

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 446 362**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2007** **E 11151772 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2013** **EP 2371971**

54 Título: **Huellas de microARN durante megacariocitopoyesis humana**

30 Prioridad:

20.03.2006 US 743585 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.03.2014

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.;
CALIN, GEORGE A. y
GARZON, RAMIRO**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 446 362 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

Huellas de microARN durante megacariocitopoyesis humana

5 Antecedentes de la invención

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

Hay pruebas sólidas de que los miARN desempeñan un papel en la hematopoyesis de mamíferos. En ratones, se expresan diferencialmente miR-181, miR-223 y miR-142 en tejidos hematopoyéticos, y su expresión está regulada durante la hematopoyesis y el compromiso de linaje (Chen, C. Z., *et al.* (2004) *Science* 303, 83-86). La expresión ectópica de miR-181 en células progenitoras hematopoyéticas murinas condujeron a la proliferación en el compartimento de linfocitos B (Chen, C. Z., *et al.* (2004) *Science* 303, 83-86). La realización de perfiles génicos de miARN sistemáticos en células del sistema hematopoyético murino reveló diferentes patrones de expresión de miARN en el sistema hematopoyético en comparación con tejidos neuronales, e identificaron cambios de expresión de miARN individuales que se producen durante la diferenciación celular (Monticelli, S., *et al.* (2005) *Genome Biology* 6, R71). Un estudio reciente ha identificado la modulación negativa de miR-221 y miR-222 en cultivo eritropoyéticos humanos de células progenitoras de sangre del cordón umbilical CD34⁺ (Felli, N., *et al.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 18081-18086). Se descubrió que estos miARN se dirigían al oncogén c-Kit. Estudios funcionales adicionales indicaron que la reducción de estos dos miARN en cultivos eritropoyéticos desbloquea la producción de proteína Kit en el nivel de traducción lo que conduce a la expansión de células eritroides tempranas (Fell, N., *et al.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 18081-18086). En línea con la hipótesis de que los miARN regulan la diferenciación celular, se descubrió que miR-223 era un miembro clave de un circuito regulador que implicaba C/EBPα y NF1-A, que controla la diferenciación granulocítica en líneas celulares leucémicas promielocíticas agudas tratadas con ácido transretinoico (Fazi, F., *et al.* (2005) *Cell* 123, 819-831).

También se han encontrado miARN desregulados en tumores malignos hematopoyéticos. De hecho, el primer informe que ligaba los miARN y el cáncer implicaba la delección y regulación negativa del grupo miR-15a y miR-16-1, localizado en el cromosoma 13q14.3, una región habitualmente suprimida en leucemia linfocítica crónica (Calin, G. A., *et al.* (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 1554-15529). También se indicó alta expresión de miR-155 y el gen hospedador *BIC* en linfomas de linfocitos B (Metzler M., *et al.* (2004) *Genes Chromosomes and Cancer* 39; 167-169). Más recientemente, se ha mostrado que el grupo miR-17-92, que se localiza en una región genómica de amplificación en linfomas, está sobreexpresado en linfomas de linfocitos B humanos y la expresión forzada de este grupo actuó conjuntamente con la expresión de c-MYC para acelerar el desarrollo tumoral en un modelo de linfoma de linfocitos B de ratón (He, L., *et al.* (2005) *Nature* 435, 828-833). El documento WO2005/118806 describe métodos y composiciones para generar perfiles de miARN y emplear dichos perfiles en la terapia, diagnóstico y pronóstico de una serie de cánceres tales como leucemia mielógena aguda. Estas observaciones indican que los miARN son importantes reguladores de la hematopoyesis y pueden estar implicados en la transformación en tumores malignos.

Las plaquetas desempeñan un papel esencial en la hemostasis y trombosis. Se producen en grandes números a partir de sus células parentales, megacariocitos de médula ósea, y surgen de fragmentación del citoplasma. Solo recientemente se ha empezado a definir la base molecular de lo que puede convertirse en una gran familia de trastornos relacionados que afectan a la producción de plaquetas. Si el nivel de plaquetas en circulación desciende por debajo de un cierto número (trombocitopenia), el paciente corre el riesgo de hemorragia catastrófica. Los pacientes con cáncer que han recibido quimioterapia o trasplantes de médula ósea habitualmente tienen trombocitopenia, y la lenta recuperación del recuento de plaquetas en estos pacientes ha sido preocupante. La demanda de unidades de plaquetas para transfusión ha aumentado progresivamente principalmente debido a la necesidad de mantener un cierto nivel de plaquetas en dichos pacientes con cáncer o los que se someten a cirugía cardíaca importante.

La huella de microARN que se expresa diferencialmente en células cancerosas (por ejemplo, células de leucemia) puede ayudar a determinar miARN específicos que están implicados en el cáncer y otros trastornos (por ejemplo, trastornos plaquetarios). Además, la huella de dianas potenciales de esos miARN puede ayudar a desvelar su papel patológico. En particular, el descubrimiento de los patrones y secuencia de expresión de miARN durante la diferenciación hematopoyética puede proporcionar información acerca de los papeles funcionales de estos genes no

codificantes pequeños en hematopoyesis normal y maligna.

Existe la necesidad de nuevos métodos y composiciones para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de cáncer, trastorno mieloproliferativos y trastornos plaquetarios (por ejemplo, trastornos plaquetarios heredados).

5

Sumario de la invención

La presente invención se basa, en parte, en la identificación de miARN específicos que están implicados en la diferenciación megacariocítica y/o tienen niveles de expresión alterados en células cancerosas (por ejemplo, en leucemia megacarioblástica aguda (líneas celulares de LMA)). En el presente estudio, se ha investigado la expresión génica de miARN en cultivos de megacariocitos humanos de progenitores CD34⁺ de médula ósea y líneas celulares de leucemia megacarioblástica aguda. Los resultados de este análisis indican que varios miARN están regulados negativamente durante la diferenciación megacariocítica normal. Los resultados demuestran además que estos miARN se dirigen a genes implicados en megacariocitopoyesis, mientras que otros están sobreexpresados en células cancerosas.

En consecuencia, la invención abarca métodos para diagnosticar LMA en un sujeto (por ejemplo, un ser humano). De acuerdo con los métodos de la invención, el nivel de al menos un producto génico de miR en una muestra de ensayo del sujeto se compara con el nivel de un producto génico de miR correspondiente en un control, en el que el al menos un producto génico de miR es miR-135, y en el que el control es el nivel del al menos un producto génico de miR de un sujeto que no tiene LMA. Un aumento en el nivel del producto génico de miR en la muestra de ensayo, en relación con el nivel del producto génico de miR correspondiente en la muestra de control, es diagnóstico de LMA. En una realización, el método comprende además determinar el nivel de un producto génico de miR adicional seleccionado del grupo que consiste en miR-101, miR-126, miR-106 y miR-20. Se desvelan en el presente documento métodos adicionales. En los métodos desvelados en el presente documento, el cáncer que se diagnostica o pronostica puede ser una leucemia (por ejemplo, leucemia mieloide aguda (por ejemplo, leucemia megacarioblástica aguda)) o mieloma múltiple. Como alternativa, el trastorno mieloproliferativo puede seleccionarse del grupo que consiste en trombocitemia esencial (TE), policitemia vera (PV), mielodisplasia, mielofibrosis (por ejemplo, metaplasia mieloide agnogénica (MMA) (también denominada mielofibrosis idiopática)) y leucemia mielógena crónica (LMC).

También se desvela un método para tratar un cáncer y/o un trastorno mieloproliferativo en un sujeto (por ejemplo, un ser humano). En el método, se administra una cantidad eficaz de un compuesto para inhibir la expresión de al menos un producto génico de miR seleccionado del grupo que consiste en miR-101, miR-126, miR-99a, miR-99-prec, miR-106, miR-339, miR-99b, miR-149, miR-33, miR-135 y miR-20. El compuesto para inhibir la expresión de al menos un producto génico de miR inhibe la expresión de un producto génico de miR seleccionado del grupo que consiste en miR-101, miR-126, miR-106, miR-20 y miR-135. Como alternativa, el compuesto para inhibir la expresión de al menos un producto génico de miR inhibe la expresión de un producto génico de miR seleccionado del grupo que consiste en miR-106, miR-20 y miR-135. En los métodos desvelados en el presente documento, el cáncer que se trata puede ser una leucemia (por ejemplo, leucemia mieloide aguda (por ejemplo, leucemia megacarioblástica aguda)) o mieloma múltiple. Como alternativa, el trastorno mieloproliferativo puede seleccionarse del grupo que consiste en trombocitemia esencial (TE), policitemia vera (PV), mielodisplasia, mielofibrosis (por ejemplo, metaplasia mieloide agnogénica (MMA)) y leucemia mielógena crónica (LMC).

También se desvela un método para tratar un cáncer y/o un trastorno mieloproliferativo asociado con la sobreexpresión de un producto génico de MAFB en un sujeto (por ejemplo, un ser humano). En el método, se administra al sujeto una cantidad eficaz de al menos un producto génico de miR o una variante o fragmento biológicamente activo del mismo que se une con, y reduce la expresión de, el producto génico de MAFB. El al menos un producto génico de miR, variante o fragmento biológicamente activo del mismo puede comprender una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una secuencia de nucleótidos en el producto génico de MAFB. El al menos un producto génico de miR puede ser miR-130a o una variante o fragmento biológicamente activo del mismo. Los cánceres y trastornos mieloproliferativos adecuados para el tratamiento usando este método incluyen, por ejemplo, los descritos en el presente documento.

También se desvela un método para tratar un cáncer y/o un trastorno mieloproliferativo asociado con la sobreexpresión de un producto génico de HOXA1 en un sujeto (por ejemplo, un ser humano). En el método, se administra al sujeto una cantidad eficaz de al menos un producto génico de miR o una variante o fragmento biológicamente activo del mismo, que se une con, y reducen la expresión de, el producto génico de HOXA1. El al menos un producto génico de miR, variante o fragmento biológicamente activo del mismo comprende una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una secuencia de nucleótidos en el producto génico de HOXA1. El al menos un producto génico de miR puede ser miR-10a o una variante o fragmento biológicamente activo del mismo. Los cánceres y trastorno mieloproliferativos adecuados para el tratamiento usando este método incluyen, por ejemplo, los descritos en el presente documento.

También se desvela un método para determinar y/o predecir diferenciación megacariocítica. En este método, se determina el nivel de al menos un producto génico de miR en una muestra (por ejemplo, una muestra de un sujeto

(por ejemplo, un ser humano)) que comprende descendencia megacariocítica y/o megacariocitos. Ese nivel se compara con el nivel del producto génico de miR correspondiente en un control. Una alteración en el nivel del al menos un producto génico de miR en la muestra, en relación con el del control, es indicativa de diferenciación megacariocítica. La alteración puede ser una reducción del nivel del al menos un producto génico de miR en la muestra. El al menos un producto génico de miR puede seleccionarse del grupo que consiste en miR-10a, miR-126, miR-106, miR-010b, miR-130a, miR-130a-prec, miR-124a, miR-032-prec, miR-101, miR-30c, miR-213, miR-132-prec, miR-150, miR-020, miR-339, let-7a, let-7d, miR-181c, miR-181b y miR-017. Como alternativa, el al menos un producto génico de miR se selecciona del grupo que consiste en miR-10a, miR-10b, miR-30c, miR-106, miR-126, miR-130a, miR-132 y miR-143.

También se desvelan en el presente documento composiciones farmacéuticas para tratar cáncer y/o un trastorno mieloproliferativo. Las composiciones farmacéuticas comprenden al menos un compuesto de inhibición de la expresión de miR y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El al menos un compuesto de inhibición de la expresión de miR puede ser específico de un producto génico de miR cuya expresión es mayor en células cancerosas (por ejemplo, células de leucemia megacarioblástica aguda (LMA)) que en células de control (es decir, está regulada positivamente). El compuesto de inhibición de la expresión de miR puede ser específico de uno o más productos génicos de miR seleccionados del grupo que consiste en miR-101, miR-126, miR-99a, miR-99-prec, miR-106, miR-339, miR-99b, miR-149, miR-33, miR-135 y miR-20. Como alternativa, el compuesto de inhibición de la expresión de miR puede ser específico para uno o más productos génicos de miR seleccionados del grupo que consiste en miR-101, miR-126, miR-106, miR-20 y miR-135. En otra alternativa, el compuesto de inhibición de la expresión de miR puede ser específico para uno o más productos génicos de miR seleccionados del grupo que consiste en miR-106, miR-20 y miR-135. La composición farmacéutica puede comprender además al menos un agente antineoplásico.

Las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento pueden usarse para tratar un cáncer asociado con la sobreexpresión de un producto génico de MAFB y/o un trastorno mieloproliferativo asociado con la sobreexpresión de un producto génico de MAFB. Dichas composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad eficaz de al menos un producto génico de miR y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el al menos un producto génico de miR se une con, y reduce la expresión de, el producto génico de MAFB. El al menos un producto génico de miR puede comprender una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una secuencia de nucleótidos en el producto génico de MAFB. El al menos un producto génico de miR puede ser miR-130a o una variante o un fragmento biológicamente activo del mismo. La composición farmacéutica puede comprender además al menos un agente antineoplásico.

Las composiciones farmacéuticas puede usarse para tratar un cáncer asociado con la sobreexpresión de un producto génico de HOXA1 y/o un trastorno mieloproliferativo asociado con la sobreexpresión de un producto génico de HOXA1. Dichas composiciones farmacéuticas comprenden una cantidad eficaz de al menos un producto génico de miR y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el al menos un producto génico de miR se une con, y reduce la expresión de, el producto génico de HOXA1. El al menos un producto génico de miR puede comprender una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una secuencia de nucleótidos en el producto génico de HOXA1. El al menos un producto génico de miR puede ser miR-10a o una variante o fragmento biológicamente activo del mismo. La composición farmacéutica comprende además al menos un agente antineoplásico.

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

Breve descripción de los dibujos

El archivo de patente o solicitud contiene al menos un dibujo ejecutado en color. Se proporcionarán copias de esta patente o publicación de solicitud de patente con dibujo o dibujos en color por la Oficina tras su petición y pago de la tasa necesaria.

Las FIGURAS 1A-1D representan Transferencias de Northern y resultados de PCR de miARN en Tiempo Real, que validan datos de microplaca de microARN en experimentos de diferenciación de progenitor CD34.

La FIGURA 1A representa Transferencias de Northern para miR-130a, miR-10a y miR-223. Se realizó un control de ARN de carga con U6.

La FIGURA 1B es una gráfica que representa RT-miARN-PCR para miR-10a, miR-106, miR-126 y miR-130a. La expresión de miARN se presenta como un factor de diferencia con respecto a células CD34⁺ antes del cultivo.

La FIGURA 1C es una gráfica que representa la expresión temporal de miR-223 por micromatriz.

La FIGURA 1D es una gráfica que representa la expresión temporal de miR-15-1 y miR-16-1 por RT-miARN PCR.

Las FIGURAS 2A-2C demuestran que MAFB es una diana de miR-130a.

La FIGURA 2A representa ARNm de MAFB y datos de expresión de proteínas en progenitores CD34⁺ inducidos a diferenciación megacariocítica. Se usó β actina para RT-PCR y controles de carga de transferencia de Western.

La FIGURA 2B es una gráfica que representa la represión relativa de la actividad luciferasa en células MEG01 cotransfectadas con miR-10a y PGL3 3'UTRMAFB, miR-10a con PGL3 3'UTR, miR-10a mutado coincidente con siembra y mezcla con 3'UTR MAFB mutado y de tipo silvestre.

La FIGURA 2C representa transferencias de Western de lisados proteicos totales de MAFB en células K562 transfectadas con miR-130a y mezcla.

Las FIGURAS 3A-3G demuestran que miR-10a regulan negativamente HOXA1 mediando en la escisión de ARN.

La FIGURA 3A es una gráfica que representa los resultados de RT-PCR para expresión génica de HOXA1 en megacariocitos diferenciados (cantidad relativa de transcrito con respecto a progenitores CD34⁺ en la línea basal).

La FIGURA 3B es una transferencia de Western que muestra la expresión de proteína haxa1 en megacariocitos diferenciados.

La FIGURA 3C es una gráfica que representa la represión relativa de la actividad luciferasa de plásmido indicador PGL3 clonado HOXA1 3' UTR cuando se cotransfecta con miR-10a y mezcla de control.

La FIGURA 3D es un esquema que muestra la complementariedad entre miR-10a y el 3'UTR de HOXA1 como se predice por PICTAR.

La FIGURA 3E representa resultados de RT-PCR para expresión génica de miR-10a en células K562 transfectadas con precursor de miR-10a y mezcla.

La FIGURA 3F representa resultados de RT-PCR para expresión génica de HOXA1 en células K562 transfectadas con precursor de miR-10a y mezcla.

La FIGURA 3G es una transferencia de Western que muestra la expresión de HOXA1 en células K562 con miR-10a precursor y mezcla de control.

Las FIGURAS 4A y 4B muestran resultados de caracterización fenotípica de progenitores CD34⁺ diferenciados *in vitro*.

La FIGURA 4A representa tinciones de May-Giemsa que se realizaron en preparaciones de cytopspin a partir de progenitores CD34⁺ en cultivo en diferentes días de cultivo (día 6, día 10, día 12 y día 14). El día 4, la mayoría de las células eran inmaduras, como se demuestra por la alta relación de núcleo:citoplasma. Se observaron células mayores y multinucleares el día 10. El día 14, se observaron células poliploides, predominantemente mayores, con largos procesos citoplásmicos y numerosas vesículas de membrana con invaginaciones y vacuolas (aumento original 400X).

La FIGURA 4B representa análisis de FACS de megacariocitos diferenciados *in vitro* CD34. Se muestra el fenotipo de membrana de células progenitoras CD34⁺ que se dejan crecer en cultivo. Las células se recogieron los días 10 (D+10), 14 (D+14) y 16 (D+16) y se analizaron por marcaje fluorescente individual usando un anticuerpo anti CD41, un anticuerpo anti CD61a, un anticuerpo anti CD42a y sus anticuerpos monoclonales de isotipos respectivos (isotipo D + 10; isotipo D + 14; isotipo D + 16). Se realizó doble marcaje con Ab monoclonales anti CD41a y CD61b el día 14 solamente.

La FIGURA 5 es una gráfica que representa los resultados de expresión de RT-PCR para miR-20 y miR-17 en megacariocitos diferenciados. Los resultados se presentan como factor de diferencia con respecto a células CD34⁺ en la línea basal después de normalización con cálculos de Ct delta y 18S.

La FIGURA 6A es una gráfica que representa la expresión temporal de miR-16-1 durante la diferenciación megacariocítica. El valor de expresión absoluto de miR-16-1 se determinó por una normalización de mediana por microplaca.

La FIGURA 6B es una gráfica que representa la expresión temporal de miR-142 durante la diferenciación megacariocítica. El valor de expresión absoluto de miR-142 se determinó por una normalización de mediana por microplaca.

La FIGURA 6C es una gráfica que representa la expresión temporal de miR-181b durante la diferenciación megacariocítica. El valor de expresión absoluto de miR-181b se determinó por una normalización de mediana por microplaca.

La FIGURA 7 es una Transferencia de Northern de ARN total obtenido de células K562 transfectadas con secuencias de precursor de *miR-130a* y mezcla hibridadas con la sonda para *miR-130a*. Se realizó un control de carga de ARN usando hibridación de U6.

- 5 La FIGURA 8 es un esquema que representa microARN que se localizan en los grupos génicos HOXA, HOXB, HOXC y HOXD.

La FIGURA 9A es una gráfica que representa la expresión génica de HOXB4 en megacariocitos diferenciados. Los resultados de RT-PCR para HOXB4 se muestran como factor de diferencia en el nivel de expresión con respecto a progenitores CD34⁺ en la línea basal (antes del cultivo).

La FIGURA 9B es una gráfica que representa la expresión génica de HOXB5 en megacariocitos diferenciados. Los resultados de RT-PCR para HOXB5 se muestran como factor de diferencia en los niveles de expresión con respecto a progenitores CD34⁺ en la línea basal (antes del cultivo).

La FIGURA 10 es una gráfica que representa la expresión de microARN en líneas celulares megacarioblásticas agudas por RT-PCR. Los resultados se expresan como factor de diferencia con respecto a megacariocitos diferenciados con CD34 después de normalización con cálculos de Ct delta y 18S.

20 Descripción detallada

La presente divulgación se basa, en parte, en la identificación de microARN específicos (miARN) que están implicados en diferenciación megacariocítica y/o tienen niveles de expresión alterados en células cancerosas (por ejemplo, en leucemia megacarioblástica aguda (líneas celulares de LMA)). Se desvela además la asociación de estos miARN con características de diagnóstico, pronóstico y terapéuticas particulares. Como se describe y ejemplifica en el presente documento:

- i) se regula negativamente miARN particular durante la diferenciación megacariocítica;
- 30 ii) el factor de transcripción MAFB es una diana para *miR-130a*;
- iii) la expresión de *miR-10a* es paralela a la de la expresión génica de HOXB;
- iv) *miR-10a* regula negativamente la expresión de HOXA1; y
- 35 v) está regulado miARN particular en células cancerosas (por ejemplo, células de leucemia megacarioblástica aguda (LMA)).

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

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

Las Tablas 1a y 1b representan las secuencias de nucleótidos de microARN humanos maduros y precursores particulares.

Tabla 1a: secuencias precursoras de microARN humano

Nombre del Precursor	Secuencia (5' a 3')*	SEC ID Nº
<i>let-7a-1</i>	CACUGUGGGAUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUUA GGGUCACACCCACCACUGGGAGAUAAACUAUACAAU CUACUGUCUUCUUAACGUU	1

<i>let-7a-2</i>	AGGUUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUUAGAAUUAC AUCAAGGGAGAUAAACUGUACAGCCUCCUAGCUUUC CU	2
<i>let-7a-3</i>	GGGUGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUUUGGGGCUCUG CCCUGCUAUGGGGAUAACUAUACAAUCUACUGUCUU UCCU	3
<i>let-7a-4</i>	GUGACUGCAUGCUCUCCAGGUUGAGGUAGUAGGUUG UAUAGUUUAGAAUUACACAAGGGAGAUAAACUGUAC AGCCUCCUAGCUUCCUUGGGUCUUGCACUAAACA AC	4
<i>let-7b</i>	GGCGGGGUGAGGUAGUAGGUUGUGUGGUUUCAGGG CAGUGAUGUUGCCCCUCGGAAGAUAAUAACAAC CUACUGCCUCCCCUG	5
<i>let-7c</i>	GCAUCCGGGUUGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUUUAG AGUUACACCCUGGGAGUUAACUGUACAACCUUCUA GCUUCCUUGGAGC	6
<i>let-7d</i>	CCUAGGAAGAGGUAGUAGGUUGCAUAGUUUUAGGG CAGGGAUUUUGCCCACAAGGAGGUAAUAUACGAC CUGCUGCCUUCUUAAGG	7
<i>let-7d-v1</i>	CUAGGAAGAGGUAGUAGUUUGCAUAGUUUUAGGGC AAAGAUUUUGCCCACAAGUAGUUAGCUAUACGACC UGCAGCCUUUUGUAG	8
<i>let-7d-v2</i>	CUGGCUGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUUGGUCGGGU UGUGACAUUGCCCGCUGUGGAGAUAAACUGCGCAAG CUACUGCCUUGCUAG	9
<i>let-7e</i>	CCCGGGCUGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUUGAGGAG GACACCCAAGGAGAUCACUAUACGGCCUCCUAGCUU UCCCCAGG	10
<i>let-7f-1</i>	UCAGAGUGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUUGUGGGGU AGUGAUUUUACCCUGUUCAGGAGAUAAUAUACAA UCUAUUGCCUCCCCUGA	11
<i>let-7f-2-1</i>	CUGUGGGAUGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUUGUGGG GUAGUGAUUUUACCCUGUUCAGGAGAUAAUAUAC AAUCUAUUGCCUCCCCUGA	12
<i>let-7f-2-2</i>	CUGUGGGAUGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUUUUAGG GUCAUACCCCAUCUUGGAGAUAAUAUACAGUCUA CUGUCUUUCCCACGG	13
<i>let-7g</i>	UUGCCUGAUUCCAGGCUGAGGUAGUAGUUUGUACA GUUUGAGGGGUCUAUGAUACCAACCCGGUACAGGAGA UAACUGUACAGGCCACUGCCUUGCCAGGAACAGCGC GC	14
<i>let-7i</i>	CUGGCUGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUUGGUCGGGU UGUGACAUUGCCCGCUGUGGAGAUAAACUGCGCAAG CUACUGCCUUGCUAG	15
<i>miR-1b-1-1</i>	ACCUACUCAGAGUACAUAUCUUCUUUAUGUACCCA AUGAACAUACAAUGCUAUGGAAUGUAAAGAAGUAU GUAUUUUUGGUAGGC	16
<i>miR-1b-1-2</i>	CAGCUAACAACUAGUAAUACCUACUCAGAGUACA UACUUCUUUAUGUACCCAUAUGAACAUACAAUGCU AUGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAUUUUUGGUAGGCA AUA	17

miR-1b-2	GCCUGCUUGGGAAACAUAUCUUCUUUAUAUGCCCAU AUGGACCUGCUAAGCUAUGGAAUGUAAAGAAGUAU GUAUCUCAGGCCGGG	18
miR-16	UGGGAACAUAUCUUCUUUAUAUGCCCAUAUGGAUC UGCUAAGCUAUGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAUCUC A	19
miR-1d	ACCUACUCAGAGUACAUAUCUUCUUUAUGUACCCAU AUGAACAUACAAUGCUAUGGAAUGUAAAGAAGUAU GUAUUUUUGGUAGGC	20
miR-7-1a	UGGAUGUUGGCCUAAGUUCUGUGUGGAAGACUAGUG AUUUUGUUGUUUUUAGAUAAACUAAAUCGACAACAA AUCACAGUCUGCCAUAUGGCACAGGCCAUGCCUCUA CA	21
miR-7-1b	UUGGAUGUUGGCCUAGUUCUGUGUGGAAGACUAGU GAUUUUGUUGUUUUUAGAUAAACUAAAUCGACAACA AAUCACAGUCUGCCAUAUGGCACAGGCCAUGCCUCU ACAG	22
miR-7-2	CUGGAUACAGAGUGGACCGGCGUGGCCCAUCUGGA AGACUAGUGAUUUUGUUGUUGUCUUACUGCGCUCA ACAACAAAUCCCAGUCUACCUA AUGGUGCCAGCCAU CGCA	23
miR-7-3	AGAUUAGAGUGGCUGUGGUCUAGUGCUGUGUGGAA GACUAGUGAUUUUGUUGUUCUGAUGUACUACGACA ACAAGUCACAGCCGGCCUCAUAGCGCAGACUCCCUU CGAC	24
miR-9-1	CGGGGUUGGUUGUUUAUCUUDUGGUUAUCUAGCUGUA UGAGUGGUGUGGAGUCUUCAUAAAAGCUAGAUAAAC GAAAGUAAAAUAACCCCA	25
miR-9-2	GGAAGCGAGUUGUUUAUCUUDUGGUUAUCUAGCUGUA UGAGUGUAUUGGUCUUCAUAAAAGCUAGAUAAACCGA AAGUAAAAACUCCUUA	26
miR-9-3	GGAGGCCCGUUUCUCUCUUGGUUAUCUAGCUGUA UGAGUGCCACAGAGCCGUCAUAAAAGCUAGAUAAAC GAAAGUAGAAAUGAUUCUA	27
miR-10a	GAUCUGUCUGUCUUCUGUAUAUACCCUGUAGAUGC GAAUUUGUGUAAGGAAUUUUGUGGUCACAAAUUCG UAUCUAGGGGAUAUGUAGUUGACAUAAACACUCC GCUCU	28
miR-10b	CCAGAGGUUGUAACGUUGUCUAUAUAUACCCUGUA GAACCGAAUUUGUGUGGUAUCCGUUAGUCACAGA UUCGAUUCUAGGGGAUAUAUGGUCGAUGCAAAAA CUUCA	29
miR-15a-2	GCGCGAAUGUGUGUUUAAAAAAAAAUAAAACCUUGG AGUAAAGUAGCAGCACAUAAUGGUUUGUGGAUUUU GAAAAGGUGCAGGCCAUAUUGUGCUGCCUCAAAAA UAC	30
miR-15a	CCUUGGAGUAAAGUAGCAGCACAUAAUGGUUUGUG GAUUUUGAAAAGGUGCAGGCCAUAUUGUGCUGCCU CAAAAAUACAAGG	31
miR-15b-1	CUGUAGCAGCACAUCAUGGUUUACAUGCUACAGUC AAGAUGCGAAUCAUUAUUUGCUGCUCUAG	32
miR-15b-2	UUGAGGCCUUAAGUACUGUAGCAGCACAUCAUGG UUUACAUGCUACAGUCAAGAUGCGAAUCAUUAUUU GCUGCUCUAGAAAUUUAAGGAAAUUCAU	33

miR-16-1	<u>GUCAGCAGUGCCU</u> <u>UAGCAGCACG</u> <u>UAAAUAUUGGCG</u> <u>UUAAGA</u> <u>UUCUAAAAUUAUCUCCAGUA</u> <u>UUAACUGUG</u> <u>CUGCUGAAGUAAGGUUGAC</u>	34
miR-16-2	<u>GUUCCACUCU</u> <u>AGCAGCACG</u> <u>UAAAUAUUGGCGUAGU</u> <u>GAAAUUAUAUUA</u> <u>AAACACCAAUUAUACUGUGCUGC</u> <u>UUUAGUGUGAC</u>	35
miR-16-13	<u>GCAGUGCCU</u> <u>UAGCAGCACG</u> <u>UAAAUAUUGGCGUUA</u> <u>GAUUCUAAAAUUAUCUCCAGUA</u> <u>UUAACUGUGCUGC</u> <u>UGAAGUAAGGU</u>	36
miR-17	<u>GUCAGAAUA</u> <u>AUGUCA</u> <u>AAAGUGCUUACAGUGCAGGUA</u> <u>GUGAU</u> <u>AUGUGCAUCU</u> <u>ACUGCAGUGAAGGCACUUGU</u> <u>AGCAUUAUGGUGAC</u>	37
miR-18	<u>UGUUCUA</u> <u>AAGGUGCAUCU</u> <u>AGUGCAGAUAGUGAAGUA</u> <u>GAU</u> <u>UAGCAUCUACUGCCC</u> <u>UAAGUGCUCUUCUGGC</u> <u>A</u>	38
miR-18-13	<u>UUUUUGUUC</u> <u>UAAGGUGCAUCU</u> <u>AGUGCAGAUAGUGA</u> <u>AGUAGA</u> <u>UUAAGCAUCUACUGCCC</u> <u>UAAGUGCUCUUC</u> <u>UGGCAUAAGAA</u>	39
miR-19a	<u>GCAGUCCUCUGU</u> <u>UAGUUUUGCAUAGUUGCACUACA</u> <u>AGAAGAAUGUAGU</u> <u>UGUGCAA</u> <u>AUCUAUGCAAAACUG</u> <u>AUGGUGGCCUGC</u>	40
miR-19a-13	<u>CAGUCCUCUGU</u> <u>UAGUUUUGCAUAGUUGCACUACAA</u> <u>GAAGAAUGUAGU</u> <u>UGUGCAA</u> <u>AUCUAUGCAAAACUGA</u> <u>UGGUGGCCUG</u>	41
miR-19b-1	<u>CACUGUUCU</u> <u>ADGGU</u> <u>UAGUUUUGCAGGUUUGCAUCC</u> <u>AGCUGUGUGAU</u> <u>AUUCUGCUGUGCAA</u> <u>AUCCAUGCAA</u> <u>AACUGACUGUGGUAGUG</u>	42
miR-19b-2	<u>ACAUUGCUACU</u> <u>UACAAUUA</u> <u>GUUUUGCAGGUUUGCA</u> <u>UUUCAGCGUAU</u> <u>AUAUGUAUAUGUGGCUGUGCAAAU</u> <u>CCAUGCAAAACUGA</u> <u>UUGUGAUAAUGU</u>	43
miR-19b-13	<u>UUCUAUGGU</u> <u>UAGUUUUGCAGGUUUGCAUCCAGCUG</u> <u>UGUGAU</u> <u>AUUCUGCUGUGCAA</u> <u>AUCCAUGCAAAACUG</u> <u>ACUGUGGUAG</u>	44
miR-19b-X	<u>UUACAAU</u> <u>UAGUUUUGCAGGUUUGCAUUCAGCGUA</u> <u>UAUAUGUAUAUG</u> <u>UGGCUGUGCAA</u> <u>AUCCAUGCAAAA</u> <u>CUGAUUGUGAU</u>	45
miR-20 (miR-20a)	<u>GUAGCACU</u> <u>AAAGUGCUU</u> <u>AUAGUGCAGGUAGUGUUU</u> <u>AGUUAUCUACUGCAU</u> <u>UAUGAGCACU</u> <u>AAAAGUACUG</u> <u>C</u>	46
miR-21	<u>UGUCGGG</u> <u>UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGACUGUUG</u> <u>AAUCUCAUGGCAACACCAGUCGAUGGGCUGUCUGA</u> <u>CA</u>	47
miR-21-17	<u>ACCUUGUCGGG</u> <u>UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGACU</u> <u>GUUGAAUCUCAUGGCAACACCAGUCGAUGGGCUGU</u> <u>CUGACAUUUUG</u>	48
miR-22	<u>GGCUGAGCCGCAGU</u> <u>AGUUCUUCAGUGGCAAGCUUU</u> <u>AUGUCCUGACCCAGCU</u> <u>AAAGCUGCCAGUUGAAGAA</u> <u>CUGUUGCCUCUGCC</u>	49
miR-23a	<u>GGCCGGCUGGG</u> <u>UUCUGGGGAUGGGAUUUUGCUUC</u> <u>CUGUCACAA</u> <u>UACAUUGCCAGGGAUUUCCAACCG</u> <u>ACC</u>	50

miR-23b	CUCAGGUGCUCUGGCUGCUUGGGUCCUGGCAUGC UGAUUUGUGACUUAAGAUAUAAA <u>UACAUUGCCAG</u> <u>GGAUUACCACGCAACCACGACCUUGGC</u>	51
miR-23-19	CCACGGCCGGCUGGGGUUCCUGGGGAUGGGAUUUG CUUCCUGUCACAA <u>UACAUUGCCAGGGAUUUCCA</u> ACCGACCCUGA	52
miR-24-1	CUCCGGUGCCUACUGAGCUGAUUACAGUUCUCAUU UUACACACUGGCUCAGUUCAGCAGGAACAGGAG	53
miR-24-2	CUCUGCCUCCCGUGCCUACUGAGCUGAAACACAGUU GGUUUGUGUACACUGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG GG	54
miR-24-19	CCUGGGGUCUGCCUCCCGUGCCUACUGAGCUGAAA CACAGUUGGUUUGUGUACACUGGCUCAGUUCAGCA GGAACAGGGG	55
miR-24-9	CCUCCGGUGCCUACUGAGCUGAUUACAGUUCUCAU UUUACACACUGGCUCAGUUCAGCAGGAACAGCAUC	56
miR-25	GGCCAGUGUUGAGAGGCGGAGACUUGGGCAAUUGC UGGACGCUGCCUUGGGCAUUGCACUUGUCUCGGUC UGACAGUGCCGGCC	57
miR-26a	AGGCCGUGGCUUCGUUCAAGUAAUCCAGGAUAGGC UGUGCAGGUCCCAAUGGCCUAUCUUGGUUACUUGC ACGGGGACGCGGGCCU	58
miR-26a-1	GUGGCCUCGUUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCUGUGC AGGUCCCAAUGGGCCUAUUCUUGGUUACUUGCACG GGGACGC	59
miR-26a-2	GGCUGUGGCUGGAUUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU GUUCCAUCUGUGAGGCCUAUUCUUGAUUACUUGU UUCUGGAGGCAGCU	60
miR-26b	CCGGGACCCAGUUCAAGUAAUCCAGGAUAGGUUGU GUGCUGUCCAGCCUGUUCUCCAUAUACUUGGCUCGG GGACCGG	61
miR-27a	CUGAGGAGCAGGGCUUAGCUGCUUGUGAGCAGGGU CCACACCAAGUCGUGU <u>UACACAGUGGCUAAGUCCGC</u> CCCCCAG	62
miR-27b-1	AGGUGCAGAGCUUAGCUGAUUGGUGAACAGUGAUU GGUUUCCGCUUUGU <u>UACACAGUGGCUAAGUUCUGCA</u> CCU	63
miR-27b-2	ACCUCUCUAACAAGGUGCAGAGCUUAGCUGAUUUGG UGAACAGUGAUUUGGUUCCGCUUUGU <u>UACACAGUGG</u> CUAAGUUCUGCACCUGAAGAGAAGGUG	64
miR-27-19	CCUGAGGAGCAGGGCUUAGCUGCUUGUGAGCAGGG UCCACACCAAGUCGUGU <u>UACACAGUGGCUAAGUUC</u> GCCCCCAGG	65
miR-28	GGUCCUUGCCCUCAGGAGCUCACAGUCUAUUGAG UUACCUUUCUGACU <u>UCCACUAGA</u> UUGUGAGCUC CUGGAGGGCAGGCACU	66
miR-29a-2	CCUUCUGUGACCCCUUAGAGGAUGACUGAUUUUCU UUGGUUGUUCAGAGUCAAUAAUAAUUU <u>UAGCACCA</u> <u>UCUGAAAUCGGUUAUAAUGAUUGGGGAAGAGCACC</u> AUG	67

miR-29a	AUGACUGAUUUUCUUUUGGUGUUCAGAGUCAAUUA AUUUUCUAGCACCAUCUGAAAUCGGUUAU	68
miR-29b-1	CUUCAGGAAGCUGGUUUCAU AUGGUGGUUUAGA UAAAUAGUGAUUGUCUAGCACCAUUUGAAAUCAGU GUUCUUGGGGG	69
miR-29b-2	CUUCUGGAAGCUGGUUUCACAUGGUGGCUUAGA UUUCCAUCUUUGUAUCUAGCACCAUUUGAAAUCAG UGUUUUAGGAG	70
miR-29c	ACCACUGGCCCAUCUCUACACAGGCUGACCGAUUU CUCCUGGUGUUCAGAGUCUGUUUUUGUCUAGCAC AUUUUGAAAUCGGUUAUGAUGUAGGGGGAAAAGCAG CAGC	71
miR-30a	GCGACUGUAAAACAUCUCCUGACUGGAAGCUGUGAAG CCACAGAUGGGCUUUCAGUCGGAUGUUUGCAGCUG C	72
miR-30b-1	AUGUAAAACAUCUACACUCAGCUGUAAUACAUGGA UUGGCUGGGAGGUGGAUGUUUACGU	73
miR-30b-2	ACCAAGUUUCAGUUC AUGUAAAACAUCUACACUCA GCUGUAAUACAUGGAUUGGCUGGGAGGUGGAUGUU UACUUCAGCUGACUUGGA	74
miR-30c	AGAUACUGUAAAACAUCUACACUCUCAGCUGUGGA AAGUAAAGAAAGCUGGGAGAAAGGCUGUUUACUCUU CU	75
miR-30d	GUUGUUGUAAAACAUCUCCGACUGGAAGCUGUAAGA CACAGCUAAGCUUUCAGUCAGAUGUUUGCUGCUAC	76
miR-30e	CUUUAACAUCUUCUGACUGGAAGCUGUAAGGUGUU CAGAGGAGCUUUCAGUCGGAUGUUUACAG	77
miR-31	GGAGAGGAGGCAAGAUGCUGGCAUAGCUGUUGAAC UGGGAACCUGCUAUGCCAACAUAUUGCCAUUCUUUC C	78
miR-32	GGAGAUUUUGCACAUAUAAGUUGCAUGUUGUCA CGGCCUCAUUGCAAUUUAGUGUGUGUGAUUUUUC	79
miR-33b	GGGGGCCGAGAGAGGCGGGCGGGCCCCGCGGUGCAU UGCUGUUGCAUUGCAGUGUGUGAGGCGGGUGCAG UGCCUCGGCAGUGCAGCCCCGAGCCGCCCCUGGCA CCAC	80
miR-33b-2	ACCAAGUUUCAGUUC AUGUAAAACAUCUACACUCA GCUGUAAUACAUGGAUUGGCUGGGAGGUGGAUGUU UACUUCAGCUGACUUGGA	81
miR-33	CUUGUGUGCAUUGUAGUUGCAUUGCAUGUUCUGGU GGUACCCAUGCAAUGUUUCCACAGUGCAUCACAG	82
miR-34-a	GGCCAGCUGUGAGUGUUUCUUUGGCAGUGUCUUAG CUGGUUGUUGUGAGCAAUAGUAAGGAAGCAAUCAG CAAGUAUACUGCCCUAGAAGUGCUGCACGUUGUGG GGCCC	83

<i>miR-34-b</i>	<u>GUGCUCGGUUUGUAGGCAGUGUCAUUAGCUGAUUG</u> <u>UACUGUGGUGGUUACAAUCACUAAACUCCACUGCCA</u> <u>UCAAACAAGGCAC</u>	84
<i>miR-34-c</i>	<u>AGUCUAGUUACUAGGCAGUGUAGUUAGCUGAUUGC</u> <u>UAAUAGUACCAAUCACUAACCACACGGCCAGGUAA</u> <u>AAAGAUU</u>	85
<i>miR-91-13</i>	<u>UCAGAAUAAUGUCAAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG</u> <u>UGAUUAGUGCAUCUACUGCAGUGAAGGCACUUGUA</u> <u>GCAUUAUGGUGA</u>	86
<i>miR-92-1</i>	<u>CUUUCUACACAGGUUGGGAUCCGGUUGCAAUGCUGU</u> <u>GUUUCUGUAUGGUUAUUGCACUUGUCCCGGCCUGUU</u> <u>GAGUUUGG</u>	87
<i>miR-92-2</i>	<u>UCAUCCCUGGGUGGGGAUUUGDUUGCAUUAACUUGUG</u> <u>UUCUAUAUAAAGUAUUGCACUUGUCCCGGCCUGUG</u> <u>GAAGA</u>	88
<i>miR-93-1 (miR-93-2)</i>	<u>CUGGGGGGCUCCAAGUGCUGUUCGUGCAGGUAGUG</u> <u>UGAUUACCCAACCUACUGCUGAGCUAGCACUUCCCG</u> <u>AGCCCCCGG</u>	89
<i>miR-95-4</i>	<u>AACACAGUGGGCACUCAUAAAUGUCUGUUGAAUU</u> <u>GAAAUGCGUUAUUAUUAACGGGUUUUAUUGAGCA</u> <u>CCCACUCUGUG</u>	90
<i>miR-96-7</i>	<u>UGGCCGAUUUUGGCACUAGCACAUUUUUGCUUGUG</u> <u>UCUCUCCGCUCUGAGCAAUCAUGUGCAGUGCCAAU</u> <u>AUUGGGA AA</u>	91
<i>miR-97-6 (miR-30*)</i>	<u>GUGAGCGACUGUAAACAUCCUCGACUGGAAGCUGU</u> <u>GAAGCCACAGAUUGGGCUUUCAGUCGGAUGUUUGCA</u> <u>GCUGCCUACU</u>	92
<i>miR-98</i>	<u>GUGAGGUAGUAAGUUGUAUUGUUUGUGGGGUAGGGA</u> <u>UAUUAGGCCCCAAUUAAGAAGAUAAACUAUACAACUU</u> <u>ACUACUUUCC</u>	93
<i>miR-99b</i>	<u>GGCACCCACCCGUAGAACCGACCUUGCGGGGCCUUC</u> <u>GCCGCACACAAGCUCGUGUCUGUGGGUCCGUGUC</u>	94
<i>miR-99a</i>	<u>CCCAUUGGCAUAAACCCGUAGAUCCGAUUCUUGUGG</u> <u>UGAAGUGGACCGCACAAAGCUCGCUCUAUUGGGUCU</u> <u>GUGUCAGUGUG</u>	95
<i>miR-100-112</i>	<u>AAGAGAGAAGAUUUUGAGGCCUGUUGCCACAAACC</u> <u>CGUAGAUCCGAACUUGUGGUUUUAGUCCGCACAAG</u> <u>CUUGUAUCUAUAGGUUUGUGUCUGUUAGGCAAUCU</u> <u>CAC</u>	96
<i>miR-100-11</i>	<u>CCUGUUGCCACAAACCCGUAGAUCUGAACUUGUGUG</u> <u>UAUUAGUCCGCACAAGCUUGUAUCUAUAGGUUUGU</u> <u>GUCUGUUAGG</u>	97
<i>miR-101-1/2</i>	<u>AGGCUGCCCUGGCUCAGUUAUCACAGUGCUGAUGC</u> <u>UGUCUAUUCUAAAGGUACAGUACUGUGAUAAACUGA</u> <u>AGGAUGGCAGCCAUCUUAACCUCCAUCAGAGGAGC</u> <u>CUCAC</u>	98
<i>miR-.101</i>	<u>UCAGUUAUCACAGUGCUGAUGCUGUCCAUUCUAAA</u> <u>GGUACAGUACUUGUUAUAACTUGA</u>	99

miR-101-1	UGCCCUUGGCUCAGUUAUCACAGUGGCUGAUGCUUGUC UAUUCUAAAGGU <u>ACAGUACUGUGAUAAACUGAAGGA</u> UGGCA	100
miR-101-2	ACUGUCCUUUUUCGGUUAUCAUGGUACCGAUGCUUG UAUAUCUGAAAGGU <u>ACAGUACUGUGAUAAACUGAAG</u> AAUGGUGGU	101
miR-101-9	UGUCCUUUUUCGGUUAUCAUGGUACCGAUGCUUGUA UAUCUGAAAGGU <u>ACAGUACUGUGAUAAACUGAAGAA</u> UGGUG	102
miR-102-1	CUUCUGGAAGCUGGCUUUCACAUUGGUGGCUUAGAUAU UUUCCAUCUUUGUAUCU <u>AGCACCAUUUGAAAUCAG</u> UGUUUUAGGAG	103
miR-102-7.1 (miR-102-7.2)	CUUCAGGAAGCUGGCUUUCACAUUGGUGGCUUAGAUAU UAAAUAGUGAUUGUCU <u>AGCACCAUUUGAAAUCAGU</u> GUUCUUGGGGG	104
miR-103-2	UUGUGCUUUCAGCUUCUUUACAGUGCUGCCUUGUA GCAUUCAGGUCAAG <u>CAACAUUGUACAGGGGCUAUGA</u> AAGAACCA	105
miR-103-1	UACUGCCCUCGGCUUCUUUACAGUGCUGCCUUGUU GCAUAUGGAUCAAG <u>CAGCAUUGUACAGGGGCUAUGA</u> AGGCAUUG	106
miR-104-17	AAAUUGUCAGACAGCCCAUCGACUGGUGUUGCCAUG AGAUUCAACAGU <u>CAACAUCAGUCUGAUAAAGCUACC</u> CGACAAGG	107
miR-105-1	UGUGCAUCGUGGUCAA <u>AAUGCUCAGACUCCUGUGGU</u> GGCUGCUCAUGCACCACGGAUGUUUGAGCAUGUGC UACGGUGUCUA	108
miR-105-2	UGUGCAUCGUGGUCAA <u>AAUGCUCAGACUCCUGUGGU</u> GGCUGCUUAUGCACCACGGAUGUUUGAGCAUGUGC UAUGGUGUCUA	109
miR-106-a	CCUUGGCCAUGUAA <u>AAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG</u> CUUUUUGAGAUCUACUGCAAUGUAAGCACUUCUUA CAUUAACCAUGG	110
miR-106-b	CCUGCCGGGGCUAAAGUGCUGACAGUGCAGAUAGU GGUCCUCUCCGUGCUA <u>ACCGCACUGUGGGUACUUGCU</u> GCUCCAGCAGG	111
miR-107	CUCUCUGCUUUCAGCUUCUUUACAGUGUUGCCUUG UGGCAUGGAGUUAAGC <u>AGCAUUGUACAGGGCUAU</u> CAAAGCACAGA	112
MIR-108-1-PEQUEÑO	ACACUGCAAGAACAUAAGGAUUUUUAGGGGGCAUU AUGACUGAGUCAGAAAAACAGCUGCCCCUGAAAG UCCCUCAUUUUUCUUGCUGU	113
MIR-108-2-PEQUEÑO	ACUGCAAGAGCAAUAAGGAUUUUUAGGGGGCAUUAU GAUAGUGGAAUGGAAACACAUCUGCCCCCAAAGU CCCUCAUUUU	114
miR-122a-1	CCUAGCAGAGCUGUGGAGUGUGACAAUGGUGUUU <u>GUGUCUAAACUAUCAAACGCCAUUAUCACACUAAA</u> UAGCUACUGCUAGGC	115

miR-122a-2	<u>AGCUGUGGAGUGUGACAAUGGUGUUUGUGUCCAAA</u> <u>CUAUCAAACGCCAUUAUCACACUAAAUAGCU</u>	116
miR-123	<u>ACAUAUAUACUUUUGGUACGUGUGUGACACUUCA</u> <u>AACUCGUACCGUGAGUAAUAAUGCGC</u>	117
miR-124a-1	<u>AGGCCUCUCUCUCCGUGUUCACAGCGGACCUUGAUU</u> <u>UAAAUGUCCAUACAAUUAAGGCACGCGGUGAAUGC</u> <u>CAAGAAUGGGGUCG</u>	118
miR-124a-2	<u>AUCAAGAUAAGAGGCUUCUGUCUCCGUGUUCACAG</u> <u>CGGACCUUGAUUUAAUGUCAUACAAUUAAGGCACG</u> <u>CGGUGAAUGCCAAGAGCGGAGCCUACGGCUGCACU</u> <u>UGAAG</u>	119
miR-124a-3	<u>UGAGGGCCCCUCUGCGUGUUCACAGCGGACCUUGA</u> <u>UUUAAUGUCUAUACAAUUAAGGCACGCGGUGAAUG</u> <u>CCAAGAGAGGCGCCUCC</u>	120
miR-124a	<u>CUCUGCGUGUUCACAGCGGACCUUGAUUUAAUGUC</u> <u>UAUACAAUUAAGGCACGCGGUGAAUGCCAAGAG</u>	121
miR-124b	<u>CUCUCCGUGUUCACAGCGGACCUUGAUUUAAUGUC</u> <u>AUACAAUUAAGGCACGCGGUGAAUGCCAAGAG</u>	122
miR-125a-1	<u>UGCCAGUCUCUAGGUGCCUGAGACCCUUUAACCUGU</u> <u>GAGGACAUCCAGGGUCACAGGUGAGGUUCUUGGA</u> <u>GCCUGGCGUCUGGCC</u>	123
miR-125a-2	<u>GGUCCUGAGACCCUUUAACCUGUGAGGACAUCCA</u> <u>GGGUCACAGGUGAGGUUCUUGGGAGCCUGG</u>	124
miR-125b-1	<u>UGCGCUCCUCUCAGUCCUGAGACCCUAACUUGUGA</u> <u>UGUUUACCGUUUAAAUCCACGGGUUAGGCUCUUGG</u> <u>GAGCUGCCAGUUCGUGCU</u>	125
miR-125b-2	<u>ACCAGACUUUCCUAGUCCUGAGACCCUAACUUGU</u> <u>GAGGUUUUUAGUAACAUCACAAGUCAGCCUCUUG</u> <u>GGACCUAGGCGGAGGGGA</u>	126
miR-126-1	<u>CGCUGGCGACGGGACAUUAUAUACUUUUGGUACGCG</u> <u>CUGUGACACUUCAAACUCGUACCGUGAGUAAUAAU</u> <u>GCGCCGUCCACGGCA</u>	127
miR-126-2	<u>ACAUAUAUACUUUUGGUACGCGCUGUGACACUUCA</u> <u>AACUCGUACCGUGAGUAAUAAUGCGC</u>	128
miR-127-1	<u>UGUGAUCACUGUCUCCAGCCUGGCGGAAGCUUCAGAG</u> <u>GGCUCUGAUUCAGAAAGAUCAUCGGAUCCGUCUGA</u> <u>GCUUGGCUGGUCGGAAGUCUCAUCAUC</u>	129
miR-127-2	<u>CCAGCCUGCUGAAGCUCAGAGGGCUCUGAUUCAGA</u> <u>AAGAUCAUCGGAUCCGUCUGAGCUUGGCUGGUCGG</u>	130
miR-128a	<u>UGAGCUGUUGGAAUCCGGGCGGAGCACUGUCUGA</u> <u>GAGGUUUACAUUUCUCACAGUGAACC GGUCUCUUU</u> <u>UUCAGCUGCUUC</u>	131

miR-128b	GCCCCGGCAGCCACUGUGCAGUGGGGAAGGGGGGCGG AUACACUGUACGAGAGUGAGUAGCAGGUCUCACAG <u>UGAACCGGUCUCUUUCCCUACUGUGUCACACUCCUA</u> AUGG	132
miR-128	GUUGGADUUCGGGGLCGUAGCACUGUCUGAGAGGUU UACAUUUCUCACAGUGAACCGGUCUCUUUUUCAGC	133
miR-129-1	UGGAUCUUUUUGCGGUCUGGGCUUGCUGUCCUCU CAACAGUAGUCAGGAAGCCCUUACCCCAAAAAGUA UCUA	134
MIR-129-2	UGCCCUUCGCGAAUCUUUUUGCGGUCUGGGCUUGC UGUACAUAACUCAAUAGCCGGAAGCCCUUACCCCAA AAAGCAUUUGCGGAGGGCG	135
miR-130a	UGCUGCUGGCCAGAGCUCUUUUCACAUUGUGCUAC UGUCUGCACCUGUCACUAGCAGUGCAAUGUUAAAA GGGCAUUGGCCGUGUAGUG	136
miR-131-1	GCCAGGAGGCGGGGUUGGUUUGUUAUCUUUGGUUAU CUAGCUGUAUGAGUGGUGUGGAGUCUUCAUAAAGC <u>UAGAUAACCGAAAGUAAAAUAACCCCAUACACUG</u> CGCAG	137
miR-131-3	CACGGCGCGGCAGCGGCACUGGCUAAGUGGAGUCCU UUUCUCUCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGAGUGCCA CAGAGCCGUCAUAAAGCUAGAUAACCGAAAGUAGA AAUG	138
miR-131	GUUGUUAUCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGAGUGUA UUGGUCUUCAUAAAGCUAGAUAACCGAAAGUAAAA AC	139
miR-132-1	CCGCCCCCGGUCUCCAGGGCAACCGUGGCUUUCGA UUGUUAUCUGUGGGAACUGGAGGUAAACAGUCUACAG <u>CCAUGGUCGCCCCGCGAGCACGCCCCACGCGC</u>	140
miR-132-2	GGGCAACCGUGGCUUUCGAUUGUUAUCUGUUGGAAC UGGAGGUAAACAGUCUACAGCCAUGGUCGCCC	141
miR-133a-1	ACAAUGCUUUUGCUAGAGCUGGUAAAAUGGAACCAA AUCGCCUCUUCAAUGGAUUUGGUCCCCUUCACCAG CUGUAGCUAUGCAUUGA	142
miR-133a-2	GGGAGCCAAAUGCUUUGCUAGAGCUGGUAAAAUGG AACCAAAUCGACUGUCCAAUGGAUUUGGUCCCCU <u>CAACCAGCUGUAGCUGUGCAUUGAUGGCGCCG</u>	143
miR-133	GCUAGAGCUGGUAAAAUGGAACCAAAUCGCCUCUU CAAUGGAUUUGGUCCCCUUCACCAGCUGUAGC	144
miR-133b	CCUCAGAAGAAAGAUGCCCCCUGCUCUGGCUUGGUA AACGGAACCAAGUCCGUCUCCUGAGAGGUUUUGGU <u>CCCCUUCACCAGCUACAGCAGGGCUGGCAAUGCCC</u> AGUCCUUUGGAGA	145
MIR-133B-PEQUEÑO	GCCCCUGCUCUGGCUUGGUCAAACGGAACCAAGUCC GUCUCCUGAGAGGUUUUGGUCCCCUUCACCAGCU ACAGCAGGG	146
miR-134-1	CAGGGUGUGUGACUGGUUGACCAGAGGGGCAUGCA CUGUGUUCACCCUGUGGGCCACCUAGUCACCAACCC UIC	147

miR-134-2	<u>AGGGUGUGUGACUGGUUGACCAGAGGGGCAUGCAC</u> <u>UGUGUUCACCCUGUGGGCCACCUAGUCACCAACCCU</u>	148
miR-135a-1	<u>AGGCCCGCGUGGUCUCCUAUGGCUUUUUAUCCCUAU</u> <u>GUGAUUCUACUGCUCACUCAUAUAGGGAUUGGAGC</u> <u>CGTGGCGCACGGCGGGGACA</u>	149
miR-135a-2 (miR-135-2)	<u>AGGUAUAUCCACCCUAGUCCUUUAUGGCUUUUUAU</u> <u>UCCUAUGUGAUAGUAAUAAAAGUCUCAUGUAGGGAU</u> <u>GGAAGCCAUGAAAUACAUUGUGAAAAAUCA</u>	150
miR-135	<u>CUADGGCUUUUUAUCCCUAUGUGAUUCUACUGCUC</u> <u>ACUCAUAUAGGGAUUGGAGCCGUGG</u>	151
miR-135b	<u>CACUCUGCUGUGGCCUAUGGCCUUUUCAUCCCUAU</u> <u>UGAUUGCUGUCCCAAACUCAUGUAGGGCUAAAAGC</u> <u>CAUGGGCUACAGUGAGGGGGCGAGCUCC</u>	152
miR-136-1	<u>UGAGCCUCUCGAGGACUCCAUUUUGUUUUUGAUGAUG</u> <u>GAUUCUUAUGCUCUCCAUCAUCGUCUCAAUAGAGUCU</u> <u>UCAGAGGGUUCU</u>	153
miR-136-2	<u>GAGGACUCCAUUUUGUUUUUGAUGAUGGAUUCUUAUG</u> <u>CUCCAUCAUCGUCUCAAUAGAGUCUUC</u>	154
miR-137	<u>CUUCGGUGACGGGUAAUUCUUGGGUGGAUAAUACGG</u> <u>AUUACGUUGUUAUUGCUUAAGAAUACGCGUAGUCG</u> <u>AGG</u>	155
miR-138-1	<u>CCCUGGCAUGGUGUGGUGGGGCAGCUGGUGUUGUG</u> <u>AAUCAGGCCGUUGCCAAUCAGAGAACGGCUACUUC</u> <u>ACAACACCAGGGCCACACCACACTACAGG</u>	156
miR-138-2	<u>CGUUGCUGCAGCUGGGUGUUGUGAAUCAGGCCGACG</u> <u>AGCAGCGCAUCCUCUUAACCGGCUAUUUCACGACAC</u> <u>CAGGGUUGCAUCA</u>	157
miR-138	<u>CAGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCGACGAGCAGCGC</u> <u>AUCCUCUUAACCGGCUAUUUCACGACACCAGGGUUG</u>	158
miR-139	<u>GUGUAUUCUACAGUGCAGUGUCUCCAGUGUGGCU</u> <u>CGGAGGCUGGAGACGCGGCCCUUGUUGGAGUAAC</u>	159
miR-140	<u>UGUGUCUCUCUCUGUGUCCUGGCCAGUGGUUUUACC</u> <u>CUAUGGUAGGUUACGUCAUGCUGUUCUACCACAGG</u> <u>GUAGAACCACGGACAGGAUACCGGGGCACC</u>	160
miR-140as	<u>UCCUGCCAGUGGUUUUACCCUAUGGUAGGUUACGU</u> <u>CAUGCUGUUCUACCACAGGGUAGAACCACGGACAG</u> <u>GA</u>	161
miR-140s	<u>CCUGCCAGUGGUUUUACCCUAUGGUAGGUUACGU</u> <u>AUGCUGUUCUACCACAGGGUAGAACCACGGACAGG</u>	162
miR-141-1	<u>AGGCCGCGCCUGGGUCCAUCCUCCAGUACAGUGGU</u> <u>GAUGGUCUAAUUGUGAAGCUCCUAAACACUGUCUGG</u> <u>UAAAGAUGGCUCCCGGGUGGGUUC</u>	163
miR-141-2	<u>GGGUCCAUCUCCAGUACAGUGUUGGAUGGUCUAA</u> <u>UUGUGAAGCUCCUAAACACUGUCUGGUAAAGAUGGC</u> <u>CC</u>	164

miR-142	<u>ACCCAUAAAGUAGAAAGCACUACUAACAGCACUGG</u> <u>AGGGUGUAGUGUUCUACUUUAUGGAUG</u>	165
miR-143-1	<u>GCGCAGCGCCUGUCUCCAGCCUGAGGUGCAGUGC</u> <u>UGCAUCUCUGGUCAGUUGGGAGUCUGAGAUGAAGC</u> <u>ACUGUAGCUCAGGAAGAGAGAAGUUGUUCUGCAGC</u>	166
miR-143-2	<u>CCUGAGGUGCAGUGCUGCAUCUCUGGUCAGUUGGG</u> <u>AGTCTGAGATGAAGCAGTCTTAGCTTCAGG</u>	167
miR-144-1	<u>UGGGGCCCGUGGCGGGGAUAUCAUCAUAUACUGUAA</u> <u>GUUUGCGAUGAGACACUACAGUAUAGAUGAUGUAC</u> <u>UAGUCCGGGCACCCCC</u>	168
miR-144-2	<u>GGCUGGGGAUAUCAUCAUAUACUGUAAAGUUGCGAU</u> <u>GAGACACUACAGUAUAGAUGAUGUACUAGUC</u>	169
miR-145-1	<u>CACCUUGUCCUCACGGUCCAGUUUUCCCGAGGAUCC</u> <u>CUUAGAUGCUAAGAUGGGGAUUCUUGGAAAUACUG</u> <u>UUCUUGAGGUCUAGGUU</u>	170
miR-145-2	<u>UCCACUGUCCAGUUUUCCCGAGGAUCCCUUAGAUUG</u> <u>UAAGAUGGGGAUUCUUGGAAAUACUGUUCUUGAG</u>	171
miR-146-1	<u>CCGAUGGUGUAUCCUCAGCUUUGAGAACUGAADUCC</u> <u>AUGGGUUGUGUCAGUGUCAGACCUCUGAAAUUCAG</u> <u>UUCUUCAGCUGGGGAUAUCUCUGUCAUCGU</u>	172
miR-146-2	<u>AGCUUUGAGAACUGAAUUCUUGGGUUGUGUCAGU</u> <u>GUCAGACCUGUGAAAUUCAGUUCUUCAGCU</u>	173
miR-147	<u>AAUCUAAAGACAACAUUUCUGCACACACACCAGAC</u> <u>UAUGGAAGCCAGUGUGUGGAAAUUGCUUCUGCUAGA</u> <u>UU</u>	174
miR-148a (miR-148)	<u>GAGGCAAAGUUCUGAGACACUCCGACUCUGAGUAU</u> <u>GAUAGAAGUCAGUGCACUACAGAACUUUGUCUC</u>	175
miR-148b	<u>CAAGCACGAUUAGCAUUUGAGGUGAAGUUCUGUUA</u> <u>UACACUCAGGCUGUGGCUCUCUGAAAGUCAGUGCA</u> <u>UCACAGAACUUUGUCUCGAAAGCUUUCUA</u>	176
MR-148B-PEQUEÑO	<u>AAGCACGAUUAGCAUUUGAGGUGAAGUUCUGUUAU</u> <u>ACACUCAGGCUGUGGCUCUCUGAAAGUCAGUGCAU</u>	177
miR-149-1	<u>GCCGGCGCCCGAGCUCUGGCUCGUGUCUUCACUCC</u> <u>CGUGCUUGUCCGAGGAGGGAGGGAGGGACGGGGGC</u>	178
miR-149-2	<u>UGUGCUGGGGCAGCUGGA</u> <u>GCUCUGGCUCGUGUCUUCACUCCCGUGCUUGUCCG</u>	179
miR-150-1	<u>AGGAGGGAGGGAGGGAC</u> <u>CUCCCCAUGGCCCCUGUCUCCCAACCCUUGUACCAGU</u>	180
miR-150-2	<u>GCUGGGCUCAGACCCUGGUACAGGCCUGGGGGACA</u> <u>GGGACCUGGGGAC</u>	181

miR-151	CCCUGUCUCCCAACCCUUGUACCAGUGCUGGGCUCA GACCCUGGUACAGGCCUGGGGGACAGGG	182
MIR-151-2	UUUCCUGCCCUCGAGGAGCUCACAGUCUAGUAUGU CUCAUCCCCUACUAGACUGAAGCUCCUUGAGGACAG G	183
miR-152-1	UGUCCCCCCCCGGCCAGGUUCUGUGAUACACUCCGA CUCGGGCUCUGGAGCAGUCAGUGCAUGACAGAAACU UGGGCCCCGGAAGGACC	184
miR-152-2	GGCCAGGUUCUGUGAUACACUCCGACUCGGGCUCU GGAGCAGUCAGUGCAUGACAGAAACUUGGGCCCCGG	185
miR-153-1-1	CUCACAGCUGCCAGUGUCAUUUUUGUGAUUCUGCAG CUAGUAUUCUCACUCCAGUUGCAUAGUCACAAAAG UGAUCAUUGGCAGGUGUGGC	186
miR-153-1-2	UCUCUCUCUCUCUCACAGCUGCCAGUGUCAUUGUCA CAAAAGUGAUCAUUGGCAGGUGUGGCUGCUGCAUG	187
miR-153-2-1	AGCGGUGGCCAGUGUCAUUUUUGUGAUGUUGCAGC UAGUAAUAUGAGCCCAGUUGCAUAGUCACAAAAGU GAUCAUUGGAAACUGUG	188
miR-153-2-2	CAGUGUCAUUUUUGUGAUGUUGCAGCUAGUAAUUA GAGCCCAGUUGCAUAGUCACAAAAGUGAUCAUUG	189
miR-154-1	GUGGUACUUGAAGAUAGGUUAUCCGUGUUGCCUUC GCUUUAUUUGUGACGAAUCAUACACGGUUGACCUA UUUUUCAGUACCAA	190
miR-154-2	GAAGAUAGGUUAUCCGUGUUGCCUUCGCUUUUAUU GUGACGAAUCAUACACGGUUGACCUAUUUUU	191
miR-155	CUGUUAUUGCUAAUCCGUGAUAGGGGUUUUUUGCCUC CAACUGACUCCUACAUAUUAGCAUUAACAG	192
MIR-156 = MIR-157=SOLAPAMIENTO CON MIR-141	CCUAACACUGUCUGGUAAAAGAUGGCUCGCCGGGUGG GUUCUCUCGGCAGUAACCUUCAGGGAGCCCUGAAG ACCAUGGAGGAC	193
MIR-158-PEQUEÑO = MIR-192	GCCGAGACCGAGUGCACAGGGCUCUGACCUAUGAA UUGACAGCCAGUGCUCUCGUCUCCCCUCUGGCUGCC AAUUCCAUAGGUCACAGGUUUGUUCGCCUCAUUGC CAGC	194
MIR-159-1-PEQUEÑO	UCCCGCCCCUGUAACAGCAACUCCAUGUGGAAGUG CCCACUGGUUCCAGUGGGGCUGCUUUAUCUGGGG CGAGGGCCA	195
MIR-161-PEQUEÑO	AAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAAAAAGGAUGAGGUG ACUGGUCUGGGCUACGCUAUGCUGCGGCGCUCGGG	196
MIR-163-1B-PEQUEÑO	CAUUGGCCUCCUAAGCCAGGGAUUGUGGGUUCGAG UCCCACCCGGGGUAAAAGAAAGGCCGAAUU	197
MIR-163-3-PEQUEÑO	CCUAAGCCAGGGAUUGUGGGUUCGAGUCCACCUG GGGUAGAGGUGAAAGUCCUUUUACGGAAUUUUUU	198

miR-162	CAADGUCAGCAGUGCCU <u>UAGCAGCACGUA</u> AAAUUU GGCGUUAAGAUUCUAAAAUUAUCUCCAGUAUUAAC UGUGCUGCUGAAGUAAGGUUGACCAUACUCUACAG UUG	199
MIR-175-PEQUEÑO=MIR-224	GGGCUUUAAGUCACUAGUGGUUCCGUUUAGUAGA UGAUUGUGCAUUGUUUCAA <u>AAUGGGUGCCCUAGUGA</u> CUACAAAGCCCC	200
MIR-177-PEQUEÑO	ACGCAAGUGUCCUAAAGGUUAGCUCAGGGAGCACAG AAACCUCAGUGGAACAGAAAGGGCAAAGCUCAUU	201
MIR-180-PEQUEÑO	CAUGUGUCACUUUCAGGUGGAGUUUCAAGAGUCCC UCCUGGUUCACCGUCUCCUUUGCUCUCCACAAC	202
miR-181a	AGAAGGGCUAUCAGGCCAGCCUUCAGAGGACUCCA AGGAACA <u>UUCACGCUGUCGGUGAGUUUGGGAUUU</u> GAAAAACCACUGACCGUUGACUGUACCUUGGGGU CCUUA	203
miR-181b-1	CCUGUGCAGAGAUU <u>UUUUUUAAAAGGUCACAAUC</u> <u>AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGUUGAACUGUGUGG</u> ACAAGCUCACUGAACA <u>AAUGAAUGCAACUGUGGCC</u> CGCUU	204
miR-181b-2	CUGAUGGCUGCACUCAACA <u>UUCAUUGCUGUCGGUG</u> <u>GGUUUGAGUCUGAAUCAAACUCACUGAUCAAUGAAU</u> GCAAACUGCGGACCAACA	205
miR-181c	CGGAAAAUUUGCCAAGGGUUUGGGGGAACA <u>UUCAA</u> <u>CCUGUCGGUGAGUUUGGGCAGCUCAGGCAAACCAU</u> CGACCGUUGAGUGGACCCUGAGGCCUGGA <u>AUUGCC</u> AUCCU	206
miR-182-as	GAGCUGCUUGCCUCCCCCGUUUUUGGCA <u>UUGGUA</u> <u>GAACUCACACUGGUGAGGUAAACAGGAUCCGGUGGU</u> <u>UCUAGACUUGCCAACUAUGGGGGCGAGGACUCAGCC</u> GGCAC	207
miR-182	UUUUUGGCA <u>UUGGUAGAACUCACACUGGUGAGGUA</u> <u>ACAGGAUCCGGUGGUUCUAGACUUGCCAACUAUGG</u>	208
miR-183	CCGCAGAGUGUGACUCCUGUUUCUGUGUA <u>UUGGCACU</u> <u>GGUAGAAUUCACUGUGAACAGUCUCAGUCAGUGAA</u> UUACCGAAGGGCCAUA <u>AAACAGAGCAGAGACAGAUC</u> CACGA	209
miR-184-1	CCAGUCACGUCCCCUUAUCACUUUCCAGCCCAGCU UUGUGACUGUAAGUGU <u>UGGACGGAGAACUGAUAA</u> <u>GGUAGGUGAUUGA</u>	210
miR-184-2	CCUUAUCACUUUCCAGCCCAGCUUUGUGACUGUA AGUGUUGGACGGAGAACUGAUAAAGGGUAGG	211
miR-185-1	AGGGGGCGAGGGAUUGGAGAGAAAGGCAGU <u>UCCUG</u> AUGGUCCCCUCCCCAGGGGCUGGCUUUCCUCUGGUC CUUCCCCUCCA	212
miR-185-2	AGGGAUUGGAGAGAAAGGCAGU <u>UCCUGAUUGGUCCC</u> CUCCCCAGGGGCUGGCUUUCCUCUGGUCUU	213

miR-186-1	<u>UGCUUGUAACUUUCCAAAGAAUUCUCCUUUUUGGGC</u> <u>UUUCUGGUUUUAUUUUAAAGCCCAAAGGUGAAUUUU</u> <u>UUGGGAAGUUUGAGCU</u>	214
miR-186-2	<u>ACUUUCCAAAGAAUUCUCCUUUUUGGGCUUUUCUGGU</u> <u>UUUAUUUUAAAGCCCAAAGGUGAAUUUUUUUGGGAAG</u> <u>U</u>	215
miR-187	<u>GGUCGGGCUACCAUGACACAGUGUGAGACUCGGG</u> <u>CUACAACACAGGACCCGGGGCGCUGCUCUGACCCCU</u> <u>CGUGUCUUUGUGUUGCAGCCGGAGGGACGCAGGUCC</u> <u>GCA</u>	216
miR-188-1	<u>UGCUCUCCUCUCUCACAUCCCUUGCAUGGUGGAGGGU</u> <u>GAGCUUUCUGAAAACCCCUCCCAUCAUGCAGGGUUU</u> <u>GCAGGAUGGCGAGCC</u>	217
miR-188-2	<u>UCUCACAUCCCUUGCAUGGUGGAGGGUGAGCUUUC</u> <u>UGAAAACCCCUCCCAUCAUGCAGGGUUUGCAGGA</u>	218
miR-189-1	<u>CUGUCGADUGGACCCCGCCUCCGGUGCCUACUGAGC</u> <u>UGAUUUCAGUUCUCAUUUUACACACUGGCUCAGUU</u> <u>CAGCAGGAACAGGAGUCGAGCCCUUGAGCAA</u>	219
miR-189-2	<u>CUCCGGUGCCUACUGAGCUGAUUUCAGUUCUCAUU</u> <u>UUACACACUGGCUCAGUUCAGCAGGAACAGGAG</u>	220
miR-190-1	<u>UGCAGGCCUCUGUGUGAUUUGUUUGAUUUAUUAGG</u> <u>UUUGUUAUUUAAUCCAACUAUUAUCAAAACAUUUC</u> <u>CUACAGUIGUICUUGCC</u>	221
miR-190-2	<u>CUGUGUGAUUUGUUUGAUUUAUUAGGUUGUUUAUU</u> <u>AAUCCAACUAUUAUCAAAACAUUUCUACAG</u>	222
miR-191-1	<u>UGGCUUGGACAGCGGUCACUUGAAUCCCAAAGUACG</u> <u>CUUGUUGUCUCCAGAGCAUUCAGCUGCGCUUGGAU</u> <u>UUCGUCUCCUGCUCUCCUGCCU</u>	223
miR-191-2	<u>AGCGGGLAACUGGAUCCCAAAGUACUUGUUGUUCU</u> <u>CCAGAGCAUUCAGCUGCGCUUGGAUUUCGUCCCCU</u> <u>GCU</u>	224
miR-192-2/3	<u>CCGAGACUGAGUGCACAGGGUCUUGACCUAUGAAU</u> <u>UGACAGCCAGUGCUCUCGUCUCCCCUCUGGCUGCCA</u> <u>AUCCAUAAGGUCACAGGUAUGUUCGCCUCAAUGCC</u> <u>AG</u>	225
miR-192	<u>GCCGAGACUGAGUGCACAGGGUCUUGACCUAUGAA</u> <u>UUGACAGCCAGUGCUCUCGUCUCCCCUCUGGCUGCC</u> <u>AAUCCAUAAGGUCACAGGUAUGUUCGCCUCAAUGC</u> <u>CAGC</u>	226
miR-193-1	<u>CGAGGAUGGGAGCUGAGGGGCUUGGUCUUUGCGGGC</u> <u>GAGAUAGGGUGUCGGAUCAACUGGCCUACAAAGU</u> <u>CCCAGUUCUCGGCCCCCG</u>	227
miR-193-2	<u>GCUGGGUCCUUUGCGGGCGAGAUGAGGGUGUCGGAU</u> <u>CAACUGGCCUACAAAGUCCAGU</u>	228
miR-194-1	<u>AUGGUGUUAUCAAGUGUAACAGCAACUCCAUGUGG</u> <u>ACUGUGUACCAAUUUCAGUGGAGAUGCUGUUACU</u> <u>UUUGAUGGUUACCAA</u>	229

miR-194-2	<u>GUGUAACAGCAACUCCAUGUGGACUGUGUACCAAU</u> <u>UCCAGUGGAGAUGCUGUACUUUUGAU</u>	230
miR-195-1	<u>AGCUUCCCCUGGCUCUAGCAGCACAGAAAUAUUGGC</u> <u>ACAGGGAAGCGAGUCUGCCAAUAUUGGCUGUGCUG</u> <u>CUCCAGGCAGGGUGGUG</u>	231
miR-195-2	<u>UAGCAGCACAGAAAUAUUGGCACAGGUAAGCGAGU</u> <u>CUGCCAAUAUUGGCUGUGCUGCU</u>	232
miR-196-1	<u>CUAGAGCUUGAAUUGGAACUGCUGAGUGAAU</u> <u>UAGG</u> <u>UAGUUUCAUGUUGUUGGGCCUGGGUUCUGAACAC</u> <u>AACAACAUAUAACCACCCGAUUCACGGCAGUUACU</u> <u>GCUC</u>	233
miR-196a-1	<u>GUGAAU</u> <u>UAGGUAGUUU</u> <u>CAUGUUGUUGGGCCUGGGU</u> <u>UUCUGAACACAACAACAUAUAACCACCCGAUUCAC</u>	234
miR-196a-2 miR-196-2)	<u>UGCUCGCUCAGCUGAUUCUGUGGC</u> <u>U</u> <u>UAGGUAGUUU</u> <u>AUGUUGUUGGGAUUGAGUUUUGAACUCGGCAACAA</u> <u>GAAACUGCCUGAGUUACAUCAGUCGUUUUCGUCG</u> <u>AGGGC</u>	235
miR-196	<u>GUGAAU</u> <u>UAGGUAGUUU</u> <u>CAUGUUGUUGGGCCUGGGU</u> <u>UUCUGAACACAACAACAUAUAACCACCCGAUUCAC</u>	236
miR-196b	<u>ACUGGUCGGUGAUUUAGGUAGUUU</u> <u>CCUGUUGUUGG</u> <u>GAUCCACCUUCUCUCGACAGCACGACACUGCCUUC</u> <u>AUUACUUCAGUUG</u>	237
miR-197	<u>GGCUGUGCCUGGUAGAGAGUGGCAGUGGGAGGUAA</u> <u>AGCUCUUCACCCUUCACCACCUUCUCCACCCAGCAU</u> <u>GGCC</u>	238
MIR-197-2	<u>GUUCAUGUGUAUGUAUGUGUGCAUGUGCAUGUGUA</u> <u>UGUGUAUGAGUGCAUGCGUGUGUGC</u>	239
miR-198	<u>UCAUUGGULLCAGAGGGGAGAUAGGUUCCUGUGAUU</u> <u>UUUCCUUCUUCUCUAUAGAAUAAAUGA</u>	240
miR-199a-1	<u>GCCAACCCAGUGUUCAGACUACCUGUUCAGGAGGC</u> <u>UCUCAAUUGUGUACAGUAGUCUGCACAUUGGUUAGG</u> <u>C</u>	241
miR-199a-2	<u>AGGAAGCUUCUGGAGAUCCUGCUCGCCCCAGU</u> <u>GUUCAGACUACCUGUUCAGGACAAUGCCGUUGUAC</u> <u>AGUAGUCUGCACAUUGGUUAGACUGGGCAAGGGAG</u> <u>AGCA</u>	242
miR-199b	<u>CCAGAGGACACCUCACUCCGUCUACCCAGUGUUUA</u> <u>GACUAUCUGUUCAGGACUCCCAAUUGUACAGUAG</u> <u>UCUGCACAUUGGUUAGGCUGGGCUGGGUAGACCC</u> <u>UCCG</u>	243
miR-199s	<u>GCCAACCCAGUGUUCAGACUACCUGUUCAGGAGGC</u> <u>UCUCAAUUGUGUACAGUAGUCUGCACAUUGGUUAGG</u> <u>C</u>	244
miR-200a	<u>GCCGUGGCCAUUUACUGGGCAGCAUUGGAUGGAG</u> <u>UCAGGUCUCUAAUACUGCCUGGUAAUGAUGACGGC</u>	245

miR-200b	CCAGCUCGGGCAGCCGUGGCCAUUCUACUGGGCAGC AUUGGAUGGAGUCAGGUCUCUAAUACUGCCUGGUA <u>AUGAUGACGGCGGAGCCCUGCACG</u>	246
miR-200c	UCCUCGUCUACCCAGCAGUGUUUGGGUGCGGUUG GGAGUCUCUAAUACUGCCGGGUAAUGAUGGAGG	247
miR-202	GUUCCUDDUCCUAUGCAUAAACUUCUUGAGGAU CUGGCCUAAAGAGGUAUAGGGCAUGGGAAGAUGGA GC	248
miR-203	GUGUUGGGGACUCGCGCGUGGGUCCAGUUGUUUCU UACAGUUCACAGUUCUGUAGCGCAAUUGUGAAA <u>UGUUUAGGACCACUAGACCCGGCGGGCGCGCGAC</u> <u>AGCGA</u>	249
miR-204	GGCUACAGUCUUUCUUCUUGUGACUCGUGGACUUC <u>CCUUUGUCAUCCUAUGCCUGAGAAUAUAUGAAGGA</u> GGCUGGGAAGGCAAAGGGACGUUCAAUUGUCAUCA CUGGC	250
miR-205	AAAGAUCUCAGACAAUCCAUGUGUCUUCUCUUGUC <u>CUUCAUUCACCCGAGUCUGUCUCAUACCCAACCAG</u> AUUUCAGUGGAGUGAAGUUCAGGAGGCAUGGAGCU GACA	251
miR-206-1	UGCUCCCGAGGCCACAUGCUUCUUUAUAUCCCCAU AUGGAUUAUUUGCUAUGGAAUGUAAGGAAGUGUG UGGUUUCGCAAGUG	252
miR-206-2	AGGCCACAUGCUUCUUUAUAUCCCCAUUUGGAUUA CUUUGCUAUGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGGUUUU	253
miR-208	UGACGGGCGAGCUUUUGGCCCGGGUUAUACCUGAU GCUCACGUAUAAGACGAGCAAAAAGCUUGUUGGUC A	254
miR-210	ACCCGGCAGUGCCUCCAGGCGCAGGGCAGCCUUCG CCACCGCACACUGCGCUGCCCCAGACCCACUGUGCG <u>UGUGACAGCGGCUGAUUCUGUGCCUGGGCAGCGCGA</u> CCC	255
miR-211	UCACCUGGCCAUUGUGACUUGUGGGCUUCCCUUUGU <u>CAUCCUUCGCCUAGGGCUCUGAGCAGGGCAGGGAC</u> AGCAAAGGGGUGCUCAGUUGUCACUUCACACAGCA CCGAG	256
miR-212	CGGGGCACCCCGCCCGGACAGCGCGCCGGCACCUUG GCUCUAGACUGCUUACUGCCCGGGCCGCCUCAAUA <u>ACAGUCUCCAGUCACGGCCACCGACGCCUGGCCCCG</u> CC	257
miR-213-2	CCUGUGCAGAGAUUAUUUUUUA AAAAGGUCACAAUC <u>AACAUUCAUUGCUGUCGGUGGGUUGAACUGUGUGG</u> ACAAGCUCACUGAACA AUGAAUGCAACUGUGGCC CGCUU	258
miR-213	GAGUUUUGAGGUUGCUUCAGUGAACAUAUCAAACGU GUCGGUGAGUUUGGAAUUA AAAAUCAAAACCAUCGA <u>CCGUUGAUUGUACCCUAUGGCUAACCAUCAUCUAC</u> UCC	259
miR-214	GGCCUGGCUGGACAGAGUUGUCAUGUGUCUGCCUG UCUACACUUGCUGUGCAGAACAUCCGCUCACCUGUA <u>CAGCAGGCACAGACAGGCAGUCACAUGACAACCCAG</u> CCU	260

miR-215	<u>AUCAUUCAGAAAUGGUAUACAGGAAAAUGACCUAU</u> <u>GAAUUGACAGACAUAUAGCUGAGUUUGUCUGUCA</u> <u>UUUCUUUAGGCCAAUAUUCUGUAUGACUGUGCUAC</u> <u>UUCAA</u>	261
miR-216	<u>GAUGGCUGUGAGUUUGGCUJAAUCUCAGCUGGCAAC</u> <u>UGUGAGAUGUUCAUACAATCCUCACAGUGGUCUC</u> <u>UGGGAUUAUGCUAAACAGAGCAAUUUCCUAGCCCU</u> <u>CACGA</u>	262
miR-217	<u>AGUAUAAUUUAUACAUAAGUUUUUGAUGUCGCAGAU</u> <u>ACUGCAUCAGGAACUGAUUGGAUAAGAAUCAGUCA</u> <u>CCAUCAGUUCUAAUGCAUUGCCUUCAGCAUCUAA</u> <u>ACAAAC</u>	263
miR-218-1	<u>GUGAUAAUGUAGCGAGAUUUUCUGUUGUGCUUGAU</u> <u>CUAACCAUGUGGUUGCGAGGUATUGAGUAAAACAUG</u> <u>GUUCCGUCAAGCACCAUGGAACGUCACGCAGCUUUC</u> <u>UACA</u>	264
miR-218-2	<u>GACCAGUCGCUGCGGGGCUUUCUUGUGCUUGAU</u> <u>CUAACCAUGUGGUUGGAACGAUGGAAACGGAACAUG</u> <u>GUUCUGUCAAGCACCGCGGAAAGCACCGUGCUCUCC</u> <u>TIGCA</u>	265
miR-219	<u>CCGCCCCGGGCCGCGGCUCUUGAUUGUCCAAACGCA</u> <u>AUUCUCGAGUCUAUUGGCUCGCGCCGAGAGUUGAGU</u> <u>CUGGACGUCCCGAGCCGCGCCCCCAAACCUCGAGC</u> <u>GGG</u>	266
miR-219-1	<u>CCGCCCCGGGCCGCGGCUCUUGAUUGUCCAAACGCA</u> <u>AUUCUCGAGUCUAUUGGCUCGCGCCGAGAGUUGAGU</u> <u>CUGGACGUCCCGAGCCGCGCCCCCAAACCUCGAGC</u> <u>GGG</u>	267
miR-219-2	<u>ACUCAGGGUCUUCGCCACUGAUUGUCCAAACGCAA</u> <u>UUCUUGUACGAGUCUGCGGCCAACCGAGAAUUGUG</u> <u>GCUGGACAUCUGUGGCUGAGCUCGCGG</u>	268
miR-220	<u>GACAGUGUGGCAUUGUAGGGCUCCACACCGUAUCU</u> <u>GACACUUUGGGCGAGGGCACCAUGCUGAAGGUGUU</u> <u>CAUGAUGCGGUCUGGGAAACUCCUCACGGAUCUUA</u> <u>UGAUG</u>	269
miR-221	<u>UGAACAUCCAGGUCUGGGGCAUGAACCUGGCAUAC</u> <u>AAUGUAGAUUUCUGUGUUCGUUAGGCAACAGCUAC</u> <u>AUUGUCUGCUGGGUUCAGGGCUACCUGGAAACAUG</u> <u>UUCUC</u>	270
miR-222	<u>GCUGCUGGAAGGUGUAGGUACCCUCAUUGGUCUAG</u> <u>UAGCCAGUGUAGAUCUGUCUUUCGUAAUCAGCAG</u> <u>CUACAUCUGGCUACUGGGUCUCUGAUGGCAUCUUC</u> <u>UAGCU</u>	271
miR-223	<u>CCUGGCCUCCUGCAGUGCCACGCUCUGUGUAUUUGA</u> <u>CAAGCUGAGUUGGACACUCCAUGUGGUAGAGUGUC</u> <u>AGUUUGUCAAAUACCCCAAGUGCGGCACAUGCUIA</u> <u>CCAG</u>	272
miR-224	<u>GGGCUUUCAGUCACUAGUGGUUCCGUUUAGUAGA</u> <u>UGAUUGUGCAUUGUUCAAAAUGGUGCCCUAGUGA</u> <u>CUACAAAGCCC</u>	273
MIR-294-1 (CHR16)	<u>CAAUCUUCUUUAUCAUGGUAAUUGAUUUUUCAGUG</u> <u>CUUCCCUUUUGUGUGAGAGAAGAUA</u>	274
miR-296	<u>AGGACCCUCCAGAGGGCCCCCCCCUCAAUCCUGUUG</u> <u>UGCCUAAUUCAGAGGGUUGGGUGGAGGCUCUCCUG</u> <u>AAGGGCUCU</u>	275

miR-299	AAGAAAUGGUUUACCGUCCCAUACAUUUUGAAU AUGUAUGUGGGAUGGUAAAACCGCUUCU	276
miR-301	ACUGCUAACGAAUGCUCUGACUUUAUUGCACUACU GUACUUUACAGCUAGCAGUGCAAUAGUAUUGUCA AGCAUCUGAAAGCAGG	277
miR-302a	CCACCACUUAAACGUGGAUGUACUUGCUUUGAAAC UAAAGAAGUAAGUGCUUCCAUGUUUUGGUGAUGG	278
miR-302b	GCUCCCUUCAACUUUAAACAUGGAAGUGCUUUCUGU GACUUUAAAAGUAAGUGCUUCCAUGUUUUGAGAGG AGU	279
miR-302c	CCUUUGCUUUAACAUGGGGGUACCUGCUGUGUGAA ACAAAAGUAAGUGCUUCCAUGUUUCAGUGGAGG	280
miR-302d	CCUCUACUUUAAACAUGGAGGCACUUGCUGUGACAU GACAAAAAUAAGUGCUUCCAUGUUUGAGUGUGG	281
miR-320	GCUUUGCUUCCUCCUCCGCUUCCUCCUCCGCUUCCU CCGGAGUCGGGAAAAGCUGGGUUGAGAGGGCGAAA AAGGATGAGGU	282
miR-321	UUGGCCUCCUAAGCCAGGGAUUGUGGGUUCGAGUC CCACCCGGGGUAAAGAAAGGCCGA	283
miR-323	UUGGUACUUGGAGAGAGGUGGUCCGUGGCGCGUUC GCUUUUAUUUAUGGCGCACAUUACACGGUCGACCUC UUUGCAGUAUCUAAUC	284
miR-324	CUGACUAUGCCUCCUCCGCAUCCCUUAGGGCAUUGGU GUAAAGCUGGAGACCCACUGCCCCAGGUGCUCUG GGGUUGUAGUC	285
miR-325	AUACAGUGCUUGGUUCCUAGUAGGUGUCCAGUAAG UGUUUGUGACAUAAUUUGUUUAUUGAGGACCUCU AUCAAUCAAGCACUGUGCUAGGCUCUUGG	286
miR-326	CUCAUCUGUCUGUUGGGCUGGAGGCAGGGCCUUG UGAAGGCGGGUGGUGCUCAGAUCGCCUCUGGGCCC UUCCUCCAGCCCCGAGGCGGAUUA	287
miR-328	UGGAGUGGGGGGGCAGGAGGGGCUCAGGGAGAAAG UGCAUACAGCCCCUGGCCCCUCUCUGCCCUUCCGUCC CCUG	288
miR-330	CUUUGGCGAUCACUGCCUCUCUGGGCCUGUGUCUU AGGCUCUGCAAGAUAACCGAGCAAAGCACACGGCC UGCAGAGAGGCAGCGCUCUGCCC	289
miR-331	GAGUUUGGUUUUGUUUGGGUUUGUUCUAGGUUUGG UCCAGGGAUCCAGAUCAAACCGGCCCUUGGGCC UAUCCUAGAACCAACCUAAGCUC	290
miR-335	UGUUUUGAGCGGGGGUCAAGAGCAAUAACGAAAAA UGUUUGUCAUAAACCGUUUUUCAUUAUUGCUCCUG ACCUCUCUCAUUUGCUAUAUUA	291

miR-337	GUAGUCAGUAGUUGGGGGUGGGGAACGGCUUCAUA CAGGAGUUGAUGCACAGUUA <u>UCCAGCUCCUAUAUG</u> AUGCCUUUCUUAUCCCCUCAA	292
miR-338	UCUCCAACAAUAUCCUGGUGCUGAGUGAUGACUCA GGCGACUCCAGCAUCAUGAUUUUUGUUGAAGA	293
miR-339	<u>CGGGGCGGCCGCUUCUCCUGUCCUCCAGGAGCUCAC</u> GUGUGCCUGCCUGUGAGCGCCUCGACGACAGAGCCG GCGCCUGCCCCAGUGUCUGCGC	294
miR-340	UUGUACCUGGUGUGAUUAUAAAGCAAUGAGACUGA UUGUCAUAUGUCGUUUGUGGGAU <u>UCCGUCUCAGUUA</u> CUUUAUAGCCAUAACCUGGUAUCUUA	295
miR-342	GAAACUGGGCUCAAGGUGAGGGGUGCUAUCUGUGA UUGAGGGACAUGGUUAAUGGAAUUG <u>UCUCACACAG</u> <u>AAAUCCGACCCGUCACCUUGGCCUACUUA</u>	296
miR-345	<u>ACCCAAACCCUAGGUCUGCUGACUCCUAGUCCAGGG</u> <u>UUCGUGAUGGCUGGUGGGGCCUGAACGAGGGGUCU</u> GGAGGCCUGGGUUGAAUAUCGACAGC	297
miR-346	<u>GUCUGUCUGCCCGCAUGCCUGCCUUCUGUUGUCUCU</u> GAAGGAGGCAGGGGCUGGGCCUGCAGCUGCCUGGG CAGAGCGGCUCCUGC	298
miR-367	CCAUAACUGUUGCUAAUAUGCAACUUGUUGAAUA UAAAUUGGAAUUGCACUUUAGCAAUGGUGAUGG	299
miR-368	AAAAGGUGGAUAUCCUUCUAUGUUUAUGUUUUUU AUGGUUAAACAUAAGAGGAAAUCCACGUUUU	300
miR-369	UUGAAGGGAGAUUCGACCGUGUUAUAUUCGCUUUAU UGACUUCGAAUAUAACAUGGUUGAUCUUUUCUCAG	301
miR-370	AGACAGAGAAGCCAGGUCACGUCUCUGCAGUUACA CAGCUCACGAGU <u>GCCUGCUUGGGUGGAACCUGGUC</u> UGUCU	302
miR-371	GUGGCACUCAAAACUGUGGGGGGCACUUUCUGCUCUC UGGUGAAAGUGCCGCCAUCUUUUGAGUGUUAAC	303
miR-372	GUGGGCCUCAAAUGUGGAGCACUAUUCUGAUGUCC AAGUGGAAAGUGCUGCGACAUUUGAGCGUCAC	304
miR-373	GGGAUACUCAAAAUUGGGGGCGCUUCCUUUUUGUC UGUACUGGGAAGUGCUUCGAUUUUGGGGUGUCCC	305
miR-374	UACAUCGGCCA <u>UUUAUAUAACAACCUGAUAAAGUGUU</u> AUAGCACUUUAUCAGAUUGUAUUGUAAUUGUCUGUG UA	306
mir-hes1	AUGGAGCUGCUCACCCUGUGGGGCCUCAAAUGUGGA GGAACUAUUCUGAUGUCCAAGUGGAAAGUGCUGCG ACAUUUGAGCGUCACCGGUGACGCCCAUAUCA	307
mir-hes2	GCAUCCCCUCAGCCUGUGGCACUCAAAACUGUGGGGG CACUUUCUGCUCUCUGGUGAAAGUGCCGCCAUCUU UUGAGUGUUACCGCUUGAGAAGACUCAACC	308

<i>mir-hes3</i>	CGAGGAGCUCAUACUGGGAUACUCAA <u>AAUUGGGGUC</u> GCUUCCUUUUUGUCUGUUACUGGGAAGUGCUUCG AUUUUGGGGUGUCCCUGUUUAGAGUAGGGCAUC	309
-----------------	---	-----

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

5

Tabla 1b Secuencias de microARN maduro humano

Nombre de miARN Maduro	Secuencia de miARN Maduro (5' a 3')	SEC ID Nº	MicroARN precursor o precursores correspondientes; véase Tabla 1a
<i>let-7a</i>	UGAGGUAGUAGGUUG UAUAGUU	310	<i>let-7a-1; let-7a-2; let-7a-3; let-7a-4</i>
<i>let-7b</i>	UGAGGUAGUAGGUUG UGUGGUU	311	<i>let-7b</i>
<i>let-7c</i>	UGAGGUAGUAGGUUG UAUGGUU	312	<i>let-7c</i>
<i>let-7d</i>	AGAGGUAGUAGGUUG CAUAGU	313	<i>let-7d; let-7d-v1</i>
<i>let-7e</i>	UGAGGUAGGAGGUUG UAUAGU	314	<i>let-7e</i>
<i>let-7f</i>	UGAGGUAGUAGAUG UAUAGUU	315	<i>let-7f-1; let-7f-2-1; let-7f-2-2</i>
<i>let-7g</i>	UGAGGUAGUAGUUUG UACAGU	316	<i>let-7g</i>
<i>let-7i</i>	UGAGGUAGUAGUUUG UGCU	317	<i>let-7i</i>
<i>miR-1</i>	UGGAAUGUAAAGAAG UAUGUA	318	<i>miR-1b; miR-1b-1; miR-1b-2</i>
<i>miR-7</i>	UGGAAGACUAGUGAU UUUGUU	319	<i>miR-7-1; miR-7-1a; miR-7-2; miR-7-3</i>
<i>miR-9</i>	UCUUUGGUUAUCUAGC UGUAUGA	320	<i>miR-9-1; miR-9-2; miR-9-3</i>
<i>miR-9*</i>	UAAAGCUAGAUAACCG AAAGU	321	<i>miR-9-1; miR-9-2; miR-9-3</i>
<i>miR-10a</i>	UACCCUGUAGAUCCGA AUUUGUG	322	<i>miR-10a</i>
<i>miR-10b</i>	UACCCUGUAGAACCGA AUUUGU	323	<i>miR-10b</i>
<i>miR-15a</i>	UAGCAGCACAUAAUGG UUUGUG	324	<i>miR-15a-2</i>
<i>miR-15b</i>	UAGCAGCACAUCAUGG UUUACA	325	<i>miR-15b</i>

<i>miR-16</i>	UAGCAGCACGUAAAUA UUGGCG	326	<i>miR-16-1; miR-16-2; miR-16-13</i>
<i>miR-17-5p</i>	CAAAGUGCUUACAGUG CAGGUAGU	327	<i>miR-17</i>
<i>miR-17-3p</i>	ACUGCAGUGAAGGCAC UUGU	328	<i>miR-17</i>
<i>miR-18</i>	UAAGGUGCAUCUAGUG CAGAU	329	<i>miR-18; miR-18-13</i>
<i>miR-19a</i>	UGUGCAAAUCUAUGCA AAACUGA	330	<i>miR-19a; miR-19a-13</i>
<i>miR-19b</i>	UGUGCAAAUCCAUGCA AAACUGA	331	<i>miR-19b-1; miR-19b-2</i>
<i>miR-20</i>	UAAAGUGCUUAGU GCAGGUA	332	<i>miR-20 (miR-20a)</i>
<i>miR-21</i>	UAGCUUAUCAGACUGA UGUUGA	333	<i>miR-21; miR-21-17</i>
<i>miR-22</i>	AAGCUGCCAGUUGAAG AACUGU	334	<i>miR-22</i>
<i>miR-23a</i>	AUCACAUUGCCAGGGA UUUCC	335	<i>miR-23a</i>
<i>miR-23b</i>	AUCACAUUGCCAGGGA UUACCAC	336	<i>miR-23b</i>
<i>miR-24</i>	UGGCUCAGUUCAGCAG GAACAG	337	<i>miR-24-1; miR-24-2; miR-24-19; miR-24-9</i>
<i>miR-25</i>	CAUUGCACUUGUCUCG GUCUGA	338	<i>miR-25</i>
<i>miR-26a</i>	UUCAAGUAAUCCAGGA UAGGCU	339	<i>miR-26a; miR-26a-1; miR-26a-2</i>
<i>miR-26b</i>	UUCAAGUAAUUCAGGA UAGGU	340	<i>miR-26b</i>
<i>miR-27a</i>	UUCACAGUGGCUAAGU UCCGCC	341	<i>miR-27a</i>
<i>miR-27b</i>	UUCACAGUGGCUAAGU UCUG	342	<i>miR-27b-1; miR-27b-2</i>
<i>miR-28</i>	AAGGAGCUCACAGUCU AUUGAG	343	<i>miR-28</i>
<i>miR-29a</i>	CUAGCACCAUCUGAAA UCGGUU	344	<i>miR-29a-2; miR-29a</i>
<i>miR-29b</i>	UAGCACCAUUGAAA CAGU	345	<i>miR-29b-1; miR-29b-2</i>

<i>miR-29c</i>	UAGCACCAUUUGAAAU CGGUUA	346	<i>miR-29c</i>
<i>miR-30a-5p</i>	UGUAAACAUCCUCGAC UGGAAGC	347	<i>miR-30a</i>
<i>miR-30a-3p</i>	CUUUCAGUCGGAUGUU UGCAGC	348	<i>miR-30a</i>
<i>miR-30b</i>	UGUAAACAUCCUACAC UCAGC	349	<i>miR-30b-1; miR-30b-2</i>
<i>miR-30c</i>	UGUAAACAUCCUACAC UCUCAGC	350	<i>miR-30c</i>
<i>miR-30d</i>	UGUAAACAUCCCGAC UGGAAG	351	<i>miR-30d</i>
<i>miR-30e</i>	UGUAAACAUCCUUGAC UGGA	352	<i>miR-30e</i>
<i>miR-31</i>	GGCAAGAUGCUGGCAU AGCUG	353	<i>miR-31</i>
<i>miR-32</i>	UAUUGCACAUUACUAA GUUGC	354	<i>miR-32</i>
<i>miR-33</i>	GUGCAUUGUAGUUGCA UUG	355	<i>miR-33; miR-33b</i>
<i>miR-34a</i>	UGGCAGUGUCUAGCU GGUUGU	356	<i>miR-34a</i>
<i>miR-34b</i>	AGGCAGUGUCAUAGC UGAUUG	357	<i>miR-34b</i>
<i>miR-34c</i>	AGGCAGUGUAGUAGC UGAUUG	358	<i>miR-34c</i>
<i>miR-92</i>	UAUUGCACUUGUCCCG GCCUGU	359	<i>miR-92-2; miR-92-1</i>
<i>miR-93</i>	AAAGUGCUGUUCGUGC AGGUAG	360	<i>miR-93-1; miR-93-2</i>
<i>miR-95</i>	UUCAACGGGUAUUUAU UGAGCA	361	<i>miR-95</i>
<i>miR-96</i>	UUUGGCACUAGCACAU UUUUGC	362	<i>miR-96</i>
<i>miR-98</i>	UGAGGUAGUAAGUUG UAUUGUU	363	<i>miR-98</i>
<i>miR-99a</i>	AACCCGUAGAUCCGAU CUUGUG	364	<i>miR-99a</i>
<i>miR-99b</i>	CACCCGUAGAACCGAC CUUGCG	365	<i>miR-99b</i>

<i>miR-100</i>	UACAGUACUGUGAUAA CUGAAG	366	<i>miR-100</i>
<i>miR-101</i>	UACAGUACUGUGAUAA CUGAAG	367	<i>miR-101-1; miR-101-2</i>
<i>miR-103</i>	AGCAGCAUUGUACAGG GCUAUGA	368	<i>miR-103-1</i>
<i>miR-105</i>	UCAA AUGCUCAGACUC CUGU	369	<i>miR-105</i>
<i>miR-106-a</i>	AAAAGUGCUUACAGUG CAGGUAGC	370	<i>miR-106-a</i>
<i>miR-106-b</i>	UAAAGUGCUGACAGUG CAGAU	371	<i>miR-106-b</i>
<i>miR-107</i>	AGCAGCAUUGUACAGG GCUAUCA	372	<i>miR-107</i>
<i>miR-122a</i>	UGGAGUGUGACAAUG GUGUUUGU	373	<i>miR-122a-1; miR-122a-2</i>
<i>miR-124a</i>	UUAAGGCACGCGGUGA AUGCCA	374	<i>miR-124a-1; miR-124a-2; miR-124a-3</i>
<i>miR-125a</i>	UCCCUAGAGACCCUUA ACCUGUG	375	<i>miR-125a-1; miR-125a-2</i>
<i>miR-125b</i>	UCCCUAGAGACCCUAAC UUGUGA	376	<i>miR-125b-1; miR-125b-2</i>
<i>miR-126*</i>	CAUUAUUACUUUUGGU ACGCG	377	<i>miR-126-1; miR-126-2</i>
<i>miR-126</i>	UCGUACCGUGAGUAAU AAUGC	378	<i>miR-126-1; miR-126-2</i>
<i>miR-127</i>	UCGGAUCCGUCUGAGC UUGGCU	379	<i>miR-127-1; miR-127-2</i>
<i>miR-128a</i>	UCACAGUGAACCGGUC UCUUUU	380	<i>miR-128; miR-128a</i>
<i>miR-128b</i>	UCACAGUGAACCGGUC UCUUUC	381	<i>miR-128b</i>
<i>miR-129</i>	CUUUUUGCGGUCUGGG CUUGC	382	<i>miR-129-1; miR-129-2</i>
<i>miR-130a</i>	CAGUGCAAUGUAAAA GGGC	383	<i>miR-130a</i>
<i>miR-130b</i>	CAGUGCAAUGAUGAAA GGGCAU	384	<i>miR-130b</i>
<i>miR-132</i>	UAACAGUCUACAGCCA UGGUCG	385	<i>miR-132-1</i>

<i>miR-133a</i>	UUGGUCCCCUUAACC AGCUGU	386	<i>miR-133a-1; miR-133a-2</i>
<i>miR-133b</i>	UUGGUCCCCUUAACC AGCUA	387	<i>miR-133b</i>
<i>miR-134</i>	UGUGACUGGUUGACCA GAGGG	388	<i>miR-134-1; miR-134-2</i>
<i>miR-135a</i>	UAUGGCUUUUUAUUC UAUGUGA	389	<i>miR-135a; miR-135a-2 (miR-135-2)</i>
<i>miR-135b</i>	UAUGGCUUUUUAUUC UAUGUG	390	<i>miR-135b</i>
<i>miR-136</i>	ACUCCAUUUGUUUGA UGAUGGA	391	<i>miR-136-1; miR-136-2</i>
<i>miR-137</i>	UAUUGCUUAAGAAUAC GCGUAG	392	<i>miR-137</i>
<i>miR-138</i>	AGCUGGUGUUGUGAA UC	393	<i>miR-138-1; miR-138-2</i>
<i>miR-139</i>	UCUACAGUGCACGUGU CU	394	<i>miR-139</i>
<i>miR-140</i>	AGUGGUUUUACCCUAU GGUAG	395	<i>miR-140; miR-140as; miR-140s</i>
<i>miR-141</i>	AACACUGUCUGGUAAA GAUGG	396	<i>miR-141-1; miR-141-2</i>
<i>miR-142-3p</i>	UGUAGUGUUUCCUACU UUAUGGA	397	<i>miR-142</i>
<i>miR-142-5p</i>	CAUAAAGUAGAAAGCA CUAC	398	<i>miR-142</i>
<i>MIR-143</i>	UGAGAUGAAGCACUGU AGCUCA	399	<i>miR-143-1</i>
<i>miR-144</i>	UACAGUAUAGAUGAU GUACUAG	400	<i>miR-144-1; miR-144-2</i>
<i>miR-145</i>	GUCCAGUUUCCCCAGG AAUCCCUU	401	<i>miR-145-1; miR-145-2</i>
<i>miR-146</i>	UGAGAACUGAAUUGCA UGGGUU	402	<i>miR-146-1; miR-146-2</i>
<i>miR-147</i>	GUGUGUGGAAAUGCU UCUGC	403	<i>miR-147</i>
<i>miR-148a</i>	UCAGUGCACUACAGAA CUUUGU	404	<i>miR-148a (miR-148)</i>
<i>miR-148b</i>	UCAGUGCAUCACAGAA CUUUGU	405	<i>miR-148b</i>

<i>miR-149</i>	UCUGGCUCGUGUCUU CACUCC	406	<i>miR-149</i>
<i>miR-150</i>	UCUCCCAACCCUUGUA CCAGUG	407	<i>miR-150-1; miR-150-2</i>
<i>miR-151</i>	ACUAGACUGAAGCUCC UUGAGG	408	<i>miR-151</i>
<i>miR-152</i>	UCAGUGCAUGACAGAA CUUGG	409	<i>miR-152-1; miR-152-2</i>
<i>miR-153</i>	UUGCAUAGUCACAAAA GUGA	410	<i>miR-153-1-1; miR-153-1-2; miR-153-2-1; miR-153-2-2</i>
<i>miR-154</i>	UAGGUUAUCCGUGUUG CCUUCG	411	<i>miR-154-1; miR-154-2</i>
<i>miR-154*</i>	AAUCAUACACGGUUGA CCUAUU	412	<i>miR-154-1; miR-154-2</i>
<i>miR-155</i>	UUAAUGCUAAUCGUGA UAGGGG	413	<i>miR-155</i>
<i>miR-181a</i>	AACAUUCAACGCUGUC GGUGAGU	414	<i>miR-181a</i>
<i>miR-181b</i>	AACAUUCAUUGCUGUC GGUGGGUU	415	<i>miR-181b-1; miR-181b-2</i>
<i>miR-181c</i>	AACAUUCAACCUGUCG GUGAGU	416	<i>miR-181c</i>
<i>miR-182</i>	UUUGGCAAUGGUAGA ACUCACA	417	<i>miR-182; miR-182as</i>
<i>miR-182*</i>	UGGUUCUAGACUUGCC AACTUA	418	<i>miR-182; miR-182as</i>
<i>miR-183</i>	UAUGGCACUGGUAGAA UUCACUG	419	<i>miR-183</i>
<i>miR-184</i>	UGGACGGAGAACUGAU AAGGGU	420	<i>miR-184-1; miR-184-2</i>
<i>miR-185</i>	UGGAGAGAAAGGCAG UUC	421	<i>miR-185-1; miR-185-2</i>
<i>miR-186</i>	CAAAGAAUUCUCCUUU UGGGCUU	422	<i>miR-186-1; miR-186-2</i>
<i>miR-187</i>	UCGUGUCUUGUGUUGC AGCCG	423	<i>miR-187</i>
<i>miR-188</i>	CAUCCCUUGCAUGGUG GAGGGU	424	<i>miR-188</i>
<i>miR-189</i>	GUGCCUACUGAGCUGA UAUCAGU	425	<i>miR-189-2</i>

<i>miR-190</i>	UGAUAUGUUUGAUAU AUUAGGU	426	<i>miR-190-1; miR-190-2</i>
<i>miR-191</i>	CAACGGAAUCCCAAAA GCAGCU	427	<i>miR-191-1; miR-191-2</i>
<i>miR-192</i>	GUGACCUAUGAAUUGA CAGCC	428	<i>miR-192</i>
<i>miR-193</i>	AACUGGCCUACAAAGU CCCAG	429	<i>miR-193-1; miR-193-2</i>
<i>miR-194</i>	UGUAACAGCAACUCCA UGUGGA	430	<i>miR-194-1; miR-194-2</i>
<i>miR-195</i>	UAGCAGCACAGAAAUA UUGGC	431	<i>miR-195-1; miR-195-2</i>
<i>miR-196a</i>	UAGGUAGUUUCAUGU UGUUGG	432	<i>miR-196a; miR-196a-2 (miR196</i>
<i>miR-196b</i>	UAGGUAGUUUCCUGUU GUUGG	433	<i>miR-196b</i>
<i>miR-197</i>	UUCACCACCUUCUCCA CCCAGC	434	<i>miR-197</i>
<i>miR-198</i>	GGUCCAGAGGGGAGAU AGG	435	<i>miR-198</i>
<i>miR-199a</i>	CCCAGUGUUCAGACUA CCUGUUC	436	<i>miR-199a-1; miR-199a-2</i>
<i>miR-199a*</i>	UACAGUAGUCUGCACA UUGGUU	437	<i>miR-199a-1; miR-199a-2; miR-199s; miR-199b</i>
<i>miR-199b</i>	CCCAGUGUUUAGACUA UCUGUUC	438	<i>miR-199b</i>
<i>miR-200a</i>	UAACACUGUCUGGUAA CGAUGU	439	<i>miR-200a</i>
<i>miR-200b</i>	CUCUAAUACUGCCUGG UAAUGAUG	440	<i>miR-200b</i>
<i>miR-200c</i>	AAUACUGCCGGGUAUU GAUGGA	441	<i>miR-200c</i>
<i>miR-202</i>	AGAGGUUAGGGCAU GGGAAGA	442	<i>miR-202</i>
<i>miR-203</i>	GUGAAAUGUUUAGGA CCACUAG	443	<i>miR-203</i>
<i>miR-204</i>	UUCCCUUUGUCAUCCU AUGCCU	444	<i>miR-204</i>
<i>miR-205</i>	UCCUUCAUUECCACCGG AGUCUG	445	<i>miR-205</i>

<i>miR-206</i>	UGGAAUGUAAGGAAG UGUGUGG	446	<i>miR-206-1; miR-206-2</i>
<i>miR-208</i>	AUAAGACGAGCAAAAA GCUUGU	447	<i>miR-208</i>
<i>miR-210</i>	CUGUGCGUGUGACAGC GGCUG	448	<i>miR-210</i>
<i>miR-211</i>	UCCCCUUGUCAUCCU UCGCCU	449	<i>miR-211</i>
<i>miR-212</i>	UACAGUCUCCAGUCA CGGCC	450	<i>miR-212</i>
<i>miR-213</i>	ACCAUCGACCGUUGAU UGUACC	451	<i>miR-213</i>
<i>miR-214</i>	ACAGCAGGCACAGACA GGCAG	452	<i>miR-214</i>
<i>miR-215</i>	AUGACCUAUGAAUUGA CAGAC	453	<i>miR-215</i>
<i>miR-216</i>	UAAUCUCAGCUGGCAA CUGUG	454	<i>miR-216</i>
<i>miR-217</i>	UACUGCAUCAGGAACU GAUUGGAU	455	<i>miR-217</i>
<i>miR-218</i>	UUGUGCUUGAUCUAAC CAUGU	456	<i>miR-218-1; miR-218-2</i>
<i>miR-219</i>	UGAUUGUCCAAACGCA AUUCU	457	<i>miR-219; miR-219-1; miR-219-2</i>
<i>miR-220</i>	CCACACCGUAUCUGAC ACUUU	458	<i>miR-220</i>
<i>miR-221</i>	AGCUACAUUGUCUGCU GGGUUUC	459	<i>miR-221</i>
<i>miR-222</i>	AGCUACAUCUGGCUAC UGGGUCUC	460	<i>miR-222</i>
<i>miR-223</i>	UGUCAGUUUGUCAAAU ACCCC	461	<i>miR-223</i>
<i>miR-224</i>	CAAGUCACUAGUGGUU CCGUUUA	462	<i>miR-224</i>
<i>miR-296</i>	AGGGCCCCCCCCUCAAU CCUGU	463	<i>miR-296</i>
<i>miR-299</i>	UGGUUUACCGUCCAC AUACAU	464	<i>miR-299</i>
<i>miR-301</i>	CAGUGCAAUAGUAUUG UCAAGC	465	<i>miR-301</i>

<i>miR-302a</i>	UAAGUGCUUCCAUGUU UUGGUGA	466	<i>miR-302a</i>
<i>miR-302b*</i>	ACUUUAACAUGGAAGU GCUUUCU	467	<i>miR-302b</i>
<i>miR-302b</i>	UAAGUGCUUCCAUGUU UUAGUAG	468	<i>miR-302b</i>
<i>miR-302c*</i>	UUUAACAUGGGGGUAC CUGCUG	469	<i>miR-302c</i>
<i>miR-302c</i>	UAAGUGCUUCCAUGUU UCAGUGG	470	<i>miR-302c</i>
<i>miR-302d</i>	UAAGUGCUUCCAUGUU UGAGUGU	471	<i>miR-302d</i>
<i>miR-320</i>	AAAAGCUGGGUUGAG AGGGCGAA	472	<i>miR-320</i>
<i>miR-321</i>	UAAGCCAGGGAUUGUG GGUUC	473	<i>miR-321</i>
<i>miR-323</i>	GCACAUUACACGGUCG ACCUCU	474	<i>miR-323</i>
<i>miR-324-5p</i>	CGCAUCCCCUAGGGCA UUGGUGU	475	<i>miR-324</i>
<i>miR-324-3p</i>	CCACUGCCCCAGGUGC UGCUGG	476	<i>miR-324</i>
<i>miR-325</i>	CCUAGUAGGUGUCCAG UAAGU	477	<i>miR-325</i>
<i>miR-326</i>	CCUCUGGGCCCUCUCCU CCAG	478	<i>miR-326</i>
<i>miR-328</i>	CUGGCCCUCUCUGCCC UUCCGU	479	<i>miR-328</i>
<i>miR-330</i>	GCAAAGCACACGGCCU GCAGAGA	480	<i>miR-330</i>
<i>miR-331</i>	GCCCCUGGGCCUAUCC UAGAA	481	<i>miR-331</i>
<i>miR-335</i>	UCAAGAGCAAUAACGA AAAAUGU	482	<i>miR-335</i>
<i>miR-337</i>	UCCAGCUCCUAUAUGA UGCCUUU	483	<i>miR-337</i>
<i>miR-338</i>	UCCAGCAUCAGUGAUU UUGUUGA	484	<i>miR-338</i>
<i>miR-339</i>	UCCCUGUCCUCCAGGA GCUCA	485	<i>miR-339</i>

<i>miR-340</i>	UCCGUCUCAGUUACUU UAUAGCC	486	<i>miR-340</i>
<i>miR-342</i>	UCUCACACAGAAAUCG CACCCGUC	487	<i>miR-342</i>
<i>miR-345</i>	UGCUGACUCCUAGUCC AGGGC	488	<i>miR-345</i>
<i>miR-346</i>	UGUCUGCCCGCAUGCC UGCCUCU	489	<i>miR-346</i>
<i>miR-367</i>	AAUUGCACUUUAGCAA UGGUGA	490	<i>miR-367</i>
<i>miR-368</i>	ACAUAGA GGAAA UU CC ACGUUU	491	<i>miR-368</i>
<i>miR-369</i>	AAUAAUACAUGGUUG AUCU₁U	492	<i>miR-369</i>
<i>miR-370</i>	GCCUGCUGGGGUGGAA CCUGG	493	<i>miR-370</i>
<i>miR-371</i>	GUGCCGCCAUCUUUUG AGUGU	494	<i>miR-371</i>
<i>miR-372</i>	AAAGUGCUGCGACAUU UGAGCGU	495	<i>miR-372</i>
<i>miR-373*</i>	ACUCAAAAUGGGGGCG CUU₁UCC	496	<i>miR-373</i>
<i>miR-373</i>	GAAGUGCUCGAUUUU GGGGUGU	497	<i>miR-373</i>
<i>miR-374</i>	UUAUAAUACAACCUGA UAAGUG	498	<i>miR-374</i>

La presente divulgación abarca métodos para diagnosticar o pronosticar si un sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, un cáncer y/o un trastorno mieloproliferativo. Los métodos comprenden determinar el nivel de al menos un producto génico de miR en un muestra del sujeto y comparar el nivel de producto génico de miR en la muestra con un control. Como se usa en el presente documento, un "sujeto" puede ser cualquier mamífero que tenga, o se sospeche que tiene, un cáncer y/o trastorno mieloproliferativo. El sujeto puede ser un ser humano que tiene, o se sospecha que tiene, un cáncer, trastorno mieloproliferativo y/o un trastorno plaquetario.

El nivel de al menos un producto génico de miR puede medirse en células de una muestra biológica obtenida del sujeto. Por ejemplo, puede retirarse una muestra tisular de un sujeto que se sospecha que tiene cáncer y/o un trastorno mieloproliferativo por técnicas de biopsia convencionales. Como alternativa, puede retirarse una muestra de sangre del sujeto, y pueden aislarse glóbulos blancos para extracción de ADN por técnicas convencionales. La muestra sanguínea o tisular puede obtenerse del sujeto antes del inicio de la radioterapia, quimioterapia u otro tratamiento terapéutico. Puede obtenerse un tejido de control o muestra de sangre correspondiente, o una muestra de referencia de control (por ejemplo, obtenida de una población de muestras de control) de tejidos no afectados del sujeto, de un individuo humano normal o población de individuo normales, o de células cultivadas correspondientes a la mayoría de células en la muestra del sujeto. El tejido o muestra sanguínea de control puede después procesarse junto con la muestra del sujeto, de modo que puedan compararse los niveles de producto génico de miR producido a partir de un gen de miR dado en células de la muestra del sujeto con los niveles de producto génico de miR correspondientes de células de la muestra de control. Como alternativa, puede obtenerse una muestra de referencia y procesarse por separado (por ejemplo, en un momento diferente) de la muestra de ensayo y puede compararse el nivel de un producto génico de miR producido a partir de un gen de miR dado en células de la muestra de ensayo con el nivel de producto génico de miR correspondiente de la muestra de referencia.

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

Una alteración (es decir, un aumento o reducción) en el nivel de un producto génico de miR en la muestra obtenida del sujeto, en relación con el nivel de un producto génico de miR correspondiente en una muestra de control, es indicativa de la presencia de cáncer y/o un trastorno mieloproliferativo en el sujeto. El nivel del al menos un producto génico de miR en la muestra de ensayo puede ser mayor que el nivel del producto génico de miR correspondiente en la muestra de control. Se describen y ejemplifican en el presente documento (véase, por ejemplo, Ejemplo 5) productos génicos de miR que tienen mayores niveles de expresión en líneas celulares cancerosas (por ejemplo, líneas celulares de LMA) que células de control (por ejemplo, megacariocitos diferenciados CD34⁺ *in vitro*). El al menos un producto génico de miR puede seleccionarse del grupo que consiste en miR-101, miR-126, miR-99a, miR-99-prec, miR-106, miR-339, miR-99b, miR-149, miR-33, miR-135, miR-20 y combinaciones de los mismos. Como alternativa, el al menos un producto génico de miR puede seleccionarse del grupo que consiste en miR-101, miR-126, miR-106, miR-20 y miR-135 y combinaciones de los mismos. En otra alternativa, el al menos un producto génico de miR se selecciona del grupo que consiste en miR-106, miR-20 y miR-135 y combinaciones de los mismos. Como se describe y ejemplifica en el presente documento, el aumento de la expresión de dichos productos génicos de miR diferencia células cancerosas de células no cancerosas correspondientes.

Como se describe en el presente documento, los métodos de diagnóstico y pronóstico pueden usarse para diagnosticar o pronosticar cánceres y/o trastornos mieloproliferativos. Los métodos de diagnóstico y pronóstico pueden usarse para diagnosticar un cáncer en un sujeto, muestra tisular, muestra celular o muestra de fluido. Los métodos de diagnóstico o pronóstico pueden usarse para diagnosticar o pronosticar cualquier tipo de cáncer. Los métodos de diagnóstico y pronóstico pueden usarse para diagnosticar o pronosticar una leucemia. La leucemia que se diagnostica o pronostica puede ser leucemia mieloide aguda (por ejemplo, leucemia megacarioblástica aguda). Como alternativa, los métodos de diagnóstico y pronóstico pueden usarse para diagnosticar o pronosticar mieloma múltiple.

Los métodos de diagnóstico y pronóstico también pueden usarse para diagnosticar o pronosticar tumores malignos hematológicos (por ejemplo, trastornos mieloproliferativos). El trastorno mieloproliferativo que se diagnostica o pronostica puede seleccionarse del grupo que consiste en trombocitemia esencial (TE), policitemia vera (PV), mielodisplasia, mielofibrosis (por ejemplo, metaplasia amiloide agnógena (MMA) (también denominada mielofibrosis idiopática)) y leucemia mielógena crónica (LMC).

Los métodos de diagnóstico, pronóstico y terapéuticos también pueden usarse para diagnosticar, pronosticar y/o tratar trastornos plaquetarios (por ejemplo, trastornos plaquetarios heredados). Por ejemplo, los métodos de diagnóstico, pronóstico y terapéuticos pueden usarse para diagnosticar, pronosticar y/o tratar defectos en las interacciones entre la pared de los vasos-plaquetas (es decir, trastornos de adhesión). Dichos trastornos de adhesión incluyen, por ejemplo, enfermedad de von Willebrand (deficiencia o defecto en vWF en plasma) y síndrome de Bernard-Soulier (deficiencia o defecto en GPIb). Como alternativa, los métodos de diagnóstico, pronóstico y terapéuticos pueden usarse para diagnosticar, pronosticar y/o tratar defectos en la interacción plaqueta-plaqueta (es decir, trastornos de agregación). Dichos trastornos de agregación incluyen, por ejemplo, afibrinogenemia congénita (deficiencia de fibrinógeno en plasma) y trombostenia de glanzmann (deficiencia o defecto en GPIIb-IIIa). En otra alternativa, los métodos de diagnóstico, pronóstico y terapéuticos pueden usarse para diagnosticar, pronosticar y/o tratar trastornos de secreción de plaquetas y anomalías de gránulos. Dichos trastornos de la secreción de plaquetas y anomalías de gránulos incluyen, por ejemplo, deficiencia de grupo de almacenamiento y trastorno de plaquetas de Quebec. En una alternativa adicional, los métodos de diagnóstico, pronóstico y terapéuticos pueden usarse para diagnosticar, pronosticar y/o tratar trastornos de la secreción de plaquetas y transducción de señal (defectos de secreción primarios). Dichos defectos de secreción primarios incluyen, por ejemplo, defectos en la interacción plaqueta-agonista (defectos de receptor) (por ejemplo, tromboxano A₂, colágeno, ADP, epinefrina), defectos en la activación de proteína G (por ejemplo, deficiencia de G_{ag}, anomalías de G_{as}, deficiencia de G_{ai}), defectos en el metabolismo del fosfatidilinositol (por ejemplo, deficiencia de fosfolipasa C-2), defectos en la movilización de calcio, defectos en la fosforilación de proteínas (pleckstrina), deficiencia de PKC- γ , y anomalías en las rutas del ácido

araquidónico y síntesis de tromboxano (por ejemplo, deficiencia de ciclooxygenasa, deficiencia de tromboxano sintasa). Como alternativa, los métodos de diagnóstico, pronóstico y terapéuticos pueden usarse para diagnosticar, pronosticar y/o tratar defectos en la regulación citoesquelética (por ejemplo, síndrome de Wiskott-Aldrich). En otra alternativa, los métodos de diagnóstico, pronóstico y terapéuticos pueden usarse para diagnosticar, pronosticar y/o

5 tratar trastornos de interacción proteína coagulante-plaqueta (defectos de fosfolípidos de membrana) (por ejemplo, síndrome de Scott). También pueden diagnosticarse, pronosticarse y/o tratarse usando los métodos desvelados en el presente documento otros trastornos plaquetarios (por ejemplo, trastornos plaquetarios heredados).

También se desvelan en el presente documento métodos para determinar el pronóstico de un sujeto con cáncer y/o

10 un trastorno mieloproliferativo. En este método, el nivel de al menos un producto génico de miR, que se asocia con un pronóstico particular en cáncer y/o un trastorno mieloproliferativo (por ejemplo, un pronóstico bueno o positivo, un pronóstico malo o negativo), se mide en una muestra de ensayo del sujeto. Una alteración (por ejemplo, un aumento, una reducción) en el nivel del producto génico de miR en la muestra de ensayo, en relación con el nivel de un producto génico de miR correspondiente en una muestra de control, es indicativa de que el sujeto tiene un cáncer

15 y/o trastorno mieloproliferativo con un pronóstico particular. El producto génico de miR puede asociarse con un pronóstico adverso (es decir, negativo). Los ejemplos de un pronóstico adverso incluyen, pero sin limitación, baja tasa de supervivencia y rápida progresión de la enfermedad. El nivel del al menos un producto génico de miR en la muestra de ensayo puede ser mayor que el nivel del producto génico de miR correspondiente en una muestra de control (es decir, está regulado positivamente). El al menos un producto génico de miR que está regulado

20 positivamente puede seleccionarse del grupo que consiste en miR-101, miR-126, miR-99a, miR-99-prec, miR-106, miR-339, miR-99b, miR-149, miR-33, miR-135, miR-20 y combinaciones de los mismos. El al menos un producto génico de miR que está regulado positivamente puede seleccionarse del grupo que consiste en miR-101, miR-126, miR-106, miR-20 y miR-135 y combinaciones de los mismos. El al menos un producto génico de miR que está regulado positivamente puede seleccionarse del grupo que consiste en miR-106, miR-20 y miR-135 y combinaciones de los mismos. El aumento de la expresión de dichos productos génicos de miR puede correlacionarse con un

25 pronóstico adverso y la gravedad del cáncer de un sujeto y/o trastorno mieloproliferativo.

En los métodos de diagnóstico y pronóstico descritos en el presente documento, el nivel del al menos un producto génico de miR puede medirse transcribiendo de forma inversa ARN de una muestra de ensayo obtenida del sujeto

30 para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana, hibridando los oligodesoxinucleótidos diana con una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN para proporcionar 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 de una muestra de control.

La identificación de dianas de productos génicos de miR particulares (por ejemplo, los productos génicos de miR que muestran expresión regulada positivamente o regulada negativamente en relación con una muestra de control) puede ayudar a dilucidar los mecanismos de acción de los microARN. Como se describe y ejemplifica en el presente documento, se identificaron dianas particulares y dianas potenciales de microARN seleccionados (véase, por ejemplo, Tablas 2, 3 y 5 y ejemplificación). Por ejemplo, el factor de transcripción MAFB se identificó como una diana

35 de mi-130a (Ejemplo 2). De forma similar, HOXA1 se identificó como una diana de miR-10a (Ejemplo 5). Para ambos miR, se demostró interacción directa del miR con el 3' UTR de su diana respectiva (Ejemplos 2 y 5). Además, se demostró una relación inversa en la expresión del miR y su diana respectiva. Por lo tanto, la expresión de pre-miR-130a dio como resultado expresión reducida de MAFB (véase, por ejemplo, FIGURA 2C) mientras que la expresión de pre-miR-10a dio como resultado la expresión reducida de H3CA1 (véase, por ejemplo, FIGURAS 3C, 3F y 3G).

40 Por lo tanto, la expresión de genes diana de microARN particulares (por ejemplo, los enumerados en las Tablas 2, 3 y 5) pueden usarse para diagnosticar cáncer y/o un trastorno mieloproliferativo. Dichos genes diana presentan expresión inversa al miR respectivo que se dirige a ellos. Un experto en la materia puede medir los niveles de expresión de cualquiera de estos genes diana usando métodos conocidos y/o métodos descritos en el presente documento para medir los niveles de expresión de microARN (por ejemplo, RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa, análisis de transferencia de Northern, detección de hibridación de solución, análisis de micromatrices), sin

45 experimentación indebida. El gen diana que puede medirse puede ser MAFB o HOXA1.

El nivel del al menos un producto génico de miR puede medirse usando diversas técnicas que se conocen bien por los expertos en la materia (por ejemplo, RT-PCR cuantitativa o semicuantitativa, análisis de transferencia de

55 Northern, detección de hibridación de solución). El nivel de al menos un producto génico de miR puede medirse transcribiendo de forma inversa ARN a partir de una muestra de ensayo obtenida del sujeto para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana, hibridando los oligodesoxinucleótidos diana con uno o más oligonucleótidos sonda específicos de miARN (por ejemplo, una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN) para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de ensayo, y comparando el perfil

60 de hibridación de la muestra de ensayo con un perfil de hibridación generado a partir de una muestra de control. Una alteración en la señal de al menos un miARN en la muestra de ensayo en relación con la muestra de control es indicativa de que el sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar cáncer y/o un trastorno mieloproliferativo. La señal de al menos un miARN puede estar regulado positivamente, en relación con la señal generada a partir de la muestra de control. La señal de al menos un miARN puede estar regulada negativamente, en relación con la señal generada a partir de la muestra de control. La micromatriz puede comprender oligonucleótidos sonda específicos de miARN para una parte sustancial de todos los miARN humanos conocidos (por ejemplo, los miARN enumerados en las

65

Tablas 1a y 1b más otros miARN conocidos o descubiertos). La micromatriz comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN para uno o más miARN seleccionados del grupo que consiste en miR-101, miR-126, miR-99a, miR-99-prec, miR-106, miR-339, miR-99b, miR-149, miR-33, miR-135, miR-20 y una combinación de los mismos. La micromatriz puede comprender oligonucleótidos sonda específicos de miARN para uno o más miARN seleccionados del grupo que consiste en miR-101, miR-126, miR-106, miR-20, miR-135 y una combinación de los mismos.

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

La micromatriz también puede fabricarse usando técnicas conocidas en este campo. Por ejemplo, los oligonucleótidos sonda de una longitud apropiada, por ejemplo, 40 nucleótidos, se modifican con amina 5' en la posición C6 y se imprimen usando sistemas de micromatriz disponibles en el mercado, por ejemplo, el dispositivo de Micromatrices GeneMachine OmniGrid™ 100 y portaobjetos activados Amersham CodeLink™. Se prepara oligómero de ADNc marcado correspondiente a los ARN diana por transcripción inversa del ARN diana con cebador marcado. Después de la síntesis de primera cadena, los híbridos de ARN/ADN se desnaturalizan para degradar los moldes de ARN. Los ADNc diana marcados preparados de este modo se hibridan después con la microplaca de micromatriz en condiciones de hibridación, por ejemplo, SSPE 6X/formamida 30 % a 25 °C durante 18 horas, seguido de lavado en TNT 0,75X a 37 °C durante 40 minutos. En posiciones en la matriz en las que el ADN sonda inmovilizado reconoce un ADNc diana complementario en la muestra, se produce hibridación. El ADNc diana marcado marca la posición exacta en la matriz en la que se produce unión, permitiendo detección y cuantificación automáticas. El resultado consiste en una lista de acontecimientos de hibridación, que indica la abundancia relativa de secuencias de ADNc específicas, y por lo tanto la abundancia relativa de los miR complementarios correspondientes, en la muestra del paciente. El oligómero de ADNc marcado es un ADNc marcado con biotina, preparado a partir de un cebador marcado con biotina. La micromatriz se procesa después por detección directa de los transcritos que contienen biotina usando, por ejemplo, conjugado de Estreptavidina-Alexa647, y se explora utilizando métodos de exploración convencionales. Las intensidades de imagen de cada punto en la matriz son proporcionales a la abundancia del miR correspondiente en la muestra del paciente.

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

Además del uso para ensayos de nivel de expresión cuantitativa de miR específicos, puede emplearse una microplaca que contiene oligonucleótidos sonda específicos de miARN correspondientes a una parte sustancial del miRNoma, preferentemente el miRNoma completo, para llevar a cabo realización de perfiles de expresión génica de miR, para análisis de patrones de expresión de miR. Las huellas de miR distintas pueden asociarse con marcadores de enfermedad establecidos, o directamente con una patología.

De acuerdo con los métodos de realización de perfiles de expresión descritos en el presente documento, el ARN total de una muestra de un sujeto que se sospecha que tiene un cáncer y/o un trastorno mieloproliferativo se transcribe de forma inversa cuantitativamente para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana marcados complementarios del ARN en la muestra. Los oligodesoxinucleótidos diana se hibridan después con una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra. El resultado es un perfil de hibridación para la muestra que representa el patrón de expresión de miARN en la muestra. El perfil de hibridación comprende la señal de la unión de los oligodesoxinucleótidos diana de la muestra con los oligonucleótidos sonda específicos de miARN en la micromatriz. El perfil puede registrarse como la presencia o ausencia de unión (señal frente a señal cero). Más preferentemente, el perfil registrado incluye la intensidad de la señal de cada hibridación. El perfil se compara con el perfil de hibridación generado a partir de una muestra de control normal (por ejemplo, trastorno no canceroso, no mieloproliferativo) o muestra de referencia. Una alteración en la señal es indicativa de la presencia de, o propensión a desarrollar, cáncer en el sujeto.

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

También se desvelan en el presente documento métodos para diagnosticar si un sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, un cáncer y/o un trastorno mieloproliferativo con un pronóstico adverso. En este método, el nivel de al menos un producto génico de miR, que se asocia con un pronóstico adverso en un cáncer y/o trastorno mieloproliferativo, se mide por transcripción inversa de ARN de una muestra de ensayo obtenida del sujeto para proporcionar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana. Los oligodesoxinucleótidos diana se hibridan después con uno o más oligonucleótidos sonda específicos de miARN (por ejemplo, una micromatriz que comprende oligonucleótidos sonda específicos de miARN) para proporcionar un perfil de hibridación para la muestra de ensayo, y el perfil de hibridación de la muestra de ensayo se compara con un perfil de hibridación generado a partir de una muestra de control. Una alteración en la señal de al menos un miARN en la muestra de ensayo en relación con la muestra de control es indicativa de que el sujeto tiene, o está en riesgo de desarrollar, un cáncer y/o trastorno mieloproliferativo con un pronóstico adverso. Los miR adecuados para su uso en este método incluyen, por ejemplo, los que están regulados positivamente en células cancerosas (por ejemplo, células LMA).

En los métodos de diagnóstico, pronóstico y terapéuticos desvelados en el presente documento, así como las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento, el producto génico de miR no es uno o más de let7a-2, let7c, let7g, let7i, 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.

Como se describe en el presente documento, el nivel de un producto génico de miR en una muestra puede medirse usando cualquier técnica que sea adecuada para detectar los niveles de expresión de ARN en una muestra biológica. Se conocen bien por los expertos en la materia 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). El nivel de al menos un producto génico de miR puede detectarse usando análisis de transferencia de Northern. Por ejemplo, el ARN celular total puede purificarse a partir de células por homogeneización en presencia de tampón de extracción de ácidos nucleicos, seguido de centrifugación. Se precipitan ácidos nucleicos, y se retira ADN por tratamiento con Dnasa y precipitación. Las moléculas de ARN se separan después por electroforesis en gel en geles de agarosa de acuerdo con técnicas convencionales, y se transfieren a filtros de nitrocelulosa. El ARN se inmoviliza después en los filtros calentando. Se consigue detección y cuantificación de ARN específico usando sondas de ADN o ARN marcadas de forma apropiada complementarias del ARN en cuestión. Véase, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook et al., eds., 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Capítulo 7.

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

Por ejemplo, la sonda de ácido nucleico puede marcarse, por ejemplo, con un radionúclido, tal como ^3H , ^{32}P , ^{33}P , ^{14}C o ^{35}S ; un metal pesado; un ligando capaz de actuar como un miembro de 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 pueden marcarse para alta actividad específica por el método de traslación de muesca de Rigby *et al.* (1977), J. Mol. Biol. 113: 237-251 o por el método de cebadores aleatorios de Fienberg *et al.* (1983), Anal. Biochem. 132: 6-13. Este último es el método elegido para sintetizar sondas marcas con ^{32}P de alta actividad específica a partir de ADN monocatenario o de moldes de ARN. Por ejemplo, reemplazando nucleótidos preexistentes con nucleótidos altamente radiactivos de acuerdo con el método de traslación de muesca, es posible preparar sondas de ácido nucleico marcadas con ^{32}P con una actividad específica bastante superior a 10^8 cpm/microgramo. Después puede realizarse detección autorradiográfica de hibridación exponiendo filtros hibridados a película fotográfica. La exploración densitométrica de las películas fotográficas expuestas por los filtros hibridados proporciona una medición precisa de los niveles de transcrito génico de miR. Usando otro enfoque, los niveles de transcrito génico de miR pueden cuantificarse por sistemas de formación de imágenes computarizados, tales como el Molecular Dynamics 400-B 2D Phosphorimager disponible de Amersham Biosciences, Piscataway, NJ.

Cuando el marcaje con radionúclidos de sondas de ADN o ARN no es práctico, puede usarse el método de cebadores aleatorios para incorporar un análogo, por ejemplo, el análogo de dTTP 5-(N-(N-biotinil-épsilon-

aminocaproil)-3-aminoalil)desoxiuridina trifosfato, en la molécula sonda. El oligonucleótido sonda biotinilado puede detectarse mediante reacción con proteínas de unión a biotina, tales como avidina, estreptavidina y anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos anti biotina) acoplados con colorantes fluorescentes o enzimas que produzcan reacciones de color.

5 Además de Northern y otras técnicas de hibridación de ARN, la determinación de los niveles de transcritos de ARN puede conseguirse usando la técnica de hibridación *in situ*. Esta técnica requiere menos células que la técnica de transferencia de Northern e implica depositar células completas en un cubreobjetos de microscopio y explorar el contenido de ácido nucleico de la célula con una solución que contenga sondas de ácido nucleico radiactivas o
10 marcadas de otro modo (por ejemplo, ADNc o ARN). Esta técnica es particularmente adecuada para analizar muestras de biopsia tisular de los sujetos. La práctica de la técnica de hibridación *in situ* se describe en más detalle en la Patente de Estados Unidos N° 5.427.916. Pueden producirse sondas adecuadas para hibridación *in situ* de un producto génico de miR dado a partir de las secuencias de ácido nucleico proporcionadas en la Tabla 1a y Tabla 1b, e incluyen, pero sin limitación, sondas que tienen al menos aproximadamente 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de complementariedad con un producto génico de miR de interés, así como sondas que tienen complementariedad completa con un producto génico de miR de interés, como se ha descrito anteriormente.

El número relativo de transcritos génicos de miR en células también puede determinarse por transcripción inversa de transcritos génicos de miR, seguido de amplificación de los transcritos por transcripción inversa por reacción en
20 cadena la polimerasa (RT-PCR), por ejemplo, como se ejemplifica en el presente documento. Los niveles de transcritos génicos de miR pueden cuantificarse en comparación con un patrón interno, por ejemplo, el nivel de ARNm de un gen "constitutivo" presente en la misma muestra. Un gen "constitutivo" adecuado para su uso como un patrón interno incluye, por ejemplo, ARN nuclear pequeño U6, miosina o gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH). Se conocen bien por los expertos en la materia métodos para realizar RT-PCR cuantitativa y
25 semicuantitativa, y variaciones de la misma.

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

Para superar estas limitaciones, puede construirse una oligobiblioteca, en formato de microplaca (es decir, una
35 micromatriz) que contenga un conjunto de sondas oligonucleotídicas (por ejemplo, oligodesoxinucleótido) que sean específicas para un conjunto de genes de miR. Usando dicha micromatriz, puede determinarse el nivel de expresión de múltiples microARN en una muestra biológica por transcripción inversa de los ARN para generar un conjunto de oligodesoxinucleótidos diana, e hibridarlos para explorar los oligonucleótidos en la micromatriz para generar un perfil de hibridación, o expresión. El perfil de hibridación de la muestra de ensayo puede compararse después con el de
40 una muestra de control para determinar qué microARN tienen un nivel de expresión alterado en células cancerosas y/o células que muestran un trastorno mieloproliferativo. Como se usa en el presente documento, "oligonucleótido sonda" u "oligodesoxinucleótido sonda" se refiere a un oligonucleótido que es capaz de hibridar con un oligonucleótido diana. "Oligonucleótido diana" u "oligodesoxinucleótido diana" se refiere a una molécula para detectar (por ejemplo, mediante hibridación). Por "oligonucleótido sonda específico de miR" u "oligonucleótido sonda específico para un miR" se entiende un oligonucleótido sonda que tiene una secuencia seleccionada para hibridar
45 con un producto génico de miR específico, o con un transcrito inverso del producto génico de miR específico.

Un "perfil de expresión" o "perfil de hibridación" de una muestra particular es esencialmente una identificación del estado de la muestra; aunque dos estados pueden tener cualquier gen particular expresado de forma similar, la
50 evaluación de varios genes simultáneamente permite la generación de un perfil de expresión génica que es único del estado de la célula. Es decir, pueden distinguirse muestras tisulares, celulares o de fluidos normales de muestras tisulares, celulares o de fluidos que muestran trastorno canceroso y/o mieloproliferativo correspondientes. Dentro de las muestras tisulares, celulares o de fluidos que muestran trastorno mieloproliferativo y/o canceroso, pueden determinarse diferentes estados de pronóstico (por ejemplo, perspectivas de supervivencia a largo plazo buenas o
55 malas). Comparando perfiles de expresión de muestras tisulares, celulares o de fluidos que muestran trastorno canceroso y/o mieloproliferativo en diferentes estados, se obtiene información con respecto a qué genes son importantes (incluyendo tanto regulación positiva como regulación negativa de los genes) en cada uno de estos estados. La identificación de secuencias que se expresan diferencialmente en muestras tisulares, celulares o de fluidos que muestran trastorno canceroso y/o mieloproliferativo, así como la expresión diferencial que da como
60 resultado diferentes resultados de pronóstico, permite el uso de esta información de varias maneras. Por ejemplo, puede evaluarse un régimen de tratamiento particular (por ejemplo, para determinar si un fármaco quimioterapéutico actúa para mejorar el pronóstico a largo plazo en un sujeto particular). De forma similar, el diagnóstico puede realizarse o confirmarse comparando muestras de un sujeto con perfiles de expresión conocidos. Además, estos perfiles de expresión génica (o genes individuales) permiten la exploración de candidatos farmacológicos que
65 suprimen el perfil de expresión del trastorno mieloproliferativo y/o cáncer o convierten un perfil de pronóstico bueno en un perfil de pronóstico mejor.

Sin desear quedar ligado a ninguna teoría, se cree que las alteraciones en el nivel de uno o más productos génicos de miR en células pueden dar como resultado la desregulación de una o más dianas pretendidas para estos miR, lo que puede conducir a diferenciación megacariocítica aberrante y/o la formación de cáncer, un trastorno mieloproliferativo y/o un trastorno plaquetario. Por lo tanto, la alteración del nivel del producto génico de miR (por ejemplo, reduciendo el nivel de un miR que está regulado positivamente en células que muestran trastorno canceroso y/o mieloproliferativo, aumentando el nivel de un miR que está regulado negativamente en células que muestran trastorno canceroso y/o mieloproliferativo) puede tratar exitosamente el cáncer, trastorno mieloproliferativo y/o trastorno plaquetario.

En consecuencia, la presente divulgación abarca métodos para tratar un cáncer y/o trastorno mieloproliferativo en un sujeto, en el que al menos un producto génico de miR está desregulado (por ejemplo, regulado negativamente, regulado positivamente) en las células (por ejemplo, células cancerosas y/o células que muestran trastorno mieloproliferativo) del sujeto. El nivel de al menos un producto génico de miR en una muestra de ensayo (por ejemplo, una muestra que comprende tejidos, células o fluido que muestran trastorno mieloproliferativo y/o canceroso) puede ser mayor que el nivel del producto génico de miR correspondiente en una muestra de control o referencia. El nivel de al menos un producto génico de miR en una muestra de ensayo (por ejemplo, una muestra que comprende tejidos, células o fluido que muestra trastorno canceroso y/o mieloproliferativo) puede ser menor que el nivel del producto génico de miR correspondiente en una muestra de control. Cuando el al menos un producto génico de miR aislado está regulado negativamente en la muestra de ensayo (por ejemplo, una muestra que comprende tejidos, células o fluido que muestra trastorno canceroso y/o mieloproliferativo), el método comprende administrar una cantidad eficaz del al menos un producto génico de miR aislado, o una variante aislada o fragmento biológicamente activo del mismo, de modo que se inhibe la proliferación de las células que muestran trastorno canceroso y/o mieloproliferativo en el sujeto. Por ejemplo, cuando un producto génico de miR está regulado negativamente en una célula cancerosa en un sujeto, la administración de una cantidad eficaz de un producto génico de miR aislado al sujeto puede inhibir la proliferación de la célula cancerosa. El producto génico de miR aislado que se administra al sujeto puede ser idéntico a un producto génico de miR de tipo silvestre endógeno (por ejemplo, un producto génico de miR mostrado en la Tabla 1a o Tabla 1b) que está regulado negativamente en la célula cancerosa o puede ser una variante o fragmento biológicamente activo del mismo. Como se define en el presente documento, una “variante” de un producto génico de miR se refiere a un miARN que tiene menos del 100 % de identidad con un producto génico de miR de tipo silvestre correspondiente y posee una o más actividades biológicas del producto génico de miR de tipo silvestre correspondiente. Los ejemplos de dichas actividades biológicas incluyen, pero sin limitación, 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) e inhibición de un proceso celular asociado con cáncer y/o un trastorno mieloproliferativo (por ejemplo, diferenciación celular, crecimiento celular, muerte celular). Estas variantes incluyen variantes de especie y variantes que son la consecuencia de una o más mutaciones (por ejemplo, una sustitución, una delección, una inserción) en un gen de miR. La variante puede ser al menos aproximadamente 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % idéntica a un producto génico de miR de tipo silvestre correspondiente.

Como se define en el presente documento, un “fragmento biológicamente activo” de un producto génico de miR se refiere a un fragmento de ARN de un producto génico de miR que posee una o más actividades biológicas de un producto génico de miR de tipo silvestre correspondiente. Como se ha descrito anteriormente, los ejemplos de dichas actividades biológicas incluyen, pero sin limitación, inhibición de la expresión de una molécula de ARN diana e inhibición de un proceso celular asociado con cáncer y/o un trastorno mieloproliferativo. El fragmento biológicamente activo puede ser de al menos aproximadamente 5, 7, 10, 12, 15 o 17 nucleótidos de longitud. Puede administrarse un producto génico de miR aislado a un sujeto en combinación con uno o más tratamientos antineoplásicos adicionales. Los tratamientos antineoplásicos adecuados incluyen, pero sin limitación, quimioterapia, radioterapia y combinaciones de los mismos (por ejemplo, quimiorradiación).

Cuando el al menos un producto génico de miR aislado está regulado positivamente en las células cancerosas, el método comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de un compuesto que inhibe la expresión del al menos un producto génico de miR, de modo que se inhibe la proliferación de las células que muestran trastorno mieloproliferativo y/o cáncer. Dichos compuestos se denominan en el presente documento compuestos de inhibición de la expresión génica de miR. Los ejemplos de compuestos de inhibición de la expresión génica de miR adecuados incluyen, pero sin limitación, los descritos en el presente documento (por ejemplo, ARN bicatenario, ácidos nucleicos antisentido y moléculas de ARN enzimáticas). Puede administrarse un compuesto que inhibe la expresión génica de miR a un sujeto en combinación con uno o más tratamientos antineoplásicos adicionales. Los tratamientos antineoplásicos adecuados incluyen, pero sin limitación, quimioterapia, radioterapia y combinaciones de los mismos (por ejemplo, quimiorradiación).

Como se describe, cuando el al menos un producto génico de miR aislado está regulado positivamente en células cancerosas (por ejemplo, células de LMA), el método puede comprender administrar al sujeto una cantidad eficaz de al menos un compuesto para inhibir la expresión del al menos un producto génico de miR, de modo que se inhiba la proliferación de las células cancerosas. El compuesto para inhibir la expresión del al menos un producto génico de miR puede inhibir un producto génico de miR seleccionado del grupo que consiste en miR-101, miR-126, miR-99a, miR-99-prec, miR-106, miR-339, miR-99b, miR-149, miR-33, miR-135, miR-20 y una combinación de los mismos.

Como alternativa, el compuesto para inhibir la expresión del al menos un producto génico de miR inhibe un producto génico de miR seleccionado del grupo que consiste en miR-101, miR-126, miR-106, miR-20, miR-135 y una combinación de los mismos. En otra alternativa, el compuesto para inhibir la expresión del al menos un producto génico de miR inhibe un producto génico de miR seleccionado del grupo que consiste en miR-106, miR-20, miR-135 y una combinación de los mismos.

Como se describe y ejemplifica en el presente documento, el factor de transcripción MAFB, que está regulado positivamente en diferenciación megacariocítica, es una diana de miR-130a. Además, se demostró una relación inversa en la expresión de miR-130a y su diana respectiva. Por lo tanto, la expresión de pre-miR-130a dio como resultado expresión reducida de *MAFB* (véase, por ejemplo, FIGURA 2C). Se sabe que MAFB está desregulado en cáncer (por ejemplo, mieloma múltiple y leucemia mieloide aguda). Por ejemplo, se ha observado expresión ectópica de MAFB en células de mieloma humano que portaban translocaciones cromosómicas (14;20)(q32;q11) (Hanamura, I., *et al.* (2001) *Jpn. J. Cancer Res.* 92(6): 638-644 (2001)). En consecuencia, un método para tratar un cáncer y/o trastorno mieloproliferativo en un sujeto puede comprender administrar una cantidad eficaz de al menos un producto génico de miR o una variante aislada o fragmento biológicamente activo del mismo al sujeto, en el que:

el cáncer y/o trastorno mieloproliferativo está asociado con la sobreexpresión de un producto génico de MAFB; y

el al menos un producto génico de miR se une con, y reduce la expresión de, el producto génico de MAFB.

El al menos un producto génico de miR o variante aislada o fragmento biológicamente activo del mismo puede comprender una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una secuencia de nucleótidos en el producto génico de MAFB (por ejemplo, complementario del 3' UTR de MAFB). El al menos un producto génico de miR puede ser miR-130a o una variantes aislada o fragmento biológicamente activo del mismo.

También como se describe y se ejemplifica en el presente documento, el ARNm de HOXA1, uno de los miembros de la familia HOX de proteínas, está regulado positivamente 7 veces en diferenciación megacariocítica (véase, por ejemplo, Ejemplo 4). Además, HOXA1 es una diana de miR-10a y su expresión está relacionada de forma inversa con la expresión de miR-10a. Por lo tanto, la expresión de pre-miR-10a dio como resultado la expresión reducida de HOXA1 (véase, por ejemplo, FIGURAS 3C, 3F y 3G). HOXA1. Se ha demostrado que la expresión de HOXA1 es suficiente para dar como resultado la transformación oncogénica de células epiteliales mamarias humanas inmortalizadas con formación de tumor agresivo *in vivo* (Zhang, X., *et al.*, (2002) *J. Biol. Chem.* 278(9): 7580-7590). Además, la expresión forzada de HOXA1 en células de carcinoma mamario, de una manera dependiente de Bcl-2, dio como resultado una potenciación drástica de la proliferación independiente de anclaje y la formación de colonias en agar blando. Misma referencia. En consecuencia, un método para tratar un cáncer y/o trastorno mieloproliferativo en un sujeto puede comprender administrar una cantidad eficaz de al menos un producto génico de miR o una variante aislada o fragmento biológicamente activo del mismo al sujeto, en el que:

el cáncer y/o trastorno mieloproliferativo está asociado con la sobreexpresión de un producto génico de HOXA1; y

el al menos un producto génico de miR se une con, y reduce la expresión de, el producto génico de HOXA1.

El al menos un producto génico de miR o variante aislada o fragmento biológicamente activo del mismo puede comprender una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una secuencia de nucleótidos en el producto génico de HOXA1 (por ejemplo, complementario del 3' UTR de HOXA1). El al menos un producto génico de miR es miR-10a o una variante aislada o fragmento biológicamente activo del mismo.

Los métodos para tratar cáncer y/o un trastorno mieloproliferativo en un sujeto pueden comprender adicionalmente la etapa de determinar en primer lugar la cantidad de al menos un producto génico de miR en una muestra del sujeto, y comparar ese nivel del producto génico de miR con el nivel de un producto génico de miR correspondiente en un control. Si la expresión del producto génico de miR está desregulada (por ejemplo, regulada negativamente, regulada positivamente), en la muestra del sujeto, los métodos comprenden además alterar la cantidad del al menos un producto génico de miR expresado en la muestra del sujeto. La cantidad del producto génico de miR expresado en la muestra del sujeto puede ser menor que la cantidad de producto génico de miR expresado en el control, y se administra al sujeto una cantidad eficaz del producto génico de miR, o una variante aislada o fragmento biológicamente activo del mismo. Como alternativa, la cantidad del producto génico de miR expresado en la muestra del sujeto puede ser mayor que la cantidad del producto génico de miR expresado en el control, y se administra al sujeto una cantidad eficaz de al menos un compuesto para inhibir la expresión del al menos un gen miR. Los miR adecuados y compuestos que inhiben la expresión de genes miR incluyen, por ejemplo, los descritos en el presente documento.

Los términos "tratar", "tratando" y "tratamiento", como se usan en el presente documento, se refieren a aliviar síntomas asociados con una enfermedad o afección, por ejemplo, cáncer y/o un trastorno mieloproliferativo, incluyendo prevenir o retardar la aparición de los síntomas de la enfermedad y/o reducir la gravedad o frecuencia de los síntomas de la enfermedad o afección. Se define en el presente documento que los términos "sujeto", "paciente" e "individuo" incluyen animales, tales como mamíferos, incluyendo, pero sin limitación, primates, vacas, ovejas,

cabras, caballos, perros, gatos, conejos, cobayas, ratas, ratones u otras especies bovinas, ovinas, equinas, caninas, felinas, roedoras o murinas. Preferentemente, el animal es un ser humano.

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

Por ejemplo, una cantidad eficaz de un producto génico de miR aislado puede basarse en el peso aproximado de una masa tumoral para tratar. El peso aproximado de una masa tumoral puede determinarse calculando el volumen aproximado de la masa, en el que un centímetro cúbico de volumen es aproximadamente equivalente a un gramo. Una cantidad eficaz del producto génico de miR aislado basado en el peso de una masa tumoral puede estar en el intervalo de aproximadamente 10-500 microgramos/gramo de masa tumoral. La masa tumoral puede ser al menos aproximadamente 10 microgramos/gramo de masa tumoral, al menos aproximadamente 60 microgramos/gramo de masa tumoral o al menos aproximadamente 100 microgramos/gramo de masa tumoral.

Una cantidad eficaz de un producto génico de miR aislado también puede basarse en el peso corporal aproximado o estimado de un sujeto para tratar. Preferentemente, dichas cantidades eficaces se administran por vía parenteral o entérica, como se describe en el presente documento. Por ejemplo, una cantidad eficaz del producto génico de 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 más de aproximadamente 1000 microgramos/kg de peso corporal.

Un experto en la materia también puede determinar fácilmente un régimen de dosificación apropiado para la administración de un producto génico de miR aislado a un sujeto dado. Por ejemplo, puede administrarse un producto génico de miR al sujeto una vez (por ejemplo, como una única inyección o deposición). Como alternativa, puede administrarse un producto génico de miR 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, se administra un producto génico de miR una vez al día durante siete días. Cuando un régimen de dosificación comprende múltiples administraciones, se entiende que la cantidad eficaz del producto génico de miR administrado al sujeto puede comprender la cantidad total del producto génico administrado durante el régimen de dosificación completo.

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

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

Como alternativa, los productos génicos de miR pueden expresarse a partir de plásmidos de ADN circular o lineal recombinantes usando cualquier promotor adecuado. Los promotores adecuados para expresar ARN a partir de un plásmido incluyen, por ejemplo, las secuencias promotoras de ARN pol III U6 o I-11, o los promotores de citomegalovirus. La selección de otros promotores adecuados está dentro de la experiencia de la técnica. Los plásmidos recombinantes de la invención también pueden comprender promotores inducibles o regulables para expresión de los productos génicos de miR en células (por ejemplo, células cancerosas, células que muestran un trastorno mieloproliferativo).

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

células cancerosas, células que muestran un trastorno mieloproliferativo). El uso de plásmidos recombinantes para suministrar los productos génicos de miR a células (por ejemplo, células cancerosas, células que muestran un trastorno mieloproliferativo) se analiza en más detalles posteriormente.

- 5 Los productos génicos de miR pueden expresarse a partir de un plásmido recombinante separado, o pueden expresarse a partir del mismo plásmido recombinante. Los productos génicos de miR pueden expresarse como moléculas precursoras de ARN a partir de un único plásmido, y las moléculas precursoras se procesan en el producto génico de miR funcional por un sistema de procesamiento adecuado, incluyendo, pero sin limitación, sistemas de procesamiento existentes dentro de una célula cancerosa. Otros sistemas de procesamiento adecuados incluyen, por ejemplo, el sistema de lisado celular de *Drosophila in vitro* (por ejemplo, como se describe en la Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos N° 2002/0086356 de Tuschl *et al.*,) y el sistema de RNasa III de *E. coli* (por ejemplo, como se describe en la Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos N° 2004/0014113 de Yang *et al.*,).
- 10
- 15 La selección de plásmidos adecuados para expresar los productos génicos de miR, métodos para insertar secuencias de ácido nucleico en el plásmido para expresar los productos génicos y métodos para suministrar el plásmido recombinante a las células de interés están dentro de la experiencia de la técnica. Véase, por ejemplo, Zeng *et al.* (2002), Molecular Cell 9: 1327-1333; Tuschl (2002), Nat. Biotechnol. 20: 446-448; Brummelkamp *et al.* (2002), Science 296: 550-553; Miyagishi *et al.* (2002), Nat. Biotechnol. 20: 497-500; Paddison *et al.* (2002), Genes Dev. 16: 948-958; Lee *et al.* (2002), Nat. Biotechnol. 20: 500-505; y Paul *et al.* (2002), Nat. Biotechnol. 20: 505-508.
- 20

Un plásmido que expresa los productos génicos de miR puede comprender una secuencia que codifica ARN precursor de miR bajo el control del promotor intermedio-temprano de CMV. Como se usan en el presente documento, "bajo el control" de un promotor significa que las secuencias de ácido nucleico que codifican el producto génico de miR se localizan 3' del promotor, de modo que el promotor puede iniciar la transcripción de las secuencias codificantes del producto génico de miR.

25

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

30

35

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

40

Puede usarse cualquier vector viral capaz de aceptar las secuencias codificantes para los productos génicos de miR, por ejemplo, vectores derivados de adenovirus (AV); virus adenoasociados (AAV); retrovirus (por ejemplo, lentivirus (LV), Rabdovirus, virus de leucemia murina); virus del herpes y similares. El tropismo de los vectores virales puede modificarse por seudotipación de los vectores con proteínas de la envoltura u otros antígenos superficiales de otros virus, o sustituyendo diferentes proteínas de la cápsida viral, según sea apropiado.

45

Por ejemplo, los vectores lentivirales puede seudotiparse con proteínas de superficie del virus de la estomatitis vesicular (VSV), rabia, Ébola, Mokola y similares. Pueden prepararse vectores de AAV para dirigirse a células diferentes modificando por ingeniería genética los vectores para expresar diferentes serotipos de proteínas de la cápsida. Por ejemplo, un vector de AAV que exprese una cápsida de serotipo 2 en un genoma de serotipo 2 se denomina AAV 2/2. Este gen de cápsida de serotipo 2 en el vector de AAV 2/2 puede reemplazarse por un gen de cápsida de serotipo 5 para producir un vector de AAV 2/5. Están dentro de la experiencia de este campo técnicas para construir vectores de AAV que expresan diferentes serotipos de proteínas de la cápsida; véase, por ejemplo, Rabinowitz, J. E., *et al.* (2002), J. Viral. 76: 791-801.

50

55

Están dentro de la experiencia de la técnica la selección de vectores virales recombinantes adecuados, métodos para insertar secuencias de ácido nucleico para expresar ARN en el vector, métodos para suministrar el vector viral a las células de interés y recuperación de los productos de ARN expresados. Véase, por ejemplo, Dornburg (1995), Gene Therapy 2: 301-310; Eglitis (1988), Biotechniques 6: 608-614; Miller (1990), Hum. Gene Therapy 1: 5-14; y Anderson (1998), Nature 392: 25-30.

60

Son vectores virales particularmente adecuados los derivados de AV y AAV. Se describen un vector de AV adecuado para expresar los productos génicos de miR, un método para construir el vector de AV recombinante y un método para suministrar el vector a células diana en Xia *et al.* (2002), Nat. Biotech. 20: 1006-1010. Se describen

65

vectores de AAV adecuados para expresar los productos génicos de miR, métodos para construir el vector de AAV recombinante, y métodos para suministrar los vectores a células diana en Samulski *et al.* (1987), J. Virol. 61: 3096-3101; Fisher *et al.* (1996), J. Virol., 70: 520-532; Samulski *et al.* (1989), J. Virol. 63: 3822-3826; Patente de Estados Unidos Nº 5.252.479; Patente de Estados Unidos Nº 5.139.941; Solicitud de Patente Internacional Nº WO 94/13788; y Solicitud de Patente Internacional Nº WO 93/24641. Los productos génicos de miR pueden expresarse a partir de un único vector de AAV recombinante que comprende el promotor temprano intermedio de CMV.

Un vector viral de AAV recombinante puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica un ARN precursor de miR en conexión operativa con una secuencia de terminación de poliT bajo el control de un promotor de ARN U6 humano. Como se usa en el presente documento, "en conexión operativa con una secuencia de terminación de poliT" significa que las secuencias de ácido nucleico que codifican las cadenas con sentido o antisentido están inmediatamente adyacentes a la señal de terminación de poliT en la dirección 5'. Durante la transcripción de las secuencias de miR del vector, las señales de terminación de poliT actúan para terminar la transcripción.

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

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

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

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

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

El ARNip útil en los presentes métodos comprende ARN bicatenario corto de aproximadamente 17 nucleótidos a aproximadamente 29 nucleótidos de longitud, preferentemente de aproximadamente 19 a aproximadamente 25 nucleótidos de longitud. El ARNip comprende una cadena de ARN con sentido y una cadena de ARN antisentido complementaria hibridadas entre sí mediante interacciones de formación de pares de bases de Watson-Crick convencionales (en lo sucesivo en el presente documento "con formación de pares de bases"). La cadena con sentido comprende una secuencia de ácido nucleico que es sustancialmente idéntica a una secuencia de ácido nucleico contenida dentro del producto génico de miR diana.

Como se usa en el presente documento, una secuencia de ácido nucleico en un ARNip que es "sustancialmente idéntica" a una secuencia diana contenida dentro del ARNm diana es una secuencia de ácido nucleico que es idéntica a la secuencia diana, o que difiere de la secuencia diana en uno o dos nucleótidos. Las cadenas con sentido y antisentido del ARNip pueden comprender dos moléculas de ARN monocatenarias, complementarias, o pueden comprender una única molécula en la que se forman pares de bases de dos partes complementarias y se unen covalentemente por un área de "horquilla" monocatenaria.

El ARNip también puede ser ARN alterado que difiere del ARN de origen natural por la adición, delección, sustitución y/o alteración de uno o más nucleótidos. Dichas alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleotídico, tal como al extremo o los extremos del ARNip o a uno o más nucleótidos internos del ARNip, o modificaciones que hacen al ARNip resistente a digestión por nucleasa, o la sustitución de uno o más nucleótidos en el ARNip con desoxirribonucleótidos.

Una o ambas cadenas del ARNip también pueden comprender un saliente 3'. Como se usa 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 bicatenaria. Por lo tanto, el ARNip puede comprender al menos un saliente 3' de 1 a aproximadamente 6 nucleótidos (que incluye ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos) de longitud, de 1 a aproximadamente 5 nucleótidos de longitud, de 1 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud, o de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 nucleótidos de longitud. El saliente 3' puede estar presente en ambas cadenas del ARNip, y es de 2 nucleótidos de longitud. Por ejemplo, cada cadena del ARNip puede comprender salientes 3' de ácido ditimidílico ("TT") o ácido diuridílico ("uu").

El ARNip puede producirse química o biológicamente, o puede expresarse a partir de un plásmido recombinante o vector viral, como se ha descrito anteriormente para los productos génicos de miR aislados. Se describen métodos ejemplares para producir y ensayar moléculas de ARNbc o ARNip en la Solicitud de Patente publicada de Estados Unidos N° 2002/0173478 de Gewirtz y la Solicitud de Patente Publicada de Estados Unidos N° 2004/0018176 de Reich *et al.*

La expresión de un gen de miR dado también puede inhibirse por un ácido nucleico antisentido. Como se usa en el presente documento, un "ácido nucleico antisentido" se refiere a una molécula de ácido nucleico que se une a ARN diana por medio de interacciones de ARN-ARN, ARN-ADN o ARN-ácido peptidonucleico, que altera la actividad del ARN diana. Los ácidos nucleicos antisentido adecuados para su uso en los presentes métodos son ácidos nucleicos monocatenarios (por ejemplo, ARN, ADN, quimeras ARN-ADN, ácidos peptidonucleicos (PNA)) que generalmente comprenden una secuencia de ácido nucleico complementaria de una secuencia de ácido nucleico contigua en un producto génico de miR. El ácido nucleico antisentido puede comprender una secuencia de ácido nucleico que es 50-100 % complementaria, 75-100 % complementaria o 95-100 % complementaria de una secuencia de ácido nucleico contigua en un producto génico de miR. Se proporcionan secuencias de ácido nucleico de productos génicos de miR humanos particulares en la Tabla 1a y Tabla 1b. Si desear quedar ligado a ninguna teoría, se cree que los ácidos nucleicos antisentido activan RNasa H u otra nucleasa celular que digiere el producto génico de miR/doble cadena de ácido nucleico antisentido.

Los ácidos nucleicos antisentido también pueden contener modificaciones de la cadena principal de ácido nucleico o de los restos de azúcares y bases (o sus equivalentes) para potenciar la especificidad de diana, resistencia a nucleasa, suministro u otras propiedades relacionadas con la eficacia de la molécula. Dichas modificaciones incluyen restos de colesterol, intercaladores bicatenarios, tales como acridina, o uno o más grupos resistentes a nucleasa.

Pueden producirse ácidos nucleicos antisentido de forma química o biológica, o pueden expresarse a partir de un plásmido recombinante o vector viral, como se ha descrito anteriormente para los productos génicos de miR aislados. Están dentro de la experiencia de la técnica métodos ejemplares para producir y ensayar; véase, por ejemplo, Stein y Cheng (1993), Science 261: 1004 y Patente de Estados Unidos N° 5.849.902 de Woolf *et al.*

La expresión de un gen de miR dado también puede inhibirse por un ácido nucleico enzimático. Como se usa en el presente documento, un "ácido nucleico enzimático" se refiere a un ácido nucleico que comprende una región de unión a sustrato que tiene complementariedad con una secuencia de ácido nucleico contigua de un producto génico de miR, y que es capaz de escindir específicamente el producto génico de miR. La región de unión a sustrato de ácido nucleico enzimático puede ser, por ejemplo, 50-100 % complementaria, 75-100 % complementaria o 95-100 % complementaria de una secuencia de ácido nucleico contigua en un producto génico de miR. Los ácidos nucleicos enzimáticos también pueden comprender modificaciones en los grupos básicos, azúcares y/o fosfato. Un ácido nucleico enzimático ejemplar para uso en los presentes métodos es una ribozima.

Los ácidos nucleicos enzimáticos pueden producirse de forma química o biológica, o pueden expresarse a partir de un plásmido recombinante o vector viral, como se ha descrito anteriormente para los productos génicos de miR aislados. Se describen métodos ejemplares para producir y ensayar moléculas de ARNbc o ARNip en Werner y Uhlenbeck (1995), Nucleic Acids Res. 23: 2092-96; Hammann *et al.* (1999), Antisense and Nucleic Acid Drug Dev. 9: 25-31; y Patente de Estados Unidos N° 4.987.071 de Cech *et al.*

La administración de al menos un producto génico de miR, o al menos un compuesto para inhibir la expresión de miR, inhibirá la proliferación de células (por ejemplo, células cancerosas, células que muestren un trastorno mieloproliferativo) en un sujeto que tiene un cáncer y/o un trastorno mieloproliferativo. Como se usa en el presente documento, "inhibir la proliferación de células cancerosas o células que muestran un trastorno mieloproliferativo" significa destruir las células, o detener permanente o temporalmente o ralentizar el crecimiento de las células. Puede inferirse inhibición de la proliferación celular si el número de dichas células en el sujeto permanece constante o se

reduce después de la administración de los productos génicos de miR o compuestos de inhibición de la expresión génica de miR. Una inhibición de la proliferación de células cancerosas o células que muestran un trastorno mieloproliferativo también puede inferirse si el número absoluto de dichas células aumenta, pero se reduce la tasa de crecimiento tumoral.

El número de células cancerosas en el cuerpo de un sujeto puede determinarse por medición directa, o por estimación a partir del tamaño de masas tumorales primarias o metastásicas. Por ejemplo, el número de células cancerosas en un sujeto puede medirse por métodos inmunohistológicos, citometría de flujo u otras técnicas diseñadas para detectar marcadores de superficie característicos de células cancerosas.

El tamaño de una masa tumoral puede determinarse por observación visual directa, o por métodos de formación de imágenes de diagnóstico, tales como rayos X, formación de imágenes por resonancia magnética, ultrasonidos y escintigrafía. Los métodos de formación de imágenes de diagnóstico usados para determinar el tamaño de la masa tumoral pueden emplearse 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 de la masa tisular o medición de la masa tisular con un instrumento de medición, tal como un calibrador.

Los productos génicos de miR o compuestos de inhibición de la expresión génica de miR pueden administrarse a un sujeto por cualquier medio adecuado para suministrar esos compuestos a células (por ejemplo, células cancerosas, células que muestran un trastorno mieloproliferativo) del sujeto. Por ejemplo, los productos génicos de miR o compuestos inhibidores de la expresión de miR pueden administrarse por métodos adecuados para transfectar células del sujeto con estos compuestos, o con ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican estos compuestos. Las células pueden transfectarse con un plásmido o vector viral que comprende secuencias que codifican al menos un producto génico de miR o compuesto inhibidor de la expresión génica de miR.

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

Por ejemplo, las células pueden transfectarse con un compuesto de transferencia liposómico, por ejemplo, DOTAP (metilsulfato de N-[1-(2,3-dioleoiloxi) propil]-N,N,N-trimetil-amonio, Boehringer-Mannheim) o un equivalente, tal como LIPOFECTIN. La cantidad de ácido nucleico usada no es crítica; pueden conseguirse resultados aceptables con 0,1100 microgramos de ácido nucleico/ 10^5 células. Por ejemplo, puede usarse una relación de aproximadamente 0,5 microgramos de vector plasmídico en 3 microgramos de DOTAP por cada 10^5 células.

También puede administrarse un producto génico de miR o compuesto inhibidor de la expresión génica de miR a un sujeto por cualquier vía de administración entérica o parenteral adecuada. Las vías de administración entéricas adecuadas para los presentes métodos incluyen, por ejemplo, suministro oral, rectal o intranasal. Las vías de administración parenteral adecuadas incluyen, por ejemplo, administración intravascular (por ejemplo, inyección de embolada intravenosa, infusión intravenosa, inyección de embolada intraarterial, infusión intraarterial e instilación por catéter en la vasculatura); inyección peri e intratisular (por ejemplo, inyección peritumoral e intratumoral, inyección intrarretinal o inyección subretinal); inyección o deposición subcutánea, incluyendo infusión subcutánea (tal como por bombas osmóticas); aplicación directa al tejido de interés, por ejemplo por un catéter u otro dispositivo de colocación (por ejemplo, un microgránulo retinal o un supositorio o un implante que comprenda un material poroso, no poroso o gelatinoso); e inhalación. Son vías de administración particularmente adecuadas inyección, infusión e inyección directa en el tumor.

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

Se analizan en el presente documento y/o se conocen bien en la técnica plásmidos recombinantes y vectores virales que comprenden secuencias que expresan productos génicos de miR o compuesto inhibidores de la expresión génica de miR, y técnicas para suministrar dichos plásmidos y vectores a células cancerosas.

Pueden usarse liposomas para suministrar un producto génico de miR o compuesto inhibidor de la expresión génica de miR (o ácidos nucleicos que comprenden secuencias que los codifican) a un sujeto. Los liposomas también pueden aumentar la semivida en sangre de los productos génicos o ácidos nucleicos. Pueden formarse liposomas adecuados a partir de lípidos formadores de vesículas convencionales, que generalmente incluyen fosfolípidos neutros o cargados negativamente y un esteroide, tal como colesterol. La selección de lípidos generalmente se guía por consideración de factores, tales como el tamaño del liposoma deseado y la semivida de los liposomas en el torrente sanguíneo. Se conocen diversos métodos para preparar liposomas, por ejemplo, como se describe en

Szoka *et al.* (1980), Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467; y las 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 métodos pueden comprender una molécula de ligando que dirige el liposoma a células cancerosas. Se prefieren ligandos que se unan a receptores prevalentes en células cancerosas, tales como anticuerpos monoclonales que se unan a antígenos de células tumorales.

Los liposomas para su uso en los presentes métodos también pueden modificarse para evitar la eliminación por el sistema de macrófagos mononucleares ("MMS") y sistema reticuloendotelial ("RES"). Dichos liposomas modificados tienen restos de inhibición de la opsonización en la superficie o incorporados en la estructura del liposoma. Un liposoma puede comprender tanto un resto de una inhibición de la opsonización como un ligando.

Los restos de inhibición de la opsonización para su uso en la preparación de los liposomas de la invención son normalmente polímeros hidrófilos grandes que están unidos a las membranas del liposoma. Como se usa en el presente documento, un resto inhibidor de la opsonización está "unido" a una membrana de liposoma cuando está fijado química o físicamente a la membrana, por ejemplo, por la intercalación de un anclaje soluble en lípidos en la membrana en sí misma, o por unión directa a grupos activos de lípidos de membrana. Estos polímeros hidrófilos inhibidores de la opsonización forman una capa superficial protectora que reduce 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 liposomas son preferentemente polímeros solubles en agua con un peso molecular medio en número de aproximadamente 500 a aproximadamente 40.000 daltons, y más preferentemente de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 20.000 dalton. Dichos polímeros incluyen 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 dendríméricas; ácidos poliacrílicos; polialcoholes, por ejemplo, polivinil alcohol y polixilitol a los que se unen químicamente grupos carboxílicos o amino, así como gangliósidos, tales como gangliósido GM1. También son adecuados copolímeros de PEG, metoxi PEG o metoxi PPG, o derivados de los mismos. Además, el polímero inhibidor de la opsonización puede ser un copolímero en bloque de PEG y un poliaminoácido, polisacárido, poliamidoamina, polietilenamina o polinucleótido. Los polímeros inhibidores de la opsonización también pueden ser polisacáridos naturales que contienen aminoácidos o ácidos carboxílicos, por ejemplo, ácido galacturónico, ácido glucurónico, ácido manurónico, ácido hialurónico, ácido pécico, ácido neuramínico, ácido algínico, carragenina; polisacáridos aminados u oligosacáridos (lineales o ramificados); o polisacáridos u oligosacáridos carboxilados, por ejemplo, que han reaccionado con derivados de ácidos carbónicos con enlace resultante 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 de PEG se denominan en ocasiones "liposomas PEGilados".

El resto inhibidor de la opsonización puede estar unido con la membrana del liposoma por cualquiera de numerosas técnicas bien conocidas. Por ejemplo, un éster de N-hidroxisuccinimida de PEG puede estar unido a un anclaje soluble en lípido de fosfatidiletanolamina, y después unido a una membrana. De forma similar, un polímero de dextrano puede derivatizarse con un anclaje soluble en lípido de estearilamina mediante aminación reductora usando Na(CN)BH₃ y una mezcla de disolvente, tal como tetrahidrofurano y agua en una relación 30:12 a 60 °C.

Los liposomas modificados con restos inhibidores de la opsonización permanecen en la circulación mucho más tiempo que los liposomas no modificados. Por esta razón, dichos liposomas se determinan en ocasiones liposomas "sigilosos". Se sabe que los liposomas sigilosos se acumulan en tejidos alimentados por microvasculatura porosa o "filtrante". Por lo tanto, el tejido caracterizado por dichos defectos de la microvasculatura, por ejemplo, tumores sólidos, acumulará eficazmente estos liposomas; véase Gabizon, *et al.* (1988), Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 18: 6949-53. Además, la captación reducida por el RES reduce la toxicidad de liposomas sigilosos evitando la acumulación significativa de los liposomas en el hígado y el bazo. Por lo tanto, los liposomas que se modifican con restos inhibidores de la opsonización están particularmente adaptados para suministrar los productos génicos de miR o compuestos inhibidores de la expresión génica de miR (o ácidos nucleicos que comprenden secuencias que los codifican) a células tumorales.

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

La composición farmacéutica puede comprender al menos un compuesto inhibidor de la expresión de miR y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El al menos un compuesto inhibidor de la expresión de miR puede ser específico de un producto génico de miR cuya expresión es mayor en células cancerosas que en células de control (es decir, está regulado positivamente). El compuesto inhibidor de la expresión de miR puede ser específico de uno o más productos génicos de miR seleccionados del grupo que consiste en miR-101, miR-126, miR-99a, miR-99b, miR-106, miR-339, miR-99b, miR-149, miR-33, miR-135 y miR-20. Como alternativa, el compuesto inhibidor de

la expresión de miR puede ser específico de uno o más productos génicos de miR seleccionados del grupo que consiste en miR-101, miR-126, miR-106, miR-20 y miR-135. En otra alternativa, el compuesto inhibidor de la expresión de miR puede ser específico de uno o más productos génicos de miR seleccionados del grupo que consiste en miR-106, miR-20 y miR-135.

5 Las composiciones farmacéuticas pueden comprender una cantidad eficaz de al menos un producto génico de miR, o una variante aislada o fragmento biológicamente activo del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El cáncer y/o trastorno mieloproliferativo puede asociarse con la sobreexpresión de un producto génico de MAFB. La composición farmacéutica puede comprender al menos un producto génico de miR que se une con, y reduce la expresión de, el producto génico de MAFB. El al menos un producto génico de miR puede comprender una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una secuencia de nucleótidos en el producto génico de MAFB. El al menos un producto génico de miR puede ser miR-130a o una variante aislada o fragmento biológicamente activo del mismo.

15 Las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento pueden usarse para tratar un cáncer y/o un trastorno mieloproliferativo, en el que el cáncer y/o trastorno mieloproliferativo se asocia con la sobreexpresión de un producto génico de HOXA1. La composición farmacéutica puede comprender al menos un producto génico de miR que se une con, y reduce la expresión de, el producto génico de HOXA1. El al menos un producto génico de miR puede comprender una secuencia de nucleótidos que es complementaria de una secuencia de nucleótidos en el producto génico de HOXA1. El al menos un producto génico de miR puede ser miR-10a o una variante aislada o fragmento biológicamente activo del mismo.

25 Las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento se caracterizan como al menos estériles y sin pirógenos. Como se usa en el presente documento, las "composiciones farmacéuticas" incluyen formulaciones para uso humano y veterinario. Están dentro de la experiencia de la técnica métodos para preparar las composiciones farmacéuticas, por ejemplo, como se describe en Remington's Pharmaceutical Science, 17ª ed., Mack Publishing Company, Easton, PA. (1985).

30 Las presentes composiciones farmacéuticas comprenden al menos un producto génico de miR o compuesto inhibidor de la expresión génica de miR (o al menos un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el producto génico de miR o compuesto inhibidor de la expresión génica de miR) (por ejemplo, 0,1 a 90 % en peso) o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, mezclado con un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender adicionalmente uno o más agentes antineoplásicos (por ejemplo, agentes quimioterapéuticos). Las formulaciones farmacéuticas también pueden comprender al menos un producto génico de miR o compuesto inhibidor de la expresión génica de miR (o al menos un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el producto génico de miR o compuesto inhibidor de la expresión génica de miR), que están encapsulados por liposomas y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender un gen o producto génico de miR que no es miR-15, miR-16, miR-143 y/o miR-145.

40 Son vehículos farmacéuticamente aceptables especialmente adecuados agua, agua tamponada, solución salina normal, solución salina 0,4 %, glicina 0,3 %, ácido hialurónico y similares.

45 Las composiciones farmacéuticas pueden comprender al menos un producto génico de miR o compuesto inhibidor de la expresión génica de miR (o al menos un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el producto génico de miR o compuesto inhibidor de la expresión génica de miR) que es resistente a degradación por nucleasas. Un experto en la materia puede sintetizar fácilmente ácidos nucleicos que son resistentes a nucleasa, por ejemplo, incorporando uno o más ribonucleótidos que están modificados en la posición 2' en el producto génico de miR. Los ribonucleótidos modificados en 2' adecuados incluyen los modificados en la posición 2' con fluoro, amino, alquilo, alcoxi y o-alilo.

50 Las composiciones farmacéuticas también pueden comprender excipientes y/o adyuvantes farmacéuticos convencionales. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen estabilizadores, antioxidantes, agentes de ajuste de la osmolalidad, tampones y agentes de ajuste del pH. Los adyuvantes adecuados incluyen, por ejemplo, tampones fisiológicamente biocompatibles (por ejemplo, clorhidrato de trometamina), adiciones de quelantes (tales como, por ejemplo, DTPA o DTPA-bisamida) o complejos quelantes de calcio (tales como, por ejemplo, DTPA, 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 pueden envasarse para su uso en forma líquida o pueden liofilizarse.

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

65 Por ejemplo, una composición farmacéutica sólida para administración oral puede comprender cualquiera de los vehículos y excipientes enumerados anteriormente y 10-95 %, preferentemente 25 %-75 % del al menos un producto génico de miR o compuesto inhibidor de la expresión génica de miR (o al menos un ácido nucleico que comprende

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

Las composiciones farmacéuticas pueden comprender además uno o más agentes antineoplásicos. Las composiciones pueden comprender al menos un producto génico de miR o compuesto inhibidor de la expresión génica de miR (o al menos un ácido nucleico que comprenda una secuencia que codifique el producto génico de miR o compuesto inhibidor de la expresión génica de miR) y al menos un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos que son adecuados para los métodos desvelados en el presente documento incluyen, pero sin limitación, agentes alquilantes de ADN, agentes antibióticos antitumorales, agentes antimetabólicos, agentes estabilizadores de tubulina, agentes desestabilizadores de tubulina, agentes antagonistas de hormonas, inhibidores de topoisomerasa, inhibidores de proteína quinasa, inhibidores de HMG-CoA, inhibidores de CDK, inhibidores de ciclina, inhibidores de caspasa, inhibidores de metaloproteinasas, ácidos nucleicos antisentido, ADN de triple hélice, aptámeros de ácidos nucleicos y agentes virales, bacterianos y exotóxicos modificados molecularmente. Los ejemplos de agentes adecuados para las composiciones desveladas en el presente documento incluyen, pero sin limitación, arabinósido de citidina, metotrexato, vincristina, etopósido (VP-16), doxorubicina (adriamicina), cisplatino (CDDP), dexametasona, arglabinina, ciclofosfamida, sarcolisina, metilnitrosourea, fluorouracilo, 5-fluorouracilo (5FU), vinblastina, camptotecina, actinomicina D, mitomicina C, peróxido de hidrógeno, oxaliplatino, irinotecán, topotecán, leucovorina, carmustina, estreptozocina, CPT-11, taxol, tamoxifeno, dacarbacina, rituximab, daunorrubicina, 1-β-D-arabinofuranosilcitosina, imatinib, fludarabina, docetaxel y FOLFOX4.

También se desvelan en el presente documento métodos para identificar un agente antineoplásico, que comprenden proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico de miR en la célula. El método puede comprender proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico de miR asociado con niveles de expresión aumentados en células cancerosas (por ejemplo, en células LMA). Una reducción del nivel del producto génico de miR que se asocia con aumento de los niveles de expresión en cáncer, en relación con un control adecuado (por ejemplo, el nivel del producto génico de miR en células de control), es indicativa de que el agente de ensayo es un agente antineoplásico. El al menos un producto génico de miR asociado con aumento de los niveles de expresión en células cancerosas puede seleccionarse del grupo que consiste en miR-101, miR-126, miR-99a, miR-99-prec, miR-106, miR-339, miR-99b, miR-149, miR-33, miR-135 y miR-20. Como alternativa, el al menos un producto génico de miR asociado con aumento de los niveles de expresión en células cancerosas puede seleccionarse del grupo que consiste en miR-101, miR-126, miR-106, miR-20 y miR-135. En otra alternativa, el al menos un producto génico de miR asociado con aumento de los niveles de expresión de células cancerosas puede seleccionarse del grupo que consiste en miR-106, miR-20 y miR-135. El producto génico de miR puede no ser 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 método puede comprender proporcionar un agente de ensayo a una célula y medir el nivel de al menos un producto génico de miR asociado con reducción de los niveles de expresión en células cancerosas. Un aumento del nivel del producto génico de miR en la célula, en relación con un control adecuado (por ejemplo, el nivel del producto génico de miR en una célula de control), es indicativa de que el agente de ensayo es un agente antineoplásico.

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

Ejemplificación

A no ser que se indique de otro modo, los siguientes materiales y métodos se usaron en los Ejemplos.

Materiales y métodos

Líneas celulares y células CD34⁺ humanas.

Las líneas celulares de crisis blástica de leucemia mieloide crónica (LMC) humanas K-562 y MEG-01 se obtuvieron del Cultivo Americano de Tejidos Tipo (ATCC, Manassas, VA) y se mantuvieron en RPMI 1640 (GIBCO, Carlsbad, CA) que contenía FBS 10 % y penicilina-gentamicina a 37 °C con CO₂ 5 %. Las células de leucemia megacarioblástica humana UT-7 y CMK, y la leucemia mieloide crónica (LMC) en LAMA de crisis blástica se obtuvieron de DSMZ (Braunschweig, Alemania). Todas las células se mantuvieron en medio RPMI 1640 con FBS 20 % y antibióticos, excepto UT-7 que es dependiente del factor y se cultivó en MEM- α con FBS 20 % y GM-CSF 5 ng/ml. Se obtuvieron células CD34⁺ de médula ósea humana congelada y reciente de Stemcell Technologies (Vancouver, B. C., Canadá). El análisis de FACS con respecto al antígeno CD34 reveló una pureza >98 %.

Cultivos de células CD34⁺ progenitoras humanas.

Se cultivaron células CD34⁺ de médula ósea humana en medio STEM (Stemcell Technologies), que incluye medio de Dulbecco modificado por Isocove complementado con transferrina humana, insulina, albúmina de suero bovino, lipoproteína de baja densidad humana y glutamina, en presencia de trombopoyetina recombinante humana (TPO) 100 ng/ml, durante los primeros 4 días, seguido de una combinación de TPO 100 ng/ml, IL3 y SCF (mezcla de citocina CC-200, Stemcell Technologies). La densidad celular inicial fue de 100.000 células/ml; tres veces a la semana, la densidad celular se ajustó a 100.000 células a 200.000 células/ml. Para aumentar la pureza de las células para análisis de micromatrices, se realizó separación de células el día 10 de cultivo. Las células se incubaron en hielo durante 45 minutos con CD34⁺ anti humano, CD41⁺ anti humano, CD61⁺ anti humano, y sus isotipos respectivos. Después de lavar dos veces con PBS FBS 3 %, las células se separaron usando una máquina de separación FACS Aria a granel en dos poblaciones separadas; células CD34⁺ CD61⁺ y CD34⁺ CD61⁺ para cultivo y extracción de ARN. La pureza de las poblaciones separadas fue mayor de 95 %.

Caracterización de megacariocitos.

Se realizaron preparaciones de Cytospin de progenitores CD34⁺ y se tiñeron con May-Grunwald Giemsa en puntos temporales diferentes durante la inducción de diferenciación megacariocítica. Para análisis de FACS, los anticuerpos primarios que se usaron fueron los siguientes: CD41A, CD61A, CD42B y CD34 con sus isotipos respectivos (BD Pharmingen, San Diego, CA). Se realizaron estudios citométricos como se ha descrito previamente (Tajima, S., *et al.* (1996) J. Exp. Med 184,1357-1364) usando un FACScalibur (BD Biosciences) y el software CELLQUEST (BD Biosciences).

Extracción de ARN, transferencia de Northern y experimentos de micromatrices de miARN.

Se realizaron procedimientos como se ha descrito en detalle en otra parte (Liu, C.G., *et al.* (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 9740-9744). Los datos sin tratar se normalizaron y analizaron en software GENESPRING 7.2 (zcomSilicon Genetics, Redwood City, CA). Los datos de expresión se centraron en la mediana usando tanto la opción de normalización de GENESPRING como la normalización de la mediana global del paquete BIOCONDUCTOR (www.bioconductor.org) con resultados similares. Se realizaron comparaciones estadísticas usando la herramienta GENESPRING ANOVA, análisis predictivo de micromatriz (PAM) y el software de análisis de significación de micromatriz (SAM) (www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/index.html).

PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR) y PCR en tiempo real.

Se procesó ARN total aislado con reactivo de Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA) después de tratamiento con DNase (Ambion, Austin, TX) directamente a ADNc por transcripción inversa usando Superscript II (Invitrogen). Se realizó PCR en tiempo real comparativa por triplicado. Se obtuvieron cebadores y sondas de Applied Biosystems (Foster City, CA) para los siguientes genes: HOXA1, HOXA3, HOXB4, HOXB5 y HOXD10. Se cuantificaron los niveles de expresión génica usando el sistema de detección de Secuencia ABI Prism 7900 (Applied Biosystems). Se realizó normalización usando el kit de cebadores de ARN 18S. Se calculó la expresión relativa usando el método de tomografía computarizada (CT). También se realizó RT-PCR usando los siguientes cebadores oligonucleotídicos:

MAFB FW; 5'-AACTTTGTCTTGGGGGACAC-3' (SEC ID N°: 499);

MAFB RW; 5'-GAGGGGAGGATCTGTTTTCC-3' (SEC ID N°: 500);

HOXA1 FW; 5'-CCAGGAGCTCAGGAAGAAGA GAT-3' (SEC ID N°: 501); y

HOXA1 RW; 5'-CCCTCTGAGGCATCTGATTGGGTTT-3' (SEC ID N°: 502).

Cuantificación en tiempo real de miARN por RT-PCR de tallo-lazo.

Se realizó PCR en tiempo real para pri-miARN 10a, miR15a, miR16-1, miR-130a, miR-20, miR-106, miR-17-5, miR-181b, miR-99a y miR-126 (Chen, C., *et al.* (2005) Nucl. Acids Res. 33, e179. Se usó 18S para normalización. Todos

los reactivos y cebadores se obtuvieron de Applied Biosystems.

Bioinformática

- 5 Se realizó predicción de diana de miARN de los miARN expresados diferencialmente usando software TARGETSCAN (www.genes.mit.edu/targetscan), MIRANDA (www.mskc.miranda.org), y PICTAR (www.pictar.bio.nyu.edu).

Transfección de células J con precursores de miARN.

- 10 Se obtuvieron precursores de miARN *miR-10a* y *miR-130a* de Ambion: se nucleoporaron cinco millones de células K562 usando Amaxa (Gaithersburg, MD) con 5 µg de oligonucleótidos precursores en un volumen total de 10 ml. La expresión de los oligonucleótidos se evaluó por transferencias de Northern y RT-PCR como se ha descrito.

- 15 *Experimentos indicadores de luciferasa.*

- Los segmentos 3' UTR que contenían los sitios diana para *miR-10a* y *miR-130a* de los genes *HOXA1* y *MAFB*, respectivamente, se amplificaron por PCR a partir de ADN genómico y se insertaron en el vector de control pGL3 (Promega, Madison, WI), usando el sitio XbaI inmediatamente cadena abajo del codón de parada de luciferasa. Se usaron los siguientes conjuntos de cebadores oligonucleotídicos para generar fragmentos específicos:

MAFB FW 5'-GCATCTAGAGCACCCAGAGGAGTGT-3' (SEC ID N°: 503);

MAFB RW 5'-GCATCTAGACAAGCACCATGCGGTTC-3' (SEC ID N°: 504);

- 25 HOXA1 FW 5'-TACTCTAGACCAGGAGCTCAGGAAGA-3' (SEC ID N°: 505); y

ROXA1 RW 5'-MCATTCTAGATGAGGCATCTGATTGGG-3' (SEC ID N°: 506).

- 30 Los inventores también generaron dos insertos con delecciones de 5 pb y 9 pb, respectivamente, desde el sitio de complementariedad perfecta usando el Kit de Mutagénesis dirigida QuikChange XL (Stratagene, La Jolla, CA). El inserto de tipo silvestre (WT) y mutante se confirmó por secuenciación.

- Se cotransfectó leucemia mieloide crónica humana (LMC) en la línea celular de crisis megacarioblástica (MEG-01) en placas de seis pocillos usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del fabricante con 0,4 µg del vector indicador de luciferasa de luciérnaga y 0,08 µg del vector de control que contenía luciferasa de *Renilla* pRL-TK (Promega). Para cada pocillo, se usaron los precursores premiR-130a y premiR-10a 10 nM (Ambion). Se midieron las actividades luciferasa de luciérnaga y *Renilla* consecutivamente usando los ensayos de luciferasa dobles (Promega) 24 horas después de la transfección.

- 40 *Transferencias de Western.*

- Se extrajeron extractos proteicos totales y nucleares de células K562 transfectadas con miR-10a y miR-130a, así como células CD34⁺ en diferentes estados de diferenciación megacariocítica usando tampón RIPA o Kit de Extracción Nuclear (Pierce, Rockford, IL). Se analizó la expresión proteica por transferencia de Western con los siguientes anticuerpos primarios: MAFB (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), HOXA1 (RED Systems, Minneapolis, MN), β Actina y Nucleolina (Santa Cruz Biotechnology). Se usaron anticuerpos secundarios apropiados (Santa Cruz Biotechnology).

- 50 **Ejemplo 1: expresión de miARN durante la diferenciación megacariocítica *in vitro* de progenitores CD34⁺.**

- Usando una combinación de un factor de crecimiento megacariocítico específico (trombopoyetina) y citocinas no específicas (SCF e IL-3), los inventores pudieron generar *in vitro* descendencia megacariocítica abundante, pura, a partir de progenitores de médula ósea CD34⁺ adecuados para estudios de micromatrices (FIGURA 4). Se obtuvo ARN total para análisis de microplacas de miARN de tres progenitores de CD34 diferentes en la línea basal y los días 10, 12, 14 y 16 de cultivo con citocinas. Los inventores compararon inicialmente la expresión de miARN entre los progenitores CD34⁺ y los megacariocitos diferenciados CD34⁺ agrupados en todos los puntos durante el proceso de diferenciación. Se identificaron 17 miARN (Tabla 1) que están marcadamente regulados negativamente durante la diferenciación megacariocítica. No hubo miARN estadísticamente significativos regulados positivamente durante la diferenciación megacariocítica. Usando análisis predictivo de micromatrices (PAM), los inventores identificaron 8 microARN que predecían diferenciación megacariocítica sin error de clasificación errónea: miR-10a, miR-10b, miR-30c, miR-106, miR-126, miR-130a, miR-132 y miR-143. Todos estos miARN, excepto miR-143, se incluyen en los 17 miARN identificados por análisis de significación de micromatrices (SAM). Las transferencias de Northern y PCR en tiempo real para varios miARN confirmaron los resultados obtenidos por análisis de microplacas de miARN (FIGURA 1).

- Debido a que los inventores descubrieron principalmente regulación negativa de los miARN durante la megacariocitopoyesis, plantean la hipótesis de que estos miARN pueden desbloquear genes diana implicados en la diferenciación. En línea con esta hipótesis, se predice que los miARN que están marcadamente regulados negativamente en el sistema de los inventores se dirigen a genes con papeles importantes en la diferenciación megacariocítica. Entre los factores de transcripción con función bien conocida en la megacariocitopoyesis, RUNX-1 (Elagib, K. E., *et al.* (2003) *Blood*, 101: 4333-4341), Fli-1 (Athanasoiu, M., *et al.* (1996) *Cell Growth Differ.* 7, 1525-1534), FLT1 (Caselia, I., *et al.* (2003) *Blood* 101, 1316-1323), ETV6 (Hock, H., *et al.* (2004) *Genes Dev.* 18: 2336-2341), TAL1 (Begley, C. G., y Green, A. R. (1999) *Blood*, 93: 2760-2770), ETS1 (Jackers, P., *et al.* (2004) *J. Biol. Chem.* 279: 52183-52190) y CRK (Lannutti, B. J., *et al.* (2003) *Exp. Hematol.* 12: 1268-1274) son dianas potenciales para varios miARN regulados negativamente en megacariocitos diferenciados. Además, cada uno de estos factores de transcripción tiene más de un miARN que se predice que es su regulador. Por ejemplo, se predice que RUNX1 (AML1) es la diana de miR-106, miR-181b, miR-101, let7d y el grupo de miR-17-92. Los múltiples miARN que se predice que se dirigen a *AML1* sugieren un modelo de regulación combinatorio.
- Los inventores observaron después la expresión temporal de miARN durante el proceso de diferenciación megacariocítica de progenitores CD34⁺. Los inventores se centraron en miARN que se han descrito en tejidos hematopoyéticos, tales como miR-223, miR-181, miR-155, miR-142, miR-15a, miR-16, miR-106 y el grupo de miR-17-92 (FIGURA 5). Los inventores descubrieron cambios secuenciales en la expresión de miR-223. Inicialmente, miR-223 está regulado negativamente durante la diferenciación megacariocítica, pero después de 14 días en cultivo, su expresión vuelve a niveles comparables con los de progenitores CD34 (FIGURA 1C). El grupo de miR-15a y miR-16-1 también sigue el mismo patrón de expresión que miR-223 (FIGURA 1D), mientras que miR-181b, miR-155, miR-106a, miR-17 y miR-20 se regularon negativamente durante la diferenciación (FIGURA 6). La variación temporal de la expresión de miR-223 y miR-15a/miR-16-1 sugiere una función específica de estadio.
- Tabla 2. miARN regulados negativamente durante la diferenciación megacariocítica de CD34⁺ *in vitro*. Todos los miARN expresados diferencialmente tienen valor $q < 0,01$ (tasa de falso positivo).

Tabla 2

miARN	Localización Cromosómica	Ensayo de T (†)	Factor de Cambio	Dianas potenciales
<i>hsa-mir-010a*</i>	17 q21	-9,10	50,00	<i>HOXA1, HOXA3, HOXD10, CRK, FLT1, CRK, EV12, HOXA9, MAFB,</i>
<i>hsa-mir-126*</i>	9q34	-2,73	8,33	<i>CMAF</i>
<i>hsa-mir-106*</i>	xq26.2	-2,63	2,86	<i>TAL1, FLT1, SKI, RUNX1, FOG2, FLI, PDGFRA, CRK</i>
<i>hsa-mir-010b*</i>	2q31	-2,17	11,11	<i>HOXA1, HOXA3, HOXD10, ETS-1, CRK, FLT1</i>
<i>hsa-mir-130a*</i>	11q12	-2,08	4,76	<i>MAFB, MYB, FOG2, CBFB,</i>
<i>hsa-mir-130a-prec*</i>	11q12	-2,07	7,69	<i>PDGFRA, SDFR1, CXCL12</i>
<i>hsa-mir-124a</i>	8q23	-1,81	2,78	<i>NA±</i>
<i>hsa-mir-032-prec</i>	9q31	-1,76	3,57	<i>TAL1, SKI, FLT1, FOG2, ETS-1,</i>
<i>hsa-mir-101</i>	1p31.3	-1,75	3,33	<i>CBFB, RAF1, MYB</i>
<i>hsa-mir-30c</i>	6q13	-1,71	2,56	<i>NA±</i>
<i>hsa-mir-213*</i>	1q31.3	-1,69	2,38	<i>TAL1, CXCL12, MEIS1, MEIS2,</i>
<i>hsa-mir-150*</i>	19q13.3	-1,63	5,26	<i>ETS-1 RUNX1, MYB</i>
<i>hsa-mir-020</i>	13q31	-1,62	2,17	<i>CBFB, MAFB, HOXA1, SBFI,</i>
<i>hsa-mir-339</i>	7p22	-1,60	3,03	<i>NCOR2, ERG</i>
<i>hsa-let-7a</i>	9q22	-1,58	2,94	<i>MAX- SATB2</i>
				<i>MYB, SDFR1</i>
				<i>TAL1, SKI, RUNX-1, FLT1, CRK,</i>
				<i>FOG2, RARB</i>
				<i>RAP1B, JUNB, MEIS2 HOXA1, HOXA9, MEIS2, ITGB3,</i>
				<i>PLDN</i>
				<i>HOXA1, HOXD1, ITGB3, RUNX1,</i>

<i>hsa-let-7d</i>	9q22	-1,56	2,17	<i>PDGFRA</i> <i>RUNX-1, KIT, HOXA1, MEIS2,</i>
<i>hsa-mir-181c</i>	19p13	-1,55	2,50	<i>ETS-1 ETV6, PDGFRA</i> <i>RUNX-1, KIT, ITGA3, HOXA1,</i>
<i>hsa-mir-181b</i>	1q31.3	-1,53	2,13	<i>MEIS2, ETS-1, SDFR1,</i> <i>TAL1, SKI, FLT1, RUNX1, CRK,</i>
<i>hsa-mir-017</i>	13q31	-1,38	1,82	<i>FOG1, ETS-1, MEIS1</i>

† p de ensayo <0,05.

* Estos miARN se identificaron por PAM como predictores de una clase megacariocítica con el menor error de clasificación errónea. Todos, excepto miR-143 están regulados negativamente durante la diferenciación megacariocítica.

NA±: secuencia precursora de miARN que no contiene el miARN maduro, por lo tanto no se muestra diana potencial.

Ejemplo 2: el factor de transcripción de MAFB es una diana de miR-130a.

- Usando tres algoritmos de predicción de dianas (TARGETSCAN (www.genes.mit.edu/targetscan), MIRANDA (www.microma.org/miranda_new.html), y PICTAR (www.pictar.bio.nyu.edu)), los inventores identificaron que se predice que miR-130a se dirige a MAFB, un factor de transcripción que está regulado positivamente durante la diferenciación megacariocítica e induce el gen GPIIb, en sinergia con GATA1, SP1 y ETS-1 (Sevinsky, J. R., *et al.* (2004) Mol. Cell. Biol. 24, 4534-4545). Para investigar esta interacción potencial, en primer lugar, los inventores examinaron los niveles de ARNm y proteína MAFB en progenitores CD34⁺ en la línea basa y después de estimulación de citocinas (FIGURA 2A). Los inventores descubrieron que la proteína MAFB está regulada positivamente durante la diferenciación megacariocítica *in vitro*. Aunque los niveles de ARNm para MAFB por PCR aumentan con la diferenciación, este aumento no se correlaciona bien con la intensidad de su expresión proteica. El patrón inverso de la expresión de MAFB y miR-130a sugirió interacción *in vivo* que se investigó adicionalmente.
- Para demostrar una interacción directa entre las 3' UTR de MAFB con miR-130a, los inventores insertaron las regiones 3' UTR que se predijo que interaccionarían con este miARN en un vector de luciferasa. Este experimento reveló una represión de aproximadamente -60 % de la actividad luciferasa en comparación con el vector de control (FIGURA 2B). Como un experimento de control adicional, los inventores usaron una secuencia de ARNm diana mutada para MAFB sin cinco de las bases complementarias. Como se esperaba, las mutaciones anularon completamente la interacción entre miR-130a y sus 3'UTR diana (FIGURA 2B).

- Los inventores también determinaron las consecuencias *in vivo* de la sobreexpresión de miR-130a en la expresión de MAFB. El pre-miR-130a y un control negativo se transfectaron por electroporación en células K562, que expresan de forma natural MAFB y carecen de miR-130a. La transfección del pre-miR-130a, pero no el control, dio como resultado una reducción de los niveles de proteínas a las 48 horas (FIGURA 2C). La transferencia de Northern confirmó la expresión ectópica exitosa de miR-130a en células K562 (FIGURA 7).

Ejemplo 3: miR-10a se correlaciona con la expresión génica de HOXB.

- Se ha indicado que en embriones de ratón, se expresan miR-10a, miR-10b y miR-196 en patrones de tipo HOX (Mansfield, J. H., *et al.* (2004) Nature 36, 1079-1083) y siguen estrechamente su grupo HOX "hospedador" durante la evolución (Tanzer, A., *et al.* (2005) J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol. 304B, 75-85). Estos datos sugieren elementos reguladores comunes entre grupos parálogos. El miR-10a está localizado en el cromosoma 17q21 dentro del grupo de los genes HOXB (FIGURA 8) y miR-10b está localizado en el cromosoma 2q31 dentro del grupo de genes HOXD.
- Para determinar si el patrón de expresión de miR-10a se correlaciona con la expresión de genes HOXB, los inventores realizaron RT-PCR para HOXB4 y HOXB5, que son los genes localizados 5' y 3', respectivamente, de miR-10a en el grupo HOXB. Como se muestra en la FIGURA 8, la expresión de HOXB4 y HOXB5 fue paralela a la de miR-10a, lo que sugiere un mecanismo regulador común.

Ejemplo 4: miR-10a regula negativamente HOXA1.

- Los inventores determinaron por matriz de miARN y transferencia de Northern que miR-10a está marcadamente regulado negativamente durante la diferenciación megacariocítica. Resulta interesante que los inventores descubrieron varios genes HOX como dianas potenciales para miR-10 (Tabla 2). Los inventores investigaron por lo tanto si miR-10a podría dirigirse a un gen HOX. Los inventores realizaron PCR en tiempo real para las dianas de HOX predichas de miR-10: HOXA1, HOXA3 y HOXD10. Después de normalización con ARN 18S, los inventores descubrieron que el ARNm de HOXA1 está regulado positivamente 7 veces durante la diferenciación megacariocítica en comparación con progenitores de CD34 (FIGURA 3A; véase también FIGURA 9). Los niveles de proteína HOXA1 también estaban regulados positivamente durante la diferenciación megacariocítica (FIGURA 3B). Estos resultados están en marcado contraste con la regulación negativa de miR-10a en diferenciación megacariocítica, lo que sugiere que miR-10a podría ser un inhibidor de la expresión de HOXA1. Para demostrar una

interacción directa de miR-10a y las secuencias 3' UTR del gen de HOXA1, los inventores llevaron a cabo un ensayo indicador de luciferasa como se describe en *Materiales y Métodos*. Cuando el precursor de miARN miR-10a se introdujo en las células MEG01 junto con el plásmido indicador que contenía la secuencia 3' UTR de *HOXA1*, se observó una reducción del 50 % en la actividad luciferasa (FIGURA 3C). El grado de complementariedad entre miR-10a y el 3' UTR de HOXA1 se muestra en la Figura 3D, como se predice por PICTAR (www.pictar.bio.nyu.edu).

Para confirmar estos hallazgos *in vivo*, los inventores transfectaron células K562 con el precursor pre-miR-10a usando nucleoporación y midieron la expresión de ARNm de HOXA1 por RT-PCR y los niveles de proteína HOXA1 por transferencia de Western. Se documentó expresión ectópica exitosa de miR-10a por Transferencia de Northern (FIGURA 3E). Se encontró una reducción significativa en los niveles de ARNm y proteína para HOXA1 para células K562 transfectadas con el precursor de miR-10a pero no con el control negativo (FIGURAS 3F y 3G). Estos datos indican que miR-10a se dirige a HOXA1 *in vitro* e *in vivo*.

Se ha indicado que miR-196 induce escisión de ARNm de HOXB8, apuntando a un mecanismo de restricción postranscripcional de la expresión génica de HOX (Yekta, S., *et al.* (2004) *Science*, 304: 594-596). Al contrario que la interacción de miR-196-HOXB8, en la que existe una complementariedad casi perfecta, el grado de emparejamiento entre miR-10a y el 3' UTR de HOXA1 humano es subóptimo (FIGURA 4). Aunque los resultados de los inventores indicaron degradación de ARNm diana, son necesarios estudios adicionales para determinar si la escisión o la represión traduccional es el mecanismo primario de regulación negativa del gen de HOXA1 en este sistema. Un estudio previo usando análisis de micromatrices mostró que un gran número de genes de ARNm diana están regulados negativamente por miARN al nivel de transcripción (Lim, L. P., *et al.* (2005) *Nature*: 433,769-771). Estos datos plantean la cuestión de si la degradación diana es una consecuencia de la represión traduccional y posterior relocalización de los complejos de diana-miR a cuerpos de procesamiento citoplasmáticos o es un acontecimiento primario (Pillai, R. (2005) *RNA* 11, 1753-1761).

Ejemplo 5: realización de perfiles de miARN en líneas celulares de leucemia megacarioblástica aguda (LMA).

Tras la identificación del perfil de expresión de microARN de células CD34⁺ durante la diferenciación megacariocítica, los inventores investigaron después la expresión de miARN en líneas celulares de LMA con el objetivo de identificar miARN expresados diferencialmente que podrían tener un papel patógeno en leucemia megacarioblástica. Los inventores compararon inicialmente la expresión de miARN en cuatro líneas celulares de LMA con la de megacariocitos diferenciados por CD34⁺ *in vitro*. Usando análisis de significación de micromatriz (SAM), los inventores identificaron 10 miARN regulados positivamente en líneas celulares de LMA en comparación con los de megacariocitos diferenciados *in vitro* por CD34 (Tabla 3; véase también Tabla 4). Estos miARN son los siguientes (en orden del factor de aumento con respecto a megacariocitos diferenciados): miR-101, miR-126, miR-99a, miR-99-prec, miR-106, miR-339, miR-99b, miR-149, miR-33 y miR-135. Los resultados se validaron por RT-PCR como se muestra en la FIGURA 10. Usando PAM, los inventores compararon la expresión de miARN en células CD34⁺ con megacariocitos diferenciados *in vitro* y líneas celulares de LMA (FIGURA 10). Resulta interesante que los inventores descubrieron cinco miARN implicados en la identificación de diferenciación megacariocítica (miR-101, miR-126, miR-106, miR-20 y miR-135) que estaban regulados positivamente en las líneas celulares leucémicas (Tablas 3, 5 y 6). Aún debe dilucidarse si este perfil representa solamente un estado de diferenciación de las células o tiene un verdadero papel patógeno. Apoyando la segunda hipótesis, se predice que miR-106, miR-135 y miR-20 se dirigen a RUNX1, que es uno de los genes más habitualmente asociados con leucemia (Nakao, M., *et al.* (2004) *Oncogene* 23, 709-719). Además, se han descrito mutaciones de RUNX1 en trombocitopenias familiares con una propensión a desarrollar leucemia mieloide aguda (Song, W. J., *et al.* (1999) *Nat. Genet.* 23, 166-175).

Tabla 3. microARN regulados positivamente en líneas celulares megacarioblásticas agudas en comparación con megacariocitos diferenciados *in vitro*.

Todos los miARN tienen un valor $q < 0,01$ (tasa de falso descubrimiento).

Se descubrió usando PAM que los mismos miARN, excepto miR-339 y miR-149, predecían una clase de leucemia megacarioblástica sin error de clasificación.

TABLA 3

miARN	Localización Cromosómica	Puntuación de ensayo de t	Factor Cambio	Dianas potenciales
<i>hsa-mir-101</i>	1p31.3	6,14	11,85	<i>MEIS2, RUNX1, ETS-1, C-MYB, FOS, RARB, NFE2L2</i>
<i>hsa-mir-126</i>	9q34	4,91	11,97	<i>V-CRK</i>
<i>hsa-mir-099a</i>	21q21	3,30	6,83	<i>HOXA1, EIF2C, FOXA1</i>

<i>hsa-mir-099b-prec</i>	21q21	2,85	7,59	NA <i>FLT1, SKI, E2F1, NCOA3,</i>
<i>hsa-mir-106</i>	xq26.2	2,79	3,33	<i>PDGFRA, CRK</i>
<i>hsa-mir-339</i>	7p22	2,58	3,36	<i>HOXA1, FLT1, PTP4A1, RAP1B</i> <i>HOXA1, MYCBP2 RAP1A,</i>
<i>hsa-mir-099b</i>	19q13	2,46	4,19	<i>MAFF, PDGFRA, SP1,</i>
<i>hsa-mir-149</i>	2q37	2,29	3,53	<i>NFIB</i> <i>PDGFRA, HIF1A, MEIS2</i>
<i>hsa-mir-033</i>	2q13	2,27	3,23	<i>SP1, HIF1A, SP3, HNRPA1,</i>
<i>hsa-mir-135</i>	3p21	2,12	3,97	<i>HOXA10, RUNX1</i>

Los resultados descritos en el presente documento demuestran que hay una regulación negativa de miARN durante la megacariocitopoyesis. Hipotéticamente, la regulación negativa de los miARN desbloquea los genes diana implicados en la diferenciación. En línea con esta hipótesis, se predice que los miARN que están marcadamente regulados negativamente en el sistema de los inventores se dirigen a genes con papeles importantes en la diferenciación megacariocítica. Por lo tanto, los inventores han mostrado que miR-130a se dirige a MAFB y miR-10a modula HOXA1. El hecho de que los inventores descubrieron varios miARN expresados diferencialmente durante la diferenciación y leucemia que se predice que se dirigen a HOXA1 sugiere una función para HOXA1 en la megacariocitopoyesis. En última instancia serán necesarios estudios de ganancia y pérdida para definir el papel de HOXA1 en este proceso de diferenciación. Los hallazgos de los inventores describen la expresión de miARN en diferenciación megacariocítica y sugiere un papel para la modulación de miARN de este linaje dirigiéndose a factores de transcripción megacariocíticos. Además en líneas celulares de leucemia megacarioblástica, los inventores han descubierto expresión inversa de miARN implicados en diferenciación megacariocítica normal. Estos datos proporcionan un punto de partida para futuros estudios de los miARN en la megacariocitopoyesis y leucemia.

Tabla 4. Identificación de la diferenciación megacariocítica.

TABLA 4

microARN	Expresión de CD34	Expresión Megacariocítica
<i>hsa-mir-010a</i>	aumento	Reducción
<i>hsa-mir-126</i>	aumento	Reducción
<i>hsa-mir-130a-prec</i>	aumento	Reducción
<i>hsa-mir-010b</i>	aumento	Reducción
<i>hsa-mir-106</i>	aumento	Reducción
<i>hsa-mir-130a</i>	aumento	Reducción
<i>hsa-mir-132</i>	aumento	Reducción
<i>hsa-mir-30c</i>	aumento	Reducción
<i>hsa-mir-143-prec</i>	Reducción	aumento

PAM seleccionó microARN con un error de clasificación errónea muy bajo.

Tabla 5. Identificación de líneas celulares de leucemia megacarioblástica

TABLA 5

MicroARN	Puntuación de ensayo de t	Factor de Cambio	Nivel de Expresión en AML M7	Dianas potenciales
<i>hsa-mir-101-</i>	6,14	11,85	aumento	<i>MEIS2, RUNX1, C-MYB, FOS,</i> <i>RARB, NFE2L2</i>
<i>hsa-mir-126</i>	4,91	11,97	aumento	<i>V-CRK</i>
<i>hsa-mir-099a</i>	3,30	6,83	aumento	<i>HOXA1, EIF2C, FOXA1</i>
<i>hsa-mir-095</i>			aumento	<i>SHOX2</i>
<i>hsa-mir-033</i>	2,27	3,23	aumento	<i>PDGFRA, HIF1A, MEIS2</i> <i>SP1, HIF1A, SP3, HNRPA1,</i>
<i>hsa-mir-135</i>	2,12	3,97	aumento	<i>HOXA10, RUNX1</i>

<i>hsa-mir-099b</i>	2,85	7,59	aumento	<i>HOXA1, MYCBP2</i> <i>HOXA1, FLT1, PTP4A1,</i>
<i>hsa-mir-339</i>	2,58	3,36	aumento	<i>RAP1B</i>
<i>hsa-mir-106</i>	2,79	3,33	aumento	<i>HOXA1, EIF2C, FOXA1</i>
<i>hsa-mir-124a</i>	2,07	2,78	aumento	<i>SDFR1, RXRa</i>
<i>hsa-mir-155</i>			reducción	<i>ETS-1</i> <i>TAL1, SKI, RUNX-1, FLT1, CRK,</i>
<i>hsa-mir-020</i>	2,00	3,09	aumento	<i>FOG2, RARB</i>
<i>hsa-mir-025</i>	1,98	4,24	aumento	<i>GATA2,</i>
<i>hsa-mir-140</i>			reducción	<i>GATA1</i>

PAM seleccionó microARN. El factor de cambio de la expresión de miARN se muestra junto con la puntuación del ensayo de *t* (SAM) y dianas potenciales.

- 5 Tabla 6. Análisis de tres clases que muestra los microARN regulados diferentes entre los tres tipos celulares: progenitores CD34⁺, líneas celulares de leucemia megacarioblástica aguda (LMA) y megacariocitos diferenciados *in vitro*.

TABLA 6

10

microARN	Localización Cromosómica	Puntuación de CD34 ⁺	Puntuación de líneas celulares AML M7	Puntuación de Megacariocitos diferenciados <i>In Vitro</i>
<i>hsa-mir-010a</i>	17q21	1,0198	0	-0,3562
<i>hsa-mir-101</i>	1p31.3	0	0,814	-0,432
<i>hsa-mir-126</i>	9q34	0,0621	0,4882	-0,4514
<i>hsa-mir-099a</i>	21q21	0	0,4685	-0,2875
<i>hsa-mir-033</i>	22q13	0	0,4258	-0,2294
<i>hsa-mir-095</i>	4p16	0	0,4142	-0,3567
<i>hsa-mir-010b</i>	2q31	0,3308	0	0
<i>hsa-mir-155</i>	21q21	0	-0,3217	0
<i>hsa-mir-130a</i>	11q12	0,2755	0	0
<i>hsa-let-7d</i>	9q22	0,263	-0,274	0
<i>hsa-mir-099b-prec</i>	21q21	0	0,266	-0,1078
<i>hsa-mir-135-2-prec</i>	12q23	0	0,2279	-0,2566
<i>hsa-mir-339</i>	7p22	0	0,2456	-0,1176
<i>hsa-mir-099b</i>	19q13	0	0,2275	-0,1025
<i>hsa-mir-106</i>	xq26	0	0,0575	-0,1891
<i>hsa-let-7c</i>	21q21	0,0289	-0,1753	0
<i>hsa-mir-148</i>	7p15	0	-0,1748	0
<i>hsa-mir-132-prec</i>	17p13	0,1721	0	0
<i>hsa-mir-020</i>	13q31	0	0,0374	-0,1509

- 15 Hay tres patrones de expresión de miARN entre los tres tipos celulares diferentes. El primer patrón se define por miARN altamente expresado en células CD34⁺ y regulado negativamente en LMA y megacariocitos diferenciados. miR-10a y miR-130a siguen este patrón de expresión; sin embargo, miR-10a está regulado positivamente en LMA en relación con megacariocitos diferenciados. El segundo patrón es miARN que está regulado positivamente en LMA, regulado negativamente en células CD34⁺ y megacariocitos diferenciados e incluye los siguientes miARN: miR-126, miR-99, miR-101, let 7A y miR-100. Los últimos dos miARN están expresados igualmente en CD34⁺ y megacariocitos diferenciados, en lugar de mostrar una reducción gradual en la expresión, como se demuestra por miR-126, miR-99 y miR-101. El último patrón incluye miARN-106 y miARN-135-2, que están regulados positivamente en células CD34⁺ y LMA, pero bajos en megacariocitos diferenciados.
- 20

- 25 Los microARN son una clase altamente conservada de ARN no codificantes con funciones reguladoras importantes en proliferación, apoptosis, desarrollo y diferenciación. Como se describe en el presente documento, para descubrir nuevas rutas reguladoras durante la diferenciación megacariocítica, los inventores realizaron perfiles de expresión de microARN de megacariocitos diferenciados *in vitro* derivados de progenitores hematopoyéticos CD34⁺. Un hallazgo importante fue la regulación negativa de miR-10a, miR-126, miR-106, miR-10b, miR-17 y miR-20. Sin

desear quedar ligado a ninguna teoría, se cree que la regulación negativa de los microARN desbloquea genes diana implicados en la diferenciación. Se confirmó *in vitro* e *in vivo* que miR-130a se dirige al factor de transcripción MAFB, y está implicado en la activación del promotor GPIIB, una proteína clave para la fisiología de plaquetas. Además, se mostró que la expresión de miR-10a en megacariocitos diferenciados es inversa a la de HOXA1, y HOXA1 es una diana directa de miR-10a. Finalmente, la expresión de microARN de líneas celulares leucémicas megacarioblásticas se comparó con la de megacariocitos diferenciados *in vitro* y progenitores CD34<+>. Este análisis reveló la regulación positiva de miR-101, miR-126, miR-99a, miR-135 y miR-20 en la línea celular cancerosa. Los datos y resultados descritos en el presente documento describen la expresión de microARN durante la megacariocitopoyesis y demuestran un papel regulador de los microARN en este proceso dirigiéndose a los factores de transcripción megacariocíticos.

REIVINDICACIONES

1. Un método para diagnosticar leucemia megacarioblástica aguda (LMA) en un sujeto, que comprende:

- 5 i) determinar el nivel de al menos un producto génico de miR en una muestra del sujeto; y
 ii) comparar el nivel del al menos un producto génico de miR en la muestra con un control, en donde el control es el nivel del al menos un producto génico de miR de un sujeto que no tiene LMA, y en el que un aumento en el nivel del al menos un producto génico de miR en la muestra del sujeto, en relación con el del control, es diagnóstico de LMA y

10 en el que el al menos un producto génico de miR es miR-135.

2. El método de la reivindicación 1, que comprende además determinar en nivel de un producto génico de miR adicional seleccionado del grupo que consiste en miR-101, miR-126, miR-106 y miR-20.

15 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el sujeto es un ser humano.

4. El método de la reivindicación 1, 2 o 3, en el que el producto génico de miR-135 comprende miR-135a que tiene SEC ID N°: 389.

20 5. El método de la reivindicación 1, 2 o 3, en el que el producto génico de miR-135 comprende miR-135b que tiene SEC ID N°: 390.

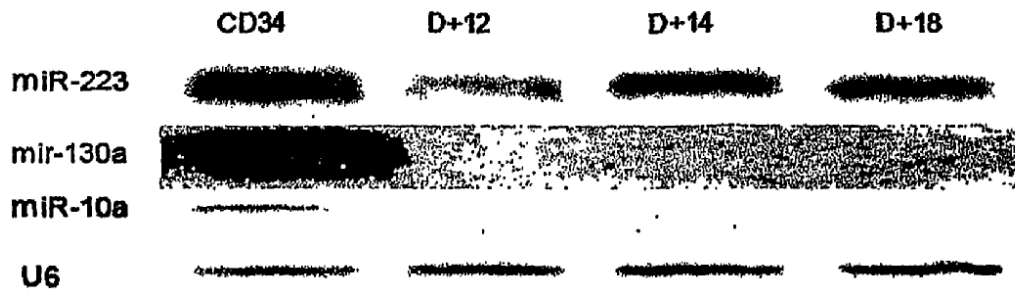


FIG. 1A

Expresión de miARN por RT-PCR en megacariocitos diferenciados

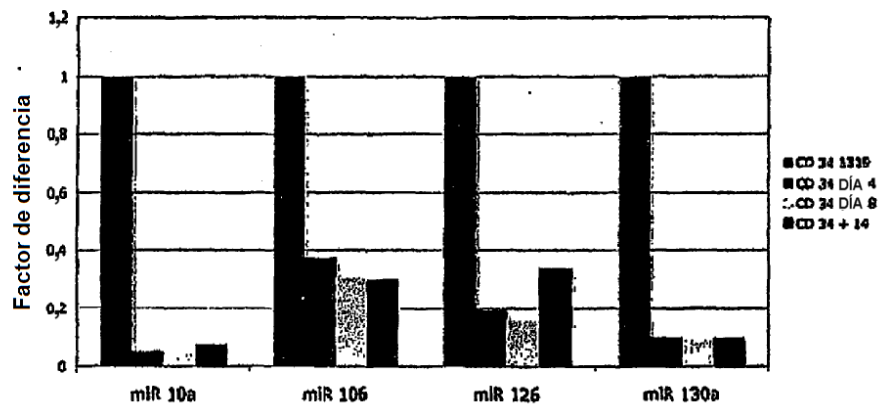


FIG. 1B

Expresión temporal de matriz de miR-223

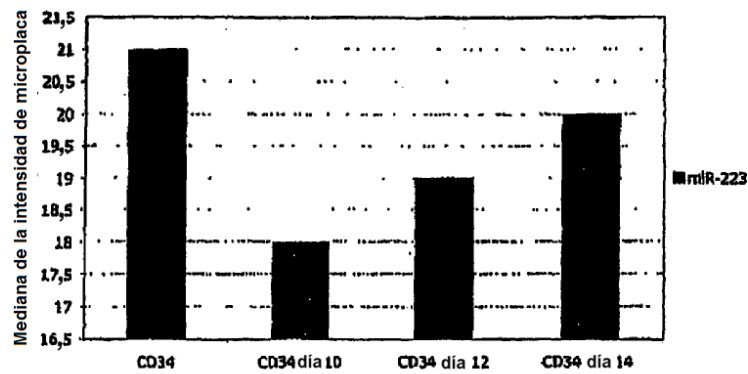


Fig. 1C

Expresión de miR-15a/16-1 en megacariocitos
diferenciados por RT-PCR

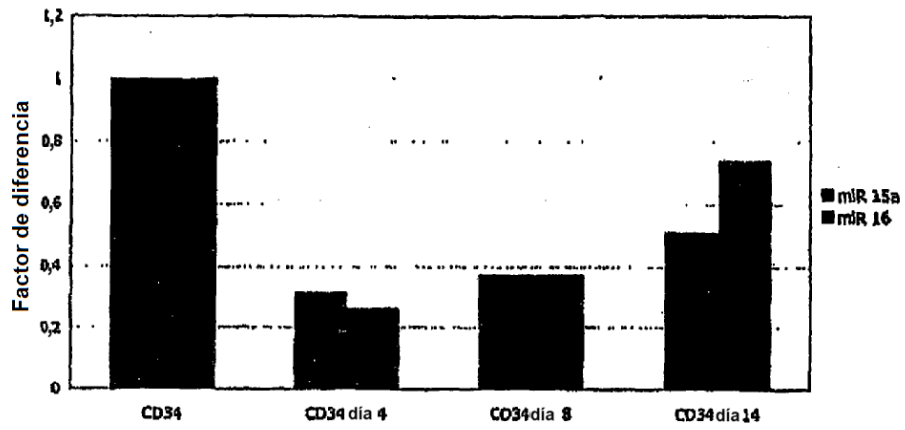


FIG. 1D

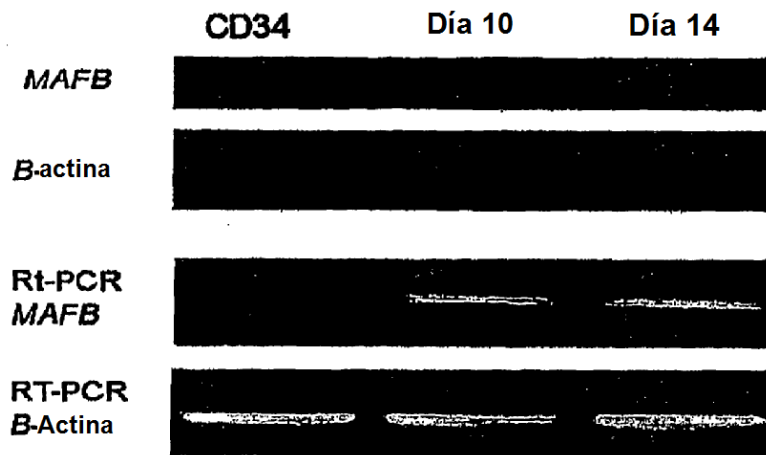


FIG. 2A

Represión relativa de la actividad luciferasa

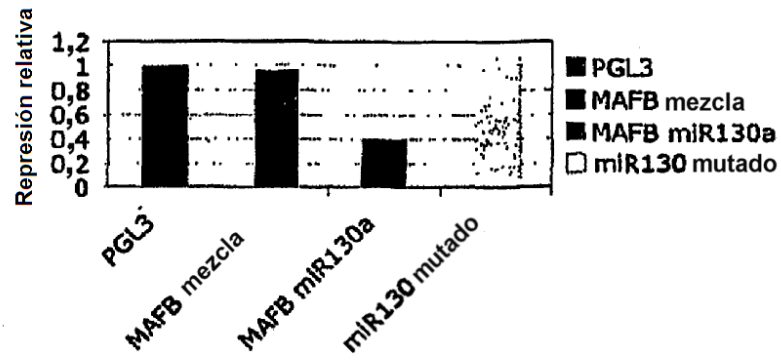


FIG. 2B

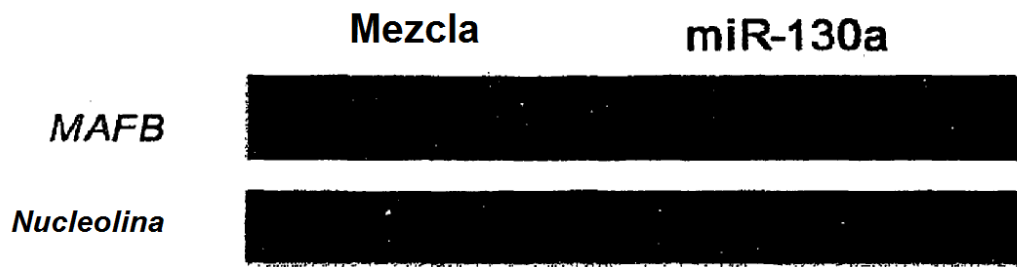


FIG. 2C
EXPRESIÓN GÉNICA DE HOXA1

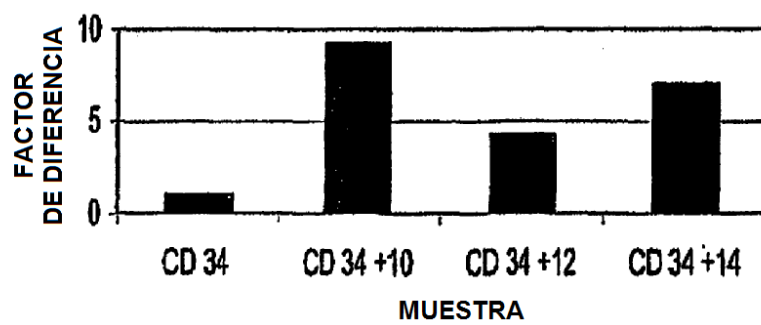


FIG. 3A

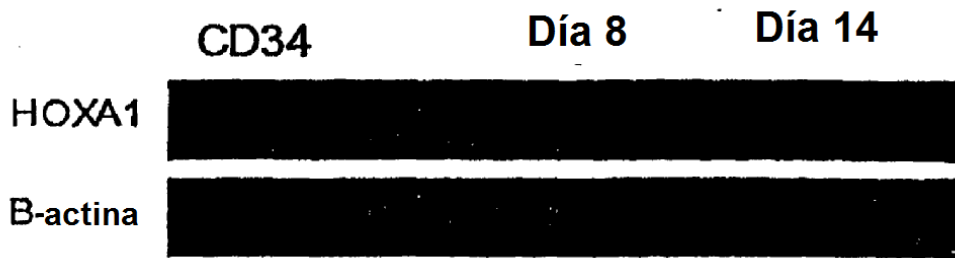


FIG. 3B

Represión relativa de la actividad luciferasa

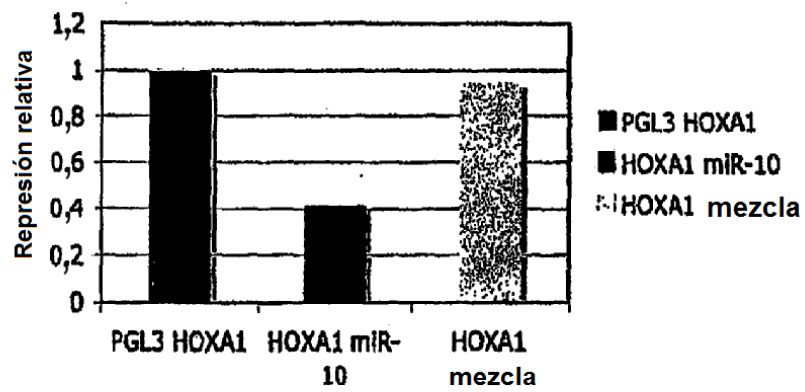


FIG. 3C

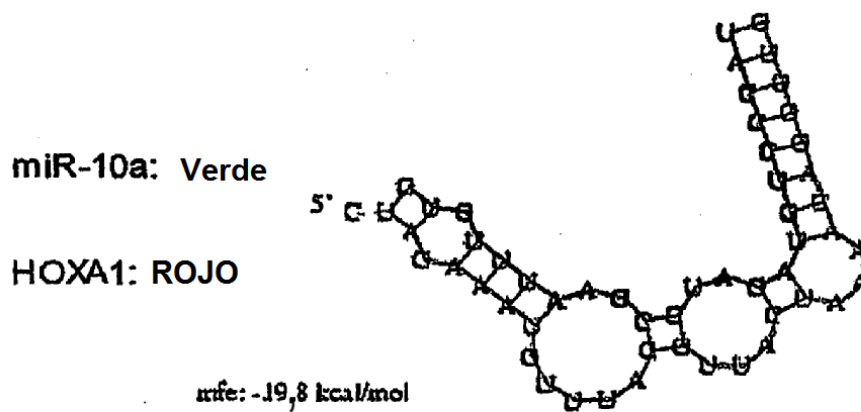


FIG. 3D

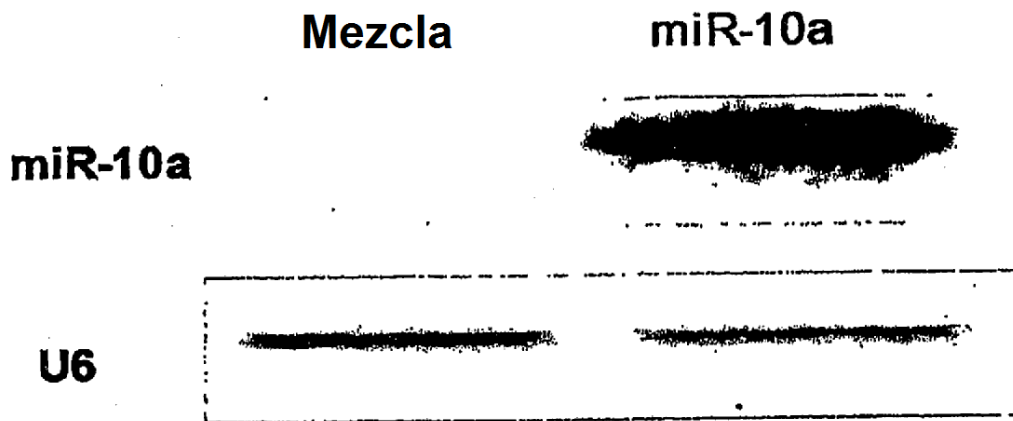


FIG. 3E

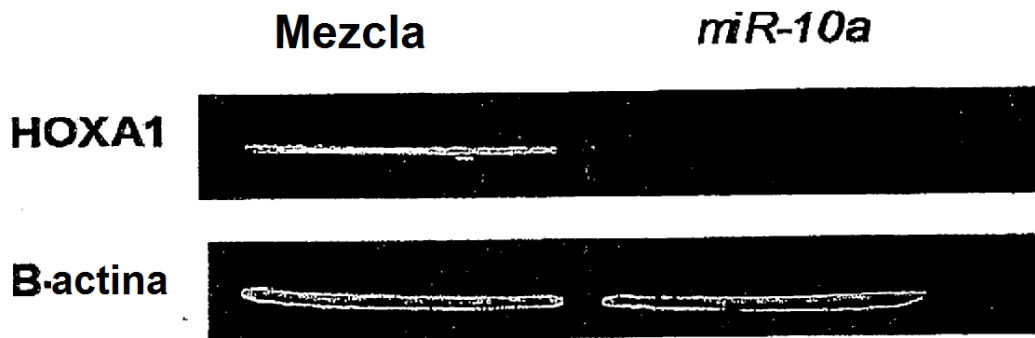


FIG. 3F

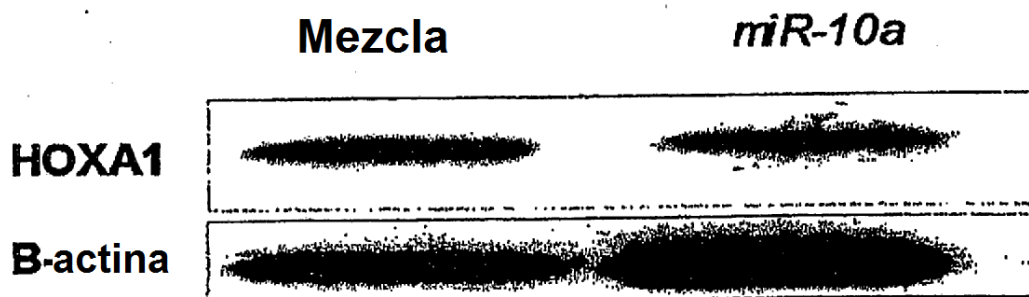


FIG. 3G

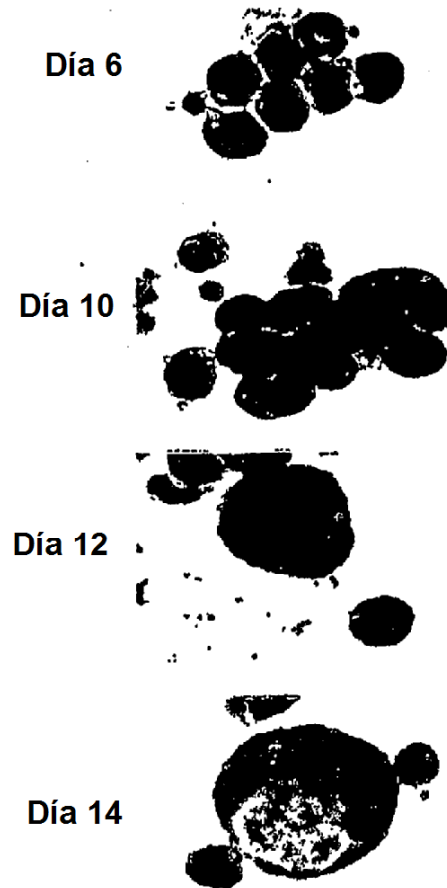


FIG. 4A

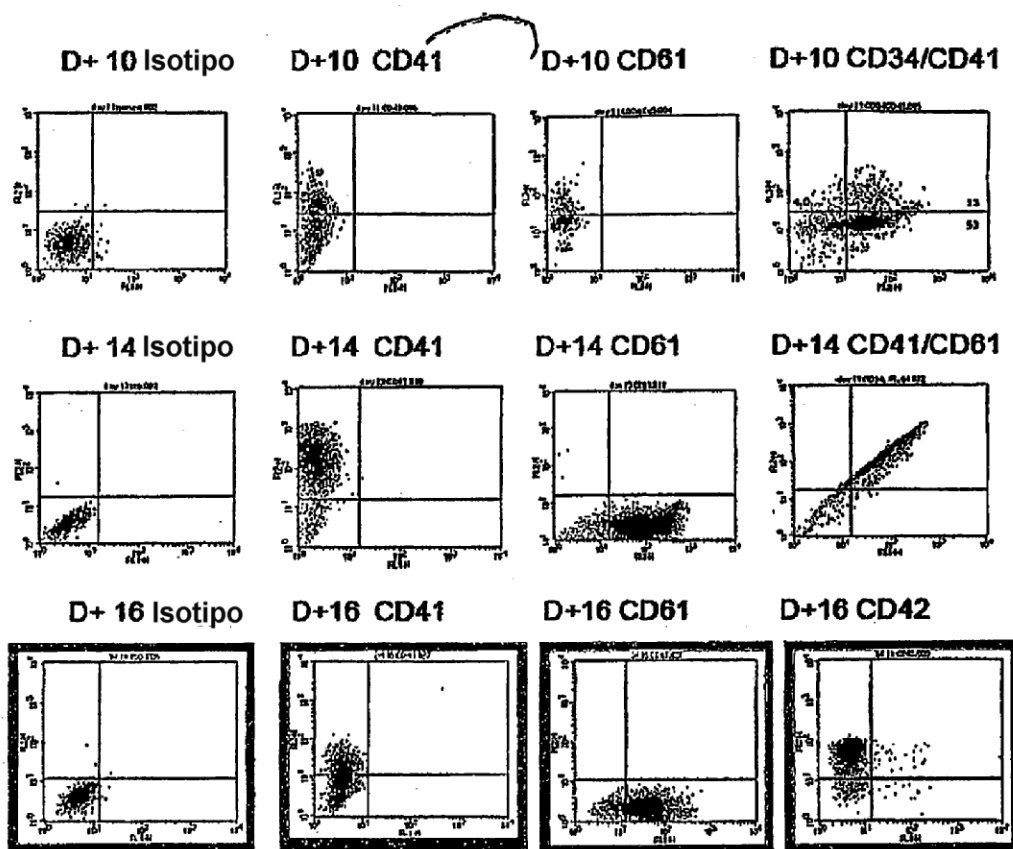


FIG. 4B

Expresión de miR-17/20
en megacariocitos diferenciados

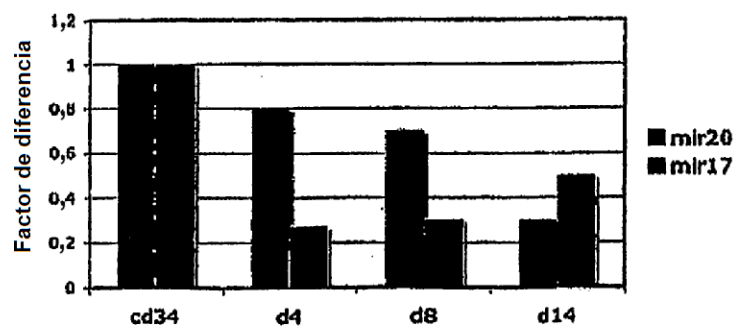
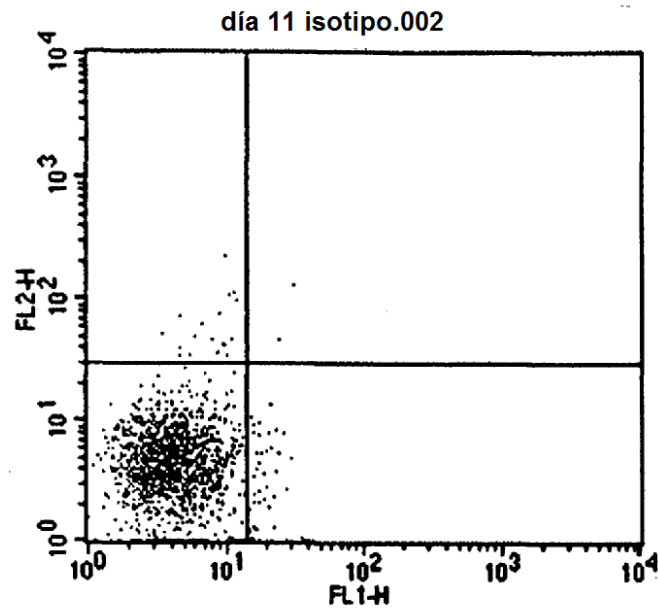


FIG. 5

D+ 10 Isotipo



D+ 14 Isotipo

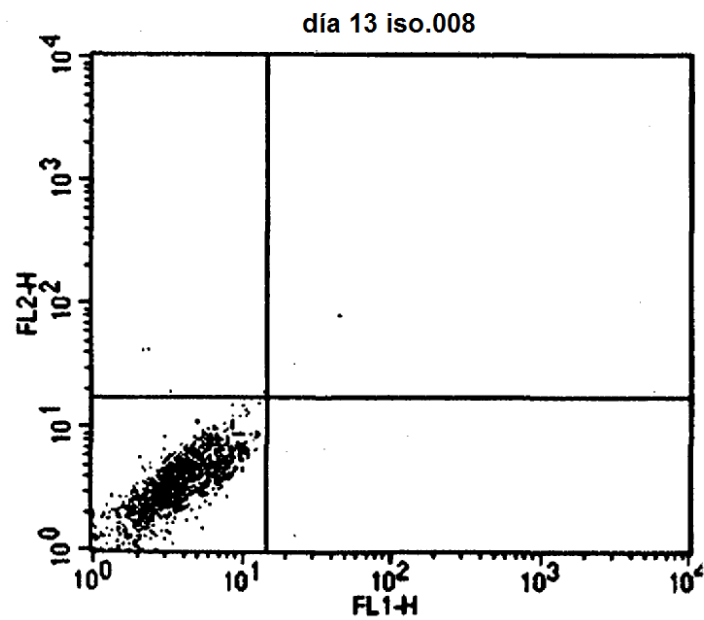
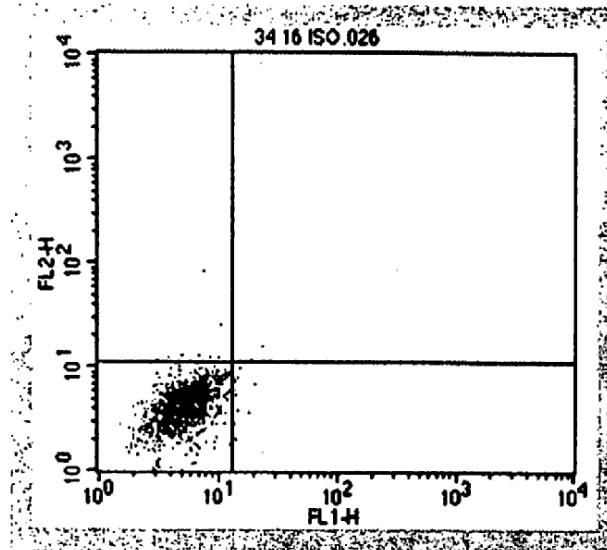


Fig. 4B

D+ 16 Isotipo



D+10 CD41

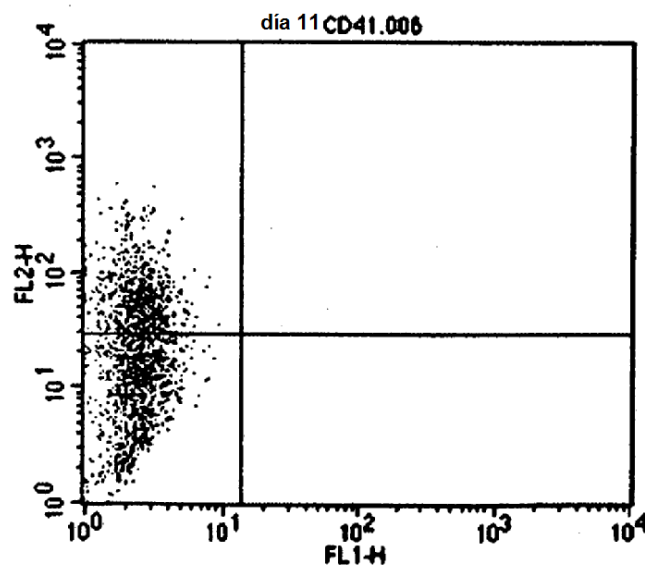
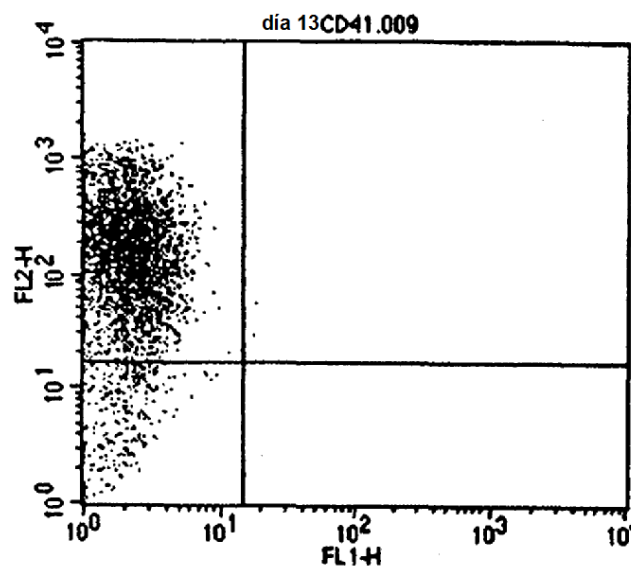


Fig. 4B

D+14 CD41



D+16 CD41

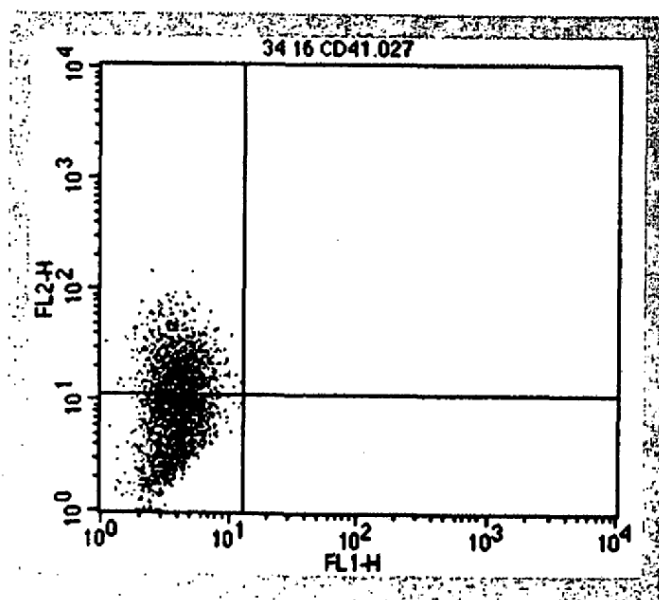
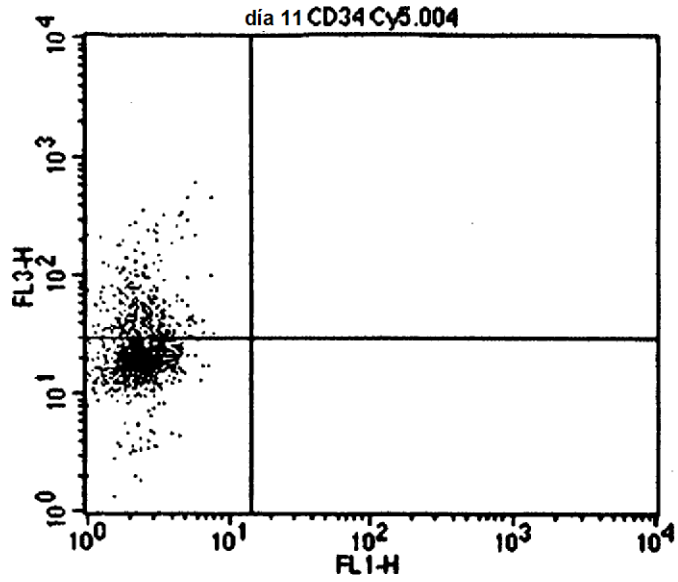


Fig. 4B

D+10 CD61



D+14 CD61

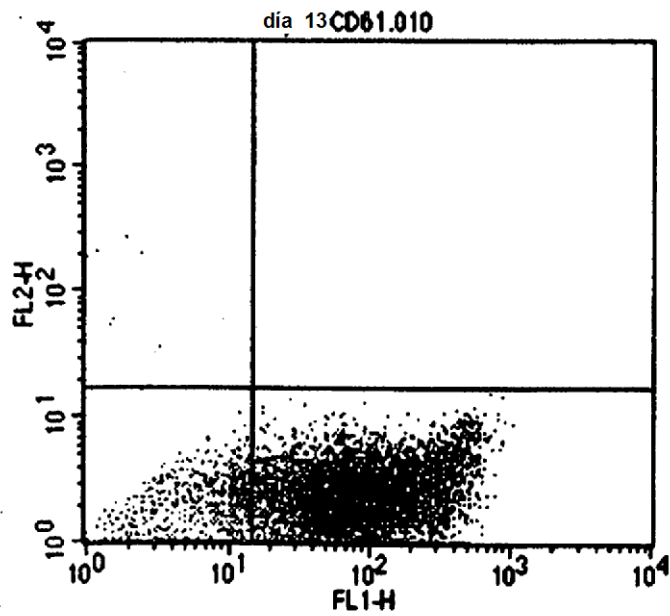
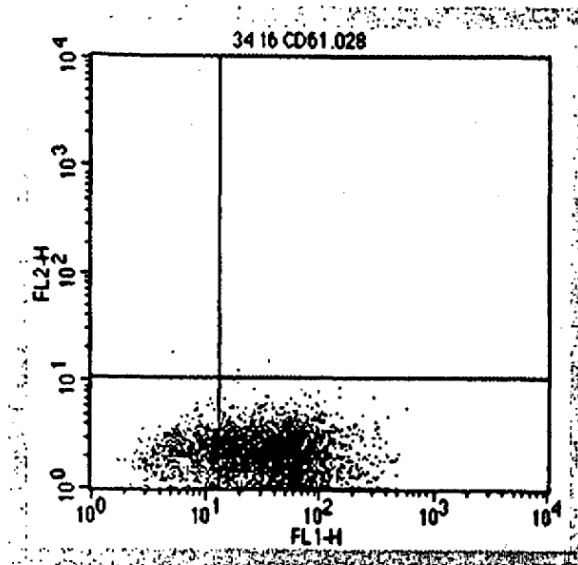


Fig. 4B

D+16 CD61



D+10 CD34/CD41

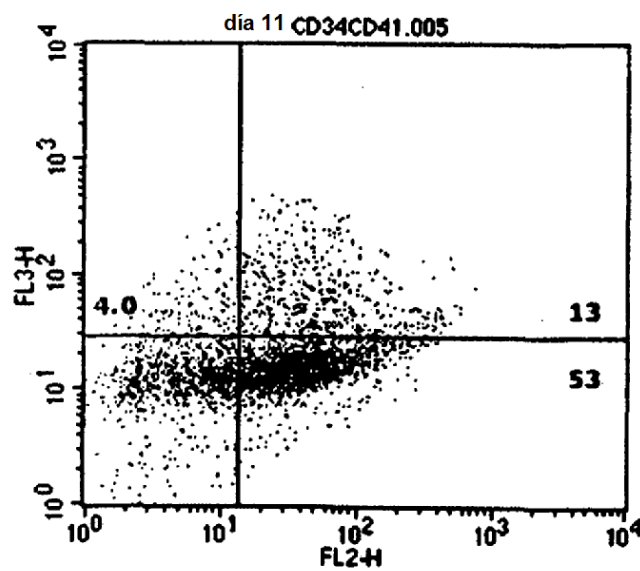
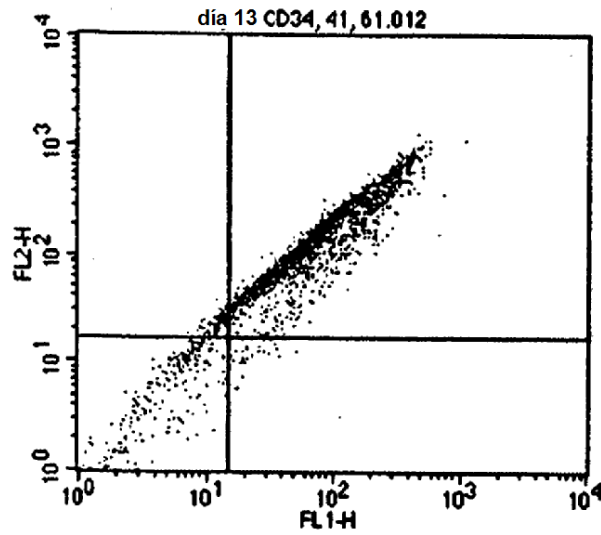


Fig. 4B

D+14 CD41/CD61



D+16 CD42

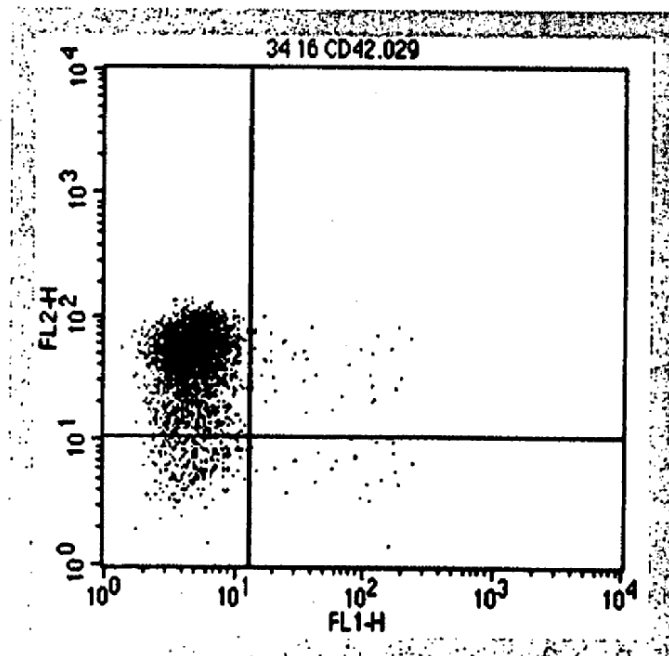
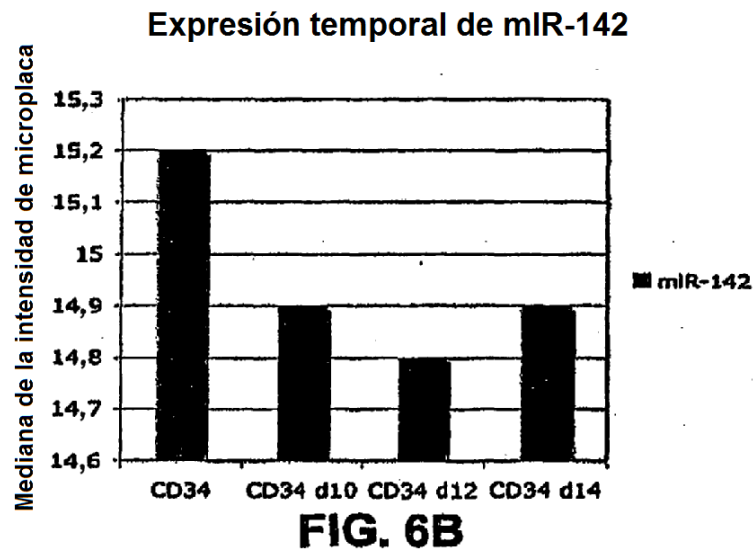
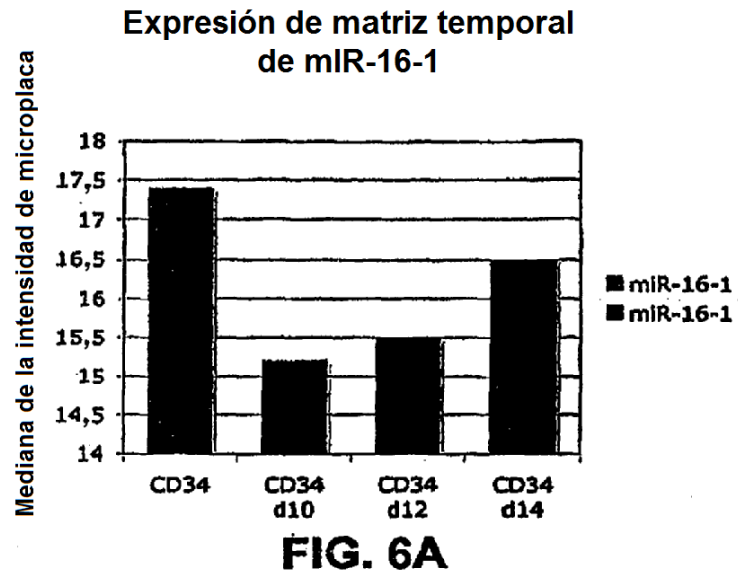


Fig. 4B



Expresión de matriz temporal
de miR-181b

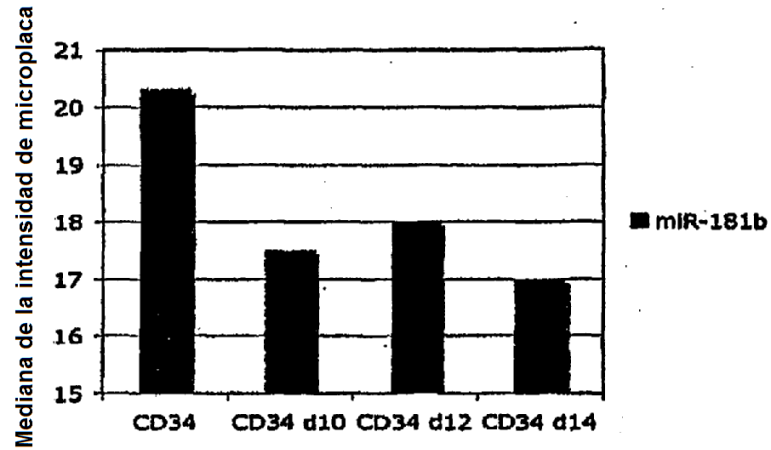


FIG. 6C

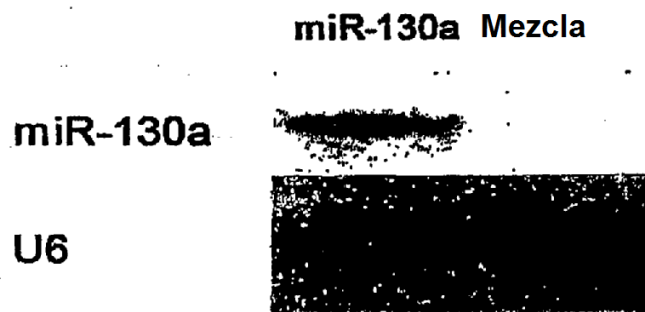


FIG. 7

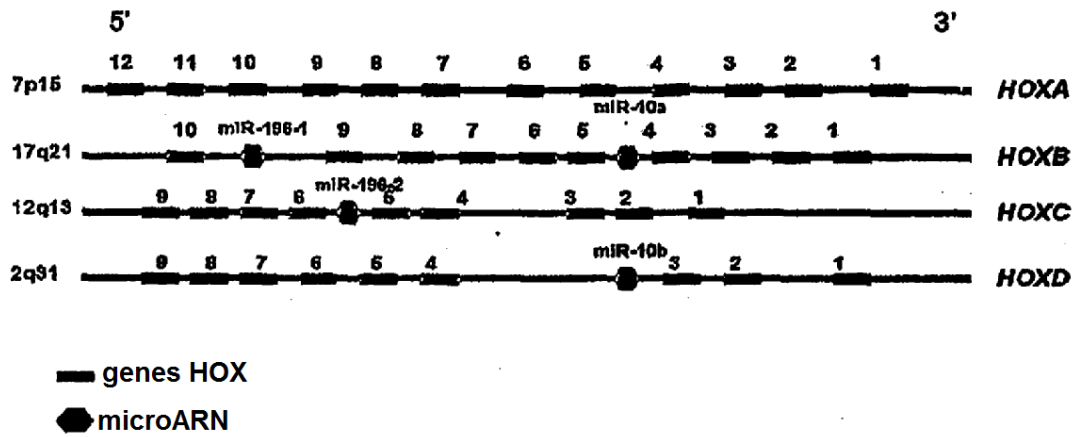


FIG. 8

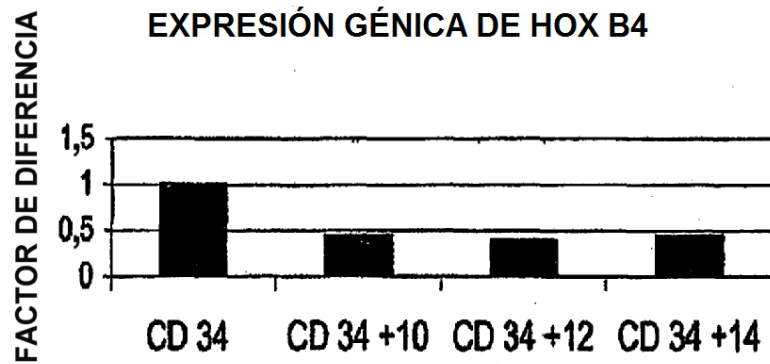


FIG. 9A

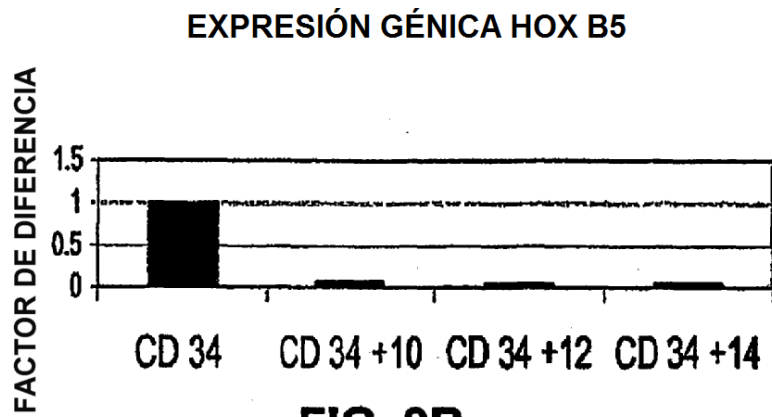


FIG. 9B

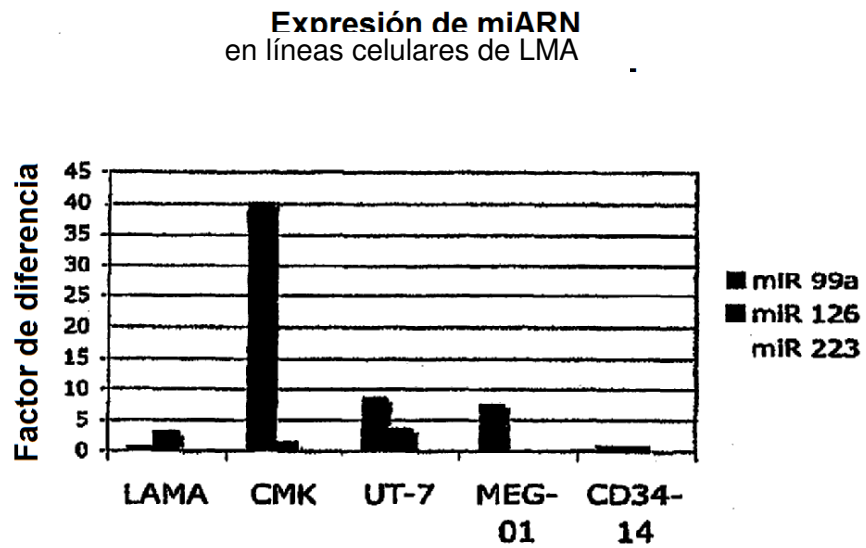


FIG. 10