

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 430**

51 Int. Cl.:

A61K 31/7105 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/711 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2007 E 07800215 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2061482**

54 Título: **Método de modulación de la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que implica miARN**

30 Prioridad:

28.08.2006 AU 2006904662 P
06.02.2007 AU 2007900558 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.04.2015

73 Titular/es:

THE UNIVERSITY OF WESTERN AUSTRALIA
(100.0%)
NEDLANDS
WESTERN AUSTRALIA 6907, AU

72 Inventor/es:

LEEDMAN, PETER;
GILES, KEITH y
WEBSTER, REBECCA, JANE

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 534 430 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

Método de modulación de la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) que implica miARN

5 **Campo**

La presente invención se refiere a un método para modular la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y sus efectores de señalización posterior. En particular, la presente invención se refiere a un método para modular la expresión de EGFR utilizando miARN.

10

Antecedentes

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), un miembro de la familia del receptor erbB, se expresa ampliamente en tejidos humanos y regula importantes procesos celulares incluyendo proliferación, diferenciación y desarrollo (S. Yano et al., 2003, *Anticancer Res.* 23, 3639). Sucede sobreexpresión de EGFR en una gama de tumores sólidos y está asociada con progresión de la enfermedad, resistencia a quimioterapia y radioterapia, y mal pronóstico (Arteaga, 2001, *J. Clin. Oncol.*, 19, 32). Por consiguiente, el EGFR y sus efectores de señalización posterior son dianas principales de nuevos agentes terapéuticos tales como anticuerpos monoclonales e inhibidores de tirosina quinasa (Arteaga, 2003, *Semin. Oncol.*, 30, 3). Sin embargo, las respuestas clínicas a agentes anti-EGFR existentes en cáncer a menudo están limitadas y por tanto un objetivo principal de la investigación es el desarrollo de nuevos enfoques para bloquear la expresión y señalización de EGFR (Bianco et al., 2005, *Cancer*, 12, 159).

Los microARN (miARN) son moléculas de ARN no codificantes endógenas cortas que se unen mediante complementariedad imperfecta a regiones no traducidas 3' (UTR 3') de ARNm diana, que causan la represión traduccional del gen diana o la degradación del ARNm diana (Bartel, 2004, *Cell.* 116, 281; Mattick y Makunin, 2005, *Hum. Mol. Genet.* 14, 121; Humphreys et al., 2005, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 16961). Los miARN están implicados en una gama de procesos que incluye desarrollo y diferenciación (Chen et al., 2006, *Nat. Genet.*, 38, 228), proliferación y apoptosis (Cheng et al., 2005, *Nucleic Acids Res.* 33, 1290), y se han implicado en cáncer (Zhang et al., 2007, *Dev. Biol.* 302, 1). De forma interesante, más de la mitad de los genes miARN están localizados en sitios en el genoma humano que frecuentemente se amplifican, delecionan o reordenan en cáncer (Calin et al., 2004, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 2999), lo que sugiere que algunos miARN pueden actuar como oncogenes ('oncomirs', Esquela-Kerscher y Slack, 2006, *Nat. Rev. Cancer* 6, 259) o supresores tumorales (revisado en Zhang et al., 2007, *Dev. Biol.* 302, 1). Por ejemplo, una expresión reducida de la familia let-7 de miARN está asociada con expresión aumentada del oncogén Ras y supervivencia reducida en pacientes con cáncer pulmonar no microcítico (NSCLC) (Johnson et al., 2005, *Cell* 120, 635; Takamizawa et al., 2004, *Cancer Res.*, 64, 3753). En contraste, la expresión aumentada de miR-21 en gliomas (Chan et al., 2005, *Cancer Res.* 65, 6029), cánceres de mama, colon, pulmón, páncreas, próstata y estómago (Volinia et al., 2006, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103, 2257) está asociada con resistencia a apoptosis, quimiosensibilidad reducida y crecimiento aumentado del tumor (Chan et al., 2005, *Cancer Res.* 65, 6029; Si et al., 2006, *Oncogene*, 26, 2799).

40

Se han desarrollado enfoques computacionales para predecir dianas de miARN. Estos métodos han utilizado criterios tales como complementariedad entre ARNm diana y una región "semilla" con el miARN que se cree que es crítica para la especificidad de unión, y conservación de sitios predichos de unión a miARN a través de las UTR 3' de múltiples especies (revisado en Rajewsky, 2006, *Nat. Genet.*, 38, 8; Maziere y Enright, 2007, *Drug Discov. Today*, 12, 452). Se ha sugerido que los miARN pueden tener la capacidad de regular cientos o incluso miles de ARNm diana (Lewis et al., 2005, *Cell*, 120, 15) y que mucha parte de esta regulación podría suceder al nivel de descomposición de ARNm (Krutzfeldt, et al., 2005, *Nature*, 438, 685). Además, miARN específicos tienen el potencial de regular la expresión de varios miembros de una vía de señalización o proceso celular (Stark et al., 2003, *PLoS Biol.*, 1, 60). Sin embargo, la complementariedad imperfecta de las interacciones miARN:diana significa que la identificación y validación funcional de verdaderas dianas de miARN sigue siendo un reto principal.

50

Sumario

Los inventores han descubierto que una parte particular de la región no traducida 3' (UTR 3') del ARNm del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) controla la expresión y/o actividad del EGFR. Además, se han identificado especies de miARN que son capaces de modular la expresión y/o actividad del EGFR así como varios elementos posteriores asociados a EGFR. Estas capacidades significan que estas especies de miARN pueden desempeñar un papel regulador principal en la vía de señalización de EGFR así como una amplia gama de capacidad funcional en múltiples vías sintéticas celulares.

60

Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un agente que comprende un miARN capaz de interactuar con una secuencia expuesta en una cualquiera de las SEC ID N° 31 a 36 presentes en la región no traducida (UTR) 3' del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) de una molécula efectora posterior de la misma, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno seleccionados entre enfermedad renal, enfermedad pulmonar, enfermedad cardíaca, enfermedad cutánea, infección, cáncer pulmonar, cáncer gastrointestinal, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer

65

cerebral, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, cáncer esofágico y cáncer de cabeza y cuello.

5 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un agente que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en: SEC ID N° 37 a 54, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno seleccionados entre enfermedad renal, enfermedad pulmonar, enfermedad cardíaca, enfermedad cutánea, infección, cáncer pulmonar, cáncer gastrointestinal, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cerebral, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, cáncer esofágico y cáncer de cabeza y cuello, donde: el agente comprende un miARN capaz de interactuar con una secuencia expuesta en una cualquiera de las SEC ID N° 31 a 36 presente en la UTR 3' de EGFR y una molécula efectora posterior.

15 Se exponen realizaciones preferidas de la invención en sus dos aspectos mencionados anteriormente en las reivindicaciones dependientes adjuntas con la presente 2-8 y 10-15.

20 En algunas realizaciones, el precursor de miARN se procesa en una célula después de transfección para firmar una molécula de ácido nucleico que tenga una secuencia de al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en la secuencias expuestas en las SEC ID N° 20 a 36. En realizaciones adicionales, el vector comprende un promotor y otras secuencias reguladoras que están unidas de forma funcional para posibilitar que se exprese el miARN.

25 Además, la presente descripción proporciona un método para modular la expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en una célula que comprende poner en contacto dicha célula con un agente capaz de alterar directa o indirectamente la expresión endógena de al menos una molécula de ácido nucleico codificada por una secuencia que tiene una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias expuestas en la SEC ID N° 20 a 36.

30 En algunas realizaciones, el agente aumenta la expresión endógena de al menos una molécula de ácido nucleico que codifica una especie de miARN, donde la expresión de EGFR está reducida en comparación con el nivel de expresión antes de poner en contacto el agente con la célula.

35 En algunas realizaciones, el agente comprende una molécula de ácido nucleico, que se une específicamente a un ARNm codificado por al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias expuestas en la SEC ID N° 1-36. En algunas realizaciones, el agente comprende una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias expuestas en la SEC ID N° 37 a 54, donde la molécula de ácido nucleico disminuye el nivel de expresión de EGFR o molécula similar. El agente puede comprender adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable. El agente puede ser adecuado para su uso en el tratamiento o prevención de cáncer, tal como un cáncer cerebral, cáncer pulmonar, cáncer de mama, cáncer de próstata, o cáncer de colon. En algunas realizaciones, el cáncer cerebral es glioma.

45 Además, la presente descripción proporciona el uso de un agente que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad con al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias expuestas en la SEC ID N° 37 a 54 o un compuesto capaz de modular directa o indirectamente la expresión endógena de al menos una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias expuestas en la SEC ID N° 37 a 54, para modular la expresión de EGFR por una célula. En algunas realizaciones, la expresión de EGFR está disminuida.

50 Además, la presente descripción proporciona un método para modular el crecimiento de una célula que expresa EGFR, que comprende la etapa de poner en contacto dicha célula con un agente que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad con al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias expuestas en la SEC ID N° 37 a 54 o un compuesto capaz de alterar directa o indirectamente la expresión endógena de al menos una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias expuestas en la SEC ID N° 37 a 54, modulando de este modo el crecimiento de la célula.

60 Además, la presente descripción proporciona un método para modular la diferenciación de una célula que expresa EGFR, que comprende la etapa de poner en contacto dicha célula con un agente que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad con al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias expuestas en la SEC ID N° 37 a 54 o un compuesto capaz de alterar directa o indirectamente la expresión endógena de al menos una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias expuestas en la SEC ID N° 37 a 54, modulando de este modo la diferenciación de la célula.

65

Además, la presente descripción proporciona el uso de un agente que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad con al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias expuestas en la SEC ID N° 37 a 54 o un compuesto capaz de alterar directa o indirectamente la expresión endógena de al menos una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias expuestas en la SEC ID N° 37 a 54 para modular el crecimiento de una célula que expresa EGFR.

Además, la presente descripción proporciona el uso de un agente que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad con al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias expuestas en la SEC ID N° 37 a 54 o un compuesto capaz de alterar directa o indirectamente la expresión endógena de al menos una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias expuestas en la SEC ID N° 37 a 54, para modular la diferenciación de una célula que expresa EGFR.

Además, la presente descripción proporciona un método de diagnóstico de una enfermedad o de un trastorno asociados a un nivel anormal de expresión de EGFR en un sujeto, que comprende la etapa de determinar el nivel de expresión de al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias expuestas en la SEC ID N° 37-54 en el sujeto y comparar dicho nivel de expresión con un nivel de expresión de referencia.

Además, la presente descripción proporciona un método de pronóstico de una enfermedad o de un trastorno asociados a un nivel anormal de expresión de EGFR en un sujeto, que comprende la etapa de determinar el nivel de expresión de al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias expuestas en la SEC ID N° 37-54 en el sujeto y comparar dicho nivel de expresión con un nivel de expresión de referencia.

Además, la presente descripción proporciona el uso de un agente que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad con al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias expuestas en la SEC ID N° 37 a 54 o un compuesto capaz de alterar directa o indirectamente la expresión endógena de al menos una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias expuestas en la SEC ID N° 37 a 54, para la preparación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad o un trastorno asociados a un nivel anormal de expresión de EGFR.

Además, la presente descripción proporciona el uso de un agente que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad con al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias expuestas en la SEC ID N° 37 a 54 o un compuesto capaz de alterar directa o indirectamente la expresión endógena de al menos una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias expuestas en la SEC ID N° 37 a 54, para el diagnóstico de una enfermedad o un trastorno asociados a un nivel anormal de expresión de EGFR.

Además, la presente descripción proporciona el uso de un agente que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad con al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias expuestas en la SEC ID N° 37 a 54 o un compuesto capaz de alterar directa o indirectamente la expresión endógena de al menos una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias expuestas en la SEC ID N° 37 a 54, para el pronóstico de una enfermedad o un trastorno asociados a un nivel anormal de expresión de EGFR.

Además, la presente descripción proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad o un trastorno asociados a un nivel anormal de expresión de EGFR en un sujeto mamífero, que comprende la etapa de administrar al sujeto un agente que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que tiene al menos aproximadamente un 90 % de identidad con al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias expuestas en la SEC ID N° 37 a 54 o un compuesto capaz de alterar directa o indirectamente la expresión endógena de al menos una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias expuestas en la SEC ID N° 37 a 54.

La enfermedad que puede tratarse de acuerdo con la presente descripción puede ser cáncer, tal como un cáncer cerebral, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, o cáncer de colon. En algunas realizaciones el cáncer es glioma.

El tratamiento de acuerdo con la presente descripción puede comprender adicionalmente la administración de un segundo agente, tal como un anticuerpo monoclonal anti-EGFR o un inhibidor de tirosina quinasa de EGFR. En algunas realizaciones, el inhibidor de tirosina quinasa de EGFR es erlotinib o gefitinib.

Además, la presente descripción proporciona un método para seleccionar un agente o compuesto capaz de modular la expresión endógena de miARN, que comprende la etapa de:

- (i) proporcionar una construcción que comprenda al menos una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias expuestas en la SEC ID N° 1 a 36 unida de forma funcional a una molécula indicadora, donde dicho indicador produce una señal detectable; y
- (ii) poner en contacto dicha construcción con un compuesto de ensayo o agente en condiciones adecuadas para unirse entre la al menos una molécula de ácido nucleico y el compuesto y/o agente, donde la unión entre la molécula y el compuesto de ensayo o agente reduce la señal detectable.

Breve descripción de las figuras

- 10 La Figura 1 muestra el ARNm de la UTR 3' de EGFR no conservada que contiene sitios diana para la unión específica de miR-7. Usando el software TargetScan™ se predijeron tres sitios de unión a miR-7 (A, B, C) en la UTR 3' del ARNm de EGFR humano.
- 15 La Figura 2 muestra la alineación de secuencia de dianas putativas de miR-7 en la UTR 3' del ARNm de EGFR que muestra que los sitios A, B, C no están conservados entre ser humano, ratón y rata. La secuencia diana semilla de miR-7 (UCUUC) se muestra en negrita y subrayada, y los nucleótidos conservados están sombreados.
- 20 La Figura 3 muestra una representación esquemática de construcciones indicadoras de luciferasa para diana consenso de miR-7 y sitios diana de miR-7 en UTR 3' de EGFR.
- La Figura 4 muestra la secuencia de sitios diana de miR-7 en UTR 3' del ARNm de EGFR de tipo silvestre (WY) y mutante (MT).
- 25 La Figura 5 muestra células HeLa que se transfectaron con construcción de luciferasa de UTR 3' diana de miR-7 consenso y miR-7 o precursor de miR-NC. Los valores de expresión relativa de luciferasa (luciérnaga normalizada con renilla) se expresan como una proporción de vector indicador solamente (\pm DT).
- 30 La Figura 6 muestra células A549 que se transfectaron con indicador de UTR 3' de sitio diana A, B, C o D de EGFR WT o MT junto con precursor de miR-7 o miR-NC. Los valores de expresión relativa de luciferasa (luciérnaga normalizada con renilla) son la proporción de vector indicador tratado con miR-7 en comparación con vector indicador tratado con miR-NC (\pm DT).
- 35 La Figura 7 muestra que miR-7 regula la expresión de EGFR y altera la progresión del ciclo celular y la viabilidad de células NSCLC A549. El panel A muestra células A549 que se transfectaron con miR-7 o precursor de miR-NC y ARN aislado a las 12 horas para análisis semi-cuantitativo por RT-PCR de expresión de ARNm de EGFR y β -actina. El panel B muestra la inmunotransferencia de EGFR y β -actina usando 15 μ g de extractos de proteína citoplasmática de células A549 y MDA-MB-468 transfectadas con miR-7 o miR-NC durante 3 días.
- 40 La Figura 8 muestra los resultados del análisis de ciclo celular de células de cáncer pulmonar A549 tratadas con miR-7 o miARN sin sentido (miR-NS). El panel A muestra los resultados del análisis de ciclo celular de células de cáncer pulmonar A549 tratadas con miR-7 o miARN sin sentido (miR-NS). El panel B muestra las mismas células analizadas por microscopía óptica que muestra que miR-7 induce muerte celular extendida.
- 45 La Figura 9 muestra que miR-7 regula la expresión de Raf1 mediante unión específica a la UTR 3' del ARNm de Raf1. Validación por qRT-PCR de la expresión de ARNm de Raf1 después de transfección de células A549 durante 24 horas con miR-7 o miR-NC. Los valores son cambio factorial (\pm DT) en la expresión del ARNm de Raf1 respecto a la expresión del ARNm de GAPDH entre muestras triplicadas de miR-NC y miR-7.
- 50 La Figura 10 muestra que la UTR 3' del ARNm de Raf1 contiene sitios diana semilla conservados (C) y no conservados (NC) para la unión de miR-7.
- La Figura 11 muestra células A549 transfectadas con vector indicador de UTR 3' de Raf1-luciferasa WT o MT y miR-7 o miR-NC. Los valores son expresión relativa de luciferasa (luciérnaga normalizada con renilla) como una proporción de células transfectadas con miR-NC (\pm DT).
- 55 La Figura 12 muestra un gráfico del efecto del ARN mir-7 precursor o de control sobre pGL-3-Raf1 en células A549.
- 60 La Figura 13 muestra la identificación de vías funcionales enriquecidas para genes diana miR-7. Las vías KEGG enriquecidas significativamente para genes regulados negativamente en células A549 por transfección con miR-7 en comparación con transfección con miR-NC incluyen: "Glioma", "vía de señalización de ErbB", "vía de señalización de GnRH", "potenciación a largo plazo", y "unión comunicante". $Z > 1,96$ para $p < 0,05$.
- 65 La Figura 14 muestra una alineación de las secuencias de ADNC que codifica las UTR 3' de EGFR para varias especies de mamífero.

Descripción detallada de realizaciones preferidas

Antes de describir la invención en detalle, debe entenderse que no está limitada a métodos particularmente ejemplificados y puede, por supuesto, variar. También debe entenderse que la terminología usada en este documento es con el fin de describir realizaciones particulares de la invención solamente, y no pretende ser limitante de lo que estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente citadas en este documento, sea supra o infra, se mencionan en su totalidad. Las publicaciones mencionadas en este documento se citan con el fin de describir y divulgar los protocolos y reactivos que se presentan en las publicaciones y que podrían usarse en relación con la invención.

Además, la práctica de la presente invención emplea, salvo que se indique otra cosa, biología molecular y farmacología convencional dentro de las habilidades de la técnica. Dichas técnicas son bien conocidas para los especialistas en la técnica, y se explican completamente en la bibliografía. Véase, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª Ed., (ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); "Nucleic Acid Hybridization", (Hames y Higgins eds. 1984); "Oligonucleotide Synthesis" (Gait ed., 1984); Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª Edición, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania, EEUU; "The Merck Index", 12ª Edición (1996), Therapeutic Category and Biological Activity Index; y "Transcription & Translation", (Hames y Higgins eds. 1984).

Durante toda la memoria descriptiva, la palabra "comprender" y variaciones de la palabra, tales como "que comprende" y "comprende", significa "incluyendo aunque sin limitación" y no pretende excluir otros aditivos, componentes, enteros o etapas. Por "que consiste en" se entiende incluyendo, y limitado a, lo que sea que sigue a la expresión "que consiste en". Por tanto, la expresión "que consiste en" indica que los elementos enumerados son necesarios o imperativos, y que no pueden estar presentes otros elementos. Por "que consiste esencialmente en" se entiende incluyendo cualquier elemento enumerado después de la expresión, y limitado a otros elementos que no interfieren con o contribuyen a la actividad o acción especificada en la descripción para los elementos enumerados. Por tanto, la expresión "que consiste esencialmente en" indica que los elementos enumerados son necesarios o imperativos, pero que no otros elementos son opcionales y pueden estar presentes o no dependiendo de si afectan a no a la actividad o acción de los elementos enumerados.

Debe apreciarse que como se usa en este documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen referencias plurales salvo que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, una referencia a "una molécula de ácido nucleico" incluye una pluralidad de moléculas de ácido nucleico, y una referencia a "una célula" es una referencia a una o más células, y similares. Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tiene los mismos significados que los comprendidos habitualmente por un especialista en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque puede usarse cualquier material y método similar o equivalente a los descritos en este documento para practicar o ensayar la presente invención, ahora se describen los materiales y métodos preferidos.

En uno de sus aspectos más amplios, la presente descripción se refiere al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). El EGFR es un miembro de la familia del receptor erbB y se expresa ampliamente en tejidos de mamífero y regula importantes procesos celulares incluyendo proliferación, diferenciación y desarrollo (Yano et al., 2003, Anticancer Res. 23, 3639). El gen que codifica EGFR en este documento después mencionado como "gen de EGFR" es bien conocido en la técnica. Ejemplos no limitantes de genes de EGFR incluyen las secuencias descritas en los números de acceso a GenBank XM_001156439.1 (*Pan troglodytes*), XM_001156495.1 (*Pan troglodytes*), XM_001156546.1 (*Pan troglodytes*), XM_519102.2 (*Pan troglodytes*), NM_005228.3 (*Homo sapiens*), AY588246.1 (*Homo sapiens*), AC073324.6, (*Homo sapiens*), AC146013.2 (*Pan troglodytes*), AF288738.1 (*Homo sapiens*), X00588.1 (*Homo sapiens*) y NM_214007.1 (*Sus scrofa*). Por tanto, la expresión "EGFR o molécula similares", como se usa en este documento, se refiere a un gen capaz de transcribir un transcrito de ARNm que tiene homología sustancial con un ARNm transcrito a partir de uno cualquiera de los genes para EGFR expuestos en una cualquiera de las secuencias anteriores mostradas en Genbank.

En algunas realizaciones de la presente invención el término "EGFR" se refiere a la región no traducida (UTR) 3'del ARNm que codifica EGFR. En estas realizaciones, la UTR 3'del ARNm de EGFR está codificada por al menos una de las secuencias seleccionadas entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 1 a 36 o una secuencia con un alto grado de identidad de secuencia con las mismas. Como puede observarse a partir de la Figura 14, el ADNc que codifica las UTR 3' del ARNm de EGFR de varias especies de mamífero tiene un alto grado de identidad de secuencia. La expresión "identidad de secuencia" o "porcentaje de identidad de secuencia" puede determinarse comparando dos secuencias o subsecuencias alineadas de forma óptima sobre una ventana o tramo de comparación, donde la parte de la secuencia polinucleotídica en la ventana de comparación puede comprender opcionalmente adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o deleciones) para una alineación óptima de las dos secuencias.

La identidad y similitud de moléculas de ácido nucleico relacionadas puede calcularse fácilmente por métodos conocidos. Dichos métodos incluyen, aunque sin limitación, los descritos en Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Parte 1, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M. Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo et al., SIAM J. Applied Math. 48:1073, 1988.

Los métodos preferidos para determinar la identidad y/o similitud están diseñados para dar la mayor coincidencia entre las secuencias ensayadas. Los métodos para determinar la identidad y similitud se describen en programas informáticos disponibles al público. Los métodos preferidos de los programas informáticos para determinar la identidad y similitud entre dos secuencias incluyen, aunque sin limitación, el paquete de programas GCG, incluyendo GAP (Devereux et al., Nucl. Acid. Res., 12:387, 1984; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul et al., J. Mol. Biol., 215:403-410, 1990). El programa BLASTX está disponible al público en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul et al. NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul et al., *supra*). También puede usarse el bien conocido algoritmo de Smith Waterman para determinar la identidad.

Los parámetros preferidos para la comparación de secuencias de moléculas de ácido nucleico incluyen los siguientes:

Algoritmo: Needleman y Wunsch, J. Mol Biol. 48:443-4, 1970

Matriz de comparación: apareamiento=+10, desappareamiento=0

Penalización por hueco: 50

Penalización por longitud de hueco: 3

El programa GAP también es útil con los parámetros anteriores. Los parámetros mencionados anteriormente son los parámetros por defecto para comparaciones de moléculas de ácido nucleico.

Los especialistas en la técnica pueden usar otros algoritmos ejemplares, penalizaciones por abertura de hueco, penalizaciones por extensión de hueco, matrices de comparación, umbrales de similitud, etc., incluyendo aquellos expuestos en el Program Manual, Wisconsin Package, Versión 9, Septiembre, 1997. Las elecciones particulares a hacer serán evidentes para los especialistas en la técnica y dependerán de la comparación específica a hacer.

Normalmente, la secuencia que codifica la UTR 3' del ARNm de EGFR o molécula similar de acuerdo con la presente invención mostrará al menos un 70 %, preferiblemente un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad de secuencia con una o más de las secuencias mostradas en las SEC ID N° 1 a 36. Más particularmente, la secuencia que codifica la UTR 3' del ARNm de EGFR o molécula similar mostrará un 100 % de identidad de secuencia con una o más de las secuencias mostradas en las SEC ID N° 20-36. Por tanto, la expresión "UTR 3'" como se usa en este documento, se refiere a la secuencia que codifica cualquiera de las UTR 3' de ARNm de EGFR tales como las mostradas en las SEC ID N° 1 a 36 o molécula similar, es decir, una molécula que comprende una secuencia con una elevada identidad de secuencia con una o más de las secuencias mostradas en las SEC ID N° 1 a 36 o cualquier molécula con un alto grado de identidad de secuencia con estas secuencias.

En algunas realizaciones, la UTR 3' del EGFR comprende un "motivo UTR 3'" que es una secuencia específica contenida dentro de las secuencias mostradas en las SEC ID N° 1 a 19. Por ejemplo, como se muestra en los Ejemplos supra, los inventores han identificado que partes o regiones particulares de la UTR 3' del ARNm de EGFR o molécula similar comprenden motivos que tienen altos grados de identidad de secuencia. Ejemplos no limitantes de estos motivos incluyen las secuencias mostradas en las SEC ID N° 31-36. Estos motivos codifican sitios de unión para especies específicas de miARN.

Como se usa en este documento, una "molécula de miARN" o "especie de miARN" es una molécula pequeña de ARN, normalmente de aproximadamente 20 a 25 nucleótidos, codificada por el genoma de un animal o producida sintéticamente con una secuencia que corresponde a una codificada por el genoma del animal. Como se usa en este documento, las moléculas de miARN pueden ser monocatenarias o bicatenarias (también conocidas como ARNip pero incluidas dentro del alcance de esta invención). En algunas realizaciones de la invención el miARN es una molécula monocatenaria de miARN.

Las moléculas de microARN regulan la expresión de su diana o dianas mediante uno de dos mecanismos: por unión perfecta o casi perfecta a la diana de ARNm e inducción de complejo de silenciamiento inducido por ARN multiproteína, asociado a miARN (miRISC), que provoca la descomposición acelerada del ARNm, o por unión menos perfecta al ARNm diana e inhibición de la transcripción a través de un complejo RISC similar a, o idéntico a, el complejo reclutado en interferencia de ARN (iARN).

En algunas realizaciones, las moléculas de miARN de la presente invención tienen las secuencias mostradas en las SEC ID N° 37-54. En algunas realizaciones de la presente invención, estas especies de miARN se llaman "miR-7". Sin el deseo de limitarse a teoría o hipótesis alguna, la invención se basa en el descubrimiento de que la especie particular de miARN, por ejemplo, miR-7, se une específicamente a la UTR 3' de ARNm que codifica el EGFR o molécula similar. Además, los inventores han descubierto sorprendentemente que la sobre-expresión de estos miARN como miR-7 en células cancerosas con elevada de expresión de EGFR provoca un nivel reducido de expresión de ARNm y proteína EGFR, detención del ciclo celular en fase G1 y muerte celular.

En algunas realizaciones, la especie de ARNm tiene la secuencia 5' UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUG 3' (SEC ID N° 48) e incluye moléculas con al menos un 90 % de identidad de secuencia con la SEC ID N°48.

En otras realizaciones, la especie de miARN tiene al menos un 95 % de identidad de secuencia con la SEC ID N° 48. En otras realizaciones, la especie de miARN tiene al menos un 98 % de identidad de secuencia con la SEC ID N° 48. En otras realizaciones más, la especie de miARN tiene al menos un 99 % de identidad de secuencia con la SEC ID N° 49.

Además de unirse a la UTR 3' del ARNm de EGFR, los inventores han demostrado que cualquier molécula de ARNm que comprenda el motivo de UTR 3' CTCTTCCA (SEC ID N° 31), CTTTTCCA (SEC ID N° 32), CTCTTGTA (SEC ID N° 33), GTCTTCCA (SEC ID N° 34), GTCTTCCA (SEC ID N° 35) o GTTTTCTG (SEC ID N° 36) es capaz de unirse a la especie de miARN de la presente invención. De hecho, la serina/treonina quinasa *Raf-1* (homólogo 1 del oncogén viral de leucemia murina), un regulador clave en muchas vías de crecimiento y desarrollo, es capaz de unirse a miR-7. La regulación de *Raf-1* es un proceso intrincado de múltiples etapas que implica cambios en la localización subcelular de *Raf-1* y cambios en interacciones proteína-proteína en respuesta a eventos de fosforilación.

Además de la molécula miR-7 de longitud completa, tal como la mostrada en la SEC ID N° 48, el término "miR-7" también incluye fragmentos de una molécula miR-7 con la condición de que los fragmentos sean fragmentos funcionales. El término "fragmento" de una molécula de miARN significa una parte de la molécula de longitud completa. El tamaño del fragmento se limita solamente en que debe ser un fragmento funcional, es decir, capaz de modular la expresión de EGFR, modular el crecimiento celular, y/o modular la diferenciación celular. Normalmente, comprenderá al menos la secuencia mostrada en la SEC ID N° 54.

Como se ha mencionado anteriormente, los inventores han encontrado sorprendentemente que la expresión de EGFR puede modularse usando un agente para interaccionar directa o indirectamente con la UTR 3' del ARNm de EGFR o molécula similar. El término "agente" comprende cualquier molécula de ácido nucleico, que sea capaz de interaccionar por ejemplo unirse, a la UTR 3' del ARNm de EGFR o molécula similar.

El término "modulador", "modulación", "modulante" y equivalentes gramaticales usados en el presente documento se refieren al agente descrito en este documento que es capaz de afectar directa o indirectamente a la actividad o nivel de expresión de EGFR o molécula similar de modo que la actividad o expresión esté alterada en comparación con la actividad o expresión "de tipo silvestre", es decir, la actividad o expresión antes de ponerse en contacto con un agente de la presente invención. El término "indirectamente" se refiere al modo de acción de un agente, donde el efecto está mediado mediante una molécula intermediaria en lugar de a través de contacto directo con la UTR 3'. En contraste, el término "directamente" se refiere a un agente que interacciona con la UTR 3' del ARNm de EGFR o molécula similar mediante, por ejemplo, unión a la UTR 3'.

En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para modular la expresión de EGFR en una célula poniendo en contacto la célula con un agente, por ejemplo, especie de miARN como se define en este documento. El término "célula" se refiere a cualquier tipo de célula que expresa EGFR o molécula similar. Ejemplos de células que expresan EGFR incluyen células cancerosas, células pulmonares, células óseas, células sanguíneas, y células cutáneas. La célula puede aislarse o purificarse de un sujeto mamífero, puede estar localizada en una muestra de un sujeto, o puede estar localizada en o sobre un sujeto.

El término "muestra" como se usa en este documento incluye cualquier material biológico de un sujeto que contiene una célula que comprende moléculas de ácido nucleico que codifican EGFR. En algunas realizaciones, la muestra es un tejido, o fluido tal como médula ósea, plasma, suero, fluido medular, fluid linfático, las secciones de los tractos respiratorio, intestinal, o genitourinario, lágrimas, saliva, leche, sangre completa, tumores, órganos. En algunas realizaciones la muestra es sangre.

El contacto de la célula y los agentes, por ejemplo, la especie de miARN puede conseguirse por cualquier método conocido en la técnica. En algunas realizaciones, la célula se ha aislado del sujeto y la combinación de la célula y la especie de miARN o un fragmento funcional del mismo, o una molécula de ácido nucleico antisentido al mismo, o un antagonista o anticuerpo que se une específicamente al miARN, o compuesto que modula la transcripción del ADN que codifica la especie de miARN sucede *in vitro*. En otras realizaciones la célula no se ha aislado del sujeto y el contacto de la célula y la especie de miARN etcétera sucede *in vivo*. El agente puede ponerse en contacto con la célula directamente, es decir, aplicarse directamente a una célula que requiere modulación de EGFR. Como

alternativa, el agente puede combinarse con la célula indirectamente, por ejemplo, inyectando la especie de miARN en el torrente sanguíneo de un sujeto, que después transporta la especie de miARN a la célula que requiere modulación de EGFR.

5 En algunas realizaciones de la presente descripción, el agente de la presente invención se pone en contacto con una célula, donde los niveles endógenos de una o más especies de miARN de la presente invención se expresan de forma diferente en comparación con la célula antes del contacto con el agente. El término "endógeno" como se usa en este documento se refiere a los niveles "de origen natural" de expresión y/o actividad de, por ejemplo, una o más de las especies de miARN de la presente invención (por ejemplo, SEC ID N° 37-54). En estas realizaciones, los compuestos o composiciones pueden ponerse en contacto con células de modo que la expresión y/o actividad de la especie de miARN de la presente invención se aumente o disminuya en comparación con los niveles "de origen natural" de una o más especies de miARN de la presente invención (por ejemplo, SEC ID N° 37-54) y/o actividad del miARN en comparación con los niveles de tipo silvestre y/o normales.

10
15 Cuando las especies de miARN se administran a un sujeto, en algunas realizaciones esto es mediante un enfoque basado en vector (por ejemplo viral), o por administración del miARN en forma de una proteína de fusión donde el miARN está unido a un fragmento de anticuerpo protamina-Fab que dirige el miARN a células de interés, es decir, células que expresan especies de miARN de la presente invención.

20 Como alternativa, puede retirarse una muestra de un sujeto y combinarse con el miARN *in vitro* antes de devolver al menos una parte de la muestra de vuelta al sujeto. Por ejemplo, la muestra puede ser una muestra de sangre que se retira de un sujeto y se combina con el miARN antes de inyectar al menos una parte de la sangre de vuelta en el sujeto.

25 En algunas realizaciones de la invención, la combinación de la especie de miARN modula el nivel de expresión de la molécula EGFR. La expresión "nivel de expresión" se refiere al nivel de traducción de una molécula de ARNm y también abarca la ausencia de expresión.

30 El nivel de expresión de EGFR puede estar aumentado en comparación con el nivel en una muestra que no se ha combinado con una especie de miARN de la presente invención. Como alternativa, el nivel de expresión de una molécula de ácido nucleico puede estar disminuido en comparación con el nivel en una muestra de un sujeto que no se ha combinado con una especie de miARN de la presente invención.

35 EGFR se une a EGF, TGF- α , y otras proteínas relacionadas, lo que conduce a la generación de señales proliferativas y de supervivencia dentro de la célula. Se encuentra en la superficie de algunas células y, cuando se une por EGF, causa que las células crezcan y se diferencien. Por tanto, en algunas realizaciones la presente descripción proporciona un método para modular el crecimiento celular. Como se usa en este documento el término "crecimiento celular" significa crecimiento de una célula en número, tal como por reproducción de una célula precursora para producir células hijas, y/o crecimiento en tamaño.

40 En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un método para modular la diferenciación celular. Como se usa en este documento la expresión "diferenciación celular" se refiere a un proceso por el cual un tipo celular inmaduro, relativamente joven alcanza una forma y/o función especializada.

45 EGFR se encuentra a niveles anormales sobre la superficie de muchos tipos de células, incluyendo células cancerosas. Por tanto, en algunas realizaciones, la invención proporciona la administración de especies de miARN de la presente invención para tratar o prevenir una enfermedad o un trastorno asociados a un nivel anormal de expresión de EGFR por un sujeto.

50 La especie de miARN de la presente invención puede administrarse por cualquier medio y puede administrarse en combinación con uno o más agentes terapéuticos diferentes e incluye administración simultánea (concurrente) y consecutiva en cualquier orden de la especie de miARN y otro u otros agentes terapéuticos.

55 El otro u otros agentes terapéuticos usados dependerán de la enfermedad o el trastorno a tratar o prevenir. Sin embargo, por ejemplo, cuando la enfermedad es un glioma, los otros agentes terapéuticos adecuados incluyen erlotinib (Tarecva), o gefitinib (Iressa o ZD1839), 17-AAG (inhibidor de Hsp90), ZD6474, y sorafenib (Nexavar). Como alternativa o adicionalmente, el miARN puede administrarse simultánea y/o consecutivamente en cualquier orden con un agente que contrarresta los efectos secundarios de miARN.

60 La especie de miARN de la presente invención puede administrarse mediante cualquier vía adecuada, y los especialistas en la técnica serán fácilmente capaces de determinar la vía y dosis más adecuada para la afección a tratar. La dosificación será a juicio del médico o veterinario asistente, y dependerá de la naturaleza y estado de la afección a tratar, la edad y estado general de salud del sujeto a tratar, la vía de administración, y cualquier tratamiento previo que pueda haberse administrado.

65

La especie de miARN puede administrarse a un sujeto periódica o repetidamente, y puede administrarse en forma de una composición farmacéutica.

5 Los métodos y vehículos farmacéuticos para la preparación de composiciones farmacéuticas son bien conocidos en la técnica, como se expone en libros de texto tales como Remington's Pharmaceutical Sciences, 20ª Edición, Williams y Wilkins, Pennsylvania, EEUU. El vehículo dependerá de la vía de administración, y de nuevo los especialistas en la técnica serán fácilmente capaces de determinar la formulación más adecuada para cada caso particular.

10 La composición puede estar en cualquier forma adecuada para su uso deseado. Por ejemplo, dependiendo de la enfermedad o el trastorno, la composición puede estar en forma de una loción, suspensión, solución, pulverización, emulsión, gel, tónico capilar, champú, gelatina, supositorio o enema de retención, pesario, tampón, pasta, espuma, colirio, poción, pomada, jabón líquido, crema, jabón sólido, elixir bucal, pastilla o gragea. Los especialistas en la
15 técnica serán fácilmente capaces de formular la composición de modo que esté en una forma adecuada para su uso pretendido.

La administración de la especie de miARN puede tratar o prevenir una enfermedad o un trastorno de un sujeto asociados a un nivel anormal de expresión de EGFR. Como se usa en este documento los términos "tratamiento" y "prevención" significan cualquier tratamiento o prevención de una enfermedad o un trastorno en un sujeto mediante
20 la administración de miARN al sujeto. "Tratamiento" y "prevención" incluyen: (a) inhibición de la enfermedad o el trastorno, es decir, detención de su desarrollo; o (b) alivio o mejora de los síntomas de la enfermedad o el trastorno, es decir, causa regresión de los síntomas de la enfermedad o el trastorno. El efecto puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de la enfermedad o el trastorno.

25 En algunas realizaciones, el miARN puede usarse en el diagnóstico de una enfermedad o un trastorno asociados a un nivel anormal de expresión de EGFR. El término "diagnóstico" significa el proceso de identificar una enfermedad o un trastorno por sus síntomas, mediante ensayos de laboratorio (incluyendo ensayos genotípicos) o a través de hallazgos físicos. En algunas realizaciones, la identificación de, por ejemplo, miR-7 en una muestra de un sujeto puede usarse en el diagnóstico de una enfermedad asociada con el miARN.

30 En algunos aspectos de la presente descripción, la especie de miARN de la presente invención puede usarse para determinar el pronóstico de una enfermedad o un trastorno asociados a un nivel anormal de expresión de EGFR. Se aceptará que el término "pronóstico" significa un indicado de la probabilidad de progresión de una enfermedad o un trastorno diagnosticados en un sujeto o la probabilidad de que un sujeto desarrolle la enfermedad o el trastorno. Por
35 ejemplo, dependiendo del nivel de expresión de miR-7, un sujeto podría identificarse como probable de desarrollar una enfermedad o un trastorno particulares.

"Enfermedad" como se usa en este documento es un término general usado para hacer referencia a cualquier desviación en la salud que un sujeto padece y que está asociada con un nivel anormal de expresión de EGFR. Un
40 "trastorno" se refiere a un funcionamiento anormal de una función o parte del organismo de un sujeto y que está asociado a un nivel anormal de expresión de EGFR.

La enfermedad o el trastorno pueden ser cualquier enfermedad o trastorno asociados a un nivel anormal de expresión de EGFR, tal como un cáncer, enfermedad renal, enfermedad pulmonar, enfermedad cardiaca,
45 enfermedad cutánea o infección (tal como por un virus).

El término "cáncer" como se usa en este documento se refiere a cualquier crecimiento celular maligno o tumor causado por división celular anormal e incontrolada. Cualquier cáncer puede tratarse, prevenirse, o diagnosticarse usando un método de la invención ya que las moléculas de miARN se asocian con células cancerosas.

50 Ejemplos de cáncer incluyen, aunque sin limitación, cáncer pulmonar microcítico, cáncer pulmonar no microcítico, cáncer gastrointestinal, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, carcinoma esofágico, y diversos tipos de cáncer de cabeza y cuello. Los cánceres preferidos para tratamiento de acuerdo con algunas realizaciones de la invención son glioma,
55 cáncer de mama, colon, pulmón, y próstata.

El sujeto que se trata de acuerdo con algunos aspectos de la presente descripción puede ser un sujeto de cualquier especie de animal mamífero, ya que los miARN se encuentran en numerosas especies de animales. Por ejemplo, se han identificado cientos de miARN en ratones y seres humanos.

60 En algunos aspectos de la presente descripción, el sujeto es un ser humano o un mamífero de importancia económica y/o importancia social para los seres humanos, por ejemplo, carnívoros diferentes a los seres humanos (tales como gatos y perros), porcinos (cochinillos, cerdos, y jabalíes), ruminantes (tales como ganado bovino, bueyes, ovejas, jirafas, ciervos, cabras, bisontes, y camellos) y caballos. El término no indica una edad particular. Por tanto,
65 se pretende cubrir sujetos tanto adultos como recién nacidos.

En algunos aspectos de la presente descripción, pueden obtenerse compuestos que son capaces de modular la transcripción de ADN que codifica una o más de las especies de miARN o afectar los niveles endógenos de expresión y/o actividad de la una o más de las especies de miARN definidas en este documento mediante técnicas de selección.

Por tanto, la presente descripción proporciona metodologías de selección útiles en la identificación de proteínas y otros compuestos que se unen a, o interaccionan directamente de otro modo con, la especie de miARN de la presente invención. Las metodologías de selección son bien conocidas en la técnica (véase por ejemplo, la publicación internacional PCT N° WO 96/34099, publicada el 31 de octubre de 1996, que se incorpora por referencia en este documento en su totalidad). Las proteínas y compuestos incluyen componentes celulares endógenos que interaccionan con la especie de miARN *in vivo* y que, por lo tanto, pueden proporcionar nuevas dianas para intervenciones farmacéuticas y terapéuticas, así como compuestos recombinantes, sintéticos, y exógenos de otro modo que puede tener capacidad de unión y, por lo tanto, pueden ser candidatos para agentes farmacéuticos. Por tanto, en una serie de realizaciones, pueden seleccionarse lisados celulares u homogeneizados tisulares para proteínas u otros compuestos que se unen a una de las especies de miARN definidas en este documento.

Como alternativa, puede seleccionarse cualquiera de diversos compuestos exógenos, de origen natural y/o sintéticos (por ejemplo, bibliotecas de moléculas pequeñas o péptidos), para la capacidad de unión. Todos estos métodos comprenden la etapa de poner en contacto ácido nucleico que codifica la UTR 3' de EGFR o molécula similar, por ejemplo, SEC ID N° 1-11 como se define en este documento o una célula que expresa el mismo con compuestos de ensayo, dejar tiempo para que suceda cualquier unión o reacción, y ensayar cualquier complejo unido o actividad.

Los ensayos de selección de la presente descripción también abarcan selecciones de alto rendimiento y ensayos para identificar compuestos capaces de modular la expresión y/o actividad de la especie de miARN de la presente invención. De acuerdo con el aspecto de la presente descripción, los sistemas descritos a continuación pueden formularse en kits. Para este fin, pueden envasarse células que expresan construcciones que codifican, por ejemplo, una de las moléculas de ácido nucleico descritas en las SEC ID N° 1 a 11 unida de forma funcional a una molécula indicadora en diversos recipientes, por ejemplo, viales, tubos, placas de pocillos de microtitulación, frascos, y similares. Pueden incluirse otros reactivos en recipientes diferentes y proporcionarse con el kit; por ejemplo, muestras de control positivo, muestras de control negativo, tampones, medios de cultivo celular, etc.

En algunos aspectos de la presente descripción, los agentes de la presente invención que son capaces de regular los niveles endógenos de la especie de miARN y/o su actividad pueden identificarse inicialmente usando ensayos basados en células *in vitro*. Por ejemplo, puede proporcionarse un sistema tal como los genes indicadores Chroma-Luc™, Luc™ o GFP™ en múltiples formatos de vector de clonación diferentes. Las versiones de vector Basic son vectores indicadores de propósito general basados en el diseño, por ejemplo, del vector pGL3-Basic, que permite la clonación de la secuencia codificante de la UTR 3' por ejemplo la SEC ID N° 1 a 11 en el extremo 5' del gen indicador. La expresión de la actividad luciferasa, o cualquier gen indicador, en células transfectadas con este "vector de promotor pGL3" depende de compuestos que son capaces de inducir directa o indirectamente la expresión del indicador. Además de la configuración de vector básico, están disponibles otros sistemas tales como los genes Chroma-Luc™ en una configuración de vector que contiene un promotor de SV40 y potenciador de SV40, similar al vector de control pGL3. La presencia de las secuencias promotora y potenciadora de SV40 provoca la fuerte expresión de *luc+* en muchos tipos de células de mamífero. Por tanto esta tecnología y cualquier otra modificación del vector es adecuada para la rápida cuantificación en placas de múltiples pocillos y en aplicaciones de alto rendimiento para ensayar compuestos que son potencialmente capaces de modificar la expresión de miARN midiendo el gen indicador posterior. Estos compuestos identificados después pueden ensayarse en células. En general, cualquier luminómetro capaz de medir la luminiscencia filtrada debe ser capaz de realizar ensayos de doble color y cualquier científico especialista en la técnica puede reproducir estos ensayos.

La invención ahora se describirá adicionalmente a modo de referencia solamente a los siguientes ejemplos no limitantes. Debe entenderse, sin embargo, que los siguientes ejemplos son solamente ilustrativos, y no deben aceptarse de ningún modo como una restricción sobre la generalidad de la invención, que se define por las reivindicaciones adjuntas.

Ejemplo 1 Especificidad de especies de miARN miR-7 por EGFR en líneas celulares que sobre-expresan EGFR

EGFR se sobre-expresa en numerosos cánceres, incluyendo glioblastoma, cáncer de pulmón, y cáncer de mama. Por consiguiente, aspiramos a mostrar que una de las especies de miARN descritas en este documento (miR-7) era específica para EGFR en líneas celulares de glioblastoma, cáncer de pulmón, y cáncer de mama, y por lo tanto podría modular el nivel de expresión de EGFR, y que miR-7 podría usarse en el tratamiento de cánceres incluyendo glioblastoma, cáncer de pulmón, y cáncer de mama.

En vista del hallazgo de que la expresión de EGFR está regulada en parte mediante secuencias de estabilidad del ARNm de UTR 3' de acción en cis, buscamos identificar los miARN que podrían regular la expresión génica de EGFR en células humanas. Usando TargetScan (Lewis et al., 2005, *Cell*, 120, 15) se identificaron tres sitios diana

putativos de miR-7 (A, B, C; Figura 1). El extremo 3' de cada sitio contenía el motivo hexamérico UCUUCC complementario a la región semilla (nt. 2-7) en el extremo 5' de miR-7 humano (hsa-miR-7) (Figura 2). Aunque miR-7 se expresa normalmente en el cerebro, cristalino, pituitaria e hipotálamo, su expresión está significativamente disminuida en adenomas de pituitaria y en un panel de líneas celulares de cáncer del SNC respecto a tejido normal del SNC, lo que sugiere que puede funcionar como supresor tumoral en estos sistemas inhibiendo la expresión de oncogenes. De forma interesante, la UTR 3' de EGFR está mal conservada entre especies con diferencias de secuencia en cada uno de los tres sitios diana putativos de miR-7 entre seres humanos, ratón y rata (Figura 2). Los sitios de unión que no están conservados entre especies a menudo se ignoran en un intento por reducir la cantidad de falsos positivos en series de predicción de dianas. Sin embargo, la evolución de los miARN y sus ARNm diana sugiere que esta exclusión también podría aumentar la tasa de predicciones falsas negativas. En ratones, miR-7b regula la traducción del oncogén Fos mediante un sitio diana en UTR 3' que no está presente en el ARNm de Fos humano.

Para investigar la interacción putativa entre miR-7 y sus sitios diana predichos en UTR 3' del ARNm de EGFR, primero generamos vectores indicadores que contenían secuencias diana de miARN cadena debajo de la ORF de luciferasa (Figura 3). Se generó pGL3-miR-7-report ligando oligonucleótidos de ADN hibridados correspondientes a un sitio diana perfecto de hsa-miR-7 (5'-CAA CAA AAT CAC TAG TCT TCC A-3' (SEC ID N° 55) y 5'-TGG AAG ACT AGT GAT TTT GTT G-3' (SEC ID N° 56) a sitios únicos *Spel* y *Apal* que se insertaron 3' de la ORF de luciferasa del vector indicador de luciferasa de luciérnaga de control de pGL3 (Promega) (denominado pGL3-control-MCS; Giles, et al., 2003, J. Biol. Chem., 278, 2937). Los plásmidos indicadores de diana de EGFR de tipo silvestre (WT) pGL3-EGFR-A, -B, y -C se generaron clonando oligonucleótidos hibridados correspondientes a los nt. 4214-4260, nt. 4302-4348, y nt. 4585-4631, respectivamente, de la UTR 3' del ARNm de EGFR (número de acceso a GenBank NM_005228) en sitios *Spel* y *Apal* en pGL3-control-MCS. El plásmido pGL3-EGFR-D contenía una secuencia UTR 3' de EGFR generada por PCR que abarcaba los sitios diana predichos de miR-7 B y C. También se generaron indicadores mutantes (MT) que incluían tres sustituciones de nucleótidos para alterar la unión de la secuencia semilla de miR-7 a su diana. Los plásmidos pGL3-RAF1-WT y pGL3-RAF1-MT se construyeron clonando oligonucleótidos de ADN hibridados correspondientes a los nt. 2965-3030 de la UTR 3' del ARNm de Raf1 (número de acceso a GenBank NM_002880) en los sitios *Spel* y *Apal* en pGL3-control-MCS. La secuencia de todos los plásmidos se confirmó por secuenciación.

Se predijo un sitio diana con complementariedad perfecta a la secuencia de miR-7, la secuencias UTR 3' de EGFR (A, B, C, D) con sitios diana predichos de miR-7, y estas mismas secuencias con tres mutaciones puntuales en la región de apareamiento semilla para alterar la unión de miR-7 (Figura 4). Se obtuvieron las líneas celulares A549, MDA-MB-468, U87MG, U251MG y HeLa de la American Type Culture Collection (ATCC) y se cultivaron a 37 °C en CO₂ al 5 % con DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10 % y penicilina/estreptomicina al 1 %. Se obtuvieron moléculas precursoras de miARN sintéticas correspondientes a miR-7 humano (producto precursor de miARN Pre-miR ID: PM10568; producto inhibidor de miARN Anti-miR ID: AM10568) y un miARN de control negativo (miR-NC; control negativo de precursor de miARN Pre-miR n° 1, Producto ID: AM 17110; control negativo de inhibidor de miARN Anti-miR n° 1, Producto ID: AM17010) de Ambion. Las células se sembraron 24 h antes de transfección en placas de 6 pocillos o placas de 10 cm y se transfectaron usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) con precursores de miARN (Ambion) a concentraciones finales que variaban de 0,1-30 nM. Las células se recogieron a las 12-24 h (para la extracción de ARN) o 3 d (para la extracción de proteínas). Para ensayos indicadores, las células se sembraron en placas de 24 pocillos y se transfectaron usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) con 100 ng de ADN indicador de luciferasa de luciérnaga de control de pGL3 y 5 ng de ADN indicador de luciferasa de renilla pRL-CMV como control de transfección. Los lisados se ensayaron para las actividades luciferasa de luciérnaga y renilla 24 h después de transfección usando el sistema de ensayo indicador de luciferasa dual (Promega) y un lector de microplaca Fluostar OPTIMA (BMG Labtech). Los valores de expresión se normalizaron a luciferasa de renilla y se expresaron respecto al valor promedio para cada construcción indicadora de tipo silvestre transfectada con miR-NC.

En la Figura 4 puede observarse que en células HeLa transfectadas con precursor de miR-7 sintético, la expresión del indicador de diana perfecta se redujo, un efecto que no fue evidente con un precursor de miARN de control negativo (miR-NC) (Figura 5).

Estudios de transfección usando células NSCLC humanas (A549, que sobre-expresa EGFR) examinaron la contribución relativa de cada sitio diana putativo de miR-7 en la UTR 3' de EGFR a la regulación de la expresión de genes diana. Descubrimos que la expresión de miR-7 reducía la expresión del indicador mediante los sitios diana B y C en comparación con miR-NC, mientras que los correspondientes indicadores mutantes no estaban afectados (Figura 6). En contraste, miR-7 no tuvo efecto sobre la expresión del gen indicador mediada por el sitio diana A de UTR 3' de EGFR (Figura 6), a pesar de que este sitio es una diana predicha para la unión de miR-7. Esto sugirió que el sitio diana A en solitario no era una diana para la unión de miR-7. De forma interesante, la presencia de los sitios diana B y C (construcción plasmídica de EGFR D, Figura 3) en la misma construcción indicadora confería represión aditiva, pero no sinérgica, con miR-7 que no se observó con el indicador mutante de EGFR D (Figura 6). En conjunto, estos datos indican que dos de los tres sitios de unión predichos a miR-7 en la UTR 3' del ARNm de EGFR probablemente son dianas específicas para miR-7, y además sugiere que los sitios diana B y C pueden actuar de un modo aditivo para amplificar la represión de la expresión de EGFR por miR-7.

Ejemplo 2 El efecto de miR-7 sobre el ARNm de EGFR y expresión de proteína en líneas celulares

A continuación, buscamos determinar el efecto de miR-7 sobre el ARNm de EGFR y la expresión de proteína en A549 y células de cáncer de mama MDA-MB-468 que sobre-expresan EGFR. Se extrajo el ARN total de líneas celulares con reactivo Trizol (Invitrogen) y columnas RNeasy (Qiagen) y se trató con DNasa I (Promega) para eliminar el ADN genómico contaminante. Para la medición semi-cuantitativa de la expresión de transcrito de EGFR y β -actina, se transcribió de forma inversa 1 μ g de ARN en ADNc usando hexámeros aleatorios y transcriptasa inversa AMV (Promega). Los cebadores de PCR para EGFR y β -actina son: EGFR-F, 5'-CAC CGA CTA GCC AGG AAG TA-3' (SEC ID N° 57); EGFR-R, 5'-AAG CTT CTT CCT TGT TGG AAG AGC CCA TTG A-3' (SEC ID N° 58); β -actina-F, 5'-GCC AAC ACA GTG CTG TCT GG-3' (SEC ID N° 59); β -actina-R, 5'-TAC TCC TGC TTG CTG ATC CA-3' (SEC ID N° 60). Para qRT-PCR, se transcribió de forma inversa 1 μ g de ARN con hexámeros aleatorios y Thermoscript (Invitrogen). Se realizó PCR a tiempo real para Raf1 y GAPDH usando un instrumento Corbett 3000 RotorGene (Corbett Research) con mezcla de PCR QuantiTect SYBR Green (Qiagen) con cebadores que se obtuvieron de PrimerBank (<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/>; Wang y Seed, 2003, Nucleic Acids Res., 31, 154): RAF1-F, 5'-GCA CTG TAG CAC CAA AGT ACC-3' (SEC ID N° 61); RAF1-R, 5'-CTG GGA CTC CAC TAT CAC CAA TA-3' (SEC ID N° 62); GAPDH-F, 5'-ATG GGG AAG GTG AAG GTC G-3' (SEC ID N° 63); GAPDH-R, GGG GTC ATT GAT GGC AAC AAT A-3' (SEC ID N° 64). La expresión del ARNm de Raf1 respecto al ARNm de GAPDH se determinó usando el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak y Schmittgen, 2001, Methods, 25, 402).

Los extractos de proteína citoplásmica se prepararon como se ha descrito (Thomson et al., 1999, Biotechniques, 27, 1032), se resolvieron en geles de Bis Tris al 4-12 % NuPAGE (Invitrogen) y se transfirieron a PVDF (Roche). Las membranas se sondearon con anticuerpo monoclonal de ratón anti-EGFR (1:1000, Neomarkers Cat n° MS-400-P1), anticuerpo monoclonal de ratón anti-Raf-1 (1:1000, Santa Cruz sc-7267), o anticuerpo monoclonal de ratón anti- β -actina (1:10.000, Abcam ab6276-100), antes de detección con reactivo de detección ECL Plus (General Electric Healthcare) y ECL-Hyperfilm (General Electric Healthcare).

La transfección de precursor de miR-7, pero no de precursor de miR-NC, indujo una reducción significativa en la expresión de ARNm de EGFR en células A549 observada a las 12 h post-transfección (Figura 7A), coherente con el miR-7 que promueve la descomposición de ARNm de EGFR. Este efecto está en contraste con los resultados de un estudio en que miR-7 regula la traducción de ARNm de Fos en el hipotálamo de ratón, lo que sugiere que miR-7 es capaz de regular la estabilidad y/o traducción de ARNm diana. Además, cuando se compara con miR-NC, a las 72 h, post-transfección con miR-7 hubo una reducción drástica en la expresión de proteína EGFR en células A549 y MDA-MB-468 (Figura 7B), incluso a bajas concentraciones de precursor de miR-7.

Las células se cultivaron y transfectaron sobre cubreobjetos en palcas de 6 pocillos, se fijaron en metanol enfriado en hielo y se bloquearon con BSA/PBS al 1 %, seguido de incubación con anticuerpo contra EGFR (1:500, Neomarkers Cat n° MS-378-P1). Después de lavar, las células se incubaron con anticuerpo secundario (1:1000, Alexa Fluor 488 de cabra anti-IgG de ratón, Invitrogen Cat n° A11029), con colorante Hoechst (1:10.000, Hoechst AG) y los cubreobjetos se montaron y las células teñidas se analizaron y fotografiaron con microscopía de fluorescencia (microscopio Olympus IX71S1F-2) usando exposiciones idénticas.

Asimismo, se observó que la expresión de proteína EGFR estaba reducida por la transfección de miR-7 en células de glioblastoma U87MG EGFR-positivas por inmunofluorescencia e inmunotransferencia. El último resultado fue particularmente intrigante dada la regulación negativa informada de la expresión de miR-7 y el papel establecido para la sobre-expresión de EGFR en tumores del SNC.

Ejemplo 3 miR-7 inhibe la progresión del ciclo celular e induce muerte celular de células cancerosas de mama y pulmón

Para estudiar los efectos de miR-7 sobre la detención del ciclo celular, las células se trataron con tripsina, se permeabilizaron, se tiñeron con yoduro de propidio y se analizaron en un Coulter EPICS XL-MCL (Coulter Corp. citómetro de flujo). El análisis del ciclo celular se realizó usando el software de análisis de datos MultiPlus AV MultiParameter (Phoenix Flow Systems).

Las células se sembraron en placas de 6 cm en 6 ml de medio de Eagle modificado por Dulbecco más suero bovino fetal al 5 %, 24 horas antes de la transfección. Se sembraron células A549 a 300.000/pocillo. Se sembraron células MDA-468 a 800.000/pocillo. Inmediatamente antes de la transfección, el medio se reemplazó con 6 ml de medio fresco. Las células se transfectaron usando reactivo Lipofectamina 2000. Para cada condición, se preparó una mezcla de transfección de reserva con 22,5 μ l de precursor de miARN 10 μ M (Ambion catálogo n° 17110 control negativo pre-mir n° 1) y 727,5 μ l de medio OptiMEM I para cada placa a transfectar, para una concentración final de precursor de 30 nM. También se preparó una solución de reserva de Lipofectamina 2000 diluida en medio OptiMEM I, con 45 μ l de Lipofectamina 2000 y 705 μ l de medio OptiMEM I para cada pocillo a transfectar. Las soluciones se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después se añadió la reserva de Lipofectamina diluida a cada tubo de condición a una proporción de 1:1 y se pipeteó suavemente arriba y abajo. Las soluciones se incubaron a

temperatura ambiente durante 20 minutos. Se añadieron 1,5 ml de mezcla de transfección a cada pocillo. Las placas se balancearon suavemente atrás y adelante. El medio se reemplazó con 6 ml de medio fresco 4 horas después de la transfección.

5 La transfección de células A549 con precursor de miR-7 indujo la detección del ciclo celular en G₁ (Figura 8A), y causó una disminución significativa en la viabilidad celular de A549 en comparación con células A549 transfectadas con vehículo y miR-NC (Figura 8B). Sin embargo, la muerte celular inducida por la transfección con precursor de miR-7 no pareció implicar apoptosis, debido a la ausencia de (a) una población celular sub-G₁ apoptótica por tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo (Figura 8A), y (b) activación de las caspasas ejecutoras 3 y 7 (datos no mostrados). Por tanto, es probable que la expresión de miR-7 induzca un amplio programa de expresión génica que reduce la viabilidad celular de A549 a través de necrosis.

15 En vista de las evidencias de que los miARN pueden tener múltiples dianas relacionadas funcionalmente, realizamos análisis en microserie para identificar genes diana de miR-7 y tendencias funcionales usando muestras de ARN a partir de células A549 tratadas con miR-7 o miR-NC. Se aisló el ARN total de células A549 transfectadas con miR-7 o miR-NC usando reactivo Trizol (Invitrogen) y columnas RNeasy (Qiagen) y se evaluó usando un 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). El perfilado de expresión génica se realizó por hibridación en microserie a chips de serie Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix). Los datos de expresión génica se analizaron usando el software GeneSifter (VizX Labs). Las comparaciones de datos fueron de dos réplicas experimentales. Aquellos genes con un p < 0,05 y que estaban > 2,0 veces significativamente regulados negativamente por transfección con miR-7 se seleccionaron para análisis adicional sobre la base de que podrían representar dianas directas de miR-7. Las predicciones de dianas de miR-7 se realizaron usando software miRTarget (Wang y Wang, 2006, Nucleic Acids Res., 34, 1646), miRanda (Enright et al., 2003, Genome Biol., 5, 1), PicTar (Krek et al., 2005, Nat Genet., 37, 495) y TargetScan (Lewis et al., 2003, Cell., 115, 787). Los datos de expresión en microserie se depositarán en Gene Expression Omnibus (GEO) y se proporcionarán con un número de acceso.

20 En células A549 transfectadas con miR-7, 248 transcritos estaban significativamente regulados negativamente y 199 transcritos estaban significativamente regulados positivamente en al menos 2 veces (p < 0,05) en comparación con células A549 transfectadas con miR-NC. Además, hubo enriquecimiento significativo (2,18 veces, p = 0,025) para genes diana de miR-7 predichos, pero no para genes diana predichos de cualquier otro miARN, entre la serie reconocida de 248 genes regulados negativamente. El enriquecimiento para genes diana putativos de miR-7 entre los genes regulados negativamente en células A549 transfectadas con miR-7 es coherente con otros estudios que identificaron genes diana de miARN por análisis en microserie. EGFR estaba significativamente regulado negativamente por miR-7 para las tres sondas de chip de microserie (3,13, 3,07, y 2,87 veces), coherente con la reducción observada en la expresión del ARNm de EGFR con transfección de miR-7 (Figura 7A). De forma interesante, Raf1, un miembro de la cascada de señalización EGFR-Ras-Raf-MEK-ERK, también estaba regulado negativamente por miR-7 (3,47 veces). Este resultado se confirmó por qRT-PCR en células A549 tratadas con precursor de miR-7 o miR-NC (Figura 9), lo que sugiere que miR-7 promueve la degradación del ARNm de Raf1. El análisis TargetScan reveló que la UTR 3' de Raf1 humano contiene dos sitios diana predichos de miR-7 (uno conservado, uno no conservado; Figura 10).

Ejemplo 4 miR-7 regula la expresión de proteína *Raf-1* en líneas celulares cancerosas mediante un sitio diana en la región no traducida 3' del ARNm de *Raf-1*

45 Los efectos de la expresión de miR-7 sobre la expresión génica de *Raf-1* se determinaron en células MDA-468 (línea celular de cáncer de mama) y A549 (línea celular de cáncer de pulmón). *Raf-1* es un efecto posterior bien establecido de EGFR mediante la vía Raf-MEK-ERK que se considera una diana terapéutica en cáncer (por ejemplo, esta vía es una diana para Nexavar).

50 Se sembraron células de cáncer de pulmón A549 o cáncer de mama MDA-468 en placas de 6 pocillos a 100.000/pocillo o 300.000/pocillo, respectivamente, en 2 ml de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) más suero bovino fetal al 5 %, 24 horas antes de la transfección. Inmediatamente antes de la transfección, el medio se reemplazó con 2 ml de medio fresco. Las células se transfectaron usando reactivo Lipofectamina 2000. Para cada condición de transfección, se preparó una mezcla de reserva con 7,5 µl de ARN precursor de miARN 10 µM (Ambion Catálogo n° 17110 control negativo pre-mir n° 1 o Ambion Catálogo n° 17100 ID265 hsa-miR-7 pre-mir) y 242,5 µl de medio OptiMEM I para cada pocillo a transfectar, para una concentración final de precursor de 30 nM. También se preparó una solución de reserva de Lipofectamina 2000 diluida en medio OptiMEM I, con 15 µl de Lipofectamina 2000 y 235 µl de medio OptiMEM I para cada pocillo a transfectar. Las soluciones se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. La reserva de Lipofectamina diluida después se añadió a cada tubo de condición a una proporción de 1:1 y se pipeteó suavemente arriba y abajo.

Las soluciones se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se añadieron 500 µl de mezcla de transfección a cada pocillo. Las placas se balancearon suavemente atrás y adelante. El medio se reemplazó con 2 ml de medio fresco 4 horas después de la transfección.

65

Como se muestra en la Figura 12, en células transfectadas con precursor de miR-7 hubo una reducción significativa en la expresión de proteína Raf-1 por inmunotransferencia en líneas celulares A549 y MDA-468. Los carriles 1 y 4 muestra la expresión de Raf-1 y beta-actina en células A549 y MDA-468, respectivamente, que se trataron con reactivo de transfección solamente (es decir, Lipofectamina 2000 solamente). Los carriles 2 y 5 muestra la expresión de proteína Raf-1 y beta-actina en células A549 y MDA-468, respectivamente, que se trataron con precursor de miR-7 (30 nM) durante 3 días. Los carriles 3 y 6 muestran la expresión de proteína Raf-1 y beta-actina en células A549 y MDA-468, respectivamente, que se trataron con un precursor de miARN de control negativo (NC) (30 nM) durante 3 días.

Para determinar si Raf-1 representaba una diana específica de miR-7 en células cancerosas, las células A549 se transfectaron con precursor de miR-7 0,5 nM, 1 nM o 10 nM (Ambion Catálogo nº 17100 ID265 hsa-miR-7 pre-mir) o control negativo pre-mir nº 1 (Ambion Catálogo nº 17110 control negativo pre-mir nº 1) junto con un plásmido indicador de luciferasa que porta la región diana de UTR 3' de Raf-1 de tipo silvestre para miR-7 o una versión mutada de esta región diana, y un plásmido de luciferasa de renilla para la normalización de la eficacia de transfección.

Las líneas celulares transfectadas se ensayaron para la actividad luciferasa de luciérnaga y renilla usando el kit de ensayo indicador de luciferasa dual (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los datos para luciferasa de luciérnaga se normalizaron a luciferasa de renilla para dar una actividad luciferasa relativa.

Como se muestra en la Figura 11, la UTR 3' de Raf-1 contiene un sitio diana específico para miR-7, pero no el miARN de control negativo en células NSCLC A549 (Figura 12). Los carriles 1-3 de la Figura 12 representan la secuencia de ARNm de Raf-1 de UTR 3' de tipo silvestre que es una diana para miR-7, los carriles 4-6 representan una versión mutada de esta secuencia. Los carriles 1 y 4 muestran la actividad luciferasa normalizada para células A549 que se transfectaron con la secuencia diana de miR-7 de tipo silvestre o mutante, respectivamente, a partir de Raf-1. Los carriles 2 y 5 demuestran la especificidad de miR-7 por el sitio diana de Raf-1. Los datos muestran la actividad luciferasa normalizada para células A549 que se transfectaron con la secuencia diana de tipo silvestre o mutante de miR-7 (carriles 2 y 5, respectivamente), a partir de Raf-1, junto con precursor de miR-7 durante 24 horas. La actividad luciferasa está reprimida en el carril 2, es decir, en presencia tanto de indicador de luciferasa del sitio diana de tipo silvestre de Raf-1 como de miR-7, pero no en el carril 5, es decir, en presencia del indicador de luciferasa de sitio diana mutante de Raf-1 y miR-7.

Los carriles 3 y 6 demuestran la especificidad del sitio diana de Raf-1 por miR-7. Los datos muestran actividad luciferasa normalizada para células A549 que se transfectaron con el sitio diana de tipo silvestre o mutante de miR-7 (carriles 3 y 6, respectivamente), a partir de Raf-1, junto con el precursor de miARN de control negativo durante 24 horas. La actividad luciferasa no está reprimida en ningún caso, lo que indica una necesidad de miR-7 para bloquear la expresión de luciferasa mediante el sitio diana de tipo silvestre de Raf-1.

Por tanto, en estos estudios de transfección con células A549, miR-7 redujo la actividad indicadora en células transfectadas con una construcción de luciferasa que portaba una secuencia diana de tipo silvestre de Raf1 para miR-7 pero no un inserto análogo con tres mutaciones puntuales en la región de coincidencia semilla (Figura 11). Esto indicó que la UTR 3' del ARNm de Raf1 es una diana específica para la unión de miR-7. Además, la expresión de la proteína Raf1 estaba sustancialmente disminuida en células A549 y MDA-MB-468 transfectadas con precursor de miR-7 en comparación con precursor de miR-NC (Figura 12). Estos datos proporcionan evidencias de que miR-7 regula directamente la expresión de Raf1, un efector corriente debajo de la señalización de EGFR mediante la cascada Raf-MEK-ERK MAPK, que se activa habitualmente por mutaciones y/o se sobre-expresa en cánceres humanos.

Ejemplo 5 miR-7 regula la expresión de varios ARNm que contienen sitios diana putativos de miR-7

Para identificar nuevas dianas de la actividad miR-7 en células cancerosas, realizamos análisis en microserie de células NSCLC A549 que se transfectaron con precursor de miR-7 30 nM (Ambion Catálogo nº 17100 ID265 hsa-miR-7 pre-mir) o control negativo pre-mir nº 1 (Ambion Catálogo nº 17110 control negativo pre-mir nº 1). Se aisló el ARN total a las 24 horas post-transfección usando reactivo Trizol (Invitrogen, Australia) y columnas de purificación de ARN total RNeasy (QIAGEN, Australia), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La calidad e integridad del ARN se confirmó con un Agilent Bioanalyser (Agilent Technologies, Inc., 5301 Stevens Creek Blvd, Santa Clara, CA 95051, Estados Unidos). El ADNc marcado de cada muestra se hibridó con chips U133 plus 1 (Affymetrix, EEUU) y los datos de las microseries se analizaron usando el software Genesifter (200 West Mercer Street, Suite 500, Seattle, WA 98119-3995 EEUU) y Microsoft Excel (Microsoft, Seattle, WA, EEUU). Varios (> 40) ARNm que estaban significativamente regulados negativamente sobre dos experimentos independientes y que contenían sitios diana predichos de ARNm de UTR 3' para la unión a miR-7 se seleccionaron para análisis adicional. Se indica en la tabla el cambio factorial promedio en los estudios en microserie (respecto a las muestras tratadas con control negativo), el nombre oficial del gen en GenBank, el identificador LocusLink y el GeneID de la base de datos NCBI/GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y la cantidad de casos para los cuales se predijo que un gen dado era una diana de miR-7 (usando herramientas de predicción libres basadas en la red tales como TargetScan, PicTar, miRanda junto con un algoritmo de predicción desarrollado de forma interna).

5 Para investigar las tendencias funcionales potenciales para miR-7 examinados las vías de la Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) para el enriquecimiento significativo de genes que estaban regulados negativamente en análisis en microserie de células A549 transfectadas con precursor de miR-7 (Figura 13), ya que éstas pueden incluir dianas reales de miR-7. La investigación del enriquecimiento de conjuntos de genes para dianas predichas de miARN se realizó usando la herramienta de análisis en microserie L2L (<http://depts.washing-ton.edu/121/about.html>) (Newman y Weiner, 2005, *Genome Biol.*, 6, 81). Análisis de vía funcional KEGG. El análisis del enriquecimiento de conjuntos de genes para vías KEGG funcionales se realizó usando el software GeneSifter (VizX Labs).

10 De forma notable, las vías "glioma", "vía de señalización de ErbB", "vía de señalización de GnRH", "potenciación a largo plazo" y "unión comunicante" estaban enriquecidas significativamente con genes que estaban regulados negativamente por transfección con miR-7. Éstas son coherentes con un papel para miR-7 en la regulación de la señalización de EGFR, y con la expresión específica de cerebro y pituitaria de miR-7 y su regulación negativa en tumores del SNC y la pituitaria. Además de los genes diana validados EGFR y Raf1, varios genes regulados negativamente diferentes en estas vías contienen sitios de unión predichos para miR-7. Estos incluyen genes implicados en la señalización de calcio (CALM3 y CAMK2D, regulados negativamente 7,1 y 2,08 veces, respectivamente), reorganización del citoesqueleto y señalización nuclear (PAK1, regulado negativamente 2,2 veces), y síntesis de AMPc y señalización intracelular (ADCY9, regulado negativamente 3,38 veces).

20 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> university of western Australia
- <120> modulador
- 25 <130> FP25668
- <140> PCT/AU2007/00
- <141> 28-08-2007
- 30 <150> AU2006904662
- <151> 28-08-2006
- <150> AU2007900558
- 35 <151> 06-02-2007
- <160> 64
- <170> PatentIn versión 3.3
- 40 <210> 1
- <211> 418
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- 45 <400> 1

```

tttcattgtc gctattgatt tttacttcaa tgggctcttc caacaaggaa gaagcttgct      60
ggtagcactt gctaccctga gttcatccag gcccaactgt gagcaaggag cacaagccac      120
aagtcttcca gaggatgctt gattccagtg gttctgcttc aaggcttcca ctgcaaaaca      180
ctaaagatcc aagaaggcct tcatggcccc agcaggccgg atcgggtactg tatcaagtca      240
tggcaggtac agtaggataa gccactctgt cccttcctgg gcaaagaaga aacggagggg      300
atggaattct tccttagact tacttttgta aaaatgtccc cacggtactt actccccact      360
gatggaccag tggtttccag tcatgagcgt tagactgact tgtttgcttt ccattcca      418

```

- 50 <210> 2
- <211> 418
- <212> ADN
- <213> *Pan troglodytes*

ES 2 534 430 T3

<400> 2

tttcattgtc gctattgatt tttacttcaa tgggctcttc caacaaggaa gaagcttgct 60
 ggtagcactt gctaccctga gttcatccag gcccaactgt gagcaaggag cacaagccac 120
 aagtcttcca gaggatgctt gattccagtg gttctgcttc aaggcttcca ctgcaaaaca 180
 ctaaagatcc aagaaggcct tcatggcccc agcaggccgg atcggtagctg tatcaagtca 240
 tggcaggtac agtaggataa gccactctgt cccttctctgg gcaaagaaga aacggagggg 300
 atggaattct tccttagact tacttttgta aaaatgtccc cacggtactt actccccact 360
 gatggaccag tggtttccag tcatgagcgt tagactgact tgtttgtctt ccattcca 418

5 <210> 3
 <211> 418
 <212> ADN
 <213> *Pan troglodytes*

10 <400> 3

tttcattgtc gctattgatt tttacttcaa tgggctcttc caacaaggaa gaagcttgct 60
 ggtagcactt gctaccctga gttcatccag gcccaactgt gagcaaggag cacaagccac 120
 aagtcttcca gaggatgctt gattccagtg gttctgcttc aaggcttcca ctgcaaaaca 180
 ctaaagatcc aagaaggcct tcatggcccc agcaggccgg atcggtagctg tatcaagtca 240
 tggcaggtac agtaggataa gccactctgt cccttctctgg gcaaagaaga aacggagggg 300
 atggaattct tccttagact tacttttgta aaaatgtccc cacggtactt actccccact 360
 gatggaccag tggtttccag tcatgagcgt tagactgact tgtttgtctt ccattcca 418

15 <210> 4
 <211> 418
 <212> ADN
 <213> *Pan troglodytes*

20 <400> 4

tttcattgtc gctattgatt tttacttcaa tgggctcttc caacaaggaa gaagcttgct 60
 ggtagcactt gctaccctga gttcatccag gcccaactgt gagcaaggag cacaagccac 120
 aagtcttcca gaggatgctt gattccagtg gttctgcttc aaggcttcca ctgcaaaaca 180
 ctaaagatcc aagaaggcct tcatggcccc agcaggccgg atcggtagctg tatcaagtca 240
 tggcaggtac agtaggataa gccactctgt cccttctctgg gcaaagaaga aacggagggg 300
 atggaattct tccttagact tacttttgta aaaatgtccc cacggtactt actccccact 360
 gatggaccag tggtttccag tcatgagcgt tagactgact tgtttgtctt ccattcca 418

25 <210> 5
 <211> 418
 <212> ADN
 <213> *Pan troglodytes*

<400> 5

ES 2 534 430 T3

tttcattgtc gctattgatt tttacttcaa tgggctcttc caacaaggaa gaagcttgct 60
 ggtagcactt gctaccctga gttcatccag gcccaactgt gagcaaggag cacaagccac 120
 aagtcttcca gaggatgctt gattccagtg gttctgcttc aaggcttcca ctgcaaaaca 180
 ctaaagatcc aagaaggcct tcatggcccc agcaggccgg atcggtagctg tatcaagtca 240
 tggcaggtac agtaggataa gccactctgt cccttctctg gcaaagaaga aacggagggg 300
 atggaattct tccttagact tacttttgta aaaatgtccc cacggtactt actccccact 360
 gatggaccag tggtttccag tcatgagcgt tagactgact tgtttgtctt ccattcca 418

5 <210> 6
 <211> 418
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 6

tttcattgtc gctattgatt tttacttcaa tgggctcttc caacaaggaa gaagcttgct 60
 ggtagcactt gctaccctga gttcatccag gcccaactgt gagcaaggag cacaagccac 120
 aagtcttcca gaggatgctt gattccagtg gttctgcttc aaggcttcca ctgcaaaaca 180
 ctaaagatcc aagaaggcct tcatggcccc agcaggccgg atcggtagctg tatcaagtca 240
 tggcaggtac agtaggataa gccactctgt cccttctctg gcaaagaaga aacggagggg 300
 atggaattct tccttagact tacttttgta aaaatgtccc cacggtactt actccccact 360
 gatggaccag tggtttccag tcatgagcgt tagactgact tgtttgtctt ccattcca 418

10 <210> 7
 <211> 418
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 7

tttcattgtc gctattgatt tttacttcaa tgggctcttc caacaaggaa gaagcttgct 60
 ggtagcactt gctaccctga gttcatccag gcccaactgt gagcaaggag cacaagccac 120
 aagtcttcca gaggatgctt gattccagtg gttctgcttc aaggcttcca ctgcaaaaca 180
 ctaaagatcc aagaaggcct tcatggcccc agcaggccgg atcggtagctg tatcaagtca 240
 tggcaggtac agtaggataa gccactctgt cccttctctg gcaaagaaga aacggagggg 300
 atggaattct tccttagact tacttttgta aaaatgtccc cacggtactt actccccact 360
 gatggaccag tggtttccag tcatgagcgt tagactgact tgtttgtctt ccattcca 418

20 <210> 8
 <211> 418
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 8

ES 2 534 430 T3

tttcattgtc gctattgatt tttacttcaa tgggctcttc caacaaggaa gaagcttgct 60
 ggtagcactt gctaccctga gttcatccag gcccaactgt gagcaaggag cacaagccac 120
 aagtcttcca gaggatgctt gattccagtg gttctgcttc aaggcttcca ctgcaaaaca 180
 ctaaagatcc aagaaggcct tcatggcccc agcaggccgg atcggtagctg tatcaagtca 240
 tggcaggtac agtaggataa gccactctgt cccttcctgg gcaaagaaga aacggagggg 300
 atggaattct tccttagact tacttttgta aaaatgtccc cacggtactt actccccact 360
 gatggaccag tggtttccag tcatgagcgt tagactgact tgtttgctt ccattcca 418

5 <210> 9
 <211> 418
 <212> ADN
 <213> *Pan troglodytes*

<400> 9

tttcattgtc gctattgatt tttacttcaa tgggctcttc caacaaggaa gaagcttgct 60
 ggtagcactt gctaccctga gttcatccag gcccaactgt gagcaaggag cacaagccac 120
 aagtcttcca gaggatgctt gattccagtg gttctgcttc aaggcttcca ctgcaaaaca 180
 ctaaagatcc aagaaggcct tcatggcccc agcaggccgg atcggtagctg tatcaagtca 240
 tggcaggtac agtaggataa gccactctgt cccttcctgg gcaaagaaga aacggagggg 300
 atggaattct tccttagact tacttttgta aaaatgtccc cacggtactt actccccact 360
 gatggaccag tggtttccag tcatgagcgt tagactgact tgtttgctt ccattcca 418

10 <210> 10
 <211> 417
 <212> ADN
 15 <213> *Homo sapiens*

<400> 10

tttcattgtc gctattgatt tttacttcaa tgggctcttc caacaaggaa gaagcttgct 60
 ggtagcactt gctaccctga gttcatccag gcccaactgt gagcaaggag cacaagccac 120
 aagtcttcca gaggatgctt gattccagtg gttctgcttc aaggcttcca ctgcaaaaca 180
 ctaaagatcc aagaaggcct tcatggcccc agcaggccgg atcggtagctg tatcaagtca 240
 tggcaggtac agtaggataa gccactctgt cccttcctgg gcaaagaaga aacggagggg 300
 atgaattctt ccttagactt acttttgtaa aaatgtcccc acggtactta ctccccactg 360
 atggaccagt ggtttccagt catgagcgtt agactgactt gtttgcttc cattcca 417

20 <210> 11
 <211> 417
 <212> ADN
 25 <213> *HOMO SAPIENS*

<400> 11

ES 2 534 430 T3

tttcattgtc gctattgatt tttacttcaa tgggctcttc caacaaggaa gaagcttgct 60
 ggtagcactt gctaccctga gttcatccag gcccaactgt gagcaaggag cacaagccac 120
 aagtcttcca gaggatgctt gattccagtg gttctgcttc aaggcttcca ctgcaaaaca 180
 ctaaagatcc aagaaggcct tcatggcccc agcaggcccg atcggtagctg tatcaagtca 240
 tggcaggtac agtaggataa gccactctgt ccttctctgg gcaaagaaga aacggagggg 300
 atgaattctt ccttagactt acttttgtaa aaatgtcccc acggtagctta ctccccactg 360
 atggaccagt ggtttccagt catgagcgtt agactgactt gtttgccttc cattcca 417

5 <210> 12
 <211> 399
 <212> ADN
 <213> *Sus scrofa*
 <400> 12

gtcgtcattg attttgcttt taacgggctt ttccaacgag gaagaagctc actttagca 60
 cttgggccgc agagtccacc cagatacggg accagcccgg gccagccttc cactaacact 120
 tgattccact ggctctgctc ggaggctctt cctctgcaag gcagttgaaa accagctagt 180
 tctccgtgct ccaggcagge ccgattggta ctctgtcaaa tcatgtcagg tgcaagagga 240
 taagccactt tgaacccttc ctgggcaggg gagaaaagga gggtagaatt cctcctcaga 300
 cttactttta tccaaatate tccacggtag ttaccctcca ttgagtgacc agtgttttct 360
 gattatatgt gttggattta cttgtttatt ttccattcc 399

10
 15 <210> 13
 <211> 397
 <212> ADN
 <213> *Bos taurus*
 <400> 13

ttttactttt aatgagcttt tctaataagg aaaaagcttg ctcatagcac ctgtggtact 60
 gagttgacct aggcccaact gtgactgaga cgcacggacc agccttccag ccaacacgtg 120
 attccattgg ctctgcttgg agactcctcc actgcaagtc agttgaataa ccagccagtc 180
 ctctgagttc tcagcaggcc acattggtag tatctcagat caaggcaggt acaagacaat 240
 aagccacttt gaactcttcc tgagcaagga agaaacagag ggagtagaat tcttctcag 300
 acttacttgt atatagatgt ctccatggta ctttctctcc tttgggtgac cagtgtattt 360
 taattataag tatttagactt gtttattttc cattcca 397

20
 25 <210> 14
 <211> 213
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 <400> 14

ES 2 534 430 T3

ttggttccac cagctctgca tcaagacact tccgtggcaa gacaactaaa tgtataagaa 60
gtccatggat gccctgagca ggccacactt gtacagcatt aaaccatggc agatacaata 120
ggataagcca ctttgttact tactggggct gggagaagag gaatgacggg gtagaatttt 180
ccctcagacg tactttttat ataaatatgt ccc 213

5 <210> 15
 <211> 213
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 15

ttggttccac cagctctgca tcaagacact tccgtggcaa gacaactaaa tgtataagaa 60
gtccatggat gccctgagca ggccacactt gtacagcatt aaaccatggc agatacaata 120
ggataagcca ctttgttact tactggggct gggagaagag gaatgacggg gtagaatttt 180
ccctcagacg tactttttat ataaatatgt ccc 213

10

15 <210> 16
 <211> 213
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 16

ttggttccac cagctctgca tcaagacact tccgtggcaa gacaactaaa tgtataagaa 60
gtccatggat gccctgagca ggccacactt gtacagcatt aaaccatggc agatacaata 120
ggataagcca ctttgttact tactggggct gggagaagag gaatgacggg gtagaatttt 180
ccctcagacg tactttttat ataaatatgt ccc 213

20

25 <210> 17
 <211> 213
 <212> ADN
 <213> *MUS MUSCULUS*

<400> 17

ttggttccac cagctctgca tcaagacact tccgtggcaa gacaactaaa tgtataagaa 60
gtccatggat gccctgagca ggccacactt gtacagcatt aaaccatggc agatacaata 120
ggataagcca ctttgttact tactggggct gggagaagag gaatgacggg gtagaatttt 180
ccctcagacg tactttttat ataaatatgt ccc 213

30

<210> 18
 <211> 213
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

35 <400> 18

ES 2 534 430 T3

ttggttccac cagctctgca tcaagacact tccgtggcaa gacaactaaa tgtataagaa 60
gtccatggat gccctgagca ggccacactt gtacagcatt aaaccatggc agatacaata 120
ggataagcca ctttgttact tactggggct gggagaagag gaatgacggg gtagaatttt 180
ccctcagacg tactttttat ataaatatgt ccc 213

5 <210> 19
 <211> 213
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 19

ttggttccac cagctctgca tcaagacact tccgtggcaa gacaactaaa tgtataagaa 60
gtccatggat gccctgagca ggccacactt gtacagcatt aaaccatggc agatacaata 120
ggataagcca ctttgttact tactggggct gggagaagag gaatgacggg gtagaatttt 180
ccctcagacg tactttttat ataaatatgt ccc 213

10

<210> 20
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL

15

<400> 20
 atttttact caatgggctc ttcca 25

20

<210> 21
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL

25

<400> 21
 attttattc tcgtgggctt ttcca 25

30

<210> 22
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL

35

<400> 22
 atttgattga tgcactcttg ta 22

40

<210> 23
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL

<400> 23
 atttgattca tgcactcttc ca 22

45

<210> 24
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL

50

<400> 24
 aggagcacia gccacaagtc ttcca 25

<210> 25
 <211> 24

ES 2 534 430 T3

<212> ADN
 <213> ARTIFICIAL

 <400> 25
 5 agaagcaagg gtcagagtct tcca 24

 <210> 26
 <211> 25
 <212> ADN
 10 <213> ARTIFICIAL

 <400> 26
 gttagactga ctggttgc ttcca 25

 <210> 27
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL
 15

 <400> 27
 20 atcggaccta atttcca 18

 <210> 28
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL
 25

 <400> 28
 attagacttc ctctatgtt ttctg 25
 30

 <210> 29
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL
 35

 <400> 29
 attagactac ctttatgtt ttctg 25

 <210> 30
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL
 40

 <400> 30
 45 caacaaaatc actagtcttc ca 22

 <210> 31
 <211> 8
 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL
 50

 <400> 31
 ctctcca 8

 <210> 32
 <211> 8
 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL
 55

 <400> 32
 60 ctttcca 8

 <210> 33
 <211> 8
 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL
 65

<400> 33
 ctcttgta 8

5

<210> 34
 <211> 8
 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL

10

<400> 34
 gtctcca 8

15

<210> 35
 <211> 8
 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL

20

<400> 35
 gtctcca 8

25

<210> 36
 <211> 8
 <212> ADN
 <213> ARTIFICIAL

30

<400> 36
 gtttctg 8

35

<210> 37
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> ARTIFICIAL

<400> 37
 uggaagagcc cauugaagua aaaau 25

40

<210> 38
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> ARTIFICIAL

<400> 38
 uggaaaagcc cacgagaaaau aaaau 25

45

<210> 39
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> ARTIFICIAL

50

<400> 39
 uacaagagug caucaaucaa au 22

55

<210> 40
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> ARTIFICIAL

60

<400> 40
 uggaagagug caugaaucua au 22

65

<210> 41
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> ARTIFICIAL

<400> 41

uggaagacuu guggcuugug cuccu 25
 <210> 42
 <211> 24
 <212> ARN
 <213> ARTIFICIAL
 5
 <400> 42
 uggaagacuc ugacccuugc uucu 24
 10
 <210> 43
 <211> 24
 <212> ARN
 <213> ARTIFICIAL
 15
 <400> 43
 uggaagacuc ugacccuugc uucu 24
 20
 <210> 44
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> ARTIFICIAL
 25
 <400> 44
 uggaagacaa acacgucagu cuaag 25
 30
 <210> 45
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> ARTIFICIAL
 35
 <400> 45
 uggaaaaua gguccgau 18
 40
 <210> 46
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> ARTIFICIAL
 45
 <400> 46
 cagaaaacau agaaggaagu cuaau 25
 50
 <210> 47
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> ARTIFICIAL
 55
 <400> 47
 cagaaaacau aaaagguagu cuaau 25
 60
 <210> 48
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> ARTIFICIAL
 65
 <400> 48
 uggaagacua gugauuuugu ug 22
 70
 <210> 49
 <211> 8
 <212> ARN
 <213> ARTIFICIAL
 75
 <400> 49
 uggaagag 8

ES 2 534 430 T3

<210> 50
 <211> 8
 <212> ARN
 <213> ARTIFICIAL
 5
 <400> 50
 uggaaaag 8
 <210> 51
 <211> 8
 <212> ARN
 <213> ARTIFICIAL
 10
 <400> 51
 acaagag 8
 <210> 52
 <211> 8
 <212> ARN
 <213> ARTIFICIAL
 20
 <400> 52
 uggaagac 8
 <210> 53
 <211> 8
 <212> ARN
 <213> ARTIFICIAL
 25
 <400> 53
 uggaagac 8
 <210> 54
 <211> 8
 <212> ARN
 <213> ARTIFICIAL
 35
 <400> 54
 cagaaaac 8
 <210> 55
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> *HOMO SAPIENS*
 45
 <400> 55
 caacaaaatc actagtcttc ca 22
 <210> 56
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> *HOMO SAPIENS*
 50
 <400> 56
 tggaagacta gtgatttgt tg 22
 <210> 57
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *HOMO SAPIENS*
 60
 <400> 57
 caccgactag ccaggaagta 20
 <210> 58
 <211> 31

ES 2 534 430 T3

<212> ADN
 <213> *HOMO SAPIENS*

 <400> 58
 5 aagcttctc cttgtggaa gagcccattg a 31

 <210> 59
 <211> 20
 <212> ADN
 10 <213> *HOMO SAPIENS*

 <400> 59
 gccaacacag tgctgtctgg 20

 15 <210> 60
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> *HOMO SAPIENS*

 20 <400> 60
 tactcctgct tgctgatcca 20

 <210> 61
 <211> 21
 25 <212> ADN
 <213> *HOMO SAPIENS*

 <400> 61
 gcactgtagc accaaagtac c 21
 30
 <210> 62
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> *HOMO SAPIENS*
 35
 <400> 62
 ctgggactcc actatcacca ata 23

 <210> 63
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> *HOMO SAPIENS*

 <400> 63
 45 atggggaagg tgaaggtcg 19

 <210> 64
 <211> 22
 <212> ADN
 50 <213> *HOMO SAPIENS*

 <400> 64
 ggggtcattg atggcaacaa ta 22

 55

REIVINDICACIONES

1. Un agente que comprende un miARN capaz de interactuar con una secuencia expuesta en una cualquiera de las SEC ID N° 31 a 36 presente en la región no traducida (UTR) 3' del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) o una molécula efectora posterior del mismo, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno seleccionados entre enfermedad renal, enfermedad pulmonar, enfermedad cardíaca, enfermedad cutánea, infección, cáncer de pulmón, cáncer gastrointestinal, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cerebral, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, cáncer esofágico y cáncer de cabeza y cuello.
2. El agente de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la molécula efectora posterior se selecciona entre el grupo que consiste en Raf-1, CALM3, CAMK2D, PAK1 y ADCY9, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno seleccionados entre enfermedad renal, enfermedad pulmonar, enfermedad cardíaca, enfermedad cutánea, infección, cáncer de pulmón, cáncer gastrointestinal, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cerebral, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, cáncer esofágico y cáncer de cabeza y cuello.
3. El agente de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la UTR 3' está codificada por una secuencia que comprende una secuencia que tiene al menos un 70 %, preferiblemente un 90 % de identidad de secuencia con al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 1 a 36, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno seleccionados entre enfermedad renal, enfermedad pulmonar, enfermedad cardíaca, enfermedad cutánea, infección, cáncer de pulmón, cáncer gastrointestinal, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cerebral, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, cáncer esofágico y cáncer de cabeza y cuello.
4. El agente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la UTR 3' está codificada por una secuencia contenida en la SEC ID N° 1, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno seleccionados entre enfermedad renal, enfermedad pulmonar, enfermedad cardíaca, enfermedad cutánea, infección, cáncer de pulmón, cáncer gastrointestinal, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cerebral, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, cáncer esofágico y cáncer de cabeza y cuello.
5. El agente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la UTR 3' comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con una secuencia que se une específicamente al menos a una molécula de ácido nucleico, en donde dicha molécula de ácido nucleico comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 37 a 54, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno seleccionados entre enfermedad renal, enfermedad pulmonar, enfermedad cardíaca, enfermedad cutánea, infección, cáncer de pulmón, cáncer gastrointestinal, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cerebral, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, cáncer esofágico y cáncer de cabeza y cuello.
6. El agente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el miARN comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 37 a 54, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno seleccionados entre enfermedad renal, enfermedad pulmonar, enfermedad cardíaca, enfermedad cutánea, infección, cáncer de pulmón, cáncer gastrointestinal, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cerebral, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, cáncer esofágico y cáncer de cabeza y cuello.
7. El agente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el agente comprende una primera molécula de ácido nucleico que codifica un precursor de miARN, que se procesa en una célula para formar una segunda molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia de al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N° 37 a 54, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno seleccionados entre enfermedad renal, enfermedad pulmonar, enfermedad cardíaca, enfermedad cutánea, infección, cáncer de pulmón, cáncer gastrointestinal, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cerebral, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, cáncer esofágico y cáncer de cabeza y cuello.
8. El agente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el miARN es miR-7, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno seleccionados entre enfermedad renal, enfermedad pulmonar, enfermedad cardíaca, enfermedad cutánea, infección, cáncer de pulmón, cáncer gastrointestinal, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cerebral, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, cáncer esofágico y cáncer de cabeza y cuello.
9. Un agente que comprende un miARN que comprende una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que tiene al menos un 90 % de identidad con al menos una secuencia seleccionada entre el grupo que

consiste en las SEC ID Nº 37 a 54, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno seleccionados entre enfermedad renal, enfermedad pulmonar, enfermedad cardiaca, enfermedad cutánea, infección, cáncer de pulmón, cáncer gastrointestinal, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cerebral, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, cáncer esofágico y cáncer de cabeza y cuello, en donde:

el agente es capaz de interactuar con una secuencia expuesta en una cualquiera de las SEC ID Nº 31 a 36 presente en la UTR 3' de EGFR o una molécula efectora posterior.

10 El agente de acuerdo con la reivindicación 9, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno seleccionados entre enfermedad renal, enfermedad pulmonar, enfermedad cardiaca, enfermedad cutánea, infección, cáncer de pulmón, cáncer gastrointestinal, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cerebral, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, cáncer esofágico y cáncer de cabeza y cuello, en donde la molécula efectora posterior se selecciona entre el grupo que consiste en Raf-1, CALM3, CAMK2D, PAK1 y ADCY9.

11 El agente de acuerdo con la reivindicación 9 o la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno seleccionados entre enfermedad renal, enfermedad pulmonar, enfermedad cardiaca, enfermedad cutánea, infección, cáncer de pulmón, cáncer gastrointestinal, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cerebral, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, cáncer esofágico y cáncer de cabeza y cuello, que comprende adicionalmente un segundo agente seleccionado entre el grupo que consiste en un anticuerpo anti-EGFR y un inhibidor de tirosina quinasa de EGFR.

12 El agente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno seleccionados entre enfermedad renal, enfermedad pulmonar, enfermedad cardiaca, enfermedad cutánea, infección, cáncer de pulmón, cáncer gastrointestinal, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer cerebral, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, cáncer esofágico y cáncer de cabeza y cuello, en donde el agente comprende adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

13 El agente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno seleccionados entre enfermedad renal, enfermedad pulmonar, enfermedad cardiaca, enfermedad cutánea, infección, cáncer gastrointestinal, glioblastoma, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, carcinoma endometrial, cáncer esofágico y cáncer de cabeza y cuello.

14 El agente de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o un trastorno que son cáncer cerebral, cáncer de mama, cáncer de próstata, o cáncer de colon.

15 El agente de acuerdo con la reivindicación 14, para su uso en el tratamiento de cáncer cerebral que es glioma.

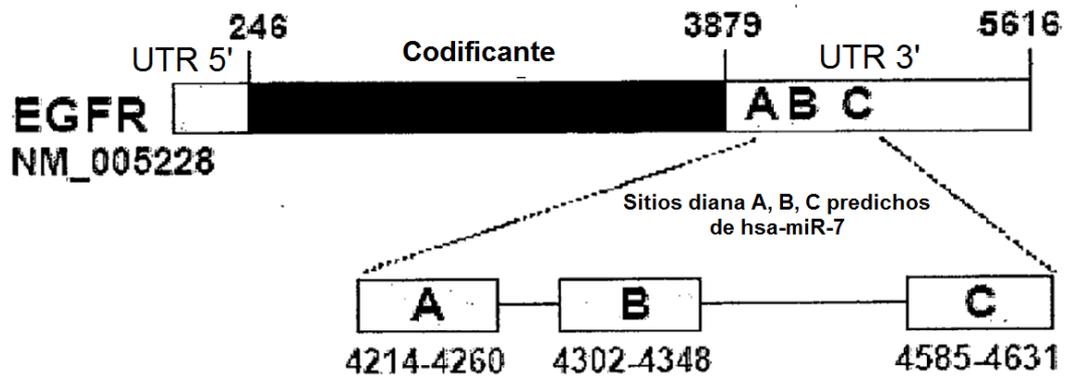


FIGURA 1

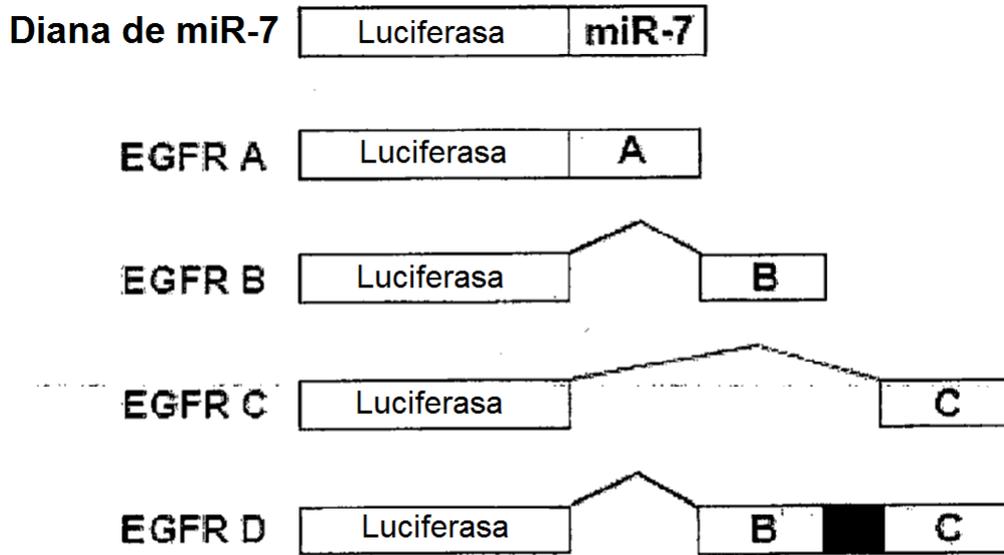


FIGURA 3

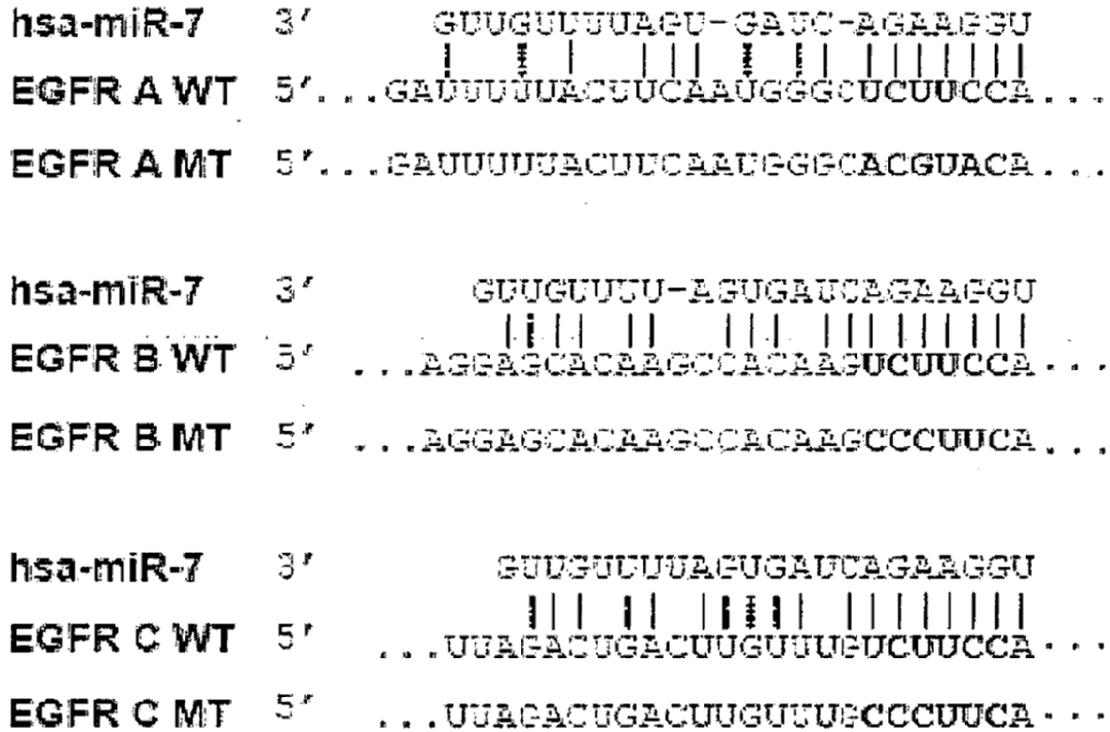


FIGURA 4

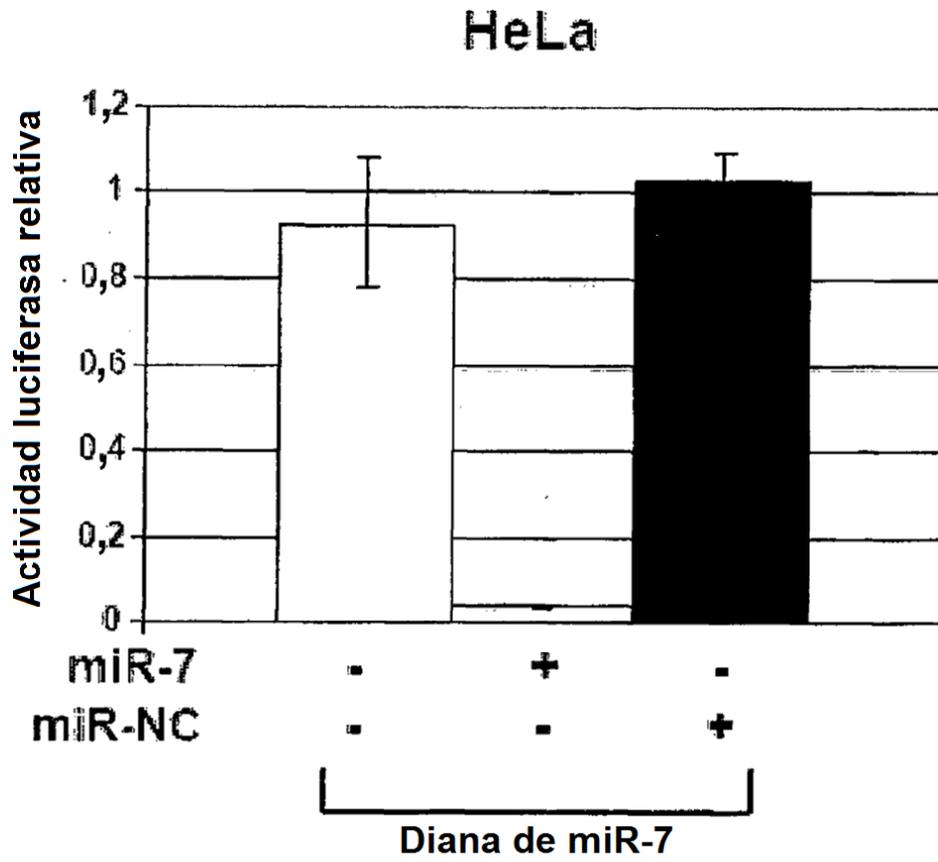


FIGURA 5

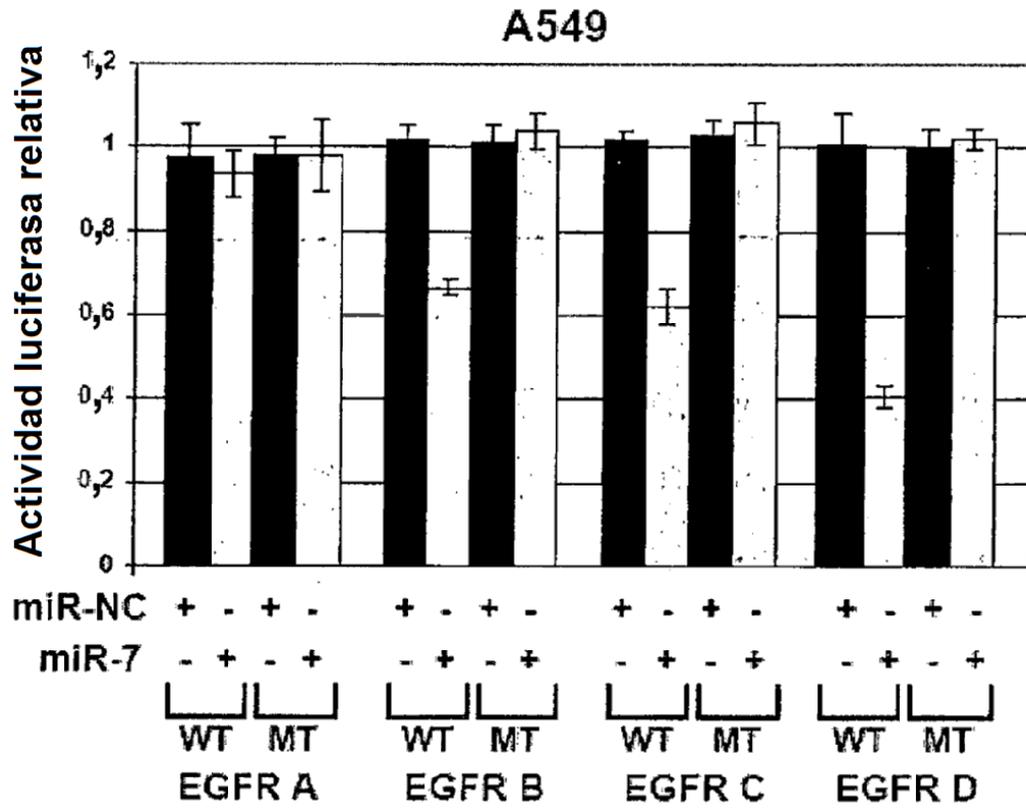


FIGURA 6

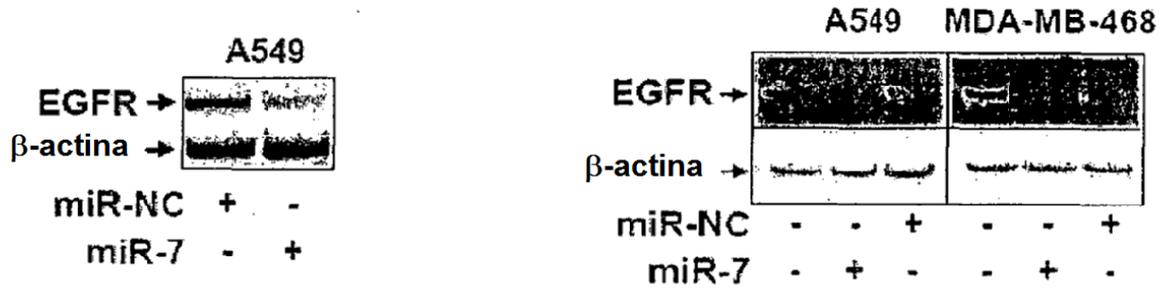


FIGURA 7

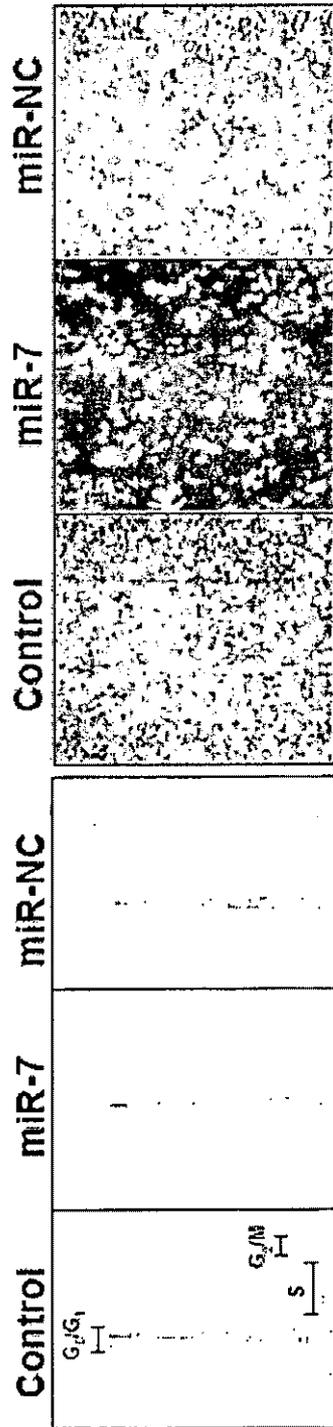


FIGURA 8

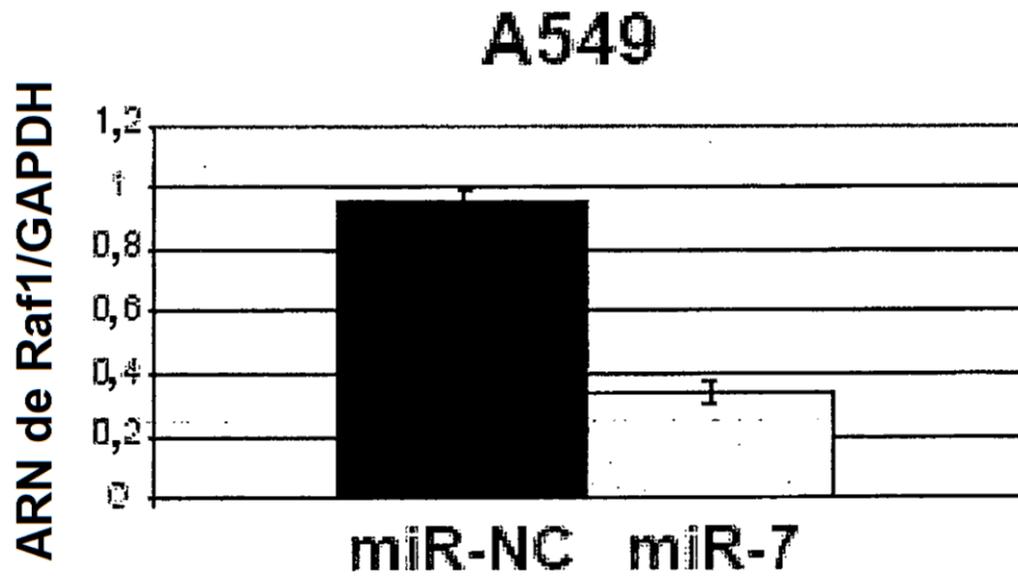


FIGURA 9

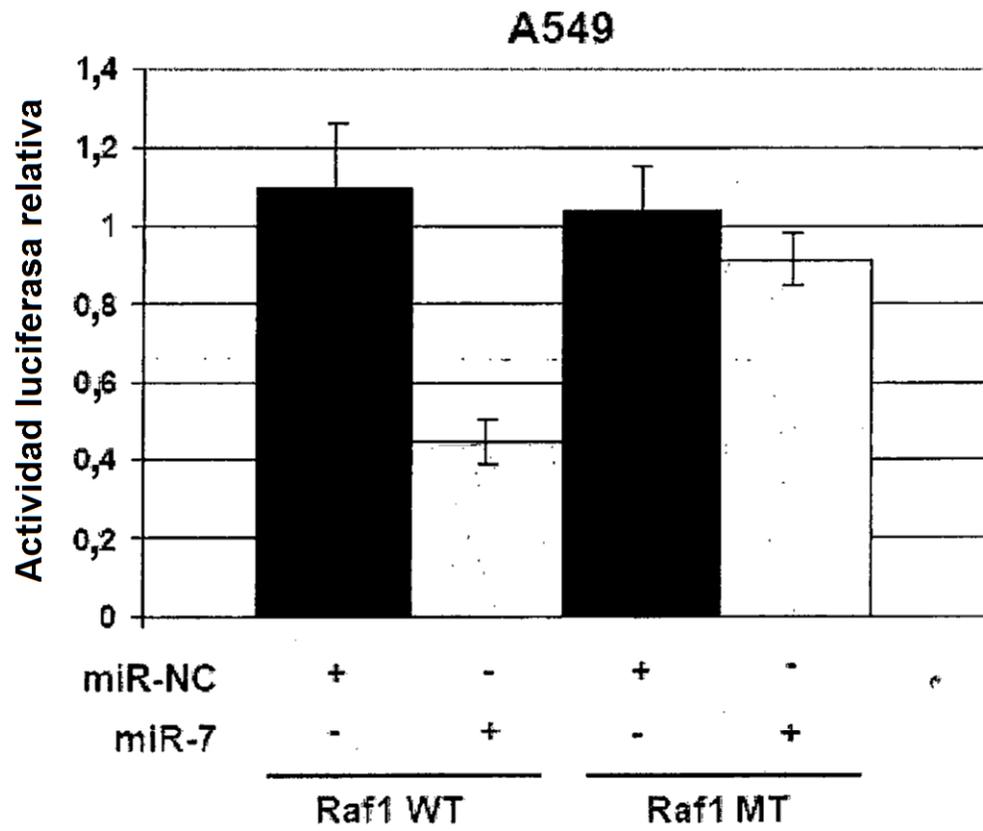


FIGURA 11

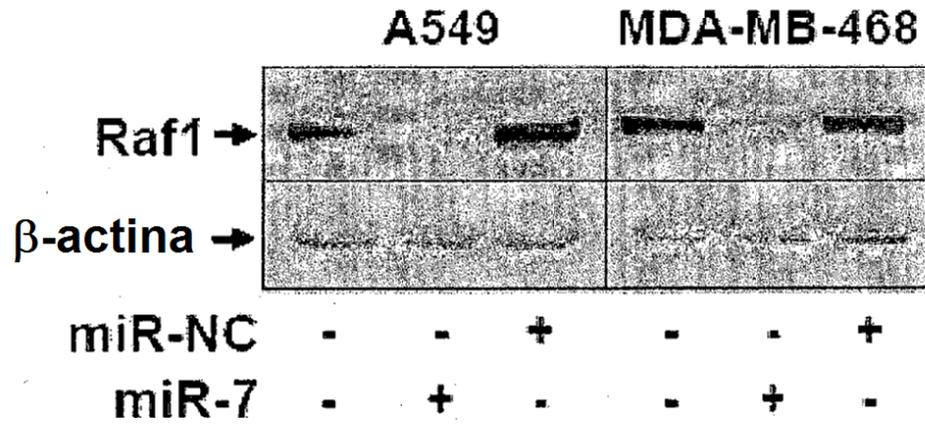


FIGURA 12

Vía KEGG	Reg. Neg.	Serie	Valor z
Glioma	7	64	6,40
Cáncer endometrial	6	52	6,12
Cáncer pulmonar no microcítico	6	53	6,05
Vía de señalización de ErbB	7	86	5,25
Cáncer de próstata	7	90	5,08
Cáncer pancreático	6	73	4,88
Metabolismo de glicerolípidos	5	57	4,66
Metabolismo de pirimidina	6	84	4,41
Carcinoma de células renales	5	68	4,11
Vía de señalización de VEGF	5	68	4,11
Vía de señalización de GnRH	6	95	4,01
Melanoma	5	71	3,98
Adhesión focal	9	192	3,85
Leucemia mieloide crónica	5	76	3,78
Apoptosis	5	84	3,49
Cáncer colorrectal	5	84	3,49
Cáncer pulmonar microcítico	5	86	3,42
Señalización de células epiteliales en infección por <i>H. pylori</i>	4	67	3,12
Potenciación a largo plazo	4	68	3,08
Regulación del citoesqueleto de actina	8	202	3,06
Melanogénesis	5	99	3,03
Vía de señalización de Fc épsilon RI	4	74	2,87
Metabolismo de purina	6	141	2,84
Metabolismo de beta-alanina	2	24	2,83
ADN polimerasa	2	25	2,75
Formación del eje dorso-ventral	2	27	2,60
Metabolismo de éter lípidos	2	29	2,46
Unión comunicante	4	90	2,40
Ciclo de urea y metabolismo de grupos amino	2	30	2,40
Transducción olfatoria	2	31	2,34
Vía de señalización de insulina	5	134	2,25
Metabolismo de glicerogfosfolípidos	3	64	2,18

FIGURA 13

ES 2 534 430 T3

SEC ID N°:1	1	TTTCATTGTCGCTATTGATTTTTACTTCAATGGGCTCTTCCAACAAGGAAGAAGCTTGCT	60
SEC ID N°:2	4044	TTTCATTGTCGCTATTGATTTTTACTTCAATGGGCTCTTCCAACAAGGAAGAAGCTTGCT	4103
SEC ID N°:3	4278	TTTCATTGTCGCTATTGATTTTTACTTCAATGGGCTCTTCCAACAAGGAAGAAGCTTGCT	4337
SEC ID N°:4	4233	TTTCATTGTCGCTATTGATTTTTACTTCAATGGGCTCTTCCAACAAGGAAGAAGCTTGCT	4292
SEC ID N°:5	4227	TTTCATTGTCGCTATTGATTTTTACTTCAATGGGCTCTTCCAACAAGGAAGAAGCTTGCT	4286
SEC ID N°:6	4214	TTTCATTGTCGCTATTGATTTTTACTTCAATGGGCTCTTCCAACAAGGAAGAAGCTTGCT	4273
SEC ID N°:7	188790	TTTCATTGTCGCTATTGATTTTTACTTCAATGGGCTCTTCCAACAAGGAAGAAGCTTGCT	188849
SEC ID N°:8	18261	TTTCATTGTCGCTATTGATTTTTACTTCAATGGGCTCTTCCAACAAGGAAGAAGCTTGCT	18320
SEC ID N°:9	476	TTTCATTGTCGCTATTGATTTTTACTTCAATGGGCTCTTCCAACAAGGAAGAAGCTTGCT	535
SEC ID N°:10	196065	TTTCATTGTCGCTATTGATTTTTACTTCAATGGGCTCTTCCAACAAGGAAGAAGCTTGCT	196124
SEC ID N°:11	4156	TTTCATTGTCGCTATTGATTTTTACTTCAATGGGCTCTTCCAACAAGGAAGAAGCTTGCT	4215
SEC ID N°:1	61	GGTAGCACTTGCTACCCTGAGTTCATCCAGGCCAACTGTGAGCAAGGAGCACAAAGCCAC	120
SEC ID N°:2	4104	GGTAGCACTTGCTACCCTGAGTTCATCCAGGCCAACTGTGAGCAAGGAGCACAAAGCCAC	4163
SEC ID N°:3	4338	GGTAGCACTTGCTACCCTGAGTTCATCCAGGCCAACTGTGAGCAAGGAGCACAAAGCCAC	4397
SEC ID N°:4	4293	GGTAGCACTTGCTACCCTGAGTTCATCCAGGCCAACTGTGAGCAAGGAGCACAAAGCCAC	4352
SEC ID N°:5	4287	GGTAGCACTTGCTACCCTGAGTTCATCCAGGCCAACTGTGAGCAAGGAGCACAAAGCCAC	4346
SEC ID N°:6	4274	GGTAGCACTTGCTACCCTGAGTTCATCCAGGCCAACTGTGAGCAAGGAGCACAAAGCCAC	4333
SEC ID N°:7	188850	GGTAGCACTTGCTACCCTGAGTTCATCCAGGCCAACTGTGAGCAAGGAGCACAAAGCCAC	188909
SEC ID N°:8	18321	GGTAGCACTTGCTACCCTGAGTTCATCCAGGCCAACTGTGAGCAAGGAGCACAAAGCCAC	18380
SEC ID N°:9	536	GGTAGCACTTGCTACCCTGAGTTCATCCAGGCCAACTGTGAGCAAGGAGCACAAAGCCAC	595
SEC ID N°:10	196125	GGTAGCACTTGCTACCCTGAGTTCATCCAGGCCAACTGTGAGCAAGGAGCACAAAGCCAC	196184
SEC ID N°:11	4216	GGTAGCACTTGCTACCCTGAGTTCATCCAGGCCAACTGTGAGCAAGGAGCACAAAGCCAC	4275
SEC ID N°:1	121	AAGTCTTCCAGAGGATGCTTGATTCAGTGGTTCGCTTCAAGGCTTCCACTGCAAAAACA	180
SEC ID N°:2	4164	AAGTCTTCCAGAGGATGCTTGATTCAGTGGTTCGCTTCAAGGCTTCCACTGCAAAAACA	4223
SEC ID N°:3	4398	AAGTCTTCCAGAGGATGCTTGATTCAGTGGTTCGCTTCAAGGCTTCCACTGCAAAAACA	4457
SEC ID N°:4	4353	AAGTCTTCCAGAGGATGCTTGATTCAGTGGTTCGCTTCAAGGCTTCCACTGCAAAAACA	4412
SEC ID N°:5	4347	AAGTCTTCCAGAGGATGCTTGATTCAGTGGTTCGCTTCAAGGCTTCCACTGCAAAAACA	4406
SEC ID N°:6	4334	AAGTCTTCCAGAGGATGCTTGATTCAGTGGTTCGCTTCAAGGCTTCCACTGCAAAAACA	4393
SEC ID N°:7	188910	AAGTCTTCCAGAGGATGCTTGATTCAGTGGTTCGCTTCAAGGCTTCCACTGCAAAAACA	188969
SEC ID N°:8	18381	AAGTCTTCCAGAGGATGCTTGATTCAGTGGTTCGCTTCAAGGCTTCCACTGCAAAAACA	18440
SEC ID N°:9	596	AAGTCTTCCAGAGGATGCTTGATTCAGTGGTTCGCTTCAAGGCTTCCACTGCAAAAACA	655
SEC ID N°:10	196185	AAGTCTTCCAGAGGATGCTTGATTCAGTGGTTCGCTTCAAGGCTTCCACTGCAAAAACA	196244
SEC ID N°:11	4276	AAGTCTTCCAGAGGATGCTTGATTCAGTGGTTCGCTTCAAGGCTTCCACTGCAAAAACA	4335

FIGURA 14

ES 2 534 430 T3

SEC ID N°:1	181	CTAAAGATCCAAGAAGGCCCTTCATGGCCCCAGCAGGCCGGATCGGTACTGTATCAAGTCA	240
SEC ID N°:2	4224	CTAAAGATCCAAGAAGGCCCTTCATGGCCCCAGCAGGCCGGATCGGTACTGTATCAAGTCA	4283
SEC ID N°:3	4458	CTAAAGATCCAAGAAGGCCCTTCATGGCCCCAGCAGGCCGGATCGGTACTGTATCAAGTCA	4517
SEC ID N°:4	4413	CTAAAGATCCAAGAAGGCCCTTCATGGCCCCAGCAGGCCGGATCGGTACTGTATCAAGTCA	4472
SEC ID N°:5	4407	CTAAAGATCCAAGAAGGCCCTTCATGGCCCCAGCAGGCCGGATCGGTACTGTATCAAGTCA	4466
SEC ID N°:6	4394	CTAAAGATCCAAGAAGGCCCTTCATGGCCCCAGCAGGCCGGATCGGTACTGTATCAAGTCA	4453
SEC ID N°:7	188970	CTAAAGATCCAAGAAGGCCCTTCATGGCCCCAGCAGGCCGGATCGGTACTGTATCAAGTCA	189029
SEC ID N°:8	18441	CTAAAGATCCAAGAAGGCCCTTCATGGCCCCAGCAGGCCGGATCGGTACTGTATCAAGTCA	18500
SEC ID N°:9	656	CTAAAGATCCAAGAAGGCCCTTCATGGCCCCAGCAGGCCGGATCGGTACTGTATCAAGTCA	715
SEC ID N°:10	196245	CTAAAGATCCAAGAAGGCCCTTCATGGCCCCAGCAGGCCGGATCGGTACTGTATCAAGTCA	196304
SEC ID N°:11	4336	CTAAAGATCCAAGAAGGCCCTTCATGGCCCCAGCAGGCCGGATCGGTACTGTATCAAGTCA	4395
SEC ID N°:1	241	TGGCAGGTACAGTAGGATAAGCCACTCTGTCCCTTCCTGGGCAAAGAAGAAACGGAGGGG	300
SEC ID N°:2	4284	TGGCAGGTACAGTAGGATAAGCCACTCTGTCCCTTCCTGGGCAAAGAAGAAACGGAGGGG	4343
SEC ID N°:3	4518	TGGCAGGTACAGTAGGATAAGCCACTCTGTCCCTTCCTGGGCAAAGAAGAAACGGAGGGG	4577
SEC ID N°:4	4473	TGGCAGGTACAGTAGGATAAGCCACTCTGTCCCTTCCTGGGCAAAGAAGAAACGGAGGGG	4532
SEC ID N°:5	4467	TGGCAGGTACAGTAGGATAAGCCACTCTGTCCCTTCCTGGGCAAAGAAGAAACGGAGGGG	4526
SEC ID N°:6	4454	TGGCAGGTACAGTAGGATAAGCCACTCTGTCCCTTCCTGGGCAAAGAAGAAACGGAGGGG	4513
SEC ID N°:7	189030	TGGCAGGTACAGTAGGATAAGCCACTCTGTCCCTTCCTGGGCAAAGAAGAAACGGAGGGG	189089
SEC ID N°:8	18501	TGGCAGGTACAGTAGGATAAGCCACTCTGTCCCTTCCTGGGCAAAGAAGAAACGGAGGGG	18560
SEC ID N°:9	716	TGGCAGGTACAGTAGGATAAGCCACTCTGTCCCTTCCTGGGCAAAGAAGAAACGGAGGGG	775
SEC ID N°:10	196305	TGGCAGGTACAGTAGGATAAGCCACTCTGTCCCTTCCTGGGCAAAGAAGAAACGGAGGGG	196364
SEC ID N°:11	4396	TGGCAGGTACAGTAGGATAAGCCACTCTGTCCCTTCCTGGGCAAAGAAGAAACGGAGGGG	4455
SEC ID N°:1	301	ATGGAATTCCTTAGACTTACTTTTGTA AAAATGTCCCACGGTACTTACTCCCCT	360
SEC ID N°:2	4344	ATGGAATTCCTTAGACTTACTTTTGTA AAAATGTCCCACGGTACTTACTCCCCT	4403
SEC ID N°:3	4578	ATGGAATTCCTTAGACTTACTTTTGTA AAAATGTCCCACGGTACTTACTCCCCT	4637
SEC ID N°:4	4533	ATGGAATTCCTTAGACTTACTTTTGTA AAAATGTCCCACGGTACTTACTCCCCT	4592
SEC ID N°:5	4527	ATGGAATTCCTTAGACTTACTTTTGTA AAAATGTCCCACGGTACTTACTCCCCT	4586
SEC ID N°:6	4514	ATGGAATTCCTTAGACTTACTTTTGTA AAAATGTCCCACGGTACTTACTCCCCT	4573
SEC ID N°:7	189090	ATGGAATTCCTTAGACTTACTTTTGTA AAAATGTCCCACGGTACTTACTCCCCT	189149
SEC ID N°:8	18561	ATGGAATTCCTTAGACTTACTTTTGTA AAAATGTCCCACGGTACTTACTCCCCT	18620
SEC ID N°:9	776	ATGGAATTCCTTAGACTTACTTTTGTA AAAATGTCCCACGGTACTTACTCCCCT	835
SEC ID N°:10	196365	AT-GAATTCCTTAGACTTACTTTTGTA AAAATGTCCCACGGTACTTACTCCCCT	196423
SEC ID N°:11	4456	AT-GAATTCCTTAGACTTACTTTTGTA AAAATGTCCCACGGTACTTACTCCCCT	4514

FIGURA 14 Continuación.

