUCUCCUUUAUCAUGGUAUUGAUUUUCAGUGCU</u> UCCCUUUUGUGUGAGAGAAGUA	274
<i>miR-296</i>	<u>AGGACCCUCCAGAGGGCCCCCCUCA AUCCUGUUGUG</u> <u>CCUAAUUCAGAGGGUUGGGUGGAGGCUCUCCUGAAGG</u> GCUCU	275
<i>miR-299</i>	<u>AAGAAUUGGUUUACCGUCCACAUA CAUUUUGAAUUAU</u> GUAUGUGGGAUGGUA AACCGCUUCU	276
<i>miR-301</i>	<u>ACUGCUAACGAAUGCUCUGACUUUAUUGCACUACUGU</u> <u>ACUUUACAGCUAGCAGUGCAAUAGUAUUGUCA AAGCA</u> UCUGAAAGCAGG	277
<i>miR-302a</i>	<u>CCACCACUAAAACGUGGAUGUACUUGCUUUGAAACUA</u> AAGAAGUAAGUGCUUCCAUGUUUUGGUGAUGG	278
<i>miR-302b</i>	<u>GCUCCCUUCAACUUUAACAUGGAAGUGCUUUCUGUGA</u> <u>CUUUAAAAGUAAGUGCUUCCAUGUUUAGUAGGAGU</u>	279
<i>miR-302c</i>	<u>CCUUUGCUUUAACAUGGGGGUACCUGCUGUGUGAAAC</u> AAAAGUAAGUGCUUCCAUGUUUCAGUGGAGG	280
<i>miR-302d</i>	<u>CCUCUACUUUAACAUGGAGGCACUUGCUGUGACAUGA</u> CAAAAUAAGUGCUUCCAUGUUUGAGUGUGG	281

<i>miR-320</i>	GCUUCGCUCCCCUCCGCCUUCUCUUC <del>CCGGUUCU</del> UCCC GGAGUCGGGAAAGCUGGGUUGAGAGGGGCGAAAAGG AUGAGGU	282
<i>miR-321</i>	UUGGCCUCCUAAGCCAGGGAUUGUGGGUUCGAGUCCC ACCCGGGGUAAAGAAAGGCCGA	283
<i>miR-323</i>	UUGGUACUUGGAGAGAGGUGGUCGUGGGCGCGUUCGC UUUAUUUAUGGCGCACAUACACGGUCGACCUCUUUG CAGUAUCUAAUC	284
<i>miR-324</i>	CUGACUAUGCCUCCCCGCAUCCCCUAGGGCAUUGGUGU AAAGCUGGAGACCCACUGCCCCAGGUGCUGCUGGGGGU UGUAGUC	285
<i>miR-325</i>	AUACAGUGCUCUUGGUUCCUAGUAGGUGUCCAGUAAGUG UUUGUGACAUAUUUUGUUUAUUGAGGACCUCUAUCA AUCAAGCACUGUGCUAGGCUCUGG	286
<i>miR-326</i>	CUCAUCUGUCUGUUGGGCUGGAGGCAGGGCCUUGUG AAGGCGGGUGGUGCUCAGAUCGCCUCUGGGCCCUUCCU CCAGCCCCGAGGCGGAUUCA	287
<i>miR-328</i>	UGGAGUGGGGGGGCAGGAGGGGCUCAGGGAGAAAGUG CAUACAGCCCCUGGCCUCUCUGCCCUUCCGUCCCCUG	288
<i>miR-330</i>	CUUUGGCGAUCACUGCCUCUCUGGGCCUGUGUCUUAGG CUCUGCAAGAUCAACCGAGCAAAGCACACGGCCUGCAG AGAGGCAGCGCUCUGCCC	289
<i>miR-331</i>	GAGUUUGGUUUUGUUUGGGUUUGUUCUAGGUAUGGUC CCAGGGAUCCCAGAUCAAACCAGGCCCCUGGGCCUAUC CUAGAACCAACCUAAGCUC	290
<i>miR-335</i>	UGUUUUGAGCGGGGGUCAAGAGCAAUAACGAAAAAUG UUUGUCAUAAACCGUUUUUCAUUUUGCUCCUGACCU CCUCUCAUUUGCUAUUAUCA	291
<i>miR-337</i>	GUAGUCAGUAGUUGGGGGGUGGGAAACGGCUUCAUACA GGAGUUGAUGCACAGUUAUCCAGCUCCUAUAUGAUGC CUUUCUUCAUCCCCUUCA	292
<i>miR-338</i>	UCUCCAACAAUAUCCUGGUGCUGAGUGAUGACUCAGG CGACUCCAGCAUCAGUGAUUUUGUUGAAGA	293
<i>miR-339</i>	CGGGGCGGCCGCUCUCCCUGUCCUCCAGGAGCUCACGU GUGCCUGCCUGUGAGCGCCUCGACGACAGAGCCGGCGC CUGCCCCAGUGUCUGCGC	294
<i>miR-340</i>	UUGUACCUGGUGUGAUUAUAAGCAAUGAGACUGAUU GUCAUAUGUCGUUUGUGGGAUCCGUCUCAGUUACUUU AUAGCCAUAACCGGUAUCUUA	295

<i>miR-342</i>	<u>GAAACUGGGCUCAAGGUGAGGGGUGCUAUCUGUGAUU</u> <u>GAGGGACAUGGUUAAUGGAAUUGUCUCACACAGAAU</u> CGCACCCGHCACCTTIGGCCITACTTTA	296
<i>miR-345</i>	ACCCAAACCCUAGGUCUGCUGACUCCUAGUCCAGGGCU CGUGAUGGCUGGGUGGGCCUGAACGAGGGGUCUGGAG GCCUGGGUUGAAUAUCGACAGC	297
<i>miR-346</i>	<u>GUCUGUCUGCCCGCAUGCCUGCCUCUCUGUUGCUCUGA</u> AGGAGGCAGGGGCUGGGCCUGCAGCUGCCUGGGCAGA GCGGCUCCUGC	298
<i>miR-367</i>	CCAUUACUGUUGC UAAUAUGCAACUCUGUUGAAUAUA AAUUGGAAUUGCACUUUAGCAAUGGUGAUGG	299
<i>miR-368</i>	AAAAGGUGGAU AUUCCUUCUAUGUUUAUGUU AUUU AU GGUUAACAUAAGAGGAAAUUCCACGUUUU	300
<i>miR-369</i>	UUGAAGGGAGAUCGACCGUGUUAUAUUCGCUUUAUUG ACUUCGAAUAAUACAUGGUUGAUCUUUUCUCAG	301
<i>miR-370</i>	AGACAGAGAAGCCAGGUCACGUCUCUGCAGUUACACA GCUCACGAGUGCCUGCUGGGGUGGAACCUGGUCUGUC U	302
<i>miR-371</i>	GUGGCACUCAAACUGUGGGGGCACUUUCUGCUCUCUG GUGAAAGUGCCGCCAUCUUUUGAGUGUUAC	303
<i>miR-372</i>	GUGGGCCUCAA AUGUGGAGCACUAUUCUGAUGUCCAA GUGGAAAGUGCUGCGACA UUGAGCGUCAC	304
<i>miR-373</i>	GGGAUACUCAA AUGGGGGCGCUUCCUUUUUGUCUG UACUGGGAAGUGCUCG AUUUUGGGGUGUCCC	305
<i>miR-374</i>	<u>UACAUCGGCCA UUAUAUAACAACCUGAUAAGUGUUAU</u> AGCACUUAUCAGAUUGUAUUGUAAUUGUCUGUGUA	306
<i>miR-hes1</i>	AUGGAGCUGCUCACCCUGUGGGCCUCAA AUGUGGAGG AACUAUUCUGAUGUCCAAGUGGAAAGUGCUGCGACAU UUGAGCGUCACCGGUGACGCCCAUAUCA	307
<i>miR-hes2</i>	GCAUCCCCUCAGCCUGUGGCACUCAAACUGUGGGGGCA CUUUCUGCUCUCUGGUGAAAGUGCCGCCAUCUUUUGA GUGUACCGCUUGAGAAGACUCAACC	308
<i>miR-hes3</i>	CGAGGAGCUCAUACUGGGAUACUCAAAAUGGGGGCGC UUUCCUUUUUGUCUGUACUGGGAAGUGCUCG AUUU UGGGGUGUCCCUGUUGAGUAGGGCAUC	309

\* Una secuencia subrayada dentro de una secuencia de precursor corresponde a un transcrito de miR procesado maduro (véase la Tabla 1b). Algunas secuencias de precursor tienen dos secuencias subrayadas que indican dos miR maduros diferentes que se obtienen a partir del mismo precursor. Todas las secuencias son humanas.

Tabla 1b - Secuencias de microRNA maduro humano.

Nombre de miRNA Maduro	Secuencia de miRNA Maduro (5' a 3')	SEC ID Nº	microRNA precursor correspondiente(s); véase la Tabla 1a
<i>let-7a</i>	ugagguaguagguuguauaguu	310	<i>let-7a-1; let-7a-2; let-7a-3; let-7a-4</i>
<i>let-7b</i>	ugagguaguagguuguguguu	311	<i>let-7b</i>
<i>let-7c</i>	ugagguaguagguuguauuguu	312	<i>let-7c</i>
<i>let-7d</i>	agagguaguagguugcauagu	313	<i>let-7d; let-7d-v1</i>
<i>let-7e</i>	ugagguaggagguuguauaguu	314	<i>let-7e</i>
<i>let-7f</i>	ugagguaguagauuguauaguu	315	<i>let-7f-1; let-7f-2-1; let-7f-2-2</i>
<i>let-7g</i>	ugagguaguaguuguuacagu	316	<i>let-7g</i>
<i>let-7i</i>	ugagguaguaguuuugucu	317	<i>let-7i</i>
<i>miR-1</i>	uggaauguaaagaaguaugua	318	<i>miR-1b; miR-1b-1; miR-1b-2</i>
<i>miR-7</i>	uggaagacuagauuuuuuuuu	319	<i>miR-7-1; miR-7-1a; miR-7-2; miR-7-3</i>
<i>miR-9</i>	<b>ucuuugguuuacuagcuguauaga</b>	320	<i>miR-9-1; miR-9-2; miR-9-3</i>
<i>miR-9*</i>	uaaagcuagauaaccgaaagu	321	<i>miR-9-1; miR-9-2; miR-9-3</i>
<i>miR-10a</i>	uaccugugaauccgaaauugug	322	<i>miR-10a</i>
<i>miR-10b</i>	uaccugugaaccgaaauugu	323	<i>miR-10b</i>
<i>miR-15a</i>	uagcagcacauaauuguuugug	324	<i>miR-15a; miR-15a-2</i>
<i>miR-15b</i>	uagcagcacaucauguuuaca	325	<i>miR-15b</i>
<i>miR-16</i>	uagcagcacguaaaauuugcg	326	<i>miR-16-1; miR-16-2; miR-16-13</i>
<i>miR-17-5p</i>	<b>caaagugcuuacagugcagguagu</b>	327	<i>miR-17</i>
<i>miR-17-3p</i>	acugcagugaaggcacuugu	328	<i>miR-17</i>
<i>miR-18</i>	uaaggugcaucuagugcagaua	329	<i>miR-18; miR-18-13</i>
<i>miR-19a</i>	ugugcaaaucuaugcaaacuga	330	<i>miR-19a; miR-19a-13</i>
<i>miR-19b</i>	ugugcaaaucuaugcaaacuga	331	<i>miR-19b-1; miR-19b-2</i>
<i>miR-20</i>	uaaagugcuuauagugcaggua	332	<i>miR-20 (miR-20a)</i>
<i>miR-21</i>	uagcuuaucaugacugauguuga	333	<i>miR-21; miR-21-17</i>
<i>miR-22</i>	aagcugccaguugaagaacugu	334	<i>miR-22</i>
<i>miR-23a</i>	aucacauugccagggaauuucc	335	<i>miR-23a</i>
<i>miR-23b</i>	aucacauugccagggaauaccac	336	<i>miR-23b</i>
<i>miR-24</i>	uggcucagucagcaggaacag	337	<i>miR-24-1; miR-24-2; miR-24-19; miR-24-9</i>
<i>miR-25</i>	cauugcacuugucucggucuga	338	<i>miR-25</i>
<i>miR-26a</i>	uucaaguaauccaggauaggcu	339	<i>miR-26a; miR-26a-1; miR-26a-2</i>
<i>miR-26b</i>	uucaaguaauccaggauaggu	340	<i>miR-26b</i>
<i>miR-27a</i>	uucacaguggcuuaguuccgcc	341	<i>miR-27a</i>

ES 2 429 404 T3

<i>miR-27b</i>	uucacaguggcuaaguucug	342	<i>miR-27b-1; miR-27b-2</i>
<i>miR-28</i>	aaggagcucacagucuaauugag	343	<i>miR-28</i>
<i>miR-29a</i>	cuagcaccaucugaaaucgguu	344	<i>miR-29a-2; miR-29a</i>
<i>miR-29b</i>	uagcaccuuugaaaucagu	345	<i>miR-29b-1; miR-29b-2</i>
<i>miR-29c</i>	uagcaccuuugaaaucgguua	346	<i>miR-29c</i>
<i>miR-30a-5p</i>	uguaaacauccucgacuggaagc	347	<i>miR-30a</i>
<i>miR-30a-3p</i>	cuuucagucggauguuugcagc	348	<i>miR-30a</i>
<i>miR-30b</i>	uguaaacauccuacacucagc	349	<i>miR-30b-1; miR-30b-2</i>
<i>miR-30c</i>	uguaaacauccuacacucagc	350	<i>miR-30c</i>
<i>miR-30d</i>	uguaaacaucggcagucggaag	351	<i>miR-30d</i>
<i>miR-30e</i>	uguaaacauccuugacugga	352	<i>miR-30e</i>
<i>miR-31</i>	ggcaagaugcuggcauagcug	353	<i>miR-31</i>
<i>miR-32</i>	uauugcacauuacuaaguugc	354	<i>miR-32</i>
<i>miR-33</i>	gugcauuguaguugcauug	355	<i>miR-33; miR-33b</i>
<i>miR-34a</i>	uggcagugucuagcugguugu	356	<i>miR-34a</i>
<i>miR-34b</i>	aggcagugucauagcugauug	357	<i>miR-34b</i>
<i>miR-34c</i>	aggcaguguaguagcugauug	358	<i>miR-34c</i>
<i>miR-92</i>	uauugcacuugcccgccugu	359	<i>miR-92-2; miR-92-1</i>
<i>miR-93</i>	aaagugcuguucgugcagguag	360	<i>miR-93-1; miR-93-2</i>
<i>miR-95</i>	uucaacggguauuuauugagca	361	<i>miR-95</i>
<i>miR-96</i>	uuuggcacuagcacauuuugc	362	<i>miR-96</i>
<i>miR-98</i>	ugagguaguaaguuguauuguu	363	<i>miR-98</i>
<i>miR-99a</i>	aaccgugagauccgcauugug	364	<i>miR-99a</i>
<i>miR-99b</i>	caccgugagaaccgaccuugcg	365	<i>miR-99b</i>
<i>miR-100</i>	uacaguacugugauaacugaag	366	<i>miR-100</i>
<i>miR-101</i>	uacaguacugugauaacugaag	367	<i>miR-101-1; miR-101-2</i>
<i>miR-103</i>	agcagcauuguacagggcuaua	368	<i>miR-103-1</i>
<i>miR-105</i>	ucaaauugcucagacuccugu	369	<i>miR-105</i>
<i>miR-106-a</i>	<b>aaaagugcuuacagugcagguagc</b>	370	<i>miR-106-a</i>
<i>miR-106-b</i>	uaaagugcugacagugcagau	371	<i>miR-106-b</i>
<i>miR-107</i>	agcagcauuguacagggcuaua	372	<i>miR-107</i>
<i>miR-122a</i>	<b>uggagugugacaauugguguuuugu</b>	373	<i>miR-122a-1; miR-122a-2</i>
<i>miR-124a</i>	uuaaggcacgcgguuauugcca	374	<i>miR-124a-1; miR-124a-2; miR-124a-3</i>
<i>miR-125a</i>	ucccugagaccuuuauaccugug	375	<i>miR-125a-1; miR-125a-2</i>
<i>miR-125b</i>	ucccugagaccuaacuuguga	376	<i>miR-125b-1; miR-125b-2</i>

ES 2 429 404 T3

miR-126*	cauuauuacuuuugguacgcg	377	<i>miR-126-1; miR-126-2</i>
<i>miR-126</i>	ucguaccgugaguaauaaugc	378	<i>miR-126-1; miR-126-2</i>
<i>miR-127</i>	ucggauccgucugagcuuggcu	379	<i>miR-127-1; miR-127-2</i>
<i>miR-128a</i>	ucacagugaaccggucucuuuu	380	<i>miR-128; miR-128a</i>
<i>miR-128b</i>	ucacagugaaccggucucuuuc	381	<i>miR-128b</i>
<i>miR-129</i>	cuuuuugcggucugggcuugc	382	<i>miR-129-1; miR-129-2</i>
<i>miR-130a</i>	cagugcaauguuaaaagggc	383	<i>miR-130a</i>
<i>miR-130b</i>	cagugcaaugaugaaagggcau	384	<i>miR-130b</i>
<i>miR-132</i>	uaacagucuacagccauggucg	385	<i>miR-132-1</i>
<i>miR-133a</i>	uuggucccuucaaccagcugu	386	<i>miR-133a-1; miR-133a-2</i>
<i>miR-133b</i>	uuggucccuucaaccagcua	387	<i>miR-133b</i>
<i>miR-134</i>	ugugacugguugaccagaggg	388	<i>miR-134-1; miR-134-2</i>
<i>miR-135a</i>	<b>uauggcuuuuuauuccuauguga</b>	389	<i>miR-135a; miR-135a-2 (miR-135-2)</i>
<i>miR-135b</i>	uauggcuuuucauuccuaugug	390	<i>miR-135b</i>
<i>miR-136</i>	acuccauuuuguuuugaugga	391	<i>miR-136-1; miR-136-2</i>
<i>miR-137</i>	uauugcuuaagaauacgcuag	392	<i>miR-137</i>
<i>miR-138</i>	agcugguguugugauc	393	<i>miR-138-1; miR-138-2</i>
<i>miR-139</i>	ucuacagugcagugucu	394	<i>miR-139</i>
<i>miR-140</i>	agugguuuuaccuauugguag	395	<i>miR-140; miR-140as; miR-140s</i>
<i>miR-141</i>	aacacugucugguaaagaugg	396	<i>miR-141-1; miR-141-2</i>
<i>miR-142-3p</i>	<b>uguaguguuuuccuacuuuaugga</b>	397	<i>miR-142</i>
<i>miR-142-5p</i>	cauaaaguagaagcacuac	398	<i>miR-142</i>
<i>miR-143</i>	ugagaugaagcacuguagcuca	399	<i>miR-143-1</i>
<i>miR-144</i>	uacaguauagaugauguacuag	400	<i>miR-144-1; miR-144-2</i>
<i>miR-145</i>	<b>guccaguuuuccaggaauccuu</b>	401	<i>miR-145-1; miR-145-2</i>
<i>miR-146</i>	ugagaacugaaauccauggguu	402	<i>miR-146-1; miR-146-2</i>
<i>miR-147</i>	guguguggaaaugcuucugc	403	<i>miR-147</i>
<i>miR-148a</i>	ucagugcacuacagaacuuugu	404	<i>miR-148a (miR-148)</i>
<i>miR-148b</i>	ucagugcaucacagaacuuugu	405	<i>miR-148b</i>
<i>miR-149</i>	ucuggcuccgugucuucacucc	406	<i>miR-149</i>
<i>miR-150</i>	ucuccaaccuuguaccagug	407	<i>miR-150-1; miR-150-2</i>
<i>miR-151</i>	acuagacugaagcuccuugagg	408	<i>miR-151</i>
<i>miR-152</i>	ucagugcaugacagaacuugg	409	<i>miR-152-1; miR-152-2</i>
<i>miR-153</i>	uugcauagucacaaaaguga	410	<i>miR-153-1-1; miR-153-1-2; miR-153-2-1; m iR-153-2-2</i>

ES 2 429 404 T3

<i>miR-154</i>	uagguuauccguguugccuucg	411	<i>miR-154-1; miR-154-2</i>
<i>miR-154*</i>	aaucuuacacgguugaccuauu	412	<i>miR-154-1; miR-154-2</i>
<i>miR-155</i>	uuauugcuaaucgugauagggg	413	<i>miR-155</i>
<i>miR-181a</i>	aacauucaacgcugucggugagu	414	<i>miR-181a</i>
<i>miR-181b</i>	<b>aacauucauugcugucggugguu</b>	415	<i>miR-181b-1; miR-181b-2</i>
<i>miR-181c</i>	aacauucaaccugucggugagu	416	<i>miR-181c</i>
<i>miR-182</i>	uuuggcaaugguagaacucaca	417	<i>miR-182; miR-182as</i>
<i>miR-182*</i>	ugguucuagacuugccaacua	418	<i>miR-182; miR-182as</i>
<i>miR-183</i>	uauggcacugguagaauucacug	419	<i>miR-183</i>
<i>miR-184</i>	uggacggagaacugauaagggg	420	<i>miR-184-1; miR-184-2</i>
<i>miR-185</i>	uggagagaaaggcaguuc	421	<i>miR-185-1; miR-185-2</i>
<i>miR-186</i>	caaagaaauucuccuuugggcuu	422	<i>miR-186-1; miR-186-2</i>
<i>miR-187</i>	ucgugucuuguguugcagccg	423	<i>miR-187</i>
<i>miR-188</i>	caucccuugcaugguggagggg	424	<i>miR-188</i>
<i>miR-189</i>	gugccuacugagcugauaucagu	425	<i>miR-189-1; miR-189-2</i>
<i>miR-190</i>	ugauauguuugauauauaggu	426	<i>miR-190-1; miR-190-2</i>
<i>miR-191</i>	caacggaaucccaaaagcagcu	427	<i>miR-191-1; miR-191-2</i>
<i>miR-192</i>	cugaccuaugaauugacagcc	428	<i>miR-192</i>
<i>miR-193</i>	aacuggccuacaaaguccag	429	<i>miR-193-1; miR-193-2</i>
<i>miR-194</i>	uguaacagcaacuccaugugga	430	<i>miR-194-1; miR-194-2</i>
<i>miR-195</i>	uagcagcacagaaauauuggc	431	<i>miR-195-1; miR-195-2</i>
<i>miR-196a</i>	uagguaguuucauguuguugg	432	<i>miR-196a; miR-196a-2 (miR196-2)</i>
<i>miR-196b</i>	uagguaguuuuccuguuguugg	433	<i>miR-196b</i>
<i>miR-197</i>	uuccaccuccuuccaccaccagc	434	<i>miR-197</i>
<i>miR-198</i>	gguccagaggggagauagg	435	<i>miR-198</i>
<i>miR-199a</i>	cccaguguucagacuaccguuc	436	<i>miR-199a-1; miR-199a-2</i>
<i>miR-199a*</i>	uacaguagucgacauugguu	437	<i>miR-199a-1; miR-199a-2; miR-199s; miR-199b</i>
<i>miR-199b</i>	cccaguguuuagacuauucguuc	438	<i>miR-199b</i>
<i>miR-200a</i>	uaacacugucugguaacgaugu	439	<i>miR-200a</i>
<i>miR-200b</i>	<b>cucuaauacugccugguaaugaug</b>	440	<i>miR-200b</i>
<i>miR-200c</i>	aaucugccgguaaugaugga	441	<i>miR-200c</i>
<i>miR-202</i>	agagguauagggcaugggaaga	442	<i>miR-202</i>
<i>miR-203</i>	gugaaauguuaggaccacuag	443	<i>miR-203</i>
<i>miR-204</i>	uucccuuugucauccuauugccu	444	<i>miR-204</i>

ES 2 429 404 T3

<i>miR-205</i>	uccuuc <u>au</u> uccaccgagucug	445	<i>miR-205</i>
<i>miR-206</i>	ugga <u>aug</u> uaaggaugugugg	446	<i>miR-206-1; miR-206-2</i>
<i>miR-208</i>	auaagacgagcaaaaagcuugu	447	<i>miR-208</i>
<i>miR-210</i>	cugugcgugugacagcggcug	448	<i>miR-210</i>
<i>miR-211</i>	u <u>ccccu</u> uguca <u>ccu</u> ucg <u>ccu</u>	449	<i>miR-211</i>
<i>miR-212</i>	uaacagucuccagucacggcc	450	<i>miR-212</i>
<i>miR-213</i>	acc <u>aucg</u> accguugauuguacc	451	<i>miR-213</i>
<i>miR-214</i>	acagcaggcacagacaggcag	452	<i>miR-214</i>
<i>miR-215</i>	augaccu <u>aug</u> aaugacagac	453	<i>miR-215</i>
<i>miR-216</i>	ua <u>auc</u> ucagcuggcaacugug	454	<i>miR-216</i>
<i>miR-217</i>	<b>uacugcaucaggaacugauuggau</b>	455	<i>miR-217</i>
<i>miR-218</i>	uugugcuugaucua <u>acc</u> augu	456	<i>miR-218-1; miR-218-2</i>
<i>miR-219</i>	ugauuguccaaacgca <u>uu</u> cu	457	<i>miR-219; miR-219-1; miR-219-2</i>
<i>miR-220</i>	ccacaccgu <u>auc</u> gacacuuu	458	<i>miR-220</i>
<i>miR-221</i>	agcuacauugucugcugguuuc	459	<i>miR-221</i>
<i>miR-222</i>	<b>agcuacau</b> cuggcuacugggucuc	460	<i>miR-222</i>
<i>miR-223</i>	ugucaguuuguca <u>aa</u> u <u>ac</u> ccc	461	<i>miR-223</i>
<i>miR-224</i>	caagucacuaguggu <u>cc</u> gu <u>uu</u> a	462	<i>miR-224</i>
<i>miR-296</i>	agggccccc <u>cu</u> ca <u>au</u> ccu <u>gu</u>	463	<i>miR-296</i>
<i>miR-299</i>	ugguuuaccgu <u>cc</u> ca <u>u</u> ac <u>au</u>	464	<i>miR-299</i>
<i>miR-301</i>	cagugca <u>au</u> agu <u>au</u> ugca <u>aa</u> gc	465	<i>miR-301</i>
<i>miR-302a</i>	<b>uaagugcu</b> uccauguuuugguga	466	<i>miR-302a</i>
<i>miR-302b*</i>	acuuuac <u>au</u> ggaagugcu <u>uu</u> cu	467	<i>miR-302b</i>
<i>miR-302b</i>	uaagugcuuccauguuu <u>u</u> aguag	468	<i>miR-302b</i>
<i>miR-302c*</i>	uuu <u>aa</u> caugggg <u>u</u> accugcug	469	<i>miR-302c</i>
<i>miR-302c</i>	uaagugcuuccauguu <u>u</u> cagugg	470	<i>miR-302c</i>
<i>miR-302d</i>	<b>uaagugcu</b> uccauguuugagugu	471	<i>miR-302d</i>
<i>miR-320</i>	aaaagcuggguagagggcgaa	472	<i>miR-320</i>
<i>miR-321</i>	uaagccaggga <u>u</u> uggg <u>u</u> uc	473	<i>miR-321</i>
<i>miR-323</i>	gcacauuacacggucgacc <u>u</u> cu	474	<i>miR-323</i>
<i>miR-324-5p</i>	cgca <u>u</u> cc <u>cu</u> agggcauugg <u>u</u> gu	475	<i>miR-324</i>
<i>miR-324-3p</i>	ccacugcccaggugcugcugg	476	<i>miR-324</i>
<i>miR-325</i>	ccuaguagguguccag <u>u</u> agu	477	<i>miR-325</i>
<i>miR-326</i>	ccucugggccc <u>u</u> cc <u>u</u> ccag	478	<i>miR-326</i>
<i>miR-328</i>	cuggcc <u>u</u> cucugcc <u>u</u> cc <u>u</u> ccgu	479	<i>miR-328</i>

<i>miR-330</i>	gcaaagcacacggccugcagaga	480	<i>miR-330</i>
<i>miR-331</i>	gccccugggcuauccuagaa	481	<i>miR-331</i>
<i>miR-335</i>	ucaagagcaauaacgaaaaugu	482	<i>miR-335</i>
<i>miR-337</i>	uccagcuccuauaugaugccuuu	483	<i>miR-337</i>
<i>miR-338</i>	uccagcaucagugauuuuguuga	484	<i>miR-338</i>
<i>miR-339</i>	ucccuguccuccaggagcuca	485	<i>miR-339</i>
<i>miR-340</i>	uccgcucaguuacuuuauagcc	486	<i>miR-340</i>
<i>miR-342</i>	ucucacacagaaucgcacccguc	487	<i>miR-342</i>
<i>miR-345</i>	ugcugacuccuaguccagggc	488	<i>miR-345</i>
<i>miR-346</i>	ugucugcccgaugccugccucu	489	<i>miR-346</i>
<i>miR-367</i>	aaugcacuuuagcaaugguga	490	<i>miR-367</i>
<i>miR-368</i>	acauagaggaaauccacguuu	491	<i>miR-368</i>
<i>miR-369</i>	aaauaacaugguugauuuuu	492	<i>miR-369</i>
<i>miR-370</i>	gccugcugggguggaaccugg	493	<i>miR-370</i>
<i>miR-371</i>	gugccgccaucuuuugagugu	494	<i>miR-371</i>
<i>miR-372</i>	aaagugcugcgacauuugagcgu	495	<i>miR-372</i>
<i>miR-373*</i>	acuaaaauggggcgcuuucc	496	<i>miR-373</i>
<i>miR-373</i>	<b>gaagugcuucgauuuuggggugu</b>	497	<i>miR-373</i>
<i>miR-374</i>	uuauaauacaaccugauaagug	498	<i>miR-374</i>

El nivel del al menos un producto génico del miR se puede medir en las células de una muestra biológica obtenida de un sujeto. Por ejemplo, se puede extraer una muestra de tejido de un sujeto del que se sospecha que tiene un cáncer de pulmón por medio de las técnicas de biopsia convencionales. En otra realización, se puede extraer una muestra de sangre del sujeto y se pueden aislar los glóbulos blancos para extraer el ADN por las técnicas de referencia. La muestra de sangre o de tejido se obtiene del sujeto preferentemente antes del inicio de la radioterapia, quimioterapia u otro tratamiento terapéutico. Se puede obtener una correspondiente muestra de tejido o de sangre de control o una muestra control de referencia, a partir de tejidos sin afectar del sujeto, a partir de un individuo humano normal o una población de individuos humanos normales o a partir de cultivos celulares que correspondan con la mayoría de las células de la muestra del sujeto. La muestra control de tejido o de sangre se procesa entonces junto con la muestra del sujeto, de forma que se puedan comparar los niveles del producto génico del miR producido por un gen miR determinado en las células de la muestra del sujeto con los niveles del producto génico del miR correspondiente de las células de la muestra control. De manera alternativa, se puede obtener una muestra de referencia y procesarse independientemente (por ejemplo, a una hora diferente) de la muestra de ensayo y se puede comparar el nivel del producto génico del miR producido por un determinado gen miR en las células de la muestra de ensayo con el nivel del correspondiente producto génico del miR de la muestra de referencia.

En una realización, el nivel de al menos un producto génico del miR en la muestra de ensayo es mayor que el nivel del correspondiente producto génico del miR en la muestra control (es decir, la expresión del producto génico del miR está "regulada positivamente"). Como se usa en el presente documento, la expresión de un producto génico del miR está "regulada positivamente" cuando la cantidad del producto génico del miR en una célula o muestra de tejido del sujeto es mayor que la cantidad del mismo producto génico en una célula o muestra de tejido de control. En otra realización, el nivel del al menos un producto génico del miR en la muestra de ensayo es menor que el nivel del correspondiente producto génico del miR de la muestra de control (es decir, la expresión del producto génico del miR está "regulada negativamente"). Como se usa en el presente documento, la expresión de un gen miR está "regulada negativamente" cuando la cantidad del producto génico del miR producido por ese gen en una célula o muestra de tejido del sujeto es menor que la cantidad producida por el mismo gen en una célula o muestra de tejido de control. La expresión génica del miR relativa en las muestras de control y normales se puede determinar con respecto a una o más expresiones de ARN de referencia. Las referencias pueden comprender, por ejemplo, un nivel cero de expresión génica del miR, el nivel de expresión génica del miR en una línea celular de referencia, el nivel de

expresión génica del miR en tejidos sin afectar del sujeto o el nivel medio de la expresión génica del miR obtenida previamente para una población de seres humanos normales de control.

Una alteración (es decir, un aumento o disminución) del nivel de un producto génico del miR en la muestra obtenida del sujeto, con respecto al nivel de un correspondiente producto génico del miR de la muestra control, es indicativa de la presencia de cáncer de pulmón en el sujeto. En una realización, el nivel de al menos un producto génico del miR en la muestra de ensayo es mayor que el nivel del correspondiente producto génico del miR en la muestra control. En otra realización, el nivel de al menos un producto génico del miR en la muestra de ensayo es menor que el nivel del correspondiente producto génico del miR en la muestra control. El al menos un producto génico del miR se selecciona entre el grupo que consiste en miR-155.

También se desvelan los miR-21, miR-191, miR-126\*, miR-210, miR-143, miR-205, miR-192-prec, miR-224, miR-126, miR-24-2, miR-30a-5p, miR-212, miR-140, miR-9, miR-214, miR-17-3p, miR-124a-1, miR-218-2, miR-95, miR-145, miR-198, miR-216-prec, miR-219-1, miR-106a, miR-197, miR-192, miR-125a-prec, miR-26a-1-prec, miR-146, miR-203, miR-199b-prec, let-7a-2-prec, miR-27b, miR-32, miR-29b-2, miR-220, miR-33, miR-181c-prec, miR-150, miR-101-1, miR-124a-3, miR-125a y let-7f-1. En una divulgación en particular, el al menos un producto génico del miR se selecciona entre el grupo que consiste en miR-21, miR-205 and miR-216. En otra divulgación, el cáncer de pulmón es un adenocarcinoma de pulmón y el al menos un producto génico del miR se selecciona entre el grupo que consiste en miR-21, miR-191, miR-155, miR-210, miR-126\* y miR-224.

En una divulgación particular, el producto génico del miR no es uno o más de let7a-2, let-7c, let-7g, let-7i, miR-7-2, miR-7-3, miR-9, miR-9-1, miR-10a, miR-15a, miR-15b, miR-16-1, miR-16-2, miR-17-5p, miR-20a, miR-21, miR-24-1, miR-24-2, miR-25, miR-29b-2, miR-30, miR-30a-5p, miR-30c, miR-30d, miR-31, miR-32, miR-34, miR-34a, miR-34a prec, miR-34a-1, miR-34a-2, miR-92-2, miR-96, miR-99a, miR-99b prec, miR-100, miR-103, miR-106a, miR-107, miR-123, miR-124a-1, miR-125b-1, miR-125b-2, miR-126\*, miR-127, miR-128b, miR-129, miR-129-1/2 prec, miR-132, miR-135-1, miR-136, miR-137, miR-141, miR-142-as, miR-143, miR-146, miR-148, miR-149, miR-153, miR-155, miR-159-1, miR-181, miR-181b-1, miR-182, miR-186, miR-191, miR-192, miR-195, miR-196-1, miR-196-1 prec, miR-196-2, miR-199a-1, miR-199a-2, miR-199b, miR-200b, miR-202, miR-203, miR-204, miR-205, miR-210, miR-211, miR-212, miR-214, miR-215, miR-217, miR-221 y/o miR-223.

El nivel de un producto génico del miR en una muestra se puede medir utilizando cualquier técnica que sea adecuada para detectar los niveles de expresión de ARN en una muestra biológica. Las técnicas adecuadas (por ejemplo, análisis de transferencia de Northern, RT-PCR, hibridación *in situ*) para determinar los niveles de expresión de ARN en una muestra biológica (por ejemplo, células, tejidos) son bien conocidas por los expertos en la técnica. En una realización en particular, el nivel de al menos un producto génico del miR se detecta utilizando el análisis de transferencia de Northern. Por ejemplo, el ARN total celular se puede purificar a partir de las células por homogenización en presencia de un tampón de extracción de ácido nucleico, seguido por centrifugación. Los ácidos nucleicos se precipitan y el ADN se elimina tratándolo con ADNasa y precipitación. Las moléculas de ARN se separan entonces por electroforesis en gel sobre geles de agarosa según las técnicas de referencia y se transfieren a los filtros de nitrocelulosa. Entonces se inmoviliza el ARN sobre los filtros por calentamiento. La detección y la cuantificación de ARN específico se consigue utilizando sondas de ADN o ARN marcadas adecuadamente que sean complementarias del ARN en cuestión. Véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook y col., eds., 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Capítulo 7.

Las sondas adecuadas (por ejemplo, sondas ADN, sondas ARN) para la hibridación por transferencia de Northern de un determinado producto génico del miR se pueden producir a partir de las secuencias proporcionadas en la Tabla 1a y la Tabla 1b e incluyen, pero sin limitación, sondas que tienen al menos una complementariedad de aproximadamente el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o el 99 % con el producto génico del miR de interés. Los procedimientos para la preparación de sondas marcadas de ADN y ARN y las condiciones para la hibridación de las mismas con las secuencias de nucleótidos diana se describen en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook y col., eds., 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Capítulos 10 y 11.

Por ejemplo, la sonda de ácido nucleico se puede marcar con, por ejemplo un radionucleido, tal como  $^3\text{H}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{14}\text{C}$  o  $^{35}\text{S}$ ; un metal pesado; un ligando capaz de funcionar como un miembro de un par de unión específico para un ligando marcado (por ejemplo, biotina, avidina o un anticuerpo); una molécula fluorescente; una molécula quimioluminiscente; una enzima o similares.

Las sondas se pueden marcar para que tengan una actividad específica alta bien por el procedimiento de traducción de Nick de Rigby y col. (1977), *J Mol. Biol.* 113: 237-251 o por el procedimiento del cebador aleatorio de Fienberg y col. (1983), *Anal. Biochem.* 132: 6-13. Este último es el procedimiento de elección para sintetizar sondas de actividad específica alta marcadas con  $^{32}\text{P}$  a partir de matrices de ADN de cadena sencilla o de moldes de ARN. Por ejemplo, reemplazando los nucleótidos preexistentes con nucleótidos altamente radiactivos según el procedimiento de traducción de Nick, es posible preparar sondas de ácido nucleico marcadas con  $^{32}\text{P}$  con una actividad específica en exceso de  $10^8$  cpm/microgramo. Se puede entonces llevar a cabo la detección autorradiográfica de hibridación, exponiendo una película fotográfica a los filtros hibridados. El escáner densitométrico de las películas fotográficas expuestas por los filtros hibridados proporciona una medición precisa de los niveles de transcripción del gen miR. Utilizando otra estrategia, los niveles de transcripción del gen miR se pueden cuantificar por sistemas de imagen

computarizados, tales como el Molecular Dynamics 400-B 2D Phosphorimager disponible en Amersham Biosciences, Piscataway, NJ.

En el caso de que el marcado de ADN o ARN por radionucleidos no sea práctico, se puede utilizar el procedimiento del cebador aleatorio para incorporar un análogo, por ejemplo, el análogo dTTP 5-(N-(N-biotinil-epsilon-aminocaproil)-3-aminoalil) desoxiuridina trifosfato, en la molécula sonda. El oligonucleótido sonda biotinilado se puede detectar al reaccionar con proteínas unidas a biotina, tales como la avidina, estreptavidina y anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos antibiotina) acoplados a tintes fluorescentes o enzimas que producen reacciones de color.

Además de la técnica Northern y otras técnicas de hibridación de ARN, la determinación de las transcripciones de ARN se puede conseguir utilizando la técnica de hibridación *in situ*. Esta técnica necesita menos células que la técnica de transferencia de Northern e implica depositar las células enteras en un cubreobjetos de microscopio y sondar el contenido de ácido nucleico de la célula con una solución que contiene sondas de ácido nucleico radiactivo o marcado de alguna manera (por ejemplo, ADNc o ARN). Esta técnica es particularmente muy precisa para analizar muestras de biopsias de sujetos. La práctica de la técnica de la hibridación *in situ* se describe con mayor detalle en la Patente de Estados Unidos N° 5.427.916. Las sondas adecuadas para la hibridación *in situ* de un determinado producto génico del miR se pueden producir a partir de las secuencias de ácidos nucleicos proporcionadas en la Tabla 1a y la Tabla 1b, e incluyen, sin limitación, sondas que tienen al menos una complementariedad de aproximadamente el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o el 99 % con un producto génico del miR de interés, así como sondas que tienen una complementariedad completa con un producto génico de interés, como se ha descrito anteriormente.

El número relativo de transcritos del gen miR en las células también se puede determinar por transcripción inversa de los transcritos del gen miR, seguida por la amplificación de los transcritos transcritos inversamente por reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Los niveles de transcritos del gen miR se pueden cuantificar comparándolos con una referencia interna, por ejemplo, el nivel de ARNm de un gen constitutivo presente en la misma muestra. Un gen constitutivo adecuado para su uso como referencia interna incluye, por ejemplo, el de la miosina o la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH). Los procedimientos para llevar a cabo la RT-PCR cuantitativa y semicuantitativa y variaciones de las mismas, son bien conocidos por los expertos en la técnica.

En algunos casos, puede ser deseable determinar simultáneamente el nivel de expresión de una pluralidad de diferentes productos génicos del miR en una muestra. En otros casos, puede ser deseable determinar el nivel de expresión de los transcritos de todos los genes miR conocidos que se correlacionan con un cáncer. Evaluar los niveles de expresión específicos del cáncer para cientos de genes miR o productos génicos tarda mucho tiempo y necesita una gran cantidad de ARN total (por ejemplo, al menos 20 mg para cada transferencia de Northern) y las técnicas autorradiográficas necesitan isótopos radiactivos.

Para superar estas limitaciones, puede construirse una genoteca de oligos, en formato de microchip (es decir, una micromatriz) que contenga una serie de oligonucleótidos sondas (por ejemplo, oligodesoxinucleótidos) que son específicos para una serie de genes miR. Utilizando tal micromatriz, se puede determinar el nivel de expresión de múltiples microARN en una muestra biológica haciendo una transcripción inversa de los ARN para generar una serie de oligodesoxinucleótidos diana, e hibridándolos con los oligonucleótidos sonda de la micromatriz para generar un perfil de hibridación o de expresión. El perfil de hibridación de la muestra de ensayo se puede entonces comparar con el de una muestra control para determinar cuáles son los microARN que tienen un nivel de expresión alterado en las células del cáncer de pulmón. Como se usa en el presente documento, "oligonucleótido sonda" u "oligodesoxinucleótido sonda" se refiere a un oligonucleótido que es capaz de hibridarse con un oligonucleótido diana. "Oligonucleótido diana" u "oligodesoxinucleótido diana" se refiere a una molécula que se tiene que detectar (por ejemplo, por medio de 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 hibridarse con un producto génico del miR o con una transcripción inversa del producto génico del miR específico.

Un "perfil de expresión" o un "perfil de hibridación" de una muestra particular es esencialmente una huella dactilar del estado de la muestra, aunque cualquier gen en particular puede tener dos estados que se expresen de forma similar, la evaluación de un cierto número de genes simultáneamente permite la generación de un perfil de expresión génica que es único del estado de la célula. Es decir que el tejido normal se puede distinguir del tejido del cáncer de pulmón y se pueden determinar diferentes estados pronósticos en el tejido del cáncer de pulmón (por ejemplo, pronósticos de supervivencia buenos o malos a largo plazo). Comparando los perfiles de expresión del tejido del cáncer de pulmón en diferentes estados, se obtiene información con respecto a cuáles son los genes importantes (incluyendo tanto la regulación positiva como negativa de genes) en cada uno de esos estados. La identificación de secuencias que se expresan diferencialmente en el tejido del cáncer de pulmón o en el tejido pulmonar normal, así como la expresión diferencial que da lugar a diferentes resultados pronósticos, permite el uso de esta información de varias maneras. Por ejemplo, se puede evaluar un régimen de tratamiento particular (por ejemplo, para determinar si el fármaco quimioterapéutico actúa para mejorar el pronóstico a largo plazo en un paciente en particular). De manera similar, el diagnóstico se puede hacer o confirmar comparando muestras del paciente con perfiles de expresión conocidos. Además, estos perfiles de expresión génica (o genes individuales) permiten seleccionar entre los fármacos candidatos que suprimen el perfil de expresión del cáncer de pulmón o convierten un perfil de pronóstico malo en un perfil de pronóstico mejor.

En consecuencia, la invención proporciona procedimientos para diagnosticar si un sujeto tiene o está en riesgo de desarrollar un cáncer de pulmón, que comprende la transcripción inversa del ARN de una muestra de ensayo obtenida del sujeto para proporcionar una serie de oligodesoxinucleótidos diana, hibridando los oligodesoxinucleótidos diana con una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN para proporcionar un perfil de hibridación de la muestra de ensayo y comparando el perfil de hibridación de la muestra de ensayo con un perfil de hibridación generado a partir una muestra de control, de manera que una alteración en la señal de al menos un miARN seleccionado entre el grupo que consiste en miR-155 es indicativa de que el sujeto o tiene o está en riesgo de desarrollar un cáncer de pulmón. En una realización, la micromatriz comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN para un miARN seleccionado entre el grupo que consiste en miR-155. En una divulgación particular, la micromatriz comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN para uno o más de los miARN seleccionados entre el grupo que consiste en miR-21, miR-191, miR-126\*, miR-210, miR-155, miR-143, miR-205, miR-192-prec, miR-224, miR-126, miR-24-2, miR-30a-5p, miR-212, miR-140, miR-9, miR-214, miR-17-3p, miR-124a-1, miR-218-2, miR-95, miR-145, miR-198, miR-216-prec, miR-219-1, miR-106a, miR-197, miR-192, miR-125a-prec, miR-26a-1-prec, miR-146, miR-203, miR-199b-prec, let-7a-2-prec, miR-27b, miR-32, miR-29b-2, miR-220, miR-33, miR-181c-prec, miR-150, miR-101-1, miR-124a-3, miR-125a, let-7f-1 y una combinación de los mismos.

La micromatriz se puede preparar con oligonucleótidos sonda específicos de un gen generados a partir de secuencias conocidas de miARN. La matriz puede contener dos oligonucleótidos sonda diferentes para cada miARN, uno que contiene la secuencia madura, activa y el otro que es específico para el miARN precursor. La matriz también puede contener controles, tales como una o más secuencias de ratón que se diferencian de los ortólogos humanos solamente en unas pocas bases, que pueden servir como controles para las condiciones de rigurosidad de la hibridación. Se pueden imprimir en el microchip ARNt y otros ARN (por ejemplo, ARNr, ARNm) de ambas especies, proporcionando un control interno positivo de hibridación específica, relativamente estable. También se pueden incluir en el microchip uno o más controles apropiados de hibridación no específica. Con este propósito, las secuencias se seleccionan basándose en la ausencia de cualquier homología con cualquiera de los miARN conocidos.

La micromatriz puede fabricarse utilizando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, los oligonucleótidos sonda de una longitud apropiada, por ejemplo, 40 nucleótidos, se modifican en 5'-amino en la posición C6 y se imprimen utilizando los sistemas de micromatrices disponibles en el mercado, por ejemplo el GeneMachine OmniGrid™ 100 Microarrayer y portaobjetos activados Amersham CodeLink™. El oligómero ADNc marcado correspondiente a los ARN diana se prepara por transcripción inversa del ARN diana con el cebador marcado. Después de la síntesis de la primera cadena, los híbridos ARN/ADN se desnaturalizan para degradar las matrices. Los ADNc marcados preparados de esta manera se hibridan con el chip de la micromatriz bajo condiciones de hibridación, por ejemplo SSPE 6X /formamida al 30 % a 25° C durante 18 horas y a continuación lavándolo con TNT 0,75x a 37° C durante 40 minutos. La hibridación se produce en las posiciones de la matriz en las que la sonda ADN inmovilizada reconoce un ADNc diana complementario de la muestra. El ADNc diana marcado marca la posición exacta en la matriz donde se produce la unión, permitiendo la detección automática y la cuantificación. El resultado consiste en un lista de acontecimientos de hibridación, indicando la abundancia relativa de las secuencias específicas de ADNc y por tanto la abundancia relativa de los correspondientes miR complementarios, en la muestra del paciente. De acuerdo con una realización, el oligómero ADNc marcado es un ADNc marcado con biotina, preparado a partir de un cebador marcado con biotina. La micromatriz se procesa entonces por detección directa de los transcritos que contienen biotina utilizando, por ejemplo, Streptavidina-Alexa647 conjugada y seleccionada utilizando los procedimientos de selección convencionales. Las intensidades de las imágenes de cada mancha en la matriz son proporcionales a la abundancia del correspondiente miR en la muestra del paciente.

El uso de la matriz tiene varias ventajas en la detección de la expresión de miARN. En primer lugar, se puede identificar la expresión global de varios cientos de genes en la misma muestra a la vez. En segundo lugar, con el diseño cuidadoso de los oligonucleótidos sonda, se pueden identificar tanto las moléculas precursoras como las maduras. En tercer lugar, comparado con el análisis de transferencia de Northern, el chip necesita una pequeña cantidad de ARN y proporciona resultados reproducibles utilizando 2,5 mg de ARN en total. El número relativamente limitado de miARN (unos pocos cientos por especie) permite la construcción de una micromatriz común para varias especies, con oligonucleótidos sonda distintivos de cada una. Tal herramienta permitiría analizar la expresión transespecífica para cada miR conocido bajo distintas condiciones.

Además de usarse para los ensayos cuantitativos del nivel de expresión de miR específicos, un microchip que contenga oligonucleótidos sonda específicos de miARN que se correspondan con una parte sustancial del miRNoma, preferentemente el miRNoma entero, se puede emplear para llevar a cabo el perfil de expresión génica del miR, por el análisis de los patrones de expresión del miR. Las distintas firmas del miR se pueden asociar con marcadores establecidos de enfermedades o directamente con un estado de enfermedad.

De acuerdo con los procedimientos de creación del perfil de expresión descritos en el presente documento, el ARN total de una muestra de un sujeto sospechoso de tener un cáncer (por ejemplo, un cáncer de pulmón) se transcribe inversamente de manera cuantitativa para proporcionar una serie de oligodesoxinucleótidos diana marcados, complementarios del ARN de la muestra. Los oligodesoxinucleótidos diana entonces se hibridan con una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN para proporcionar un perfil de hibridación de la

muestra. El resultado es un perfil de hibridación de la muestra que representa el patrón de expresión del miARN de 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 de la micromatriz. El perfil se puede registrar como presencia o ausencia de señal (señal contra cero señal). 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 normal, por ejemplo no cancerosa, de control. Una alteración en la señal es indicativa de la presencia de cáncer o la propensión a desarrollar un cáncer en el sujeto.

Otras técnicas para la medición de la expresión génica del miR están dentro de la experiencia de la técnica y se incluyen distintas técnicas para medir tasas de transcripción y degradación del ARN.

La invención también proporciona procedimientos para determinar el pronóstico de un sujeto con cáncer de pulmón, que comprenden la medición del nivel de al menos un producto génico del miR, que se asocia con un pronóstico adverso en el cáncer de pulmón en la muestra de ensayo de un sujeto. Según estos procedimientos, una alteración en el nivel de un producto génico del miR que se asocia con un pronóstico adverso, en la muestra de ensayo, al compararse con el nivel del correspondiente producto génico del miR en una muestra control, es indicativa de que el sujeto tiene un cáncer de pulmón con un pronóstico adverso. Los ejemplos de un pronóstico adverso incluyen, sin limitación, baja tasa de supervivencia y progresión rápida de la enfermedad. El al menos un producto génico del miR asociado con un pronóstico adverso se selecciona entre el grupo que consiste en miR-155. También se desvelan miR-17-3p, miR-106a, miR-93, let-7a-2, miR-145, let-7b, miR-20 y miR-21. En una divulgación particular, el cáncer de pulmón es un adenocarcinoma y el al menos un producto génico del miR asociado con un pronóstico particular se selecciona entre el grupo que consiste en let-7a-2. En ciertas realizaciones, el nivel del al menos un producto génico del miR se mide haciendo la transcripción inversa del ARN de una muestra de ensayo obtenida de un sujeto para proporcionar una serie de oligodesoxinucleótidos diana, hibridando los oligodesoxinucleótidos diana con una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN para proporcionar un perfil de hibridación de la muestra de ensayo y comparando el perfil de hibridación de la muestra de ensayo con el perfil de hibridación generado a partir de una muestra control.

Sin desear quedar ligados por teoría alguna, se cree que las alteraciones en el nivel de uno o más productos génicos del miR en las células pueden dar lugar a la desregulación de una o más posibles dianas de estos miR, lo que conduce a la formación del cáncer de pulmón. Por tanto, alterando el nivel del producto génico del miR (por ejemplo disminuyendo el nivel de un miR que está regulado positivamente en las células del cáncer de pulmón, aumentando el nivel de un miR que está regulado negativamente en las células del cáncer de pulmón) se puede tratar con éxito el cáncer de pulmón.

En consecuencia, la presente divulgación engloba procedimientos para tratar el cáncer de pulmón en un sujeto, en el que al menos un producto génico del miR está desregulado (por ejemplo, regulado negativamente, regulado positivamente) en las células (por ejemplo, células del cáncer de pulmón) del sujeto. En una divulgación, el nivel de al menos un producto génico del miR en una muestra de ensayo (por ejemplo, una muestra de cáncer de pulmón) es mayor que el nivel del correspondiente producto génico del miR en una muestra control. En otra divulgación, el nivel de al menos un producto génico del miR en una muestra de ensayo (por ejemplo, una muestra de cáncer de pulmón) es menor que el nivel del correspondiente producto génico en una muestra control. Cuando el al menos un producto génico del miR aislado está regulado negativamente en las células del cáncer de pulmón, el procedimiento comprende la administración de una cantidad eficaz del al menos un producto génico del miR aislado o una variante aislada o un fragmento biológicamente activo del mismo, de forma que se inhiba la proliferación de las células del cáncer en el sujeto. Por ejemplo, cuando un producto génico del miR está regulado negativamente en una célula cancerígena de un sujeto, la administración de una cantidad eficaz de un producto génico del miR aislado al sujeto puede inhibir la proliferación de las células cancerígenas. El producto génico del miR aislado que se administra al sujeto puede ser idéntico al producto génico silvestre endógeno del miR (por ejemplo, un producto génico del miR mostrado en la Tabla 1a o la Tabla 1b) que está regulado negativamente en la célula cancerígena o puede ser una variante o un fragmento biológicamente activo del mismo. Como se define en el presente documento, una "variante" de un producto génico del miR se refiere a un miARN que tiene menos del 100 % de identidad con el correspondiente producto génico silvestre del miR y posee una o más actividades biológicas del correspondiente producto génico silvestre del miR. Ejemplos de tales actividades biológicas incluyen, pero sin limitación, la inhibición de la expresión de una molécula de ARN diana (por ejemplo, inhibiendo la traducción de una molécula de ARN diana, modulando la estabilidad de una molécula de ARN diana, inhibiendo el procesamiento de una molécula de ARN diana) y la inhibición de un proceso celular asociado con el cáncer de pulmón (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 miR. En ciertas divulgaciones, la variante es idéntica en al menos aproximadamente el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o el 99 % a un correspondiente producto génico silvestre del miR.

Como se define en el presente documento, un "fragmento biológicamente activo" de un producto génico del miR se refiere a un fragmento de ARN de un producto génico del miR que posee una o más actividades biológicas del correspondiente producto génico silvestre del miR. Como se ha descrito anteriormente, los ejemplos de tales actividades biológicas incluyen, pero sin limitación, la inhibición de la expresión de una molécula de ARN diana y la inhibición del proceso celular asociado con cáncer de pulmón. En ciertas divulgaciones, el fragmento biológicamente

activo tiene al menos una longitud de aproximadamente 5, 7, 10, 12, 15 o 17 nucleótidos. En una divulgación particular, un producto génico del miR aislado se puede administrar a un sujeto en combinación con uno o más tratamientos anticáncer adicionales. Los tratamientos anticáncer adecuados incluyen, pero sin limitación, quimioterapia, radioterapia y combinaciones de las mismas (por ejemplo quimiorradiación).

5 Cuando el al menos un producto génico del miR aislado está regulado positivamente en las células cancerígenas, el procedimiento comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un compuesto que inhiba la expresión del al menos un producto génico del miR, de forma que se inhiba la proliferación de las células del cáncer de pulmón. Se hace referencia a tales compuestos en el presente documento como compuestos inhibidores de la expresión génica del miR. Ejemplos de compuestos inhibidores de la expresión génica del miR incluyen, pero sin limitación, los descritos en el presente documento (por ejemplo, ARN de doble cadena, ácidos nucleicos antisentido y moléculas enzimáticas de ARN). En una divulgación particular, un compuesto inhibidor de la expresión génica del miR se puede administrar a un sujeto en combinación con uno o más tratamientos anticáncer adicionales. Los tratamientos anticáncer adecuados incluyen, pero sin limitación, quimioterapia, radioterapia y la combinación de las mismas (por ejemplo, quimiorradiación).

15 En cierta divulgación, el producto génico del miR aislado que está desregulado en el cáncer de pulmón se selecciona entre el grupo que consiste en miR-21, miR-191, miR-126\*, miR-210, miR-155, miR-143, miR-205, miR-192-prec, miR-224, miR-126, miR-24-2, miR-30a-5p, miR-212, miR-140, miR-9, miR-214, miR-17-3p, miR-124a-1, miR-218-2, miR-95, miR-145, miR-198, miR-216-prec, miR-219-1, miR-106a, miR-197, miR-192, miR-125a-prec, miR-26a-1-prec, miR-146, miR-203, miR-199b-prec, let-7a-2-prec, miR-27b, miR-32, miR-29b-2, miR-220, miR-33, miR-181c-prec, miR-150, miR-101-1, miR-124a-3, miR-125a y let-7f-1. En una divulgación particular, el al menos un producto génico del miR se selecciona entre el grupo que consiste en miR-21, miR-205 y miR-216. En otra divulgación, el cáncer de pulmón es un adenocarcinoma de pulmón y el al menos un producto génico del miR se selecciona entre el grupo que consiste en miR-21, miR-191, miR-155, miR-210, miR-126\* y miR-224.

25 En una divulgación en particular, el producto génico del miR no es uno o más de let7a-2, let-7c, let-7g, let-7i, miR-7-2, miR-7-3, miR-9, miR-9-1, miR-10a, miR-15a, miR-15b, miR-16-1, miR-16-2, miR-17-5p, miR-20a, miR-21, miR-24-1, miR-24-2, miR-25, miR-29b-2, miR-30, miR-30a-5p, miR-30c, miR-30d, miR-31, miR-32, miR-34, miR-34a, miR-34a prec, miR-34a-1, miR-34a-2, miR-92-2, miR-96, miR-99a, miR-99b prec, miR-100, miR-103, miR-106a, miR-107, miR-123, miR-124a-1, miR-125b-1, miR-125b-2, miR-126\*, miR-127, miR-128b, miR-129, miR-129-1/2 prec, miR-132, miR-135-1, miR-136, miR-137, miR-141, miR-142-as, miR-143, miR-146, miR-148, miR-149, miR-153, miR-155, miR-159-1, miR-181, miR-181b-1, miR-182, miR-186, miR-191, miR-192, miR-195, miR-196-1, miR-196-1 prec, miR-196-2, miR-199a-1, miR-199a-2, miR-199b, miR-200b, miR-202, miR-203, miR-204, miR-205, miR-210, miR-211, miR-212, miR-214, miR-215, miR-217, miR-221 y/o miR-223.

35 Los términos “tratar”, “tratando” y “tratamiento”, como se utilizan en el presente documento, se refieren a la mejoría de los síntomas asociados con una enfermedad o afección, por ejemplo, el cáncer de pulmón, incluyendo la prevención o el retraso de la aparición de los síntomas de la enfermedad, y/o la disminución de la gravedad o la frecuencia de los síntomas de la enfermedad o afección. Los términos “sujeto” e “individuo” se definen en el presente documento para incluir animales, tales como mamíferos, incluyendo, pero sin limitación, primates, vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, cobayas, ratas, ratones u otras especies de bovinos, ovinos, equinos, caninos, felinos, roedores o murinos. En una divulgación preferida, el animal es un ser humano.

40 Como se utiliza en el presente documento, una “cantidad eficaz” de un producto génico del miR aislado es una cantidad suficiente para inhibir la proliferación de una célula cancerígena en un sujeto que padece cáncer de pulmón. Un experto en la técnica puede rápidamente determinar una cantidad eficaz de un producto génico del miR para administrarla a un determinado sujeto, teniendo en cuenta factores tales como el tamaño y el peso del sujeto; el grado de penetración de la enfermedad; la edad, salud y sexo del sujeto; la vía de administración; y si la administración es regional o sistémica.

45 Por ejemplo, una cantidad eficaz de un producto génico del miR aislado se puede basar en el peso aproximado de la masa tumoral que se tiene que tratar. El peso aproximado de una masa tumoral se puede determinar calculando el volumen aproximado de la masa, en la que un centímetro cúbico es equivalente más o menos a un gramo. Una cantidad eficaz del producto génico del miR aislado basándose en el peso de la masa tumoral puede estar en el intervalo de aproximadamente 10-500 microgramos/gramo de masa tumoral. En ciertas divulgaciones, la cantidad eficaz puede ser de al menos aproximadamente 10 microgramos/gramo de masa tumoral, al menos aproximadamente 60 microgramos/gramo de masa tumoral o al menos aproximadamente de 100 microgramos/gramo de masa tumoral.

55 Una cantidad eficaz de un producto génico del miR aislado también se puede basar en el peso corporal aproximado o estimado del sujeto que se tiene que tratar. Preferentemente, tales cantidades eficaces se administran parenteral o entéricamente, como se describe en el presente documento. Por ejemplo, una cantidad eficaz del producto génico del miR aislado que se administra a un sujeto puede variar de aproximadamente 5 – 3000 microgramos/kg de peso corporal, de aproximadamente 700 – 1000 microgramos/kg de peso corporal o aproximadamente más de 1000 microgramos/kg de peso corporal.

- Un experto en la técnica también puede determinar fácilmente un régimen de dosificación apropiado para la administración de un producto génico del miR aislado a un determinado sujeto. Por ejemplo, un producto génico del miR se puede administrar al sujeto una vez (por ejemplo como inyección única o de depósito). De manera alternativa, un producto génico del miR se puede administrar una vez o dos veces al día a un sujeto durante un periodo de aproximadamente tres a aproximadamente veintiocho días, más particularmente de aproximadamente siete a aproximadamente diez días. En un régimen de dosificación particular, un producto génico del miR se administra una vez al día durante siete días. Cuando un régimen de dosificación comprende múltiples administraciones, se entiende que la cantidad eficaz del producto génico del miR administrado al sujeto puede comprender la cantidad total del producto génico administrado durante el régimen de dosificación completo.
- Como se utiliza en el presente documento, un producto génico del miR "aislado" es uno que se sintetiza o se altera o se extrae de su estado natural por medio de la intervención humana. Por ejemplo, un producto génico del miR sintético o un producto génico del miR separado parcial o completamente de los materiales con los que coexiste en su estado natural, se considera que está "aislado". Un producto génico del miR aislado puede existir en una forma sustancialmente purificada o puede existir en una célula a la que se le ha suministrado el producto génico del miR. Por tanto, un producto génico del miR que se ha suministrado deliberadamente a o se ha expresado en, una célula, se considera un producto génico del miR "aislado". Un producto génico del miR producido dentro de una célula a partir de una molécula precursora de un miR también se considera que es una molécula "aislada". Según la presente divulgación, los productos génicos del miR aislados descritos en el presente documento se pueden utilizar para la fabricación de un medicamento para tratar el cáncer de pulmón en un sujeto (por ejemplo, un ser humano).
- Los productos génicos del miR aislados se pueden obtener utilizando varias técnicas de referencia. Por ejemplo, los productos génicos del miR se pueden sintetizar químicamente o producirse de forma recombinante utilizando procedimientos conocidos en la técnica. En una divulgación, los productos génicos del miR se sintetizan químicamente utilizando fosforamiditas de nucleósido protegidas apropiadamente y un sintetizador convencional de ADN/ARN. Se incluyen entre los proveedores comerciales de moléculas sintéticas de ARN o reactivos de síntesis, por ejemplo, Prologo (Hamburgo, Alemania), Dharmacon Research (Lafayette, CO, U.S.A.), Pierce Chemical (parte de Perbio Science, Rockford, IL, U.S.A.), Glen Research (Sterling, VA, U.S.A.), ChemGenes (Ashland, MA, U.S.A.) y Cruachem (Glasgow, RU).
- De manera alternativa, los productos génicos del miR se pueden expresar a partir de plásmidos ADN recombinantes circulares o lineales utilizando cualquier promotor adecuado. Los promotores adecuados para expresar ARN a partir de un plásmido incluyen, por ejemplo, las secuencias promotoras U6 o H1 de la 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 divulgación también pueden comprender promotores inducibles o regulables para la expresión de los productos génicos del miR en las células cancerosas.
- Los productos génicos del miR que se expresan a partir de plásmidos recombinantes se pueden aislar de sistemas de expresión de cultivos celulares por técnicas de referencia. Los productos génicos del miR que se expresan de los plásmidos recombinantes también pueden suministrarse a y expresarse directamente en las células cancerosas. El uso de plásmidos recombinantes para suministrar los productos génicos del miR a las células cancerosas se trata con más detalle posteriormente.
- Los productos génicos se pueden expresar de un plásmido recombinante aparte o se pueden expresar del mismo plásmido recombinante. En una divulgación, los productos génicos del miR se expresan como moléculas precursoras de ARN a partir de un único plásmido y las moléculas precursoras se procesan para producir el producto génico del miR funcional por medio de un sistema de procesamiento adecuado, incluyendo, pero sin limitación, los restantes sistemas de procesamiento que existen en una célula cancerígena. Otros sistemas de procesamiento adecuados incluyen, por ejemplo, el sistema de lisado celular de *Drosófila in vitro* (por ejemplo, como el descrito en la Solicitud de Patente de Estados Unidos publicada N° 2002/0086356 a Tuschl y col.) y el sistema ARNasa III de *E.coli* (por ejemplo, como el que se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos publicada N° 2004/0014113 a Yang y col.).
- La selección de plásmidos adecuada para expresar los productos génicos del miR, los procedimientos para insertar las secuencias de ácido nucleico en el plásmido para expresar los productos génicos y los procedimientos para suministrar el plásmido recombinante a las células de interés, están dentro de la experiencia de la técnica. Véanse, 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.
- En una divulgación, un plásmido que expresa los productos génicos del miR comprende una secuencia que codifica un ARN precursor del miR bajo el control del promotor temprano intermedio del CMV. Como se utiliza en el presente documento, "bajo el control" de un promotor significa que las secuencias del ácido nucleico que codifican el producto génico del miR están localizados en el 3' del promotor, de forma que el promotor puede iniciar la transcripción de las secuencias codificantes del producto génico del miR.

Los productos génicos del miR también se pueden expresar a partir de vectores virales recombinantes. Se considera que los productos génicos del miR se pueden expresar a partir de dos vectores virales recombinantes separados o a partir del mismo vector viral. El ARN expresado a partir de vectores virales recombinantes puede aislarse de sistemas de expresión de cultivos celulares por técnicas de referencia o puede expresarse directamente en las células cancerosas. El uso de vectores virales recombinantes para suministrar los productos génicos del miR a las células cancerosas se trata con mayor detalle posteriormente.

Los vectores virales recombinantes de la divulgación comprenden secuencias que codifican los productos génicos del miR y cualquier promotor adecuado para expresar secuencias de ARN. Los promotores adecuados incluyen, pero sin limitación, las secuencias de promotor U6 o H1 de la ARN pol III o los promotores de citomegalovirus. La selección de otros promotores adecuados está dentro de la experiencia de la técnica. Los vectores virales recombinantes de la divulgación también pueden comprender promotores inducibles o regulables para la expresión de los productos génicos del miR en una célula cancerosa.

Se puede utilizar cualquier vector viral capaz de aceptar las secuencias codificantes para los productos génicos del miR; por ejemplo, vectores que derivan de adenovirus (AV); adenovirus asociados (AAV); retrovirus (por ejemplo, lentivirus (LV), rabdovirus, virus de leucemia murina); herpesvirus y similares. El tropismo de los vectores virales se puede modificar seudotipando los vectores con envueltas de proteínas u otros antígenos de superficie de otros virus o sustituyendo diferentes proteínas de la cápside vírica, según sea apropiado.

Por ejemplo, los vectores lentivirales de la divulgación se pueden seudotipar con proteínas de superficie del virus de la estomatitis vesicular (VSV), rabia, Ébola, Mokola y similares. Los vectores AAV de la divulgación se pueden hacer para dirigirse a diferentes células manipulando los vectores para que expresen diferentes serotipos de proteínas de la cápside. Por ejemplo, un vector AAV que exprese un serotipo 2 de cápside sobre un genoma de serotipo 2 se llama AAV 2/2. Este gen de cápside de serotipo 2 en el vector 2/2 se puede remplazar por un gen de serotipo 5 de cápside para producir un vector AAV 2/5. Las técnicas para construir vectores AAV que expresen diferentes serotipos de proteínas de la cápside están dentro de la experiencia de la técnica; véase, por ejemplo, Rabinowitz, J.E. y col. (2002), *J. Virol.* 76: 791-801.

La selección de vectores virales recombinantes adecuados para su uso en la divulgación, los procedimientos para insertar secuencias de ácidos nucleicos para expresar ARN en el vector, los procedimientos de suministro del vector viral a las células de interés y la recuperación de los productos de ARN expresados están en la experiencia de la técnica. Véase, por ejemplo, Dornburg (1995), *Gene Therap.* 2: 301-310; Eglitis (1988), *Biotechniques* 6: 608-614; Miller (1990), *Hum. Gene Therap.* 1: 5-14; y Anderson (1998), *Nature* 392: 25-30,

Son particularmente adecuados los vectores derivados de AV y AAV. Un vector AV adecuado para expresar los productos génicos del miR, un procedimiento para construir un vector AV recombinante y un procedimiento para suministrar el vector en las células diana, se describen en Xia y col. (2002), *Nat. Biotech.* 20: 1006-1010. Los vectores AAV adecuados para expresar los productos génicos del miR, los procedimientos para construir el vector AAV recombinante y los procedimientos para suministrar los vectores en las células diana se describen en Samulski y col. (1987), *J. Virol.* 61: 3096-3101; Fisher y col. (1996), *J. Virol.*, 70: 520-532; Samulski y col. (1989), *J. virol.* 63: 3822-3826; Patente de Estados Unidos N° 5.252.479; Patente de Estados Unidos N° 5.139.941; Solicitud de Patente Internacional N° WO 94/13788; y Solicitud de Patente Internacional N° WO 93/24641. En una divulgación, los productos génicos del miR se expresan de un vector AAV recombinante único que comprende el promotor temprano intermedio del CMV.

En cierta divulgación, un vector viral AAV recombinante comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un ARN precursor del miR en conexión operativa con una secuencia del extremo poliT bajo el control de un ARN promotor U6 humano. Como se utiliza en el presente documento "en conexión operativa con una secuencia del extremo poliT" significa que las secuencias de ácido nucleico que codifican las cadenas sentido o antisentido están inmediatamente adyacentes a la señal del extremo T en la dirección 5'. Durante la transcripción de las secuencias del miR a partir del vector, el extremo poliT actúa para terminar la transcripción.

En otras divulgaciones de los procedimientos de tratamiento, se puede administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un compuesto inhibidor de la expresión del miR. Como se utiliza en el presente documento, "inhibidor de la expresión del miR" significa que la producción del precursor y/o el producto génico del miR maduro, activo tras el tratamiento es menor que la cantidad producida antes del tratamiento. Un experto en la técnica puede fácilmente determinar si la expresión del miR se ha inhibido en una célula cancerosa, utilizando, por ejemplo, las técnicas para determinar el nivel de transcripción del miR revisadas en el presente documento. La inhibición puede producirse a nivel de la expresión génica (es decir, inhibiendo la transcripción de un gen miR que codifica el producto génico del miR) o a nivel del procesamiento (por ejemplo, inhibiendo el procesamiento de un precursor del miR que da lugar a un miR maduro, activo).

Como se utiliza en el presente documento, una "cantidad eficaz" de un compuesto inhibidor de la expresión del miR es una cantidad suficiente para inhibir la proliferación de una célula cancerosa en un sujeto que padece un cáncer (por ejemplo, un cáncer de pulmón). Un experto en la técnica puede fácilmente determinar una cantidad eficaz de un compuesto inhibidor de la expresión de un miR que se tiene que administrar a un sujeto determinado, teniendo en

cuenta factores tales como el tamaño y el peso del sujeto; el grado de penetración de la enfermedad; la edad, salud y sexo del sujeto; la vía de administración; y si la administración es regional o sistémica.

5 Por ejemplo, una cantidad eficaz del compuesto inhibidor de la expresión se puede basar en el peso aproximado de la masa tumoral que se tiene que tratar, como se ha descrito en el presente documento. Una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe la expresión del miR se puede basar también en el peso corporal aproximado o estimado de un sujeto que se tiene que tratar, como se ha descrito en el presente documento.

10 Un experto en la técnica también puede determinar fácilmente un régimen de dosificación apropiado para la administración de un compuesto a un sujeto determinado que inhiba la expresión del miR, como se ha descrito en el presente documento. Los compuestos adecuados para inhibir la expresión del gen miR incluyen el ARN de cadena doble (tal como el ARN corto o pequeño interferente o "ARNsi"), los ácidos nucleicos antisentido y las moléculas enzimáticas de ARN, tales como las ribozimas. Cada uno de estos compuestos se puede dirigir a un determinado producto génico del miR e interfiere con la expresión (por ejemplo, inhibiendo la traducción, induciendo la escisión y/o la degradación) del producto génico del miR diana.

15 Por ejemplo, la expresión de un determinado gen miR se puede inhibir induciendo la interferencia de ARN del gen miR con una molécula aislada de ARN de doble cadena (ARNds) 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 del miR. En una divulgación en particular, la molécula de ARNds es un "ARN corto o pequeño interferente" o "ARNsi".

20 El ARNsi útil en los procedimientos presentes comprende un ARN corto de doble cadena con una longitud aproximada de 17 nucleótidos a aproximadamente 29 nucleótidos, preferentemente una longitud de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos. El ARNsi comprende una cadena ARN sentido y una cadena de ARN antisentido complementaria hibridadas juntas por las interacciones de emparejamiento de bases de referencia de Watson-Crick (en lo sucesivo en la presente memoria "emparejamiento de bases"). La cadena sentido comprende una secuencia de ácido nucleico que es sustancialmente idéntica a la secuencia de ácido nucleico que está contenida en el producto génico del miR diana.

25 Como se utiliza en el presente documento, una secuencia de ácido nucleico en un ARNsi que es "sustancialmente idéntica" a una secuencia diana que está contenida en el miARN diana, es una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia diana o que se diferencia de la secuencia diana por uno o dos nucleótidos. Las cadenas de ARNsi sentido y antisentido pueden comprender dos moléculas complementarias de ARN de cadena única o comprender una única molécula en la que dos partes complementarias están emparejadas y unidas covalentemente por un área "horquilla" de una cadena única.

30 El ARNsi también puede ser un ARN alterado, que difiere del ARN que se produce naturalmente, por adición, delección, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Tales alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleotídico, tal como el de los extremos del ARNsi o de uno o más nucleótidos internos del ARNsi o modificaciones que hacen que el ARNsi sea resistente a la digestión por nucleasas o la sustitución de uno o más nucleótidos en el ARNsi por desoxirribonucleótidos.

35 Una o ambas cadenas del ARNsi pueden comprender también un saliente 3'. Como se utiliza en el presente documento, un "saliente 3'" se refiere a al menos un nucleótido no emparejado que se extiende desde el extremo 3' de una cadena de ARN duplicada. Por eso, en ciertas divulgaciones, el ARNsi comprende al menos un saliente 3' de una longitud de 1 a aproximadamente 6 nucleótidos (que incluyen ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos), de una longitud de 1 a aproximadamente 5 nucleótidos, de una longitud de 1 a aproximadamente 4 nucleótidos o de una longitud de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 nucleótidos. En una divulgación en particular, el saliente 3' está presente en ambas cadenas del ARNsi y tiene una longitud de 2 nucleótidos. Por ejemplo cada cadena del ARNsi puede comprender salientes 3' de ácido ditimidílico ("TT") o ácido diuridílico ("uu").

40 El ARNsi se puede producir química o biológicamente o se puede expresar a partir de un plásmido recombinante o un vector viral, como se ha descrito anteriormente para los productos génicos del miR aislados. Los procedimientos ilustrativos para producir y ensayar las moléculas de ARNds o ARNsi se describen en la Solicitud de Patente de Estados Unidos publicada N° 2002/0173478 a Gewirtz y en la Solicitud de Patente de Estados Unidos publicada N° 2004/0018176 a Reich y col.

45 La expresión de un determinado gen miR también se puede inhibir por un ácido nucleico antisentido. Como se utiliza en el presente documento, un "ácido nucleico antisentido" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se une al ARN diana por medio de interacciones de ácidos nucleicos ARN-ARN, ARN-ADN o ARN-péptido, que alteran la actividad del ARN diana. Los ácidos nucleicos antisentido adecuados para su uso en los presentes procedimientos son ácidos nucleicos de cadena única (por ejemplo, ARN, ADN, quimeras ARN-ADN, ácidos nucleicos peptídicos (PNA)) que generalmente comprenden una secuencia de ácido nucleico complementaria con una secuencia de ácido nucleico contigua en un producto génico de un miR. El ácido nucleico antisentido puede comprender una secuencia de ácido nucleico que tiene una complementariedad del 50 al 100 %, el 75-100 % de complementariedad o el 95-100 % de complementariedad con una secuencia de ácido nucleico contigua en un producto génico de miR.

Las secuencias de ácido nucleico de particulares productos génicos del miR humanos se proporcionan en la Tabla 1a y en la Tabla 1b. Sin desear quedar ligados por teoría alguna, se cree que los ácidos nucleicos antisentido activan la ARNasa H u otra nucleasa celular que digiere el dúplex producto génico del miR/ácido nucleico antisentido.

5 Los ácidos nucleicos antisentido también pueden contener modificaciones en la cadena principal del ácido nucleico o en los restos azúcar y base (o su equivalente) para mejorar la especificidad con la diana, la resistencia a las nucleasas, el suministro u otras propiedades relacionadas con la eficacia de la molécula. Tales modificaciones incluyen restos de colesterol, intercaladores de dúplex, tales como la acridina o uno o más grupos resistentes a la nucleasa.

10 Los ácidos nucleicos antisentido se pueden producir química o biológicamente o pueden expresarse a partir de un plásmido recombinante o un vector viral, como se ha descrito anteriormente para los productos génicos del miR aislado. Los procedimientos ilustrativos para producirlos y ensayarlos están en la experiencia de la técnica, véase, por ejemplo, Stein y Cheng (1993), Science 261: 1004 y la Patente de Estados Unidos Nº 5.849.902 de Woolf y col.

15 La expresión de un determinado gen miR también se puede inhibir por un ácido nucleico enzimático. Como se utiliza en el presente documento, un "ácido nucleico enzimático" se refiere a un ácido nucleico que comprende una región de unión al sustrato que tiene complementariedad con una secuencia de ácido nucleico contigua de un producto génico del miR y que es capaz de escindir específicamente el producto génico del miR. La región de unión al sustrato del ácido nucleico enzimático puede ser, por ejemplo, complementaria en un 50-100 %, complementaria en un 75-100 % o complementaria en un 95-100 % con una secuencia de ácido nucleico contigua en un producto  
20 génico del miR. Los ácidos nucleicos enzimáticos también pueden comprender modificaciones en la base, azúcar, y/o grupos fosfato. Un ácido nucleico enzimático ejemplar para su uso en los presentes procedimientos es una ribozima.

25 Los ácidos nucleicos enzimáticos se pueden producir química o biológicamente o se pueden expresar a partir de un plásmido recombinante o un vector viral, como se ha descrito anteriormente para los productos génicos del miR aislados. Los procedimientos ilustrativos para producir y ensayar moléculas de ARNs o ARNs<sub>i</sub> se describen en Wemer and Uhlenbeck (1995), Nucl. Acids Res. 23: 2092-96; Hammann y col. (1999), Antisense and Nucleic Acid Drug Dev. 9: 25-3 1; y Patente de Estados Unidos Nº 4.987.071 de Cech y col.

30 La administración de al menos un producto génico del miR o al menos un compuesto para inhibir la expresión del miR inhibirá la proliferación de las células cancerosas en un sujeto que tenga un cáncer (por ejemplo, un cáncer de pulmón). Como se utiliza en el presente documento, "inhibir la proliferación de una célula cancerosa" significa matar la célula o arrestarla temporal o permanentemente o ralentizar el crecimiento de la célula. La inhibición de la proliferación celular del cáncer se puede inferir si el número de tales células en el sujeto permanece constante o disminuye tras la administración de los productos génicos del miR o de los compuestos inhibidores de la expresión  
35 génica del miR. Una inhibición de la proliferación celular del cáncer también se puede inferir si el número absoluto de tales células aumenta, pero la tasa de crecimiento del tumor disminuye.

El número de células cancerosas en el cuerpo de un sujeto se puede determinar por medición directa o por estimación a partir del tamaño de las masas tumorales primaria o metastásica. Por ejemplo, el número de células en un sujeto se puede medir por procedimientos inmunohistológicos, citometría de flujo, u otras técnicas diseñadas para detectar los marcadores de superficie característicos de las células cancerosas.

40 El tamaño de una masa tumoral puede determinarse por observación visual directa o por procedimientos de diagnóstico por imagen, tales como rayos X, imágenes de resonancia magnética, ultrasonidos y centellografía. Los procedimientos de diagnóstico por imagen que se usan para determinar el tamaño de una masa tumoral se pueden utilizar con o sin agentes de contraste, como se conoce en la técnica. El tamaño de una masa tumoral también puede determinarse por medios físicos, tales como palpación del tejido de la masa o medición del tejido de la masa  
45 con un instrumento de medida, tal como un calibre.

Los productos génicos del miR o los compuestos inhibidores de la expresión génica del miR se pueden administrar a un sujeto por cualquier medio adecuado para suministrar estos compuestos a las células cancerosas del sujeto. Por ejemplo, los productos génicos del miR o los compuestos inhibidores de la expresión del miR se pueden administrar por procedimientos adecuados para transfectar células del sujeto con estos compuestos o con ácidos nucleicos que  
50 comprenden secuencias que codifican estos compuestos. En una divulgación, las células se transfectan con un plásmido o un vector viral que comprenden secuencias que codifican al menos un producto génico del miR o un compuesto inhibidor de la expresión génica el miR.

Los procedimientos de transfección para células eucariotas se conocen bien en la técnica, e incluyen, por ejemplo, la inyección directa del ácido nucleico en el núcleo o pronúcleo de una célula; la electroporación; la transferencia por liposomas o la transferencia mediada por materiales lipófilos; el suministro de ácido nucleico mediado por receptor, biobalística o aceleración de partículas; precipitación en fosfato cálcico y la transfección mediada por vectores  
55 virales.

Por ejemplo, las células pueden transfectarse con un compuesto de transferencia liposómico, por ejemplo, DOTAP

(N-[1-(2,3-dioleoiloxi) propil]-N, N, N-trimetil-amonio metilsulfato, Boehringer-Mannheim) o un equivalente, tal como la LIPOFECTINA. La cantidad de ácido nucleico utilizado no es crítica para la práctica de la divulgación; se pueden alcanzar resultados aceptables con 0,1-100 microgramos de ácido nucleico/10<sup>5</sup> células. Por ejemplo, se puede utilizar una relación de aproximadamente 0,5 microgramos de vector plásmido en 3 microgramos de DOTAP por 10<sup>5</sup> células

Un producto génico del miR o el compuesto inhibidor de la expresión génica del miR también se pueden administrar a un sujeto por cualquier vía de administración adecuada entérica o parenteral. Las vías adecuadas de administración entérica para los presentes procedimientos incluyen, por ejemplo, el suministro oral, rectal o intranasal. Las vías de administración parenteral adecuadas incluyen, por ejemplo, la administración intravascular (por ejemplo, la inyección intravenosa en bolo, la infusión intravenosa, la inyección intra-arterial en bolo, la infusión intra-arterial y la instilación por catéter en el sistema vascular); la inyección peri e intratisular (por ejemplo, la inyección peri e intratisular, la inyección intrarretiniana o la inyección subretiniana); la inyección subcutánea o de depósito, incluyendo la infusión subcutánea (tal como las bombas osmóticas); la aplicación directa sobre el tejido de interés, por ejemplo por medio de un catéter u otro dispositivo de aplicación (por ejemplo, un microgránulo retiniano o un supositorio o un implante que comprenda un material poroso, no poroso o gelatinoso); y por inhalación. Las vías de administración particularmente adecuadas son la inyección, la infusión y la inyección directa en el tumor.

En los presentes procedimientos, un producto génico del miR o un compuesto inhibidor de la expresión génica de un miR se puede administrar al sujeto o bien como ARN desnudo, en combinación con un reactivo de suministro o bien como un ácido nucleico (por ejemplo, un plásmido recombinante o un vector viral) que comprendan secuencias que expresan el producto génico del miR o el compuesto inhibidor de la expresión génica del miR. Los reactivos de suministro adecuados incluyen, por ejemplo, el reactivo lipófilo Mirus Transit TKO; LIPOFECTINA; lipofectamina; cellfectina; policationes (por ejemplo, la polilisina) y liposomas.

Los plásmidos recombinantes y los vectores virales comprenden secuencias que expresan los productos génicos del miR o los compuestos inhibidores de la expresión génica el miR y las técnicas para suministrar tales plásmidos y vectores a las células cancerosas, se tratan en el presente documento y/o son bien conocidas en la técnica.

En una divulgación particular, se utilizan liposomas para suministrar el producto génico del miR o el compuesto inhibidor de la expresión génica del miR (o ácidos nucleicos que comprenden secuencias que los codifican) a un sujeto. Los liposomas también pueden aumentar la vida media sanguínea de los productos génicos o los ácidos nucleicos. Los liposomas adecuados para su uso en la divulgación se pueden formar a partir de los lípidos formadores de vesículas de referencia, que generalmente incluyen fosfolípidos cargados negativamente o neutros y un esteroles, tal como el colesterol. La selección de los lípidos está guiada generalmente por la consideración de ciertos factores, tales como el tamaño deseado del liposoma y la vida media de los liposomas en la corriente sanguínea. Se conocen varios procedimientos para preparar liposomas, por ejemplo, los que se describen en Szoka y col. (1980), Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467; y Patentes de Estados Unidos N° 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028 y 5.019.369.

Los liposomas para su uso en los presentes procedimientos pueden comprender una molécula ligando que dirija el liposoma a las células cancerosas. Se prefieren los ligandos que se unen a los receptores prevalentes en las células cancerosas, tales como los anticuerpos monoclonales que se unen a los antígenos celulares del tumor.

Los liposomas para su uso en los presentes procedimientos también se pueden modificar de forma que eviten su eliminación por el sistema mononuclear fagocitario ("MMS") y el sistema reticuloendotelial ("RES"). Tales liposomas modificados tienen restos inhibidores de la opsonización sobre la superficie o incorporados en la estructura del liposoma. En una divulgación particularmente preferida, un liposoma puede comprender un resto inhibidor de la opsonización y un ligando.

Los restos inhibidores de la opsonización para su uso en la preparación de los liposomas desvelados son normalmente grandes polímeros hidrófilos que se unen a la membrana del liposoma. Como se utiliza en el presente documento, un resto inhibidor de la opsonización se "une" a la membrana de un liposoma cuando se fija química o físicamente a la membrana, por ejemplo, por intercalación de un ancla liposoluble en la misma membrana o uniéndose directamente a grupos activos de los lípidos de la membrana. Estos polímeros hidrófilos inhibidores de la opsonización forman una capa de superficie protectora que disminuye significativamente la captación de los liposomas por el MMS y RES; por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 4.920.016.

Los restos inhibidores de la opsonización adecuados para modificar los liposomas son preferentemente polímeros solubles en agua con un peso molecular medio de aproximadamente 500 a aproximadamente 40.000 Dalton y más preferentemente de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 20.000 Dalton. Tales polímeros incluyen el polietilenglicol (PEG) o polipropilenglicol (PPG) o derivados de los mismos; por ejemplo, metoxi PEG o PPG y estearato de PEG o PPG; polímeros sintéticos, tales como poliacrilamida o poli N-vinil pirrolidona; poliamidoaminas lineales, ramificadas o dendriméricas; ácidos poliacrílicos, polialcoholes, por ejemplo, alcohol polivinílico y polixilitol a los que se unen químicamente los grupos amino o carboxílico, así como gangliósidos, tales como el gangliósido GM1. También son adecuados los copolímeros de PEG, metoxiPEG o metoxiPPG o derivados de los mismos.

Además, el polímero inhibidor de la opsonización puede ser un copolímero de bloque de PEG y o un poliaminoácido, polisacárido, poliamidoamina, polietilenoamina o polinucleótido. Los polímeros inhibidores de la opsonización también pueden ser polisacáridos naturales que contengan aminoácidos o ácidos carboxílicos, por ejemplo, ácido galacturónico, ácido glucurónico, ácido manurónico, ácido hialurónico, ácido péctico, ácido neuramínico, ácido algínico, carragenano; polisacáridos u oligosacáridos aminados (lineales o ramificados); o polisacáridos u oligosacáridos carboxilados, por ejemplo, que reaccionan con derivados de ácidos carbónicos con el resultado de unión de grupos carboxílicos. Preferentemente, el resto inhibidor de la opsonización es un PEG, PPG o un derivado de los mismos. Los liposomas modificados con PEG o derivados del PEG se llaman a veces "liposomas PEGilados".

El resto inhibidor de la opsonización se puede unir a la membrana del liposoma por cualquiera de las numerosas técnicas que son bien conocidas. Por ejemplo, un N-hidroxisuccinimida éster de PEG puede unirse a un ancla liposoluble fosfatidil-etanolamina y después se unen a la membrana. De manera similar, se puede derivar un polímero de dextrano con un ancla liposoluble estearilamina por medio de aminación reductiva utilizando Na (CN) BH3 y una mezcla disolvente, tal como tetrahidrofurano y agua en una relación de 30:12 a 60 °C.

Los liposomas modificados con restos inhibidores de la opsonización permanecen en la circulación mucho más tiempo que los liposomas que no están modificados. Por esta razón, tales liposomas a veces se denominan liposomas "furtivos". Los liposomas furtivos se conocen por acumularse en los tejidos irrigados por un sistema microvascular poroso o "permeable". Por tanto, el tejido que se caracteriza por esos defectos en el sistema microvascular, como por ejemplo, los tumores sólidos (por ejemplo, los cánceres de pulmón), acumularán eficazmente estos liposomas; véase Gabizon y col. (1988), Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 18: 6949-53. Además, su reducida captación por el RES disminuye la toxicidad de los liposomas furtivos previniendo significativamente la acumulación de los liposomas en el hígado y el bazo. Por tanto, los liposomas que se han modificado con restos inhibidores de la opsonización son particularmente adecuados para suministrar los productos génicos del miR o los compuestos inhibidores de la expresión génica del miR (o los ácidos nucleicos que comprenden secuencias que los codifican) a las células tumorales.

Los productos génicos del miR o los compuestos inhibidores de la expresión génica del miR se pueden formular como composiciones farmacéuticas, a veces llamadas "medicamentos", antes de administrarlos a un sujeto, según las técnicas conocidas en la técnica. En consecuencia, la divulgación engloba composiciones farmacéuticas para tratar el cáncer de pulmón. En una divulgación, la composición farmacéutica comprende al menos un producto génico del miR aislado o una variante aislada o un fragmento biológicamente activo del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una divulgación particular, el al menos un producto génico del miR se corresponde con un producto génico del miR que tiene un nivel de expresión disminuido en las células del cáncer de pulmón con respecto a las células de control adecuadas. En ciertas divulgaciones el producto génico del miR se selecciona entre el grupo que consiste en miR-126\*, miR-192, miR-224, miR-126, miR-30a-5p, miR-140, miR-9, miR-124a-1, miR-218-2, miR-95, miR-145, miR-198, miR-216, miR-219-1, miR-125a, miR-26a-1, miR-199b, let-7a-2, miR-27b, miR-32, miR-29b-2, miR-220, miR-33, miR-181c, miR-101-1, miR-124a-3, miR-125b-1, let-7f-1 y una combinación de los mismos. En una divulgación, el producto génico del miR aislado no es miR-15a o miR-16-1. En una divulgación adicional, el producto génico del miR no es miR-210 o miR-212. En otra divulgación, el producto génico del miR no es miR-21, miR-143, miR-205 o miR-9. En otra divulgación más, el producto génico del miR no es miR-21, miR-191, miR-126\*, miR-210, miR-155, miR-143, miR-205, miR-126, miR-30a-5p, miR-140, miR-214, miR-218-2, miR-145, miR-106a, miR-192, miR-203, miR-150, miR-220, miR-212 o miR-9.

En otras divulgaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden al menos un compuesto inhibidor de la expresión del miR. En una divulgación particular, el al menos un compuesto inhibidor de la expresión génica del miR es específico para un gen miR cuya expresión es mayor en las células del cáncer de pulmón que en las células de control. En ciertas divulgaciones, el compuesto inhibidor de la expresión génica del miR es específico para uno o más productos génicos del miR seleccionados entre el grupo que consiste en miR-21, miR-191, miR-210, miR-155, miR-205, miR-24-2, miR-212, miR-214, miR-17-3p, miR-106a, miR-197, miR-192, miR-146, miR-203, miR-150 y una combinación de los mismos. En una divulgación, el producto génico del miR aislado no es específico para miR-15a o miR-16-1. En una divulgación adicional, el producto génico del miR no es específico para miR-210 o miR-212. En otra divulgación, el producto génico del miR no es específico para miR-21, miR-143, miR-205 o miR-9. En otra divulgación más, el producto génico del miR no es específico para miR-21, miR-191, miR-126\*, miR-210, miR-155, miR-143, miR-205, miR-126, miR-30a-5p, miR-140, miR-214, miR-218-2, miR-145, miR-106a, miR-192, miR-203, miR-150, miR-220, miR-212 o miR-9. Las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación se caracterizan por ser al menos estériles y libres de pirógenos. Como se utiliza en el presente documento, las "composiciones farmacéuticas" incluyen las formulaciones para seres humanos y de uso veterinario. Los procedimientos para preparar las composiciones farmacéuticas desveladas están en la experiencia de la técnica, por ejemplo, como se describen Remington's Pharmaceutical Science, 17<sup>a</sup> ed., Mack Publishing Company, Easton, PA. (1985).

Las presentes composiciones farmacéuticas comprenden al menos un producto génico del miR o un compuesto inhibidor de la expresión génica del miR (o al menos un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el producto génico del miR o el compuesto inhibidor de la expresión génica del miR) (por ejemplo, del 0,1 al 90 % en peso) o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, mezclado con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertas divulgaciones, la composición farmacéutica comprende adicionalmente uno o más agentes anticáncer (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos). Las formulaciones farmacéuticas de la divulgación pueden comprender

también al menos un producto génico del miR o un compuesto inhibidor de la expresión génica del miR (o al menos un ácido nucleico que comprenda secuencias que codifiquen el producto génico del miR o un compuesto inhibidor de la expresión génica del miR), que está encapsulado por liposomas y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una divulgación, la composición farmacéutica comprende un gen miR o un producto génico que no es del miR-15, miR-16, miR-143 y/o miR-145.

Vehículos farmacéuticamente aceptables especialmente adecuados son el agua, el agua tamponada, la solución salina normal, la solución salina al 0,4 %, la glicina al 0,3 %, el ácido hialurónico y similares.

En una divulgación particular, las composiciones farmacéuticas comprenden al menos un producto génico del miR o un compuesto inhibidor de la expresión génica del miR (o al menos un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el producto génico del miR o el compuesto inhibidor de la expresión génica del miR) que es resistente a la degradación por nucleasas. Un experto en la técnica puede fácilmente sintetizar ácidos nucleicos que sean resistentes a las nucleasas, por ejemplo incorporando uno o más ribonucleótidos que están modificados en la posición 2' en el producto génico del miR. Los ribonucleótidos modificados en 2' adecuados incluyen aquellos modificados en la posición 2' con fluoro, amino, alquil, alcoxi y O-alil.

Las composiciones farmacéuticas desveladas también pueden comprender excipientes y/o aditivos farmacéuticos convencionales. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen estabilizadores, antioxidantes, agentes para ajustar la osmolalidad, tampones y agentes para ajustar el pH. Los aditivos adecuados incluyen, por ejemplo, tampones fisiológicamente biocompatibles (por ejemplo, hidrócloruro de trometamina), adiciones de quelantes (tales como, por ejemplo, DTPA o DTPA-bisamida) o complejos quelantes del calcio (tales como, por ejemplo, DTPA cálcico o CaNaDTPA-bisamida) u, opcionalmente, adiciones de sales de calcio o sodio (por ejemplo, cloruro cálcico, ascorbato cálcico, gluconato cálcico o lactato cálcico). Las composiciones farmacéuticas desveladas pueden envasarse para su uso en forma líquida o pueden estar liofilizados.

Para las composiciones farmacéuticas sólidas de la divulgación, se pueden utilizar vehículos farmacéuticamente aceptables, convencionales, sólidos, no tóxicos; por ejemplo, manitol, lactosa, almidón, estearato magnésico, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato magnésico y similares de calidad farmacéutica.

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 del miR o un compuesto inhibidor de la expresión génica del miR (o al menos un ácido nucleico que comprende una secuencia que los codifica). Una composición farmacéutica para administración por aerosol (vía inhalatoria) puede comprender del 0,01-20 % en peso, preferentemente del 1 %-10 % en peso, del al menos un producto génico del miR o un compuesto inhibidor de la expresión génica del miR (o al menos un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el producto génico del miR o el compuesto inhibidor de la expresión génica del miR) encapsulado en un liposoma como se ha descrito anteriormente y un propulsor. Se puede incluir también, si se desea, un vehículo; por ejemplo, lecitina para suministro intranasal.

Las composiciones farmacéuticas desveladas pueden comprender además uno o más agentes anticáncer. En una divulgación particular, las composiciones comprenden al menos un producto génico del miR o un compuesto inhibidor de la expresión génica del miR (o al menos un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el producto génico del miR o el compuesto inhibidor de la expresión del miR) y al menos un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos que son adecuados para los procedimientos desvelados incluyen, pero sin limitación, agentes alquilantes de ADN, agentes antibióticos antitumorales, agentes antimetabólicos, agentes estabilizadores de la tubulina, agentes desestabilizantes de la tubulina, agentes antagonistas hormonales, inhibidores de la topoisomerasa, inhibidores de la proteína quinasa, inhibidores de HMG-CoA, inhibidores de la CDK, inhibidores de la ciclina, inhibidores de la caspasa, inhibidores de la metaloproteinasas, ácidos nucleicos antisentido, ADN de triple hélice, aptámeros de ácidos nucleicos y agentes virales, bacterianos o exotóxicos modificados molecularmente. Ejemplos de agentes adecuados para las composiciones incluyen, pero sin limitación, arabinósido de citidina, metotrexato, vincristina, etopósido (VP-16), doxorubicina (adriamicina), cisplatino (CDDP), dexametasona, arglabin, ciclofosfamida, sarcolisina, metilnitrosourea, fluorouracilo, 5-fluorouracilo (5FU), vinblastina, camptotecina, actinomicina-D, mitomicina-C, peróxido de hidrógeno, oxaliplatino, irinotecan, topotecan, leucovorín, carmustina, estreptozocina, CPT-11, taxol, tamoxifeno, dacarbacina, rituximab, daunorubicina, 1-β-D-arabinofuranosilcitosina, imatinib, fludarabina, docetaxel y FOLFOX4.

La divulgación también engloba procedimientos para identificar un agente anticáncer de pulmón, que comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico del miR en la célula. En una divulgación, el procedimiento comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico asociado con disminución de los niveles de expresión en las células del cáncer de pulmón. Un aumento del nivel del producto génico del miR en la célula, con respecto a un control adecuado (por ejemplo, el nivel del producto génico del miR en una célula control), es indicativo de que el agente de ensayo es un agente anticáncer de pulmón. En una divulgación particular, el al menos un producto génico del miR asociado con una disminución de los niveles de expresión en las células del cáncer de pulmón se selecciona entre el grupo que consiste en miR-126\*, miR-192, miR-224, miR-126, miR-30a-5p, miR-140, miR-9, miR-124a-1, miR-218-2, miR-95, miR-145, miR-198, miR-216, miR-219-1, miR-125a, miR-26a-1, miR-199b, let-7a-2, miR-27b, miR-32, miR-29b-2,

miR-220, miR-33, miR-181c, miR-101-1, miR-124a-3, miR-125b-1, let-7f-1 y una combinación de los mismos. En una divulgación, el producto génico del miR no es uno o más de let7a-2, let-7c, let-7g, let-7i, miR-7-2, miR-7-3, miR-9, miR-9-1, miR-10a, miR-15a, miR-15b, miR-16-1, miR-16-2, miR-17-5p, miR-20a, miR-21, miR-24-1, miR-24-2, miR-25, miR-29b-2, miR-30, miR-30a-5p, miR-30c, miR-30d, miR-31, miR-32, miR-34, miR-34a, miR-34a prec, miR-34a-1, miR-34a-2, miR-92-2, miR-96, miR-99a, miR-99b prec, miR-100, miR-103, miR-106a, miR-107, miR-123, miR-124a-1, miR-125b-1, miR-125b-2, miR-126\*, miR-127, miR-128b, miR-129, miR-129-1/2 prec, miR-132, miR-135-1, miR-136, miR-137, miR-141, miR-142-as, miR-143, miR-146, miR-148, miR-149, miR-153, miR-155, miR-159-1, miR-181, miR-181b-1, miR-182, miR-186, miR-191, miR-192, miR-195, miR-196-1, miR-196-1 prec, miR-196-2, miR-199a-1, miR-199a-2, miR-199b, miR-200b, miR-202, miR-203, miR-204, miR-205, miR-210, miR-211, miR-212, miR-214, miR-215, miR-217, miR-221 y/o miR-223.

En otras divulgaciones el procedimiento comprende proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico del miR asociado con un aumento de los niveles de expresión en las células del cáncer de pulmón. Un descenso en el nivel del producto génico del miR en la célula, con respecto a un control adecuado (por ejemplo, el nivel del producto génico del miR en una célula de control), es indicativo de que el agente de ensayo es un agente anticáncer de pulmón. En una divulgación particular, al menos un producto génico del miR asociado con el aumento de los niveles de expresión en las células del cáncer de pulmón se selecciona entre el grupo que consiste en miR-21, miR-191, miR-210, miR-155, miR-205, miR-24-2, miR-212, miR-214, miR-17-3p, miR-106a, miR-197, miR-192, miR-146, miR-203, miR-150 y una combinación de los mismos. En una divulgación, el producto génico del miR no es uno o más de let7a-2, let-7c, let-7g, let-7i, miR-7-2, miR-7-3, miR-9, miR-9-1, miR-10a, miR-15a, miR-15b, miR-16-1, miR-16-2, miR-17-5Sp, miR-20a, miR-21, miR-24-1, miR-24-2, miR-25, miR-29b-2, miR-30, miR-30a-5p, miR-30c, miR-30d, miR-31, miR-32, miR-34, miR-34a, miR-34a prec, miR-34a-1, miR-34a-2, miR-92-2, miR-96, miR-99a, miR-99b prec, miR-100, miR-103, miR-106a, miR-107, miR-123, miR-124a-1, miR-125b-1, miR-125b-2, miR-126\*, miR-127, miR-128b, miR-129, miR-129-1/2 prec, miR-132, miR-135-1, miR-136, miR-137, miR-141, miR-142-as, miR-143, miR-146, miR-148, miR-149, miR-153, miR-155, miR-159-1, miR-181, miR-181b-1, miR-182, miR-186, miR-191, miR-192, miR-195, miR-196-1, miR-196-1 prec, miR-196-2, miR-199a-1, miR-199a-2, miR-199b, miR-200b, miR-202, miR-203, miR-204, miR-205, miR-210, miR-211, miR-212, miR-214, miR-215, miR-217, miR-221 y/o miR-223.

Los agentes adecuados incluyen, pero sin limitarse, fármacos (por ejemplo, moléculas pequeñas, péptidos) y macromoléculas biológicas (por ejemplo, proteínas, ácidos nucleicos). El agente se puede producir recombinantemente, sintéticamente o puede aislarse (por ejemplo, purificarse) de una fuente natural. Se conocen bien en la técnica varios procedimientos para proporcionar tales agentes a una célula (por ejemplo, transfección) y varios de tales procedimientos se han descrito anteriormente en el presente documento. Los procedimientos para detectar la expresión de al menos un producto génico del miR (por ejemplo, transferencia de Northern, hibridación *in situ*, RT-PCR, perfil de expresión) también son bien conocidos en la técnica. Varios de estos procedimientos también se han descrito en el presente documento.

La invención ahora se ilustrará por los siguientes ejemplos no limitantes.

## Ejemplos

Ejemplo 1: Expresión de miARN alterada en cánceres primarios de pulmón

### Materiales y métodos

#### Muestras

Se utilizaron en este estudio 104 parejas de cánceres primarios de pulmón y sus correspondientes tejidos pulmonares no cancerosos. Se utilizaron 32 casos adicionales, en los que se podía hacer un seguimiento durante 5 años, como una base de datos de validación independiente. Estos tejidos se obtuvieron entre 1990 y 1999 como especímenes quirúrgicos de pacientes en el área metropolitana de Baltimore, con consentimiento informado y de acuerdo con el Consejo de Revisión Institucional. Los tejidos de cáncer de pulmón se obtuvieron de 65 pacientes con adenocarcinoma de pulmón y 39 pacientes con carcinoma de células escamosas de pulmón. Comprendían el grupo 65 pacientes masculinos y 39 pacientes femeninos, con una edad media de 65 años (intervalo de 38-84). Se clasificaron 65 tumores como de estadio I, 17 como de estadio II y 22 tumores como de estadio III o IV. Para la mayoría de las muestras, estaba disponible la información clínica y biológica. El ARN total de los tejidos se aisló con el Reactivo TRIzol® (Invitrogen), según las instrucciones del fabricante.

### Análisis de micromatrices

El análisis de micromatrices se llevó a cabo como se ha descrito previamente (Liu, C.G. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101: 9740-9744 (2004)). Resumiendo, 5 µg de ARN total se hibridó con chips de micromatrices miARN que contenían 352 sondas por triplicado. Específicamente, estos chips contenían oligonucleótidos sondas específicas del gen 40-miR, aplicadas por tecnologías de contacto y fijadas covalentemente a una matriz polimérica, que fueron generadas de 161 miARN humanos, 84 miARN de ratón, miARN de otras tres especies y ARNt. Las micromatrices se hibridaron en SSPE 6x (NaCl 0,9 M/ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 60 mM/EDTA 8 mM, pH 7,4)/formamida al 30 % a 25 °C durante 18 h, se lavaron en TNT 0,75x (Tris-HCl/NaCl/Tween 20) a 37 °C durante 40 min y se procesaron utilizando

un método de detección directa de transcripciones que contienen biotina con streptavidina-Alexa647 conjugada (Molecular Probes, Carlsbad, CA). Los portaobjetos procesados se exploraron utilizando un Scanner PerkinElmer ScanArray XL5K, con el láser ajustado a 635 nm, a 80 de potencia y 70 de PMT y con una resolución de exploración de 10  $\mu\text{m}$ . Un valor medio de las tres réplicas de las manchas para cada miARN se normalizó y analizó con BRB-Array Tools versión 3.2.3. Después de excluir valores negativos con intensidad de hibridación por debajo del fondo, se llevó a cabo la normalización utilizando un procedimiento de normalización per chip sobre la media y normalización para la matriz media como referencia. Finalmente, se seleccionaron 147 miARN con valores logarítmicos congruentes presentes en más del 50 % de las muestras. Los genes que se expresaron de manera diferente entre los grupos se identificaron utilizando el ensayo t o F y los genes se consideraron estadísticamente significativos si su valor de  $p$  era menor de 0,001. Se llevó a cabo también un ensayo global para ver si los perfiles de expresión eran diferentes entre los grupos, permutando los marcadores de las matrices que correspondían a los grupos. Para cada permutación, los valores de  $p$  se recalcularon y se apuntó el número de genes significativos al nivel de 0,001. La proporción de las permutaciones que dieron al menos tantos genes significativos como los datos actuales fue el nivel significativo del ensayo global

#### 15 Análisis de detección de hibridación en solución y análisis RT-PCR en tiempo real

Los niveles de expresión de los miARN maduros se midieron por detección de hibridación en solución utilizando el Kit de detección *mirVana*<sup>TM</sup> (Ambion Inc., TX). En resumen, se incubó 1 mg de ARN total con sondas marcadas radiactivamente que correspondían con estos miARN. Después de someterse a digestión para eliminar cualquier sonda que no se hubiera unido al miARN diana, se fraccionaron los productos marcados radiactivamente por desnaturalización por electroforesis en gel de poliacrilamida. Las sondas se prepararon marcando el extremo 5' utilizando polinucleótido quinasa T4 con el kit Probe & Marker de *mirVana*<sup>TM</sup> (Ambion Inc., TX), según las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo la PCR cuantitativa en tiempo real como se ha descrito (Schmittgen y col., Nucl. Acids Res. 32: e43 (2004)) sobre un Sistema Aplicado de Detección de Secuencias de Biosistemas, haciéndose todas las reacciones por triplicado. En resumen, el ARN se transcribió inversamente a ADNc con cebadores génicos específicos y Thermoscript y la cantidad relativa de cada miARN con respecto al ARNt, se determinó por medio del iniciador de la metionina, utilizando la ecuación:  $2^{-dC_T}$ , donde  $dC_T = (C_{T\text{miARN}} - C_{T\text{U6}})$ .

#### Análisis de supervivencia

Se identificaron los genes cuya expresión estaba relacionada significativamente con la supervivencia del paciente. Se valoró la significación estadística para cada gen basándose en el modelo de regresión de riesgos proporcionales univariado de Cox en BRB-ArrayTools versión 3.2.3. Estos valores de  $p$  se utilizaron en un ensayo multivariado de permutación en el que los tiempos de supervivencia y los indicadores de censura se permutaron aleatoriamente entre las matrices. Los genes se consideraron estadísticamente significativos si su valor de  $p$  era menor de 0,05.

Se estimaron las curvas de supervivencia por el procedimiento de Kaplan-Meier (SAS Institute, Cary, NC) y las curvas resultantes se compararon utilizando un ensayo de intervalo logarítmico. Se examinaron el efecto articulación y las covariables utilizando el modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el StatMate (ATMS Co. Ltd., Tokyo, Japón).

#### Resultados

Se analizó la expresión de miARN en 104 pares de cáncer primario de pulmón y en los correspondientes tejidos pulmonares no cancerosos para investigar la participación de los miARN en el cáncer de pulmón. La comparación de la expresión de miARN para varios pares de un grupo específico se enumera en la Tabla 2. Se identificaron los miARN que se expresaron de manera diferente en 5 clasificaciones fenotípicas e histológicas (Tabla 2).

Al compararse la expresión del miARN en los tejidos del cáncer de pulmón y en los correspondientes tejidos pulmonares no cancerosos, se identificaron 43 miARN que mostraban diferencias de la expresión entre los grupos estadísticamente significativas (Tabla 3). Se llevó a cabo el ensayo de permutación multivariada en el análisis de comparación de clases utilizando nuestra herramienta de análisis de micromatrices, para controlar las múltiples comparaciones. El ensayo proporciona un nivel de confianza específica para asegurar que el número de descubrimientos falsos no exceda el nivel de dianas o para asegurar que la proporción de la lista de genes que representa falsos descubrimientos no exceda un nivel de dianas. Por tanto, si no hay diferencias reales entre las clases, la probabilidad de obtener por casualidad al menos 43 miARN expresados de manera diferente que sea estadísticamente significativa a un nivel  $<0,001$ , sería 0 y así se estimó por el ensayo de permutación multivariada. Además, el 91 % de los 104 cánceres de pulmón se clasificaron correctamente utilizando el procedimiento de predicción de validación de clase dejando uno fuera, basándose en el predictor covariado compuesto. Basándose en 2.000 permutaciones aleatorias, el valor de  $p$ , que se define como la proporción de las permutaciones aleatorias que dan una tasa de errores de validación cruzada no mayor que la tasa de error de validación cruzada con los datos reales, fue  $< 0,0005$ .

Varios de estos miARN se asociaron con FRA (Tabla 3). En particular, tres miARN están localizados dentro de sitios frágiles (*hsa-mir-21* en FRA17B, *hsa-mir-27b* en FRA9D y *hsa-mir-32* en FRA9E). Además, muchos de estos miARN identificados se localizan en regiones que son eliminadas o amplificadas frecuentemente en varias enfermedades

5 malignas (Tabla 3). Por ejemplo, *hsa-mir-21* y *hsa-mir-205* están localizados en la región amplificada en el cáncer de pulmón, mientras que *hsa-mir-126\** y *hsa-mir-126* están en 9q34.3, una región eliminada en el cáncer del pulmón. La expresión reducida de los precursores *let-7a-2* y *let-7f-1* se descubrió en el adenocarcinoma y en el carcinoma de células escamosas con un valor de p con un límite de 0,05. De igual manera. Los análisis de comparación entre el adenocarcinoma vs. tejidos no cancerosos y el carcinoma de células escamosas vs. tejidos no cancerosos revelaron respectivamente, 17 y 16 miARN con una expresión estadísticamente diferente (Tabla 4). Seis miARN (*hsa-mir-21*, *hsa-mir-191*, *hsa-mir-155*, *hsa-mir-210*, *hsa-mir-126\** y *hsa-mir-224*) se compartieron en los dos tipos histológicos de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC).

Tabla 2. Análisis de comparación de clasificaciones clinicopatológicas

Clasificación (Número)	Total	Nº de genes <sup>a</sup>	FDR <sup>b</sup>	% clasificados correctamente <sup>c</sup> (valor de p)
<b>Clasificación Fenotípica</b>				
Todos los tumores (104) vs. Todos los normales (104)	208	43	0	91 (< 0,0005)
Tumor Adeno <sup>d</sup> (65) vs. Adeno normal(65)	130	17	0,001	80 (< 0,0005)
Tumor SCC <sup>e</sup> (39) vs. SCC normal (39)	78	16	0	92 (< 0,0005)
<b>Clasificación Histológica</b>				
Tumor Adeno (65) vs. Tumor SCC (39)	104	6	0,001	81 (< 0,0005)
<b>Clasificación por Edad</b>				
Todos; Edad <67 (56) vs. Edad ≥67 (48)	104	0		
Adeno; Edad <67 (37) vs. Edad ≥67 (28)	65	0		
SCC; Edad <67 (19) vs. Edad ≥67 (20)	39	0		
<b>Clasificación por Sexo</b>				
Todos; Masculino (65) vs. Femenino (39)	104	0		
Adeno; Masculino (39) vs. Femenino (26)	65	0		
SCC; Masculino (26) vs. Femenino (13)	39	0		
<b>Clasificación por Raza</b>				
Todos; Afro-Americana (21) vs. Blanca Americana (83)	104	0		
Adeno; Afro-Americana (13) vs. Blanca Americana (52)	65	0		
SCC; Afroamericana (8) vs. Blanca Americana (31)	39	0		
<b>Clasificación por Estadio</b>				
Todos; Estadio I (65) vs. Estadio II (17) vs. Estadio III, IV (22)	104	0		
Adeno; Estadio I (41) vs. Estadio II (8) vs. Estadio III, IV (16)	65	1		
SCC; Estadio I (24) vs. Estadio II (9) vs. Estadio III, IV (6)	39	0		

<sup>a</sup>Nº de genes, Número de genes significativos a 0,001.

<sup>b</sup>FDR, Tasa de falsos descubrimientos que es la probabilidad de genes significativos por casualidad.

<sup>c</sup>% clasificados correctamente (valor de p). Procedimiento de predicción de clases de validación cruzada dejando uno fuera basado en el predictor covariado compuesto. El valor de p es la proporción de permutaciones aleatorias que daban una tasa de error de validación cruzada que no era mayor que la tasa de error de validación cruzada con los datos reales.

<sup>d</sup>Adeno, Adenocarcinoma.

<sup>e</sup>SCC, Carcinoma de células escamosas.

ES 2 429 404 T3

Tabla 3. 43 miARN expresados diferencialmente en tejidos del cáncer de pulmón vs. Tejidos pulmonares no cancerosos.

miARN	Localización	Valor de <i>p</i>	Tipo	Asociación con FRA <sup>a</sup>	Regiones genómicas asociadas con Cáncer <sup>a</sup>	Gen hospedador <sup>b</sup>
<b><i>hsa-mir-21</i></b>	17q23.2	$p < 1e-07$	Positivo	FRA17B	Amp <sup>c</sup> -netwoblastoma; pulmón ca	<i>TMEM49</i>
<b><i>hsa-mir-191</i></b>	3p21.31	$p < 1e-07$	Positivo			Proteína nueva
<b><i>hsa-mir-126*</i></b>	9q34.3	$p < 1e-07$	Negativo		Del <sup>d</sup> -NSCLC <sup>e</sup> ; HCC <sup>f</sup>	<i>EGFL-7</i>
<b><i>hsa-mir-210</i></b>	11p15.5	1,00E-07	Positivo		Del-ovárico: pulmón co	Proteína nueva
<b><i>hsa-mir-155</i></b>	21q21.3	1,00E-07	Positivo		Amp-colon ca	<i>BIC</i>
<b><i>hsa-mir-143</i></b>	5q32	4,00E-07	Negativo		Del-próstata ca	minARNc <sup>F</sup>
<b><i>hsa-mir-205</i></b>	1q32.2	4,00E-07	Positivo		Amp-pulmón ca	minARNc
<b><i>hsa-mir-192-prec</i></b>	11q13.1	5,00E-07	Negativo	FRA11A	Del-tiroides ca	minARNc
<b><i>hsa-mir-224</i></b>	Xq28	5,00E-07	Negativo	FRAXF		<i>G4BRE</i>
<b><i>hsa-mir-126</i></b>	9q34.3	7,00E-07	Negativo		Del-NSCLC: HCC	<i>EGFL-7</i>
<b><i>hsa-mir-24-2</i></b>	19p13.1	1,30E-06	Positivo			ND <sup>b</sup>
<b><i>hsa-mir-30a-5p</i></b>	6q13	4,50E-06	Negativo			minARNc
<b><i>hsa-mir-212</i></b>	17p13.3	5,00E-06	Positivo			ND
<b><i>hsa-mir-140</i></b>	16q22.1	5,10E-06	Negativo			<i>ATROPINA-1</i>
<b><i>hsa-mir-9</i></b>	15q26.1	6,50E-06	Negativo			Proteína nueva
<b><i>hsa-mir-214</i></b>	1q24.3	8,60E-06	Positivo			ND
<b><i>hsa-mir-17-3p</i></b>	13q31.3	9,40E-06	Positivo			Proteína nueva
<b><i>hsa-mir-124a-1</i></b>	8p23.1	1,23E-05	Negativo		Amp-MFHs <sup>l</sup>	Proteína nueva
<b><i>hsa-mir-218-2</i></b>	5q34	1,34E-05	Negativo			<i>SLIT3</i>
<b><i>hsa-mir-95</i></b>	4p16.1	1,48E-05	Negativo			<i>ABLIM2</i>
<b><i>hsa-mir-145</i></b>	5q32	1,90E-05	Negativo		Del-próstata ca	minARNc
<b><i>hsa-mir-198</i></b>	3q13.33	2,43E-05	Negativo			<i>FSTL1</i>
<b><i>hsa-mir-216-prec</i></b>	2p16.1	3,05E-05	Negativo			ND
<b><i>hsa-mir-219-1</i></b>	6p21.32	5,56E-05	Negativo			ND
<b><i>hsa-mir-106a</i></b>	Xq26.2	6,20E-05	Positivo		Del-ovárico ca	ND
<b><i>hsa-mir-197</i></b>	1p13.3	7,23E-05	Positivo			ND
<b><i>hsa-mir-192</i></b>	11q13.1	0,000119	Positivo	FRA11A	Del-tiroides ca	ND

<b><i>hsa-mir-125a-prec</i></b>	19q13.41	0,000143	Negativo			minARNc
<b><i>hsa-mir-26a-1-prec</i></b>	3p22.3	0,000148	Negativo		Del-epitelial ca	<i>NIF1</i>
<b><i>hsa-mir-146</i></b>	5q33.3	0,000163	Positivo			minARNc
<b><i>hsa-mir-203</i></b>	14q32.33	0,000267	Positivo			ND
<b><i>hsa-mir-199b-prec</i></b>	9q34.11	0,000304	Negativo		Del-vejiga ca	<i>GOLGA2</i>
<b><i>hsa-mir-7a-2-prec</i></b>	11q24.1	0,000398	Negativo	FRA11B	Del-pulmón ca	minARNc
<b><i>hsa-mir-27b</i></b>	9q22.32	0,000454	Negativo	FRA9D	Del-Vejiga ca	Proteína nueva
<b><i>hsa-mir-32</i></b>	9q31.3	0,000458	Negativo	FRA9E	Del-pulmón ca	Proteína nueva
<b><i>hsa-mir-29b-2-</i></b>	1q32.2	0,000466	Negativo			minARNc
<b><i>hsa-mir-220</i></b>	Xq25	0,000630	Negativo			ND
<b><i>hsa-mir-33</i></b>	22q13.2	0,000683	Negativo		Del-colon ca	<i>SREBF2</i>
<b><i>hsa-mir-181c-prec</i></b>	19p13.12	0,000736	Negativo			<i>NANOS3</i>
<b><i>hsa-mir-150</i></b>	19q13.33	0,000784	Positivo			ND
<b><i>hsa-mir-101-1</i></b>	1p31.3	0,000844	Negativo	FRA1C	Del-ovárico; mama ca	ND
<b><i>hsa-mir-124n-3</i></b>	20q13.33	0,000968	Negativo			ND
<b><i>hsa-mir-125a</i></b>	19q13.41	0,000993	Negativo			ND

<sup>a</sup> La información se obtuvo de un informe previo (Calin, G.A. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101: 2999-3004 (2004)). <sup>b</sup> La información se obtuvo de un informe previo (Rodríguez, A. y col., Genome Res. 14: 1902-1910 (2004)). <sup>c</sup> Amp, Amplificación; <sup>d</sup> Del, Delección; <sup>e</sup> NSCLC, Carcinoma de pulmón de células no pequeñas; <sup>f</sup> HCC, carcinoma hepatocelular; <sup>g</sup> minARNc, ARN no codificante similar a mRNA; <sup>h</sup> ND, no definido; <sup>i</sup> MFHs, Histiocitomas fibrosos malignos.

5 El análisis PCR en tiempo real de los precursores de miARN seleccionados se llevó a cabo para validar los resultados del análisis de la micromatriz. Primero, se prepararon los ADNc de 16 pares de adenocarcinomas pulmonares y 16 pares de carcinoma pulmonar de células escamosas, utilizando cebadores génicos específicos para *hsa-mir-21*, *hsa-mir-126\**, *hsa-mir-205* y *U6* (como control). A continuación, se llevaron a cabo los análisis de RT-PCR en tiempo real para determinar los niveles de expresión de estos miARN en diferentes muestras. Al menos una regulación doblemente positiva de la expresión de los precursores de miARN *hsa-mir-21* y *hsa-mir-205* se encontró en el 66 % y el 56 % de los 32 casos, respectivamente, cuando se compararon con los niveles de expresión de estos miARN en los tejidos no cancerosos correspondientes (FIG. 1). Las diferencias fueron estadísticamente significativas con una  $p < 0,001$  según el ensayo-t pareado. Por el contrario, el 31 % de los 32 casos de cáncer de pulmón examinados mostraron una reducción de la expresión del precursor *hsa-mir-126\** de más del 50 %, aunque estos resultados no fueron estadísticamente significativos (FIG. 1). Estos hallazgos muestran que los miARN precursores específicos están regulados frecuentemente de forma positiva o están reducidos en los cánceres de pulmón, lo que es congruente con los patrones de expresión de sus miARN maduros, como se determinó utilizando el análisis de micromatriz.

10

15

Tabla 4. miARN expresados diferencialmente en tejidos con adenocarcinoma/tejidos con carcinoma pulmonar de células escamosas vs. Tejidos pulmonares no cancerosos.

miARN	Localización	Valor de $\rho$	Tipo
<b>Adenocarcinoma</b>			
<i>*hsa-mir-21</i>	17q23.2	$p < 1e-07$	Positivo
<i>hsa-mir-191</i>	3p21.31	1,20E-06	Positivo
<i>hsa-mir-155</i>	21q21.3	4,10E-06	Positivo
<i>hsa-mir-210</i>	11p15.5	9,90E-06	Positivo
<i>hsa-mir-126*</i>	9q34.3	1,92E-05	Negativo
<i>hsa-mir-126</i>	9q34.3	4,13E-05	Negativo
<i>hsa-mir-24-2</i>	19p13.1	0,000228	Positivo
<i>hsa-mir-219-1</i>	6p21.32	0,000251	Negativo
<i>hsa-mir-95</i>	4p16.1	0,000303	Negativo
<i>hsa-mir-192-prec</i>	11q13.1	0,000307	Negativo
<i>hsa-mir-220</i>	Xq25	0,000309	Negativo
<i>hsa-mir-216-prec</i>	2p16.1	0,00042	Negativo
<i>hsa-mir-204-prec</i>	9q21.11	0,000449	Negativo
<i>hsa-mir-188</i>	Xp11.23	0,000475	Negativo
<i>hsa-mir-198</i>	3q13.33	0,000494	Negativo
<i>hsa-mir-145</i>	5q32	0,000579	Negativo
<i>hsa-mir-224</i>	Xq28	0,000925	Negativo
<b>Carcinoma de células escamosas</b>			
<i>hsa-mir-205</i>	1q32.2	$p < 1e-07$	Positivo
<i>hsa-mir-224</i>	Xq28	4,14E-05	Negativo
<i>hsa-mir-191</i>	3p21.31	5,18E-05	Positivo
<i>hsa-mir-126*</i>	9q34.3	9,74E-05	Negativo
<i>hsa-mir-140</i>	16q22.1	0,000132	Negativo
<i>hsa-mir-210</i>	11p15.5	0,0001383	Positivo
<i>hsa-mir-17-3p</i>	13q31.3	0,0001772	Positivo
<i>hsa-mir-29b</i>	1q32.2	0,0002046	Negativo
<i>hsa-mir-143</i>	5q32	0,0003141	Negativo
<i>hsa-mir-203</i>	14q32.33	0,0003293	Positivo
<i>hsa-mir-155</i>	21q21.3	0,0003688	Positivo
<i>hsa-mir-21</i>	17q23.2	0,0003904	Positivo
<i>hsa-mir-214</i>	1q24.3	0,0004546	Positivo
<i>hsa-mir-212</i>	17p13.3	0,0005426	Positivo
<i>hsa-mir-30a-5p</i>	6q13	0,0006165	Negativo
<i>hsa-mir-197</i>	1p13.3	0,0008507	Positivo

Además, los datos de la micromatriz para los tres precursores de miARN, *hsa-mir-21*, *hsa-mir-126\** y *hsa-mir-205*, se confirmaron por el procedimiento de detección de hibridación en solución, sus miARN maduros. Específicamente, se analizaron siete pares de tejidos de cáncer de pulmón primario y sus correspondientes tejidos pulmonares no cancerosos, para los que estaban disponibles cantidades suficientes de ARN. Las formas maduras de *hsa-mir-21* y *hsa-mir-205* estaban claramente reguladas positivamente en los tejidos del cáncer de pulmón cuando se comparaban con los correspondientes tejidos pulmonares no cancerosos (FIG. 2), mientras que *hsa-mir-126\** estaba regulado negativamente en la mayoría de los tejidos de cáncer de pulmón examinados. Por tanto, como en los resultados de la RT-PCR, estos análisis confirmaron los datos de la expresión de la micromatriz para estos tres miARN.

**Ejemplo 2: Firmas distintivas de la expresión de miARN en líneas celulares de cáncer de pulmón. Materiales y métodos**

Muestras

Se utilizaron en este estudio trece líneas celulares de cáncer de pulmón, que consistían en cinco líneas celulares de carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC) y ocho líneas celulares de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). Las 5 líneas celulares SCLC fueron DMS 92, NCI-H82, NCI-H146, NCI-H446 y NCI-H417 (American Tissue Culture Collection). Las ocho líneas celulares NSCLC fueron NCI-H157, Calu-1, Calu-6, NCI-H292, NCI-H596, A-427, A549, and A2182 (American Tissue Culture Collection, Manassas, VA). Se aisló el ARN total de los tejidos y los cultivos celulares con Reactivo TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA), según las instrucciones del fabricante.

Análisis de micromatriz

Se llevó a cabo el análisis de la micromatriz como se ha descrito anteriormente (Liu, C.G. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101: 9740-9744 (2004), véase también el Ejemplo 1).

Análisis estadístico

- 5 Se llevaron a cabo los análisis estadísticos como se describe anteriormente en el presente documento (véase, por ejemplo, el Ejemplo 1).

Resultados

10 Se generaron con el análisis de micromatriz, los perfiles de expresión del miARN de cinco líneas celulares de carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC) y ocho líneas celulares de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). La comparación de los perfiles de expresión del miARN de NSCLC y SCLC reveló diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$  por el ensayo-t) en el nivel de expresión de 3 miARN (*hsa-mir-24-1*, *hsa-mir-29a* y *hsa-mir-29c*). Además, se revelaron distintos grupos cuando se aplicó el análisis de agrupamiento jerárquico a los 18 miARN expresados más diferencialmente para cada tipo de muestra, de forma que todas las líneas celulares NSCLC caían dentro del grupo que era distinto de las líneas celulares de SCLC (FIG. 3A, FIG. 3B). Estos resultados indican que los perfiles de expresión del miARN pueden ser diferentes en células de diferentes orígenes y/o tipos, como se había descubierto en estudios previos (véase, por ejemplo Liu, C.G. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101: 9740-9744 (2004); Bhattacharjee, A. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98: 13790-13795 (2001); Garber, M.E. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98: 13784-13789 (2001)).

20 **Ejemplo 3: Identificación de los miARN asociados con características clinicopatológicas del cáncer de pulmón**

Materiales y métodos

Análisis de micromatrices

Se llevaron a cabo los análisis de micromatrices como se ha descrito anteriormente (Liu, C.G. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101: 9740-9744 (2004), véase también, el Ejemplo 1).

25 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo como se ha descrito anteriormente en el presente documento (véase, por ejemplo, el Ejemplo 1).

Resultados

30 Se analizó si los datos de la micromatriz revelaban firmas moleculares específicas para subgrupos de cáncer de pulmón que se diferenciaban por su comportamiento clínico. Para este análisis, se examinaron las relaciones de cinco tipos de información clínica y patológica (Tabla 2). En la clasificación histológica, se identificaron seis miARN (*hsa-mir-205*, *hsa-mir-99b*, *hsa-mir-203*, *hsa-mir-202*, *hsa-mir-102* y *hsa-mir-204-prec*) que se expresaban de forma diferente en los dos tipos histológicos más comunes de NSCLC, adenocarcinoma y carcinoma de células escamosas. Los niveles de expresión de *hsa-mir-99b* y *hsa-mir-102* fueron mayores en el adenocarcinoma. No se identificaron miARN que se expresaran de manera diferente para los grupos que se habían diferenciado por la edad, el género o la raza.

35 **Ejemplo 4: Correlación entre la expresión de *hsa-mir-155* and *hsa-let-7a-2* y el pronóstico de los pacientes con adenocarcinoma de pulmón.**

Materiales y métodos

40 Análisis de micromatriz

Se llevó a cabo el análisis de micromatriz como se ha descrito previamente (Liu, C.G. y col., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101: 9740-9744 (2004), véase también, el Ejemplo 1).

Análisis estadístico

45 Se llevaron a cabo los análisis estadísticos como se ha descrito anteriormente en el presente documento (véase, por ejemplo, el Ejemplo 1).

Análisis de Ontología Génica

Las dianas predichas del *hsa-mir-155* y *hsa-let-7a* se determinaron por los procedimientos de Lewis y col., (Lewis, B.P. y col., Cell 120: 15-20 (2005)) y PicTar (Krek, A. y col., Nat. Genet. 37: 495-500 (2005)) y se analizaron con respecto a la sobre-representación en los agrupamientos biológicos de una Ontología Génica (GO) particular. Las

listas de término GO se sometieron a análisis utilizando la aplicación Whole Pathway Scope (WPS) y esos términos se enumeraron si la puntuación de la prueba exacta de Fisher era menor de 0,005.

## Resultados

Se evaluó la correlación de la expresión del miARN con la supervivencia del paciente. El modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox univariado con el ensayo de permutación total en el BRB-Array Tools indicaron que ocho miARN (*hsa-mir-155*, *hsa-mir-17-3p*, *hsa-mir-106a*, *hsa-mir-93*, *hsa-let-7a-2*, *hsa-mir-145*, *hsa-let-7b* y *hsa-mir-21*) estaban relacionados con la supervivencia del paciente con adenocarcinoma. Se descubrió que la alta expresión de *hsa-mir-155*, *hsa-mir-17-3p*, *hsa-mir-106a*, *hsa-mir-93* o *hsa-mir-21* y la baja expresión de *hsa-let-7a-2*, *hsa-let-7b* o *hsa-mir-145* tenían un pronóstico significativamente peor. Además, el análisis de supervivencia entre 41 pacientes con adenocarcinoma en estadio I reveló que tres miARN (*hsa-mir-155*, *hsa-mir-17-3p* y *hsa-mir-20*) estaban asociados con el resultado del paciente. Estos resultados demuestran la importante relación entre los perfiles de expresión del miARN y la supervivencia del paciente, independientemente del estadio de la enfermedad.

Debido a que cinco de estos miARN (*hsa-mir-155*, *hsa-mir-17-3p*, *hsa-let-7a-2*, *hsa-mir-145* y *hsa-mir-21*) se expresaban de manera diferente en los tejidos del cáncer de pulmón con respecto a los correspondientes tejidos pulmonares no cancerosos, se utilizaron estos miARN para más análisis de supervivencia. Se calculó la relación entre la expresión en el cáncer de pulmón y la correspondiente expresión en el tejido pulmonar no canceroso para cada uno de estos cinco miARN y los casos se clasificaron de acuerdo con la relación de expresión. Utilizando este agrupamiento para cada miARN, se llevó a cabo el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier. La supervivencia estimada por Kaplan-Meier mostraba que los pacientes con adenocarcinoma de pulmón con alta expresión de *hsa-mir-155* o con expresión reducida de *hsa-let-7a-2* tenían peores perspectivas de supervivencia que los pacientes con expresión baja de *hsa-mir-155* o alta expresión de *hsa-let-7a-2* (FIG. 4 y FIG. 5). La diferencia pronóstica de estos dos grupos era altamente significativa para *hsa-mir-155* ( $p=0,006$ ; ensayo de intervalo logarítmico), pero menos significativo para *hsa-let-7a-2* ( $p=0,033$ ; ensayo de intervalo logarítmico). Los análisis de supervivencia de los factores clinicopatológicos mostraron que el estadio estaba asociado significativamente con la supervivencia ( $p=0,01$ ; ensayo de intervalo logarítmico), mientras que la edad, la raza, el sexo y la historia de fumador no contaba para el pronóstico malo (Tablas 5A y 5B). Para ajustarlo por comparaciones múltiples, utilizamos el procedimiento de Storey y col., (Storey, J.D. and Tibshirani, R., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100: 9440-9445 (2003)) limitando las tasas de falsos descubrimientos a 0,05. Utilizando esta tasa, *hsa-mir-155* y el estadio de enfermedad fueron aun estadísticamente significativos. Posteriormente, se llevó a cabo un análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox multivariado utilizando todos estos factores clinicopatológicos y moleculares. La expresión alta del *hsa-mir-155* se determinó que era un factor de pronóstico desfavorable, independiente de otros factores clinicopatológicos ( $p=0,027$ ; relación de riesgo 3,03; 95 % CI, 1,13-8,14), en adición al estadio de la enfermedad ( $p=0,013$ ; relación de riesgo 3,27; 95 % CI, 1,31-8,37; Tabla 5A).

Tabla 5A. Supervivencia postoperatoria de pacientes con adenocarcinoma de pulmón en relación con las características clinicopatológicas y la expresión de miARN analizada por análisis de micromatriz.

Variable	subgrupo	Relación de riesgo (95 % CI <sup>a</sup> )	<i>p</i>
<b>Análisis univariados (n=65)</b>			
Edad	Edad >67/ Edad <67	1,41 (0,67-3,06)	0,348
Sexo	Masculino/femenino	1,36 (0,64-2,93)	0,413
Estadio	II-IV/I	2,51 (1,29-6,82)	0,010
Historia de fumador	Actual/exfumador	1,32 (0,63-2,79)	0,456
<i>hsa-mir-155</i> (n=55)	alto/bajo	3,42 (1,42-8,19)	0,006
<i>hsa-let-7a-2</i> (n=52)	bajo/alto	2,35 (1,08-6,86)	0,033
<b>Análisis Multivariado (n=55)<sup>b, c</sup></b>			
Edad	Edad>67/Edad<67	1,92 (0,71-5,17)	0,195
Sexo	Masculino/femenino	1,23 (0,47-3,22)	0,669
<b>Análisis Multivariado (n=55)<sup>b, c</sup></b>			
Estadio II-IV/I		3,27 (1,31-8,37)	0,013
Historia de fumador Actual/exfumador		1,49 (0,51-4,34)	0,457
<i>hsa-mir-155</i> alto/bajo		3,03 (1,13-8,14)	0,027

<sup>a</sup>95 % CI, 95 % Intervalo de confianza.

<sup>b</sup>Análisis multivariado, Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox.

<sup>c</sup> *hsa-let-7a-2* bajo/alto no fue estadísticamente significativo ( $p=0,089$ ).

Tabla 5B. Supervivencia postoperatoria en pacientes con adenocarcinoma de pulmón en relación con las características clinicopatológicas y la expresión de miARN precursores analizados por análisis RT-PCR en tiempo real.

Variable	Subgrupo	Cohorte Original (n=32)		Cohorte Adicional (n=32)		Todos los casos (n=64)	
		Relación de riesgos (95 % CI <sup>a</sup> )	p	Relación de riesgos (95 % CI)	p	Relación de riesgos (95 % CI)	p
<b>Análisis univariado</b>							
Edad	Edad >67/ Edad <67	1,89 (0,62-5,34)	0,274	1,21 (0,46-3,21)	0,679	1,28 (0,64-2,58)	0,482
Sexo	Masculino/femenino	0,53 (0,14-1,56)	0,232	1,37 (0,54-3,63)	0,479	0,99 (0,49-1,98)	0,975
Estadio	II-IV/I	4,22 (1,91-23,6)	0,003	2,37 (1,01-7,83)	0,048	3,07 (1,82-8,84)	<0,00
Historia de fumador	Actual/exfumador	0,92 (0,31-2,66)	0,921	1,22 (0,47-3,16)	0,674	1,12 (0,56-2,25)	0,757
Precursor <i>hsa-mir-155</i>	alto/bajo	2,75 (1,05-12,1)	0,047	2,52 (1,10-7,45)	0,033	2,74 (1,53-6,91)	0,002
Precursor <i>hsa-let-7a-2</i>	bajo/alto	3,01 (1,09-9,86)	0,037	2,22 (0,91-5,71)	0,084	2,73 (1,42-5,88)	0,003
<b>Análisis Multivariado<sup>b</sup></b>							
Edad	Edad >67/ Edad <67	0,91 (0,22-3,68)	0,899	0,93 (0,30-2,91)	0,914	1,22 (0,58-2,53)	0,593
Sexo	Masculino/femenino	0,35 (0,11-1,17)	0,089	0,92 (0,32-2,66)	0,885	0,85 (0,41-1,74)	0,659
Estadio	II-IV/I	8,99 (1,95-41,2)	0,004	4,91 (1,51-15,9)	0,008	5,58 (2,42-12,8)	<0,001
Historia de fumador	Actual/exfumador	1,01 (0,30-3,38)	0,980	2,27 (0,70-7,34)	0,170	1,89 (0,85-4,21)	0,117
Precursor <i>hsa-mir-155</i>	alto/bajo	13,3 (2,59-69,0)	0,002	3,77 (1,32-10,6)	0,013	4,98 (2,29-10,8)	<0,001
Precursor <i>hsa-let-7a-2</i>	bajo/alto	3,93 (1,06-14,5)	0,040	2,97 (1,07-8,23)	0,036	3,55 (1,64-7,69)	0,001

<sup>a</sup>95 % CI, 95 % Intervalo de confianza.

<sup>b</sup>Análisis multivariado, modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox.

5 Para investigar las consecuencias biológicas de la expresión alterada de *hsa-mir-155* and *hsa-let-7a-2*, se llevó a cabo un análisis bioinformático para agrupar las dianas predichas de estos miARN de acuerdo con los términos de Ontología Génica (Tabla 6). Además de las asociaciones con los términos más generales de GO, se vio un enriquecimiento significativo para las dianas asociado con la transcripción del *hsa-mir-155*. El *hsa-let-7a* mostró una sobre representación de dianas génicas unidas con la proteína quinasa y las cascadas intracelulares de señalización, un hallazgo congruente con la interacción funcional que se había informado, entre el *let-7* y RAS (Johnson, S.M. y col., Cell 120:635-647 (2005)).

Tabla 6. Análisis de ontología génica (proceso biológico) para las dianas de transcripción predichas de *hsa-mir-155* y *hsa-let-7a*.

Proceso biológico	Ontología Génica	Valor de p
<b><i>hsa-mir-155</i></b>		
regulación del proceso biológico	GO:0050789	3,44343E-05
regulación de base nucleica \ nucleósido \ nucleótido y metabolismo de ácido nucleico	GO:0019219	0,000149553
regulación de proceso fisiológico	G0:0050791	0,000192938
regulación de transcripción \ dependiente de ADN	GO:0006355	0,000244233
regulación del metabolismo	GO:0019222	0,000310887
regulación de la transcripción	GO:0045449	0,000367426

transcripción\dependiente de ADN	GO:0006351	0,000373583
transcripción	GO:0006350	0,000749403
Importación de sustrato del núcleo que contiene NLS	GO:0006607	0,000871079
Diferenciación de base nucleica celular B \ nucleósido \ nucleótido y metabolismo de ácido nucleico	GO:0030183	0,00142995
Selección de proteínas diana	GO:0006605	0,00238267
hemopoyesis	GO:0030097	0,00243434
proceso celular	GO:0009987	0,00270393
metabolismo de uridina	GO:0046108	0,0040568
activación celular B	GO:0042113	0,00458041
<b><i>hsa-let-7a</i></b>		
modificación proteica	GO:0006464	9,02643E-05
mantenimiento y crecimiento celular	GO:0008151	9,99217E-05
proceso fisiológico celular	GO:0050875	0,000128316
casca de la proteína quinasa	GO:0007243	0,000703203
proceso celular	GO:0009987	0,000870863
casca de señalización intracelular	GO:0007242	0,001290613
transporte	GO:0006810	0,004305096
modificación de la cromatina	GO:0016568	0,004414505
localización	GO:0051179	0,004492152
metabolismo del fósforo	GO:0006793	0,00481218
metabolismo del fosfato	GO:0006796	0,00481218

Se llevaron a cabo los análisis de la RT-PCR en tiempo real para *hsa-mir-155* y *hsa-let-7a-2* para determinar si la expresión de los miARN precursores también tenía un impacto pronóstico en los pacientes con adenocarcinoma. Primero, se sometieron 32 pares de adenocarcinoma del grupo original, en los que estaba disponible el ARN, al análisis RT-PCR en tiempo real. Se calculó la relación entre la expresión en cáncer de pulmón y la expresión de los correspondientes tejidos pulmonares no cancerosos y se clasificaron los casos de acuerdo con la relación de expresión. El análisis de supervivencia de Kaplan-Meier (FIG. 6, FIG. 7) demostró una supervivencia significativamente peor para los pacientes que tenían una expresión alta del precursor *hsa-mir-155* ( $p=0,047$ ; ensayo de intervalo logarítmico) o una expresión reducida del precursor *hsa-let-7a-2* ( $p=0,037$ ; ensayo de intervalo logarítmico) (Tabla 5B). Para validar más los clasificadores de pronóstico descritos aquí, se analizó un grupo adicional independiente de 32 adenocarcinomas utilizando el análisis RT-PCR en tiempo real. Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (FIG. 8, FIG. 9) mostraron también en esta cohorte una relación clara entre la expresión del *hsa-mir-155* precursor ( $p=0,033$ ; ensayo de intervalo logarítmico) y cerca de la significación en la expresión de *hsa-let-7a-2* ( $p=0,084$ ; ensayo de intervalo logarítmico) (Tabla 5B). Además, se descubrió que la expresión alta del precursor *hsa-mir-155* era un predictor independiente de pronóstico malo con un análisis de regresión de riesgos proporcionales de Cox multivariado (Tabla 5B). Para confirmar más si había cualquier fuerza de agrupamiento en el grupo original (32 casos) y el grupo adicional (32 casos), se llevaron a cabo los análisis de supervivencia multivariado y univariado de los 64 casos. De manera congruente con los resultados previos, estos análisis mostraron la significación de la expresión del *hsa-mir-155* precursor (Tabla 5B; FIG. 10). Es importante decir que la expresión reducida del precursor *hsa-let-7a-2* también tiene un impacto pronóstico similar en los pacientes con adenocarcinoma (Tabla 5B; FIG. 11), lo que es congruente con un informe previo (Takamizawa, J. y col., Cancer Res. 64, 3753-3756 (2004)).

#### **Ejemplo 5: Falta de regulación epigenética de la expresión de miARN en líneas celulares de NSCLC.**

##### Materiales y métodos

##### Análisis de micromatriz

El análisis de micromatriz se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente (Liu, C.G., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 101: 9740-9744 (2004), véase también, el Ejemplo 1).

##### Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente en el presente documento (véase, por ejemplo, el Ejemplo 1).

##### Tratamiento con 5-aza-dC y/o TSA

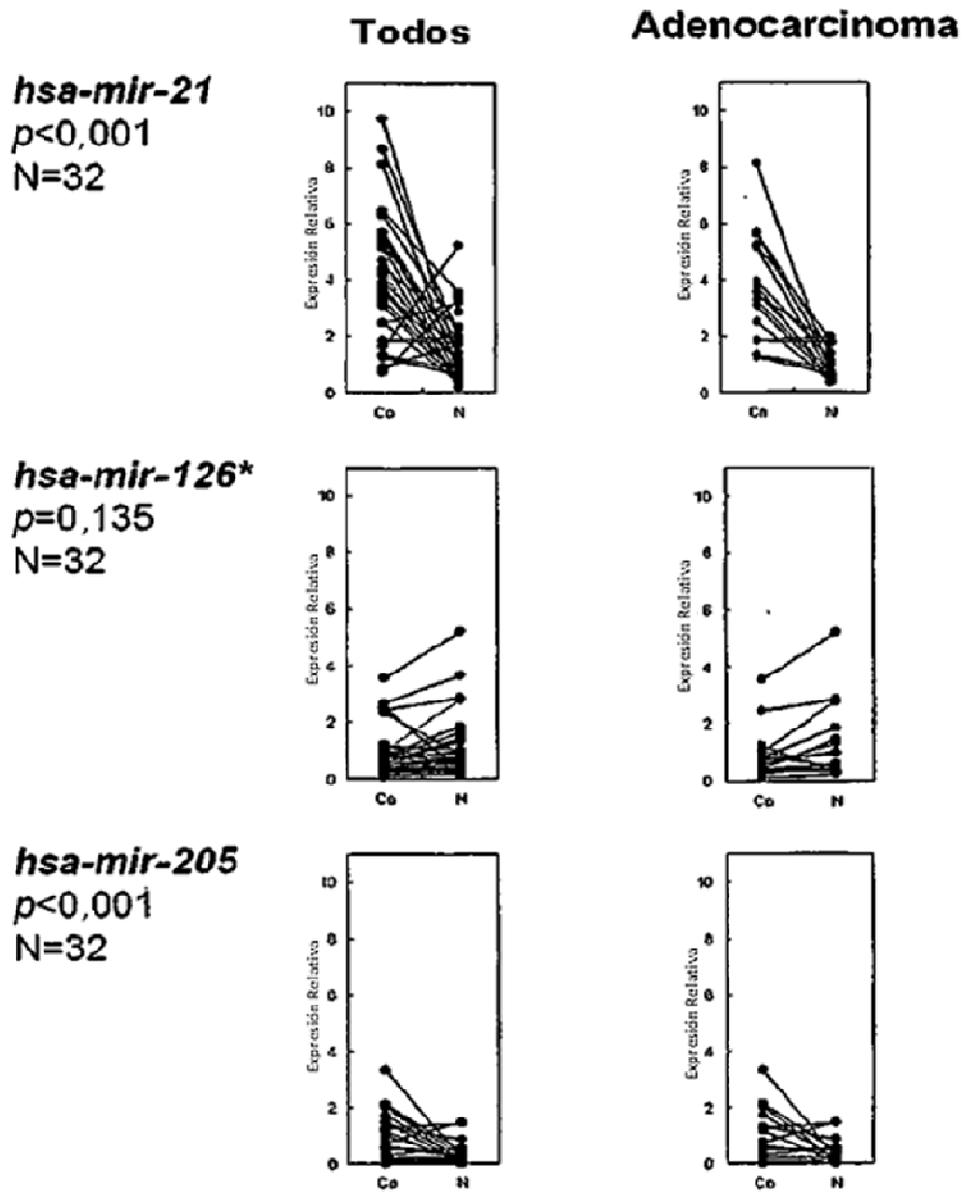
Se incubaron células A549 y NCI-H157 de cáncer de pulmón (disponibles en la American Tissue Culture Collection) en un medio que contenía 5-aza-dC 1,0 mM (Sigma, St. Louis, MO) durante 48 h y luego se incubaron durante 24 h adicionales en presencia de TSA 1,0 mM (Sigma, St. Louis, MO). Se aisló el ARN total con ReactivoTRIZOL<sup>®</sup> (Invitrogen) y se llevó a cabo el análisis de micromatriz como se ha descrito anteriormente. Cada tratamiento se llevó a cabo por triplicado.

Resultados

5 Se utilizaron las micromatrices de miARN para analizar la expresión de varios miARN en el tratamiento con 5-aza-2'-  
desoxicitidina (5-aza-dC), un inhibidor de la metilación del ADN, y/o Tricostatina A (TSA), un potente inhibidor de la  
histona desacetilasa, en dos líneas celulares de cáncer de pulmón (A549 y NCI-H157). Aunque se confirmó el  
aumento de la expresión de un gen, que se sabe que está silenciado transcripcionalmente (*MYO18B*) después del  
tratamiento con 5-aza-dC o TSA (FIG. 12), ningún miARN de la micromatriz mostró cambios de expresión,  
estadísticamente significativos tras el tratamiento con cualquiera de los productos, sugiriendo que la hipermetilación  
y la desacetilación de histona no eran responsables de la reducción de los niveles de la expresión de miARN, al  
10 menos en estas dos líneas celulares. Aunque esta invención se ha mostrado y descrito particularmente con  
referencia a las realizaciones preferidas de la misma, se entenderá por los expertos en la técnica que se pueden  
hacer varios cambios en su forma y detalles sin alejarse del ámbito de lo que engloba la invención en las  
reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un procedimiento para diagnosticar si un sujeto tiene cáncer de pulmón, que comprende la medición del nivel de al menos un producto génico del miR en una muestra de ensayo de dicho sujeto, en el que una alteración del nivel del producto génico del miR en la muestra de ensayo, con respecto al nivel de un producto génico correspondiente del miR en una muestra de control, es indicativa de que el sujeto tiene cáncer de pulmón, en el que el al menos un producto génico del miR se selecciona entre el grupo que consiste en miR-155.
2. Un procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 1 en el que el nivel del al menos un producto génico del miR en la muestra de ensayo es mayor que el nivel del producto génico correspondiente del miR en la muestra de control.
- 10 3. Un procedimiento para determinar el pronóstico de un sujeto con cáncer de pulmón, que comprende la medición del nivel de al menos un producto génico del miR en una muestra de ensayo de dicho sujeto, en el que:
- 15 el producto génico del miR está asociado con un pronóstico adverso del cáncer de pulmón; y una alteración del nivel del al menos un producto génico del miR en la muestra de ensayo de pulmón, con respecto al nivel del correspondiente producto génico del miR en una muestra de control, es indicativa de un pronóstico adverso en el que al menos un producto génico del miR se selecciona entre el grupo que consiste en miR-155.
4. Un procedimiento para diagnosticar si un sujeto tiene un cáncer de pulmón con un pronóstico adverso en un sujeto, que comprende:
- 20 (1) la transcripción inversa de ARN de una muestra de ensayo obtenida del sujeto para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana;
- (2) hibridar los oligodesoxinucleótidos diana con una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN para proporcionar un perfil de hibridación de dicha muestra de ensayo; y
- 25 (3) comparar el perfil de hibridación de la muestra de ensayo con el perfil de hibridación generado a partir de una muestra de control, en el que una alteración de la señal es indicativa de que el sujeto tiene un cáncer de pulmón con un pronóstico adverso, en el que una alteración de la señal de al menos un producto génico del miR seleccionado entre el grupo que consiste en miR-155 es indicativa de que el sujeto tiene un cáncer de pulmón con un pronóstico adverso.
5. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 3 o 4 en el que el cáncer de pulmón es un adenocarcinoma pulmonar.
- 30 6. Un procedimiento de acuerdo con la Reivindicación 4, en el que la micromatriz comprende al menos un oligonucleótido sonda específico de miARN para un miARN seleccionado entre el grupo que consiste en miR-155.



**FIG. 1**

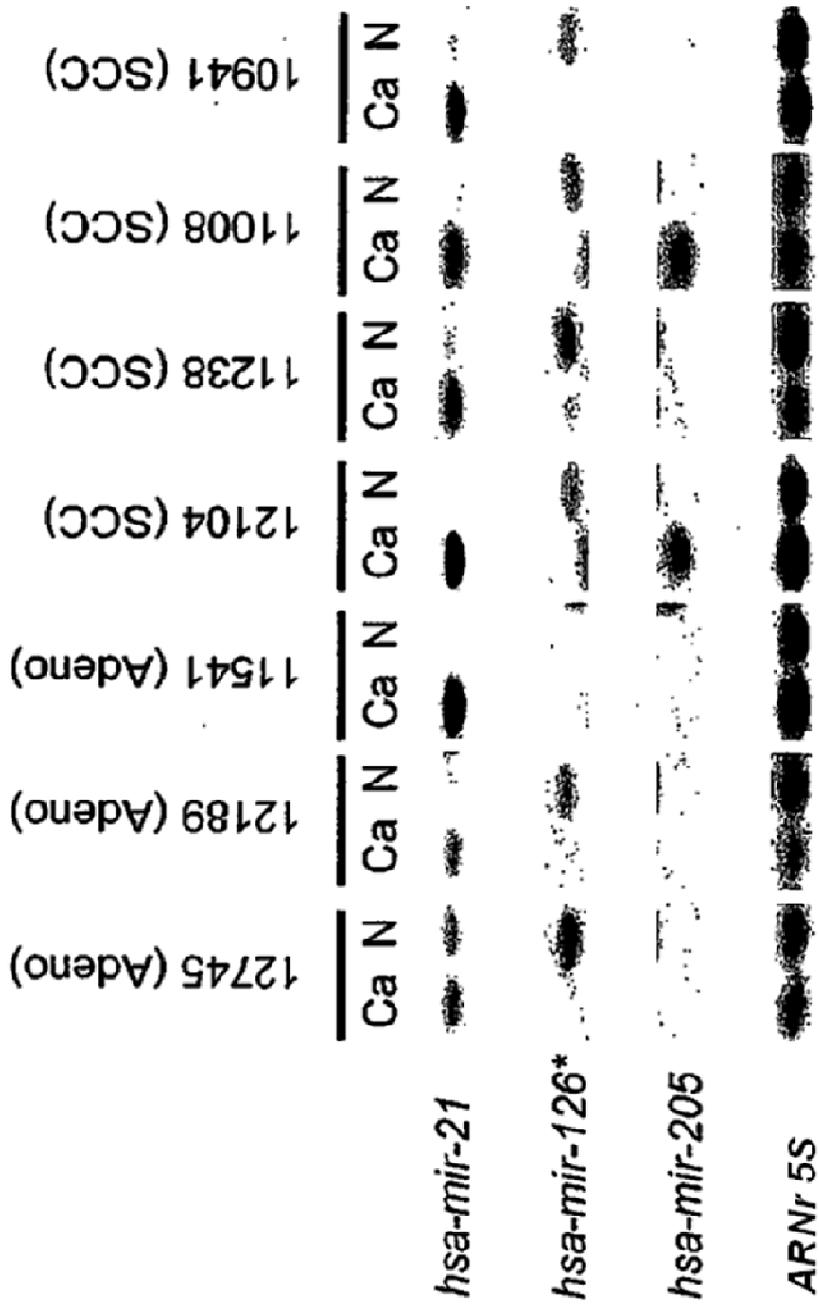


FIG. 2

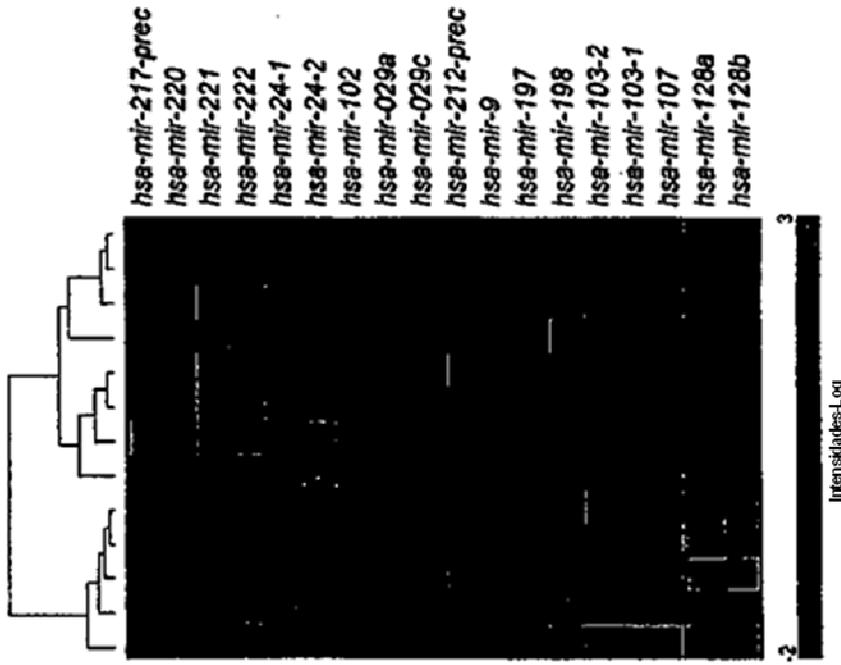


FIG. 3B

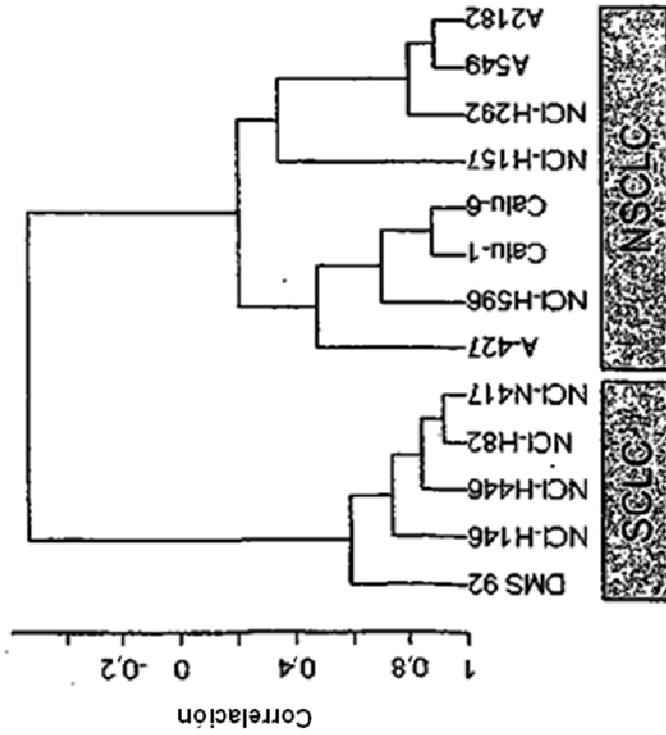


FIG. 3A

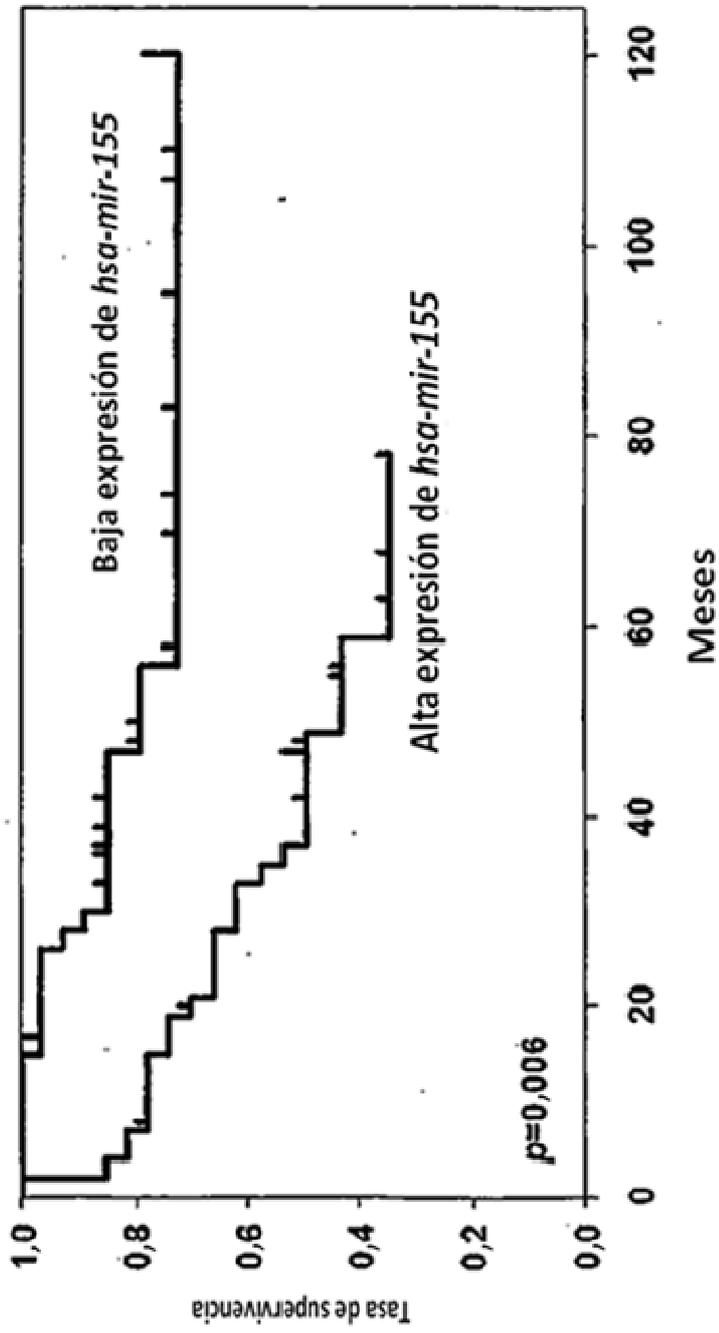


FIG. 4

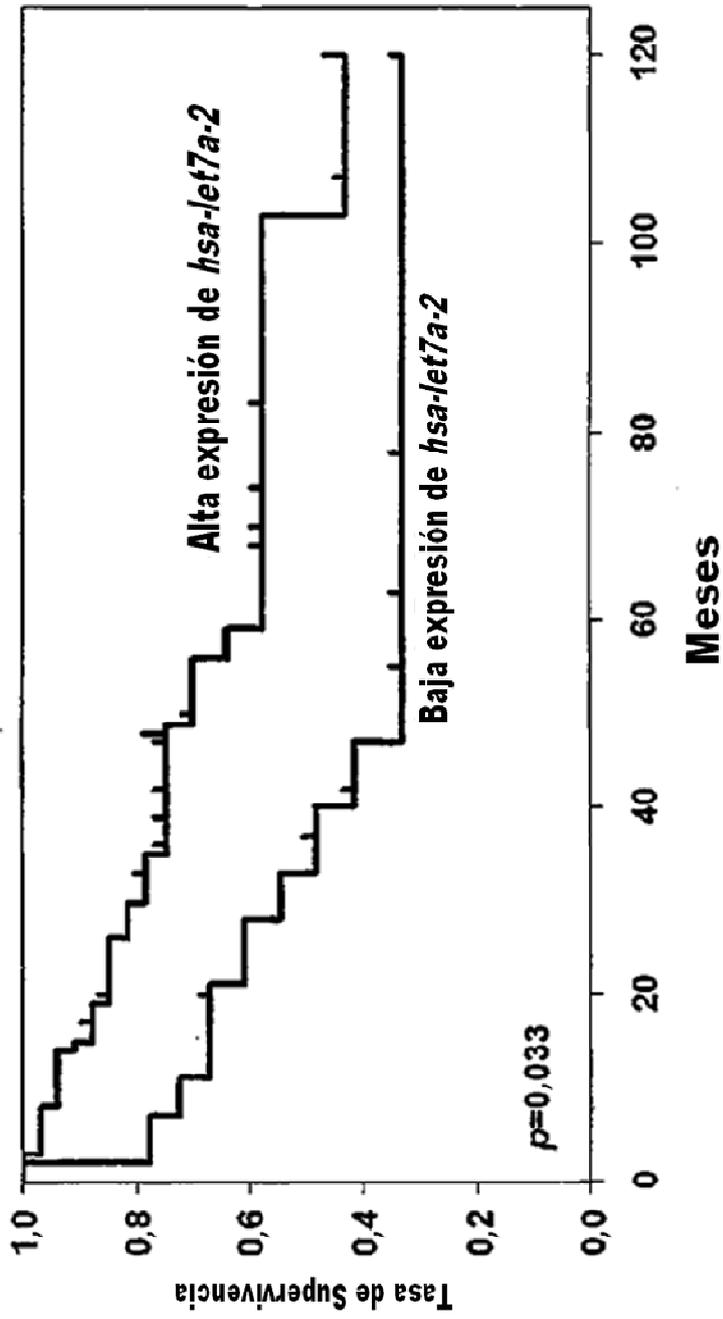


FIG. 5

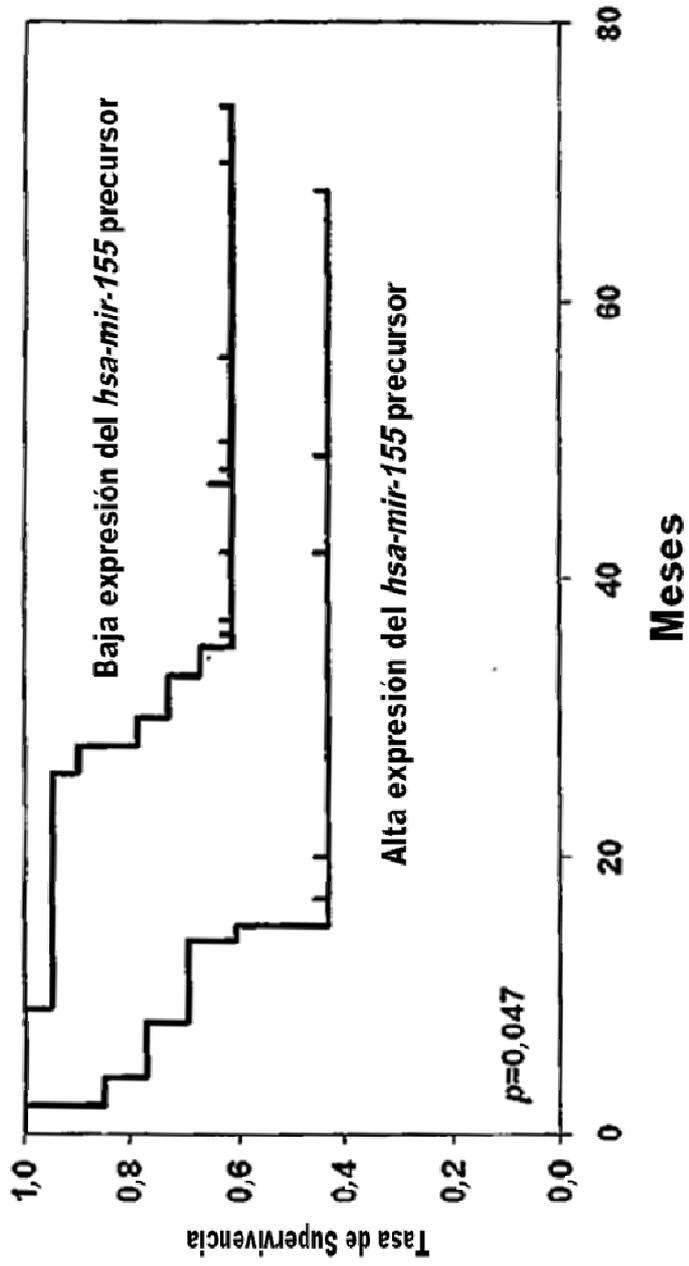


FIG. 6

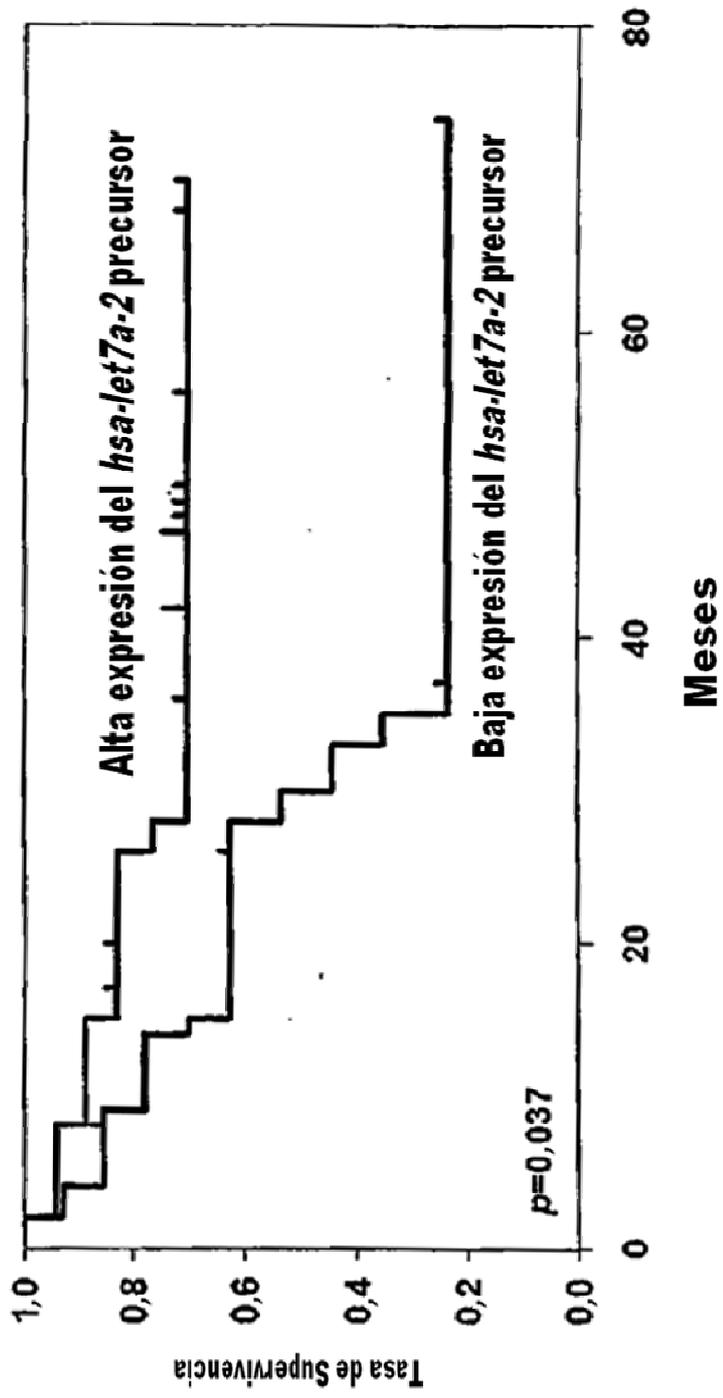


FIG. 7

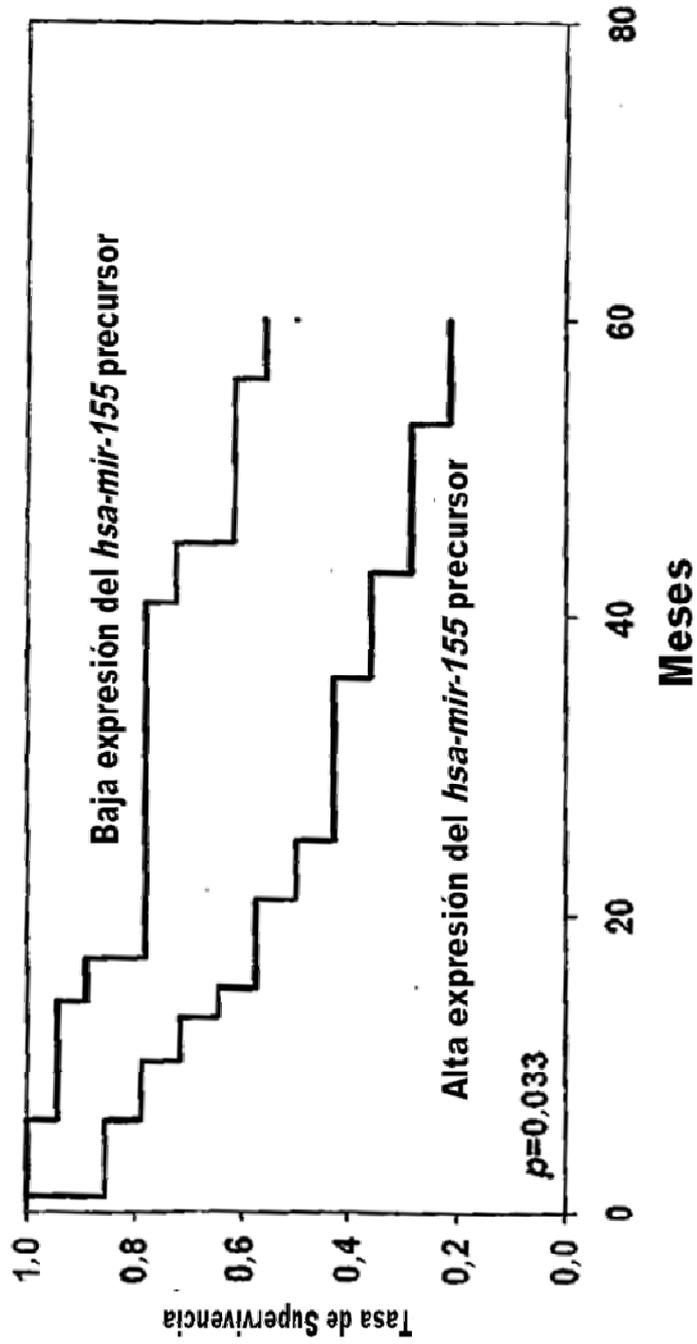


FIG. 8

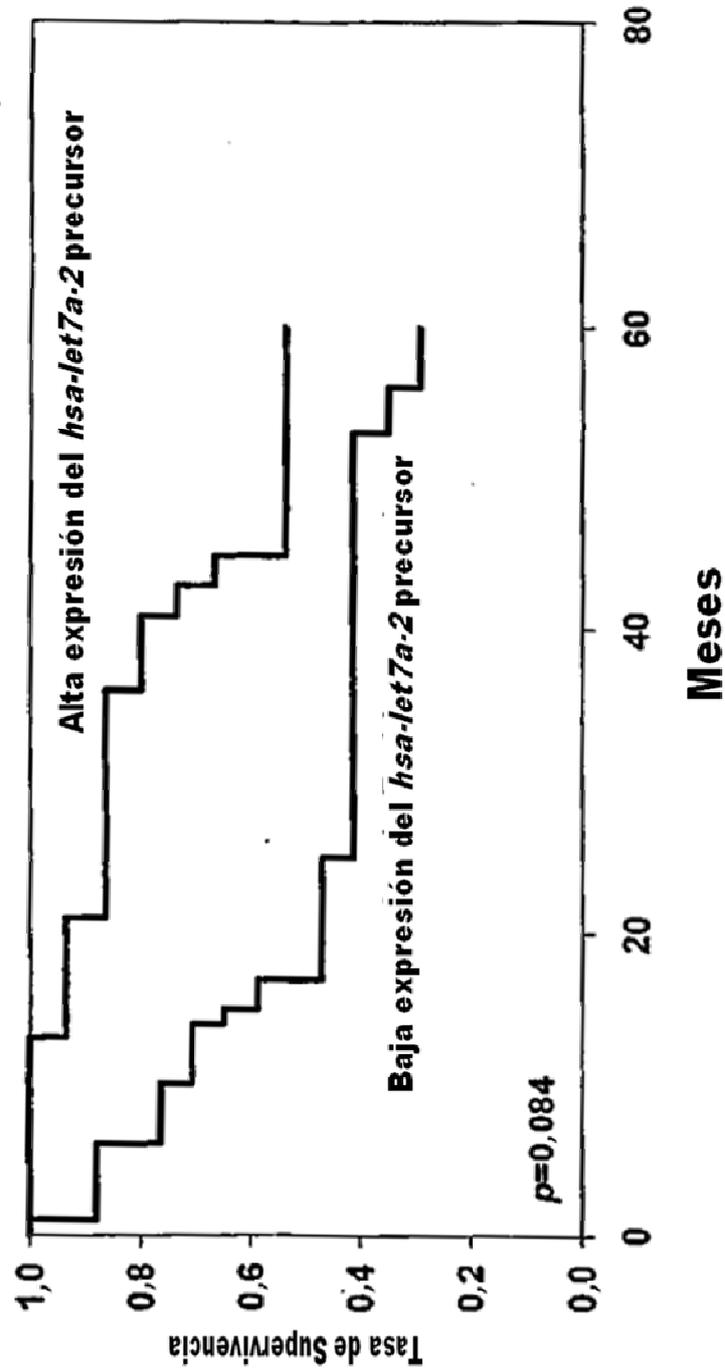


FIG. 9

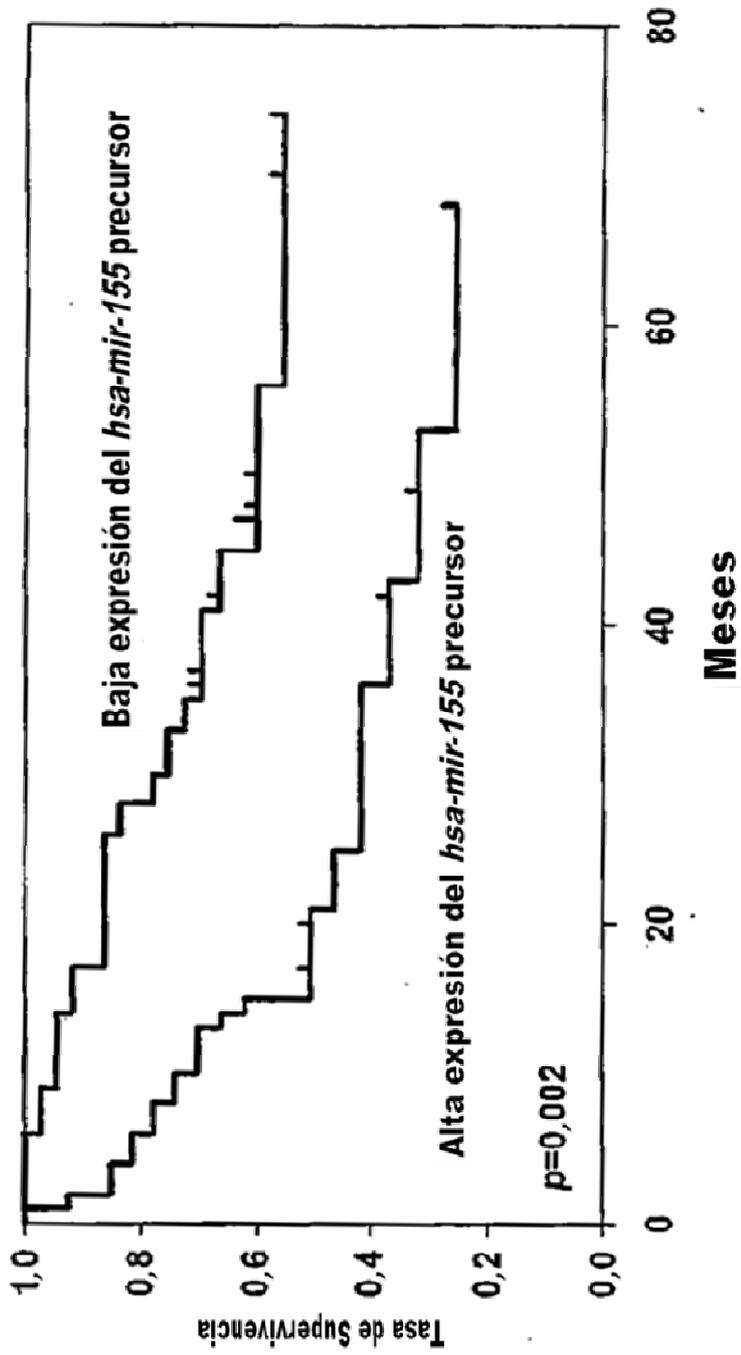


FIG. 10

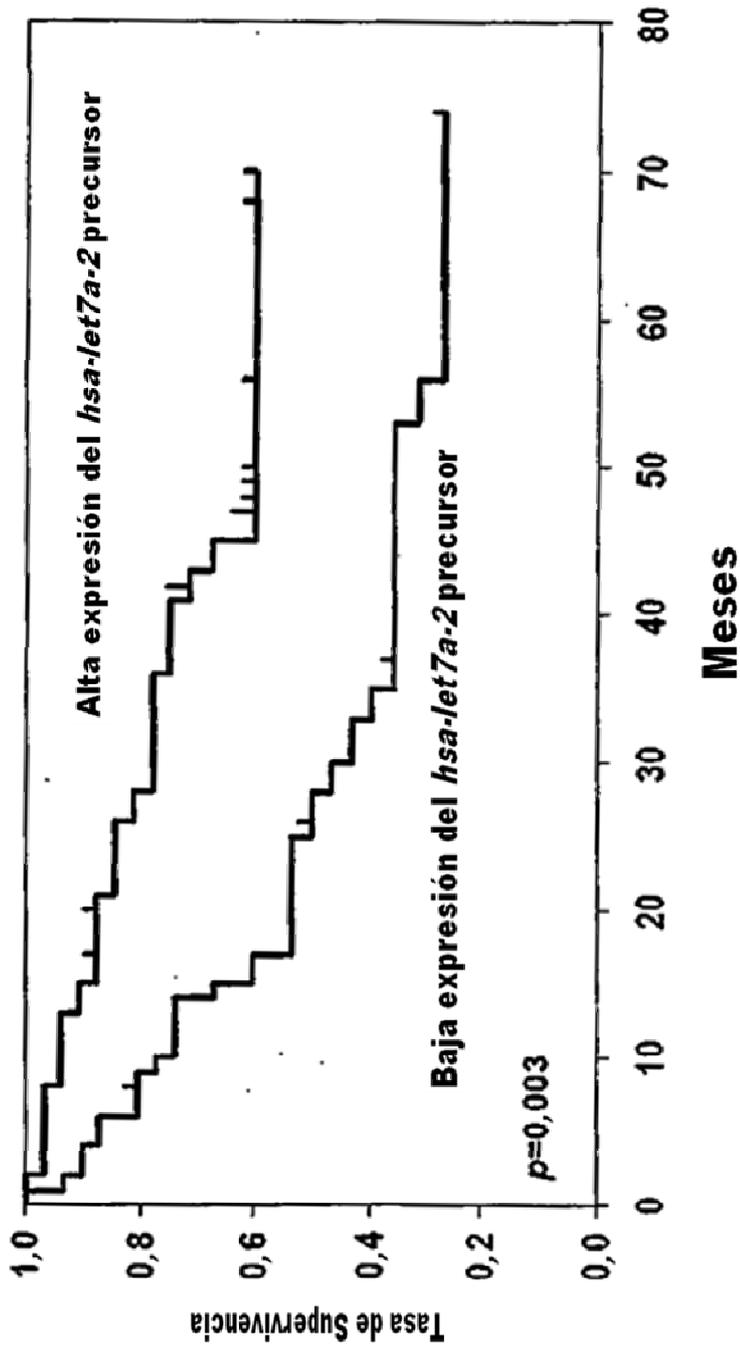


FIG. 11

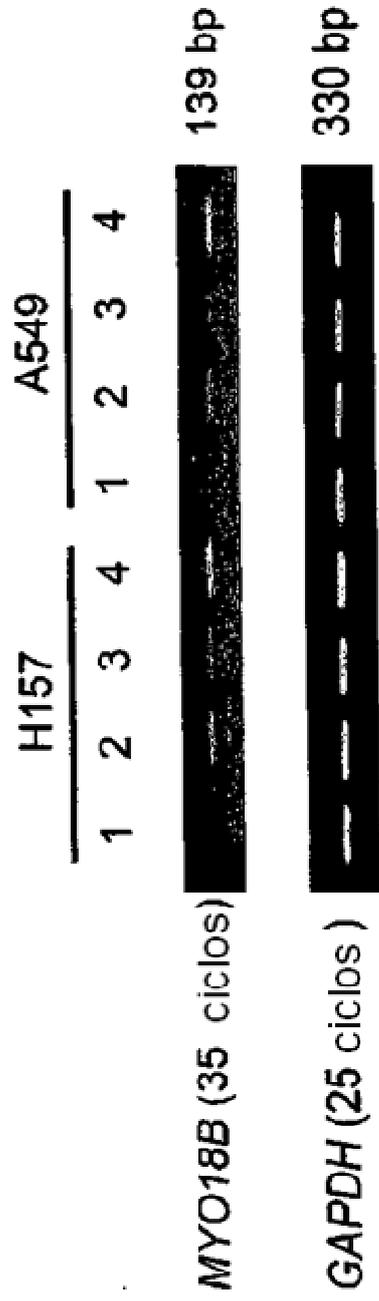


FIG. 12