

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 619**

51 Int. Cl.:

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.12.2012 PCT/NL2012/050905**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13095132**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.12.2012 E 12819153 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.06.2018 EP 2794881**

54 Título: **MiARN para tratar el cáncer de cabeza y de cuello**

30 Prioridad:

22.12.2011 EP 11195240

22.12.2011 US 201161579191 P

22.12.2011 US 201161579162 P

22.12.2011 US 201161579229 P

22.12.2011 US 201161579019 P

22.12.2011 US 201161579160 P

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

05.11.2018

73 Titular/es:

INTERNA TECHNOLOGIES B.V. (50.0%)

Jonkerbosplein 52

6534 AB Nijmegen, NL y

VERENIGING VOOR CHRISTELIJK HOGER

ONDERWIJS, WETENSCHAPPELIJK

ONDERZOEK EN PATIËNTENZORG (50.0%)

72 Inventor/es:

BRAKENHOFF, RUDOLF HENRIKUS;

VAN DER PLAS, MARLON;

DE KEMP, SANNE ROSALY;

GOMMANS, WILLEMIJN MARIA;

PREVOST, GRÉGOIRE PIERRE ANDRÉ;

SCHAAPVELD, ROELAND QUIRINUS JOZEF y

CERISOLI, FRANCESCO

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 688 619 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

MiARN para tratar el cáncer de cabeza y de cuello

5 Campo de la invención

[0001] La invención se relaciona con un uso diagnóstico de una molécula de miARN, equivalente o fuente del mismo y el uso terapéutico de dicha molécula de miARN, equivalente o fuente del mismo en enfermedades y condiciones asociadas a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de la mucosa preneoplásico.

10 Antecedentes de la invención

[0002] El carcinoma de células escamosas de cabeza y de cuello (HNSCC) se desarrolla en los revestimientos de la mucosa del tracto aerodigestivo superior y contribuye aproximadamente al 5 % de todos los cánceres en el mundo occidental. Los factores de riesgo bien conocidos del HNSCC son fumar tabaco, el consumo excesivo de alcohol y la infección con papilomavirus humano (HPV). Aproximadamente un tercio de los pacientes presentan tumores con fase temprana y reciben tratamiento de modalidad única (cirugía o radioterapia). El índice de supervivencia a cinco años para este grupo de pacientes es del 90 %. Desafortunadamente, la mayoría de los pacientes presenta etapas avanzadas de la enfermedad. Estos pacientes son frecuentemente tratados con una combinación de cirugía y radioterapia o quimiorradiación, la aplicación concurrente de quimioterapia con cisplatino y radioterapia locorregional sistémicas. A pesar de las grandes mejoras en el tratamiento del HNSCC, la supervivencia a largo plazo solo ha mejorado moderadamente durante los últimos 20 años. Los pacientes todavía desarrollan frecuentemente recurrencias locorregionales, metástasis distantes y segundos tumores primarios que dan como resultado un índice de supervivencia a cinco años inferior al 60 %. Por lo tanto, el desarrollo de nuevos agentes anticancerígenos, que mejoren la supervivencia del paciente, es lo más deseable.

[0003] Diferentes líneas de evidencia indican que los cánceres de cabeza y de cuello son precedidos por campos preneoplásicos en el epitelio de la mucosa caracterizados por cambios genéticos asociados al cáncer. Estos campos son mayoritariamente no visibles a simple vista y permanecen frecuentemente detrás cuando el tumor se extirpa o se trata de otro modo, causando recurrencias frecuentes y segundos tumores primarios (Leemans C.R., *et al.* 2011). En el presente no hay ningún tratamiento para estos campos.

[0004] Diferentes estudios han mostrado la importancia de los miARN en el HNSCC en general (Xiqiang Liu *et al.*, doi: 10.1016/j.canlet.2009.05.030; Wen-liang Lo *et al.*, doi: 10.1002/path.2826). Los perfiles de expresión de miARN alterados se describieron tanto en líneas celulares como tumores de HNSCC en comparación con los controles normales (Li-Hsin Chen *et al.*, doi: 10.1155/2010/135632; Janki Mohan Babu *et al.*, doi: 10.1016/j.bbcan.2011.04.003; Mario Pérez-Saiáns *et al.*, doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01121.x). Una serie de miARN que se han identificado como que se expresan diferencialmente demostraron estar asociados con un peor pronóstico, tal como miR-21 y miR-211. De manera interesante, estudios recientes han descrito algunos miARN que actúan como supresores de tumor mediante la dirección de ciertos oncogenes. Por ejemplo, la familia miR-16 ha mostrado efectos antiproliferativos mediante la regulación negativa de la progresión del ciclo celular y la inducción de apoptosis vía el silenciamiento de BCL2. La expresión ectópica de miR-181a resultó en la proliferación disminuida vía la dirección del oncogén K-Ras. Sin embargo, todavía no se ha desarrollado ningún nuevo tratamiento que utilice una molécula de miARN como ingrediente activo.

45 Descripción de la invención

[0005] La invención abarca diferentes usos de una molécula de miARN-323, isomiR, o un precursor del mismo como se identifica en este documento. La divulgación también abarca cada una de las recientemente identificadas moléculas de miARN, equivalente, imitación, isomiR *per se*.

[0006] En un primer aspecto, se proporciona una molécula de miARN-323, isomiR, o un precursor del mismo, o una composición que comprende dicha molécula de miARN-323, isomiR, o un precursor del mismo, para el uso como un medicamento para prevenir, tratar, revertir, curar y/o retrasar una enfermedad o una condición asociada a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de la mucosa preneoplásico, donde dicha molécula de miARN-323 o isomiR comprende la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 11, 12, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 y/o 70 y tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con la SEQ ID N.º: 22, 23, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228 y/o 229, donde dicho precursor es un ácido nucleico que tiene al menos el 90 % de identidad con la SEQ ID N.º: 3 y/o 31 y tiene una longitud de al menos 50 nucleótidos. Como parte de la divulgación, se proporciona una molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345 y/o miARN-3157, un equivalente, imitación, isomiR, o una fuente del mismo o una composición que comprende dicha molécula de miARN, dicho equivalente o dicha fuente del mismo, preferiblemente para el uso como un medicamento para prevenir, tratar, revertir, curar y/o retrasar una enfermedad o una condición asociada a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de

cuello o un cambio de la mucosa preneoplásico. Otras enfermedades y condiciones se abarcan también en la invención como se explica más tarde en este documento como el cáncer colorrectal, cáncer de colon, glioblastoma, tumor cerebral, cáncer de mama, cáncer de cérvix.

5 [0007] Los microARN (miARN) son pequeños ARN de 17-25 nucleótidos, que funcionan como reguladores de la expresión génica en eucariotas. Los miARN se expresan inicialmente en el núcleo como parte de transcritos primarios largos llamados miARN primarios (pri-miARN). Dentro del núcleo, los pri-miARN se digieren parcialmente por la enzima Drosha, para formar miARN precursores de horquilla de 65-120 nucleótidos de longitud (pre-miARN) que se exportan al citoplasma para procesamiento adicional con Dicer en miARN más cortos maduros, que son las moléculas activas. En los animales, estos breves ARN comprenden una región "semilla" proximal 5' (nucleótidos 2 a 8) que parece ser el determinante primario de la especificidad de par del miARN a la región sin traducir 3' (3'-UTR) de un ARNm objetivo. Una explicación más detallada se da en la parte dedicada a las definiciones generales.

15 [0008] Cada una de las definiciones dadas más adelante en referencia a una molécula de miARN, un equivalente de miARN, una imitación de miARN o un isomiR de miARN, o una imitación o un isomiR o una fuente de miARN se debe usar para cada uno de los miARN identificados o equivalente de miARN o fuentes de miARN de esta aplicación: miARN-345, miARN-323, miARN-371, miARN-342, miARN-326, miARN-181a, miARN-3157 y fuentes de los mismos. Las secuencias maduras o de imitación preferidas (identificadas en la tabla 3 como SEQ ID N.º: 19-29, 364), secuencias semilla (identificadas en las tablas 3 y 5 como SEQ ID N.º: 8-18, 363 y 36-107, 366, 20 367), secuencias isomiR (identificadas en la tabla 5 como SEQ ID N.º: 108-354, 368-372) o secuencias fuente (identificadas en las tablas 2 (precursor de ARN como SEQ ID N.º: 1-7, 362) o 4 (ADN que codifica un precursor de ARN como SEQ ID N.º: 30-35, 365)) de dicha molécula de miARN o equivalente del mismo respectivamente se identifican en las tablas correspondientes. En el texto entero de la aplicación, a menos que se indique lo contrario, un miARN también se puede llamar una molécula de miARN, un miR, o un equivalente del mismo o una fuente o un precursor del mismo. Un equivalente preferido es un isomiR o una imitación. Cada secuencia identificada en este documento se puede identificar como SEQ ID N.º como se usa en el texto de la aplicación o como SEQ ID N.º correspondiente en el listado de secuencias. La nomenclatura tal y como se define en www.mirbase.org/help/nomenclature.shtml se ha usado en este documento.

30 [0009] En el contexto de la invención, una molécula de miARN o un equivalente o una imitación o un isomiR del mismo puede ser un miARN sintético o natural o recombinante o maduro o parte de un miARN maduro o un miARN humano o derivado a partir de un miARN humano como se define adicionalmente en la parte dedicada a las definiciones generales. Una molécula de miARN humano es una molécula de miARN que se encuentra en una célula, tejido, órgano o fluidos corporales humanos (es decir molécula de miARN humano endógeno). Una molécula de miARN humano también puede ser una molécula de miARN humano derivada a partir de una molécula de miARN humano endógeno mediante la sustitución, delección y/o adición de un nucleótido. Una molécula de miARN o un equivalente o una imitación del mismo puede ser una molécula de ARN monocatenario o bicatenario.

40 [0010] Preferiblemente una molécula de miARN o un equivalente, o una imitación del mismo tiene una longitud de 6 a 30 nucleótidos, preferiblemente una longitud de 12 a 30 nucleótidos, preferiblemente una longitud de 15 a 28 nucleótidos, más preferiblemente dicha molécula tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos o más.

45 [0011] En una forma de realización preferida de la divulgación, una molécula de miARN o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla de dicha molécula de miARN o equivalente o imitación o isomiR del mismo (las tablas 3 y 5 muestran la secuencia semilla preferida de una de las moléculas de miARN identificadas en este documento como SEQ ID N.º: 8-18, 363 y 36-107, 366, 367). Preferiblemente en esta forma de realización de la divulgación, una molécula de miARN o un equivalente o una imitación o isomiR del mismo tiene una longitud de 6 a 30 nucleótidos y más preferiblemente comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla de dicha molécula de miARN o equivalente del mismo. Aún más preferiblemente, como parte de la divulgación, una molécula de miARN o un equivalente o una imitación o isomiR del mismo tiene una longitud de 15 a 28 nucleótidos y más preferiblemente comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla, aún más preferiblemente una molécula de miARN tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos o más.

60 [0012] Por consiguiente, una molécula de miARN-345 preferida o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como la SEQ ID N.º: 16 y más preferiblemente tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos o más.

65 [0013] Por consiguiente, una molécula de miARN-323 preferida o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende la secuencia semilla identificada como la SEQ ID N.º: 11 y/o 12 y más preferiblemente tiene una

longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos o más.

Una molécula de miARN-323 más preferida o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende la secuencia semilla identificada como la SEQ ID N.º: 11 y más preferiblemente tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos o más.

Como parte de la divulgación, una molécula de miARN-323 preferida o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como la SEQ ID N.º: 11 y/o 12 y más preferiblemente tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos o más. Una molécula de miARN-323 más preferida o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como la SEQ ID N.º: 11 y más preferiblemente tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos o más.

[0014] Por consiguiente, una molécula de miARN-371 preferida o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como la SEQ ID N.º: 17 y/o 18 y más preferiblemente tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos o más. Una molécula de miARN-371 más preferida o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como la SEQ ID N.º: 18 y más preferiblemente tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos o más.

[0015] Por consiguiente, una molécula de miARN-342 preferida o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como la SEQ ID N.º: 14 y/o 15 y más preferiblemente tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos o más. Una molécula de miARN-342 más preferida o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como la SEQ ID N.º: 14 y más preferiblemente tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos o más.

[0016] Por consiguiente, una molécula de miARN-326 preferida o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como la SEQ ID N.º: 13 y más preferiblemente tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos o más.

[0017] Por consiguiente, una molécula de miARN-3157 preferida o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como la SEQ ID N.º: 363 y más preferiblemente tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos o más. En una forma de realización, una molécula de miARN-181a más preferida o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 8, 9, y/o 10 y más preferiblemente tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos o más. En una forma de realización más preferida, una molécula de miARN-181a o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como la SEQ ID N.º: 8 y más preferiblemente tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos o más.

[0018] En otra forma de realización preferida, una molécula de miARN o un equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende una secuencia semilla dada como se identifica en las tablas 3 y 5 como SEQ ID N.º: 8-18, 363 y 36-107, 366, 367 y tiene al menos el 70 % de identidad sobre la secuencia madura entera como se identifica en la tabla 3 (la tabla 3 muestra secuencias maduras o de imitación preferidas de cada uno de los miARN identificados en este documento como las SEQ ID N.º: 19-29, 364). Preferiblemente, la identidad es de al menos el 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %. Como parte de la divulgación, una molécula de miARN o un equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en una secuencia semilla dada como se identifica en las tablas 3 y 5 como las SEQ ID N.º: 8-18, 363 y 36-107, 366, 367 y tiene al menos el 70 % de identidad con la secuencia madura entera como se identifica en la tabla 3.

[0019] Por consiguiente, una molécula de miARN-345 preferida o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 16, 100, 101, 102, y/o 103 y/o tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con las SEQ ID N.º: 27, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332 y/o 333.

[0020] Por consiguiente, una molécula de miARN-323 o isomiR del mismo comprende la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 11, 12, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 y/o 70 y tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con las SEQ ID N.º: 22, 23, 203, 204, 205, 206,

207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228 y/o 229.

Una molécula de miARN-323 más preferida o isomiR del mismo comprende la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 11, 66, 67, 68, 69 y/o 70 y tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con las SEQ ID N.º: 22, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228 y/o 229.

Como parte de la divulgación, una molécula de miARN-323 preferida o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 11, 12, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 y/o 70 y/o tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con las SEQ ID N.º: 22, 23, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228 y/o 229.

Una molécula de miARN-323 más preferida o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 11, 66, 67, 68, 69 y/o 70 y/o tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad sobre las SEQ ID N.º: 22, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228 y/o 229.

[0021] Por consiguiente, una molécula de miARN-371 preferida o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 17, 18, 104, 105, 106 y/o 107 y/o tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con las SEQ ID N.º: 28, 29, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353 y/o 354.

Una molécula de miARN-371 más preferida o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 18, 104, 105 y/o 106 y/o tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con las SEQ ID N.º: 29, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341 y/o 342.

[0022] Por consiguiente, una molécula de miARN-342 preferida o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 14, 15, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 y/o 99 y/o tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con las SEQ ID N.º: 25, 26, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317 y/o 318. Una molécula de miARN-342 más preferida o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 14, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 y/o 99 y/o tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con las SEQ ID N.º: 25, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317 y/o 318.

[0023] Por consiguiente, una molécula de miARN-326 preferida o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 13, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77 y/o 78 y/o tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con las SEQ ID N.º: 24, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243 y/o 244.

[0024] Por consiguiente, una molécula de miARN-3157 preferida o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como las SEQ ID N.º: 363, 366 y/o 367 y/o tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con las SEQ ID N.º: 364, 368, 369, 370, 371 y/o 372. Por consiguiente, una molécula de miARN-181a preferida o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 8, 9, 10, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 y/o 60 tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con las SEQ ID N.º: 19, 20, 21, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201 y/o 202.

Una molécula de miARN-181a más preferida o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 8, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 y/o 46 tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con las SEQ ID N.º: 19, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156 y/o 157.

[0025] Preferiblemente en esta forma de realización, una molécula de miARN o un equivalente o una imitación o un isomiR del mismo tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22,

23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos o más, comprende una secuencia semilla dada como se identifica en las tablas 3 y 5 como SEQ ID N.º: 8-18, 363 y 36-107, 366, 367 y tiene al menos el 70 % de identidad sobre la secuencia madura entera como se identifica en la tabla 3 como SEQ ID N.º: 19-29, 364 y 108-354, 368-372. Preferiblemente, la identidad es de al menos el 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

5

[0026] Alternativamente, preferiblemente en esta forma de realización, una molécula de miARN o un equivalente o una imitación o un isomiR del mismo tiene una longitud de no más de 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 nucleótidos, comprende una secuencia semilla dada como se identifica en las tablas 3 y 5 como SEQ ID N.º: 8-18, 363 y 36-107, 366, 367 y tiene al menos el 70 % de identidad sobre la secuencia madura entera como se identifica en la tabla 3 como SEQ ID N.º: 19-29, 364 y 108-354, 368-372. Preferiblemente, la identidad es de al menos el 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 %.

10

[0027] En otra forma de realización preferida, un isomiR de una molécula de miARN tiene al menos 70 % de identidad sobre la secuencia isomiR entera (la tabla 5 muestra el isomiR preferido de cada uno de los miARN maduros identificados como SEQ ID N.º: 108-354, 368-372. Preferiblemente, la identidad es de al menos el 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o más alta. Preferiblemente en esta forma de realización, un isomiR de una molécula de miARN o un equivalente o una imitación del mismo tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 nucleótidos o más.

15

20

[0028] Por consiguiente, una molécula de miARN-345 preferida o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 16, 100, 101, 102, y/o 103 y/o tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con las SEQ ID N.º: 27, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332 y/o 333 y/o tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 nucleótidos o más.

25

[0029] Por consiguiente una molécula de miARN-323 preferida o isomiR del mismo comprende la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 11, 12, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 y/o 70 y tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con las SEQ ID N.º: 22, 23, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228 y/o 229 y tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 nucleótidos o más.

30

Una molécula de miARN-323 más preferida o isomiR del mismo comprende la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 11, 66, 67, 68, 69 y/o 70 y tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con las SEQ ID N.º: 22, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228 y/o 229 y tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 nucleótidos o más.

35

[0030] Por consiguiente, una molécula de miARN-371 preferida o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 17, 18, 104, 105, 106 y/o 107 y/o tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con las SEQ ID N.º: 28, 29, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353 y/o 354 y/o tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 nucleótidos o más.

40

45

Una molécula de miARN-371 más preferida o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 18, 104, 105 y/o 106 y/o tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con las SEQ ID N.º: 29, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341 y/o 342 y/o tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 nucleótidos o más.

50

[0031] Por consiguiente, una molécula de miARN-342 preferida o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 14, 15, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 y/o 99 y/o tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con las SEQ ID N.º: 25, 26, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317 y/o 318 y/o tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 nucleótidos o más. Una molécula de miARN-342 más preferida o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 14, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 y/o 99 y/o tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con las SEQ ID N.º: 25, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308,

60

65

309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317 y/o 318 y/o tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 nucleótidos o más.

5 [0032] Por consiguiente, una molécula de miARN-326 preferida o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 13, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77 y/o 78 tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con las SEQ ID N.º: 24, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243 y/o 244 y/o tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 nucleótidos o más.

15 [0033] Por consiguiente, una molécula de miARN-3157 preferida o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 363, 366 y/o 367 tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con las SEQ ID N.º: 364, 368, 369, 370, 371 y/o 372 y/o tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 nucleótidos o más.

20 [0034] En una forma de realización más preferida, una molécula de miARN-181a o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 8, 9, 10, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59 y/o 60 tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con las SEQ ID N.º: 19, 20, 21, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201 y/o 202 y/o tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 nucleótidos o más.

30 En una forma de realización aún más preferida, una molécula de miARN-181a o equivalente o imitación o isomiR del mismo comprende al menos 6 de los 7 nucleótidos presentes en la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 8, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45 y/o 46 tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con las SEQ ID N.º: 19, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156 y/o 157 y/o tiene una longitud de al menos 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 nucleótidos o más.

40 [0035] Otra molécula de miARN preferida o equivalente o imitación o un isomiR del mismo tiene al menos el 60 % de identidad con una secuencia semilla (identificada en las tablas 3 y 5 como SEQ ID N.º: 8-18, 363 y 36-107, 366-367 o con una secuencia madura (identificada en la tabla 3 como SEQ ID N.º: 19-29, 364 o con una secuencia precursora (identificada en la tabla 2 como SEQ ID N.º: 1-7, 362 o con un ADN que codifica un precursor de ARN (identificado en la tabla 4 como SEQ ID N.º: 30-35, 365 o con una secuencia isomiR (identificada en la tabla 5 como SEQ ID N.º: 108-354, 368-372. La identidad puede ser de al menos el 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 99 % o el 100 %. La identidad se evalúa preferiblemente en la SEQ ID N.º entera como se identifica en una tabla determinada. Sin embargo, la identidad también se puede evaluar en parte de una SEQ ID N.º determinada. Parte puede significar al menos el 50 % de la longitud de la SEQ ID N.º, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 % o el 100 %.

50 [0036] Un equivalente de una molécula de miARN puede ser un isomiR o una imitación. Una secuencia precursora puede dar como resultado más de una secuencia isomiR dependiendo del proceso de maduración (véase por ejemplo miARN-342 donde se han identificado algunos isomiR múltiples de tejidos (tabla 5)). Una imitación es una molécula que tiene una actividad similar o idéntica a una molécula de miARN. En este contexto, una actividad similar tiene el mismo significado que un nivel aceptable de una actividad.

55 [0037] Cada una de las moléculas de miARN o equivalentes o imitaciones o isomiR del mismo identificadas en este documento tiene un nivel aceptable de una actividad de un miARN determinado del que se derivan. Un nivel aceptable de una actividad es preferiblemente que dicho miARN o equivalente o imitaciones o isomiR del mismo sigue siendo capaz de mostrar un nivel aceptable de dicha actividad de dicho miARN. Una actividad de un miARN determinado o un equivalente del mismo es, por ejemplo, la capacidad de mostrar una actividad antitumoral detectable en las células tumorales como se define más tarde en este documento. Un nivel aceptable de una actividad es preferiblemente al menos el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 100 %, o más del 100 %, tal como el 200 % o 300 % o más de la actividad del miARN del que se derivan.

65 [0038] Una actividad preferida de cualquiera de la molécula de miARN o equivalente o isomiR o imitación del mismo identificados en este documento (es decir miARN-345, miARN-323, miARN-371, miARN-342, miARN-326,

miARN-3157, miARN-181a) es mostrar o poder comprender una actividad antitumoral detectable en las células tumorales de un sujeto como se define más tarde en este documento.

[0039] Una fuente de una molécula de miARN o una fuente de un equivalente de una molécula de miARN, imitación, isomiR puede ser cualquier molécula que sea capaz de inducir la producción de una molécula de miARN o de un equivalente del mismo tal como una imitación o isomiR como se identifica en este documento y que comprende una estructura de tipo horquilla y/o una molécula de ácido nucleico bicatenario. La presencia de una estructura de tipo horquilla se puede evaluar utilizando el programa RNashapes (Steffen P. *et al* 2006) que usa ventanas deslizantes de 80, 100 y 120 nt o más. La estructura de tipo horquilla está normalmente presente en una fuente natural o endógena de una molécula de miARN mientras que una molécula de ácido nucleico bicatenario está normalmente presente en una fuente recombinante o sintética de una molécula de miARN o de un equivalente del mismo.

[0040] Una fuente de una molécula de miARN o de un equivalente o una imitación o un isomiR del mismo puede ser un ARN monocatenario opcionalmente dentro de una estructura de tipo horquilla, un ARN bicatenario o un ARN parcialmente bicatenario o puede comprender tres cadenas, un ejemplo de lo cual se describe en WO2008/10558. Como se utiliza en este documento, parcialmente bicatenario se refiere a estructuras bicatenarias que también comprenden estructuras monocatenarias en el extremo 5' y/o en el extremo 3'. Puede ocurrir cuando cada una de las cadenas de una molécula de miARN no tienen la misma longitud. En general, tal molécula de miARN bicatenario parcial puede tener menos del 75 % de estructura bicatenaria y más del 25 % de estructura monocatenaria, o menos del 50 % de estructura bicatenaria y más del 50 % estructura monocatenaria, o más preferiblemente menos del 25 %, 20 % o 15 % de estructura bicatenaria y más del 75 %, 80 %, 85% de estructura monocatenaria.

[0041] Alternativamente, una fuente de una molécula de miARN o de un equivalente o una imitación o un isomiR del mismo es una molécula de ADN que codifica un precursor de una molécula de miARN o de un equivalente o una imitación o un isomiR del mismo. Las moléculas de ADN preferidas en este contexto se identifican en la tabla 4 como SEQ ID N.º: 30-35, 365. La divulgación abarca el uso de una molécula de ADN que codifica un precursor de una molécula de miARN que tiene al menos el 70 % de identidad con dicha secuencia como se identifica en la tabla 4. Preferiblemente, la identidad es de al menos el 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 %. Preferiblemente en esta forma de realización, una molécula de ADN tiene una longitud de al menos 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 130, 150, 200, 250, 300, 350, 400 nucleótidos o más y tiene al menos el 70 % de identidad con una secuencia de ADN identificada en la tabla 4 como SEQ ID N.º: 30-35, 365. La invención abarca el uso de una molécula de ADN que codifica un precursor de una molécula de miARN que tiene al menos el 90 % de identidad con la SEQ ID N.º: 3 y/o 31 y tiene una longitud de al menos 50 nucleótidos.

La inducción de la producción de una molécula de miARN determinada o de un equivalente del mismo o de una imitación o un isomiR del mismo se obtiene preferiblemente cuando dicha fuente se introduce en una célula usando un ensayo tal y como se define a continuación.

Las células abarcadas por la presente descripción se definen más adelante.

[0042] Una fuente preferida de una molécula de miARN o de un equivalente del mismo o de una imitación o un isomiR del mismo es un precursor del mismo, más preferiblemente un ácido nucleico que codifica dicha molécula de miARN o un equivalente del mismo o de una imitación o un isomiR del mismo. Un precursor preferido es un precursor que se produce de forma natural. Un precursor puede ser un precursor sintético o recombinante.

[0043] Un precursor preferido de una molécula de miARN determinada se identifica en la tabla 2 como SEQ ID N.º: 1-7, 362. La divulgación abarca el uso de un precursor de una molécula de miARN o de un equivalente del mismo que tiene al menos el 70 % de identidad con dicha secuencia. Preferiblemente, la identidad es de al menos el 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 %. Preferiblemente en esta forma de realización, una molécula de ADN tiene una longitud de al menos 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 130, 150, 200, 250, 300, 350, 400 nucleótidos o más y tiene al menos el 70 % de identidad con una secuencia identificada en la tabla 2 como las SEQ ID N.º: 1-7, 362.

La invención abarca el uso de un precursor de una molécula de miARN o de un isomiR del mismo que tiene al menos el 90 % de identidad con la SEQ ID N.º: 3 y/o 31 y tiene una longitud de al menos 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 130, 150, 200, 250, 300, 350, 400 nucleótidos o más.

[0044] Por consiguiente, una fuente preferida de una molécula de miARN-345 tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con la SEQ ID N.º: 6 y/o 34 y/o tiene una longitud de al menos 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 130, 150, 200, 250, 300, 350, 400 nucleótidos o más.

[0045] Por consiguiente, un precursor de una molécula de miARN-323 tiene al menos el 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con la SEQ ID N.º: 3 y/o 31 y tiene una longitud de al menos 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 130, 150, 200, 250, 300, 350, 400 nucleótidos o más. Se divulgan fuentes de una molécula de miARN-323 que tienen al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con la SEQ ID N.º: 3 y/o 31 y/o tiene una longitud de al menos 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 130, 150, 200, 250, 300, 350, 400 nucleótidos o más.

[0046] Por consiguiente, una fuente preferida de una molécula de miARN-371 tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con la SEQ ID N.º: 7 y/o 35 y/o tiene una longitud de al menos 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 130, 150, 200, 250, 300, 350, 400 nucleótidos o más.

5

[0047] Por consiguiente, una fuente preferida de una molécula de miARN-342 tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con la SEQ ID N.º: 5 y/o 33 y/o tiene una longitud de al menos 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 130, 150, 200, 250, 300, 350, 400 nucleótidos o más. Por consiguiente, una fuente preferida de una molécula de miARN-326 tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con la SEQ ID N.º: 4 y/o 32 y/o tiene una longitud de al menos 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 130, 150, 200, 250, 300, 350, 400 nucleótidos o más.

10

[0048] Por consiguiente, una fuente preferida de una molécula de miARN-3157 tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con la SEQ ID N.º: 362 y/o 365 y/o tiene una longitud de al menos 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 130, 150, 200, 250, 300, 350, 400 nucleótidos o más.

15

[0049] Por consiguiente, una fuente preferida de una molécula de miARN-181a tiene al menos el 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con las SEQ ID N.º: 1, 2 y/o 30 y/o tiene una longitud de al menos 50, 55, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 130, 150, 200, 250, 300, 350, 400 nucleótidos o más.

20

[0050] En este contexto, se indica que diferentes precursores de una molécula de miARN maduro determinada pueden llevar a una molécula de miARN idéntica. Por ejemplo, hsa-miARN-181a puede originar de precursores miARN-181a-1 o miARN-181a-2 (preferiblemente identificados como SEQ ID N.º: 1 y 2).

25

[0051] Las fuentes o precursores preferidos se han definido más adelante en este documento. Una fuente preferida incluye o comprende un constructo de expresión que comprende un ácido nucleico, es decir, ADN que codifica dicho precursor de dicho miARN, más preferiblemente dicho constructo de expresión es un vector de terapia génica viral seleccionado de vectores de terapia génica basados en un adenovirus, un virus adenoasociado (AAV), un virus herpes, un virus pox y un retrovirus. Un vector de terapia génica viral preferido es un vector AAV o lentiviral. Otros vectores preferidos son vectores virales oncolíticos. Tales vectores se describen adicionalmente en este documento más adelante. Alternativamente, una fuente puede ser una molécula de miARN sintética o una imitación química como se define adicionalmente en la parte dedicada a las definiciones generales.

30

[0052] La detección de la presencia de una molécula de miARN o de un equivalente del mismo tal como una imitación o un isomiR de una molécula de miARN o equivalente del mismo se puede realizar utilizando cualquier técnica conocida para la persona experta. La evaluación del nivel de expresión o de la presencia de tal molécula se realiza preferiblemente utilizando técnicas de biología molecular clásicas tales como qPCR (reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real), micromatrices, matrices de perlas, análisis de protección de RNAsa o análisis de transferencia de Northern o clonación y secuenciación. La persona experta entenderá que alternativamente o en combinación con la cuantificación de una molécula de miARN o de un equivalente del mismo, la cuantificación de un sustrato de una molécula de miARN correspondiente o de un equivalente del mismo de cualquier compuesto conocido por estar asociado a una función de dicha molécula de miARN o de dicho equivalente del mismo o la cuantificación de una función o actividad de dicha molécula de miARN o de dicho equivalente del mismo utilizando un ensayo específico se abarca dentro del alcance de la invención.

35

40

45

[0053] Las composiciones y formulaciones preferidas se definen todas más adelante en este documento. Una molécula de miARN o un equivalente del mismo o una imitación o un isomiR del mismo se puede utilizar como tal como una molécula desnuda, con o sin modificaciones químicas, o encapsulado en una partícula o conjugado a una fracción. Una composición preferida comprende una molécula de miARN o un equivalente del mismo o una imitación o un isomiR del mismo encapsulado en una nanopartícula o una estructura liposómica. Una molécula de miARN o equivalente del mismo o una imitación o un isomiR del mismo puede ser un híbrido de aptámero-miARN. Un aptámero-miARN se define como un miARN enlazado a un oligonucleótido de ARN (o ADN), donde el último adopta una conformación que dirige la molécula híbrida de aptámero-miARN a una proteína de la superficie de la célula (por ejemplo, péptido RGD cíclico (péptido arginina (R)-glicina (G)-ácido aspártico (D) cíclico). El miARN etiquetado con aptámero se puede enlazar a, por ejemplo, polietilenglicol, lo que aumenta la vida media circulante de la quimera (Dassie, J.P., *et al.* 2009).

50

55

Una actividad de un miARN determinado o un equivalente del mismo tal como una imitación, isomiR o una fuente correspondiente del mismo todos tal y como se define en este documento es preferiblemente la capacidad para mostrar una actividad o efecto antitumoral detectable en las células tumorales. Preferiblemente, esta actividad o efecto antitumoral solo se ve en una célula tumoral y, por lo tanto, no en una célula no tumoral sana correspondiente. En el contexto de la invención, una actividad o efecto antitumoral comprende al menos uno de los siguientes:

60

65 – una reducción de la viabilidad o supervivencia de las células tumorales

- una inducción de la apoptosis en las células tumorales o una inducción de la muerte de las células tumorales,
- una inhibición de la proliferación en las células tumorales,
- 5 – una inhibición o un retraso de un aumento de peso del tumor o una reducción de un peso del tumor o un crecimiento del tumor retardado o una inhibición de un crecimiento del tumor y
- una reducción de la expresión de ATM (ataxia telangiectasia mutada) en las células tumorales.

Exhibir tal actividad antitumoral detectable es crucial en la presente invención con el objetivo de ser capaz de prevenir, retrasar, curar y/o cualquier enfermedad o condición asociada con el cáncer de cabeza y de cuello. Cualquier enfermedad o condición asociada a o que comprende un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o en el que un cambio de la mucosa preneoplásico está implicado o asociado se puede prevenir, retardar, curar y/o tratar con una molécula tal y como se define en este documento. Otras enfermedades y condiciones también se abarcan en la invención como se explica más adelante en este documento, como el cáncer colorrectal, el cáncer de colon, el glioblastoma, el tumor cerebral, el cáncer de mama, el cáncer de cérvix.

[0054] La evaluación de una actividad antitumoral se puede realizar periódicamente, por ejemplo, cada semana, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses o cada año en un sujeto tratado.

El aumento/reducción de una actividad antitumoral se puede evaluar, por lo tanto, periódicamente, por ejemplo, cada semana, mes. Esta evaluación se realiza preferiblemente en diferentes puntos temporales para un sujeto determinado o en uno o más puntos temporales para un sujeto determinado y un control sano. Alternativamente, tal actividad antitumoral se puede medir comparando dicha actividad antitumoral en una célula tumoral a partir de un sujeto con la actividad correspondiente en una célula no tumoral o sana del mismo sujeto en un punto temporal determinado después de iniciar el tratamiento.

Cuando una actividad antitumoral se detecta al menos una vez, dos veces, tres veces, se dice que una molécula de miARN, un equivalente, una imitación, un isomiR del mismo o una fuente del mismo muestra una actividad antitumoral detectable.

[0055] Una actividad antitumoral detectable se ha detectado, por lo tanto, preferiblemente cuando en al menos un punto temporal se ha detectado una actividad antitumoral. Preferiblemente, tal actividad antitumoral detectable se ha detectado en al menos dos, tres, cuatro, cinco puntos temporales. En una forma de realización preferida, una actividad antitumoral se evalúa en células tumorales de un sujeto. Más preferiblemente, dichas células tumorales son células de HNSCC (carcinoma de células escamosas de la cabeza y del cuello), es decir, carcinomas de células escamosas o células del epitelio o de la mucosa del tracto aerodigestivo superior, que incluyen el labio, labio interno, cavidad bucal (boca), lengua, suelo de la boca, encía, paladar duro, cavidad nasal (dentro de la nariz), senos paranasales, faringe, que incluye la nasofaringe, orofaringe, hipofaringe y laringe (es decir, cáncer laríngeo, que incluye cáncer glótico, supraglótico y subglótico), tráquea. Alternativamente, dichas células tumorales pueden ser células colorrectales, células del colon, células cerebrales, células de glioblastoma, células de la mama, células de las cervicales.

[0056] Una reducción de la viabilidad o supervivencia de las células tumorales puede ser al menos una reducción de al menos el 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o 75 %, o más.

Una inducción de la apoptosis en las células tumorales o una inducción de la muerte de las células tumorales puede ser de al menos el 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o 75 %, o más. La viabilidad o la supervivencia o la muerte de las células tumorales se pueden evaluar utilizando técnicas conocidas para la persona experta. La viabilidad y la muerte de las células tumorales se pueden evaluar utilizando métodos de formación de imágenes rutinarios tales como MRI, CT o PET, y derivados de los mismos, o en biopsias. La viabilidad de las células tumorales se puede evaluar visualizando la extensión de la lesión en diferentes puntos temporales. Una reducción del 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o el 75 %, o más de la lesión observada al menos una vez se verá como una reducción de la viabilidad de las células tumorales.

Una inhibición de la proliferación de las células tumorales puede ser de al menos el 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o el 75 %, o más. La proliferación de las células se puede evaluar utilizando técnicas conocidas como un ensayo de proliferación estándar. Tal ensayo de proliferación puede usar tintes vitales tales como Cell Titer Blue (Promega). Este incluye una molécula de sustrato que se convierte en una molécula fluorescente mediante enzimas metabólicas. El nivel de fluorescencia refleja entonces el número de células vivas y metabólicamente activas. Alternativamente, tal ensayo de proliferación puede determinar el índice mitótico. El índice mitótico se basa en el número de células tumorales bajo la fase de proliferación en comparación con el número de células tumorales total. El etiquetado de las células proliferativas se puede realizar usando el anticuerpo Ki-67 y coloración inmunohistoquímica. Una inhibición de la proliferación de células tumorales se puede ver cuando el índice mitótico se reduce en al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 50 % o más (como se describe en Kearsley J.H., *et al*, 1990).

[0057] En algunas formas de realización, una inhibición o una reducción de un peso del tumor o un crecimiento del tumor retardado o una inhibición de un crecimiento del tumor pueden ser de al menos el 1 %, 5 %, 10 %, 15

%, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 % o el 75 %, o más. El peso del tumor o el crecimiento del tumor se pueden evaluar utilizando técnicas conocidas para la persona experta.

La detección del crecimiento del tumor o la detección de la proliferación de las células tumorales se pueden evaluar *in vivo* midiendo los cambios en la utilización de glucosa por tomografía de emisión de positrones con el análogo de glucosa 2-[18F]-fluoro-2-desoxi-D-glucosa (FDG-PET) o [18F]-'3-fluoro-'3-desoxi-L-timidina PET. Una alternativa *ex vivo* puede ser la coloración de una biopsia tumoral con Ki67.

[0058] En una forma de realización preferida, una reducción de la expresión de ATM (ataxia telangiectasia mutada) se detecta en las células tumorales. Una reducción puede significar una reducción de al menos el 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o más. En una forma de realización, no hay expresión detectable de ATM. Una molécula preferida de ácido nucleico que codifica ATM humana se representa mediante la SEQ ID N.º: 360. Una secuencia de aminoácidos codificada preferida correspondiente de ATM humana se representa mediante la SEQ ID N.º: 361 (UGID: 197106 Unigene Hs. 367437). Preferiblemente, una reducción del nivel de expresión de ATM se evalúa en el nivel de los ácidos nucleicos, más preferiblemente utilizando, qPCR, micromatrices o análisis de transferencia de Northern. Los cebadores usados pueden ser los del equipo de Applied Biosystems Hs01112326_ml. Alternativamente, según otra forma de realización preferida, una reducción del nivel de expresión de ATM se evalúa en el nivel de los aminoácidos. Una reducción del nivel de expresión de ATM en el nivel de los aminoácidos se puede detectar utilizando el método de transferencia de Western o ELISA. Alternativamente, según otra forma de realización preferida, una reducción de ATM se evalúa como una reducción de una actividad de ATM. Una actividad de ATM puede ser la fosforilación de uno de sus sustratos (Methods in molecular immunology, 2004). La fosforilación se puede evaluar por método de transferencia de Western utilizando un anticuerpo específico para residuos de serina o treonina fosforilada.

Preferiblemente dicho sustrato es CHK2. Otros sustratos adecuados incluyen p53, BRCA1, NBS1 o BLM. Una reducción de una actividad de ATM puede significar una reducción de al menos el 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o más de dicha actividad de fosforilación en un sustrato.

[0059] La invención proporciona una molécula de miARN-323, isomiR, o un precursor del mismo o una composición que comprende dicha molécula de miARN-323, isomiR, o un precursor del mismo, para el uso como un medicamento para prevenir, tratar, revertir, curar y/o retrasar una enfermedad o una condición asociada a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de la mucosa preneoplásico. Otras enfermedades y condiciones también se abarcan en la invención como se explica más adelante como el cáncer colorrectal, el cáncer de colon, el glioblastoma, el tumor cerebral, el cáncer de mama o el cáncer de cérvix.

La divulgación proporciona una molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345 y/o miARN-3157, un equivalente o una fuente del mismo o una composición que comprende dicha molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345, y/o miARN-3157, dicho equivalente o dicha fuente del mismo, preferiblemente, para el uso como un medicamento para prevenir, tratar, revertir, curar y/o retrasar una enfermedad o una condición asociada a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de la mucosa preneoplásico. Otras enfermedades y condiciones también se abarcan en la invención como se explica más adelante como el cáncer colorrectal, el cáncer de colon, el glioblastoma, el tumor cerebral, el cáncer de mama o el cáncer de cérvix.

[0060] Preferiblemente, una molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345 y/o miARN-3157 o un equivalente o una fuente del mismo es capaz de prevenir, tratar, revertir, curar y/o retardar una enfermedad o una condición asociada a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de la mucosa preneoplásico o el cáncer colorrectal, el cáncer de colon, el glioblastoma, el tumor cerebral, el cáncer de mama o el cáncer de cérvix cuando dicha molécula muestra una actividad antitumoral detectable tal y como se ha definido anteriormente en este documento.

[0061] Una enfermedad o una condición abarcada por la invención está implicada o asociada con un carcinoma de células escamosas (SCC) o un cambio de la mucosa preneoplásico. Un SCC preferido es el cáncer de cabeza y de cuello o HNSCC. Cáncer de cabeza y de cuello se refiere a un grupo de cánceres similares biológicamente que se inician en el tracto aerodigestivo superior, que incluye el labio, labio interno, cavidad bucal (boca), lengua, suelo de la boca, encías, paladar duro, cavidad nasal (dentro de la nariz), senos paranasales, faringe, que incluye la nasofaringe, orofaringe (es decir OSCC: carcinoma de células escamosas orofaríngeo), hipofaringe y laringe (es decir, cáncer laríngeo que incluye cáncer glótico, supraglótico y subglótico). Normalmente, el cáncer de cabeza y de cuello se origina a partir de células escamosas, es decir células de la mucosa o del epitelio del tracto aerodigestivo superior. Sin embargo, la invención no está limitada al HNSCC. La invención también abarca otros SCC (carcinomas de células escamosas). Un SCC es un cáncer que se origina en los revestimientos de la mucosa o la piel. Además del revestimiento del epitelio de la mucosa de las regiones de la cabeza y del cuello (es decir, el tracto digestivo y aerodigestivo superior), este también incluye la tráquea y los bronquios, el esófago y la región anogenital. Tal cáncer se puede caracterizar genéticamente por una mutación de p53 y/o una inactivación de p16 como eventos de iniciación (Leemans C.R. *et al* 2011, y Kumar B, *et al*, 2008). La invención también abarca cualquier cambio preneoplásico o denominado "campo" en un epitelio mucoso. Tal cambio

preneoplásico incluye cualquier célula o grupo de células de la mucosa que contiene cambios genéticos asociados con el cáncer conocidos para la persona experta. Muchos de estos preneoplásicos son morfológicamente anormales bajo el microscopio y se hace referencia a ellos como displasia. Algunos son incluso visibles a simple vista como cambios de la mucosa blancos o rojos referidos como leucoplasia y eritroplasia, respectivamente (Leemans C.R. *et al*, Nature 2011).

En otra forma de realización, una enfermedad o una condición abarcada por la invención está implicada o asociada con el cáncer colorrectal o el cáncer de colon. El cáncer colorrectal se conoce por estar asociado con el crecimiento celular descontrolado (neoplasia) en el colon, recto o vermiforme.

En otra forma de realización, una enfermedad o una condición abarcada por la invención está implicada o asociada con el glioblastoma o tumor cerebral. Un glioblastoma se conoce por ser un tumor que implica a las células gliales. En otra forma de realización, una enfermedad o una condición abarcada por la invención está implicada o asociada con el cáncer de mama.

En otra forma de realización, una enfermedad o una condición abarcada por la invención está implicada o asociada con el cáncer de cérvix.

[0062] Hay medicamentos conocidos actualmente que se pueden utilizar para prevenir, tratar, revertir, curar y/o retrasar específicamente una enfermedad o condición asociada a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de la mucosa preneoplásico u otras enfermedades y condiciones tal y como se define en este documento en un sujeto. Sin embargo, es posible que cada uno de estos medicamentos muestre una actividad terapéutica que no es suficiente para curar a todos los pacientes o pueda inducir resistencia. Cada una de estas características se han definido anteriormente en este documento. La invención proporciona un medicamento nuevo que se prevé que se añada a las modalidades de tratamiento actuales. Se podría incluso aplicar para erradicar cambios de la mucosa preneoplásicos o prevenir la transformación maligna. La invención abarca una molécula de miARN-323, isomiR, o un precursor del mismo o una composición que comprende dicha molécula de miARN, isomiR, o un precursor del mismo, para el uso como un medicamento para prevenir, tratar, revertir, curar y/o retrasar una enfermedad o una condición asociada a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de la mucosa preneoplásico. Este uso incluye aumentar, preferiblemente aumentar farmacológicamente una actividad o el nivel de estado estable de dicha molécula de miARN-323, isomiR, o de dicho precursor del mismo en un sujeto, en una célula de dicho sujeto, en un tejido de dicho sujeto o en el fluido corporal de dicho sujeto.

[0063] La divulgación abarca usar una molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345, y/o miARN-3157, un equivalente o una fuente del mismo o una composición que comprende dicha molécula de miARN o equivalente del mismo o una fuente del mismo. Este uso incluye aumentar, preferiblemente aumentar farmacológicamente una actividad o el nivel de estado estable de dicha molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345 y/o miARN-3157 o equivalente del mismo o de dicha fuente del mismo en un sujeto, en una célula de dicho sujeto, en un tejido de dicho sujeto o en el fluido corporal de dicho sujeto.

[0064] En este uso, una actividad o nivel de estado estable de dicho miARN-323, molécula, isomiR, o precursor del mismo se aumenta con el fin de mostrar una actividad antitumoral detectable. En este uso como se divulga, una actividad o nivel de estado estable de dicha molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345, y/o miARN-3157 o equivalente del mismo o fuente del mismo se aumenta con el fin de mostrar una actividad antitumoral detectable. La evaluación de una actividad antitumoral en un sujeto se ha definido anteriormente en este documento.

[0065] Una actividad o nivel de estado estable de dicho miARN-323, molécula, isomiR, o precursor del mismo se puede aumentar en el nivel de dicha propia molécula de miARN (o isomiR del mismo). Como parte de la divulgación, una actividad o nivel de estado estable de dicha molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345 y/o miARN-3157, equivalente del mismo; tal como una imitación o isomiR del mismo o fuente del mismo se puede aumentar en el nivel de dicha propia molécula de miARN (o equivalente del mismo), por ejemplo, proporcionando dicha molécula de miARN o equivalente del mismo a un sujeto, preferiblemente a una célula de un sujeto, o a un tejido de dicho sujeto, o a un órgano de dicho sujeto o a dicho sujeto dicha molécula de miARN o equivalente del mismo que es de una fuente exógena. Para la provisión de una molécula de miARN o equivalente del mismo a partir de una fuente exógena, dicha molécula de miARN o equivalente del mismo se puede producir convenientemente por expresión de un ácido nucleico que codifica dicha molécula de miARN o equivalente del mismo o que codifica una fuente de dicha molécula de miARN o equivalente del mismo en una célula huésped adecuada como se describe a continuación o como molécula completamente sintética por síntesis química.

[0066] Preferiblemente, sin embargo, una actividad o nivel de estado estable de una molécula de miARN o equivalente del mismo se aumenta regulando el nivel de expresión de una secuencia de nucleótidos que codifica dicha molécula de miARN o equivalente del mismo o que codifica una fuente de dicha molécula de miARN o equivalente del mismo. Preferiblemente, el nivel de expresión de una secuencia de nucleótidos se regula en una célula de dicho sujeto o en un tejido de dicho sujeto o en el sujeto. El nivel de expresión de una molécula de miARN o equivalente del mismo o una fuente de dicha molécula de miARN o equivalente del mismo se puede

5 aumentar mediante la introducción de un miARN, y equivalente, o una fuente del mismo, o un constructo de expresión (o vector) en una célula, tejido, órgano o fluido corporal de dicho sujeto, o en el sujeto por la cual un vector de expresión comprende una secuencia de nucleótidos que comprende una molécula de miARN o equivalente del mismo o que comprende una fuente de dicha molécula de miARN o equivalente del mismo, y en donde una secuencia de nucleótidos está bajo el control de un promotor capaz de guiar la expresión de una secuencia de nucleótidos en dicha célula, tejido, órgano, sujeto. El nivel de expresión de una molécula de miARN o equivalente del mismo o fuente del mismo también se puede aumentar mediante la introducción de un constructo de expresión en una célula, tejido, órgano, sujeto, en donde un constructo comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un factor capaz de transactivar una secuencia de nucleótidos endógena que codifica una molécula de miARN o equivalente del mismo.

15 [0067] Un producto para el uso o una composición para el uso según la invención es preferiblemente para el uso donde dicho uso comprende el paso de administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un constructo de ácidos nucleicos para aumentar el nivel de actividad o de estado estable de la molécula de miARN-323 o isomiR tal y como se define en este documento. Un uso de la divulgación preferiblemente comprende el paso de administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende un constructo de ácidos nucleicos para aumentar el nivel de actividad o de estado estable de la molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345 y/o miARN-3157 o equivalente tal y como se define en este documento. Un constructo de ácidos nucleicos puede ser un constructo de expresión como se especifica adicionalmente en este documento. Preferiblemente, un constructo de expresión es un vector de terapia génica viral seleccionado de vectores de terapia génica basados en un adenovirus, un virus adenoasociado (AAV), un virus herpes, un virus pox, un vector viral oncolítico y un retrovirus. Un vector de terapia génica viral preferido es un vector AAV o lentiviral. Alternativamente, un producto para el uso o una composición para el uso según la invención es preferiblemente para el uso donde dicho uso comprende el paso de administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende una molécula de miARN-323, un isomiR o un precursor del mismo tal y como se define en este documento. Un uso de la divulgación preferiblemente comprende el paso de administrar a un sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende una molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345 y/o miARN-3157, un equivalente o una fuente de la misma tal y como se define en este documento.

35 [0068] En un producto para el uso o una composición para el uso según la invención, el uso es un uso donde una célula, un tejido, un órgano o fluido corporal es preferiblemente de un sujeto que se sospecha que tiene una enfermedad o condición asociada a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de la mucosa preneoplásico u otras enfermedades o condiciones tal y como se define en este documento debido por ejemplo a su edad o su contexto genético o a su dieta o a su estilo de vida, que incluye fumar tabaco, consumo de alcohol, luz UV. Alternativamente, en otra forma de realización preferida, un producto para el uso o una composición para el uso según la invención es para el uso donde se aplica en una célula, tejido, órgano o fluido corporal de un sujeto diagnosticado como o bien que tiene un riesgo predictivo de desarrollar más tarde una enfermedad o condición asociada a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de la mucosa preneoplásico o bien otras enfermedades o condiciones tal y como se define en este documento. Un método de diagnóstico usado es preferiblemente una de las invenciones como se describen en este documento. Alternativamente, una célula, un tejido u órgano que se va a tratar se puede seleccionar basándose en el riesgo de progresión de la enfermedad o condición asociada con una enfermedad o condición asociada a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de la mucosa preneoplásico u otras enfermedades o condiciones tal y como se define en este documento. Tal riesgo de progresión se puede evaluar utilizando criterios patológicos clínicos clásicos o prognosis basada en biomarcadores conocidos para la persona experta. También se abarca en la invención administrar una molécula de miARN-323, isomiR, o un precursor del mismo o una composición que comprende dicha molécula de miARN-323, isomiR, o precursor del mismo en un tejido o órgano o célula de dicho sujeto. Se divulga administrar una molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345, y/o miARN-3157 o equivalente del mismo o un precursor del mismo o una composición que comprende dicha molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, RNA-345, y/o miARN-3157 o equivalente del mismo o fuente del mismo en un tejido u órgano o célula de dicho sujeto. El órgano o tejido o célula puede corresponder al órgano o tejido o célula donde se ha diagnosticado una enfermedad o condición asociada a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de la mucosa preneoplásico u otras enfermedades o condiciones tal y como se define en este documento. Tal órgano o tejido o célula puede comprender o contener o consistir en o derivar de o estar en la proximidad de una célula tumoral. En la invención, un órgano o tejido o célula preferido es un órgano o tejido o célula que se encuentra en el tracto aerodigestivo superior o en su proximidad. En la invención, un tejido u órgano o célula preferido comprende o se deriva del labio, labio interno, cavidad bucal (boca), lengua, suelo de la boca, encías, paladar duro, cavidad nasal (dentro de la nariz), senos paranasales, faringe, que incluye la nasofaringe, orofaringe, hipofaringe y laringe, tráquea. Otros tejidos o células preferidos comprenden o se derivan de carcinomas de células escamosas, es decir, células de la mucosa o del epitelio del tracto aerodigestivo superior.

65 Otros tejidos o células preferidos comprenden o se derivan de células colorrectales, células del colon, célula de glioblastoma, célula cerebral, célula de la mama o célula cervical.

Una proximidad de un tumor o una proximidad del tracto aerodigestivo en este contexto puede significar hasta unos pocos centímetros.

Un órgano o un tejido o una célula puede ser un órgano o un tejido o una célula donde un cambio preneoplásico ha sucedido en la mucosa. Un cambio preneoplásico puede ser un cambio genético asociado con el cáncer que se encuentra frecuentemente en los cánceres de cabeza y de cuello tal como la mutación p53, la pérdida de 9p, 3p y 17p (Leemans C.R. *et al*, 2011).

Una célula puede ser o comprender una célula tumoral o una célula metastatizada o una célula tumoral metastatizada. Tal célula se origina normalmente a partir del área de la cabeza y del cuello.

Un sitio o tejido metastático se puede situar en el pulmón, hueso, hígado, mediastino y médula ósea.

[0069] Como se divulga, una molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345, y/o miARN-3157 o equivalente o fuente del mismo o composición que comprende dicha molécula, equivalente o fuente del mismo se administra preferiblemente a una célula presente en dicho órgano, tejido como se ha identificado anteriormente. Dicha molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345, y/o miARN-3157 o equivalente o fuente del mismo o composición que comprende dicha molécula, equivalente o fuente del mismo se administra preferiblemente a un órgano o tejido que comprende un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % de células tumorales. Dicha molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345, y/o miARN-3157 o equivalente o fuente del mismo o composición que comprende dicha molécula, equivalente o fuente del mismo se puede dirigir a células tumorales, por ejemplo, acoplado o conjugando la molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345, y/o miARN-3157 o equivalente o fuente del mismo o composición que comprende dicha molécula, equivalente o fuente del mismo con un anticuerpo u otra fracción que se une al tumor. Alternativamente o en combinación, dicha molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345, y/o miARN-3157 o equivalente o fuente del mismo o composición que comprende dicha molécula, equivalente o fuente del mismo se puede administrar localmente o inyectar usando formulación basada en lípidos específica (como se describe en Oliveira S., *et al*, 2006). Como parte de la invención, una molécula de miARN-323, isomiR, o precursor del mismo o composición que comprende dicha molécula, isomiR o precursor del mismo se administra preferiblemente a una célula presente en dicho órgano, tejido como se ha identificado anteriormente. Dicha molécula de miARN-323, isomiR, o precursor del mismo o composición que comprende dicha molécula, isomiR o precursor del mismo se administra preferiblemente a un órgano o tejido que comprende el 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % de las células tumorales. Dicha molécula de miARN-323, isomiR, o precursor del mismo o composición que comprende dicha molécula, isomiR o precursor del mismo se puede dirigir a células tumorales, por ejemplo, acoplado o conjugando la molécula de miARN-323, isomiR, o precursor del mismo o composición que comprende dicha molécula, isomiR o precursor del mismo con un anticuerpo u otra fracción que se une al tumor. Alternativamente o en combinación, dicha molécula de miARN-323, isomiR, o precursor del mismo o composición que comprende dicha molécula, isomiR o precursor del mismo se puede administrar localmente o inyectar usando formulación basada en lípidos específica (como se describe en Oliveira S., *et al*, 2006).

[0070] Un tratamiento de una enfermedad o condición asociada a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de la mucosa preneoplásico o de cualquier otra enfermedad o condición como se identifica en este documento puede incluir un tratamiento local en o dentro de un tejido tumoral que contiene células tumorales que todavía no se han metastatizado o induce una actividad antitumoral alrededor de una célula tumoral que ya ha formado metástasis y/o que está migrando del tumor primario a sitios distantes en el cuerpo. En esta forma de realización preferida, las células tumorales son células de HNSCC. En una forma de realización preferida, una molécula de miARN-323, isomiR, o precursor del mismo o composición que comprende dicha molécula, isomiR o precursor del mismo se administra sistémicamente. Como se divulga, una molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345, y/o miARN-3157, equivalente, imitación o fuente del mismo o composición que comprende dicha molécula, equivalente o fuente del mismo se administra sistémicamente. Alternativamente, en otra forma de realización, el tratamiento se administra localmente, más preferiblemente por inyección intratumoral, posiblemente combinado con electroporación (Takei *et al*, 2008). En una forma de realización preferida, una molécula de miARN-323, isomiR, o precursor del mismo o composición que comprende dicha molécula, isomiR o precursor del mismo se dirige específicamente a dicho tumor, preferiblemente células tumorales de HNSCC, enlazando o conjugando dicha molécula de miARN-323, isomiR, o precursor del mismo a una parte de dirección. Como se divulga, una molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345, y/o miARN-3157 o equivalente o imitación o fuente del mismo o composición que comprende dicha molécula, equivalente o fuente del mismo se dirige específicamente a dicho tumor, preferiblemente células tumorales de HNSCC, enlazando o conjugando dicho miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345, y/o miARN-3157 o equivalente o fuente del mismo a una parte de dirección. Una parte de dirección preferida es cualquier molécula conocida por reconocer o unir una molécula que se expresa en las células tumorales. Una molécula preferida expresada en las células tumorales es la proteína Ago-2 (Argonauta-2) (Sand M, 2011).

[0071] La invención mencionada en este documento se puede combinar con tratamientos estándar de enfermedad o condición asociada con el cáncer de cabeza y de cuello o con cualquiera de las otras enfermedades o condiciones como se identifica en este documento tales como quimioterapia, radioterapia o cirugía. Un agente quimioterapéutico preferido es el cisplatino.

[0072] Aunque la terapia génica es una posibilidad para prevenir, tratar, revertir y/o retrasar una condición o una enfermedad asociada con el cáncer de cabeza y de cuello, también se pueden contemplar otros posibles tratamientos. Por ejemplo, también se prefiere el tratamiento mediante fármacos de "molécula pequeña" para dirigir determinadas vías moleculares en la dirección deseada. Estas pequeñas moléculas se identifican preferiblemente mediante el método de cribado de la invención tal y como se define más adelante en este documento.

[0073] En el contexto de la invención, prevenir, tratar, revertir, curar y/o retrasar una enfermedad o condición asociada a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de la mucosa preneoplásico o de cualquiera de las otras enfermedades o condiciones como se identifica en este documento puede significar que:

- La gravedad de al menos un síntoma de esta enfermedad o condición se ha reducido, y/o
- Al menos un parámetro asociado con esta enfermedad o condición se ha mejorado: preferiblemente tal parámetro se asocia con una actividad o efecto antitumoral.

Tal síntoma o parámetro se identifica preferiblemente en un sujeto como:

- un retraso en la ocurrencia de metástasis y/o de migración de células tumorales y/o
- una prolongación de la supervivencia del paciente de al menos un mes, varios meses o más (en comparación con aquellos no tratados o tratados con un control o en comparación con el sujeto en la aparición del tratamiento) y/o
- la mejora de la calidad de vida y alivio del dolor observado.

Los criterios para juzgar la respuesta terapéutica se conocen como los criterios RECIST (Wahl R.L. *et al*, 2009). En el contexto de la invención, un paciente puede sobrevivir y/o se puede considerar que permanece libre de la enfermedad durante un intervalo de tiempo más largo. Alternativamente, la enfermedad o condición se puede haber detenido o retardado. En el contexto de la invención, una mejora de la calidad de vida y el alivio del dolor observado puede significar que un paciente pueda necesitar menos fármacos de alivio del dolor que al principio del tratamiento. Alternativamente o en combinación con el consumo de menos fármacos de alivio del dolor, un paciente puede estar menos estresado que al principio del tratamiento. "Menos" en este contexto puede significar un 5 % menos, 10 % menos, 20 % menos, 30 % menos, 40 % menos, 50 % menos, 60 % menos, 70 % menos, 80 % menos, 90 % menos. Un paciente puede no necesitar más ningún fármaco de alivio del dolor. Esta mejora de la calidad de vida y el alivio del dolor observado se puede ver, detectar o evaluar después de al menos una semana, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses o más de tratamiento en un paciente y en comparación con la calidad de vida y el alivio del dolor observado al principio del tratamiento de dicho paciente.

[0074] Un retraso en la ocurrencia de la metástasis y/o de la migración de las células tumorales puede ser un retraso de al menos una semana, un mes, varios meses, un año o más tiempo. La presencia de metástasis se puede evaluar utilizando MRI, CT o ecografía o técnicas que permiten la detección de células tumorales circulantes (CTC). Ejemplos de las últimas pruebas son la prueba CellSearch CTC (Veridex), una selección magnética basada en EpCam de CTC a partir de sangre periférica. En algunas formas de realización determinadas, el crecimiento del tumor se puede retardar al menos una semana, un mes, dos meses o más. En una forma de realización determinada, una ocurrencia de metástasis se retarda al menos una semana, dos semanas, tres semanas, cuatro semanas, un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses, cinco meses, seis meses o más.

[0075] En otra forma de realización preferida, se proporciona una composición que comprende además otra molécula de miARN que es: una molécula de miARN-181a, un equivalente tal como una imitación o un isomiR o un precursor del mismo. Se divulga una fuente del mismo.

[0076] Dado que no se espera que cada una de las moléculas de miARN identificados o equivalentes de los mismos tenga los mismos genes objetivo, se supone que el uso de una molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-3157 y/o miARN-345 o equivalente del mismo o fuente del mismo opcionalmente combinados y/o combinados con una molécula de miARN adicional, o equivalente del mismo o fuente del mismo identificados anteriormente permite un tratamiento más eficaz de una enfermedad o condición asociada a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de la mucosa preneoplásico o de cualquiera de las otras enfermedades o condiciones como se identifica en este documento. Un tumor tratado mediante una composición o un cóctel de al menos una molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-3157, miARN-345 y opcionalmente una molécula de miARN-181a, o equivalente o fuente del mismo se espera que tenga menos posibilidades de escapar o resistir a dicho tratamiento. En otra forma de realización preferida, se abarca diagnosticar la expresión de cada una de las

moléculas de miARN o de sus genes objetivo como se identifica en este documento y, dependiendo de los resultados, adaptar la identidad de las moléculas de miARN usadas para el tratamiento.

5 [0077] Cuando la invención se refiere a una composición que comprende más de una molécula de miARN o equivalente del mismo o fuente del mismo se abarca que cada molécula de miARN o equivalente del mismo o fuente del mismo puedan estar presentes cada una en una composición separada, donde cada composición se administra consecutivamente o simultáneamente a un sujeto. Alternativamente, también se abarca que más de una molécula de miARN o equivalentes del mismo o fuentes del mismo estén presentes en una composición tal y como se define en este documento. Las composiciones preferidas de molécula de miARN o isomiR o precursor del mismo incluyen la siguiente molécula de miARN o isomiR o precursores del mismo:

- miARN-323 y miARN-342,
- miARN-323 y miARN-326,
- miARN-323 y miARN-371,
- 15 – miARN-323 y miARN-345,
- miARN-323 y miARN-181a,
- miARN-323 y miARN-3157,

20 Las composiciones descritas incluyen la siguiente molécula de miARN o equivalente del mismo o fuente del mismo:

- miARN-3157 y miARN-342,
- miARN-3157 y miARN-326,
- miARN-3157 y miARN-371,
- 25 – miARN-3157 y miARN-345,
- miARN-3157 y miARN- 181 a,
- miARN-342 y miARN-326,
- miARN-342 y miARN- 181a,
- miARN-342 y miARN-371,
- 30 – miARN-342 y miARN-345,
- miARN-326 y miARN- 181a,
- miARN-326 y miARN-371,
- miARN-326 y miARN-345,
- miARN-371 y miARN- 181a,
- 35 – miARN-371 y miARN-345,
- miARN-345 y miARN-181a.

40 [0078] Por lo tanto, la divulgación abarca además usar una molécula de miARN, un equivalente o una fuente del mismo o una composición que comprende dicha molécula de miARN o equivalente del mismo o una fuente del mismo como se identifica en este documento.

[0079] Este uso preferido:
 incluye aumentar, preferiblemente aumentar farmacológicamente, una actividad o el nivel de estado estable de dicha molécula de miARN o equivalente del mismo o de dicha fuente del mismo como se identifica en este documento en un sujeto, en una célula de dicho sujeto, en un tejido de dicho sujeto o en el fluido corporal de dicho sujeto. En este uso preferido:
 una actividad o nivel de estado estable de una molécula de miARN tal y como se define en este documento se puede aumentar para mostrar una actividad antitumoral detectable. La evaluación de una actividad antitumoral en un sujeto se ha definido anteriormente en este documento.

50 [0080] La invención abarca una molécula de miARN-323, isomiR, o un precursor del mismo, o una composición que comprende dicha molécula de miARN-323, isomiR, o un precursor del mismo, para el uso como un medicamento para prevenir, tratar, revertir, curar y/o retrasar una enfermedad o una condición asociada a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de la mucosa preneoplásico, donde dicha molécula de miARN-323 o isomiR comprende la secuencia semilla identificada como las SEQ ID N.º: 11, 12, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 y/o 70 y tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con las SEQ ID N.º: 22, 23, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228 y/o 229, donde dicho precursor es un ácido nucleico que tiene al menos el 90 % de identidad con la SEQ ID N.º: 3 y/o 31 y tiene una longitud de al menos 50 nucleótidos.

Este uso incluye aumentar, preferiblemente aumentar farmacológicamente una actividad o el nivel de estado estable de dicha molécula de miARN o isomiR o de dicho precursor del mismo como se identifica en este documento en un sujeto, en una célula de dicho sujeto, en un tejido de dicho sujeto o en el fluido corporal de dicho sujeto. En este uso preferido, una actividad o nivel de estado estable de una molécula de miARN tal y como se define en este documento se puede aumentar con el fin de mostrar una actividad antitumoral detectable.

[0081] En otro aspecto de la divulgación, se proporciona el uso de una molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345, y/o miARN-3157, un equivalente o una fuente del mismo o una composición que comprende dicho miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345, y/o miARN-3157, un equivalente o una fuente del mismo preferiblemente para la producción de un medicamento para prevenir, tratar, revertir, curar y/o retrasar una enfermedad o una condición asociada a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de la mucosa preneoplásico o de cualquier enfermedad o condición como se identifica en este documento. Cada característica de este aspecto adicional ya se ha descrito en este documento.

[0082] En otro aspecto de la divulgación, se proporciona un método para prevenir, tratar, revertir, curar y/o retrasar una condición o enfermedad asociada a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de la mucosa preneoplásico o de cualquier enfermedad o condición como se identifica en este documento mediante la administración de una molécula de miARN o equivalente del mismo o fuente del mismo o una composición como se ha definido anteriormente en este documento a un sujeto que lo necesite. Cada característica de este aspecto adicional ya se ha descrito en este documento.

En un aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un método para diagnosticar una enfermedad o condición asociada a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de la mucosa preneoplásico o de cualquier enfermedad o condición como se identifica en este documento en un sujeto, donde el método comprende los pasos de:

(a) determinar el nivel de expresión de una molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345, y/o miARN-3157, un equivalente o una fuente del mismo en un sujeto, y opcionalmente

(b) comparar el nivel de expresión de dicha molécula o equivalente del mismo o fuente del mismo tal y como se define en (a) con un valor de referencia para el nivel de expresión de dicha molécula, equivalente o fuente del mismo, donde el valor de referencia es preferiblemente el valor medio para el nivel de expresión de dicha molécula, equivalente o fuente del mismo en un sujeto sano.

En el contexto de la divulgación, el valor de referencia evaluado en (b) y el nivel de expresión de una molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345, y/o miARN-3157, un equivalente o una fuente del mismo evaluado en (a) se evalúan en un tejido correspondiente o similar de ambos sujetos.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para diagnosticar una enfermedad o condición asociada a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de la mucosa preneoplásico en un sujeto, donde el método incluye los pasos de:

(a) determinar el nivel de expresión de una molécula de miARN-323 o isomiR que comprende la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 11, 12, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 y/o 70 y tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con las SEQ ID N.º: 22, 23, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228 y/o 229 en un sujeto donde dicho nivel de expresión se determina *ex vivo* en una muestra obtenida de dicho sujeto, y opcionalmente

(b) comparar el nivel de expresión de dicha molécula tal y como se define en (a) con un valor de referencia para el nivel de expresión de dicha molécula, donde el valor de referencia es preferiblemente el valor medio para el nivel de expresión de dicha molécula en un sujeto sano.

En el contexto de la invención, diagnóstico significa o bien una estimación de riesgos predictiva de un sujeto para desarrollar una enfermedad o bien una condición asociada a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de la mucosa preneoplásico o de cualquier enfermedad o condición como se identifica en este documento. En el contexto de la invención, un sujeto puede ser un animal o un ser humano. Preferiblemente, un sujeto es un ser humano. En el contexto de la invención, el valor de referencia evaluado en (b) y el nivel de expresión de una molécula de miARN-323, un isomiR o un precursor del mismo evaluado en (a) se evalúan en un tejido correspondiente o similar de ambos sujetos.

Dado que los niveles de expresión de estas secuencias de nucleótidos y/o cantidades de molécula de miARN correspondientes o isomiR del mismo o precursor del mismo pueden ser difíciles de medir en un sujeto, se usa una muestra a partir de un sujeto. El nivel de expresión (de una secuencia de nucleótidos o molécula de miARN o equivalente o fuente del mismo) se determina *ex vivo* en una muestra obtenida a partir de un sujeto. La muestra preferiblemente comprende un fluido corporal de un sujeto. Una muestra puede ser una biopsia de tejido o una biopsia tumoral o un tejido canceroso de un sujeto. Un tejido preferido es o bien tejido tumoral primario o bien tejido metastatizado. Un fluido corporal puede comprender o derivarse de sangre, suero, esputo, plasma, LCR (líquido cefalorraquídeo), deposición, orina. Un órgano o tejido o célula preferido es un órgano o tejido o célula que se encuentra en el tracto aerodigestivo superior. En la invención, un tejido u órgano o célula preferido comprende o se deriva del labio, labio interno, cavidad bucal (boca), lengua, suelo de la boca, encías, paladar duro, cavidad nasal (dentro de la nariz), senos paranasales, faringe, que incluye la nasofaringe, orofaringe, hipofaringe y laringe, tráquea. Otros tejidos o células preferidos comprenden o se derivan de carcinomas de células escamosas, es decir, células de la mucosa o del epitelio del tracto aerodigestivo superior.

Otro órgano o tejido o célula preferido es o se deriva de o comprende el colon, el cerebro, el pecho o el cérvix.

[0083] Concretamente se contempla que la invención se puede usar para evaluar o diagnosticar diferencias entre etapas de la enfermedad o condición asociada a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de la mucosa preneoplásico o de cualquier enfermedad o condición como se identifica en este documento, o tal como entre precáncer y cáncer, o entre un tumor primario y un tumor metastatizado.

[0084] Un aumento o reducción del nivel de expresión de una secuencia de nucleótidos (o nivel de estado estable de la molécula de miARN codificada o isomiR o precursor del mismo) se define preferiblemente como un cambio detectable del nivel de expresión de un nucleótido (o nivel de estado estable de una molécula de miARN codificada o isomiR o precursor del mismo o cualquier cambio detectable en una actividad biológica de una molécula de miARN o isomiR o precursor del mismo) utilizando un método tal y como se ha definido anteriormente en comparación con el nivel de expresión de una secuencia de nucleótidos correspondiente (o nivel de estado estable de una molécula de miARN codificada correspondiente o isomiR o precursor del mismo) en un sujeto sano. Una secuencia de nucleótidos preferida es una secuencia que codifica un precursor de una molécula de miARN o isomiR del mismo. Según una forma de realización preferida, un aumento o reducción de una actividad de miARN se cuantifica utilizando un ensayo específico para una actividad de miARN. Un ensayo preferido es la evaluación de una actividad antitumoral como se ha definido anteriormente en este documento.

[0085] Preferiblemente, una reducción del nivel de expresión de una secuencia de nucleótidos significa una reducción de al menos el 10 % del nivel de expresión de la secuencia de nucleótidos usando matrices. Más preferiblemente, una reducción del nivel de expresión de una secuencia de nucleótidos significa una reducción de al menos el 15 %, aún más preferiblemente al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 70 %, al menos el 90 %, o el 100 %. En este caso, no hay expresión detectable.

[0086] Preferiblemente, una reducción del nivel de expresión de una molécula de miARN o isomiR o precursor del mismo significa una reducción de al menos el 10 % del nivel de expresión del miARN usando qPCR, micromatrices o análisis de transferencia de Northern. Preferiblemente la qPCR es RT qPCR de tallo-bucle. Más preferiblemente, una reducción del nivel de expresión de una molécula de miARN o isomiR o precursor del mismo significa una reducción de al menos el 15 %, aún más preferiblemente al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 70 %, al menos el 90 %, o el 100 %. En este caso, no hay expresión detectable.

[0087] Preferiblemente, una reducción de una actividad de miARN significa una reducción de al menos el 5 % de una actividad de miARN utilizando un ensayo adecuado. Más preferiblemente, una reducción de una actividad de miARN significa una reducción de al menos el 10 %, aún más preferiblemente al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 70 %, al menos el 90 %, o el 100 %. En este caso, no hay actividad detectable.

[0088] Preferiblemente, un aumento del nivel de expresión de una secuencia de nucleótidos significa un aumento de al menos el 10 % del nivel de expresión de la secuencia de nucleótidos utilizando cualquiera de las técnicas mencionadas en este documento. Más preferiblemente, un aumento del nivel de expresión de una secuencia de nucleótidos significa un aumento de al menos el 15 %, aún más preferiblemente al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 70 %, al menos el 90 %, al menos el 150 % o más.

[0089] Preferiblemente, un aumento del nivel de expresión de una molécula de miARN o isomiR o precursor del mismo significa un aumento de al menos el 10 % del nivel de expresión de la molécula de miARN o isomiR o precursor del mismo usando RT-qPCR, preferiblemente RT qPCR de tallo-bucle. Más preferiblemente, un aumento del nivel de expresión de una molécula de miARN o isomiR o precursor del mismo significa un aumento de al menos el 15 %, aún más preferiblemente al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 70 %, al menos el 90 %, al menos el 150 % o más.

[0090] Preferiblemente, un aumento de una actividad de miARN significa un aumento de al menos el 5 % de una actividad de miARN utilizando un ensayo adecuado. Más preferiblemente, un aumento de una actividad de miARN significa un aumento de al menos el 10 %, aún más preferiblemente al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 70 %, al menos el 90 %, al menos el 150 % o más.

[0091] Un nivel de expresión se determina *ex vivo* en una muestra obtenida a partir de un sujeto. Más preferiblemente, la muestra es como se ha definido anteriormente en este documento y donde posteriormente una secuencia de nucleótidos determinada y/o molécula de miARN o isomiR o precursor del mismo se extrae y purifica usando métodos conocidos para la persona experta. Más preferiblemente, la muestra es o comprende o se deriva de una biopsia tumoral, sangre, esputo, deposición u orina.

[0092] En un método de diagnóstico de la invención se determina preferiblemente el nivel de expresión de más de una, más preferiblemente de al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 moléculas de miARN o

isomiR o precursor del mismo y/o los niveles de estado estable de las moléculas de miARN correspondientes o isomiR o precursor del mismo.

5 [0093] Por consiguiente, en un método preferido, en el paso (a) uno determina el nivel de expresión de otra molécula de miARN o isomiR o precursor del mismo que es una molécula de miARN-181a, un isomiR o un precursor del mismo.

10 [0094] En otro método preferido de la divulgación, una enfermedad o condición asociada a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de la mucosa preneoplásico o de cualquier enfermedad o condición como se identifica en este documento se diagnostica cuando la comparación lleva al hallazgo de una reducción del nivel de expresión de dicha molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345, y/o miARN-3157, equivalente o una fuente del mismo.

15 En otro método preferido de la invención, una enfermedad o condición asociada a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de mucosa preneoplásico o de cualquier enfermedad o condición como se identifica en este documento se diagnostica cuando la comparación lleva al hallazgo de una reducción del nivel de expresión de dicha molécula de miARN-323, isomiR, o un precursor del mismo.

20 [0095] En un método adicional preferido de la divulgación, una enfermedad o condición asociada a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de la mucosa preneoplásico o de cualquier enfermedad o condición como se identifica en este documento se diagnostica cuando la comparación lleva al hallazgo de una reducción del nivel de expresión de dicha molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345, y/o miARN-3157, equivalente o una fuente del mismo y una reducción del nivel de expresión de una molécula de miARN-181a, un equivalente o una fuente del mismo.

25 En un método adicional preferido de la invención, una enfermedad o condición asociada a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de la mucosa preneoplásico o de cualquier enfermedad o condición como se identifica en este documento se diagnostica cuando la comparación lleva al hallazgo de una reducción del nivel de expresión de dicha molécula de miARN-323, isomiR o un precursor del mismo y una reducción del nivel de expresión de una molécula de miARN-181a, un isomiR o un precursor del mismo.

30 [0096] En una forma de realización adicional preferida de la divulgación, una enfermedad o condición asociada a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de la mucosa preneoplásico o de cualquier enfermedad o condición como se identifica en este documento se diagnostica cuando la comparación lleva al hallazgo de una reducción del nivel de expresión de dicha molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345, y/o miARN-3157, equivalente o una fuente del mismo y/o una reducción del nivel de expresión en un aumento del nivel de expresión de al menos uno de otro miARN como se ha identificado anteriormente.

35 En otra forma de realización preferida de la invención, una enfermedad o condición asociada a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de la mucosa preneoplásico o de cualquier enfermedad o condición como se identifica en este documento se diagnostica cuando la comparación lleva al hallazgo de una reducción del nivel de expresión de dicha molécula de miARN-323, isomiR o un precursor del mismo y/o una reducción del nivel de expresión de al menos un otro miARN como se ha identificado anteriormente.

40 [0097] En otro aspecto adicional de la divulgación, se proporciona un método para la identificación de una sustancia o una molécula capaz de prevenir, tratar, revertir, curar y/o retrasar una condición o enfermedad asociada a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de la mucosa preneoplásico o de cualquier enfermedad o condición como se identifica en este documento en un sujeto, donde el método incluye los pasos de:

45 (a) proporcionar una población de células de prueba capaz de expresar una molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345, y/o miARN-3157 o equivalente del mismo o fuente del mismo, preferiblemente la población de prueba comprende células cancerosas y/o la población de células de prueba comprende células de mamíferos, y/o la población de células de prueba comprende células humanas;

50 (b) poner en contacto la población de células de prueba con la sustancia;

55 (c) determinar el nivel de expresión de dicha molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345, y/o miARN-3157 o equivalente del mismo o fuente del mismo o la actividad o nivel de estado estable de dicha molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345, y/o miARN-3157 o equivalente del mismo o fuente del mismo en la población de células de prueba puesta en contacto con la sustancia;

60 (d) comparar la expresión, actividad o nivel de estado estable determinado en (c) con la expresión, actividad o nivel de estado estable de dicha molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345, y/o miARN-3157 o equivalente del mismo o fuente del mismo en una población de células de prueba que no está en contacto con la sustancia; y,

(e) identificar una sustancia que produce una diferencia en el nivel de expresión, actividad o nivel de estado estable de dicha molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345, y/o miARN-3157 o equivalente del mismo o fuente del mismo, entre la población de células de prueba que está en contacto con la sustancia y la población de células de prueba que no está en contacto con la sustancia.

[0098] Preferiblemente, en el paso a), una célula de prueba comprende un constructo de ácidos nucleicos que comprende una fuente o un precursor de una molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345, y/o miARN-3157 o equivalente del mismo o un precursor de dicho miARN como se ha identificado anteriormente en este documento.

En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un método para la identificación de una sustancia capaz de prevenir, tratar, revertir y/o retrasar una condición o enfermedad asociada a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de la mucosa preneoplásico en un sujeto, donde el método incluye los pasos de:

(a) proporcionar una población de células de prueba capaz de expresar una molécula de miARN-323 o isomiR que comprende la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º: 11, 12, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 y/o 70 y tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o el 100 % de identidad con las SEQ ID N.º: 22, 23, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228 y/o 229, preferiblemente la población de prueba comprende células, más preferiblemente la población de células de prueba comprende células de mamíferos, aún más preferiblemente células humanas;

(b) poner en contacto o incubar la población de células de prueba con la sustancia;

(c) determinar el nivel de expresión de dicha molécula de miARN-323 o la actividad o nivel de estado estable de dicha molécula de miARN-323 en la población de células de prueba puesta en contacto o incubada con la sustancia;

(d) comparar la expresión, actividad o nivel de estado estable determinado en (c) con la expresión, actividad o nivel de estado estable de dicha molécula de miARN-323 en una población de células de prueba que no está en contacto con la sustancia; y

(e) identificar una sustancia que produce una diferencia en el nivel de expresión, actividad o nivel de estado estable de dicha molécula de miARN-323 entre la población de células de prueba que está en contacto con la sustancia y la población de células de prueba que no está en contacto con la sustancia.

[0099] Preferiblemente, en el paso a), una célula de prueba comprende un constructo de ácidos nucleicos que comprende un precursor de una molécula de miARN-323 o isomiR o un precursor de dicho miARN como se ha identificado anteriormente en este documento.

[0100] Preferiblemente, en un método, se comparan los niveles de expresión, una actividad o los niveles de estado estable de más de una secuencia de nucleótidos o más de una molécula de miARN, isomiR o precursor del mismo. Preferiblemente, en un método, una población de células de prueba comprende células mamíferas, más preferiblemente células humanas. Más preferiblemente, una célula de prueba es una línea celular derivada a partir de un carcinoma de células escamosas de cuello o de cabeza. Una célula de prueba también puede ser una célula colorrectal, una célula de colon, una célula de glioblastoma, una célula de tumor cerebral, una célula de cáncer de mama o una célula de cáncer cervical. Una línea celular también se puede usar como VU-SCC-120. VU-SCC-120 es una línea celular de HNSCC previamente descrita como 93VU120 (Hermsen *et al.*, 1996). Otras líneas celulares incluyen células HT29, U87, MCF7, Siha. Una población de células de prueba preferida no expresa una molécula de miARN-323, miARN-342, miARN-326, miARN-371, miARN-345, y/o miARN-3157 o equivalente del mismo o fuente del mismo o tiene una expresión reducida en comparación con un homólogo normal. Alternativamente o además de las células mencionadas anteriormente, en un aspecto la divulgación también se refiere a una sustancia que se identifica en los métodos anteriormente mencionados.

En un método preferido, los niveles de expresión, actividades o niveles de estado estable de otra molécula de miARN o equivalente o fuente del mismo se comparan, preferiblemente una molécula de miARN-181a, un equivalente tal como una imitación o un isomiR, o un precursor del mismo.

Definiciones generales y tecnologías generales a las que se hace referencia en este documento

[0101] Las moléculas de microARN ("miARN") tienen generalmente una longitud de 21 a 22 nucleótidos, aunque se han visto longitudes de 17 y hasta 25 nucleótidos. Cualquier longitud de 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 queda, por lo tanto, abarcada en la presente invención. Los miARN se procesan a partir de una molécula de ARN precursor más larga ("miARN precursor"). Los miARN precursores se transcriben a partir genes sin codificación de proteína. Un precursor puede tener una longitud de al menos 50, 70, 75, 80, 85, 100, 150 200 nucleótidos o más. Los miARN precursores tienen dos regiones de complementariedad que les permiten formar una estructura de tallo-bucle o de tipo de pliegue hacia atrás, que se escinde mediante enzimas llamadas Dicer y Drosha en animales. Dicer y Drosha son nucleasas de tipo ribonucleasa III. El miARN procesado es típicamente una porción del tallo.

[0102] El miARN procesado (también referido como "miARN maduro") se vuelve parte de un complejo grande, complejo conocido como el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), para regular (a la baja) un gen objetivo particular. Ejemplos de miARN de animales incluyen aquellos que forman pares de base perfectamente o imperfectamente con el objetivo de ARNm, dando como resultado o bien la degradación del ARNm o bien la inhibición de la traducción respectivamente (Olsen *et al*, 1999; Slegger *et al*, 2002). Las moléculas de ARNip también se procesan mediante Dicer, pero a partir de una molécula de ARN larga bicatenaria. Los ARNip no se encuentran naturalmente en células animales, pero pueden funcionar en tales células en un complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) para dirigir la escisión específica de la secuencia de un objetivo de ARNm (Denli *et al*, 2003).

[0103] El estudio de moléculas de miARN endógeno se describe en la solicitud de patente de EE. UU. 60/575,743. Un miARN está aparentemente activo en la célula cuando el ARN maduro monocatenario se une mediante un complejo de proteína que regula la traducción de los ARNm que hibridan al miARN. Introducir moléculas de ARN exógeno que afectan a las células de la misma manera que los miARN expresados endógenamente requiere que una molécula de ARN monocatenario de la misma secuencia que el miARN maduro endógeno sea absorbida por el complejo de proteína que facilita el control traslacional. Se ha evaluado una variedad de diseños de molécula de ARN. Se han identificado tres diseños generales que maximizan la absorción del miARN monocatenario deseado por la vía del miARN. Se puede hacer referencia a una molécula de ARN con una secuencia de miARN que tiene al menos uno de los tres diseños como un miARN sintético.

[0104] Las moléculas de miARN de la invención pueden reemplazar o suplementar la actividad de silenciamiento genético de un miARN endógeno. Un ejemplo de tales moléculas, características preferidas y modificaciones de tales moléculas y composiciones que comprenden tales moléculas se describe en WO2009/091982.

[0105] Las moléculas de miARN de la invención o isomiR o precursores del mismo comprenden, en algunas formas de realización, dos moléculas de ARN donde un ARN es idéntico a un miARN maduro de origen natural. Se hace referencia a la molécula de ARN que es idéntico a un miARN maduro como la cadena activa. La segunda molécula de ARN, a la que se hace referencia como la cadena complementaria, es al menos parcialmente complementaria a la cadena activa. Las cadenas activas y complementarias se hibridan para crear un ARN bicatenario, que es similar al precursor de miARN de origen natural que se une mediante el complejo de proteína inmediatamente antes de la activación del miARN en la célula. Maximizar la actividad de dicho miARN requiere maximizar la absorción de la cadena activa y minimizar la absorción de la cadena complementaria mediante el complejo de proteína de miARN que regula la expresión génica en el nivel de traducción. Los diseños moleculares que proporcionan actividad de miARN óptima implican modificaciones de la cadena complementaria.

Dos diseños incorporan modificaciones químicas de la cadena complementaria.

La primera modificación implica crear un ARN complementario con un grupo diferente de un fosfato o hidroxilo en su terminal 5'. La presencia de la modificación 5' elimina aparentemente la absorción de la cadena complementaria y favorece posteriormente la absorción de la cadena activa mediante el complejo de proteína de miARN. La modificación 5' puede ser cualquiera de una variedad de moléculas que incluyen NH₂, NHCOCH₃, biotina, y otras. La segunda estrategia de modificación química que reduce significativamente la absorción de la cadena complementaria por la vía del miARN es la incorporación de nucleótidos con modificaciones de azúcar en los primeros 2-6 nucleótidos de la cadena complementaria. Debería observarse que las modificaciones de azúcar de acuerdo con la segunda estrategia de diseño pueden acoplarse con modificaciones del terminal 5' de acuerdo con la primera estrategia de diseño para mejorar adicionalmente las actividades de miARN.

El tercer diseño de miARN implica incorporar nucleótidos en el extremo 3' de la cadena complementaria que no son complementarios a la cadena activa.

Los híbridos de los ARN activos resultantes y complementarios son muy estables en el extremo 3' de la cadena activa, pero relativamente inestables en el extremo 5' de la cadena activa. Los estudios con ARNip indican que la estabilidad del híbrido 5' es un indicador clave de la absorción de ARN mediante el complejo de proteína que soporta la interferencia de ARN, lo que al menos se relaciona con la vía del miARN en las células. Los inventores han descubierto que el uso juicioso de desapareamientos en la cadena de ARN complementaria mejora significativamente la actividad de dicho miARN.

Bibliotecas de miARN

[0106] Una aplicación clave para los miARN como se identifica en este documento es la evaluación o diagnóstico de la presencia de un miARN individual o grupos de miARN en una muestra. Las poblaciones celulares con cada uno de los diferentes miARN se pueden ensayar entonces para identificar miARN cuya presencia afecte a un fenotipo celular (es decir, proliferación y/o invasión). El número de miARN diferentes en las bibliotecas es variable. Se contempla que puede haber, haber al menos, o haber como mucho 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más, o cualquier rango derivable en los mismos, moléculas específicas de miARN diferentes en la biblioteca. En formas de realización específicas, las bibliotecas tienen de 1 a 20 moléculas específicas de miARN diferentes, o de 5 a 20 moléculas específicas de miARN diferentes. Moléculas específicas de miARN "diferentes" se refiere a ácidos nucleicos que codifican específicamente miARN con secuencias diferentes.

[0107] Se contempla que los miARN estén hechos principalmente de ARN, aunque en algunas formas de realización pueden ser ARN, análogos de nucleótidos, tales como ácidos nucleicos bloqueados (LNA) o ácidos nucleicos desbloqueados (UNA), ADN, o cualquier combinación de ADN, ARN, análogos de nucleótidos, y PNA (ácidos nucleicos peptídicos). Por consiguiente, se entiende que la biblioteca contiene uno o más ácidos nucleicos para estos miARN diferentes. En formas de realización específicas, la biblioteca es específica para miARN humanos, aunque se contemplan bibliotecas para múltiples organismos.

[0108] Una molécula de ARN de la divulgación tiene o comprende o consiste en una región de miARN. En formas de realización específicas, una molécula de miARN o equivalente del mismo tiene una secuencia que se deriva de cualquiera de las SEQ ID N.º: 19-29, 364 (tabla 3). Se contempla particularmente que las moléculas de ácido nucleico de la divulgación se pueden derivar de cualquiera de las secuencias de miARN maduro en las SEQ ID N.º: 19-29, 364.

En formas de realización específicas de la invención, una molécula de miARN o isomiR del mismo tiene una secuencia que se deriva de cualquiera de las SEQ ID N.º: 22-23 (tabla 3). Se contempla particularmente que las moléculas de ácido nucleico de la invención se pueden derivar de cualquiera de las secuencias de miARN maduro en las SEQ ID N.º: 22-23.

Una molécula de miARN o equivalente de la misma incluirá una secuencia que se extiende al menos de 1 a 5 nucleótidos de secuencia codificante aguas arriba y/o aguas abajo de la secuencia de miARN prevista. En algunas formas de realización, las moléculas tienen hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o más nucleótidos contiguos, o cualquier rango derivable en los mismos, que flanquea la secuencia que codifica el miARN procesado predominante en uno o ambos lados (extremo 5' y/o 3').

[0109] Las bibliotecas de la divulgación pueden contener secuencias de miARN de cualquier organismo con miARN, que incluyen específicamente, pero de forma no limitativa, mamíferos tales como seres humanos, primates no humanos, ratas y ratones. Se contemplan específicamente bibliotecas que tienen, tienen al menos, o tienen como mucho 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o más miARN diferentes (es decir, moléculas específicas de miARN que tienen secuencias diferentes derivadas de distintos genes de miARN). Se contemplan específicamente tales bibliotecas descritas en la frase precedente con respecto a cualquiera de las SEQ ID N.º: 19-29, 364 particularmente aquellas correspondientes a las secuencias de miARN (secuencia madura).

Ácidos nucleicos

[0110] La presente invención se refiere a moléculas de ácido nucleico también llamadas fuentes o precursores de miARN que pueden introducir miARN en células cultivadas o en un sujeto. Los ácidos nucleicos se pueden producir en células o *ex vitro* mediante enzimas purificadas, aunque preferentemente se producen por síntesis química. Pueden ser crudos o purificados. El término "miARN", a menos que se indique lo contrario, se refiere al miARN procesado, después de que se haya escindido de su precursor. La tabla 2 indica qué SEQ ID N.º corresponde a una secuencia precursora particular de un miARN (SEQ ID N.º: 1-7, 362) y la tabla 3 indica qué SEQ ID N.º corresponde a la secuencia madura o de imitación de un miARN (SEQ ID N.º: 19-29, 364). La tabla 4 identifica las secuencias de ADN clonadas en la biblioteca retroviral (SEQ ID N.º: 30-35, 365 que se usaron en el cribado funcional como se describe en los ejemplos. Las tablas 3 y 5 identifican las secuencias semilla preferidas (como las SEQ ID N.º: 8-18, 363 y 36-107, 366, 367) de cada uno de los miARN maduros de la tabla 3. El nombre del miARN se abrevia frecuentemente y se hace referencia al mismo sin el prefijo y se entenderá como tal, dependiendo del contexto. A menos que se indique lo contrario, los miARN a los que se hace referencia en la aplicación son secuencias humanas identificadas como mir-X o let-X, donde X es un número y/o letra.

[0111] Se entiende que un miARN se deriva de secuencias genómicas o un gen no codificante. En este aspecto, el término "gen" se usa para simplicidad para referirse a la secuencia genómica que codifica el miARN precursor para un miARN determinado. Sin embargo, formas de realización de la invención pueden implicar secuencias genómicas de un miARN que se implican en su expresión, tal como un promotor u otras secuencias reguladoras.

[0112] El término "recombinante" se puede utilizar y este generalmente se refiere a una molécula que ha sido manipulada *ex vitro* o que es el producto replicado o expresado de tal molécula.

[0113] El término "ácido nucleico" es muy conocido en la técnica. Un "ácido nucleico" como se utiliza en este documento se referirá generalmente a una molécula (una o más cadenas) de ADN, ARN o un derivado o análogo del mismo, que comprende una nucleobase. Una nucleobase incluye, por ejemplo, una purina de origen natural o base de pirimidina encontrada en el ADN (por ejemplo, una adenina "A", una guanina "G", una timina "T" o una citosina "C") o ARN (por ejemplo, una A, una G, un uracilo "U" o una C). El término "ácido nucleico" abarca los términos "oligonucleótido" y "polinucleótido", cada uno como un subgénero del término "ácido nucleico".

[0114] El término "miARN" generalmente se refiere a una molécula monocatenaria, pero en formas de realización específicas, las moléculas implementadas en la invención también abarcarán una región o una cadena adicional que es parcialmente (entre el 10 y 50 % complementaria a lo largo de la longitud de la cadena), sustancialmente

(más del 50 %, pero menos del 100 % complementaria a lo largo de la longitud de la cadena) o completamente complementaria a otra región de la misma molécula monocatenaria o a otro ácido nucleico. Así, los ácidos nucleicos pueden abarcar una molécula que comprende una o más cadena(s) o "complemento(s)" complementario(s) o autocomplementario(s) de una secuencia particular que comprende una molécula. Por ejemplo, miARN precursor puede tener una región autocomplementaria, que es hasta 100 % complementaria.

[0115] Como se utiliza en este caso, "hibridación", "hibrida" o "capaz de hibridar" se entiende que significa la formación de una molécula de cadena doble o triple o una molécula con naturaleza de cadena doble o triple parcial usando técnicas conocidas para la persona experta tales como procedimientos de transferencia de Southern. El término "renaturalizar" como se utiliza en este documento es sinónimo de "hibridar". El término "hibridación", "hibrida(n)" o "capaz de hibridar" puede significar condiciones de "baja", "media" o "alta" hibridación tal y como se define a continuación.

Condiciones de baja a media a alta astringencia significa prehibridación e hibridación a 42 °C en 5X SSPE, 0,3 % de SDS, 200 pg/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y o 25 %, 35 % o 50 % de formamida para de baja a media a alta astringencia respectivamente. Posteriormente, la reacción de hibridación se lava tres veces durante 30 minutos cada una utilizando 2XSSC, 0,2 % de SDS y o 55 °C, 65 °C o 75 °C para baja a media a alta astringencia.

[0116] Los ácidos nucleicos o derivados de los mismos de la invención comprenderán, en algunas formas de realización, la secuencia de miARN de cualquiera de los miARN descritos en las SEQ ID N.º: 22-23 o se describen en las SEQ ID N.º: 203-229. Los ácidos nucleicos o derivados de los mismos de la divulgación comprenderán, en algunas formas de realización, la secuencia de miARN de cualquier miARN descrito en las SEQ ID N.º: 19-29, 364 o se describen en la SEQ ID N.º: 108-354, 368-372. Se contempla que las secuencias de ácidos nucleicos de la invención derivadas de la SEQ ID N.º: 22-23, y/o 203-229 pueden tener, tener al menos, o tener como mucho 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, nucleótidos contiguos de las SEQ ID N.º: 22-23, y/o 203-229. Se contempla que las secuencias de ácidos nucleicos de la divulgación derivadas de la SEQ ID N.º: 19-29, 364 y/o 108-354, 368-372 pueden tener, tener al menos, o tener como mucho 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, nucleótidos contiguos de las SEQ ID N.º: 19-29, 364 y/o 108-354, 368-372 (o cualquier rango derivable en los mismos). En otras formas de realización, los ácidos nucleicos son, son al menos, o son como mucho 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 % idénticos a la secuencia de miARN de 22-23, y/o 203-229 a la secuencia precursora de cualquiera de las SEQ ID N.º: 3 o 31 o cualquier combinación o rango derivable en las mismas. En otras formas de realización de la divulgación, los ácidos nucleicos son, son al menos, o son como mucho 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 % idénticos a la secuencia de miARN de las SEQ ID N.º: 19-29, 364 o 108-354, 368-372 a la secuencia precursora de cualquiera de las SEQ ID N.º: 1-7, 362 o 30-35, 365 o cualquier combinación o rango derivable en los mismos.

Nucleobases

[0117] Como se utiliza en este documento, una "nucleobase" se refiere a una base heterocíclica, tal como por ejemplo una nucleobase de origen natural (es decir, una A, T, G, C o U) encontrada en al menos un ácido nucleico de origen natural (es decir, ADN y ARN), y derivado(s) y análogos de origen natural o no natural de tal nucleobase. Una nucleobase generalmente puede formar uno o más enlaces de hidrógeno ("renaturalizarse" o "hibridar") con al menos una nucleobase de origen natural de una manera que puede sustituir el apareamiento de nucleobases de origen natural (por ejemplo, el enlace de hidrógeno entre A y T, G y C, y A y U).

[0118] La(s) nucleobase(s) de "purina" y/o de "pirimidina" abarca(n) nucleobases de purina y/o de pirimidina de origen natural y también derivado(s) y análogo(s) de las mismas, que incluyen, pero de forma no limitativa, aquellas purina o pirimidina sustituidas por una o más fracciones de un alquilo, carboxialquilo, amino, hidroxilo, halógeno (es decir, fluoro, cloro, bromo, o yodo), tiol o alquiltiol. Las fracciones de alquilo preferidas (por ejemplo, alquilo, carboxialquilo, etc.) comprenden de aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, a aproximadamente 6 átomos de carbono. Otros ejemplos no limitativos de una purina o pirimidina incluyen una desazapurina, un 2,6-diaminopurina, un 5-fluorouracilo, una xantina, una hipoxantina, una 8-bromoguanina, una 8-cloroguanina, una bromotimina, una 8-aminoguanina, una 8-hidroxiguanina, una 8-metilguanina, una 8-tioguanina, una azaguanina, una 2-aminopurina, una 5-etilcitosina, una 5-metilcitosina, un 5-bromouracilo, un 5-etiluracilo, un 5-yodouracilo, un 5-clorouracilo, un 5-propiluracilo, un tiouracilo, una 2-metiladenina, una metiltioadenina, una N,N-dimetiladenina, una azaadenina, una 8-bromoadenina, una 8-hidroxiadenina, una 6-hidroxiadenina, una 6-tiopurina, una 4-(6-aminohexil/citosina), y similares. Otros ejemplos son muy conocidos para los expertos en la técnica.

[0119] Una nucleobase se puede comprender en un nucleósido o nucleótido, utilizando cualquier método de síntesis química o natural descrito en este documento o conocido para un experto en la técnica. Tal nucleobase se puede marcar o puede ser parte de una molécula que está marcada y que contiene la nucleobase.

Nucleósidos

[0120] Como se utiliza en este documento, un "nucleósido" se refiere a una unidad química individual que comprende una nucleobase unida de manera covalente a una fracción de enlazador de nucleobase. Un ejemplo no limitativo de una "fracción de enlazador de nucleobase" es un azúcar que comprende 5 átomos de carbono (es decir, un "azúcar de 5 carbonos"), que incluye, pero de forma no limitativa, una desoxirribosa, una ribosa, una arabinosa, o un derivado o un análogo de un azúcar de 5 carbonos. Ejemplos no limitativos de un derivado o un análogo de un azúcar de 5 carbonos incluyen una 2'-fluoro-2'-desoxirribosa o un azúcar carbocíclico donde un carbono se sustituye por un átomo de oxígeno en el anillo del azúcar.

[0121] Diferentes tipos de unión(es) covalente(s) de una nucleobase a una fracción de enlazador de nucleobase se conocen en la técnica. A modo de ejemplo no limitativo, un nucleósido que comprende una nucleobase de purina (es decir, A o G) o 7-desazapurina típicamente une de manera covalente la posición 9 de una purina o una 7-desazapurina la posición 1' de un azúcar de 5 carbonos. En otro ejemplo no limitativo, un nucleósido que comprende una nucleobase de pirimidina (es decir, C, T o U) típicamente une de manera covalente una posición 1 de una pirimidina a una posición 1' de un azúcar de 5 carbonos (Kornberg y Baker, 1992).

Nucleótidos

[0122] Como se utiliza en este documento, un "nucleótido" se refiere a un nucleósido que comprende además una "fracción de esqueleto". Una fracción de esqueleto generalmente une de manera covalente un nucleótido a otra molécula que comprende un nucleótido, o a otro nucleótido para formar un ácido nucleico. La "fracción de esqueleto" en nucleótidos de origen natural comprende típicamente una fracción de fósforo, que se une de manera covalente a un azúcar de 5 carbonos. La unión de la fracción de esqueleto ocurre típicamente en la posición 3' o 5' del azúcar de 5 carbonos. Sin embargo, otros tipos de uniones se conocen en la técnica, particularmente cuando un nucleótido comprende derivados o análogos de una fracción de fósforo o azúcar de 5 carbonos de origen natural.

Análogos de ácidos nucleicos

[0123] Un ácido nucleico puede comprender, o estar compuesto totalmente de, un derivado o análogo de una nucleobase, una fracción de enlazador de nucleobase y/o fracción de esqueleto que puede estar presente en un ácido nucleico de origen natural. ARN con análogos de ácido nucleico también se puede marcar según métodos de la divulgación. Como se utiliza en este documento, un "derivado" se refiere a una forma modificada o alterada químicamente de una molécula de origen natural, mientras que los términos "imitación" o "análogo" se refieren a una molécula que puede parecer o no estructuralmente una molécula o fracción de origen natural, pero posee funciones similares. Como se utiliza en este documento, una "fracción" generalmente se refiere a un componente químico o molecular más pequeño de una estructura química o molecular más grande. Los análogos o derivados de nucleobases, nucleósidos y nucleótidos son muy conocidos en la técnica y han sido descritos (véase, por ejemplo, Scheit, 1980).

[0124] Ejemplos no limitativos adicionales de nucleósidos, nucleótidos o ácidos nucleicos que comprenden azúcar de 5 carbonos y/o derivados o análogos de fracción de esqueleto incluyen aquellos en: la patente de EE. UU. N.º 5,681,947, que describe oligonucleótidos que comprenden derivados de purina con los que forman hélices triples y/o previenen la expresión de ADNbc; las patentes de EE. UU. 5,652,099 y 5,763,167, que describen ácidos nucleicos que incorporan análogos fluorescentes de nucleósidos encontrados en ADN o ARN, particularmente para el uso como sondas de ácidos nucleicos fluorescentes; la patente de EE. UU. 5,614,617, que describe análogos oligonucleótidos con sustituciones en los anillos de pirimidina que poseen estabilidad de nucleasa mejorada; las patentes de EE. UU. 5,670,663, 5,872,232 y 5,859,221, que describen análogos oligonucleótidos con azúcares de 5 carbonos modificados (es decir, fracciones de T-desoxifuranosilo modificado) usados en la detección de ácidos nucleicos; la patente de EE. UU. 5,446,137, que describe oligonucleótidos que comprenden al menos una fracción de azúcar de 5 carbonos sustituida en la posición 4' con un sustituyente diferente del hidrógeno que se pueden usar en los ensayos de hibridación; la patente de EE. UU. 5,886,165, que describe oligonucleótidos con tanto desoxirribonucleótidos con enlaces internucleótidos 3'-5' como ribonucleótidos con enlaces internucleótidos 2'-5'; la patente de EE. UU. 5,714,606, que describe una conexión internucleótida modificada donde un oxígeno en la posición 3' de la conexión internucleótida se sustituye por un carbono para mejorar la resistencia de nucleasa de los ácidos nucleicos; la patente de EE. UU. 5,672,697, que describe oligonucleótidos que contienen una o más conexiones internucleótidas de fosfonato de metileno 5' que mejoran la resistencia de nucleasa; las patentes de EE. UU. 5,466,786 y 5,792,847, que describen la conexión de una fracción sustituyente que puede comprender un fármaco o marcador al carbono 2' de un oligonucleótido para proporcionar estabilidad de nucleasa mejorada y capacidad para administrar fármacos o fracciones de detección; la patente de EE. UU. 5,223,618, que describe análogos de oligonucleótidos con una conexión de esqueleto de carbono 2' o 3' que une la posición 4' y la posición 3' de la fracción de azúcar de 5 carbonos adyacente para absorción celular mejorada, resistencia a nucleasas e hibridación a ARN objetivo; la patente de EE. UU. 5,470,967, que describe oligonucleótidos que comprenden al menos una conexión internucleótida de sulfamato o sulfamida que son útiles como sonda de hibridación de ácidos nucleicos; las patentes de EE. UU. 5,378,825, 5,777,092, 5,623,070, 5,610,289 y 5,602,240, que describen oligonucleótidos con fracciones de enlazador de tres o cuatro átomos que sustituye la fracción de esqueleto de fosfodiéster usada para resistencia

de nucleasa, absorción celular y expresión de ARN regulador mejoradas; la patente de EE. UU. 5,858,988, que describe agente portador hidrofóbico unido a la posición 2'-O de oligonucleótidos para mejorar su permeabilidad de membrana y estabilidad; la patente de EE. UU. 5,214,136, que describe oligonucleótidos conjugados a antraquinona en el terminal 5' que poseen hibridación mejorada a ADN o ARN; estabilidad mejorada a nucleasas; la patente de EE. UU. 5,700,922, que describe quimeras PNA-ADN-PNA donde el ADN comprende nucleótidos de 2'-desoxi-eritro-pentofuranosilo para resistencia de nucleasa, afinidad de enlace, y capacidad para activar RNasa H mejoradas; y WO98/39352, WO99/14226, WO2003/95467 y WO2007/085485, que describen nucleótidos de ARN modificados cuya fracción de ribosa se modifica con un puente extra que conecta el oxígeno 2' y el carbono 4'. La ribosa bloqueada aumenta significativamente la afinidad y especificidad de enlace; y WO2008/147824, que describe nucleótidos de ARN modificado denominado UNA (ácido nucleico desbloqueado). Los UNA son análogos acíclicos de ARN donde el enlace entre los átomos C2' y C3' se ha escindido, reduciendo la afinidad de enlace hacia una cadena complementaria. Los UNA son compatibles con reconocimiento de RNasa H y escisión de ARN y mejoran el silenciamiento genético mediado de ARNip; WO2008/036127 que describe análogos de ácido nucleico de morfolino, que contiene conexiones de intersubunidad tanto sin carga como catiónicas; WO/2007/069092 y EP2075342, que describen ácidos nucleicos zip (ZNA), que contienen derivados de espermina de conjugación como fracciones catiónicas (unidades Z) a un oligonucleótido; la patente de EE. UU. 5,708,154, que describe ARN enlazado a un ADN para formar un híbrido de ADN-ARN; la patente de EE. UU. 5,728,525, que describe el etiquetado de análogos de nucleósidos con un marcador fluorescente universal.

[0125] Enseñanzas adicionales para análogos de nucleósidos y análogos de ácidos nucleicos son la patente de EE. UU. 5,728,525, que describe análogos de nucleósidos que están marcados en un extremo; la patente de EE. UU. 5,637,683, 6,251,666 (sustituciones de L-nucleótido), y 5,480,980 (nucleótidos de 7-desaza- 2'-desoxiguanosina y análogos de ácidos nucleicos de los mismos).

[0126] El uso de otros análogos se contempla específicamente para el uso en el contexto de la presente invención. Tales análogos se pueden utilizar en las moléculas de ácido nucleico sintético de la invención, tanto en toda la molécula como en nucleótidos seleccionados. Incluyen, pero de forma no limitativa,

- 1) Modificaciones de ribosa (tales como 2'F, 2' NH₂, 2'N₃, 4'thio, o 2' O-CH₃) y
- 2) Modificaciones de fosfato (tales como las encontradas en fosforotioatos, fosfonatos de metilo, y fosforoboratos).

Tales análogos se han creado para conferir estabilidad a los ARN reduciendo o eliminando su capacidad para ser escindidos por ribonucleasas. Cuando estos análogos de nucleótidos están presentes en los ARN, pueden tener efectos profundamente positivos en la estabilidad de los ARN en los animales. Se contempla que el uso de análogos de nucleótidos se puede usar solo o conjuntamente con cualquiera de las modificaciones de diseño de un miARN sintético para cualquier ácido nucleico de la invención.

[0127] En una forma de realización preferida, se usa un oligonucleótido de ARNmc (ARN monocatenario) fosforotioatado. Tal química es atractiva, ya que se asume que tal ARNmc imita a un doble bicatenario correspondiente (E. Swayze, Isis Pharmaceuticals, Copenhagen, 7th Annual Meeting of the oligonucleotide, Therapeutics society, septiembre 8-10, 2011).

Nucleótidos modificados

[0128] Los miARN de la invención contemplan específicamente el uso de nucleótidos que se modifican para mejorar sus actividades. Tales nucleótidos incluyen aquellos que están en el terminal 5' o 3' del ARN al igual que aquellos que son internos en la molécula. Los nucleótidos modificados usados en las cadenas complementarias de dichos miARN o bien bloquean el 5' OH o fosfato del ARN o bien introducen modificaciones de azúcar internas que mejoran la absorción de la cadena activa del miARN. Las modificaciones de los miARN incluyen modificaciones de azúcar internas que mejoran la hibridación al igual que estabilizan las moléculas en células y modificaciones terminales que además estabilizan los ácidos nucleicos en células. Además, se contemplan modificaciones que se pueden detectar por microscopía u otros métodos para identificar células que contienen los miARN sintéticos.

Preparación de ácido nucleico

[0129] Un ácido nucleico se puede hacer mediante cualquier técnica conocida para un experto en la técnica, tal como, por ejemplo, síntesis química, producción enzimática o producción biológica. Aunque los miARN según la invención se podrían producir utilizando métodos recombinantes, se prefiere producir miARN por síntesis química o producción enzimática. Los miARN se pueden producir mediante una serie de métodos, que incluyen métodos que implican tecnología del ADN recombinante.

[0130] La síntesis de ácidos nucleicos se realiza según métodos estándar. Véase, por ejemplo, Itakura y Riggs (1980). Adicionalmente, la patente de EE. UU. 4,704,362, la patente de EE. UU. 5,221,619, y la patente de EE.

UU. 5,583,013 describen cada una varios métodos de preparación de ácidos nucleicos. Ejemplos no limitativos de un ácido nucleico (por ejemplo, un oligonucleótido), incluyen un ácido nucleico hecho por síntesis químicamente *ex vitro* usando química de fosfotriéster, fosfito o fosforamidita y técnicas de fase sólida tal como se describe en EP 266,032, o vía intermediarios de desoxinucleósido H-fosfonato como se describe por Froehler *et al.*, 1986 y la patente de EE. UU. N.º de serie 5,705,629. En los métodos de la presente invención, se pueden utilizar uno o más oligonucleótidos. Varios mecanismos diferentes de síntesis de oligonucleótidos se han descrito en, por ejemplo, las patentes de EE. UU. 4,659,774, 4,816,571, 5,141,813, 5,264,566, 4,959,463, 5,428,148, 5,554,744, 5,574,146, 5,602,244.

10 [0131] Un ejemplo no limitativo de un ácido nucleico producido enzimáticamente incluye uno producido por enzimas en reacciones de amplificación tales como PCR[™] (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. 4,683,202 y la patente de EE. UU. 4,682,195), o la síntesis de un oligonucleótido descrita en la patente de EE. UU. N.º 5,645,897.

15 [0132] La síntesis de oligonucleótidos es muy conocida por aquellos expertos en la técnica. Varios mecanismos diferentes de síntesis de oligonucleótidos se han descrito en, por ejemplo, las patentes de EE. UU. 4,659,774, 4,816,571, 5,141,813, 5,264,566, 4,959,463, 5,428,148, 5,554,744, 5,574,146, 5,602,244. Básicamente, la síntesis química se puede conseguir por el método del diéster, el método del triéster, el método de polinucleótido fosforilasa y por química de fase sólida. Estos métodos se discuten con más detalle a
20 continuación.

Método del diéster

25 [0133] El método del diéster fue el primero en desarrollarse a un estado utilizable, principalmente por Khorana y cotrabajadores. (Khorana, 1979). El paso básico es la unión de dos desoxinucleótidos adecuadamente protegidos para formar un didesoxinucleótido que contiene un enlace fosfodiéster. El método del diéster está bien establecido y se ha usado para sintetizar moléculas de ADN (Khorana, 1979).

Método del triéster

30 [0134] La diferencia principal entre los métodos del diéster y del triéster es la presencia en el último de un grupo protector extra en los átomos de fosfato de los reactivos y productos (Itakura *et al.*, 1975). El grupo protector de fosfato es normalmente un grupo clorofenilo, que vuelve los nucleótidos e intermediarios de polinucleótidos solubles en solventes orgánicos. Por lo tanto, se hacen purificaciones en soluciones de cloroformo. Otras mejoras en el método incluyen (i) el acoplamiento de bloque de trímeros y oligómeros más grandes, (ii) el uso
35 extenso de cromatografía líquida de alta eficacia para la purificación de tanto los intermediarios como de los productos finales, y (iii) la síntesis de fase sólida.

Método de polinucleótido fosforilasa.

40 [0135] Este es un método enzimático de síntesis de ADN que se puede utilizar para sintetizar muchos oligonucleótidos útiles (Gillam *et al.*, 1978; Gillam *et al.*, 1979). Bajo condiciones controladas, el polinucleótido fosforilasa añade predominantemente un nucleótido único a un oligonucleótido corto.

45 [0136] La purificación cromatográfica permite la obtención del aducto único deseado. Al menos un trímero se requiere para iniciar el procedimiento, y este cebador se debe obtener por algún otro método. El método de polinucleótido fosforilasa funciona y tiene la ventaja de que los procedimientos implicados son familiares para la mayoría de los bioquímicos.

Métodos de fase sólida.

50 [0137] Basándose en la tecnología desarrollada para la síntesis de fase sólida de polipéptidos, ha sido posible unir el nucleótido inicial a material de soporte sólido y proceder con la adición gradual de nucleótidos. Todos los pasos de mezcla y de lavado se simplifican, y el procedimiento se vuelve susceptible de automatización. Estas síntesis se realizan ahora rutinariamente utilizando sintetizadores de ácidos nucleicos automáticos.

55 [0138] La química de fosforamidita (Beaucage y Lyer, 1992) se ha convertido de lejos en la química de acoplamiento más ampliamente usada para la síntesis de oligonucleótidos. Como ya conocen aquellos expertos en la técnica, la síntesis de fosforamidita de oligonucleótidos implica la activación de precursores de monómeros de nucleósidos fosforamidita por reacción con un agente de activación para formar productos intermedios activados, seguido de adición secuencial de los productos intermedios activados a la cadena de oligonucleótidos en crecimiento (anclada generalmente en un extremo a un soporte sólido adecuado) para formar el producto de
60 oligonucleótido.

Métodos recombinantes.

65

[0139] Los métodos recombinantes para producir ácidos nucleicos en una célula son bien conocidos para los expertos en la técnica. Estos incluyen el uso de vectores, plásmidos, cósmidos, y otros vehículos para administrar un ácido nucleico a una célula, que puede ser la célula objetivo o simplemente una célula huésped (para producir grandes cantidades de la molécula de ARN deseada). Alternativamente, tales vehículos se pueden usar en el contexto de un sistema libre celular mientras los reactivos para generar la molécula de ARN están presentes. Tales métodos incluyen aquellos descritos en Sambrook, 2003, Sambrook, 2001 y Sambrook, 1989. En algunas formas de realización, la presente invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que no son sintéticas. En algunas formas de realización, la molécula de ácido nucleico tiene una estructura química de un ácido nucleico de origen natural y una secuencia de un ácido nucleico de origen natural, tal y como la secuencia exacta y entera de un miARN primario monocatenario (véase, Lee 2002), un miARN precursor monocatenario, o un miARN maduro monocatenario. Además del uso de tecnología recombinante, tales ácidos nucleicos no sintéticos se pueden generar químicamente, tal como empleando tecnología de utilización usada para crear oligonucleótidos.

15 Diseño de miARN

[0140] Los miARN típicamente comprenden dos cadenas, una cadena activa que es idéntica en secuencia al miARN maduro que se está estudiando y una cadena complementaria que es al menos parcialmente complementaria a la cadena activa. La cadena activa es la molécula biológicamente pertinente y debería ser preferentemente absorbida por el complejo en células que modulan la traducción bien a través de degradación de ARNm o bien de control traslacional. La absorción preferencial de la cadena activa tiene dos resultados profundos: (1) la actividad observada de dicho miARN aumenta espectacularmente y (2) los efectos desintencionados inducidos por la absorción y la activación de la cadena complementaria se eliminan esencialmente. Según la invención, diferentes diseños de miARN pueden utilizarse para asegurar la absorción preferencial de la cadena activa.

25 Agente de bloqueo 5'

[0141] La introducción de una fracción estable diferente de fosfato o hidroxilo en el extremo 5' de la cadena complementaria perjudica su actividad en la vía del miARN. Esto asegura que solo se usará la cadena activa del miARN para regular la traducción en la célula. Las modificaciones 5' incluyen, pero de forma no limitativa, NH₂, biotina, un grupo amino, un grupo alquilamino inferior, un grupo acetílico, 2' O-Me, DMTO, fluoresceína, un tiol, o acridina o cualquier otro grupo con este tipo de funcionalidad.

[0142] Otras modificaciones de cadena sentido. La introducción de modificaciones de nucleótidos como 2'-O Me, 2'-desoxi, T-desoxy-2'-fluoro, 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropilo (2'-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetilo (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropilo (2'-O-DMAP), 2'-O-dimetilaminoetiloetilo (2'-O-DMAEOE), o 2'-O-N-metilacetamido (2'-O-NMA), NH₂, biotina, un grupo amino, un grupo alquilamino inferior, un grupo acetílico, DMTO, fluoresceína, un tiol, o acridina o cualquier otro grupo con este tipo de funcionalidad en la cadena complementaria del miARN puede eliminar la actividad de la cadena complementaria y mejorar la absorción de la cadena activa del miARN.

[0143] Desapareamientos de bases en la cadena sentido. Como con los ARNip (Schwarz 2003), la estabilidad relativa de los extremos 5' y 3' de la cadena activa del miARN determina aparentemente la absorción y activación del activo por la vía del miARN. Desestabilizar el extremo 5' de la cadena activa del miARN mediante la colocación estratégica de desapareamientos de bases en el extremo 3' de la cadena complementaria del miARN sintético mejora la actividad de la cadena activa y elimina esencialmente la actividad de la cadena complementaria.

50 Células huésped y células objetivo

[0144] Las células donde un miARN o fuente del mismo se introduce o donde se evalúa la presencia de un miARN pueden derivarse de o contenerse en cualquier organismo. Preferiblemente, la célula es una célula de vertebrado. Más preferiblemente, la célula es una célula de mamífero.

Aún más preferiblemente, la célula es una célula humana. Una célula de mamífero puede ser de la línea germinal o somática, totipotente o pluripotente, divisora o no divisora, de epitelio, inmortalizada o transformada, o similar. La célula puede ser una célula no diferenciada, tal como una célula madre, o una célula diferenciada, tal como una célula de un órgano o tejido. Alternativamente, las células pueden ser del tracto aerodigestivo superior. En la invención, un tejido u órgano o célula preferido comprende o se deriva del labio, labio interno, cavidad bucal (boca), lengua, suelo de la boca, encías, paladar duro, cavidad nasal (dentro de la nariz), senos paranasales, faringe, que incluye la nasofaringe, orofaringe, hipofaringe y laringe, tráquea. Otros tejidos preferidos o células comprenden o se derivan de carcinomas de células escamosas, es decir, células de la mucosa o del epitelio del tracto aerodigestivo superior. Otras células o tejidos pueden comprender células colorrectales, células de colon, células de glioblastoma, células de tumor cerebral, células de cáncer de mama o células de cáncer de las cervicales.

[0145] Como se utilizan en este documento, los términos "célula", "línea celular" y "cultivo celular" se pueden utilizar de forma intercambiable. Todos estos términos también incluyen su progenie, que es cualquiera y la totalidad de las generaciones posteriores formadas por división celular. Se entiende que toda la progenie no puede ser idéntica debido a mutaciones deliberadas o involuntarias. Una célula huésped puede ser "transfectada" o "transformada", lo que se refiere a un proceso por el cual el ácido nucleico endógeno se transfiere o introduce en la célula huésped. Una célula transformada incluye la célula del sujeto primaria y su progenie. Como se utilizan en este documento, los términos células "diseñadas" y "recombinantes" o células huésped se destinan para referirse a una célula en la que se ha introducido una secuencia de ácidos nucleicos exógena, tal como, por ejemplo, un ARN pequeño interferente o un constructo modelo que codifica un gen reportero. Por lo tanto, las células recombinantes se pueden distinguir a partir de las células de origen natural que no contienen un ácido nucleico recombinantemente introducido.

[0146] Un tejido puede comprender una célula o células huésped que se van a transformar o poner en contacto con una composición de administración de ácidos nucleicos y/o un agente adicional. El tejido puede ser parte o separarse de un organismo. En algunas formas de realización, un tejido y sus células constituyentes pueden comprender, pero de forma no limitativa, un tejido o célula encontrado en el tracto aerodigestivo superior como el labio, labio interno, cavidad bucal (boca), lengua, suelo de la boca, encías, paladar duro, cavidad nasal (dentro de la nariz), senos paranasales, faringe, que incluye la nasofaringe, orofaringe, hipofaringe y laringe, tráquea. Otros tejidos o células preferidos comprenden o se derivan de carcinomas de células escamosas, es decir, células de la mucosa o del epitelio del tracto aerodigestivo superior. Otros tejidos preferidos incluyen tejidos colorrectales, del colon, del cerebro, de la mama, del cérvix.

[0147] En algunas formas de realización, la célula huésped o el tejido se puede comprender en al menos un organismo. En algunas formas de realización, el organismo puede ser un mamífero, un humano, un primate o murino. Un experto en la técnica entendería además las condiciones bajo las que habría que incubar todas las células huésped descritas anteriormente para mantenerlas y para permitir su división para formar progenie.

Métodos de administración

[0148] La presente invención implica en algunas formas de realización la administración de un ácido nucleico en una célula. Esto se puede realizar como parte de un método de cribado, o se puede relacionar con una aplicación terapéutica o de diagnóstico. Las moléculas de ARN se pueden codificar por una molécula de ácido nucleico comprendida en un vector. El término "vector" se utiliza para referirse a una molécula de ácido nucleico portadora en la que se puede insertar una secuencia de ácidos nucleicos para la introducción en una célula donde se puede ser replicar. Una secuencia de ácidos nucleicos puede ser "exógena", lo que significa que es foránea a la célula en la que se está introduciendo el vector o que la secuencia es homóloga a una secuencia en la célula, pero en una posición dentro del ácido nucleico de la célula huésped en la que la secuencia no se encuentra ordinariamente. Los vectores incluyen plásmidos, cósmidos, virus (bacteriófago, virus animales, lentivirus, y virus vegetales), y cromosomas artificiales (por ejemplo, YAC). Un experto en la técnica estaría bien equipado para construir un vector mediante técnicas recombinantes estándar, que se describen en Sambrook *et al*, 1989 y Ausubel *et al*, 1996. Además de codificar un polipéptido modificado tal como gelonina modificada, un vector puede codificar secuencias polipeptídicas no modificadas tal como una etiqueta o molécula de dirección. Una molécula de dirección es una que dirige el ácido nucleico deseado a un órgano, tejido, célula u otra ubicación particular en un cuerpo del sujeto.

[0149] El término "vector de expresión" se refiere a un vector que contiene una secuencia de ácidos nucleicos que codifica al menos parte de un producto génico capaz de ser transcrito. Los vectores de expresión pueden contener una variedad de "secuencias de control", que se refieren a secuencias de ácido nucleico necesarias para la transcripción y posiblemente traducción de una secuencia codificante operativamente enlazada en un organismo huésped. Además de las secuencias de control que gobiernan la transcripción y la traducción, los vectores y vectores de expresión pueden contener secuencias de ácidos nucleicos que cumplen otras funciones también y que se describen.

[0150] Hay una serie de maneras en las que se pueden introducir vectores de expresión en células. En algunas formas de realización de la invención, el vector de expresión comprende un virus o vector diseñado derivado a partir de un genoma viral. La capacidad de ciertos virus para introducir células vía endocitosis mediada por receptor, para integrar en el genoma de la célula huésped y expresar genes virales de forma estable y eficaz han hecho de ellos candidatos atractivos para la transferencia de genes foráneos en células de mamíferos (Ridgeway, 1988; Nicolas y Rubenstein, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Temin, 1986). Los primeros virus usados como vectores génicos fueron virus de ADN que incluyen los papovavirus (virus símico 40, virus del papiloma bovino, y polioma) (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986) y adenovirus (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986). Estos tienen una capacidad relativamente baja para secuencias de ADN foráneas y tienen un espectro de huésped restringido. Además, su potencial oncogénico y efectos citopáticos en células permisivas suscitan cuestiones de seguridad. Pueden alojar solo hasta 8 kb de material genético foráneoextranjero, pero se pueden introducir fácilmente en una variedad de líneas celulares y animales de laboratorio (Nicolas y Rubenstein, 1988; Temin, 1986). Los vectores de expresión pueden contener un casete de

expresión de ARNi que comprende un promotor y una o más estructuras de tallo-bucle separadas por una o más regiones separadoras (WO2006/084209).

Otra manera de introducir vectores de expresión en células, usando proteínas de fusión de avidina, se describe en US6,287,792.

5

[0151] Los retrovirus son un grupo de virus de ARN monocatenario caracterizados por una capacidad para convertir su ARN en ADN bicatenario en células infectadas; también se pueden usar como vectores. Otros vectores virales se pueden emplear como constructos de expresión en la presente invención. Se pueden emplear vectores derivados de virus tales como virus vacuna (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar *et al.*, 1988) virus adenoasociado (AAV) (Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Hermonat y Muzycska, 1984), lentivirus (WO2008/071959, WO2004/054512), virus hemaglutinante de Japón (WO2004/035779), baculovirus (WO2006/048662) y herpesvirus. Ellos ofrecen diferentes características atractivas para diversas células mamíferas (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Baichwal y Sugden, 1986; Coupar *et al.*, 1988; Horwich *et al.*, 1990).

10

15

[0152] Se cree que otros métodos adecuados para la administración de ácidos nucleicos para afectar la expresión de composiciones de la presente invención incluyen prácticamente cualquier método por el que un ácido nucleico (por ejemplo, ADN, que incluye vectores virales y no virales) se puede introducir en un orgánulo, una célula, un tejido o un organismo, como se describe en este documento o como sería conocido por un experto en la técnica. Tales métodos incluyen, pero de forma no limitativa, la administración directa de ADN tal como por inyección (patente de EE. UU. N.º 5,994,624, 5,981,274, 5,945,100, 5,780,448, 5,736,524, 5,702,932, 5,656,610, 5,589,466 y 5,580,859), con microinyección (Harlan y Weintraub, 1985; patente de EE. UU. N.º 5,789,215); por electroporación (patente de EE. UU. N.º 5,384,253); por precipitación de fosfato cálcico (Graham y Van Der Eb, 1973; Chen y Okayama, 1987; Rippe *et al.*, 1990); usando DEAE dextrano seguido de polietilenglicol (Gopal, 1985); por carga sónica directa (Fechheimer *et al.*, 1987); por transfección mediada de liposoma (Nicolau y Sene, 1982; Fraley *et al.*, 1979; Nicolau *et al.*, 1987; Wong *et al.*, 1980; Kaneda *et al.*, 1989; Kato *et al.*, 1991); por internalización fotoquímica (WO2008/007073); por bombardeo de microproyectiles (solicitud PCT N.º WO 94/09699 y 95/06128; patente de EE. UU. N.º 5,610,042, 5,322,783, 5,563,055, 5,550,318, 5,538,877 y 5,538,880); por agitación con fibras de carburos de silicón (Kaeppler *et al.*, 1990; patentes de EE. UU. N.º 5,302,523 y 5,464,765); por transformación mediada por *Agrobacterium* (patentes de EE. UU. N.º 5,591,616 y 5,563,055); o por transformación mediada por PEG de protoplastos (Omirulleh *et al.*, 1993; patentes de EE. UU. N.º 4,684,611 y 4,952,500); por absorción de ADN mediada por desecación/inhibición (Potrykus *et al.*, 1985). A través de la aplicación de técnicas como estas, orgánulo(s), célula(s), tejido(s) u organismo(s) se puede(n) transformar de forma estable o transitoriamente.

20

25

30

35

[0153] Una revisión proporciona diferentes maneras de formular una molécula de ARN para optimizar su internalización en una célula (Kim SS., *et al.*, Trends. Mol. Med., 2009, 15: 491-500). Las siguientes otras publicaciones divulgan maneras alternativas de formular una molécula de ARN para mejorar su internalización en una célula: WO 2007/095152, que describe el uso de PTD-DRBD (dominios de transducción de péptidos enlazados a dominio de unión bicatenaria) para la administración de oligonucleótidos, WO 2009/086558, que describe el uso de partículas SNALP (partículas lipídicas de ácidos nucleicos estables), que comprenden una mezcla de lípidos catiónicos y fusogénicos que habilitan la absorción celular y la liberación endosómica de la carga útil del ácido nucleico de la partícula, WO 2009/149418, que describe emulsiones neutras de fosfolípido-aceite-ARNi, WO 2007/121947, que describe el uso de un vehículo de administración basado en lipoplex, WO 2009/132131, que describe el uso de nuevos lípidos y partículas lipídicas de ácidos nucleicos que proporcionan encapsulación eficaz y administración eficaz del ácido nucleico encapsulado a las células, WO2004/091578 y WO2004/064805, que describen tecnología coclear de capas alternas de lípidos que forman una espiral alrededor de una molécula de ácido nucleico, WO2003/047494 y WO2003/047493, que describen micelas inversas que incorporan ácidos nucleicos para la administración oral y mucosa, WO 2008/156702, que describe bacterias y partícula terapéutica bacteriana (BTP), que incluye oligonucleótidos como vehículo de administración para las células. Cada una de las formulaciones a las que se hace referencia o que se describen en estas publicaciones se abarcan en la presente invención.

40

45

50

55

[0154] Una variedad de compuestos se han unido a los extremos de oligonucleótidos para facilitar su transporte a través de las membranas celulares. Se ha descubierto que los péptidos señal cortos encontrados en HIV TAT, HSV VP22, *Drosophila antennapedia*, y otras proteínas habilitan la transferencia rápida de biomoléculas a través de las membranas (revisado por Schwarze 2000). Estos péptidos señal, referidos como dominios de transducción de proteínas (PTD), se han unido a oligonucleótidos para facilitar su administración en células cultivadas (Eguchi A, Dowdy SF, Trends Pharmacol Sci., 2009, 7:341-5). Se han conjugado colesterol a oligonucleótidos para mejorar su absorción en células en animales (MacKellar 1992). Los grupos de colesterol terminales aparentemente interactúan con los receptores o lípidos en las superficies de las células y facilitan la internalización de los oligonucleótidos modificados. Asimismo, se ha conjugado poli-L-lisina a oligonucleótidos para reducir la carga negativa neta y mejorar la absorción en las células (Leonetti 1990).

60

65

[0155] Se han desarrollado una variedad de compuestos que forman complejo con ácidos nucleicos, los administran a superficies de células, y facilitan su absorción en el interior y su liberación de los endosomas. Entre

5 estos están: (1) una variedad de lípidos tales como DOTAP (u otro lípido catiónico), DDAB, DHDEAB, y DOPE y (2) polímeros no basados en lípidos como polietilimina, poliamidoamina, y dendrímeros de estos y otros polímeros. En alguna de estas formas de realización se emplea una combinación de lípidos tales como DOTAP y colesterol o un derivado de colesterol (patente de EE. UU. 6,770,291). Se ha mostrado que diversos de estos reactivos facilitan la absorción de ácido nucleico en animales.

10 [0156] Los componentes celulares implicados en la vía del miARN se están volviendo conocidos. Las proteínas que estabilizan y/o transportan miARN en las células pueden mejorar la estabilidad y actividad de los miARN porque deberían proteger y guiar a los miARN enlazados una vez que están en las células. Las mezclas de proteínas transportadoras de miARN y miARN podrían mejorar la eficacia de los tratamientos basados en miARN. Los ARN son moléculas hidrofílicas en virtud de su fosfato aniónico y esqueleto de azúcar. Aunque las nucleobases son hidrofóbicas, la hidrofilidad domina debido al enlace de hidrógeno extenso resultante de los residuos de fosfato y de azúcar. El carácter hidrofílico y el esqueleto aniónico reducen la permeación celular. Se ha mostrado que la conjugación de grupos lipofílicos como colesterol (Manoharan, 2002) y derivados de ácido láurico y litocólico con funcionalidad C32 (Lorenz *et al.*, 2004) mejora la absorción celular. Además, la unión de oligonucleótidos conjugados con esteroides a lipoproteínas diferentes en el flujo sanguíneo, tales como LDL, protege su integridad y gobierna su biodistribución (Rump *et al.*, 2000). El colesterol unido a moléculas antisentido (Bijsterbosch *et al.*, 2001) y aptámeros (Rusconi *et al.*, 2004) también se ha mostrado que estabiliza los oligonucleótidos permitiendo la unión a lipoproteínas. Se ha demostrado que el colesterol mejora la absorción y la estabilidad del suero de ARN *ex vitro* (Lorenz *et al.*, 2004) e *in vivo* (Soutschek *et al.*, 2004). Adicionalmente, una serie de moléculas pequeñas como SB-435495 (Blackie *et al.*, (2002), isradipina (Oravcova *et al.*, 1994), amlodipina (Oravcova *et al.*, 1994) y 2,2',4,4',5,5'-hexaclorobifenilo (Borlakoglu *et al.*, 1990) podrían mejorar la absorción celular, y mejorar la resistencia de nucleasa mediante la promoción de la asociación de lipoproteínas.

25 Cribado con bibliotecas de miARN

30 [0157] Como se usa en la solicitud de patente, el cribado es un proceso donde múltiples reactivos específicos de miARN se administran separadamente en poblaciones de células individuales o animales. En uno o más momentos designados después de la administración, las poblaciones celulares o animales se ensayan para uno o más fenotipos. Aquellas células o animales que tienen un fenotipo significativamente diferente de las células o animales en el grupo de control negativo se clasifican como positivos. El miARN que se estaba manipulando en la muestra se define como un impacto. Los impactos representan objetivos para investigación adicional y desarrollo terapéutico potencial.

35 [0158] En algunas formas de realización, hay un proceso multifase para el cribado, en algunas formas de realización, hay cuatro pasos generales:

(1) Desarrollar ensayo cuantitativo para controlar el proceso celular que se está estudiando.

40 [0159] Los ensayos que miden la intensidad de un fenotipo celular van desde ensayos microscópicos que controlan el tamaño celular, estado de ciclo celular, o coloración con anticuerpos a ensayos enzimáticos que valoran la producción de un sustrato específico en un lisado celular para mediciones directas de biomoléculas o moléculas pequeñas en lisados, en células, o en el medio.

45 [0160] Crítico para el éxito de un cribado es crear un ensayo que mida realmente el fenotipo celular y maximizar la proporción de señal-ruido del ensayo. Maximizar la señal-ruido implica ensayar variables como tiempo de ensayo, componentes de ensayo, tipo celular, y longitud de tiempo entre transfección y ensayo. A mayor diferencia en los resultados de ensayo entre un fenotipo positivo y un fenotipo de control negativo, mayor será la extensión en los resultados del cribado y mejor será la oportunidad de identificar genes interesantes. Existen métodos de cribado alternativos que usan infección por lotes.

(2) Optimizar las condiciones de transfección para las células deseadas.

55 [0161] El primer paso en este proceso es identificar un reactivo de transfección y condiciones de recubrimiento que maximizan la absorción de miARN sintéticos mientras se mantiene una viabilidad celular alta. Encontramos útil ensayar 2-5 reactivos de transfección diferentes cuando se usan líneas celulares o 5-10 condiciones de electroporación cuando se usan células primarias o de suspensión. La transfección se puede optimizar para el reactivo o condición de electroporación que funcionó mejor entre las condiciones evaluadas. Cribar bibliotecas específicas de miARN requiere condiciones para transfección de alto rendimiento. En este tipo de cribado, se usó introducción lentiviral en lugar de transfección. Esto puede requerir técnicas de optimización alternativas.

(3) Cribar

65 [0162] Una vez que el ensayo y el proceso de transfección se han desarrollado, una biblioteca de miARN sintéticos o miARN expresados por virus se puede introducir consecutivamente en células en una placa de 24 o 96 pocillos. Las transfecciones duplicadas o triplicadas para cada reactivo proporcionan datos suficientes para un

análisis estadístico razonable. El ensayo MTS como se realiza en la parte experimental es un ejemplo de tal cribado.

(4) Validar impactos

5

[0163] Convalidar un impacto implica mostrar que el fenotipo observado se debe al miARN que se dirige. Los impactos se confirman típicamente administrando una serie de diluciones del inhibidor de miARN o miARN sintético que se registró como un impacto en la célula que se ensayó originalmente. La confirmación es ligeramente diferente de la validación. La confirmación es una repetición del fenotipo inducido por miARN, mientras que la validación puede también incluir inversión del fenotipo mediante la antagonización del fenotipo mediado por miARN.

10

Etiquetado y técnicas de etiquetado

15

[0164] En algunas formas de realización, la presente invención se refiere a miARN que están marcados, tal como para ensayos de cribado para evaluar la relevancia terapéutica o de diagnóstico de unas especies de miARN particulares. Se contempla que el miARN se puede aislar primero (bien a partir de una célula donde el miARN es endógeno a la célula o bien a partir de una célula donde el miARN es exógeno a la célula) y/o purificar antes del etiquetado. Esto puede conseguir una reacción que marca más eficazmente el miARN, a diferencia de otro ARN en una muestra donde el miARN no se aísla o purifica antes del etiquetado. En muchas formas de realización de la invención, el marcador es no radioactivo. Generalmente, los ácidos nucleicos se pueden marcar añadiendo nucleótidos marcados (proceso de un paso) o añadiendo nucleótidos y etiquetando los nucleótidos añadidos (proceso de dos pasos).

20

25

[0165] Además, los miARN se pueden marcar como se describe en la solicitud de patente de EE. UU. N.º de serie 60/649,584. Tales nucleótidos incluyen aquellos que se pueden marcar con un tinte, que incluye un tinte fluorescente, o con una molécula tal como biotina. Los nucleótidos marcados están fácilmente disponibles; se pueden adquirir comercialmente o se pueden sintetizar mediante reacciones conocidas por aquellos expertos en la técnica.

30

Nucleótidos para el etiquetado

35

[0166] Los nucleótidos para el etiquetado no son nucleótidos de origen natural, sino que, en cambio, se refieren a nucleótidos preparados que tienen una fracción reactiva en ellos. Las funcionalidades reactivas específicas de interés incluyen: amina, sulfhidrilo, sulfoxilo, aminosulfhidrilo, azida, epóxido, isotiocianato, isocianato, anhídrido, monoclorotriazina, diclorotriazina, piridina sustituida con mono o dihalógeno, diazina mono o disustituída, maleimida, epóxido, aziridina, haluro de sulfonilo, haluro de ácido, haluro de alquilo, haluro de arilo, alquilsulfonato, éster de N-hidroxisuccinimida, éster imida, hidrazina, azidonitrofenilo, azida, 3-(2-piridil ditio)propionamida, glioxal, aldehído, iodoacetilo, éster de cianometilo, éster de p-nitrofenilo, éster de O-nitrofenilo, éster de hidroxipiridina, imidazol carbonilo, y los otros grupos químicos de este tipo. En algunas formas de realización, la funcionalidad reactiva se puede enlazar directamente a un nucleótido, o se puede enlazar al nucleótido a través de un grupo de conexión. La fracción funcional y cualquier enlazador no pueden perjudicar sustancialmente la capacidad del nucleótido de ser añadido al miARN o de ser marcado. Los grupos de conexión representativos incluyen grupos de conexión que contienen carbono, típicamente variando de aproximadamente 2 a 18, normalmente de aproximadamente 2 a 8 átomos de carbono, donde los grupos de conexión que contienen carbono pueden incluir o no uno o más heteroátomos, por ejemplo, S, O, N, etc., y pueden incluir o no uno o más sitios de insaturación. De interés particular en muchas formas de realización son grupos de conexión de alquilo, típicamente grupos de conexión de alquilo inferiores de 1 a 16, normalmente de 1 a 4 átomos de carbono, donde los grupos de conexión pueden incluir uno o más sitios de insaturación. Los nucleótidos funcionalizados (o cebadores) usados en los métodos anteriores de generación de objetivos funcionalizados se pueden fabricar utilizando protocolos conocidos o comprados de vendedores comerciales, por ejemplo, Sigma, Roche, Ambion, e IDT. Los grupos funcionales se pueden preparar según maneras conocidas para los expertos en la técnica, que incluyen la información representativa encontrada en las patentes de EE. UU. N.º 4,404,289, 4,405,711, 4,337,063 y 5,268,486, y la patente Br. N.º 1,529,202.

55

[0167] Los nucleótidos modificados con amina se usan en diferentes formas de realización de la invención. El nucleótido modificado con amina es un nucleótido que tiene un grupo amino reactivo para la unión del marcador. Se contempla que cualquier ribonucleótido (G, A, U, o C) o desoxirribonucleótido (G, A, T, o C) se puede modificar para el etiquetado.

60

Ejemplos incluyen, pero de forma no limitativa, los siguientes ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos modificados: 5-(3-aminoalil)-UTP; 8-[(4-amino)butil]-amino-ATP y 8-[(6-amino)butil]-amino-ATP; N⁶-(4-amino)butil-ATP, N⁶-(6-amino)butil-ATP, N⁴-[2,2-oxi-bis-(etilamina)]-CTP; N⁶-(6-amino)hexil-ATP; 8-[(6-amino)hexil]-amino-ATP; 5-propargilamino-CTP, 5-propargilamino-UTP; 5-(3-aminoalil)-dUTP; 8-[(4-amino)butil]-amino-dATP y 8-[(6-amino)butil]-amino-dATP; N-(4-amino)butil-dATP, N⁶-(6-amino)butil-dATP, N⁴-[2,2-oxi-to-(etilamina)]-dCTP; N⁶-(6-amino)hexil-dATP; 8-[(6-amino)hexil]-amino-dATP; 5-propargilamino-dCTP, y 5-propargilamino-dUTP. Tales nucleótidos se pueden preparar según métodos conocidos por aquellos expertos en

65

la técnica. Además, una persona experta en la técnica podría preparar otras entidades de nucleótido con la misma modificación de amina, tal como un 5-(3-aminoalil)-CTP, GTP, ATP, dCTP, dGTP, dTTP, o dUTP en lugar de un 5-(3-aminoalil)-UTP.

5 Técnicas de etiquetado

[0168] En algunas formas de realización, los ácidos nucleicos se marcan añadiendo catalíticamente al ácido nucleico un nucleótido o nucleótidos ya marcado(s). Uno o más nucleótidos marcados se pueden añadir a moléculas de miARN. Véase la patente de EE. UU. 6,723,509.

10

[0169] En otras formas de realización, un nucleótido o nucleótidos no marcado(s) se añade(n) catalíticamente a un miARN, y el nucleótido no marcado se modifica con una fracción química que le permite que sea marcado posteriormente, en formas de realización de la invención, la fracción química es una amina reactiva de manera que el nucleótido es un nucleótido modificado con amina. Ejemplos de nucleótidos modificados con amina son muy conocidos para los expertos en la técnica, y muchos están disponibles comercialmente tales como de Ambion, Sigma, Jena Bioscience, y TriLink.

15

[0170] A diferencia del etiquetado del ADNc durante su síntesis, la cuestión para el etiquetado de miARN es cómo marcar la molécula ya existente. Con este fin, podemos usar una enzima capaz de utilizar un ribonucleótido di o trifosfato o desoxirribonucleótido como un sustrato para su adición a un miARN, una molécula de ARN pequeña. Además, en formas de realización específicas, implica utilizar un ribonucleótido di o trifosfato modificado, que se añade al extremo 3' de un miARN. La fuente de la enzima no es limitante. Ejemplos de fuentes para las enzimas incluyen levadura, bacterias gramnegativas tales como *E. coli*, *Lactococcus lactis*, y virus pox de oveja.

25

[0171] Las enzimas capaces de añadir tales nucleótidos incluyen, pero de forma no limitativa, poli(A) polimerasa, transferasa terminal, y polinucleótido fosforilasa. En formas de realización específicas de la invención, se contempla que la ligasa NO es la enzima usada para añadir el marcador y, en cambio, se usa una enzima no ligasa.

30

[0172] Se ha clonado poli(A) polimerasa a partir de una serie de organismos desde plantas hasta seres humanos. Se ha demostrado que cataliza la adición de trectos de homopolímero a ARN (Martin *et al*, RNA, 4(2):226-30,1998).

35

[0173] La transferasa terminal cataliza la adición de nucleótidos al terminal 3' de un ácido nucleico.

[0174] El polinucleótido fosforilasa puede polimerizar difosfatos de nucleótidos sin la necesidad de un cebador.

40 Marcadores y etiquetas

40

[0175] Los miARN o sondas de miARN se pueden marcar con un marcador o etiqueta de emisión de positrones (que incluye radiactivo), enzimático, colorimétrico (incluye espectro visible y UV, que incluye fluorescente), luminiscente u otro para fines de detección o de aislamiento. El marcador se puede detectar directa o indirectamente. Los marcadores radiactivos incluyen ¹²⁵I, ³²P, ³³P, y ³⁵S. Ejemplos de marcadores enzimáticos incluyen fosfatasa alcalina, luciferasa, peroxidasa de rábano, y β-galactosidasa. Los marcadores también pueden ser proteínas con propiedades luminiscentes, por ejemplo, proteína verde fluorescente y ficoeritrina.

45

Los marcadores colorimétricos y fluorescentes contemplados para el uso como conjugados incluyen, pero de forma no limitativa, AMCA, tintes Alexa Fluor, tintes como BODIPY, tales como BODIPY FL, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIP Y-R6G, BODIPY-TRX; Cascade Blue; Cascade Yellow; cumarina y sus derivados, tales como 7-amino-4-metilcumarina, aminocumarina e hidroxycumarina; tintes de cianina, tales como Cy3 y Cy5; eosinas y eritrosinas; fluoresceína y sus derivados, tales como isotiocianato de fluoresceína; quelatos macrocíclicos de iones de lantánido, tales como Quantum DyeTM; Marina Blue; Oregon Green; tintes de rodamina, tales como rhodamine red, tetrametilrodamina y rodamina 6G; Texas Red;

50

Ejemplos específicos de tintes incluyen, pero de forma no limitativa, aquellos identificados anteriormente y los siguientes: Alexa Fluor 350, Alexa Fluor 405, Alexa Fluor 430, Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 500. Alexa Fluor 514, Alexa Fluor 532, Alexa Fluor 546, Alexa Fluor 555, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 610, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, Alexa Fluor 700, y Alexa Fluor 750; tintes BODIPY reactivos de amina, tales como BODIPY 493/503, BODEPY 530/550, BODEPY 558/568, BODIPY 564/570, BODDPY 576/589, BODIPY 581/591, BODEPY 630/650, BODIPY 650/655, BODIPY FL, BODIPY R6G, BODEPY TMR, y, BODIPY-TR; Cy3, Cy5, 6-FAM, isotiocianato de fluoresceína, HEX, 6-JOE, Oregon Green 488, Oregon Green 500, Oregon Green 514, Pacific Blue, REG, Rhodamine Green, Rhodamine Red, Renographin, ROX, SYPRO TAMRA, 2',4',5',7'-Tetrabromosulfonafluoresceína, y TET.

60

[0176] Ejemplos específicos de ribonucleótidos marcados fluorescentemente están disponibles de Molecular Probes, y estos incluyen Alexa Fluor 488-5-UTP, fluoresceína-12-UTP, BODEPY TMR-14-UTP, BODEPY FL-14-UTP, BODIPY TMR-14-UTP, tetrametilrodamina-6-UTP, Alexa Fluor 546-14-UTP, Texas Red-5-UTP, y BODIPY

65

TR-14-UTP. Otros ribonucleótidos fluorescentes están disponibles de Amersham Biosciences, tales como Cy3-UTP y Cy5-UTP. Ejemplos de desoxirribonucleótidos marcados fluorescentemente incluyen dinitrofenil (DNP)-11-dUTP, Cascade Blue-7-dUTP, Alexa Fluor 488-5-dUTP, fluoresceína-12-dUTP, Oregon Green 488-5-dUTP, BODEPY FL-14-dUTP, Rhodamine Green-5-dUTP, Alexa Fluor 532-5-dUTP, BODEPY TMR-14-dUTP, tetrametilrodamina-6-dUTP, Alexa Fluor 546-14-dUTP, Alexa Fluor 568-5-dUTP, Texas Red-12-dUTP, Texas Red-5-dUTP, BODEPY TR-14-dUTP, Alexa Fluor 594-5-dUTP, BODEPY 630/650-14-dUTP, BODIPY 650/665-14-dUTP, Alexa Fluor 488-7-OB EA-dCTP, Alexa Fluor 546-16-OB EA-dCTP, Alexa Fluor 594-7-OB EA-dCTP, Alexa Fluor 647-12-OB EA-dCTP. Se contempla que los ácidos nucleicos se pueden marcar con dos marcadores diferentes. Además, se puede emplear transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET) en los métodos de la invención (por ejemplo, Klostermeier *et al.*, 2002; Emptage, 2001; Didenko, 2001). Se pueden usar tintes de transferencia de energía fluorescentes, tales como heterodímero de etidio-naranja de tiazol; y, TOTAB. Alternativamente, el marcador puede no ser detectable *per se*, sino detectable indirectamente o que permite el aislamiento o separación del ácido nucleico dirigido. Por ejemplo, el marcador podría ser biotina, digoxigenina, cationes polivalentes, grupos quelantes y los otros ligandos, que incluyen ligandos para un anticuerpo.

Técnicas de visualización

[0177] Una serie de técnicas para visualizar o detectar ácidos nucleicos marcados están fácilmente disponibles. La referencia de Stanley T. Croke, 2000 tiene una discusión de tales técnicas (capítulo 6). Tales técnicas incluyen microscopía, matrices, fluorometría, cicladores de luz u otras máquinas de PCR^(TM) en tiempo real, análisis FACS, contadores de centelleo, generador de imágenes de fósforo, contadores Geiger, MRI, CAT, métodos de detección a base de anticuerpos (Westerns, inmunofluorescencia, inmunohistoquímica), técnicas histoquímicas, HPLC (Griffey *et al.*, 1997, espectroscopia, electroforesis en gel capilar (Cummins *et al.*, 1996), espectroscopia; espectroscopia de masas; técnicas radiológicas; y técnicas del balance de masa. Alternativamente, se pueden marcar o etiquetar ácidos nucleicos para permitir su aislamiento eficaz. En otras formas de realización de la invención, los ácidos nucleicos son biotinilados.

[0178] Cuando se emplean dos o más marcadores coloreados diferencialmente, se pueden emplear técnicas de transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET) para caracterizar el ARNbc. Además, una persona experta en la técnica es bien consciente de maneras de visualizar, identificar y caracterizar ácidos nucleicos marcados y, por consiguiente, tales protocolos se pueden utilizar como parte de la invención. Ejemplos de herramientas que se pueden utilizar también incluyen microscopía fluorescente, un bioanalizador, un lector de placa, Storm (Molecular Dynamics), escáner de matriz, FACS (clasificador de células activadas fluorescentes), o cualquier instrumento que tenga la capacidad de excitar y detectar una molécula fluorescente (citómetro de placa Acumen [TTP Labtech] por ejemplo.

Preparación de las muestras

[0179] Se contempla que el miARN de una amplia variedad de muestras se puede analizar utilizando ensayos descritos en este documento. Aunque se contempla el miARN endógeno para el uso con algunas formas de realización, el miARN recombinante o sintético -que incluye ácidos nucleicos que son idénticos al miARN endógeno o miARN precursor- también se puede manejar y analizar como se describe en este documento. Las muestras pueden ser muestras biológicas, en cuyo caso, pueden ser de sangre, LCR, tejido, órganos, tumor, semen, esputo, deposición, orina, saliva, lágrimas, otro fluido corporal, folículos pilosos, piel, o cualquier muestra que contenga o constituya células biológicas. Alternativamente, la muestra puede no ser una muestra biológica, sino ser una mezcla química, tal como una mezcla reactiva libre de células (que puede contener una o más enzimas biológicas).

Ensayos celulares para identificar miARN con vínculos con la enfermedad

[0180] Las aplicaciones específicamente contempladas incluyen identificar miARN que contribuyen a inducir una actividad antitumoral que son ellos mismos parte de una enfermedad o condiciones o pueden de otro modo estar asociados con un estado de enfermedad particular. Adicionalmente, una aplicación contemplada incluye la identificación de miARN que son capaces de inducir una actividad antitumoral. También, se pueden comparar funciones de miARN entre una muestra que se cree que es susceptible a una enfermedad o condición particular asociada a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de la mucosa preneoplásico y una que se cree que no es susceptible o resistente a esa enfermedad o condición. Concretamente se contempla que las moléculas de ARN de la presente invención pueden utilizarse para tratar cualquiera de las enfermedades o condiciones discutidas en la sección precedente o modular cualquiera de las vías celulares discutidas en la sección precedente. Las aplicaciones específicamente contempladas incluyen identificar miARN que inducen una actividad antitumoral que son ellos mismos parte de una enfermedad o pueden de otro modo estar asociados con un estado de enfermedad particular. También, se pueden comparar funciones de miARN entre una muestra que se cree que es susceptible a una enfermedad o condición particular asociada con neoangiogénesis y una que se cree que no es susceptible o resistente a esa enfermedad o condición.

[0181] La eficacia de diferentes fármacos terapéuticos se puede alterar, preferiblemente mejorar, mediante una molécula de miARN, equivalente, imitación o fuente del mismo tal y como se define en este documento y como se usa según la presente invención. La molécula de miARN, equivalente o fuente del mismo que induce una actividad antitumoral puede mejorar la susceptibilidad a, por ejemplo, la quimioterapia e inmunoterapia. Tales fármacos terapéuticos incluyen, pero de forma no limitativa, fármacos quimioterapéuticos. Un "agente quimioterapéutico" se utiliza para connotar un compuesto o composición que se administra en el tratamiento contra el cáncer. Estos agentes o fármacos se categorizan por su modo de actividad dentro de una célula, por ejemplo, si afectan al ciclo celular y en qué etapa. Alternativamente, un agente se puede caracterizar basándose en su capacidad para reticular directamente ADN, para intercalarse en el ADN, o para inducir aberraciones cromosómicas y mitóticas que afectan a la síntesis de ácidos nucleicos. Además, se contempla que las moléculas de ácidos nucleicos de la invención se pueden emplear en métodos de diagnóstico y terapéuticos con respecto a cualquiera de las vías o factores anteriores. Así, en algunas formas de realización de la invención, una molécula de miARN, equivalente, imitación o fuente del mismo inhibe, elimina, activa, induce, aumenta, o modula de otro modo una o más de las vías o factores anteriores se contempla como parte de la invención. El ácido nucleico puede utilizarse para diagnosticar una enfermedad o condición basándose en la relación de ese miARN con cualquiera de las vías anteriormente descritas.

Otros ensayos

[0182] Además del uso de matrices y micromatrices, se contempla que se podría emplear una serie de ensayos diferentes para analizar miARN, sus actividades y sus efectos. Tales ensayos incluyen, pero de forma no limitativa, RT-PCR, hibridación *in situ*, ensayo de protección de hibridación (HPA) (GenProbe), ensayo de ADN ramificado (ADNr) (Collins, M. L. *et al.* (1997). *Nucleic Acids Research* 25: 2979-2984), amplificación de círculo rodante (RCA), detección de hibridación de molécula única (US Genomics), ensayo Invader (ThirdWave Technologies), y Bridge Litigation Assay (Qiagen). Se contempla que tales métodos se pueden utilizar en el contexto de matrices, al igual que en el contexto de ensayos de diagnóstico.

Aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico

[0183] Los miARN que afectan a los rasgos fenotípicos proporcionan puntos de intervención para aplicaciones terapéuticas al igual que aplicaciones de diagnóstico (mediante el cribado para la presencia o ausencia de un miARN particular). Concretamente se contempla que las moléculas de ARN de la presente invención pueden utilizarse para tratar cualquiera de las enfermedades o condiciones discutidas en la sección precedente. Además, cualquiera de los métodos anteriormente descritos también se puede emplear con respecto a los aspectos terapéuticos y de diagnóstico de la invención. Por ejemplo, los métodos con respecto a la detección de miARN o el cribado de los mismos también se pueden emplear en un contexto de diagnóstico. En usos terapéuticos, una cantidad eficaz de los miARN de la presente invención se administra a una célula, que puede estar o no en un animal. En algunas formas de realización, una cantidad terapéuticamente eficaz de los miARN de la presente invención se administra a un individuo para el tratamiento de la enfermedad o condición. El término "cantidad efectiva" como se utiliza en este documento se define como la cantidad de moléculas de la presente invención que son necesarias para dar como resultado el cambio fisiológico deseado en la célula o tejido al que se administra. El término "cantidad terapéuticamente eficaz" como se utiliza en este documento se define como la cantidad de las moléculas de la presente invención que consigue un efecto deseado con respecto a una enfermedad o condición asociada con el cáncer de cabeza y de cuello como se ha definido anteriormente en este documento. Un experto en la técnica reconoce fácilmente que en muchos casos las moléculas pueden no proporcionar una cura, pero pueden proporcionar un beneficio parcial, tal como alivio o mejora de al menos un síntoma. En algunas formas de realización, un cambio fisiológico que tiene algún beneficio también se considera beneficioso terapéuticamente. Así, en algunas formas de realización, una cantidad de moléculas que proporciona un cambio fisiológico se considera una "cantidad efectiva" o una "cantidad terapéuticamente efectiva".

[0184] En algunas formas de realización, la molécula tiene una secuencia que corresponde a la secuencia de miARN de ese animal particular, a diferencia de de otro animal. Así, en algunas formas de realización, una secuencia humana se utiliza en las moléculas de ARN de la presente invención. En experimentos *in vivo*, una secuencia de miARN puede diferir en el animal de prueba en comparación con la secuencia humana. En ese caso, un miARN que difiere de la secuencia humana se puede usar para demostrar efecto terapéutico en el animal. Los resultados obtenidos con esta secuencia evaluada en un animal pueden ser resultados previstos extrapolados en un humano con una molécula de miARN correspondiente.

Modos de administración y formulaciones

[0185] Las moléculas de ácidos nucleicos de la invención se pueden administrar a un sujeto solas o en forma de una composición farmacéutica para el tratamiento de una condición o enfermedad. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular de manera convencional usando uno o más portadores, diluyentes, excipientes o productos auxiliares fisiológicamente aceptables que facilitan el procesamiento del miARN en preparaciones que se pueden usar farmacéuticamente. La formulación apropiada depende de la ruta de administración elegida. Para administración tópica, los miARN de la invención se pueden formular como

5 soluciones, geles, pomadas, cremas, suspensiones, etc. como se conocen bien en la técnica. Las formulaciones sistémicas incluyen aquellas diseñadas para administración por inyección, por ejemplo, inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intratecal o intraperitoneal, al igual que aquellas diseñadas para administración transdérmica, transmucosa, por inhalación, oral o pulmonar. Para la inyección, los ácidos nucleicos de la invención se pueden formular en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones compatibles fisiológicamente tal como solución de Hanks, solución de Ringer, o tampón de solución salina fisiológica. La solución puede contener agentes formulatorios tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, las moléculas de ácidos nucleicos pueden estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua sin pirógeno estéril, antes del uso. Para la administración transmucosa, penetrantes apropiados a la barrera que se ha de penetrar se usan en la formulación. Tal penetrantes son generalmente conocidos en la técnica. Para la administración oral, los ácidos nucleicos se pueden formular fácilmente combinando las moléculas con soportes farmacéuticamente aceptables muy conocidos en la técnica. Tales soportes permiten que los ácidos nucleicos de la invención se formulen como comprimidos, píldoras, grageas, cápsula, líquidos, geles, jarabes, suspensiones acuosas, suspensiones y similares, para ingestión oral por un paciente que se va a tratar. Para formulaciones sólidas orales tales como, por ejemplo, polvos, capsulas y comprimidos, excipientes adecuados incluyen rellenos tales como azúcares, por ejemplo, lactosa, sacarosa, manitol y sorbitol; preparaciones de celulosa tales como almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, goma tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, y/o polivinilpirrolidona (PVP); agentes de granulación; y agentes aglutinantes. Si se desea, se pueden añadir agentes de desintegración, tales como la polivinilpirrolidona reticulada, agar, o ácido alginico o una sal derivada de los mismos tal como alginato de sodio. Si se desea, formas de dosificación sólida se pueden recubrir de azúcar o recubrir entéricamente utilizando técnicas estándar. Para preparaciones líquidas orales, tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones, soportes, excipientes o diluyentes adecuados incluyen agua, glicoles, aceites, alcoholes, etc. Adicionalmente, se pueden añadir agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares. Para administración bucal, las moléculas pueden tomar la forma de comprimidos, pastillas, etc. formulados de manera convencional. Para administración por inhalación, las moléculas para el uso según la presente invención se administran convenientemente en la forma de un spray de aerosol con envase presurizado o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad dosificada. Las capsulas y los cartuchos de gelatina para el uso en un inhalador o insuflador se pueden formular con una mezcla de polvo de los ácidos nucleicos y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón. Las moléculas de ARN también se pueden formular en composiciones rectales o vaginales tales como supositorios o enemas de retención, por ejemplo, que contienen bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao u otros glicéridos.

40 [0186] Además de las formulaciones previamente descritas, las moléculas también se pueden formular como una preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada se pueden administrar mediante implante (por ejemplo, subcutáneamente o intramuscularmente) o por inyección intramuscular. Así, por ejemplo, las moléculas se pueden formular con materiales poliméricos adecuados o hidrofóbicos (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio de iones, o como derivados escasamente solubles, por ejemplo, como una sal escasamente soluble. Alternativamente, se pueden emplear otros sistemas de administración farmacéutica.

45 [0187] Los liposomas y emulsiones son ejemplos muy conocidos de vehículos de administración que se pueden utilizar para administrar ácidos nucleicos de la invención.

50 [0188] Un ácido nucleico de la invención se puede administrar en combinación con un portador o lípido para aumentar la absorción celular. Por ejemplo, el oligonucleótido se puede administrar en combinación con un lípido catiónico. Ejemplos de lípidos catiónicos incluyen, pero de forma no limitativa, lipofectina, DOTMA, DOPE, y DOTAP. La publicación de WO0071096 describe formulaciones diferentes, tales como una formulación de colesterol o de derivado de colesterol que se puede usar eficazmente para terapia génica. Otras descripciones también discuten diferentes formulaciones lipídicas o liposómicas que incluyen nanopartículas y métodos de administración; estas incluyen, pero de forma no limitativa, la publicación de patente de EE. UU. 20030203865, 20020150626, 20030032615, y 20040048787. Los métodos usados para la formación de partículas también se describen en las patentes de EE. UU. N.º 5,844,107, 5,877,302, 6,008,336, 6,077,835, 5,972,901, 6,200,801, y 5,972,900. Los ácidos nucleicos también se pueden administrar en combinación con una amina catiónica tal como poli-L-lisina.

60 Los ácidos nucleicos también se pueden conjugar a una fracción química, tal como transferrina y colesteriles. Además, los oligonucleótidos se pueden dirigir a ciertos órganos o tejidos enlazando grupos químicos específicos al oligonucleótido. Por ejemplo, enlazando el oligonucleótido a una matriz adecuada de residuos de manosa dirigirá el oligonucleótido al hígado. Otros ligandos de dirección se describen en Liu B., Brief Funct. Genomic Proteomic 6:112-119, 2007. Ejemplos adicionales son azúcares de carbohidratos tales como galactosa, N-acetilgalactosamina, manosa; vitaminas tales como folatos; moléculas pequeñas, que incluyen naproxeno, ibuprofeno u otras moléculas de unión a proteínas conocidas, ciclodextrina, que dirige el receptor de transferrina, también llamada ciclodextrina de transferencia modificada (Hu-Lieskovan *et al.*, 2005), PEI (PEG-PEI dirigido con

RGD, Schiffelers *et al.* 2004), anisamida, péptidos de RGD o imitaciones de RGD, poliarginina, fragmento de anticuerpo monocatenario anti-TfR/TfRscFv, anexina A5 (que se dirige a membranas que exponen fofatidilserina, Garnier B. *et al.*, 2009, 11:2114-22), WO 2009/126933, que describe composiciones y métodos para la administración específica del sitio de ácidos nucleicos por combinación de los mismos con ligandos de dirección y componentes endosomolíticos. Los ligandos de dirección que son preferentemente adecuados son proteínas de superficie celular asociadas endoteliales. La dirección de ácidos nucleicos también se puede realizar usando tecnología de aptámeros como se describe en WO2005/111238. Además, fracciones lipídicas adicionales, tales como PEG-lípidos, colesterol, lípidos o péptidos auxiliares endosomolíticos (WO2009/046220) o la morfología general de las nanopartículas generadas (caracterizadas por la carga y el tamaño de las partículas) a los vehículos de administración anteriormente mencionados pueden conferir especificidad de dirección a o bien células cancerosas y/o vasculatura tumoral.

[0189] Adicionalmente, las moléculas se pueden administrar utilizando un sistema de liberación prolongada, tales como matrices semipermeables de polímeros sólidos que contienen el agente terapéutico. Varios materiales de liberación prolongada se han establecido y se conocen por aquellos expertos en la técnica. Las cápsulas de liberación prolongada pueden, dependiendo de su naturaleza química, liberar las moléculas durante unas pocas semanas hasta más de 100 días. Dependiendo de la naturaleza química y la estabilidad biológica de las moléculas quiméricas, se pueden emplear estrategias adicionales para la estabilización de moléculas.

[0190] Alternativamente, las moléculas se pueden administrar utilizando un sistema de administración basado en química de coordinación como se describe en WO2007011217.

[0191] Además de lo anterior, una molécula de la invención se puede administrar utilizando electroporación para tratamiento local o dirigido. Los métodos de electroporación son conocidos para la persona experta y se describen, por ejemplo, en Daud *et al.* (2008) o Bodles-Brakhop (2009).

[0192] Los ácidos nucleicos se pueden incluir en cualquiera de las formulaciones descritas anteriormente como los ácidos o bases libres o como sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables son aquellas sales que retienen sustancialmente la actividad biológica de las bases libres y que se preparan por reacción con ácidos inorgánicos. Las sales farmacéuticas tienden ser más solubles en solventes acuosos y otros solventes próticos de lo que lo son las formas de base libre correspondientes.

[0193] Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden una cantidad eficaz de una o más moléculas de miARN disueltas o dispersadas en un portador farmacéuticamente aceptable. La frase "farmacéuticamente o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades y composiciones moleculares que no producen o producen una aceptable reacción, adversa, alérgica u otra reacción perjudicial cuando se administran a un animal, tal como, por ejemplo, un humano, según sea apropiado. Si determinados efectos adversos son aceptables o no se determina basándose en la gravedad de la enfermedad. La preparación de una composición farmacéutica que contiene al menos un polipéptido quimérico o ingrediente activo adicional será conocida para los expertos en la técnica a la luz de la presente descripción, como se ejemplifica en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed. Mack Printing Company, 1990. Además, para la administración a un animal (por ejemplo, un humano), se entiende que las preparaciones deberían cumplir estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza según como se requiere por la Oficina de Estándares Biológicos de la FDA.

Como se utiliza en este documento, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cualquiera de solventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, agentes de retraso de absorción, sales, conservantes, fármacos, estabilizadores farmacológicos, geles, ligantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, tintes, materiales semejantes y combinaciones de los mismos, como sería conocido para un experto en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed. Mack Printing Company, 1990, págs. 1289-1329). Salvo en la medida en que cualquier portador convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas o terapéuticas.

[0194] Los miARN pueden comprender diferentes tipos de portadores dependiendo de si se administran en forma sólida, líquida o de aerosol, y de si necesitan esterilizarse para rutas de administración tales como la inyección. La presente invención se puede administrar intravenosamente, intradérmicamente, intraarterialmente, intraperitonealmente, intralesionalmente, intracranealmente, intraarticularmente, intraprostáticamente, intrapleuralmente, intratraquealmente, intranasalmente, intravítreamente, intravaginalmente, rectalmente, tópicamente, intratumoralmente, intramuscularmente, intraperitonealmente, subcutáneamente, subconjuntival, intravesicularmente, mucosalmente, intrapericardialmente, intraumbilicalmente, intraocularmente, oralmente, tópicamente, localmente, por inhalación (por ejemplo, inhalación de aerosol), por inyección, por infusión, por infusión continua, directamente por células seleccionadas como objetivo con baño de perfusión localizada, vía un catéter, vía un lavado, en cremas, en composiciones lipídicas (por ejemplo, liposomas), o por otro método o cualquier combinación de los anteriores como sería conocido para uno experto en la técnica (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed. Mack Printing Company, 1990).

[0195] La cantidad de dosificación real de una composición de la presente invención administrada a un animal o un paciente se puede determinar mediante factores físicos y fisiológicos tales como peso corporal, gravedad de la condición, el tipo de enfermedad que se está tratando, intervenciones terapéuticas precedentes o concurrentes, idiopatía del paciente y la ruta de administración. El profesional responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la concentración de ingrediente(s) activo(s) en una composición y la(s) dosis(s) apropiada(s) para el sujeto individual

[0196] En algunas formas de realización, las composiciones farmacéuticas pueden comprender, por ejemplo, al menos aproximadamente el 0,1 % de un compuesto activo. En otras formas de realización, un compuesto activo puede comprender del 2 % al 75 % del peso de la unidad, o del 25 % al 60 %, por ejemplo, y cualquier rango derivable en los mismos. En otros ejemplos no limitativos, una dosis también puede comprender menos de 1 microgramo/kg/peso corporal, o 1 microgramo/kg/peso corporal, de 5 microgramos/kg/peso corporal, 10 microgramos/kg/peso corporal, 50 microgramos/kg/peso corporal, 100 microgramos/kg/peso corporal, 200 microgramos/kg/peso corporal, 350 microgramos/kg/peso corporal, 500 microgramos/kg/peso corporal, 1 miligramo/kg/peso corporal, 5 miligramos/kg/peso corporal, 10 miligramos/kg/peso corporal, 50 miligramos/kg/peso corporal, 100 miligramos/kg/peso corporal, 200 miligramos/kg/peso corporal, 350 miligramos/kg/peso corporal, o 500 miligramos/kg/peso corporal, a 1000 miligramos/kg/peso corporal o más por administración, y cualquier rango derivable en los mismos. En ejemplos no limitativos de un rango derivable de los números listados en este documento, un rango de 5 miligramos/kg/peso corporal a 100 miligramos/kg/peso corporal, 5 microgramos/kg/peso corporal a 500 miligramos/kg/peso corporal, etc. se puede administrar, basándose en los números anteriormente descritos.

[0197] En cualquier caso, la composición puede comprender diferentes antioxidantes para retardar la oxidación de uno o más componentes. Adicionalmente, la prevención de la acción de microorganismos se puede causar mediante conservantes tales como varios agentes antibacterianos y antifúngicos, que incluyen, pero de forma no limitativa, parabenos (por ejemplo, metilparabenos, propilparabenos), clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal o combinaciones de los mismos.

[0198] Las moléculas se pueden formular en una composición en una base libre, forma de sal o neutra. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido, por ejemplo, aquellas formadas con los grupos amino libres de una composición proteínica, o que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídricos o fosfóricos, o tales ácidos orgánicos como ácido acético, oxálico, tartárico o mandélico. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también se pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o hierro; o tales bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina o procaina.

[0199] En formas de realización donde la composición está en una forma líquida, un portador puede ser un solvente o medio de dispersión que comprende, pero de forma no limitativa, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido, etc.), lípidos (por ejemplo, triglicéridos, aceites vegetales, liposomas) y combinaciones de los mismos. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina; mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido por dispersión en portadores tales como, por ejemplo, poliol líquido o lípidos; mediante el uso de tensioactivos tales como, por ejemplo, hidroxipropilcelulosa; o combinaciones de los mismos tales métodos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, tales como, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio o combinaciones de los mismos.

[0200] En otras formas de realización, uno puede usar gotas oculares, soluciones nasales o espráis, aerosoles o inhalantes en la presente invención. Tales composiciones se diseñan generalmente para ser compatibles con el tipo de tejido objetivo. En un ejemplo no limitativo, las soluciones nasales son soluciones acuosas normalmente diseñadas para ser administradas a los conductos nasales en gotas o espráis. Las soluciones nasales se preparan de modo que son similares en muchos aspectos a las secreciones nasales, de modo que se mantiene la acción ciliar. Así, en formas de realización preferidas, las soluciones nasales acuosas normalmente son isotónicas o ligeramente tamponadas para mantener un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5. Además, conservantes antimicrobianos, similares a aquellos usados en preparaciones oftálmicas, fármacos, o estabilizadores de fármacos apropiados, si es necesario, se pueden incluir en la formulación. Por ejemplo, se conocen varias preparaciones nasales comerciales e incluyen fármacos tales como antibióticos o antihistaminas. En algunas formas de realización, las moléculas se preparan para la administración mediante vías tales como la ingestión oral. En estas formas de realización, la composición sólida puede comprender, por ejemplo, soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas (por ejemplo, cápsulas de gelatina sin cáscara duras o blandas), formulaciones de liberación prolongada, composiciones bucales, pastillas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, o combinaciones de los mismos. Las composiciones orales se pueden incorporar directamente con el alimento de la dieta. Los soportes preferidos para la administración oral comprenden diluyentes inertes, portadores comestibles asimilables o combinaciones de los mismos. En otros aspectos de la invención, la composición oral se puede preparar como un jarabe o elixir. Un jarabe o elixir puede comprender, por ejemplo, al

menos un agente activo, un agente edulcorante, un conservante, un agente aromatizante, un tinte, un conservante, o combinaciones de los mismos.

5 [0201] En algunas formas de realización preferidas, una composición oral puede comprender uno o más ligantes, excipientes, agentes de desintegración, lubricantes, agentes aromatizantes, y combinaciones de los mismos. En algunas formas de realización, una composición puede comprender uno o más de los siguientes: un ligante, tal como, por ejemplo, goma tragacanto, acacia, almidón de maíz, gelatina o combinaciones de los mismos; un excipiente, tal como, por ejemplo, fosfato dicálcico, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, celulosa, carbonato de magnesio o combinaciones de los mismos; un agente de desintegración, tal como, 10 por ejemplo, almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico o combinaciones de los mismos; un lubricante, tal como, por ejemplo, estearato de magnesio; un agente edulcorante, tal como, por ejemplo, sacarosa, lactosa, sacarina o combinaciones de los mismos; un agente aromatizante, tal como, por ejemplo menta, aceite de gaulteria, aromatizante de cereza, aromatizante de naranja, etc. o combinaciones de los anteriores. Cuando la forma unitaria de dosificación es una cápsula, puede contener, además de materiales del tipo anterior, 15 portadores tales como un portador líquido. Varios otros materiales pueden estar presentes como recubrimientos o para modificar de otro modo la forma física de la unidad de dosificación. Por ejemplo, los comprimidos, píldoras, o cápsulas pueden recubrirse con goma laca, azúcar o ambos.

20 [0202] La composición debe ser estable bajo las condiciones de producción y almacenamiento, y conservada frente a la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Se apreciará que la contaminación de endotoxinas se debería mantener mínimamente en un nivel seguro, por ejemplo, menos de 0,5 ng/mg de proteína.

25 [0203] En formas de realización particulares, la absorción prolongada de una composición inyectable se puede causar mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, tales como, por ejemplo, monoestearato de aluminio, gelatina o combinaciones de los mismos.

30 [0204] Cualquier forma de realización mencionada anteriormente con respecto a la administración o transporte a las células también se puede emplear con respecto a la implementación de la administración de compuestos medicinales discutidos en esta sección.

Dosificaciones eficaces

35 [0205] Las moléculas de la invención se usarán generalmente en una cantidad eficaz para conseguir el fin previsto. Para el uso para tratar o prevenir una condición de enfermedad, las moléculas de la invención, o composiciones farmacéuticas de las mismas, se administran o aplican en una cantidad terapéuticamente eficaz. Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad eficaz para mejorar o prevenir los síntomas, o prolongar la supervivencia del paciente que se está tratando. La determinación de una cantidad terapéuticamente eficaz está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica, especialmente a la luz de la divulgación detallada proporcionada en este documento. 40

45 [0206] Para la administración sistémica, una dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de ensayos *ex vitro*. Por ejemplo, una dosis se puede formular en modelos animales para conseguir un rango de concentración circulante que incluye la EC50 como se determina en el cultivo celular. Tal información se puede utilizar para determinar con más precisión dosis útiles en seres humanos.

50 [0207] Las dosificaciones iniciales también se pueden estimar a partir de datos *in vivo*, por ejemplo, modelos animales, usando técnicas que se conocen en la técnica. Un experto en la técnica podría fácilmente optimizar la administración para humanos basándose en datos de animales.

55 [0208] La cantidad y el intervalo de dosificación se pueden ajustar individualmente para proporcionar niveles de plasma de las moléculas que sean suficientes para mantener el efecto terapéutico. Las dosificaciones habituales para pacientes para la administración por inyección varían de 0,01 a 0,1 mg/kg/día, o de 0,1 a 5 mg/kg/día, preferiblemente de 0,5 a 1 mg/kg/día o más. Niveles de suero terapéuticamente eficaces se pueden conseguir mediante la administración de múltiples dosis cada día.

[0209] La cantidad de moléculas administrada dependerá, por supuesto, del sujeto que se esté tratando, del peso del sujeto, la gravedad de la afección, la manera de administración y la decisión del médico prescriptor.

60 [0210] La terapia se puede repetir intermitentemente mientras los síntomas sean detectables o incluso cuando no sean detectables. La terapia se puede proporcionar sola o en combinación con otros fármacos o tratamientos (incluida cirugía).

Toxicidad

65

[0211] Preferiblemente, una dosis terapéuticamente eficaz de las moléculas descritas en este documento proporcionará beneficio terapéutico sin causar toxicidad sustancial. La toxicidad de las moléculas descritas en este documento se puede determinar por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos de células o animales experimentales, por ejemplo, determinando la dosis tolerada máxima (Ann.Pharm, Fr, 2010, 291-300). La proporción de dosis entre efecto terapéutico y tóxico es el índice terapéutico. Los datos obtenidos de estos ensayos de cultivos celulares y estudios animales se pueden usar en la formulación de un rango de dosificación que no es tóxico para el uso en un humano.

Grupos pendientes

[0212] Un "grupo pendiente" se puede unir o conjugar al ácido nucleico. Los grupos pendientes pueden aumentar la absorción celular del ácido nucleico. Los grupos pendientes se pueden enlazar en cualquier porción del ácido nucleico, pero se enlazan comúnmente al extremo (los extremos) de la cadena de oligonucleótidos. Ejemplos de grupos pendientes incluyen, pero de forma no limitativa: derivados de acridina (es decir 2-metoxi-6-cloro-9-ammoacridina); reticuladores tales como derivados de psoraleno, azidofenacilo, proflavina y azidoproflavina; endonucleasas artificiales; complejos metálicos tales como EDTA-Fe(II), o-fenantrolina-Cu(I), y porfirina-Fe(II); fracciones alquilantes; nucleasas tales como nucleasa amino-1- hexanolestafilococal y fosfatasa alcalina; transferasas terminales; abzimas; fracciones de colesterol; portadores lipofílicos; conjugados peptídicos; alcoholes de cadena larga; ésteres de fosfato; amino; grupos mercapto; marcadores radiactivos; marcadores no radiactivos tales como tintes; y polilisina u otras poliaminas. En un ejemplo, el ácido nucleico se conjuga a un carbohidrato, carbohidrato sulfatado, o glicano.

Equipos

[0213] Cualquiera de las composiciones descritas en este documento se puede comprender en un equipo. En un ejemplo no limitativo, miARN individuales se incluyen en un equipo. El equipo puede incluir además uno o más miARN sintéticos de control negativo que pueden utilizarse para controlar los efectos de la administración de miARN sintéticos. El equipo puede incluir además agua y tampón de hibridación para facilitar la hibridación de las dos cadenas de los miARN sintéticos. El equipo también puede incluir uno o más reactivo(s) de transfección para facilitar la administración del miARN a las células.

[0214] En otro ejemplo no limitativo, múltiples miARN sintéticos se incluyen en un equipo. El equipo puede incluir además uno o más miARN sintéticos de control negativo que pueden utilizarse para controlar los efectos de la administración de miARN sintéticos. El equipo también puede incluir uno o más reactivos de transfección para facilitar la administración en las células.

[0215] Los componentes de los equipos se pueden empaquetar o bien en medios acuosos o bien en forma liofilizada. Los medios contenedores de los equipos incluirán generalmente, por lo menos, un frasco, probeta, matraz, botella, jeringa u otros medios contenedores, en donde se pueda colocar un componente, y preferiblemente, dividido adecuadamente en partes alícuotas. Donde haya más de un componente en el equipo (el reactivo de etiquetado y el marcador se pueden empaquetar juntos), el equipo también contendrá generalmente un segundo, tercer u otro contenedor adicional en el que se pueden colocar separadamente los componentes adicionales. Sin embargo, varias combinaciones de componentes se pueden comprender en un frasco. Los equipos también incluirán típicamente un medio para contener los ácidos nucleicos, y cualquier otro contenedor reactivo en confinamiento estricto para la venta comercial. Tales contenedores pueden incluir contenedores plásticos moldeados por inyección o soplado en los que se retienen los frascos deseados.

[0216] Cuando los componentes del equipo se proporcionan en una y/o más soluciones líquidas, la solución líquida es una solución acuosa, donde se prefiere particularmente una solución acuosa estéril.

[0217] Sin embargo, los componentes del equipo se pueden proporcionar como polvo(s) seco(s). Cuando los reactivos y/o componentes se proporcionan como un polvo seco, el polvo se puede reconstituir mediante la adición de un solvente adecuado. Se prevé que el solvente también se pueda proporcionar en otro medio contenedor.

[0218] Los medios contenedores generalmente incluirán, por lo menos, un frasco, probeta, matraz, botella, jeringa y/u otros medios contenedores, en donde se colocan las formulaciones de ácido nucleico, preferiblemente, adecuadamente repartidas. Los equipos también pueden comprender un segundo contenedor para contener un tampón estéril farmacéuticamente aceptable y/u otro diluyente. Los equipos también incluirán típicamente un medio para contener los frascos en confinamiento estrecho para la venta comercial, tales como, por ejemplo, contenedores plásticos moldeados por inyección y/o soplado en los que se retienen los frascos deseados.

[0219] Tales equipos también pueden incluir componentes que conservan o mantienen el miARN o que lo protegen frente a su degradación. Tales componentes pueden ser sin RNAsa o proteger contra las RNAsas.

Tales equipos comprenderán generalmente, en medios adecuados, contenedores diferentes para cada reactivo o solución individual.

[0220] Un equipo también incluirá instrucciones para utilizar los componentes del equipo, así como el uso de cualquier otro reactivo no incluido en el equipo. Las instrucciones pueden incluir variaciones que se pueden implementar.

[0221] Los equipos también pueden incluir uno o más de los siguientes: miARN, biblioteca de miARN, biblioteca de combinación de miARN, miARN de control negativo, agua sin nucleasa; contenedores sin RNAsa, tales como tubos de 1,5 ml; tampón de hibridación; y reactivo(s) de transfección.

[0222] Se contempla que tales reactivos sean formas de realización de equipos. Tales equipos, sin embargo, no se limitan a los artículos particulares identificados anteriormente y pueden incluir cualquier reactivo usado para la manipulación o caracterización de miARN.

Identidad de secuencia

[0223] La "identidad de secuencia" se define en este documento como una relación entre dos o más secuencias de ácidos nucleicos (nucleótido, polinucleótido, ARN, ADN), determinada comparando las secuencias. En la técnica, "identidad" también significa el grado de relación de secuencia entre secuencias de ácidos nucleicos, según el caso, como se determina por la correspondencia entre cadenas de tales secuencias. La "identidad" y la "similitud" se pueden calcular fácilmente por métodos conocidos, que incluyen, pero de forma no limitativa, aquellos 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, Part I*, Griffin, A. M., y Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heine, G., Academic Press, 1987; y *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991; y Carillo, H., y Lipman, D., *SIAM J. Applied Math.*, 48:1073 (1988). En una forma de realización, la identidad se evalúa en una longitud entera de una SEQ ID N.º determinada.

[0224] Los métodos preferidos para determinar la identidad se diseñan para dar la correspondencia más grande entre las secuencias evaluadas. Los métodos para determinar la identidad y la similitud se codifican en programas informáticos disponibles públicamente. Los métodos de programas informáticos preferidos para determinar la identidad y la similitud entre dos secuencias incluyen, por ejemplo, el paquete del programa GCG (Devereux, J., *et al.*, *Nucleic Acids Research* 12 (1): 387 (1984)), BestFit, BLASTP, BLASTN, y FASTA (Altschul, S. F. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990)). El programa BLAST X está disponible públicamente de NCBI y otras fuentes (BLAST Manual, Altschul, S., *et al.*, NCBI NLM NIH Bethesda, MD 20894; Altschul, S., *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990)). El algoritmo bien conocido de Smith Waterman también se puede usar para determinar la identidad.

[0225] Los parámetros preferidos para la comparación de ácidos nucleicos incluyen los siguientes: algoritmo: Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443-453 (1970); matriz de comparación: correspondencias = +10; no correspondencias = 0; penalización de espacio: 50; penalización de longitud de espacio: 3. Disponible como el programa Gap de Genetics Computer Group, situado en Madison, Wis. Arriba se dan los parámetros por defecto para las comparaciones de ácidos nucleicos.

[0226] En este documento y en sus reivindicaciones, el verbo "comprender" y sus conjugaciones se usan en su sentido no limitativo para significar que los elementos después de la palabra se incluyen, pero que los elementos no mencionados específicamente no se excluyen. Además, el verbo "consistir" se puede sustituir por "consistir esencialmente en" y significa que un miARN, un equivalente, una imitación o una fuente del mismo o una composición tal y como se define en este documento puede comprender componente(s) adicional(es) a aquellos específicamente identificados, donde dicho(s) componente(s) adicional(es) no altera(n) la característica singular de la invención. Además, la referencia a un elemento mediante el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad que más de uno de los elementos estén presentes, a menos que el contexto requiera claramente que allí sea uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido "un" o "una", por lo tanto, significa normalmente "al menos uno/una". Los ejemplos siguientes se ofrecen solo para uso ilustrativo y no se destinan para limitar el alcance de la presente invención de ninguna manera.

Descripción de las figuras

[0227]

Figura 1. Identificación de cribado genético funcional de miARN con efecto letal específico del tumor potencial. (A) Representación de diferencias en la supervivencia para ciOKC (barras negras) y VU-SCC-120 (barras grises) observada en el cribado. Los experimentos se realizaron por duplicado. La confluencia de los cultivos se estimó por inspección visual. Los datos promediados se representan con

desviación estándar como barras de error. Solo se muestran seis ejemplos que tienen ningún efecto (miR-30e, miR-153), un efecto tóxico general (miR-519d, miR-510e), o un efecto letal específico del tumor (miR-326, miR-323) (B) El efecto de la expresión ectópica de los seis miARN que mostraron un efecto letal específico del tumor en queratinocitos orales primarios (barras negras) y líneas celulares de cáncer de cabeza y de cuello VU-SCC-120 (barras gris oscuro), VU-SCC-OE (barras gris claro) y UM-SCC-06 (barras blancas). La viabilidad celular se cuantificó mediante el ensayo CellTiter Blue. El valor medio de experimentos triplicados se representa con desviaciones estándar como barras de error. Estos seis miR son letales para tres líneas celulares tumorales escamosas de la cabeza y del cuello y no para queratinocitos de la mucosa primarios.

Figura 2. Efecto de los seis miARN en líneas celulares derivadas de otros tipos de cáncer. El efecto de los miARN en la proliferación de líneas celulares de (A) Siha, cáncer cervical (B) MCF7, cáncer de mama (C) HT29, cáncer de colon y (D) U87, glioblastoma. La viabilidad celular se cuantificó mediante el ensayo de CellTiter Blue. El valor medio de experimentos triplicados se representa con desviaciones estándar como barras de error. Estos seis miR son letales para algunas líneas celulares tumorales.

Figura 3. Expresión de miARN letales del tumor en tumores de HNSCC y epitelio de la mucosa normal. Los niveles de miARN se determinaron utilizando análisis qRT-PCR en el ARN de tumores y del epitelio de la mucosa microseccionados, fijados con formalina e introducidos en parafina (FFPE). Se muestran valores deltaCT, $Ct_{(miARN)} - Ct_{(RNU44)}$ para (A) miR-181a (B) miR-323 (C) miR-326 (D) miR-342 y (E) miR-345. Los datos muestran la regulación al alza o regulación a la baja relativa, corregidas para la introducción de ARN mediante la expresión de RNU44. El miR-371 no se expresó, ni en el epitelio de la mucosa ni en las células tumorales escamosas y, por lo tanto, no se representa.

Figura 4. Expresión ectópica de miARN específicos y su efecto en la expresión génica. Células VU-SCC-120 se transfectaron transitoriamente con los seis plásmidos de miARN diferentes y la expresión se comparó con las células transfectadas miR-Vec-Ctrl para (A) miR-345, miR-342 y miR-181a (B) miR-323, miR-326 y miR-371 (*p < 0,05, prueba t).

El mismo ARN se usó para analizar los perfiles de expresión de las células transfectadas usando análisis de expresión génica basada en micromatrices para identificar genes objetivo potenciales. Los perfiles cambiaron considerablemente por el microARN transfectado y revelaron correlaciones entre miARN diferentes (C) y dos grupos separados se volvieron aparentes vía análisis de agrupación (D). (*p < 0,05, prueba t). Estos datos sugieren que los microARN letales específicos del tumor dentro del grupo A o B pueden (en parte) dirigir los mismos genes.

Figura 5. La expresión de ATM se regula por miARN, miR-181a, miR-326 y miR-345 del grupo A. (A) La expresión de ATM endógena se muestra en células ciOKC o bien transfectadas transitoriamente con miR-Vec-Ctrl o los constructos de miARN indicados. Esto muestra que la ATM es uno de los objetivos posibles de los miR del grupo A, y un desplome de ATM puede inducir el mismo fenotipo letal. (B) Supervivencia celular después del desplome de ATM con cinco constructos de shRNA diferentes en comparación con un vector de control (ctrl) en ciOKC (barras negras) y VU-SCC-120 (barras grises). De hecho, el desplome de la expresión de ATM muestra un fenotipo letal específico del tumor similar (aunque no idéntico). (C) Como control, el desplome de la expresión de ATM endógena después de la transducción lentiviral de las células ciOKC con o bien un constructo de control (Ctrl) o constructos de ATM shRNA 1 a 5 se determinó mediante qRT-PCR. El promedio de experimentos triplicados se representa con desviaciones estándar como barras de error. (*p < 0,05, prueba t). En (D) se determina la sensibilidad de las líneas celulares de HNSCC y células VU-SCC-120 y ciOKC al fármaco de la ATM CP466722. (E) Efecto de los miARN del grupo A en el constructo indicador de luciferasa 3'UTR de la ATM. El 3'UTR de la ATM se clonó detrás de la luciferasa de luciérnaga. La actividad de luciferasa de luciérnaga se normalizó utilizando la actividad de luciferasa de renilla para corregir la eficiencia de la transfección. (F) Experimentos de recuperación con ATM que codifica constructos de expresión. La ATM de tipo salvaje (ATM) o ATM sin actividad quinasa (ATMkd) se transfectaron y el efecto en el fenotipo selectivo del tumor del miR-181a, miR-326, miR-345 o miR-Vec-Ctrl (miCtrl) en comparación con células no modificadas que tienen niveles endógenos de ATM, pero reguladas por estos miARN (ctrl). El promedio de experimentos triplicados se muestra con desviaciones estándar como barras de error. Las diferencias significativas se indican con un asterisco (p < 0,05, prueba t de Student).

Figura 6. Expresión de ATM después de la transfección transitoria de constructos de expresión con ATM y ATM sin actividad quinasa mutante que no tiene la 3'UTR de ATM.

Figura 7. Efecto fenotípico de la sobreexpresión de miR-181a en el tiempo, o cuando se introduce por transducción retroviral o transfección transitoria en la línea celular VU-SCC-120 de HNSCC.

Figura 8. Visión de conjunto del efecto de las imitaciones de miARN en la viabilidad celular en varias líneas celulares.

Figura 9. Efecto del miARN-3157 en la viabilidad celular de varias líneas celulares de HNSCC. El efecto del miARN-3157 en la proliferación de células VU-SCC-120, VU-SCC-059, y línea precursora M3 (A), UM-SCC-11B, UM-SCC-22A (B). La viabilidad celular se cuantificó mediante el ensayo CellTiter Blue. El ARNip contra quinasa 1 de tipo Polo (PLK1, una quinasa que controla la proliferación celular) se usó como control positivo. El miARN-3157 es letal para tres de cada cuatro líneas celulares tumorales, pero no letal en la línea precursora M3 y queratinocitos normales. La siPLK1 es activa en todas líneas celulares.

Ejemplos

[0228] Una biblioteca retroviral se ha preparado usando métodos conocidos en la técnica. Brevemente, secuencias genómicas de aproximadamente 500 pares de bases que contienen secuencias de microARN anotadas de mirbase se clonaron en miR-Vec, un vector retroviral que expresa secuencias clonadas. La funcionalidad de la biblioteca se evaluó como se describe en Voorhoeve *et al.*, 2006. Detalles sobre la construcción del vector y la preparación de la biblioteca se describen en Voorhoeve *et al.* 2006.

Ejemplo 1.

Materiales y métodos

Cultivo celular

[0229] Se aislaron y cultivaron queratinocitos orales normales tal y como se ha descrito anteriormente (van Zeeburg *et al.*, 2010). Queratinocitos orales inmortalizados condicionalmente (ciOKC) se cultivaron en medio libre de suero de queratinocitos (KSFM; Invitrogen, Breda, Países Bajos) suplementado con 0,1 % de albúmina de suero bovino, 25 mg de extracto de glándula pituitaria bovina, 2,5 µg de EGF recombinante humano, 250 µg de anfotericina B (MP biomedical, San Francisco, Estados Unidos de América) y 250 µg de gentamicina (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos) a 32 °C (Smeets *et al.*, 2011). Las líneas celulares tumorales VU-SCC-120, VU-SCC-OE, UM-SCC-6, MCF7, SiHa, U87, HT29 y células Phoenix se cultivaron en DMEM, 5 % de FCS, 2 mM de L-glutamina, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin a 37 °C y 5 % de CO₂. Las líneas celulares de HNSCC usadas fueron todas negativas para el papilomavirus humano y se secuenciaron para mutaciones TP53. La línea celular UM-SCC-6 era TP53 de tipo salvaje, VU-SCC-120 contenía dos mutaciones con cambio de sentido (c.181_182CG>TT y c.527G>A) y VU-SCC-OE una delección de truncamiento (c.11_919del).

Cribado de biblioteca de miARN humano

[0230] Tal y como se ha descrito anteriormente, sobrenadantes retrovirales anfitriónicos se produjeron para todos los 370 microARN anotados y putativos incluidos en la biblioteca de expresión de miARN humano (miR-Lib) con miR-Vec-Ctrl (secuencia revuelta) como control negativo (Voorhoeve *et al.*, 2006). Dado que los queratinocitos primarios no se pueden cultivar a una escala que permita tal cribado usamos un modelo de queratinocitos orales inmortalizados condicionalmente (ciOKC) como se ha descrito previamente (Smeets *et al.*, 2011). Estos se generaron por transformación de queratinocitos primarios con un antígeno T grande SV40 termosensible. Tanto los ciOKC como las células VU-SCC-120 (línea celular de HNSCC previamente descrita como 93VU120 (Hermsen *et al.*, 1996)) se transdujeron en los dos días siguientes durante cuatro horas en presencia de 3 µg/ml de polibreno (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos). Después de 48 horas, las células se sometieron a selección de blasticidina. Para los ciOKC esto fue dos días de 4 µg/ml y posteriormente 5 días de 8 µg/ml de blasticidina (Sigma-Aldrich). Para las VU-SCC-120 la selección se realizó con 10 µg/ml durante siete días. Para el cribado inicial, la supervivencia celular se evaluó por inspección visual cuando el miR-Vec-Ctrl (control negativo) hubo alcanzado el 100 % de confluencia, y se expresó como porcentaje estimado del control. Para los experimentos de validación posteriores, la viabilidad se cuantificó utilizando el ensayo de viabilidad celular CellTiter-Blue® (Promega, Leiden, Países Bajos). La conversión de resazurina a resorufina se midió utilizando el lector de placas Infinite 200 (Tecan Group Ltd, Männedorf, Suiza).

Aislamiento de ARN de tejidos introducidos en parafina fijados con formalina

[0231] Se derivó mucosa oral normal de tres especímenes introducidos en parafina fijados con formalina (FFPE) de pacientes que fueron sometidos a uvulopalatofaringoplastia. Además, se seleccionaron biopsias de tumores de FFPE de cinco pacientes de HNSCC. Las células del epitelio mucoso o tumorales se microseccionaron a partir de las muestras de úvula y de tumor respectivamente, tal y como se ha descrito anteriormente (Bremmer *et al.*, 2005). Los tejidos microseccionados se trataron con 1 mg/ml de proteinasa K durante 17 horas a 56 °C en tampón que contiene 100 mM de TRIS-HCL (pH 9,0), 10 mM de NaCl, 1 % de dodecilsulfato sódico y 5 mM de EDTA (pH 8,2). Se aisló ARN mediante extracción de fenol-cloroformo usando glicógeno como portador y se precipitó mediante acetato sódico y etanol según protocolos estándar. Después de que el ARN se lavara con 70 % de etanol, se disolvió en agua sin RNAsa.

Transducción de ATM de shRNA lentiviral

[0232] Los vectores lentivirales con secuencias de ARN de horquilla corta que dirigen la ATM se obtuvieron de la biblioteca de horquilla corta TRC (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos) que está disponible en el centro médico universitario VU. Cada secuencia de shRNA es complementaria a una parte única de la secuencia de ARNm de ATM.

5

5'-
CCGGCCTGCCAACATACTTTAAGTACTCGAGTACTTAAAGTATGTTGGCAG
GTTTTTG-3' (SEQ ID NO: 355)

5'-
CCGGGCACTGAAAGAGGATCGTAAACTCGAGTTTACGATCCTCTTTCAGTG
CTTTTTG-3' (SEQ ID NO: 356)

5'-
CCGGCGTGTCTTAATGAGACTACAACCTCGAGTTGTAGTCTCATTAAAGACAC
GTTTTTG-3' (SEQ ID NO: 357)

5'-
CCGGGCCATAATTCAGGGTAGTTTACTCGAGTAAACTACCCTGAATTATGG
CTTTTTG-3' (SEQ ID NO: 358)

5'-
CCGGGCCGTCAACTAGAACATGATACTCGAGTATCATGTTCTAGTTGACGG
CTTTTTG-3' (SEQ ID NO: 359)

[0233] Los sobrenadantes virales se produjeron por cotransfección de células HEK239T usando FuGENE® 6 (Roche diagnostics, Woerden, Países Bajos) con el vector de horquilla corta pLKO.1 junto con los vectores de embalaje y envoltorio. Tanto ciOKC como VU-SCC-120 (línea celular de HNSCC) se transdujeron con lentivirus en los dos días siguientes durante cuatro horas en presencia de 3 µg/ml de polibreno (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos). En total 48 horas después de la transducción, las células se sometieron a selección de puomicina. Para los ciOKC esto fue dos días de 5 µg/ml y posteriormente 5 días de 10 µg/ml de puomicina (Sigma-Aldrich). Para las VU-SCC-120 la selección se realizó con 1 µg/ml durante siete días.

10

15

Transcripción-PCR inversa cuantitativa

[0234] El ARN total se aisló utilizando el equipo de aislamiento de miARN *miVana*[™] (Ambion, Nieuwerkerk aan den IJssel, Países Bajos) según las instrucciones del fabricante con como única modificación que las columnas se eluyeron mediante tampón de elución de 2x 25 µl. La expresión de *hsa-miR-181a*, *hsa-miR-323*, *hsa-miR-326*, *hsa-miR-342*, *hsa-miR-345* y *hsa-miR-371* se analizó mediante ensayos de micro-ARN Taqman® siguiendo las instrucciones del fabricante (Applied biosystems, Nieuwerkerk aan den IJssel, Países Bajos). La expresión de ATM se analizó mediante ensayo de expresión génica Taqman®. La expresión relativa se calculó vía el método comparativo C_T utilizando la transcripción de ARN nucleolar pequeña RNU44 (para la expresión de microARN) o glucuronidasa beta, BGUS (para la expresión de ATM) como referencia interna (Schmittgen y Livak, 2008). Las reacciones RT-PCR cuantitativas sin transcriptasa inversa se efectuaron en paralelo para cada muestra de ARN para excluir la señal mediante ADN contaminante.

20

25

Los cebadores usados eran de Applied Biosystems

30

[0235]

35

miR-181a	assayID000480
miR-323	assayID000538
miR-326	assayID000542
miR-342	assayID002147
miR-345	assayID002186

miR-371 assayID000559
ATM Hs01112326_m1

Establecimiento del perfil de expresión génica

5
[0236] Los clones retrovirales con los miARN miR-181a, miR-323, miR-326, miR-342, miR-345 y miR-371 y el control negativo miR-Vec-Ctrl se transfectaron transitoriamente en VU-SCC-120 mediante FuGENE® 6 (Roche diagnostics, Woerden, Países Bajos). El ARN total se aisló 72 horas después de la transfección utilizando el equipo de aislamiento de miARN mirVana™ (Ambion). La hibridación de micromatrices utilizando los equipos
10 Agilent Low Input Quick Amplification labeling Kit y 4x44K Whole Human Genome Arrays se efectuó según el fabricante (Agilent Technologies, Amstelveen, Países Bajos). Los datos se analizaron mediante Limma en el paquete R utilizando el miR-Vec-Ctrl como referencia. La normalización de los datos de expresión génica se hizo en el software estadístico R, utilizando el paquete Limma y consistió en corrección de base de RMA, normalización en la matriz de loess y normalización entre la matriz de A-cuantiles. Luego, los valores faltantes se
15 imputaron utilizando el paquete de imputación (impute.knn con ajustes predeterminados). Finalmente, los efectos de deslizamiento y de tinte se quitaron mediante regresión lineal en modo genético utilizando los valores de intensidad del registro.

[0237] Los cambios de pliegues del registro entre el grupo de referencia y cada grupo tratado se usaron para agrupar los seis tratamientos. Esto se hizo mediante agrupación jerárquica con conexión de protección y la similitud se definió como la distancia euclidiana y como uno menos el valor absoluto de la medida de correlación de Spearman. El agrupamiento de la agrupación jerárquica se verificó mediante gráficos del componente principal. Dentro de cada agrupación la diferencia en la expresión génica entre referencia y muestras tratadas se evaluó mediante una prueba t. El problema de la multiplicidad (se evaluaron muchos genes) se afrontó mediante
20 la aplicación del procedimiento Benjamini-Hochberg a los valores p brutos para controlar la FDR (tasa de falso descubrimiento).

Tratamiento de inhibidor de ATM

[0238] Tanto las células ciOKC como las VU-SCC-120 se sometieron a un rango de concentración de 40 - 0,075 µM de inhibidor de ATM CP466722 (Axon Medchem, Groninga, Países Bajos). Después de 72 horas, la viabilidad celular se evaluó con el ensayo de viabilidad celular CellTiter-Blue®.

Ensayo de luciferasa indicadora 3'UTR de ATM

[0239] Las células ciOKC se cotransfectaron transitoriamente con un constructo indicador de luciferasa que contiene la secuencia 3'UTR de *ATM* (GeneCopoeia Inc, Rockville, MD, Estados Unidos de América) y uno de los vectores retrovirales que contienen los genes miR-181a, miR-323, miR-326 o el control negativo miR-Vec-Ctrl mediante FuGENE® 6. En total 72 horas después de la transfección, la actividad de luciferasa de luciérnaga y de renilla se midió utilizando el LucPair™ miR Dual Luciferase Assay Kit según las instrucciones del fabricante (GeneCopoeia). La actividad de luciferasa se midió utilizando el lector de placas Infinite 200 (Tecan Group Ltd, Männedorf, Suiza).

Experimento de recuperación de fenotipo letal

[0240] Las células VU-SCC-120 se transfectaron transitoriamente con o bien pcDNA3.1(+)*Flag-His-ATMwt* (secuencia de ADNc de ATM de tipo salvaje, plásmido 31985 de Addgene) o pcDNA3.1(+)*Flag-His-ATMkd* (secuencia de ADNc de *ATM* sin actividad quinasa, plásmido 31986 de Addgene) (23). Los sobrenadantes retrovirales anfitriónicos se produjeron para los miARN miR-181a, miR-326, miR-345 y miR-Vec-Ctrl (secuencia revuelta) como control negativo. Las células VU-SCC-120-ATMwt y VU-SCC-120-ATMkd se transdujeron con los retrovirus de expresión de microARN en los dos días siguientes durante cuatro horas en presencia de 3 µg/ml de polibreno. Después de 72 horas, la viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de viabilidad celular de CellTiter-Blue® (Promega).

Transfección de imitación sintética

[0241] Las células se colocaron en placas y se transfectaron con imitaciones de microARN de miRIDIAN miR-181a, miR-181a*, miR-181a-2, miR-323-5p, miR-323-3p, miR-326-5p, miR-345-5p, miR-342-3p, miR-342-5p, miR-371-3p, miR-371-5p y control#1 negativo de imitación sin dirección (Dharmacon, Thermo Fisher Scientific, Lafayette, CO) en placas de 96 pocillos de fondo plano (Greiner Bio-One B.V., Alphen a/d Rijn, Países Bajos). La imitación de microARN para miR-3157 se obtuvo de Ambion. El siCONTROL#1 sin dirección, y el ARNip PLK1 SMARTpool (Dharmacon) se usaron como controles negativo y positivo, respectivamente. Las células se transfectaron con 30 nmol de imitación/ARNip y cantidades dependientes de la línea celular de DharmaFECT1 (Dharmacon) (Tabla 6). La viabilidad celular se determinó, 96 horas después de la transfección, añadiendo reactivo CellTiter-Blue (Promega, Leiden, Países Bajos). Después de dos horas de incubación a 37 °C, se

analizó la fluorescencia a 540 nm de excitación y 590 nm de longitud de onda de emisión utilizando un lector de microplacas Infinite F200 (Tecan, Giessen, Países Bajos).

Tabla 6. Condiciones de transfección usadas para las diversas líneas celulares

Línea celular	Células/pocillo	ARNip o imitación/pocillo (nM)	DharmaFECT1/pocillo (µl)
ciOKC10	3000	30	0,12
VU-SCC-120	1000	30	0,03
UM-SCC-22A	4000	30	0,15
VU-SCC-059	1000	30	0,05
UM-SCC-11B	2000	30	0,065
UM-SCC-22B	4000	30	0,15
M3	2000	30	0,08

5

Resultados

Identificación de miARN letales para HNSCC

[0242] Para identificar miARN que son letales para células de cáncer de cabeza y de cuello, realizamos un cribado genético funcional utilizando la biblioteca de expresión de miARN humano (miR-Lib). Como un control seminormal usamos queratinocitos orales primarios condicionalmente transformados mediante un antígeno T grande termosensible SV40 (ciOKC). La biblioteca consistió en 370 miARN anotados y putativos insertados en un vector retroviral, y se introdujo en ciOKC y en la línea celular de HNSCC VU-SCC-120 en placas de 24 pocillos. Todos los microARN se cribaron separadamente. La mayoría de los miARN no influyeron en la supervivencia de o bien las células tumorales o bien las células ciOKC, o el efecto letal en ambos modelos fue similar. Sin embargo, un subconjunto de 6 microARN (1,6 %) afectó específicamente a la línea celular del cáncer de cabeza y de cuello, mientras que las ciOKC permanecieron sin verse afectadas (Tabla 1, figura 1A y figura 1B).

[0243] Para verificar estos impactos, cribamos todos los 6 miARN identificados en el cribado inicial en tres líneas celulares de HNSCC, que son VU-SCC-120, VU-SCC-OE y UM-SCC-6, y cuantificamos los números de células (figura 1B). Para los cribados iniciales a gran escala, tuvimos que confiar en el modelo celular de ciOKC inmortalizados condicionalmente para estudiar el efecto de los miARN. En los experimentos de validación a pequeña escala posteriores también incluimos queratinocitos orales primarios (figura 1B). Los miARN miR-323, miR-345, miR-371, miR-181a, miR-342, y miR-326 mostraron todos una reducción significativa en la supervivencia celular específicamente en células de HNSCC, y no en queratinocitos primarios (figura 1B). La identidad de secuencia de todos los miARN se confirmó utilizando análisis de secuencia (datos no mostrados).

[0244] Entonces cuestionamos si el efecto observado en las líneas celulares del HNSCC era solo específico para el HNSCC. Así que evaluamos los seis miARN con efectos letales específicos del tumor en otras líneas celulares cancerosas. La introducción de estos miARN en la línea celular del carcinoma cervical (SiHa) y línea celular del carcinoma de mama (MCF7) no tuvieron ningún efecto letal salvo el miARN 181a (figura 2A y 2B). Cuando los miARN se introdujeron en la línea celular del adenocarcinoma de colon (HT29) o la línea celular del glioblastoma (U87), se observó una reducción en la supervivencia celular, aunque con un fenotipo menos severo en comparación con las líneas celulares del HNSCC evaluadas (figura 2C y 2D). Los efectos observados dependían del microARN específico. Esto sugiere fuertemente interacciones letales en relación con el estado mutacional de genes de cáncer específicos o vías de señalización desreguladas en las diversas líneas celulares.

Expresión de miARN en HNSCC

[0245] Ya que la expresión ectópica de estos seis miARN letales del tumor tenía un efecto letal en las líneas celulares del tumor, pero ningún o menor efecto en los queratinocitos de la mucosa, nos interesamos en la expresión de estos miARN en los tumores de HNSCC y en la mucosa oral normal. Por tanto, determinamos los niveles de expresión para los seis miARN en el ARN extraído de muestras tanto de tumor como de mucosa oral microseccionadas. No se observó ninguna expresión para miR-371, ni en la mucosa normal ni en los cinco tumores analizados (datos no mostrados). Para los otros cinco miARN, se observó expresión en todas las muestras del tumor y de la mucosa (figura 3). Los niveles de expresión fueron en cualquier caso inferiores a aquellos del gen de referencia RNU44. Además, se observaron solo diferencias mínimas en niveles de expresión entre las muestras de la mucosa y del tumor. La expresión de miR-181a se aumentó ligeramente en tumores, pero no de forma significativa (figura 3A). Para miR-326 (figura 3C), miR-342 (figura 3D) y 345 (figura 3E) el nivel de expresión en el tejido tumoral se disminuyó en comparación con el epitelio de la mucosa normal, pero no de forma significativa. Solo el nivel de expresión de miR-323 (figura 3B) fue significativamente inferior en las células tumorales.

55

Fenotipo letal específico del tumor en líneas celulares de diferentes tipos de cáncer

[0246] Después cuestionamos si el efecto observado en las líneas celulares de HNSCC era específico para el HNSCC. Por lo tanto, evaluamos los seis miARN con efectos letales específicos del HNSCC en otras líneas celulares cancerosas. La introducción de los diversos miARN en la línea celular del carcinoma cervical (SiHa) y línea celular del carcinoma de mama (MCF7) no tuvo ningún efecto en la proliferación salvo para el miARN 181a (figura 6A y 6B). Sin embargo, cuando los miARN se introdujeron en la línea celular del adenocarcinoma de colon (HT29) o la línea celular del glioblastoma (U87) se observó una reducción en la proliferación celular, aunque con un fenotipo menos severo en comparación con las líneas celulares del HNSCC evaluadas (figura 6C y 6D). Los efectos observados varían con el microARN específico. Esto sugiere fuertemente interacciones letales sintéticas en relación con el estado mutacional de genes de cáncer específicos o vías de señalización desreguladas en las diversas líneas celulares de origen de tejido diferente. La interacción letal posiblemente no está relacionada con una mutación en *TP53*, ya que todos los miARN mostraron el efecto letal selectivo del tumor en todas las tres líneas celulares de HNSCC, mientras que una línea celular fue *TP53* de tipo salvaje, una mostró dos mutaciones de cambio de sentido y una mostró una gran delección (véase M&M arriba).

15 Análisis de expresión de gen objetivo

[0247] Los miARN regulan la expresión génica en el nivel postranscripcional, así que nos interesamos en los objetivos genéticos aguas abajo de estos seis miARN que son letales para las células del HNSCC, pero no para los queratinocitos normales. Por lo tanto, realizamos un análisis de expresión génica basado en micromatrices para identificar estos genes objetivo candidatos. Dado que la expresión ectópica de estos miARN provocó una reducción en la proliferación celular y muerte celular en líneas celulares del HNSCC, no fuimos capaces de analizar células transducidas de forma estable con el miARN en los vectores retrovirales. Por lo tanto, decidimos transfectar transitoriamente las células con plásmidos de vector retrovirales en vez de transducción con partículas retrovirales. La transfección transitoria es normalmente eficaz, y la expresión se puede observar casi inmediatamente. Así, las células VU-SCC-120 se transfectaron transitoriamente, se recolectaron y el ARN se aisló 72 horas después de la transfección, se observó el punto temporal con alta expresión de miARN, pero antes de la muerte celular (figura 7). La sobreexpresión de todos los miARN después de la transfección se comparó con células transfectadas miR-Vec-Ctrl. Dependiendo de la expresión endógena de los microARN, la sobreexpresión osciló de 23 - 4.000 veces (figura 4A y 4B).

[0248] A continuación, el ARN se marcó e hibridó para establecer el perfil de expresión génica. Supusimos que es muy probable que alguno de estos seis miARN dirigen los mismos genes y, por lo tanto, nos centramos en una comparación en modo grupal. En los perfiles de expresión observamos de hecho correlaciones significativas entre algunos miARN (figura 4C). Correlaciones altamente significativas se vieron para hsa-miR-181a y miR-326 ($r=0,572$), hsa-miR-326 y hsa-miR-345 ($r=0,573$), hsa-miR-323 y hsa-miR-371 ($r=0,602$) y hsa-miR-342 y hsa-miR-323 ($r=0,577$). El análisis de la agrupación reveló dos grupos de cada tres miARN con efectos de objetivo aguas abajo que mostraron correlaciones significativas (figura 4D). Los miARN miR-181a, miR-326 y miR-345 se agruparon juntos en el grupo A y el grupo B estuvo compuesto por miR-342, miR-371 y miR-323. Los perfiles de estos tres microARN se agruparon y analizaron frente al vector de control vacío (hibridado en cuatuplicado en las matrices) para detectar genes expresados diferencialmente significativos. En total observamos 187 (valor p corregido FDR < 0,1) genes expresados significativamente en el grupo A y 15 en el grupo B. Posteriormente, aplicamos diferentes clasificaciones en los genes expresados diferencialmente en el grupo A para distinguir efectos primarios de efectos secundarios. Primero, clasificamos los genes para un efecto negativo (regulación a la baja) ya que los microARN se consideran que regulan al alza la expresión de sus genes objetivo. Segundo, dado que muchas sondas múltiples de genes estaban presentes en la matriz, clasificamos posteriormente los genes por el número de sondas por gen detectadas con un valor p corregido FDR < 0,1 (no mostrado). Uno de los genes objetivo más impactantes aparentemente regulado por los miARN del grupo A es el gen de la *ataxia telangiectasia mutada (ATM)*. Primero, las diferencias son altamente significativas dado el limitado tamaño de la muestra (cuatro controles frente a tres miARN del grupo A analizados por duplicado) y el fuerte ajuste del valor p. Segundo, en total 9/12 sondas de ATM se regularon significativamente. No encontramos un tal objetivo principal aparente para el microARN en el grupo B. La regulación a la baja de la ATM resulta en una letalidad específica del tumor

[0249] La ATM es una quinasa de proteína nuclear que se activa tras el daño al ADN (Smith *et al.*, 2010). Para validar la reducción observada en la expresión realizamos qRT-PCR para ATM en las mismas muestras que se transfectaron transitoriamente con los miARN y que se analizaron mediante hibridación de micromatrices. De hecho, encontramos que la expresión ectópica de todos los miARN del grupo A inhibió significativamente la expresión de ATM en ~50 % (figura 5A).

[0250] Dado que la expresión ectópica de miR-181a, miR-326 y miR-345 produce muerte celular específica del tumor y regulación a la baja de la expresión de ATM, nos interesamos en ver si la regulación a la baja de la ATM viene acompañada de la muerte celular específica del tumor en las células del HNSCC. Por lo tanto, introducimos cinco constructos de shRNA lentivirales diseñados para desplomar específicamente la expresión de ATM. Cada secuencia de shRNA era complementaria a una parte única de la secuencia de ARNm de la ATM. La introducción de los shRNA de la ATM resultó en alguna muerte celular en ciOKC en comparación con las células

transducidas con un constructo de control (ctrl), pero se observó significativamente más muerte celular en la línea celular VU-SCC-120 del HNSCC, que varía del 21-90 % (figura 5B).

[0251] La ventana terapéutica máxima se observó con shRNA de ATM1. Fue al menos 8 veces más tóxica en la línea celular tumoral en comparación con las células ciOKC. Para controlar el desplome de los diversos constructos de shRNA aislamos ARN a partir de las células ciOKC transducidas con o bien el constructo de control o bien los cinco constructos diferentes de shRNA de ATM. La expresión de ATM se analizó mediante qRT-PCR y los niveles de expresión se compararon con las células transducidas con el constructo de control. La introducción de cuatro de los cinco shRNA de ATM resultó en más del 70 % de regulación a la baja de los niveles de expresión de ATM. Solo en las células transducidas con el shRNA de ATM número 5 no se observó ninguna regulación a la baja significativa de ATM (figura 5C).

[0252] La ATM es una quinasa y se puede tratar con fármacos mediante inhibidores de quinasa. Para confirmar la reducción específica del tumor en la viabilidad celular mediante la inhibición de ATM, también sometimos células ciOKC y HNSCC a concentraciones diferentes del inhibidor de ATM específico disponible comercialmente CP466722. El análisis de la viabilidad celular muestra que las células HNSCC son más sensibles al inhibidor en comparación con las células ciOKC (figura 5D). El IC₅₀ de 8,2 μM en células ciOKC cambia a 2,6 μM en VU-SCC-120, un cambio significativo de 3 veces (valor $p < 0,05$ mediante prueba t).

[0253] Se conoce que los miARN regulan la expresión génica postranscripcionalmente vía la unión a la 3'UTR de una secuencia de ARNm. Para demostrar un efecto de miR-181a, miR-326 y miR-345 en la 3'UTR del gen de ATM, se cotransfectaron miARN con un constructo indicador de luciferasa clonado a la secuencia 3'UTR de ATM. La transfección de ciOKC con miR-181a y miR-326 suprimió la actividad de un gen reportero de luciferasa clonado a la 3'UTR de ATM. El miR-345 mostró un efecto, pero no fue significativo (figura 5E).

[0254] La inhibición de ATM, bien por sobreexpresión de microARN, shRNA de ATM específicos o inhibidores de quinasa produce una reducción en la proliferación celular en las células del HNSCC. Cuando la ATM es el efector directo, la expresión ectópica de ATM debería salvar las células del HNSCC de la muerte celular. Para investigar esto, células VU-SCC-120 se transfectaron con o bien ATM de tipo salvaje (ATMwt) o bien ATM mutante sin actividad quinasa (ATMkd) en un casete de expresión que carece de la 3'UTR de ATM. La sobreexpresión de ATMwt o ATMkd se confirmó mediante qRT-PCR (figura 8). A continuación, los miARN miR-181a, miR-326 y miR-345 se introdujeron en estas dos líneas celulares y se compararon con VU-SCC-120 sin transducir (ctrl). Los miARN mostraron todos una reducción en la proliferación celular en el VU-SCC-120 sin transducir (figura 5F). Sin embargo, en las células con el constructo de expresión de ATMwt, la proliferación celular se salvó hasta ~80 % (miR-181a) y ~50 % (miR-326 y miR-345). El salvamento no se observó cuando la ATM mutante sin actividad quinasa se expresó de forma ectópica en las células VU-SCC-120. Estos datos indican que los miARN inhiben la expresión de ATM, lo que suscita el fenotipo letal selectivo del tumor y depende de la actividad de quinasa de la ATM.

Transfección de imitación sintética

[0255] Los resultados de las transfecciones de imitaciones se resumen en la figura 8. Los colores gris oscuro, blanco, y gris claro indican que la imitación causa como máximo el 30 %, entre el 30 % y máximo el 60 %, y más del 60 % de reducción en la viabilidad celular, respectivamente.

[0256] Basándose en la figura 8, se indica que algunas líneas celulares como UM-SCC-22A y la línea celular precursora M3 responden menos a las imitaciones. Mientras que otras como VU-SCC-120 y VU-SCC-059 y VU-SCC-22B responden a algunas imitaciones. Desde la perspectiva de las imitaciones, hay algunas imitaciones que tienen de poco a ningún efecto en todas las líneas celulares. Sin embargo, la imitación 342-5p y 323-5p causan una reducción en todas las líneas celulares tumorales y en menor medida en la línea precursora M3.

Transfección sistémica de células de HNSCC con imitación de miARN-3157

Cultivo celular y proliferación:

[0257] Los queratinocitos orales normales se aislaron y cultivaron tal y como se ha descrito anteriormente (van Zeeburg *et al.*, 2010). Los queratinocitos orales inmortalizados condicionalmente (ciOKC) se cultivaron en medio libre de suero de queratinocitos (KFSM; Invitrogen, Breda, Países Bajos) suplementado con 0,1 % de albúmina de suero bovino, 25 mg de extracto de glándula pituitaria bovina, 2,5 μg de EGF recombinante humano, 250 μg de anfotericina B (MP biomedical, San Francisco, Estados Unidos de América) y 250 μg de gentamicina (Sigma-Aldrich, Zwijndrecht, Países Bajos) a 32 °C (Smeets *et al.*, 2011). Las líneas celulares tumorales se cultivaron en DMEM, 5 % de FCS, 2mM de L-glutamina, 50 U/ml de penicilina y 50 μg/ml de estreptomina a 37 °C y 5 % de CO₂.

[0258] La proliferación celular se ha evaluado 96 horas después de la transfección de ácidos nucleicos usando Dharmafect y la lectura basada en el tinte fluorescente de Alamar Blue (resazurina) para la evaluación de la citotoxicidad de la célula de mamífero.

5 [0259] Mediante otro cribado de miARN (Poell *et al.* 2012) se descubrió un miARN que era letal para las células del melanoma o del cáncer colorrectal. Este miARN, miR-3157, se ha indicado como un inhibidor selectivo de la vía de BRAF activada en tales células cancerosas. En el cáncer de cabeza y de cuello, la vía de BRAF se indica como una vía no activada debido a la ausencia de mutaciones de BRAF. Para investigar si este miARN es letal también para otros tipos de tumores, el miARN-3157 se evaluó como imitación en varias células del HNSCC. La
10 Figura 9 muestra sorprendentemente que el miARN-3157 (30nM) inhibe la viabilidad celular de las células del HNSCC VU-SCC-120, VU-SCC-059 y UM-SCC-11B, pero no UM-SCC-22A y la línea precursora M3. Similar a los otros miARN letales, el miARN-3157 no inhibe la viabilidad celular de los queratinocitos normales, lo que indica que la inducción de la muerte celular es específica de las células cancerosas del HNSCC. La comparación de la actividad del miARN-3157 con la del control positivo siPLK1 (quinasa 1 de tipo Polo, una quinasa que controla la proliferación celular) también muestra que el miARN-3157 es letal selectivamente para las células
15 tumorales del HNSCC.

[0260] Tomados en conjunto, nuestros datos muestran que la sobreexpresión de miARN tales como miR-323, miR-345, miR-371, miR-181a, miR-342, miR-326, y miR-3157 puede servir como un tratamiento nuevo en el
20 HNSCC. Especialmente en el cáncer de cabeza y de cuello donde el acceso al tumor es relativamente fácil, la introducción de miARN vía, por ejemplo, inyección intratumoral combinada con electroporación, puede ser una posibilidad terapéutica en el futuro (Takei *et al.*, 2008). También la aplicación de fármacos dirigidos a ATM puede ser un enfoque muy interesante para pruebas específicamente centradas en el HNSCC.

25 Listado de referencias

[0261]

Bremmer, J. F., Braakhuis, B. J. M., Ruijter-Schippers, H. J., Brink, A., Duarte, H. M. B., Kuik, D. J., Bloemena, E., Leemans, C. R., van der Waal, I. C., y Brakenhoff, R. H. (2005). A noninvasive genetic screening test to detect
30 oral preneoplastic lesions. *Laboratory Investigation* 85, 1481-1488.
Canman CE, Lim DS, Cimprich KA, Taya Y, Tamai K, Sakaguchi K, *et al.* Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. *Science* 1998; 281:1677-9.
Cervigne, N. K., Reis, P. P., Machado, J., Sadikovic, B., Bradley, G., Galloni, N. N., Pintilie, M., Jurisica, I., Perez-Ordóñez, B., Gilbert, R., Gullane, P., Irish, J., y Kamel-Reid, S. (2009). Identification of a microRNA signature
35 associated with progression of leukoplakia to oral carcinoma. *Hum. Mol Genet* 18, 4818-4829.
Hermesen, M. A., Joenje, H., Arwert, F., Welters, M. J., Braakhuis, B. J., Bagnay, M., Westerveld, A., y Slater, R. (1996). Centromeric breakage as a major cause of cytogenetic abnormalities in oral squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 15, 1-9.
Kearsley J. H., *et al*, *Br J Cancer*. 1990 jun; 61(6):821-7.
40 Kefas, B. (2010). Pyruvate kinase M2 is a target of the tumor-suppressive microRNA-326 and regulates the survival of glioma cells. *Kumar B, et al, J Clin Oncol*. 2008 jul 1;26(19):3128-37.
Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH. Molecular biology of head and neckcancer. *Nature Rev Cancer*, 11: 9-21, 2011.
Sand, M., Skrygan, M., Georgas, D., Arenz, C., Gambichler, T., Sand, D., Altmeyer, P. y Bechara, F. G. (2011),
45 Expression levels of the microRNA maturing microprocessor complex component DGCR8 and the RNA-induced silencing complex (RISC) components Argonaute-1, Argonaute-2, PACT, TARBP1, and TARBP2 in epithelial skin cancer. *Molecular Carcinogenesis*. doi: 10.1002/mc.20861
Poell JB, van Haastert RJ, de Gunst T, Schultz IJ, Gommans WM, Verheul M, Cerisoli F, van Noort PI, Prevost GP, Schaapveld RQ, Cuppen E. (2012) A functional screen identifies specific microRNAs capable of inhibiting
50 human melanoma cell viability. *PLoS One*. 7(8):e43569, 2012
Methods in molecular immunology, volumen 2, volumen 281, página 171 año 2004, Humana Press, editado por Axel H. Schonthal.
Oliveira S., *et al* *J Biomed Biotechnol*. 2006, (4):63675.
Schmittgen, T. D. y Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat. Protoc.* 3, 1101-1108.
55 Shin, K. H., Bae, S. D., Hong, H. S., Kim, R. H., Kang, M. K., y Park, N. H. (2011). miR-181a shows tumor suppressive effect against oral squamous cell carcinoma cells by downregulating K-ras. *Biochem. Biophys. Res Commun*. 404, 896-902.
Smeets, S. J., van der, P. M., Schaaij-Visser, T. B., van Veen, E. A., van Meerloo, J., Braakhuis, B. J., Steenberg, R. D., y Brakenhoff, R. H. (2011). Immortalization of oral keratinocytes by functional inactivation of the p53 and pRb pathways. *Int J Cancer* 128, 1596-1605.
Smith, J., Tho, L. M., Xu, N., y Gillespie, D. A. (2010). The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in ADN damage signaling and cancer. *Adv. Cancer Res* 108, 73-112.
60 Takei, Y., Nemoto, T., Mu, P., Fujishima, T., Ishimoto, T., Hayakawa, Y., Yuzawa, Y., Matsuo, S., Muramatsu, T., y Kadomatsu, K. (2008). In vivo silencing of a molecular target by short interfering RNA electroporation: tumor vascularization correlates to delivery efficiency. *Molecular Cancer Therapeutics* 7, 211-221.

van Zeeburg, H. J., van Beusechem, V. W., Huizenga, A., Haisma, H. J., Korokhov, N., Gibbs, S., Leemans, C. R., y Brakenhoff, R. H. (2010). Adenovirus retargeting to surface expressed antigens on oral mucosa. *J Gene Med* 12, 365-376.

5 Voorhoeve, P. M., le Sage, C., Schrier, M., Gillis, A. J. M., Stoop, H., Nagel, R., Liu, Y .P., van Duijse, J., Drost, J., Griekspoor, A., Zlotorynski, E., Yabuta, N., De Vita, G., Nojima, H., Looijenga, L. H. J., y Agami, R. (2006). A Genetic Screen Implicates miRNA-372 and miRNA-373 As Oncogenes in Testicular Germ Cell Tumors. *Cell* 124, 1169-1181.

Wahl R. L. *et al*, *J Nucl Med*. 2009 mayo; 50 Supl. 1:122S-50S.

Tabla 1. Lista de 6 miARN con efecto letal específico del tumor en el cribado inicial.

MicroARN

hsa-mir-181a
 hsa-mir-323
 hsa-mir-326
 hsa-mir-342
 hsa-mir-345
 hsa-mir-371

10

Tabla 2. Secuencias precursoras de miARN identificados en el cribado o a los que se hace referencia en la solicitud

Lista de secuencias precursoras de miARN (dirección 5' a 3'). Todas las secuencias se obtuvieron de miRBase (versión 16: sept. 2010; www.mirbase.org).

SEQ ID N.º	miARN	Secuencia precursora
1	hsa-mir-181a-1	UGAGUUUUGAGGUUGCUUCAGUGAACAUUCAACGCUGUCGGU GAGUUUGGAAUUAAAUCAAAACCAUCGACCGUUGAUUGUACC CUAUGGCUAACCAUCAUCUACUCCA
2	hsa-mir-181a-2	AGAAGGGCUAUCAGGCCAGCCUUCAGAGGACUCCAAGGAACAU UCAACGCUGUCGGUGAGUUUGGGAUUUGAAAAACCACUGACC GUUGACUGUACCUUGGGGUCCUUA
3	hsa-mir-323	UUGGUACUUGGAGAGAGGUGGUCCGUGGCGCGUUCGCUUUUAU UUAUGGCGCACAUUACACGGUCGACCUCUUUGCAGUAUCUAAU C
4	hsa-mir-326	CUCAUCUGUCUGUUGGGCUGGAGGCAGGGCCUUUGUGAAGGC GGGUGGUGCUCAGAUCCUCUGGGCCUUCUCCAGCCCCGA GGCGGAUUCA
5	hsa-mir-342	GAAACUGGGCUAAGGUGAGGGGUGCUAUCUGUGAUUGAGGG ACAUGGUUAAUGGAAUUGUCUCACACAGAAAUCGCACCCGUCA CCUUGGCCUACUUA
6	hsa-mir-345	ACCCAAACCUAGGUCUGCUGACUCCUAGUCCAGGGCUCGUGA UGGCUGGUGGGCCUGAACGAGGGGUCUGGAGGCCUGGGUUU GAAUAUCGACAGC
7	hsa-mir-371	GUGGCACUCAAACUGUGGGGGCACUUUCUGCUCUCUGGUGAA AGUGCCGCCAUUUUGAGUGUUAC
362	hsa-mir-3157	GGGAAGGGCUUCAGCCAGGCUAGUGCAGUCUGCUUUGUGCCA ACACUGGGGUGAUGACUGCCCUAGUCUAGCUGAAGCUUUUCCC

Tabla 3. Secuencias maduras y de imitación de miARN identificados en el cribado o a los que se hace referencia en la solicitud

15

Lista de secuencias de miARN maduro (dirección 5' a 3'). Todas las secuencias se obtuvieron de miRBase (versión 16: sept. 2010; www.mirbase.org).

miARN	microARN maduro	Semilla (SEQ ID N.º)	SEQ miARN maduro (SEQ ID)
hsa-mir-181a hsa-mir-181a-2	hsa-miR-181a	ACAUJCA (8)	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU (19)
hsa-mir-181a	hsa-miR-181a*	CCAUCGA (9)	ACCAUCGACCGUUGAUUGUACC (20)
hsa-mir-181a-2	hsa-miR-181a-2*	CCACUGA (10)	ACCACUGACCGUUGACUGUACC (21)
hsa-mir-323	hsa-miR-323-5p	GGUGGUC (11)	AGGUGGUCCGUGGCGCGUUCGC (22)
hsa-mir-323	hsa-miR-323-3p	ACAUUAC (12)	CACAUUACACGGUCGACCUCU (23)
hsa-mir-326	hsa-miR-326	CUCUGGG (13)	CCUCUGGGCCCUUCCUCCAG (24)
hsa-mir-342	hsa-miR-342-5p	GGGGUGC (14)	AGGGGUGCUAUCUGUGAUUGA (25)
hsa-mir-342	hsa-miR-342-3p	CUCACAC (15)	UCUCACACAGAAUCGCACCCGU (26)
hsa-mir-345	hsa-miR-345	CUGACUC (16)	GCUGACUCCUAGUCCAGGGCUC (27)
hsa-mir-371	hsa-miR-371-5p	CUCAAAC (17)	ACUCAAACUGUGGGGGCACU (28)
hsa-mir-371	hsa-miR-371-3p	AGUGCCG (18)	AAGUGCCGCCAUCUUUUGAGUGU (29)
hsa-mir-3157	hsa-miR-3157	UCAGCCA (363)	UUCAGCCAGGCUAGUGCAGUCU (364)

Tabla 4 Secuencias de ADN de miARN identificados en el cribado (véase la tabla 1)

Seq ID	miARN	Secuencia clonada en el vector lentiviral
30	hsa-mir-181a-2	CTGCACAGTCTATCCCACAGTTCATTAGTTCTCTGCTGCACACAAATTGATT TTATAATTTAAATACTCTCGACTTGAAACCCAGAGAGGAATGTAAGAGCAT CCATCAGCGGTGGTCTCACTGCTCACTGGTCTTGGGATGTGGATGGGAG AATGAAGAAGGGCTATCAGGCCAGCCTTCAGAGGACTCCAAGGAACATTC AACGCTGTCGGTGAGTTTGGGATTTGAAAAACCACTGACCGTTGACTGT ACCTTGGGGTCTTACAGACGACACTACATTTCTGAAGCAAAGAGCAA GCTGTACCTTCACATGTCACATGAGTTCACCAGAAATGGTCTGCAATCCC CCAAATGTGGTCCAGTGAATTTTATTCTACTGCTCACTGTTCTTCTGCTTC TGTTGTGTGTTTTATTATTATTGTTGTTTTTACAAAAAAGTGTTCATTT CAACAAGGTAAGGAGCAGTCCATGATG
31	hsa-mir-323	TTCCTGGTATTTGAAGATGCGGTTGACCATGGTGTGTACGCTTTATTTGTG ACGTAGGACACATGGTCTACTTCTTCTCAATATCACATCTCGCCTTGGAAG ACTTCCAGGAGGTGATATCAGCTTTGCGGAAGAGCCACTGTCCTGGTGTG AGTACGGCTGCTGCTTGGTACTTGGAGAGAGGTGGTCCGTGGCGGTTT GCTTTTTTATGGCGCACATTACACGGTCGACCTTTTGCAGTATCTAATCC CGCCTTGCAAGCTTTCTGGAGCTAACATCAACTGCGGGGGTGGGGGCCA CTAGGTCTGCGCTCAGTGCACCCAGCGGGGTTTGTGATGTGTCTGTCTT GTGTGTGACGATAACTCACGTGTGGCAGCCCTTCTCAGCACACTGCTCT GGCTTGGCAGCAGGGTTAACTTGCAGGAGGAGCGTGGTGTGAGCAGC TGCTGGATACATGAGATGGTTGACCAGAG
32	hsa-mir-326	CGTCCGGCCAGATCTGCTTCTTCTGAAACCATGGCAAGAGAAAGACAGAC AGACTTGGACCTACTGCAGGGAGGGTTAAGTAGCAGCGGGACTCCCATC AAGAAGAAGGAATGTCTTCCGGAGCCTCATCTGTCTGTTGGGCTGGAGGC AGGGCCTTTGTGAAGGCGGGTGGTGTCTCAGATCGCCTCTGGGCCCTTCT CCAGCCCCGAGGCGGATTACCATGAGGCTGATGCAGCTTCAGCTTCCAG CCCTTACGCTCCAGGGCCCTTCCAAGGCCTAGCAATGTGTCATGTGCT CAGGGGTTTTGTGAAATTTGCAAAAGGAAATTTTTTGTACTCTTTTTTTT TTAAAACAAACAAACAAACAAAAAACCCTTCCAAGCTCTGTAAGCTTTA GGCGCCCAAGCCAGCTCTGCCCTGCTGTGGCAAG

Seq ID	miARN	Secuencia clonada en el vector lentiviral
33	hsa-mir-342	CCTGAAGAGAGACTGACACATCAGAGGTGTCYGGTACTGAACAAGCTCC CAGCTTGCGCCATGTCATATTGTGTGCCTCTCATAGCCTGGCACTTCTG CCATTGCATCCTTCTCTGCAGACTAAGATGGAGTTCCTGAACCAAGACCGC TTGCTGGCCAACCTGTGAAACTGGGCTCAAGGTGAGGGGTGCTATCTGTG ATTGAGGGACATGGTTAATGGAATTGTCTCACACAGAAATCGCACCCGTC ACCTTGGCCTACTTATCACCACCCCAAACAGAGGAACACGCCTTCTCCAGC CACAGCCTATGGAAGGGCCTTCAGCTGCTGTGGCCCCGAGGTGTGCATAC TGTGGAAGGAACTTCGGACGTGAACTCGGATCTGGTCCAGTACCAGCTG TGCCAGGAGTGCCCTTGGGCATGTCAGTACTGACCTAAGACTCAGTTTCGCCAT CTGTGAAATGGCTGAATCAGACTCACCTCACAGG
34	hsa-mir-345	CGGTTTAGGGTCACATGGTTCTTTTATCCAAATCCAGTGGGTACCTACCT CCTGGAGGTGCAGGTGCAAAGTTCTGTGTATTTGGTACTAGGACACACA GGTAGGTGTTGTCAGTAGTGCAGCCTGGTGTAGGGGCAGGGGTCCCA GTGCTCATGTTAGTTTCTTTTAGAGTCTAAGTAGAATGTTAAGCAGAGAC CCAAACCCTAGGTCTGCTGACTCCTAGTCCAGGGCTCGTGATGGCTGGTG GGCCCTGAACGAGGGGTCTGGAGGCCTGGGTTTGAATATCGACAGCCTCT CTGACCCACTTGGTTGCCTCAGGGAGGCAGGTGTGCGGATGGGGGAGAG TGGCCCATGGGCCAGAAAAGCAGTGGTATGGGGGCCCAAGAGAAGCCC AGACCCAAAAGGGCAGGAGCTGGCTGTGGGGCTACTCAGGTGGCTGGA GGCCTCTGCAGACACAGTG
35	hsa-mir-371	TTGGATCTGGAGGCTATGGGCGGGGAGTGCTTTGAATATCTATACGTGG AAAGCCTGTTTTTTACTTTTTAAGAAAGGGTCGTTAAATTCGTGCTTTGTA GACCTTCAACAGCTCATCAAGGGCTACTCTCCACCTCCTTGCTTAAAGGCC TCTTCTGATGGGTAAGTGTCTCCACTTGCATCGCCGCTTGCCGCATCCC CTCAGCCTGTGGCACTCAAAGTGTGGGGCACTTTCTGCTCTCTGGTAAA GTGCCCCATCTTTGAGTGTACCCTTGAGAAGACTCAACTGCGGAG AAGATACATTTTGATTGGGTGAGGGGGCGGGTAGCAGGATGGCCCTAG ACCCTGCCTATGGCCGCTTCTCGTGATATAAATTTCTTGCCGGGGCTCT TGCAGATGGAGCTGCTCACCCTGTGGCCTCAAATGTGGAGCACTATTCT GATGTCCAAGTGAAAGTGTGCGAATTTGAGCGTCACCGGTGACGCC
365	hsa-mir-3157	ACAATTCTCAATGAGTCTGCCCTCACTGTCCAACAATTGAGCTGAGAATA TAAGAAGGGAAGGGCTTCAGCCAGGCTAGTGCACTGCTTTGTGCCAAC ACTGGGGTGATGACTGCCCTAGTCTAGCTGAAGCTTTCCCTTCTTTCTAC ACCCAGCTCAAGTCCAGGTCCATAAACCTTTAGAACTCTTCAGAACT CTTTAGAGCTTCAGAAGCTTGTGGAATTGGAAGATG

Tabla 5 Secuencias isomiR y semilla de miARN identificados en el cribado (véase la tabla 1) o a los que se hace referencia en esta solicitud.

Estas secuencias isomiR se han derivado de análisis de secuenciación profunda de alto rendimiento de ARN pequeños, y se obtuvieron después de la combinación de los datos de 87 muestras de tejido humano.

MiARN maduro	Semilla (SEQ ID N.º)	Secuencia isomiR (SEQ ID N.º)
hsa-miR-181a	CAUUCAA (36)	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGUUU (108)
	AUUCAAC (37)	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGUU (109)
	UUCAACG (38)	AACAUUCAACGCUGUCGGUG (110)
	AACAUUC (39)	AACAUUCAACGCUGUCGGUGA (111)
	UCAACGC (40)	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAG (112)
	CAACGCU (41)	AACAUUCAACGCUGUCGGU (113)
	CCUUCAG (42)	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGUUUG (114)
	AACGCUG (43)	ACAUUCAACGCUGUCGGUGAGUUU (115)
	ACGCUGU (44)	ACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU (116)
	CUUCAGA (45)	AACAUUCAACGCUGUCGG (117)
	GCCAGCC (46)	ACAUUCAACGCUGUCGGUGAGUU (118)
		ACAUUCAACGCUGUCGGUGAG (119)
		ACAUUCAACGCUGUCGGUG (120)
		ACAUUCAACGCUGUCGGUGA (121)
		ACAUUCAACGCUGUCGGU (122)
		CAUUCAACGCUGUCGGUGAGUUU (123)
		AUUCAACGCUGUCGGUGAGUUU (124)
		CAUUCAACGCUGUCGGUGAGU (125)
		CAUUCAACGCUGUCGGUGAG (126)
		AUUCAACGCUGUCGGUGAGU (127)
		GAACAUUCAACGCUGUCGGUGA (128)
		GAACAUUCAACGCUGUCGGU (129)
		CAUUCAACGCUGUCGGUGAGUU (130)
		GAACAUUCAACGCUGUCGGUG (131)
		AUUCAACGCUGUCGGUGAG (132)
		UUCAACGCUGUCGGUGAGUUU (133)
		AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGUUUGGA (134)
		UCAACGCUGUCGGUGAGUUU (135)
		CAUUCAACGCUGUCGGUG (136)
		UCAACGCUGUCGGUGAGUU (137)
		GAACAUUCAACGCUGUCGGUGAG (138)
		AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGUUUGG (139)
		CAACGCUGUCGGUGAGUUU (140)
		AACGCUGUCGGUGAGUUU (141)
		UUCAACGCUGUCGGUGAGU (142)
		UUCAACGCUGUCGGUGAG (143)
		AUUCAACGCUGUCGGUGAGUU (144)
		UCAACGCUGUCGGUGAGU (145)
		AUUCAACGCUGUCGGUGA (146)
		UUCAACGCUGUCGGUGAGUU (147)
		CAUUCAACGCUGUCGGUGA (148)
		ACAUUCAACGCUGUCGGUGAGUUUG (149)
		UCAACGCUGUCGGUGAGUUUGG (150)
		CAACGCUGUCGGUGAGUU (151)
		UCAACGCUGUCGGUGAGUUUG (152)
		GAACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU (153)
	GCCUUCAGAGGACUCCAAGG (154)	
	CCUUCAGAGGACUCCAAGG (155)	
	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGUUUGGGA (156)	
	GGCCAGCCUUCAGAGGACUCCAAGG (157)	
hsa-miR-181a*	ACCAUCG (47)	ACCAUCGACCGUUGAUUGUA (158)
	AACCAUC (48)	ACCAUCGACCGUUGAUUGUAC (159)
	CAUCGAC (49)	ACCAUCGACCGUUGAUUGU (160)
	AAACCAU (50)	AACCAUCGACCGUUGAUUGUA (161)
	UCGACCG (51)	AAACCAUCGACCGUUGAUUGUA (162)
	UCAAAC (52)	AACCAUCGACCGUUGAUUGU (163)
	CAAAACC (53)	ACCAUCGACCGUUGAUUG (164)
		AACCAUCGACCGUUGAUUGUAC (165)
		AAACCAUCGACCGUUGAUUGU (166)
		AAACCAUCGACCGUUGAUUGUAC (167)
		CCAUCGACCGUUGAUUGUACC (168)
		CCAUCGACCGUUGAUUGUA (169)

Estas secuencias isomiR se han derivado de análisis de secuenciación profunda de alto rendimiento de ARN pequeños, y se obtuvieron después de la combinación de los datos de 87 muestras de tejido humano.				
MiARN maduro	Semilla (SEQ ID N.º)	Secuencia isomiR (SEQ ID N.º)		
		AAAACCAUCGACCGUUGAUUGU (170)		
		CCAUCGACCGUUGAUUGUAC (171)		
		AUCGACCGUUGAUUGUACC (172)		
		AUCAAAACCAUCGACCGUUGA (173)		
		UCAAAACCAUCGACCGUUGAUUGUA (174)		
		AACCAUCGACCGUUGAUUG (175)		
		AAACCAUCGACCGUUGAUUG (176)		
		AAACCAUCGACCGUUGAU (177)		
hsa-miR-181a-2*	ACCACUG (54) CACUGAC (55) ACUGACC (56) CUGACCG (57) UGGGGUC (58) AAAAAAC (59) AAAAACC (60)	ACCACUGACCGUUGACUGUAC (178)		
		ACCACUGACCGUUGACUGUA (179)		
		ACCACUGACCGUUGACUGU (180)		
		AACCACUGACCGUUGACUGUAC (181)		
		AACCACUGACCGUUGACUGUA (182)		
		AACCACUGACCGUUGACUGU (183)		
		ACCACUGACCGUUGACUGUACCU (184)		
		CCACUGACCGUUGACUGUAC (185)		
		ACCACUGACCGUUGACUG (186)		
		AACCACUGACCGUUGACUGUACC (187)		
		CCACUGACCGUUGACUGUACC (188)		
		CACUGACCGUUGACUGUAC (189)		
		CACUGACCGUUGACUGUA (190)		
		AACCACUGACCGUUGACUGUACCU (191)		
		CCACUGACCGUUGACUGUA (192)		
		UUGGGGUCCUUACAGACGACA (193)		
				ACUGACCGUUGACUGUACC (194)
				ACUGACCGUUGACUGUAC (195)
CCACUGACCGUUGACUGUACCU (196)				
CACUGACCGUUGACUGUACC (197)				
GAAAAAACACUGACCGUUGACUGU (198)				
AAAAAACACUGACCGUUGACUGU (199)				
AACCACUGACCGUUGACUG (200)				
AAAAAACACUGACCGUUGACUGUA (201)				
ACCACUGACCGUUGACUGUACCUUG (202)				
hsa-miR-323-3p	CACAUUA (61) CAUUACA (62) AUUACAC (63) UAUGGCG (64) GCACAUU (65)			GCACAUUACACGGUCGACCUCU (203)
		GCACAUUACACGGUCGACCU (204)		
		GCACAUUACACGGUCGACCUC (205)		
		GCACAUUACACGGUCGACCUCUU (206)		
		CACAUUACACGGUCGACCUC (207)		
		ACAUUACACGGUCGACCUCU (208)		
		GCACAUUACACGGUCGACC (209)		
		GCACAUUACACGGUCGACCUCUUUG (210)		
		CACAUUACACGGUCGACCUCUU (211)		
		GCACAUUACACGGUCGACC (212)		
		CACAUUACACGGUCGACCUCU (213)		
		GCACAUUACACGGUCGACCUCUUU (214)		
		CACAUUACACGGUCGACC (215)		
		CAUUACACGGUCGACCUCU (216)		
		UUUUGGCGCACAUUACACGGUC (217)		
CGCACAUUACACGGUCGACCUCU (218)				
hsa-miR-323-5p	CUGCUUG (66) UGCUUGG (67) GCUGCUU (68) AGGUGGU (69) GUGGUCC (70)	AGGUGGUCCGUGGCGCGUUC (219)		
		AGGUGGUCCGUGGCGCGUUCG (220)		
		GCUGCUUGGUACUUGGAGAG (221)		
		AGGUGGUCCGUGGCGCGUU (222)		
		CUGCUUGGUACUUGGAGAG (223)		
		UGCUGCUUGGUACUUGGAGAG (224)		
		GAGGUGGUCCGUGGCGCGUUC (225)		
		AGGUGGUCCGUGGCGCGUUCGCU (226)		
		GGUGGUCCGUGGCGCGUU (227)		
		AGGUGGUCCGUGGCGCGU (228)		
		GAGGUGGUCCGUGGCGCGUU (229)		

Estas secuencias isomiR se han derivado de análisis de secuenciación profunda de alto rendimiento de ARN pequeños, y se obtuvieron después de la combinación de los datos de 87 muestras de tejido humano.		
MiARN maduro	Semilla (SEQ ID N.º)	Secuencia isomiR (SEQ ID N.º)
hsa-miR-326	CCUCAUC (71) CUCAUCU (72) GCCUCAU (73) UCAUCUG (74) CAUCUGU (75) CCCCGAGG (76) GAGGCAG (77) UGAAGGC (78)	GCCUCAUCUGUCUGUUGGGCU (230)
		CCUCAUCUGUCUGUUGGGCU (231)
		AGCCUCAUCUGUCUGUUGGGCU (232)
		CUCAUCUGUCUGUUGGGCU (233)
		UCAUCUGUCUGUUGGGCU (234)
		CCCCGAGGCGGAU UCACCAUGAG (235)
		CCUCUGGGCCCUUCCUCCAGC (236)
		CCCCGAGGCGGAUUCACC (237)
		GCCUCAUCUGUCUGUUGGGC (238)
		CCUCAUCUGUCUGUUGGGC (239)
		GUGAAGGCGGGUGGUCUCAGAU (240)
		GCCUCAUCUGUCUGUUGGG (241)
		GGAGGCAGGGCCUUGUGAAGGCGGG (242)
		AGCCUCAUCUGUCUGUUGGG (243)
CCCCGAGGCGGAUUCACCAU (244)		
hsa-miR-342-3p	CACACAG (79) UCACACA (80) ACACAGA (81) CACAGAA (82) CAGAAAU (83) ACAGAAA (84) UCUCACA (85)	UCUCACACAGAAAUCGCACCCGUC (245)
		UCUCACACAGAAAUCGCACCCG (246)
		UCACACAGAAAUCGCACCCGUCA (247)
		UCUCACACAGAAAUCGCACCCGUC (248)
		UCUCACACAGAAAUCGCACC (249)
		UCACACAGAAAUCGCACCCGUC (250)
		UCACACAGAAAUCGCACCCGU (251)
		CUCACACAGAAAUCGCACCCGU (252)
		UCUCACACAGAAAUCGCACCC (253)
		CUCACACAGAAAUCGCACCCGUC (254)
		CACACAGAAAUCGCACCCGUCA (255)
		UCACACAGAAAUCGCACCCG (256)
		CUCACACAGAAAUCGCACCCG (257)
		CUCACACAGAAAUCGCACCCGUCA (258)
		UCUCACACAGAAAUCGCAC (259)
		CACACAGAAAUCGCACCCGUC (260)
		ACACAGAAAUCGCACCCGU (261)
		CACACAGAAAUCGCACCCGU (262)
		CUCACACAGAAAUCGCACCC (263)
		ACAGAAAUCGCACCCGUC (264)
		ACAGAAAUCGCACCCGUCA (265)
		UCACACAGAAAUCGCACCC (266)
		UCUCACACAGAAAUCGCA (267)
GUCUCACACAGAAAUCGCACCC (268)		
ACACAGAAAUCGCACCCGUCA (269)		
CACAGAAAUCGCACCCGU (270)		
UCACACAGAAAUCGCACCCGUCAC (271)		
UCACACAGAAAUCGCACC (272)		
CACAGAAAUCGCACCCGUC (273)		
hsa-miR-342-5p	GGGUGCU (86) GCUAUCU (87) GGUGCUA (88) UGUGAAA (89) GUGCUAU (90) UGAAACU (91) CUGUGAA (92) CUAUCUG (93) UGCUAUC (94) AUGGUUA (95) AUCUGUG (96) GAAACUG (97) UAUCUGU (98) GUGAAAC (99)	GGGGUGCUAUCUGUGAUUGAGGGACA (274)
		GGGGUGCUAUCUGUGAUUGAGGGAC (275)
		GGGGUGCUAUCUGUGAUUGAGGGA (276)
		GGGGUGCUAUCUGUGAUUGAGG (277)
		UGCUAUCUGUGAUUGAGGGACA (278)
		AGGGGUGCUAUCUGUGAUUGAGG (279)
		GGGGUGCUAUCUGUGAUUGAGGG (280)
		AGGGGUGCUAUCUGUGAUUGAGGGACA (281)
		AGGGGUGCUAUCUGUGAUUGAGGGA (282)
		GGGGUGCUAUCUGUGAUUGA (283)
		UGCUAUCUGUGAUUGAGGGAC (284)
		GGGUGCUAUCUGUGAUUGAGGGA (285)
		AGGGGUGCUAUCUGUGAUUGAGGG (286)
		GGGUGCUAUCUGUGAUUGAGGGAC (287)
		AGGGGUGCUAUCUGUGAUUGAG (288)
		GGGUGCUAUCUGUGAUUGAGGG (289)

Estas secuencias isomiR se han derivado de análisis de secuenciación profunda de alto rendimiento de ARN pequeños, y se obtuvieron después de la combinación de los datos de 87 muestras de tejido humano.				
MiARN maduro	Semilla (SEQ ID N.º)	Secuencia isomiR (SEQ ID N.º)		
		GGGUGCUAUCUGUGAUUGAGG (290)		
		UGCUAUCUGUGAUUGAGGGA (291)		
		GGGUGCUAUCUGUGAUUGAGGGACA (292)		
		AGGGGUGCUAUCUGUGAUUGAGGGAC (293)		
		CUGUGAAACUGGGCUC AAGGUG (294)		
		AGGGGUGCUAUCUGUGAUUG (295)		
		GGGGUGCUAUCUGUGAUUGAG (296)		
		UGCUAUCUGUGAUUGAGGGACAU (297)		
		CUGUGAAACUGGGCUC AAGGUGA (298)		
		GGUGCUAUCUGUGAUUGAGGGAC (299)		
		GUGAAACUGGGCUC AAGGUG (300)		
		GGGUGCUAUCUGUGAUUGAG (301)		
		GGGGUGCUAUCUGUGAUUG (302)		
		GCUAUCUGUGAUUGAGGGACA (303)		
		CCUGUGAAACUGGGCUC AAGGUG (304)		
		GUGCUAUCUGUGAUUGAGGGAC (305)		
		AGGGGUGCUAUCUGUGAUUGAGGGACAU (306)		
		UGCUAUCUGUGAUUGAGGG (307)		
		GGGUGCUAUCUGUGAUUG (308)		
		CAUGGUAAUGGAAUUGUC (309)		
		GGGGUGCUAUCUGUGAUUGAGGGACAU (310)		
		GGGUGCUAUCUGUGAUUGA (311)		
		UAUCUGUGAUUGAGGGACA (312)		
		GUGAAACUGGGCUC AAGGUGA (313)		
		CCUGUGAAACUGGGCUC AAGGUGA (314)		
		GGUGCUAUCUGUGAUUGAGG (315)		
		CUAUCUGUGAUUGAGGGACA (316)		
		UGAAACUGGGCUC AAGGUG (317)		
		UGUGAAACUGGGCUC AAGGUGA (318)		
		hsa-miR-345	UGACUCC (100) GACUCCU (101) CCCUGAA (102) CCUGAAC (103)	GCUGACUCCUAGUCCAGGGCU (319)
				GCUGACUCCUAGUCCAGGGC (320)
GCUGACUCCUAGUCCAGG (321)				
GCUGACUCCUAGUCCAGGG (322)				
GCUGACUCCUAGUCCAGGGCUCGU (323)				
GCUGACUCCUAGUCCAGGGCUCG (324)				
CUGACUCCUAGUCCAGGGCU (325)				
CUGACUCCUAGUCCAGGGC (326)				
CUGACUCCUAGUCCAGGGCUC (327)				
UGACUCCUAGUCCAGGGCUCG (328)				
UGACUCCUAGUCCAGGGCU (329)				
UGACUCCUAGUCCAGGGCUC (330)				
GCCCUGAACGAGGGGUCUGGAG (331)				
CCCUGAACGAGGGGUCUGGAG (332)				
GCCCUGAACGAGGGGUCUGGA (333)				
hsa-miR-371-3p	GUGCCGC (104) UGCCGCC (105) GCCGCCA (106)	AGUGCCGCCAUCUUUUGAGUGU (334)		
		GUGCCGCCAUCUUUUGAGUGU (335)		
		AAGUGCCGCCAUCUUUUGAGU (336)		
		AGUGCCGCCAUCUUUUGAGU (337)		
		AAGUGCCGCCAUCUUUUGAGUG (338)		
		GUGCCGCCAUCUUUUGAGUG (339)		
		UGCCGCCAUCUUUUGAGUGU (340)		
		AGUGCCGCCAUCUUUUGAGUGUU (341)		
		GUGCCGCCAUCUUUUGAGU (342)		
		ACUCAAACUGUGGGGGCACUUU (343)		
		ACUCAAACUGUGGGGGCACUUUC (344)		
hsa-miR-371-5p	UCAACU (107)	ACUCAAACUGUGGGGGCACUU (345)		
		ACUCAAACUGUGGGGGCACUUUCU (346)		
		CUCAAACUGUGGGGGCACUUUC (347)		
		ACUCAAACUGUGGGGGCAC (348)		
		CUCAAACUGUGGGGGCACUUUCU (349)		

Estas secuencias isomiR se han derivado de análisis de secuenciación profunda de alto rendimiento de ARN pequeños, y se obtuvieron después de la combinación de los datos de 87 muestras de tejido humano.		
MiARN maduro	Semilla (SEQ ID N.º)	Secuencia isomiR (SEQ ID N.º)
		CUCAAACUGUGGGGGGCACUUU (350)
		ACUCAAACUGUGGGGGCA (351)
		CUCAAACUGUGGGGGCACUU (352)
		CUCAAACUGUGGGGGGCAC (353)
		CUCAAACUGUGGGGGGCACU (354)
hsa-miR-3157	UCAGCCA (363) UUCAGCC (366) CAGCCAG (367)	UUCAGCCAGGCUAGUGCAGUC (368)
		CUUCAGCCAGGCUAGUGCAGUC (369)
		UCAGCCAGGCUAGUGCAGUCU (370)
		UUCAGCCAGGCUAGUGCAGU (371)
		CUUCAGCCAGGCUAGUGCAGUCUG (372)

Listado de secuencias

[0262]

5	<110> InteRNA Technologies BV Vereniging voor christelijk hoger onderwijs, wetenschappelijk onderzoek en patiëntenzorg
10	<120> mir para tratar el cáncer de cabeza y de cuello
	<130> P6037900PCT
15	<150> EP 11195240.4
	<151> 2011-12-22
	<150> US 61/579,191
	<151> 2011-12-22
20	<150> US 61/579,162
	<151> 2011-12-22
	<150> US 61/579,229
	<151> 2011-12-22
25	<150> US 61/579,019
	<151> 2011-12-22
	<150> US 61/579,160
	<151> 2011-12-22
30	<160> 372
	<170> Versión de PatentIn 3.3
35	<210> 1
	<211> 110
	<212> ARN
	<213> Artificial
40	<220>
	<223> Secuencia precursora
	<400> 1
	ugaguuuga gguugcuuca gugaacauuc aacgcugucg gugaguuugg aauuaaauc 60
45	aaaaccaucg accguugauu guaccuaug gcuaaccauc aucuacucca 110
	<210> 2
	<211> 110
	<212> ARN
50	<213> Artificial

ES 2 688 619 T3

	<220>		
	<223> Secuencia precursora		
5	<400> 2		
	agaagggcua ucaggccagc cuucagagga cuccaaggaa caucaacgc ugucggugag	60	
	uuugggauuu gaaaaaacca cugaccguug acuguaccuu gggguccuaa	110	
10	<210> 3		
	<211> 86		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> Secuencia precursora		
	<400> 3		
	uugguacuug gagagaggug guccguggcg cguucgcuu auuuauaggcg cacauuacac	60	
20	ggucgaccuc uuugcaguau cuaauc	86	
	<210> 4		
	<211> 95		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
25	<220>		
	<223> Secuencia precursora		
	<400> 4		
30	cucaucuguc uguuggcug gaggcagggc cuuugugaag gcggguggug cucagaucgc	60	
	cucugggcc uuccuccagc cccgagggcg auuca	95	
	<210> 5		
	<211> 99		
35	<212> ARN		
	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Secuencia precursora		
40	<400>5		
	gaaacugggc ucaaggugag gggugcuauc ugugauugag ggacaugguu aauggaaug	60	
	ucucacacag aaaucgcacc cgucaccuug gccuacuua	99	
45	<210> 6		
	<211> 98		
	<212> ARN		
	<213> Artificial		
50	<220>		
	<223> Secuencia precursora		
	<400> 6		
	acccaaacc uaggucugcu gacuccuagu ccagggcucg ugauggcugg ugggccuga	60	
55	acgagggguc uggaggccug gguuugaaua ucgacagc	98	

ES 2 688 619 T3

5 <210> 7
<211> 67
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia precursora

10 <400> 7
guggcacuca aacugugggg gcacuuucug cucucuggug aaagugccgc cauuuuuga 60
guguuac 67

15 <210> 8
<211> 7
<212> ARN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Secuencia semilla

<400> 8
acauuca 7

25 <210> 9
<211> 7
<212> ARN
<213> Artificial

30 <220>
<223> Secuencia semilla

<400> 9
ccaucga 7

35 <210> 10
<211> 7
<212> ARN
<213> Artificial

40 <220>
<223> Secuencia semilla

45 <400> 10
ccacuga 7

50 <210> 11
<211> 7
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia semilla

55 <400> 11
ggugguc 7

60 <210> 12
<211> 7
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia semilla

65

<400> 12
 acauuac 7

 5 <210> 13
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

 10 <220>
 <223> Secuencia semilla

 <400> 13
 cucuggg 7

 15 <210> 14
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

 20 <220>
 <223> Secuencia semilla

 <400> 14
 ggggugc 7

 25 <210> 15
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

 30 <220>
 <223> Secuencia semilla

 <400> 15
 cucacac 7
 <210> 16
 <211> 7

 35 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia semilla

 40 <400> 16
 cugacuc 7

 <210> 17
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

 45 <220>
 <223> Secuencia semilla

 <400> 17
 cucaaac 7

 50 <210> 18
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia semilla

 55 <400> 17
 cucaaac 7

 <210> 18
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia semilla

 60 <400> 17
 cucaaac 7

 <210> 18
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia semilla

 65 <400> 17
 cucaaac 7

 <210> 18
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 18
 agugccg 7

5 <210> 19
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia madura

 <400> 19
 aacaucaac gcugucggug agu 23

15 <210> 20
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia madura

 <400> 20
 accaucgacc guugauugua cc 22

25 <210> 21
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Secuencia madura

 <400> 21
 accacugacc guugacugua cc 22

35 <210> 22
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Secuencia madura

 <400> 22
 aggguguccg uggcgcuuc gc 22

45 <210> 23
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Secuencia madura

 <400> 23
 cacauacac ggucgaccuc u 21

55 <210> 24
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> Secuencia madura

65 <220>
 <223> Secuencia madura

<400> 24
 ccucugggcc cuuccuccag 20

5 <210> 25
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia madura

 <400> 25
 aggggugcua ucugugauug a 21

15 <210> 26
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia madura

 <400> 26
 ucucacacag aaaucgcacc cgu 23

25 <210> 27
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Secuencia madura

 <400> 27
 gcugacuccu aguccagggc uc 22

35 <210> 28
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Secuencia madura

 <400> 28
 acucaaacug ugggggcacu 20

45 <210> 29
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Secuencia madura

 <400> 29
 aagugccgcc aucuuuugag ugu 23

55 <210> 30
 <211> 486
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> Secuencia clonada en vector lentiviral

65 <220>
 <223> Secuencia clonada en vector lentiviral

ES 2 688 619 T3

<400>30

ctgcacagtc tatcccacag ttcattagtt ctctgctgca cacaaattga ttttataatt 60

taaatactct cgacttgaaa cccagagagg aatgtaagag catccatcag cgggtggtctc 120

actgctcact ggttcttggg atgtggatgg gagaatgaag aagggctatc aggccagcct 180

tcagaggact ccaaggaaca ttcaacgctg tccggtgagtt tgggatttga aaaaaccact 240

gaccgttgac tgtaccttgg ggtccttaca gacgacacta catttcctga agcaaaagag 300

caagctgtac cttcacatgt cacatgagtt caccagaaat ggtcctgcaa tcccccaat 360

gtggtccagt gaattttatt cctactgctc actgttcctt gctttctggt gtgtgtttta 420

ttattatttg tttgttttta caaaaaagt gtttcatttc aacaaggtaa ggagcagtc 480

atgatg 486

5 <210> 31
<211> 483
<212> **ADN**
<213> Artificial

10 <220>
<223> Secuencia clonada en vector lentiviral

<400> 31

ttcctgggat ttgaagatgc ggttgaccat ggtgtgtacg ctttatttgt gacgtaggac 60

acatggtcta cttcttctca atatcacatc tgccttggga agacttccag gaggtgatat 120

cagctttgcg gaagagccac tgtcctggtg tcagtacggc tgctgcttgg tacttgagaga 180

gaggtggtcc gtggcgcggt cgcttttttt atggcgcaca ttacacggtc gacctctttg 240

15 cagtatctaa tccgccttg caagctttcc tggagctaac atcaactgcg ggggtggggg 300

ccactaggtc tgcgctcagt gcgaccagc ggggtttgtg atgtgtctgt cttgtgtgtg 360

acgataaactc acgtgtggca gccctcttct cagcacactg ctctggcttg gcagcaggg 420

taacttgcgg acgaggagcg tgggtgcagc acgtgcctgg atacatgaga tggttgacca 480

gag 483

20 <210> 32
<211> 438
<212> **ADN**
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia clonada en vector lentiviral

25 <400> 32

ES 2 688 619 T3

cgtccggcca gatctgcttc ttctgaaacc atggcaagag aaagacagac agacttggac 60
 ctactgcagg gagggttaag tagcagcggg actcccatca agaagaagga atgtcttccg 120
 gagcctcatc tgtctgttgg gctggaggca gggcctttgt gaaggcgggt ggtgctcaga 180
 tcgcctctgg gcccttctc cagccccgag gcggattcac catgaggctg atgcagcttc 240
 agcttccagc ccttcacgct ccagggccct ttccaaggcc tagcaatgtg tccatgtgct 300
 caggggtttt gtgaaatttg caaaaggaaa ttatttttgt actctttttt ttttaaaaca 360
 aacaaacaaa caaaaaaaaa ccttccaagc tctgtaagct ttaggcgcc aagcccagct 420
 ctgccctgct gtggcaag 438

 <210> 33
 <211> 488
 <212> **ADN**
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia clonada en vector lentiviral

 <400> 33

 cctgaagaga gactgacaca tcagaggtgt cyggtgactg aacaagctcc cagcttgcgc 60
 ccatgtcata ttgtgtgcct ctcatagcct ggcacttctc gccattgcat ctttctctgc 120
 agactaagat ggagttctcg aaccaagacc gcttgcctgc caacctgtga aactgggctc 180
 aaggtgaggg gtgctatctg tgattgaggg acatgggtaa tggaattgtc tcacacagaa 240
 atcgcacccg tcacctggc ctacttatca ccaccccaaa cagaggaaca cgccttctcc 300
 agccacagcc tatggaaggg cttcagctg ctgtggcccc gaggtgtgca tactgtggaa 360
 ggaacttcgg acgtgaactc ggatctggtt ccagtaccag ctgtgccagg agtgcccttg 420
 ggcatgtcac tgacctaaaga ctcagtttctg ccactctgtg aatggctgaa tcagactcac 480
 ctcacagg 488

 <210> 34
 <211> 467
 <212> **ADN**
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia clonada en vector lentiviral

 <400> 34

 cggtttaggg tcacatggtt cttttatcca aattccagtg ggtacctacc tcttgagggt 60
 gcaggtcgaa aggttctgtg tatttggtag taggacacac aggtaggtgt tgtcagtagt 120
 gcagcctggt gctaggggca ggggtcccca gtgctcatgt tagtttctt ttagagtcta 180
 agtagaatgt taagcagaga cccaaaccct aggtctgctg actcctagtc cagggctcgt 240
 gatggctggt gggccctgaa cgaggggtct ggaggcctgg gtttgaatat cgacagcctc 300
 tctgaccac ttggttgctc cagggaggca ggtgtgcgga tgggggagag tggcccatgg 360
 gccagaaaag cagtggtatg ggggccccaa gagaagccca gacccaaaag ggcaggagct 420
 ggctgtgggg ctactcaggt ggctggaggc ctctctcaga cacagtg 467

ES 2 688 619 T3

<210> 35
 <211> 504
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> Secuencia clonada en vector lentiviral
 <400> 35
 10
 ttgatctgg aggctatggg cgggggagtg ctttgaatat ctatacgtgg aaagccttgt 60
 tttttacttt ttaagaaagg gtcgttaaata tctgtctttg tagaccttca acagctcatc 120
 aagggtact ctccacctcc ttgcttaaag gcctcttctg atgggtaagt gcttccactt 180
 gcgatcgccg ccttgccgca tcccctcagc ctgtggcact caaactgtgg gggcactttc 240
 tgctctctgg tgaaagtgcc gccatctttt gagtgttacc gcttgagaag actcaacctg 300
 cggagaagat accattttga ttgggtgagg gggcgggtag caggatggcc ctagaccctg 360
 cctatggccg cttcctcgtg atataaattt cttggccggg gctcttgacg atggagctgc 420
 tcaccctgtg ggcctcaaat gtggagcact attctgatgt ccaagtggaa agtgctgcga 480
 atttgagcgt caccggtgac gccc 504
 <210> 36
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Secuencia semilla
 20
 <400> 36
 cauucaa 7
 <210> 37
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> Secuencia semilla
 30
 <400> 37
 auucaac 7
 <210> 38
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial
 35
 <220>
 <223> Secuencia semilla
 40
 <400> 38
 uucaacg 7
 <210> 39
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial
 45
 <220>
 <223> Secuencia semilla
 50

<400> 39
 aacauuc 7

5

<210> 40
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 40
 ucaacgc 7

15

<210> 41
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 41
 caacgcu 7

25

<210> 42
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 42
 ccuucag 7

35

<210> 43
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 43
 aacgcug 7

45

<210> 44
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

50

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 44
 acgcugu 7

55

<210> 45
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

60

<220>
 <223> Secuencia semilla

65

<400> 45
 cuucaga 7

5

<210> 46
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 46
 gccagcc 7

15

<210> 47
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 47
 accaucg 7

25

<210> 48
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 48
 aaccauc 7

35

<210> 49
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 49
 caugcac 7

45

<210> 50
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

50

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 50
 aaaccau 7

60

<210> 51
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

65

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 51
ucgaccg 7

5 <210> 52
<211> 7
<212> ARN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Secuencia semilla

<400> 52
ucaaaac 7

15 <210> 53
<211> 7
<212> ARN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Secuencia semilla

<400> 53
caaaacc 7

25 <210> 54
<211> 7
<212> ARN
<213> Artificial

30 <220>
<223> Secuencia semilla

35 <400> 54
accacug 7

<210> 55
<211> 7
<212> ARN
<213> Artificial

40 <220>
<223> Secuencia semilla

45 <400> 55
cacugac 7

<210> 56
<211> 7
<212> ARN
<213> Artificial

50 <220>
<223> Secuencia semilla

<400> 56
acugacc 7

60 <210> 57
<211> 7
<212> ARN
<213> Artificial

65 <220>
<223> Secuencia semilla

<400> 57
 cugaccg 7

5

<210> 58
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 58
 ugggguc 7

15

<210> 59
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 59
 aaaaaac 7

25

<210> 60
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 60
 aaaaacc 7

35

<210> 61
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 61
 cacauua 7

45

<210> 62
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

50

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 62
 cauuaca 7

55

<210> 63
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

60

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 62
 cauuaca 7

65

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 63
 auuacac 7

5

<210> 64
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 64
 uauggcg 7

15

<210> 65
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 65
 gcacauu 7

25

<210> 66
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 66
 cugcuug 7

35

<210> 67
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 67
 ugcuugg 7

45

<210> 68
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

50

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 68
 gcugcuu 7

55

<210> 69
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

60

<220>
 <223> Secuencia semilla

65

<400> 69
 agguggu 7

5

<210> 70
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 70
 guggucc 7

15

<210> 71
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 71
 ccucauc 7

25

<210> 72
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 72
 cucaucu 7

35

<210> 73
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 73
 gccucau 7

45

<210> 74
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

50

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 74
 ucaucug 7

55

<210> 75
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

60

<220>
 <223> Secuencia semilla

65

<400> 75
 caucugu 7

5

<210> 76
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Secuencia semilla

15

<400> 76
 cccgagg 7

<210> 77
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Secuencia semilla

25

<400> 77
 gaggcag 7

<210> 78
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Secuencia semilla

35

<400> 78
 ugaaggc 7

<210> 79
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> Secuencia semilla

45

<400> 79
 cacacag 7

<210> 80
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

50

<220>
 <223> Secuencia semilla

55

<400> 80
 ucacaca 7

60

<210> 81
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

65

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 81
 acacaga 7

5

<210> 82
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 82
 cacagaa 7

15

<210> 83
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 83
 cagaaau 7

25

<210> 84
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 84
 acagaaa 7

35

<210> 85
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 85
 ucucaca 7

45

<210> 86
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

50

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 86
 gggugcu 7

55

<210> 87
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

60

<220>
 <223> Secuencia semilla

65

<400> 87
 gcuaucu 7
 5 <210> 88
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Secuencia semilla
 <400> 88
 ggugcua 7
 15 <210> 89
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Secuencia semilla
 <400> 89
 ugugaaa 7
 25 <210> 90
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Secuencia semilla
 <400> 90
 gugcuau 7
 35 <210> 91
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> Secuencia semilla
 <400> 91
 ugaacu 7
 45 <210> 92
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Secuencia semilla
 <400> 92
 cugugaa 7
 60 <210> 93
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 93
 cuaucug 7

5

<210> 94
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Secuencia semilla

15

<400> 94
 ugcuauc 7

<210> 95
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Secuencia semilla

25

<400> 95
 augguua 7

<210> 96
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Secuencia semilla

35

<400> 96
 aucugug 7

<210> 97
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> Secuencia semilla

45

<400> 97
 gaaacug 7

<210> 98
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

50

<220>
 <223> Secuencia semilla

55

<400> 98
 uaucugu 7

60

<210> 99
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

65

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 99
 gugaaac 7

5

<210> 100
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 100
 ugacucc 7

15

<210> 101
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 101
 gacuccu 7

25

<210> 102
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 102
 cccugaa 7

35

<210> 103
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 103
 ccugaac 7

45

<210> 104
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

50

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 104
 gugccgc 7

55

<210> 105
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

60

<220>
 <223> Secuencia semilla

65

<400> 105
 ugccgcc 7

5

<210> 106
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 106
 gccgcca 7

15

<210> 107
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Secuencia semilla

<400> 107
 ucaaacu 7

25

<210> 108
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Secuencia isomiR

35

<400> 108
 aacaucaac gcugucggug aguuu 25

<210> 109
 <211> 24
 <212> ARN
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> Secuencia isomiR

45

<400> 109
 aacaucaac gcugucggug aguu 24

<210> 110
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial

50

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 110
 aacaucaac gcugucggug 20

55

<210> 111
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

60

<220>
 <223> Secuencia isomiR

65

<400> 111
 aacauucaac gcugucggug a 21
 5
 <210> 112
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 112
 aacauucaac gcugucggug ag 22
 15
 <210> 113
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 113
 aacauucaac gcugucggu 19
 25
 <210> 114
 <211> 26
 <212> ARN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 114
 aacauucaac gcugucggug aguuug 26
 35
 <210> 115
 <211> 24
 <212> ARN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 115
 acauucaacg cugucgguga guuu 24
 45
 <210> 116
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 116
 acauucaacg cugucgguga gu 22
 55
 <210> 117
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 65

<400> 117
 aacauucaac gcugucgg 18
 5 <210> 118
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Secuencia isomiR

 <400> 118
 acauucaacg cugucgguga guu 23
 15 <210> 119
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Secuencia isomiR

 <400> 119
 acauucaacg cugucgguga g 21
 25 <210> 120
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Secuencia isomiR

 <400> 120
 acauucaacg cugucggug 19
 35 <210> 121
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> Secuencia isomiR

 <400> 121
 acauucaacg cugucgguga 20
 45 <210> 122
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Secuencia isomiR

 <400> 122
 acauucaacg cugucggg 18
 55 <210> 123
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Secuencia isomiR

 <400> 122
 acauucaacg cugucggg 18
 60 <210> 123
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65 <220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 123
 cauucaacgc ugucggugag uuu 23
 5
 <210> 124
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 124
 auucaacgcu gucggugagu uu 22
 15
 <210> 125
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 125
 cauucaacgc ugucggugag u 21
 25
 <210> 126
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 35
 <400> 126
 cauucaacgc ugucggugag 20
 <210> 127
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 45
 <400> 127
 auucaacgcu gucggugagu 20
 <210> 128
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 55
 <400> 128
 gaacauuca cgcugucggu ga 22
 60
 <210> 129
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65
 <220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 129
 gaacaucaa cgcugucggu 20

5

<210> 130
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 130
 caucaacgc ugucggugag uu 22

15

<210> 131
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 131
 gaacaucaa cgcugucggu g 21

25

<210> 132
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 132
 auucaacgcu gucggugag 19

35

<210> 133
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 133
 uucaacgcug ucgugaguu u 21

45

<210> 134
 <211> 28
 <212> ARN
 <213> Artificial

50

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 134
 aacaucaac gcugucggug aguuugga 28

55

<210> 135
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial

60

<220>
 <223> Secuencia isomiR

65

<400> 135
 ucaacgcugu cggugaguuu 20

5

<210> 136
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 136
 caucaacgc ugucggug 18

15

<210> 137
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 137
 ucaacgcugu cggugaguu 19

25

<210> 138
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 138
 gaacaucaa cgcugucggu gag 23

35

<210> 139
 <211> 27
 <212> ARN
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> Secuencia isomiR

45

<400> 139
 aacaucaac gcugucggug aguuugg 27

50

<210> 140
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial

55

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 140
 caacgcuguc ggugaguuu 19

60

<210> 141
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Artificial

65

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 141
 aacgcugucg gugaguuu 18
 5 <210> 142
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 142
 uucaacgcug ucggugagu 19
 15 <210> 143
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 143
 uucaacgcug ucggugag 18
 25 <210> 144
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 144
 auucaacgcu gucggugagu u 21
 35 <210> 145
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 145
 ucaacgcugu cggugagu 18
 45 <210> 146
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 146
 auucaacgcu gucgguga 18
 55 <210> 147
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 65

<400> 147
 uucaacgcug ucgugaguu 20
 5 <210> 148
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 148
 cauucaacgc ugucgguga 19
 15 <210> 149
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 149
 acauucaacg cugucgguga guuug 25
 25 <210> 150
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 150
 ucaacgcugu cggugaguuu gg 22
 35 <210> 151
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 151
 caacgcuguc ggugaguu 18
 45 <210> 152
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 152
 ucaacgcugu cggugaguuu g 21
 55 <210> 153
 <211> 24
 <212> ARN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 65

<400> 153
 gaacaucaa cgcugucggu gagu 24

5

<210> 154
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 154
 gccuucagag gacuccaagg 20

15

<210> 155
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 155
 ccuucagagg acuccaagg 19

25

<210> 156
 <211> 29
 <212> ARN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 156
 aacaucaac gcugucggug aguuugga 29

35

<210> 157
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> Secuencia isomiR

45

<400> 157
 gccagccuu cagaggacuc caagg 25

50

<210> 158
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial

55

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 158
 accaucgacc guugauugua 20

60

<210> 159
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

65

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 159
 accaucgacc guugauugua c 21

5

<210> 160
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 160
 accaucgacc guugauugu 19

15

<210> 161
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 161
 aaccaucgac cguugauugu a 21

25

<210> 162
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 162
 aaaccaucga ccguugauug ua 22

35

<210> 163
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> Secuencia isomiR

45

<400> 163
 aaccaucgac cguugauugu 20

50

<210> 164
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Artificial

55

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 164
 accaucgacc guugauug 18

60

<210> 165
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial

65

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 165
 aaccaucgac cguugauugu ac 22

5

<210> 166
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 166
 aaaccaucga ccguugauug u 21

15

<210> 167
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 167
 aaaccaucga ccguugauug uac 23

25

<210> 168
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 168
 ccaucgaccg uugauuguac c 21

35

<210> 169
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> Secuencia isomiR

45

<400> 169
 ccaucgaccg uugauugua 19

50

<210> 170
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial

55

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 170
 aaaaccaucg accguugauu gu 22

60

<210> 171
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial

65

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 171
 ccaucgaccg uugauuguac 20

5

<210> 172
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 172
 aucgaccguu gauuguacc 19

15

<210> 173
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 173
 aucaaaacca ucgaccguug a 21

25

<210> 174
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 174
 ucaaaaccacg cgaccguuga uugua 25

35

<210> 175
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> Secuencia isomiR

45

<400> 175
 aaccaucgac cguugauug 19

50

<210> 176
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial

55

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 176
 aaaccaucga cguugauug 20

60

<210> 177
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Artificial

65

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 177
 aaaccaucga ccguugau 18

5

<210> 178
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 178
 accacugacc guugacugua c 21

15

<210> 179
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 179
 accacugacc guugacugua 20

25

<210> 180
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 180
 accacugacc guugacugu 19

35

<210> 181
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 181
 aaccacugac cguugacugu ac 22

45

<210> 182
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

50

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 182
 aaccacugac cguugacugu a 21

55

<210> 183
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial

60

<220>
 <223> Secuencia isomiR

65

<400> 183
 aaccacugac cguugacugu 20

5

<210> 184
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 184
 accacugacc guugacugua ccu 23

15

<210> 185
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 185
 ccacugaccg uugacuguac 20

25

<210> 186
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 186
 accacugacc guugacug 18

35

<210> 187
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 187
 aaccacugac cguugacugu acc 23

45

<210> 188
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

50

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 188
 ccacugaccg uugacuguac c 21

55

<210> 189
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial

60

<220>
 <223> Secuencia isomiR

65

<400> 189
 cacugaccgu ugacuguac 19
 5 <210> 190
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 190
 cacugaccgu ugacugua 18
 15 <210> 191
 <211> 24
 <212> ARN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 191
 aaccacugac cguugacugu accu 24
 25 <210> 192
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 192
 ccacugaccg uugacugua 19
 35 <210> 193
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 193
 uugggguccu uacagacgac a 21
 45 <210> 194
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 194
 acugaccguu gacuguacc 19
 55 <210> 195
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 65

<400> 195
 acugaccguu gacuguac 18

5

<210> 196
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial

10

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 196
 ccacugaccg uugacuguac cu 22

15

<210> 197
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial

20

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 197
 cacugaccgu ugacuguacc 20

25

<210> 198
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

30

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 198
 gaaaaaacca cugaccguug acugu 25

35

<210> 199
 <211> 24
 <212> ARN
 <213> Artificial

40

<220>
 <223> Secuencia isomiR

45

<400> 199
 aaaaaaccac ugaccguuga cugu 24

50

<210> 200
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial

55

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 200
 aaccacugac cguugacug 19

60

<210> 201
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

65

<220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 201
 aaaaaaccac ugaccguuga cugua 25
 5
 <210> 202
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 202
 accacugacc guugacugua ccuug 25
 15
 <210> 203
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 203
 gcacauuaca cggucgaccu cu 22
 25
 <210> 204
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 35
 <400> 204
 gcacauuaca cggucgaccu 20
 <210> 205
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 45
 <400> 205
 gcacauuaca cggucgaccu c 21
 <210> 206
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 55
 <400> 206
 gcacauuaca cggucgaccu cuu 23
 60
 <210> 207
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65
 <220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 207
 cacauuacac ggucgaccuc 20
 5
 <210> 208
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 208
 acauuacacg gucgaccucu 20
 15
 <210> 209
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 209
 gcacauuaca cggucgacc 19
 25
 <210> 210
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 210
 gcacauuaca cggucgaccu cuuug 25
 35
 <210> 211
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 211
 cacauuacac ggucgaccuc uu 22
 45
 <210> 212
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 212
 gcacauuaca cggucgac 18
 60
 <210> 213
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65
 <220>
 <223> Secuencia isomiR

	<400> 213 cacauuacac ggucgaccu	19
5	<210> 214 <211> 24 <212> ARN <213> Artificial	
10	<220> <223> Secuencia isomiR	
15	<400> 214 gcacauuaca cggucgaccu cuuu	24
20	<210> 215 <211> 18 <212> ARN <213> Artificial	
25	<220> <223> Secuencia isomiR	
30	<400> 215 cacauuacac ggucgacc	18
35	<210> 216 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
40	<220> <223> Secuencia isomiR	
45	<400> 216 cauuacacgg ucgaccucu	19
50	<210> 217 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial	
55	<220> <223> Secuencia isomiR	
60	<400> 217 uuauaggcgca cauuacacgg uc	22
65	<210> 218 <211> 23 <212> ARN <213> Artificial	
70	<220> <223> Secuencia isomiR	
75	<400> 218 cgacacauuac acggucgacc ucu	23
80	<210> 219 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial	
85	<220> <223> Secuencia isomiR	

	<400> 219 aggugguccg uggcgcgguuc	20
5	<210> 220 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial	
10	<220> <223> Secuencia isomiR	
15	<400> 220 aggugguccg uggcgcgguuc g	21
20	<210> 221 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial	
25	<220> <223> Secuencia isomiR	
30	<400> 221 gcugcuuggu acuuggagag	20
35	<210> 222 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
40	<220> <223> Secuencia isomiR	
45	<400> 222 aggugguccg uggcgcgguu	19
50	<210> 223 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
55	<220> <223> Secuencia isomiR	
60	<400> 223 cugcuuggua cuuggagag	19
65	<210> 224 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial	
70	<220> <223> Secuencia isomiR	
75	<400> 224 ugcugcuugg uacuuggaga g	21
80	<210> 225 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial	
85	<220> <223> Secuencia isomiR	

<400> 225
 gagguggucc guggcgguu c 21
 5
 <210> 226
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 226
 aggugguccg uggcgguuc gcu 23
 15
 <210> 227
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 227
 ggugguccgu ggcgguu 18
 25
 <210> 228
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 228
 aggugguccg uggcggu 18
 35
 <210> 229
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 229
 gagguggucc guggcgguu 20
 45
 <210> 230
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 230
 gccucaucug ucuguugggc u 21
 55
 <210> 231
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 65

<400> 231
 ccucaucugu cuguugggcu 20
 5
 <210> 232
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 232
 agccucaucu gucuguuggg cu 22
 15
 <210> 233
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 233
 cucaucuguc uguugggcu 19
 25
 <210> 234
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 234
 ucaucugucu guugggcu 18
 35
 <210> 235
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 235
 ccccgaggcg gauucacau gag 23
 45
 <210> 236
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 236
 ccucugggcc cuuccuccag c 21
 55
 <210> 237
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 65

<400> 237
 ccccgaggcg gauucacc 18
 5 <210> 238
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 238
 gccucaucug ucuguuggc 20
 15 <210> 239
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 239
 ccucaucugu cuguuggc 19
 25 <210> 240
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 240
 gugaaggcgg guggugcuca gau 23
 35 <210> 241
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 241
 gccucaucug ucuguuggg 19
 45 <210> 242
 <211> 26
 <212> ARN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 242
 ggaggcaggg ccuuugugaa ggcggg 26
 55 <210> 243
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 65

<400> 243
 agccucaucu gucuguuggg 20

5 <210> 244
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 244
 ccccgaggcg gauucaccau 20

15 <210> 245
 <211> 24
 <212> ARN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 245
 ucucacacag aaaucgcacc cguc 24

25 <210> 246
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 246
 ucucacacag aaaucgcacc cg 22

35 <210> 247
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 247
 ucacacagaa aucgcaccg uca 23

45 <210> 248
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 248
 ucucacacag aaaucgcacc cguca 25

55 <210> 249
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> Secuencia isomiR

65 <220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 249
 ucucacacag aaaucgcacc 20
 5
 <210> 250
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 250
 ucacacagaa aucgcaccg uc 22
 15
 <210> 251
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 251
 ucacacagaa aucgcaccg u 21
 25
 <210> 252
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 252
 cucacacaga aaucgcacc gu 22
 35
 <210> 253
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 253
 ucucacacag aaaucgcacc c 21
 45
 <210> 254
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 254
 cucacacaga aaucgcacc guc 23
 60
 <210> 255
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65
 <220>
 <223> Secuencia isomiR

<400> 255
 cacacagaaa ugcacccgu ca 22
 5
 <210> 256
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 256
 ucacacagaa aucgcaccg 20
 15
 <210> 257
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 257
 cucacacaga aaucgcacc g 21
 25
 <210> 258
 <211> 24
 <212> ARN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 258
 cucacacaga aaucgcacc guca 24
 35
 <210> 259
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 259
 ucucacacag aaaucgcac 19
 45
 <210> 260
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 260
 cacacagaaa ugcacccgu c 21
 55
 <210> 261
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 65

	<400> 261 acacagaaau cgcacccgu	19
5	<210> 262 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial	
10	<220> <223> Secuencia isomiR	
15	<400> 262 cacacagaaa ugcacccgu	20
20	<210> 263 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial	
25	<220> <223> Secuencia isomiR	
30	<400> 263 cucacacaga aaucgacccc	20
35	<210> 264 <211> 18 <212> ARN <213> Artificial	
40	<220> <223> Secuencia isomiR	
45	<400> 264 acagaaaucg cacccguc	18
50	<210> 265 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
55	<220> <223> Secuencia isomiR	
60	<400> 265 acagaaaucg cacccguca	19
65	<210> 266 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
70	<220> <223> Secuencia isomiR	
75	<400> 266 ucacacagaa aucgcacccc	19
80	<210> 267 <211> 18 <212> ARN <213> Artificial	
85	<220> <223> Secuencia isomiR	

<400> 267
 ucucacacag aaaucgca 18
 5 <210> 268
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 268
 gucucacaca gaaaucgcac cc 22
 15 <210> 269
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 269
 acacagaaau cgcacccguc a 21
 25 <210> 270
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Artificial
 30 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 270
 cacagaauc gcacccgu 18
 35 <210> 271
 <211> 24
 <212> ARN
 <213> Artificial
 40 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 271
 ucacacagaa aucgcacccg ucac 24
 45 <210> 272
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Artificial
 50 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 272
 ucacacagaa aucgcacc 18
 55 <210> 273
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 60 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 65

<400> 273
 cacagaauc gcacccguc 19

5 <210> 274
 <211> 26
 <212> ARN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia isomiR

15 <400> 274
 ggggugcuau cugugauuga gggaca 26

20 <210> 275
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Secuencia isomiR

30 <400> 275
 ggggugcuau cugugauuga gggac 25

35 <210> 276
 <211> 24
 <212> ARN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Secuencia isomiR

45 <400> 276
 ggggugcuau cugugauuga ggga 24

50 <210> 277
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial

55 <220>
 <223> isomiR sequence

60 <400> 277
 ggggugcuau cugugauuga gg 22

65 <210> 278
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial

70 <220>
 <223> Secuencia isomiR

75 <400> 278
 ucuaucugu gauugagga ca 22

80 <210> 279
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial

85 <220>
 <223> Secuencia isomiR

	<400> 279 aggggugcua ucugugauug agg	23
5	<210> 280 <211> 23 <212> ARN <213> Artificial	
10	<220> <223> Secuencia isomiR	
15	<400> 280 ggggugcuau cugugauuga ggg	23
20	<210> 281 <211> 27 <212> ARN <213> Artificial	
25	<220> <223> Secuencia isomiR	
25	<400> 281 aggggugcua ucugugauug agggaca	27
30	<210> 282 <211> 25 <212> ARN <213> Artificial	
35	<220> <223> Secuencia isomiR	
35	<400> 282 aggggugcua ucugugauug aggga	25
40	<210> 283 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial	
45	<220> <223> Secuencia isomiR	
45	<400> 283 ggggugcuau cugugauuga	20
50	<210> 284 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial	
55	<220> <223> Secuencia isomiR	
60	<400> 284 ugcuaucugu gauugagga c	21
60	<210> 285 <211> 23 <212> ARN <213> Artificial	
65	<220> <223> Secuencia isomiR	

	<400> 285 gggugcuauc ugugauugag gga	23
5	<210> 286 <211> 24 <212> ARN <213> Artificial	
10	<220> <223> Secuencia isomiR	
15	<400> 286 aggggugcua ucugugauug aggg	24
20	<210> 287 <211> 24 <212> ARN <213> Artificial	
25	<220> <223> Secuencia isomiR	
30	<400> 287 gggugcuauc ugugauugag ggac	24
35	<210> 288 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial	
40	<220> <223> Secuencia isomiR	
45	<400> 288 aggggugcua ucugugauug ag	22
50	<210> 289 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial	
55	<220> <223> Secuencia isomiR	
60	<400> 289 gggugcuauc ugugauugag gg	22
65	<210> 290 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial	
70	<220> <223> Secuencia isomiR	
75	<400> 290 gggugcuauc ugugauugag g	21
80	<210> 291 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial	
85	<220> <223> Secuencia isomiR	

<400> 291
 ugcuaucugu gauugagga 20
 5
 <210> 292
 <211> 25
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 292
 gggugcuauc ugugauugag ggaca 25
 15
 <210> 293
 <211> 26
 <212> ARN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 293
 aggggugcua ucugugauug agggac 26
 25
 <210> 294
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 294
 cugugaaacu gggcucaagg ug 22
 35
 <210> 295
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 295
 aggggugcua ucugugauug 20
 45
 <210> 296
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 296
 ggggugcuau cugugauuga g 21
 55
 <210> 297
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 65

<400> 297
 ugcuaucugu gauugagga cau 23
 5
 <210> 298
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 298
 cugugaaacu gggcucaagg uga 23
 15
 <210> 299
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 299
 ggugcuau cu guguagagg gac 23
 25
 <210> 300
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 300
 gugaaacugg gcucaaggug 20
 35
 <210> 301
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 301
 gggugcuau cu guguagagg 20
 45
 <210> 302
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 302
 gggugcuau cu guguagagg 19
 55
 <210> 303
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 65

<400> 303
 gcuaucugug auugaggac a 21
 5
 <210> 304
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 304
 ccugugaaac ugggcucaag gug 23
 15
 <210> 305
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 305
 gugcuaucug ugauugagg ac 22
 25
 <210> 306
 <211> 28
 <212> ARN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 306
 aggggugcua ucugugauug aggacau 28
 35
 <210> 307
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 307
 ugcaucugu gauugagg 19
 45
 <210> 308
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 308
 gggugcuauc ugugauug 18
 60
 <210> 309
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 65
 <220>
 <223> Secuencia isomiR

	<400> 309 caugguuauu ggaauguc	19
5	<210> 310 <211> 27 <212> ARN <213> Artificial	
10	<220> <223> Secuencia isomiR	
15	<400> 310 ggggugcuau cugugauuga gggacau	27
20	<210> 311 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
25	<220> <223> Secuencia isomiR	
30	<400> 311 gggugcuau ucugauuga	19
35	<210> 312 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
40	<220> <223> Secuencia isomiR	
45	<400> 312 uauucugugau ugaggaca	19
50	<210> 313 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial	
55	<220> <223> Secuencia isomiR	
60	<400> 313 gugaaacugg gcuaaggug a	21
65	<210> 314 <211> 24 <212> ARN <213> Artificial	
70	<220> <223> Secuencia isomiR	
75	<400> 314 ccugugaaac ugggcucaag guga	24
80	<210> 315 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial	
85	<220> <223> Secuencia isomiR	

	<400> 315 ggugcuaucu gugauugagg	20
5	<210> 316 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial	
10	<220> <223> Secuencia isomiR	
15	<400> 316 cuaucuguga uugaggaca	20
20	<210> 317 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
25	<220> <223> Secuencia isomiR	
30	<400> 317 ugaaacuggg cucaaggug	19
35	<210> 318 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial	
40	<220> <223> Secuencia isomiR	
45	<400> 318 ugugaaacug ggcucaaggu ga	22
50	<210> 319 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial	
55	<220> <223> Secuencia isomiR	
60	<400> 319 gcugacuccu aguccagggc u	21
65	<210> 320 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial	
70	<220> <223> Secuencia isomiR	
75	<400> 320 gcugacuccu aguccagggc	20
80	<210> 321 <211> 18 <212> ARN <213> Artificial	
85	<220> <223> Secuencia isomiR	

	<400> 321 gcugacuccu aguccagg	18
5	<210> 322 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
10	<220> <223> Secuencia isomiR	
15	<400> 322 gcugacuccu aguccaggg	19
20	<210> 323 <211> 24 <212> ARN <213> Artificial	
25	<220> <223> Secuencia isomiR	
25	<400> 323 gcugacuccu aguccagggc ucgu	24
30	<210> 324 <211> 23 <212> ARN <213> Artificial	
35	<220> <223> Secuencia isomiR	
35	<400> 324 gcugacuccu aguccagggc ucg	23
40	<210> 325 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial	
45	<220> <223> Secuencia isomiR	
45	<400> 325 cugacuccua guccagggcu	20
50	<210> 326 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
55	<220> <223> Secuencia isomiR	
60	<400> 326 cugacuccua guccagggc	19
60	<210> 327 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial	
65	<220> <223> Secuencia isomiR	

	<400> 327 cugacuccua guccagggcu c	21
5	<210> 328 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial	
10	<220> <223> Secuencia isomiR	
15	<400> 328 ugacuccuag uccagggcuc g	21
20	<210> 329 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
25	<220> <223> Secuencia isomiR	
30	<400> 329 ugacuccuag uccagggcu	19
35	<210> 330 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial	
40	<220> <223> Secuencia isomiR	
45	<400> 330 ugacuccuag uccagggcuc	20
50	<210> 331 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial	
55	<220> <223> Secuencia isomiR	
60	<400> 331 gccugaacg aggggucugg ag	22
65	<210> 332 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial	
70	<220> <223> Secuencia isomiR	
75	<400> 332 cccugaacga ggggucugga g	21
80	<210> 333 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial	
85	<220> <223> Secuencia isomiR	

	<400> 333 gcccugaacg aggggucugg a	21
5	<210> 334 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial	
10	<220> <223> Secuencia isomiR	
15	<400> 334 agugccgcca ucuuuugagu gu	22
20	<210> 335 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial	
25	<220> <223> Secuencia isomiR	
30	<400> 335 gugccgcca ucuuuugagug u	21
35	<210> 336 <211> 21 <212> ARN <213> Artificial	
40	<220> <223> Secuencia isomiR	
45	<400> 336 aagugccgcc aucuuuugag u	21
50	<210> 337 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial	
55	<220> <223> Secuencia isomiR	
60	<400> 337 agugccgcca ucuuuugagu	20
65	<210> 338 <211> 22 <212> ARN <213> Artificial	
70	<220> <223> Secuencia isomiR	
75	<400> 338 aagugccgcc aucuuuugag ug	22
80	<210> 339 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial	
85	<220> <223> Secuencia isomiR	

<400> 339
 gugccgccau cuuuugagug 20
 5
 <210> 340
 <211> 20
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 340
 ugccgccauc uuuugagugu 20
 15
 <210> 341
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 341
 agugccgccu uuuuugagu guu 23
 25
 <210> 342
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 342
 gugccgccau cuuuugagu 19
 35
 <210> 343
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 343
 acucuaacug ugggggcacu uu 22
 45
 <210> 344
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 344
 acucuaacug ugggggcacu uuc 23
 55
 <210> 345
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 65

<400> 345
 acucaaacug ugggggcacu u 21
 5
 <210> 346
 <211> 24
 <212> ARN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 346
 acucaaacug ugggggcacu uucu 24
 15
 <210> 347
 <211> 22
 <212> ARN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 347
 cucaaacugu gggggcacuu u 22
 25
 <210> 348
 <211> 19
 <212> ARN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 348
 acucaaacug ugggggcac 19
 35
 <210> 349
 <211> 23
 <212> ARN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 349
 cucaaacugu gggggcacuu ucu 23
 45
 <210> 350
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 <400> 350
 cucaaacugu gggggcacuu u 21
 55
 <210> 351
 <211> 18
 <212> ARN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 65

ES 2 688 619 T3

	<400> 351 acucaaacug ugggggca	18
5	<210> 352 <211> 20 <212> ARN <213> Artificial	
10	<220> <223> Secuencia isomiR	
15	<400> 352 cucaaacugu gggggcacuu	20
20	<210> 353 <211> 18 <212> ARN <213> Artificial	
25	<220> <223> Secuencia isomiR	
30	<400> 353 cucaaacugu gggggcac	18
35	<210> 354 <211> 19 <212> ARN <213> Artificial	
40	<220> <223> Secuencia isomiR	
45	<400> 354 cucaaacugu gggggcacu	19
50	<210> 355 <211> 58 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Secuencia complementaria al ARNm de ATM	
60	<400> 355 ccggcctgcc aacatactt aagtactcga gtacttaaag tatgtggca ggttttg	58
65	<210> 356 <211> 58 <212> ADN <213> Artificial	
70	<220> <223> Secuencia complementaria al ARNm de ATM	
75	<400> 356 ccgggcactg aaagaggatc gtaaactcga gtttacgatc ctcttcagt gcttttg	58
80	<210> 357 <211> 58 <212> ADN <213> Artificial	
85	<220> <223> Secuencia complementaria al ARNm de ATM	

ES 2 688 619 T3

<400> 357
 ccggcgtgtc ttaatgagac tacaactcga gttgtagtct cattaagaca cgtttttg 58

5 <210> 358
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Secuencia complementaria al ARNm de ATM

15 <400> 358
 ccgggccata attcaggga gtttactcga gtaaactacc ctgaattatg gctttttg 58

20 <210> 359
 <211> 58
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Secuencia complementaria al ARNm de ATM

30 <400> 359
 ccgggccgtc aactagaaca tgatactcga gtatcatggt ctagtgacg gctttttg 58

<210> 360
 <211> 9385
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400>360

gcgagaggag tcgggatctg cgctgcagcc accgccgcgg ttgatactac tttgaccttc	60
cgagtgcagt gaggcataca tcacaatttg gaattatgca ttggtttatac aatttacttg	120
tttattgtca ccctgctgcc cagatatgac ttcattgagga cagtgatgtg tgttctgaaa	180
ttgtgaacca tgagtctagt acttaatgat ctgcttatct gctgccgtca actagaacat	240
gatagagcta cagaacgaaa gaaagaagtt gagaaattta agcgcctgat tcgagatcct	300
gaaacaatta aacatctaga tcggcattca gattcctaac aaggaaaata tttgaattgg	360
gatgctgttt ttagatTTTT acagaaatat attcagaaag aaacagaatg tctgagaata	420
gcaaaaccaa atgtatcagc ctcaacacaa gcctccaggc agaaaaagat gcaggaaatc	480
agtagtttgg tcaaatactt catcaaatgt gcaaacagaa gagcacctag gctaaaatgt	540
caagaactct taaattatat catggataca gtgaaagatt catctaattg tgctatttac	600
ggagctgatt gtagcaacat actactcaa gacattcttt ctgtgagaaa atactggtgt	660

ES 2 688 619 T3

gaaatatctc agcaacagtg gttagaattg ttctctgtgt acttcaggct ctatctgaaa 720
 ccttcacaag atgttcatag agtttttagtg gctagaataa ttcattgctgt taccaaagga 780
 tgctgttctc agactgacgg attaaattcc aaattttttg actttttttc caaggctatt 840
 cagtgtgcga gacaagaaaa gagctcttca ggtctaaatc atatcttagc agctcttact 900
 atcttctca agactttggc tgtcaacttt cgaattcgag tgtgtgaatt aggagatgaa 960
 attcttccca ctttgcttta tatttgact caacataggc ttaatgattc tttaaaagaa 1020
 gtcattattg aattatttca actgcaaatt tataatccatc atccgaaagg agccaaaacc 1080
 caagaaaaag gtgcttatga atcaacaaaa tggagaagta ttttatacaa cttatatgat 1140
 ctgctagtga atgagataag tcatatagga agtagaggaa agtattcttc aggatttcgt 1200
 aatattgccg tcaaagaaaa tttgattgaa ttgatggcag atatctgtca ccaggttttt 1260
 aatgaagata ccagatcctt ggagatttct caatcttaca ctactacaca aagagaatct 1320
 agtgattaca gtgtcccttg caaaaggaag aaaatagaac taggctggga agtaataaaa 1380
 gatcaccttc agaagtcaca gaatgatttt gatcttgtgc cttggctaca gattgcaacc 1440
 caattaatat caaagtatcc tgcaagtta cctaactgtg agctgtctcc attactgatg 1500
 atactatctc agcttctacc ccaacagcga catggggaac gtacaccata tgtgttacga 1560
 tgccttacgg aagttgcatt gtgtcaagac aagaggtcaa acctagaaag ctcacaaaag 1620
 tcagatttat taaaactctg gaataaaatt tgggtgatta cctttcgtgg tataagtctt 1680
 gagcaatac aagctgaaa ctttggctta cttggagcca taattcaggg tagtttagtt 1740
 gaggtgaca gagaattctg gaagttattt actgggtcag cctgcagacc ttcattgcct 1800
 gcagtatgct gtttgacttt ggcaactgacc accagtatag ttccaggagc ggtaaaaatg 1860
 ggaatagagc aaaatatgtg tgaagtaaat agaagctttt ctttaaagga atcaataatg 1920
 aatggctctt tattctatca gttagagggt gacttagaaa atagcacaga agtgcctcca 1980
 attcttcaca gtaattttcc tcatcttgta ctggagaaaa ttcttgtgag tctcactatg 2040
 aaaaactgta aagctgcaat gaattttttc caaagcgtgc cagaatgtga acaccaccaa 2100
 aaagataaag aagaactttc attctcagaa gtagaagaac tatttcttca gacaactttt 2160
 gacaagatgg actttttaa cttgtgaga gaatgtgga tagaaaagca ccagtccagt 2220
 attggcttct ctgtccacca gaatctcaag gaatcactgg atcgctgtct tctgggatta 2280
 tcagaacagc ttctgaataa ttactcatct gagattacaa attcagaaac tcttgtccgg 2340
 tgttcacgtc ttttggggg tgccttggc tgctactgtt acatgggtgt aatagctgaa 2400
 gaggaagcat ataagtcaga attattccag aaagccaact ctctaagca atgtgcagga 2460
 gaaagtatca ctctgtttaa aaataagaca aatgaggaat tcagaattgg ttccttgaga 2520

ES 2 688 619 T3

aatatgatgc agctatgtac acgttgcttg agcaactgta ccaagaagag tccaaataag 2580
attgcatctg gctttttcct gcgattgta acatcaaagc taatgaatga cattgcagat 2640
atgtgtaaaa gtttagcatc cttcatcaaa aagccatttg accgtggaga agtagaatca 2700
atggaagatg atactaatgg aaatctaag gaggtggagg atcagtcac catgaatcta 2760
tttaacgatt accctgatag tagtgttagt gatgcaaacg aacctggaga gagccaaagt 2820
accataggtg ccattaatcc tttagctgaa gaatatctgt caaagcaaga tctacttttc 2880
ttagacatgc tcaagttcct gtgtttgtgt gtaactactg ctcagaccaa tactgtgtcc 2940
tttagggcag ctgatattcg gaggaaattg ttaatgttaa ttgattctag cacgctagaa 3000
cctaccaaat ccctccacct gcatatgtat ctaatgcttt taaaggagct tcctggagaa 3060
gagtaccctc tgccaatgga agatgttctt gaacttctga aaccactatc caatgtgtgt 3120
tctttgtatc gtcgtgacca agatgtttgt aaaactatct taaaccatgt cttcatgta 3180
gtgaaaaacc taggtcaaag caatatggac tctgagaaca caagggatgc tcaaggacag 3240
tttcttacag taattggagc attttgcat ctaacaaagg agaggaaata tatattctct 3300
gtaagaatgg ccctagtaaa ttgccttaa actttgcttg aggctgatcc ttattcaaaa 3360
tgggccattc ttaatgtaat gggaaaagac tttcctgtaa atgaagtatt tacacaattt 3420
cttgctgaca atcatacca agttcgcagc ttggctgcag agtcaatcaa tagattgttc 3480
caggacacga agggagattc ttccaggta ctgaaagcac ttcctttgaa gcttcagcaa 3540
acagcttttg aaaatgcata cttgaaagct caggaaggaa tgagagaaat gtcccatagt 3600
gctgagaacc ctgaaacttt ggatgaaatt tataatagaa aatctgtttt actgacgttg 3660
atagctgtgg ttttatcctg tagccctatc tgcgaaaaac aggcctttgtt tgcctgtgt 3720
aaatctgtga aagagaatgg attagaacct caccttgtga aaaaggtttt agagaaagtt 3780
tctgaaactt ttggatatag acgttttaga gactttatgg catctcattt agattatctg 3840
gttttggaat ggctaaatct tcaagatact gaatacaact tatcttcttt tccttttatt 3900
ttattaaact acacaaatat tgaggatttc tatagatctt gttataaggt tttgattcca 3960
catctggtga ttagaagtca ttttgatgag gtgaagtcca ttgctaatca gattcaagag 4020
gactggaaaa gtcttctaac agactgcttt ccaaagattc ttgtaaatat tcttccttat 4080
tttgctatg agggtagcag agacagtggg atggcacagc aaagagagac tgctaccaag 4140
gtctatgata tgcttaaaag tgaaaactta ttgggaaaac agattgatca cttattcatt 4200
agtaatttac cagagattgt ggtggagtta ttgatgacgt tacatgagcc agcaaattct 4260
agtgccagtc agagcactga cctctgtgac ttttcagggg atttggatcc tgctccta 4320
ccacctcatt ttccatcgca tgtgattaaa gcaacatttg cctatatcag caattgtcat 4380
aaaaccaagt taaaaagcat tttagaaatt ctttccaaaa gccctgattc ctatcagaaa 4440

ES 2 688 619 T3

attcttcttg ccatatgtga gcaagcagct gaaacaaata atgtttataa gaagcacaga 4500
 attcttaaaa tatatcacct gtttgttagt ttattactga aagatataaa aagtggctta 4560
 ggaggagcctt gggcctttgt tcttcgagac gttatttata ctttgattca ctatatcaac 4620
 caaagcctt cttgtatcat ggatgtgtca ttacgtagct tctccctttg ttgtgactta 4680
 ttaagtcagg tttgccagac agccgtgact tactgttaagg atgctctaga aaacatctt 4740
 catgttattg ttggtacact tatacccctt gtgtatgagc aggtggaggt tcagaaacag 4800
 gtattggact tgttgaaata cttagtata gataacaagg ataatgaaaa cctctatatac 4860
 acgattaagc ttttagatcc ttttcctgac catgttgttt ttaaggattt gcgtattact 4920
 cagcaaaaaa tcaaatacag tagaggacc ttttctactct tggaggaaat taaccatttt 4980
 ctctcagtaa gtgtttatga tgcacttcca ttgacaagac ttgaaggact aaaggatctt 5040
 cgaagacaac tggaactaca taaagatcag atggtggaca ttatgagagc ttctcaggat 5100
 aatccgcaag atgggattat ggtgaaacta gttgtcaatt tgttgacagtt atccaagatg 5160
 gcaataaacc aactgggtga aaaagaagt cttagaggctg ttggaagctg cttgggagaa 5220
 gtgggtccta tagatttctc taccatagct atacaacata gtaaagatgc atcttatacc 5280
 aaggccctta agttatttga agataaagaa cttcagtga ccttcataat gctgacctac 5340
 ctgaataaca cactggtaga agattgtgtc aaagtctgat cagcagctgt tacctgtttg 5400
 aaaaacattt tagccacaaa gactggacat agtttctggg agatttataa gatgacaaca 5460
 gatccaatgc tggcctatct acagcctttt agaacatcaa gaaaaaagt tttagaagta 5520
 cccagatttg acaagaaaa cccttttgaa ggccctggatg atataaatct gtggattcct 5580
 ctaagtgaat atcatgacat ttggataaag aactgactt gtgctttttt ggacagtggg 5640
 ggcacaaaat gtgaaattct tcaattatta aagccaatgt gtgaagtga aactgacttt 5700
 tgtcagactg tacttccata cttgattcat gatattttac tccaagatac aaatgaatca 5760
 tggagaaatc tgctttctac acatgttcag ggatttttca ccagctgtct tcgacacttc 5820
 tcgcaaacga gccgatccac aaccctgca aacttgatt cagagtcaga gcactttttc 5880
 cgatgctgtt ttgataaaaa atcacaaaga acaatgcttg ctgttgggga ctacatgaga 5940
 agacaaaaga gaccttcttc aggaacaatt tttaatgatg ctttctggct ggatttaaat 6000
 tatctagaag ttgccaaagg agctcagtct tgtgctgctc actttacagc tttactctat 6060
 gcagaaatct atgcagataa gaaaagtatg gatgatcaag agaaaagaag tcttgcat 6120
 gaagaaggaa gccagagtac aactatttct agcttgagtg aaaaaagtaa agaagaaact 6180
 ggaataagtt tacaggatct tctcttagaa atctacagaa gtatagggga gccagatagt 6240
 ttgtatggct gtggtggagg gaagatgtta caaccatta ctagactacg aacatataa 6300

ES 2 688 619 T3

cacgaagcaa tgtggggcaa agccctagta acatatgacc tcgaaacagc aatcccctca 6360
tcaacacgcc aggcaggaat cattcaggcc ttgcagaatt tgggactctg ccatattctt 6420
tccgtctatt taaaaggatt ggattatgaa aataaagact ggtgtcctga actagaagaa 6480
cttcattacc aagcagcatg gaggaatatg cagtgggacc attgcacttc cgtcagcaaa 6540
gaagtagaag gaaccagtta ccatgaatca ttgtacaatg ctctacaatc tctaagagac 6600
agagaattct ctacatttta tgaaagtctc aaatatgcca gagtaaaaga agtggagag 6660
atgtgtaagc gcagccttga gtctgtgtat tcgctctatc ccacacttag caggttgcag 6720
gccattggag agctggaaag cattggggag cttttctcaa gatcagtcac acatagacaa 6780
ctctctgaag tatatattaa gtggcagaaa cactcccagc ttctcaagga cagtgathtt 6840
agttttcagg agcctatcat ggctctacgc acagtcatth tggagatcct gatggaaaag 6900
gaaatggaca actcaciaag agaattgatt aaggacattc tcaccaaaca cctttagaa 6960
ctctctatac tggccagaac tttcaagaac actcagctcc ctgaaagggc aatatttcaa 7020
attaacagt acaattcagt tagctgtgga gtctctgagt ggagctgga agaagcacia 7080
gtattctggg caaaaaagga gcagagtctt gccctgagta ttctcaagca aatgatcaag 7140
aagttggatg ccagctgtgc agcgaacaat cccagcctaa aacttacata cacagaatgt 7200
ctgagggttt gtggcaactg gttagcagaa acgtgcttag aaaatcctgc ggtcatcatg 7260
cagacctatc tagaaaaggc agtagaagtt gctggaaatt atgatggaga aagtagtgat 7320
gagctaagaa atggaaaaat gaaggcattt ctctcattag cccggttttc agatactcaa 7380
taccaaagaa ttgaaaacta catgaaatca tcggaatttg aaaacaagca agctctcctg 7440
aaaagagcca aagaggaagt aggtctcctt agggaacata aaattcagac aaacagatac 7500
acagtaaagg ttcagcgaga gctggagttg gatgaattag ccctgcgtgc actgaaagag 7560
gatcgtaaac gtttcttatg taaagcagtt gaaaattata tcaactgctt attaagtgga 7620
gaagaacatg atatgtgggt attccggctt tgttccctct ggcttgaaaa ttctggagtt 7680
tctgaagtca atggcatgat gaagagagac ggaatgaaga ttccaacata taaatttttg 7740
cctcttatgt accaattggc tgctagaatg gggaccaaga tgatgggagg cctaggattt 7800
catgaagtcc tcaataatct aatctctaga atttcaatgg atcaccccca tcacactttg 7860
tttattatac tggccttagc aaatgcaaac agagatgaat ttctgactaa accagaggta 7920
gccagaagaa gcagaataac taaaaatgtg cctaaacaaa gctctcagct tgatgaggat 7980
cgaacagagg ctgcaaatag aataatatgt actatcagaa gtaggagacc tcagatggtc 8040
agaagtgttg aggcactttg tgatgcttat attatattag caaacttaga tgccactcag 8100
tggaagactc agagaaaagg cataaatatt ccagcagacc agccaattac taaacttaag 8160
aatttagaag atgtttgtgt ccctactatg gaaattaag tggaccacac aggagaatat 8220

ES 2 688 619 T3

ggaaatctgg tgactataca gtcatttaaa gcagaatttc gcttagcagg aggtgtaaat 8280
 ttaccaaaaa taatagattg tntaggttcc gatggcaagg agaggagaca gcttgtaag 8340
 ggccgtgatg acctgagaca agatgctgtc atgcaacagg tcttccagat gtgtaataca 8400
 ttactgcaga gaaacacgga aactaggaag aggaaattaa ctatctgtac ttataagggtg 8460
 gttcccctct ctcagcgaag tgggttctt gaatggtgca caggaactgt cccattggt 8520
 gaatttcttg ttaacaatga agatggtgct cataaaagat acaggccaaa tgatttcagt 8580
 gcctttcagt gccaaaagaa aatgatggag gtgcaaaaa agtcttttga agagaaatat 8640
 gaagtcttca tggatgttg ccaaaattt caaccagttt tccgttactt ctgcatggaa 8700
 aaattcttgg atccagctat ttggttgag aagcgattgg cttatacgcg cagtgtagct 8760
 acttcttcta ttgttggtta catacttga cttggtgata gacatgtaca gaatatcttg 8820
 ataaatgagc agtcagcaga acttgtacat atagatctag gtgttgcttt tgaacagggc 8880
 aaaatccttc ctactcctga gacagttcct tttagactca ccagagatat tgtggatggc 8940
 atgggcatta cgggtgttga aggtgtcttc agaagatgct gtgagaaaac catggaagtg 9000
 atgagaaact ctcaggaac tctgttaacc attgtagagg tccttctata tgatccactc 9060
 tttgactgga ccatgaatcc tttgaaagct ttgtatttac agcagaggcc ggaagatgaa 9120
 actgagcttc accctactct gaatgcagat gaccaagaat gcaaacgaaa tctcagtgat 9180
 attgaccaga gtttcgacaa agtagctgaa cgtgtcttaa tgagactaca agagaaactg 9240
 aaaggagtgg aagaaggcac tgtgctcagt gttggtggac aggtgaattt gctcatacag 9300
 caggccatag accccaaaaa tctcagccga ctttccag gatgaaagc ttgggtgtga 9360
 tcttcagtat atgaattacc ctttc 9385

<210> 361
 <211> 6112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 361

Met Ser Leu Val Leu Asn Asp Leu Leu Ile Cys Cys Arg Gln Leu Glu
 1 5 10 15

His Asp Arg Ala Thr Glu Arg Lys Lys Glu Val Glu Lys Phe Lys Arg
 20 25 30

Leu Ile Arg Asp Pro Glu Thr Ile Lys His Leu Asp Arg His Ser Asp
 35 40 45

Ser Lys Gln Gly Lys Tyr Leu Asn Trp Asp Ala Val Phe Arg Phe Leu
 50 55 60

10

ES 2 688 619 T3

Gln Lys Tyr Ile Gln Lys Glu Thr Glu Cys Leu Arg Ile Ala Lys Pro
65 70 75 80

Asn Val Ser Ala Ser Thr Gln Ala Ser Arg Gln Lys Lys Met Gln Glu
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Val Lys Tyr Phe Ile Lys Cys Ala Asn Arg Arg Ala
100 105 110

Pro Arg Leu Lys Cys Gln Glu Leu Leu Asn Tyr Ile Met Asp Thr Val
115 120 125

Lys Asp Ser Ser Asn Gly Ala Ile Tyr Gly Ala Asp Cys Ser Asn Ile
130 135 140

Leu Leu Lys Asp Ile Leu Ser Val Arg Lys Tyr Trp Cys Glu Ile Ser
145 150 155 160

Gln Gln Gln Trp Leu Glu Leu Phe Ser Val Tyr Phe Arg Leu Tyr Leu
165 170 175

Lys Pro Ser Gln Asp Val His Arg Val Leu Val Ala Arg Ile Ile His
180 185 190

Ala Val Thr Lys Gly Cys Cys Ser Gln Thr Asp Gly Leu Asn Ser Lys
195 200 205

Phe Leu Asp Phe Phe Ser Lys Ala Ile Gln Cys Ala Arg Gln Glu Lys
210 215 220

Ser Ser Ser Gly Leu Asn His Ile Leu Ala Ala Leu Thr Ile Phe Leu
225 230 235 240

Lys Thr Leu Ala Val Asn Phe Arg Ile Arg Val Cys Glu Leu Gly Asp
245 250 255

Glu Ile Leu Pro Thr Leu Leu Tyr Ile Trp Thr Gln His Arg Leu Asn
260 265 270

Asp Ser Leu Lys Glu Val Ile Ile Glu Leu Phe Gln Leu Gln Ile Tyr
275 280 285

Ile His His Pro Lys Gly Ala Lys Thr Gln Glu Lys Gly Ala Tyr Glu
290 295 300

Ser Thr Lys Trp Arg Ser Ile Leu Tyr Asn Leu Tyr Asp Leu Leu Val

ES 2 688 619 T3

Gln Asn Met Cys Glu Val Asn Arg Ser Phe Ser Leu Lys Glu Ser Ile
565 570 575

Met Lys Trp Leu Leu Phe Tyr Gln Leu Glu Gly Asp Leu Glu Asn Ser
580 585 590

Thr Glu Val Pro Pro Ile Leu His Ser Asn Phe Pro His Leu Val Leu
595 600 605

Glu Lys Ile Leu Val Ser Leu Thr Met Lys Asn Cys Lys Ala Ala Met
610 615 620

Asn Phe Phe Gln Ser Val Pro Glu Cys Glu His His Gln Lys Asp Lys
625 630 635 640

Glu Glu Leu Ser Phe Ser Glu Val Glu Glu Leu Phe Leu Gln Thr Thr
645 650 655

Phe Asp Lys Met Asp Phe Leu Thr Ile Val Arg Glu Cys Gly Ile Glu
660 665 670

Lys His Gln Ser Ser Ile Gly Phe Ser Val His Gln Asn Leu Lys Glu
675 680 685

Ser Leu Asp Arg Cys Leu Leu Gly Leu Ser Glu Gln Leu Leu Asn Asn
690 695 700

Tyr Ser Ser Glu Ile Thr Asn Ser Glu Thr Leu Val Arg Cys Ser Arg
705 710 715 720

Leu Leu Val Gly Val Leu Gly Cys Tyr Cys Tyr Met Gly Val Ile Ala
725 730 735

Glu Glu Glu Ala Tyr Lys Ser Glu Leu Phe Gln Lys Ala Asn Ser Leu
740 745 750

Met Gln Cys Ala Gly Glu Ser Ile Thr Leu Phe Lys Asn Lys Thr Asn
755 760 765

Glu Glu Phe Arg Ile Gly Ser Leu Arg Asn Met Met Gln Leu Cys Thr
770 775 780

Arg Cys Leu Ser Asn Cys Thr Lys Lys Ser Pro Asn Lys Ile Ala Ser
785 790 795 800

Gly Phe Phe Leu Arg Leu Leu Thr Ser Lys Leu Met Asn Asp Ile Ala
805 810 815

ES 2 688 619 T3

Asp Ile Cys Lys Ser Leu Ala Ser Phe Ile Lys Lys Pro Phe Asp Arg
 820 825 830
 Gly Glu Val Glu Ser Met Glu Asp Asp Thr Asn Gly Asn Leu Met Glu
 835 840 845
 Val Glu Asp Gln Ser Ser Met Asn Leu Phe Asn Asp Tyr Pro Asp Ser
 850 855 860
 Ser Val Ser Asp Ala Asn Glu Pro Gly Glu Ser Gln Ser Thr Ile Gly
 865 870 875 880
 Ala Ile Asn Pro Leu Ala Glu Glu Tyr Leu Ser Lys Gln Asp Leu Leu
 885 890 895
 Phe Leu Asp Met Leu Lys Phe Leu Cys Leu Cys Val Thr Thr Ala Gln
 900 905 910
 Thr Asn Thr Val Ser Phe Arg Ala Ala Asp Ile Arg Arg Lys Leu Leu
 915 920 925
 Met Leu Ile Asp Ser Ser Thr Leu Glu Pro Thr Lys Ser Leu His Leu
 930 935 940
 His Met Tyr Leu Met Leu Leu Lys Glu Leu Pro Gly Glu Glu Tyr Pro
 945 950 955 960
 Leu Pro Met Glu Asp Val Leu Glu Leu Leu Lys Pro Leu Ser Asn Val
 965 970 975
 Cys Ser Leu Tyr Arg Arg Asp Gln Asp Val Cys Lys Thr Ile Leu Asn
 980 985 990
 His Val Leu His Val Val Lys Asn Leu Gly Gln Ser Asn Met Asp Ser
 995 1000 1005
 Glu Asn Thr Arg Asp Ala Gln Gly Gln Phe Leu Thr Val Ile Gly
 1010 1015 1020
 Ala Phe Trp His Leu Thr Lys Glu Arg Lys Tyr Ile Phe Ser Val
 1025 1030 1035
 Arg Met Ala Leu Val Asn Cys Leu Lys Thr Leu Leu Glu Ala Asp
 1040 1045 1050
 Pro Tyr Ser Lys Trp Ala Ile Leu Asn Val Met Gly Lys Asp Phe
 1055 1060 1065

ES 2 688 619 T3

Pro Val Asn Glu Val Phe Thr Gln Phe Leu Ala Asp Asn His His
 1070 1075 1080

Gln Val Arg Met Leu Ala Ala Glu Ser Ile Asn Arg Leu Phe Gln
 1085 1090 1095

Asp Thr Lys Gly Asp Ser Ser Arg Leu Leu Lys Ala Leu Pro Leu
 1100 1105 1110

Lys Leu Gln Gln Thr Ala Phe Glu Asn Ala Tyr Leu Lys Ala Gln
 1115 1120 1125

Glu Gly Met Arg Glu Met Ser His Ser Ala Glu Asn Pro Glu Thr
 1130 1135 1140

Leu Asp Glu Ile Tyr Asn Arg Lys Ser Val Leu Leu Thr Leu Ile
 1145 1150 1155

Ala Val Val Leu Ser Cys Ser Pro Ile Cys Glu Lys Gln Ala Leu
 1160 1165 1170

Phe Ala Leu Cys Lys Ser Val Lys Glu Asn Gly Leu Glu Pro His
 1175 1180 1185

Leu Val Lys Lys Val Leu Glu Lys Val Ser Glu Thr Phe Gly Tyr
 1190 1195 1200

Arg Arg Leu Glu Asp Phe Met Ala Ser His Leu Asp Tyr Leu Val
 1205 1210 1215

Leu Glu Trp Leu Asn Leu Gln Asp Thr Glu Tyr Asn Leu Ser Ser
 1220 1225 1230

Phe Pro Phe Ile Leu Leu Asn Tyr Thr Asn Ile Glu Asp Phe Tyr
 1235 1240 1245

Arg Ser Cys Tyr Lys Val Leu Ile Pro His Leu Val Ile Arg Ser
 1250 1255 1260

His Phe Asp Glu Val Lys Ser Ile Ala Asn Gln Ile Gln Glu Asp
 1265 1270 1275

Trp Lys Ser Leu Leu Thr Asp Cys Phe Pro Lys Ile Leu Val Asn
 1280 1285 1290

Ile Leu Pro Tyr Phe Ala Tyr Glu Gly Thr Arg Asp Ser Gly Met

ES 2 688 619 T3

1295						1300								1305
Ala	Gln	Gln	Arg	Glu	Thr	Ala	Thr	Lys	Val	Tyr	Asp	Met	Leu	Lys
1310						1315					1320			
Ser	Glu	Asn	Leu	Leu	Gly	Lys	Gln	Ile	Asp	His	Leu	Phe	Ile	Ser
1325						1330					1335			
Asn	Leu	Pro	Glu	Ile	Val	Val	Glu	Leu	Leu	Met	Thr	Leu	His	Glu
1340						1345					1350			
Pro	Ala	Asn	Ser	Ser	Ala	Ser	Gln	Ser	Thr	Asp	Leu	Cys	Asp	Phe
1355						1360					1365			
Ser	Gly	Asp	Leu	Asp	Pro	Ala	Pro	Asn	Pro	Pro	His	Phe	Pro	Ser
1370						1375					1380			
His	Val	Ile	Lys	Ala	Thr	Phe	Ala	Tyr	Ile	Ser	Asn	Cys	His	Lys
1385						1390					1395			
Thr	Lys	Leu	Lys	Ser	Ile	Leu	Glu	Ile	Leu	Ser	Lys	Ser	Pro	Asp
1400						1405					1410			
Ser	Tyr	Gln	Lys	Ile	Leu	Leu	Ala	Ile	Cys	Glu	Gln	Ala	Ala	Glu
1415						1420					1425			
Thr	Asn	Asn	Val	Tyr	Lys	Lys	His	Arg	Ile	Leu	Lys	Ile	Tyr	His
1430						1435					1440			
Leu	Phe	Val	Ser	Leu	Leu	Leu	Lys	Asp	Ile	Lys	Ser	Gly	Leu	Gly
1445						1450					1455			
Gly	Ala	Trp	Ala	Phe	Val	Leu	Arg	Asp	Val	Ile	Tyr	Thr	Leu	Ile
1460						1465					1470			
His	Tyr	Ile	Asn	Gln	Arg	Pro	Ser	Cys	Ile	Met	Asp	Val	Ser	Leu
1475						1480					1485			
Arg	Ser	Phe	Ser	Leu	Cys	Cys	Asp	Leu	Leu	Ser	Gln	Val	Cys	Gln
1490						1495					1500			
Thr	Ala	Val	Thr	Tyr	Cys	Lys	Asp	Ala	Leu	Glu	Asn	His	Leu	His
1505						1510					1515			
Val	Ile	Val	Gly	Thr	Leu	Ile	Pro	Leu	Val	Tyr	Glu	Gln	Val	Glu
1520						1525					1530			

ES 2 688 619 T3

Val Gln Lys Gln Val Leu Asp Leu Leu Lys Tyr Leu Val Ile Asp
 1535 1540 1545

Asn Lys Asp Asn Glu Asn Leu Tyr Ile Thr Ile Lys Leu Leu Asp
 1550 1555 1560

Pro Phe Pro Asp His Val Val Phe Lys Asp Leu Arg Ile Thr Gln
 1565 1570 1575

Gln Lys Ile Lys Tyr Ser Arg Gly Pro Phe Ser Leu Leu Glu Glu
 1580 1585 1590

Ile Asn His Phe Leu Ser Val Ser Val Tyr Asp Ala Leu Pro Leu
 1595 1600 1605

Thr Arg Leu Glu Gly Leu Lys Asp Leu Arg Arg Gln Leu Glu Leu
 1610 1615 1620

His Lys Asp Gln Met Val Asp Ile Met Arg Ala Ser Gln Asp Asn
 1625 1630 1635

Pro Gln Asp Gly Ile Met Val Lys Leu Val Val Asn Leu Leu Gln
 1640 1645 1650

Leu Ser Lys Met Ala Ile Asn His Thr Gly Glu Lys Glu Val Leu
 1655 1660 1665

Glu Ala Val Gly Ser Cys Leu Gly Glu Val Gly Pro Ile Asp Phe
 1670 1675 1680

Ser Thr Ile Ala Ile Gln His Ser Lys Asp Ala Ser Tyr Thr Lys
 1685 1690 1695

Ala Leu Lys Leu Phe Glu Asp Lys Glu Leu Gln Trp Thr Phe Ile
 1700 1705 1710

Met Leu Thr Tyr Leu Asn Asn Thr Leu Val Glu Asp Cys Val Lys
 1715 1720 1725

Val Arg Ser Ala Ala Val Thr Cys Leu Lys Asn Ile Leu Ala Thr
 1730 1735 1740

Lys Thr Gly His Ser Phe Trp Glu Ile Tyr Lys Met Thr Thr Asp
 1745 1750 1755

Pro Met Leu Ala Tyr Leu Gln Pro Phe Arg Thr Ser Arg Lys Lys
 1760 1765 1770

ES 2 688 619 T3

Phe Leu Glu Val Pro Arg Phe Asp Lys Glu Asn Pro Phe Glu Gly
 1775 1780 1785
 Leu Asp Asp Ile Asn Leu Trp Ile Pro Leu Ser Glu Asn His Asp
 1790 1795 1800
 Ile Trp Ile Lys Thr Leu Thr Cys Ala Phe Leu Asp Ser Gly Gly
 1805 1810 1815
 Thr Lys Cys Glu Ile Leu Gln Leu Leu Lys Pro Met Cys Glu Val
 1820 1825 1830
 Lys Thr Asp Phe Cys Gln Thr Val Leu Pro Tyr Leu Ile His Asp
 1835 1840 1845
 Ile Leu Leu Gln Asp Thr Asn Glu Ser Trp Arg Asn Leu Leu Ser
 1850 1855 1860
 Thr His Val Gln Gly Phe Phe Thr Ser Cys Leu Arg His Phe Ser
 1865 1870 1875
 Gln Thr Ser Arg Ser Thr Thr Pro Ala Asn Leu Asp Ser Glu Ser
 1880 1885 1890
 Glu His Phe Phe Arg Cys Cys Leu Asp Lys Lys Ser Gln Arg Thr
 1895 1900 1905
 Met Leu Ala Val Val Asp Tyr Met Arg Arg Gln Lys Arg Pro Ser
 1910 1915 1920
 Ser Gly Thr Ile Phe Asn Asp Ala Phe Trp Leu Asp Leu Asn Tyr
 1925 1930 1935
 Leu Glu Val Ala Lys Val Ala Gln Ser Cys Ala Ala His Phe Thr
 1940 1945 1950
 Ala Leu Leu Tyr Ala Glu Ile Tyr Ala Asp Lys Lys Ser Met Asp
 1955 1960 1965
 Asp Gln Glu Lys Arg Ser Leu Ala Phe Glu Glu Gly Ser Gln Ser
 1970 1975 1980
 Thr Thr Ile Ser Ser Leu Ser Glu Lys Ser Lys Glu Glu Thr Gly
 1985 1990 1995
 Ile Ser Leu Gln Asp Leu Leu Leu Glu Ile Tyr Arg Ser Ile Gly
 2000 2005 2010

ES 2 688 619 T3

Glu Pro Asp Ser Leu Tyr Gly Cys Gly Gly Gly Lys Met Leu Gln
 2015 2020 2025
 Pro Ile Thr Arg Leu Arg Thr Tyr Glu His Glu Ala Met Trp Gly
 2030 2035 2040
 Lys Ala Leu Val Thr Tyr Asp Leu Glu Thr Ala Ile Pro Ser Ser
 2045 2050 2055
 Thr Arg Gln Ala Gly Ile Ile Gln Ala Leu Gln Asn Leu Gly Leu
 2060 2065 2070
 Cys His Ile Leu Ser Val Tyr Leu Lys Gly Leu Asp Tyr Glu Asn
 2075 2080 2085
 Lys Asp Trp Cys Pro Glu Leu Glu Glu Leu His Tyr Gln Ala Ala
 2090 2095 2100
 Trp Arg Asn Met Gln Trp Asp His Cys Thr Ser Val Ser Lys Glu
 2105 2110 2115
 Val Glu Gly Thr Ser Tyr His Glu Ser Leu Tyr Asn Ala Leu Gln
 2120 2125 2130
 Ser Leu Arg Asp Arg Glu Phe Ser Thr Phe Tyr Glu Ser Leu Lys
 2135 2140 2145
 Tyr Ala Arg Val Lys Glu Val Glu Glu Met Cys Lys Arg Ser Leu
 2150 2155 2160
 Glu Ser Val Tyr Ser Leu Tyr Pro Thr Leu Ser Arg Leu Gln Ala
 2165 2170 2175
 Ile Gly Glu Leu Glu Ser Ile Gly Glu Leu Phe Ser Arg Ser Val
 2180 2185 2190
 Thr His Arg Gln Leu Ser Glu Val Tyr Ile Lys Trp Gln Lys His
 2195 2200 2205
 Ser Gln Leu Leu Lys Asp Ser Asp Phe Ser Phe Gln Glu Pro Ile
 2210 2215 2220
 Met Ala Leu Arg Thr Val Ile Leu Glu Ile Leu Met Glu Lys Glu
 2225 2230 2235
 Met Asp Asn Ser Gln Arg Glu Cys Ile Lys Asp Ile Leu Thr Lys

ES 2 688 619 T3

2240							2245							2250
His	Leu	Val	Glu	Leu	Ser	Ile	Leu	Ala	Arg	Thr	Phe	Lys	Asn	Thr
2255						2260					2265			
Gln	Leu	Pro	Glu	Arg	Ala	Ile	Phe	Gln	Ile	Lys	Gln	Tyr	Asn	Ser
2270						2275					2280			
Val	Ser	Cys	Gly	Val	Ser	Glu	Trp	Gln	Leu	Glu	Glu	Ala	Gln	Val
2285						2290					2295			
Phe	Trp	Ala	Lys	Lys	Glu	Gln	Ser	Leu	Ala	Leu	Ser	Ile	Leu	Lys
2300						2305					2310			
Gln	Met	Ile	Lys	Lys	Leu	Asp	Ala	Ser	Cys	Ala	Ala	Asn	Asn	Pro
2315						2320					2325			
Ser	Leu	Lys	Leu	Thr	Tyr	Thr	Glu	Cys	Leu	Arg	Val	Cys	Gly	Asn
2330						2335					2340			
Trp	Leu	Ala	Glu	Thr	Cys	Leu	Glu	Asn	Pro	Ala	Val	Ile	Met	Gln
2345						2350					2355			
Thr	Tyr	Leu	Glu	Lys	Ala	Val	Glu	Val	Ala	Gly	Asn	Tyr	Asp	Gly
2360						2365					2370			
Glu	Ser	Ser	Asp	Glu	Leu	Arg	Asn	Gly	Lys	Met	Lys	Ala	Phe	Leu
2375						2380					2385			
Ser	Leu	Ala	Arg	Phe	Ser	Asp	Thr	Gln	Tyr	Gln	Arg	Ile	Glu	Asn
2390						2395					2400			
Tyr	Met	Lys	Ser	Ser	Glu	Phe	Glu	Asn	Lys	Gln	Ala	Leu	Leu	Lys
2405						2410					2415			
Arg	Ala	Lys	Glu	Glu	Val	Gly	Leu	Leu	Arg	Glu	His	Lys	Ile	Gln
2420						2425					2430			
Thr	Asn	Arg	Tyr	Thr	Val	Lys	Val	Gln	Arg	Glu	Leu	Glu	Leu	Asp
2435						2440					2445			
Glu	Leu	Ala	Leu	Arg	Ala	Leu	Lys	Glu	Asp	Arg	Lys	Arg	Phe	Leu
2450						2455					2460			
Cys	Lys	Ala	Val	Glu	Asn	Tyr	Ile	Asn	Cys	Leu	Leu	Ser	Gly	Glu
2465						2470					2475			

ES 2 688 619 T3

Glu His Asp Met Trp Val Phe Arg Leu Cys Ser Leu Trp Leu Glu
 2480 2485 2490

Asn Ser Gly Val Ser Glu Val Asn Gly Met Met Lys Arg Asp Gly
 2495 2500 2505

Met Lys Ile Pro Thr Tyr Lys Phe Leu Pro Leu Met Tyr Gln Leu
 2510 2515 2520

Ala Ala Arg Met Gly Thr Lys Met Met Gly Gly Leu Gly Phe His
 2525 2530 2535

Glu Val Leu Asn Asn Leu Ile Ser Arg Ile Ser Met Asp His Pro
 2540 2545 2550

His His Thr Leu Phe Ile Ile Leu Ala Leu Ala Asn Ala Asn Arg
 2555 2560 2565

Asp Glu Phe Leu Thr Lys Pro Glu Val Ala Arg Arg Ser Arg Ile
 2570 2575 2580

Thr Lys Asn Val Pro Lys Gln Ser Ser Gln Leu Asp Glu Asp Arg
 2585 2590 2595

Thr Glu Ala Ala Asn Arg Ile Ile Cys Thr Ile Arg Ser Arg Arg
 2600 2605 2610

Pro Gln Met Val Arg Ser Val Glu Ala Leu Cys Asp Ala Tyr Ile
 2615 2620 2625

Ile Leu Ala Asn Leu Asp Ala Thr Gln Trp Lys Thr Gln Arg Lys
 2630 2635 2640

Gly Ile Asn Ile Pro Ala Asp Gln Pro Ile Thr Lys Leu Lys Asn
 2645 2650 2655

Leu Glu Asp Val Val Val Pro Thr Met Glu Ile Lys Val Asp His
 2660 2665 2670

Thr Gly Glu Tyr Gly Asn Leu Val Thr Ile Gln Ser Phe Lys Ala
 2675 2680 2685

Glu Phe Arg Leu Ala Gly Gly Val Asn Leu Pro Lys Ile Ile Asp
 2690 2695 2700

Cys Val Gly Ser Asp Gly Lys Glu Arg Arg Gln Leu Val Lys Gly
 2705 2710 2715

ES 2 688 619 T3

Arg Asp Asp Leu Arg Gln Asp Ala Val Met Gln Gln Val Phe Gln
 2720 2725 2730

Met Cys Asn Thr Leu Leu Gln Arg Asn Thr Glu Thr Arg Lys Arg
 2735 2740 2745

Lys Leu Thr Ile Cys Thr Tyr Lys Val Val Pro Leu Ser Gln Arg
 2750 2755 2760

Ser Gly Val Leu Glu Trp Cys Thr Gly Thr Val Pro Ile Gly Glu
 2765 2770 2775

Phe Leu Val Asn Asn Glu Asp Gly Ala His Lys Arg Tyr Arg Pro
 2780 2785 2790

Asn Asp Phe Ser Ala Phe Gln Cys Gln Lys Lys Met Met Glu Val
 2795 2800 2805

Gln Lys Lys Ser Phe Glu Glu Lys Tyr Glu Val Phe Met Asp Val
 2810 2815 2820

Cys Gln Asn Phe Gln Pro Val Phe Arg Tyr Phe Cys Met Glu Lys
 2825 2830 2835

Phe Leu Asp Pro Ala Ile Trp Phe Glu Lys Arg Leu Ala Tyr Thr
 2840 2845 2850

Arg Ser Val Ala Thr Ser Ser Ile Val Gly Tyr Ile Leu Gly Leu
 2855 2860 2865

Gly Asp Arg His Val Gln Asn Ile Leu Ile Asn Glu Gln Ser Ala
 2870 2875 2880

Glu Leu Val His Ile Asp Leu Gly Val Ala Phe Glu Gln Gly Lys
 2885 2890 2895

Ile Leu Pro Thr Pro Glu Thr Val Pro Phe Arg Leu Thr Arg Asp
 2900 2905 2910

Ile Val Asp Gly Met Gly Ile Thr Gly Val Glu Gly Val Phe Arg
 2915 2920 2925

Arg Cys Cys Glu Lys Thr Met Glu Val Met Arg Asn Ser Gln Glu
 2930 2935 2940

Thr Leu Leu Thr Ile Val Glu Val Leu Leu Tyr Asp Pro Leu Phe
 2945 2950 2955

ES 2 688 619 T3

Asp Trp Thr Met Asn Pro Leu Lys Ala Leu Tyr Leu Gln Gln Arg
 2960 2965 2970
 Pro Glu Asp Glu Thr Glu Leu His Pro Thr Leu Asn Ala Asp Asp
 2975 2980 2985
 Gln Glu Cys Lys Arg Asn Leu Ser Asp Ile Asp Gln Ser Phe Asp
 2990 2995 3000
 Lys Val Ala Glu Arg Val Leu Met Arg Leu Gln Glu Lys Leu Lys
 3005 3010 3015
 Gly Val Glu Glu Gly Thr Val Leu Ser Val Gly Gly Gln Val Asn
 3020 3025 3030
 Leu Leu Ile Gln Gln Ala Ile Asp Pro Lys Asn Leu Ser Arg Leu
 3035 3040 3045
 Phe Pro Gly Trp Lys Ala Trp Val Met Ser Leu Val Leu Asn Asp
 3050 3055 3060
 Leu Leu Ile Cys Cys Arg Gln Leu Glu His Asp Arg Ala Thr Glu
 3065 3070 3075
 Arg Lys Lys Glu Val Glu Lys Phe Lys Arg Leu Ile Arg Asp Pro
 3080 3085 3090
 Glu Thr Ile Lys His Leu Asp Arg His Ser Asp Ser Lys Gln Gly
 3095 3100 3105
 Lys Tyr Leu Asn Trp Asp Ala Val Phe Arg Phe Leu Gln Lys Tyr
 3110 3115 3120
 Ile Gln Lys Glu Thr Glu Cys Leu Arg Ile Ala Lys Pro Asn Val
 3125 3130 3135
 Ser Ala Ser Thr Gln Ala Ser Arg Gln Lys Lys Met Gln Glu Ile
 3140 3145 3150
 Ser Ser Leu Val Lys Tyr Phe Ile Lys Cys Ala Asn Arg Arg Ala
 3155 3160 3165
 Pro Arg Leu Lys Cys Gln Glu Leu Leu Asn Tyr Ile Met Asp Thr
 3170 3175 3180
 Val Lys Asp Ser Ser Asn Gly Ala Ile Tyr Gly Ala Asp Cys Ser

ES 2 688 619 T3

3185						3190						3195			
Asn	Ile	Leu	Leu	Lys	Asp	Ile	Leu	Ser	Val	Arg	Lys	Tyr	Trp	Cys	
3200						3205					3210				
Glu	Ile	Ser	Gln	Gln	Gln	Trp	Leu	Glu	Leu	Phe	Ser	Val	Tyr	Phe	
3215						3220					3225				
Arg	Leu	Tyr	Leu	Lys	Pro	Ser	Gln	Asp	Val	His	Arg	Val	Leu	Val	
3230						3235					3240				
Ala	Arg	Ile	Ile	His	Ala	Val	Thr	Lys	Gly	Cys	Cys	Ser	Gln	Thr	
3245						3250					3255				
Asp	Gly	Leu	Asn	Ser	Lys	Phe	Leu	Asp	Phe	Phe	Ser	Lys	Ala	Ile	
3260						3265					3270				
Gln	Cys	Ala	Arg	Gln	Glu	Lys	Ser	Ser	Ser	Gly	Leu	Asn	His	Ile	
3275						3280					3285				
Leu	Ala	Ala	Leu	Thr	Ile	Phe	Leu	Lys	Thr	Leu	Ala	Val	Asn	Phe	
3290						3295					3300				
Arg	Ile	Arg	Val	Cys	Glu	Leu	Gly	Asp	Glu	Ile	Leu	Pro	Thr	Leu	
3305						3310					3315				
Leu	Tyr	Ile	Trp	Thr	Gln	His	Arg	Leu	Asn	Asp	Ser	Leu	Lys	Glu	
3320						3325					3330				
Val	Ile	Ile	Glu	Leu	Phe	Gln	Leu	Gln	Ile	Tyr	Ile	His	His	Pro	
3335						3340					3345				
Lys	Gly	Ala	Lys	Thr	Gln	Glu	Lys	Gly	Ala	Tyr	Glu	Ser	Thr	Lys	
3350						3355					3360				
Trp	Arg	Ser	Ile	Leu	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Asp	Leu	Leu	Val	Asn	Glu	
3365						3370					3375				
Ile	Ser	His	Ile	Gly	Ser	Arg	Gly	Lys	Tyr	Ser	Ser	Gly	Phe	Arg	
3380						3385					3390				
Asn	Ile	Ala	Val	Lys	Glu	Asn	Leu	Ile	Glu	Leu	Met	Ala	Asp	Ile	
3395						3400					3405				
Cys	His	Gln	Val	Phe	Asn	Glu	Asp	Thr	Arg	Ser	Leu	Glu	Ile	Ser	
3410						3415					3420				

ES 2 688 619 T3

Gln Ser Tyr Thr Thr Thr Gln Arg Glu Ser Ser Asp Tyr Ser Val
 3425 3430 3435

Pro Cys Lys Arg Lys Lys Ile Glu Leu Gly Trp Glu Val Ile Lys
 3440 3445 3450

Asp His Leu Gln Lys Ser Gln Asn Asp Phe Asp Leu Val Pro Trp
 3455 3460 3465

Leu Gln Ile Ala Thr Gln Leu Ile Ser Lys Tyr Pro Ala Ser Leu
 3470 3475 3480

Pro Asn Cys Glu Leu Ser Pro Leu Leu Met Ile Leu Ser Gln Leu
 3485 3490 3495

Leu Pro Gln Gln Arg His Gly Glu Arg Thr Pro Tyr Val Leu Arg
 3500 3505 3510

Cys Leu Thr Glu Val Ala Leu Cys Gln Asp Lys Arg Ser Asn Leu
 3515 3520 3525

Glu Ser Ser Gln Lys Ser Asp Leu Leu Lys Leu Trp Asn Lys Ile
 3530 3535 3540

Trp Cys Ile Thr Phe Arg Gly Ile Ser Ser Glu Gln Ile Gln Ala
 3545 3550 3555

Glu Asn Phe Gly Leu Leu Gly Ala Ile Ile Gln Gly Ser Leu Val
 3560 3565 3570

Glu Val Asp Arg Glu Phe Trp Lys Leu Phe Thr Gly Ser Ala Cys
 3575 3580 3585

Arg Pro Ser Cys Pro Ala Val Cys Cys Leu Thr Leu Ala Leu Thr
 3590 3595 3600

Thr Ser Ile Val Pro Gly Ala Val Lys Met Gly Ile Glu Gln Asn
 3605 3610 3615

Met Cys Glu Val Asn Arg Ser Phe Ser Leu Lys Glu Ser Ile Met
 3620 3625 3630

Lys Trp Leu Leu Phe Tyr Gln Leu Glu Gly Asp Leu Glu Asn Ser
 3635 3640 3645

Thr Glu Val Pro Pro Ile Leu His Ser Asn Phe Pro His Leu Val
 3650 3655 3660

ES 2 688 619 T3

Leu Glu Lys Ile Leu Val Ser Leu Thr Met Lys Asn Cys Lys Ala
 3665 3670 3675

Ala Met Asn Phe Phe Gln Ser Val Pro Glu Cys Glu His His Gln
 3680 3685 3690

Lys Asp Lys Glu Glu Leu Ser Phe Ser Glu Val Glu Glu Leu Phe
 3695 3700 3705

Leu Gln Thr Thr Phe Asp Lys Met Asp Phe Leu Thr Ile Val Arg
 3710 3715 3720

Glu Cys Gly Ile Glu Lys His Gln Ser Ser Ile Gly Phe Ser Val
 3725 3730 3735

His Gln Asn Leu Lys Glu Ser Leu Asp Arg Cys Leu Leu Gly Leu
 3740 3745 3750

Ser Glu Gln Leu Leu Asn Asn Tyr Ser Ser Glu Ile Thr Asn Ser
 3755 3760 3765

Glu Thr Leu Val Arg Cys Ser Arg Leu Leu Val Gly Val Leu Gly
 3770 3775 3780

Cys Tyr Cys Tyr Met Gly Val Ile Ala Glu Glu Glu Ala Tyr Lys
 3785 3790 3795

Ser Glu Leu Phe Gln Lys Ala Asn Ser Leu Met Gln Cys Ala Gly
 3800 3805 3810

Glu Ser Ile Thr Leu Phe Lys Asn Lys Thr Asn Glu Glu Phe Arg
 3815 3820 3825

Ile Gly Ser Leu Arg Asn Met Met Gln Leu Cys Thr Arg Cys Leu
 3830 3835 3840

Ser Asn Cys Thr Lys Lys Ser Pro Asn Lys Ile Ala Ser Gly Phe
 3845 3850 3855

Phe Leu Arg Leu Leu Thr Ser Lys Leu Met Asn Asp Ile Ala Asp
 3860 3865 3870

Ile Cys Lys Ser Leu Ala Ser Phe Ile Lys Lys Pro Phe Asp Arg
 3875 3880 3885

Gly Glu Val Glu Ser Met Glu Asp Asp Thr Asn Gly Asn Leu Met
 3890 3895 3900

ES 2 688 619 T3

Glu Val Glu Asp Gln Ser Ser Met Asn Leu Phe Asn Asp Tyr Pro
 3905 3910 3915

Asp Ser Ser Val Ser Asp Ala Asn Glu Pro Gly Glu Ser Gln Ser
 3920 3925 3930

Thr Ile Gly Ala Ile Asn Pro Leu Ala Glu Glu Tyr Leu Ser Lys
 3935 3940 3945

Gln Asp Leu Leu Phe Leu Asp Met Leu Lys Phe Leu Cys Leu Cys
 3950 3955 3960

Val Thr Thr Ala Gln Thr Asn Thr Val Ser Phe Arg Ala Ala Asp
 3965 3970 3975

Ile Arg Arg Lys Leu Leu Met Leu Ile Asp Ser Ser Thr Leu Glu
 3980 3985 3990

Pro Thr Lys Ser Leu His Leu His Met Tyr Leu Met Leu Leu Lys
 3995 4000 4005

Glu Leu Pro Gly Glu Glu Tyr Pro Leu Pro Met Glu Asp Val Leu
 4010 4015 4020

Glu Leu Leu Lys Pro Leu Ser Asn Val Cys Ser Leu Tyr Arg Arg
 4025 4030 4035

Asp Gln Asp Val Cys Lys Thr Ile Leu Asn His Val Leu His Val
 4040 4045 4050

Val Lys Asn Leu Gly Gln Ser Asn Met Asp Ser Glu Asn Thr Arg
 4055 4060 4065

Asp Ala Gln Gly Gln Phe Leu Thr Val Ile Gly Ala Phe Trp His
 4070 4075 4080

Leu Thr Lys Glu Arg Lys Tyr Ile Phe Ser Val Arg Met Ala Leu
 4085 4090 4095

Val Asn Cys Leu Lys Thr Leu Leu Glu Ala Asp Pro Tyr Ser Lys
 4100 4105 4110

Trp Ala Ile Leu Asn Val Met Gly Lys Asp Phe Pro Val Asn Glu
 4115 4120 4125

Val Phe Thr Gln Phe Leu Ala Asp Asn His His Gln Val Arg Met

ES 2 688 619 T3

4130						4135						4140			
Leu	Ala	Ala	Glu	Ser	Ile	Asn	Arg	Leu	Phe	Gln	Asp	Thr	Lys	Gly	
4145						4150					4155				
Asp	Ser	Ser	Arg	Leu	Leu	Lys	Ala	Leu	Pro	Leu	Lys	Leu	Gln	Gln	
4160						4165					4170				
Thr	Ala	Phe	Glu	Asn	Ala	Tyr	Leu	Lys	Ala	Gln	Glu	Gly	Met	Arg	
4175						4180					4185				
Glu	Met	Ser	His	Ser	Ala	Glu	Asn	Pro	Glu	Thr	Leu	Asp	Glu	Ile	
4190						4195					4200				
Tyr	Asn	Arg	Lys	Ser	Val	Leu	Leu	Thr	Leu	Ile	Ala	Val	Val	Leu	
4205						4210					4215				
Ser	Cys	Ser	Pro	Ile	Cys	Glu	Lys	Gln	Ala	Leu	Phe	Ala	Leu	Cys	
4220						4225					4230				
Lys	Ser	Val	Lys	Glu	Asn	Gly	Leu	Glu	Pro	His	Leu	Val	Lys	Lys	
4235						4240					4245				
Val	Leu	Glu	Lys	Val	Ser	Glu	Thr	Phe	Gly	Tyr	Arg	Arg	Leu	Glu	
4250						4255					4260				
Asp	Phe	Met	Ala	Ser	His	Leu	Asp	Tyr	Leu	Val	Leu	Glu	Trp	Leu	
4265						4270					4275				
Asn	Leu	Gln	Asp	Thr	Glu	Tyr	Asn	Leu	Ser	Ser	Phe	Pro	Phe	Ile	
4280						4285					4290				
Leu	Leu	Asn	Tyr	Thr	Asn	Ile	Glu	Asp	Phe	Tyr	Arg	Ser	Cys	Tyr	
4295						4300					4305				
Lys	Val	Leu	Ile	Pro	His	Leu	Val	Ile	Arg	Ser	His	Phe	Asp	Glu	
4310						4315					4320				
Val	Lys	Ser	Ile	Ala	Asn	Gln	Ile	Gln	Glu	Asp	Trp	Lys	Ser	Leu	
4325						4330					4335				
Leu	Thr	Asp	Cys	Phe	Pro	Lys	Ile	Leu	Val	Asn	Ile	Leu	Pro	Tyr	
4340						4345					4350				
Phe	Ala	Tyr	Glu	Gly	Thr	Arg	Asp	Ser	Gly	Met	Ala	Gln	Gln	Arg	
4355						4360					4365				

ES 2 688 619 T3

Glu Thr Ala Thr Lys Val Tyr Asp Met Leu Lys Ser Glu Asn Leu
 4370 4375 4380
 Leu Gly Lys Gln Ile Asp His Leu Phe Ile Ser Asn Leu Pro Glu
 4385 4390 4395
 Ile Val Val Glu Leu Leu Met Thr Leu His Glu Pro Ala Asn Ser
 4400 4405 4410
 Ser Ala Ser Gln Ser Thr Asp Leu Cys Asp Phe Ser Gly Asp Leu
 4415 4420 4425
 Asp Pro Ala Pro Asn Pro Pro His Phe Pro Ser His Val Ile Lys
 4430 4435 4440
 Ala Thr Phe Ala Tyr Ile Ser Asn Cys His Lys Thr Lys Leu Lys
 4445 4450 4455
 Ser Ile Leu Glu Ile Leu Ser Lys Ser Pro Asp Ser Tyr Gln Lys
 4460 4465 4470
 Ile Leu Leu Ala Ile Cys Glu Gln Ala Ala Glu Thr Asn Asn Val
 4475 4480 4485
 Tyr Lys Lys His Arg Ile Leu Lys Ile Tyr His Leu Phe Val Ser
 4490 4495 4500
 Leu Leu Leu Lys Asp Ile Lys Ser Gly Leu Gly Gly Ala Trp Ala
 4505 4510 4515
 Phe Val Leu Arg Asp Val Ile Tyr Thr Leu Ile His Tyr Ile Asn
 4520 4525 4530
 Gln Arg Pro Ser Cys Ile Met Asp Val Ser Leu Arg Ser Phe Ser
 4535 4540 4545
 Leu Cys Cys Asp Leu Leu Ser Gln Val Cys Gln Thr Ala Val Thr
 4550 4555 4560
 Tyr Cys Lys Asp Ala Leu Glu Asn His Leu His Val Ile Val Gly
 4565 4570 4575
 Thr Leu Ile Pro Leu Val Tyr Glu Gln Val Glu Val Gln Lys Gln
 4580 4585 4590
 Val Leu Asp Leu Leu Lys Tyr Leu Val Ile Asp Asn Lys Asp Asn
 4595 4600 4605

ES 2 688 619 T3

Glu Asn Leu Tyr Ile Thr Ile Lys Leu Leu Asp Pro Phe Pro Asp
 4610 4615 4620
 His Val Val Phe Lys Asp Leu Arg Ile Thr Gln Gln Lys Ile Lys
 4625 4630 4635
 Tyr Ser Arg Gly Pro Phe Ser Leu Leu Glu Glu Ile Asn His Phe
 4640 4645 4650
 Leu Ser Val Ser Val Tyr Asp Ala Leu Pro Leu Thr Arg Leu Glu
 4655 4660 4665
 Gly Leu Lys Asp Leu Arg Arg Gln Leu Glu Leu His Lys Asp Gln
 4670 4675 4680
 Met Val Asp Ile Met Arg Ala Ser Gln Asp Asn Pro Gln Asp Gly
 4685 4690 4695
 Ile Met Val Lys Leu Val Val Asn Leu Leu Gln Leu Ser Lys Met
 4700 4705 4710
 Ala Ile Asn His Thr Gly Glu Lys Glu Val Leu Glu Ala Val Gly
 4715 4720 4725
 Ser Cys Leu Gly Glu Val Gly Pro Ile Asp Phe Ser Thr Ile Ala
 4730 4735 4740
 Ile Gln His Ser Lys Asp Ala Ser Tyr Thr Lys Ala Leu Lys Leu
 4745 4750 4755
 Phe Glu Asp Lys Glu Leu Gln Trp Thr Phe Ile Met Leu Thr Tyr
 4760 4765 4770
 Leu Asn Asn Thr Leu Val Glu Asp Cys Val Lys Val Arg Ser Ala
 4775 4780 4785
 Ala Val Thr Cys Leu Lys Asn Ile Leu Ala Thr Lys Thr Gly His
 4790 4795 4800
 Ser Phe Trp Glu Ile Tyr Lys Met Thr Thr Asp Pro Met Leu Ala
 4805 4810 4815
 Tyr Leu Gln Pro Phe Arg Thr Ser Arg Lys Lys Phe Leu Glu Val
 4820 4825 4830
 Pro Arg Phe Asp Lys Glu Asn Pro Phe Glu Gly Leu Asp Asp Ile
 4835 4840 4845

ES 2 688 619 T3

Asn Leu Trp Ile Pro Leu Ser Glu Asn His Asp Ile Trp Ile Lys
 4850 4855 4860
 Thr Leu Thr Cys Ala Phe Leu Asp Ser Gly Gly Thr Lys Cys Glu
 4865 4870 4875
 Ile Leu Gln Leu Leu Lys Pro Met Cys Glu Val Lys Thr Asp Phe
 4880 4885 4890
 Cys Gln Thr Val Leu Pro Tyr Leu Ile His Asp Ile Leu Leu Gln
 4895 4900 4905
 Asp Thr Asn Glu Ser Trp Arg Asn Leu Leu Ser Thr His Val Gln
 4910 4915 4920
 Gly Phe Phe Thr Ser Cys Leu Arg His Phe Ser Gln Thr Ser Arg
 4925 4930 4935
 Ser Thr Thr Pro Ala Asn Leu Asp Ser Glu Ser Glu His Phe Phe
 4940 4945 4950
 Arg Cys Cys Leu Asp Lys Lys Ser Gln Arg Thr Met Leu Ala Val
 4955 4960 4965
 Val Asp Tyr Met Arg Arg Gln Lys Arg Pro Ser Ser Gly Thr Ile
 4970 4975 4980
 Phe Asn Asp Ala Phe Trp Leu Asp Leu Asn Tyr Leu Glu Val Ala
 4985 4990 4995
 Lys Val Ala Gln Ser Cys Ala Ala His Phe Thr Ala Leu Leu Tyr
 5000 5005 5010
 Ala Glu Ile Tyr Ala Asp Lys Lys Ser Met Asp Asp Gln Glu Lys
 5015 5020 5025
 Arg Ser Leu Ala Phe Glu Glu Gly Ser Gln Ser Thr Thr Ile Ser
 5030 5035 5040
 Ser Leu Ser Glu Lys Ser Lys Glu Glu Thr Gly Ile Ser Leu Gln
 5045 5050 5055
 Asp Leu Leu Leu Glu Ile Tyr Arg Ser Ile Gly Glu Pro Asp Ser
 5060 5065 5070
 Leu Tyr Gly Cys Gly Gly Gly Lys Met Leu Gln Pro Ile Thr Arg

ES 2 688 619 T3

5075						5080						5085			
Leu	Arg	Thr	Tyr	Glu	His	Glu	Ala	Met	Trp	Gly	Lys	Ala	Leu	Val	
5090						5095					5100				
Thr	Tyr	Asp	Leu	Glu	Thr	Ala	Ile	Pro	Ser	Ser	Thr	Arg	Gln	Ala	
5105						5110					5115				
Gly	Ile	Ile	Gln	Ala	Leu	Gln	Asn	Leu	Gly	Leu	Cys	His	Ile	Leu	
5120						5125					5130				
Ser	Val	Tyr	Leu	Lys	Gly	Leu	Asp	Tyr	Glu	Asn	Lys	Asp	Trp	Cys	
5135						5140					5145				
Pro	Glu	Leu	Glu	Glu	Leu	His	Tyr	Gln	Ala	Ala	Trp	Arg	Asn	Met	
5150						5155					5160				
Gln	Trp	Asp	His	Cys	Thr	Ser	Val	Ser	Lys	Glu	Val	Glu	Gly	Thr	
5165						5170					5175				
Ser	Tyr	His	Glu	Ser	Leu	Tyr	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Leu	Arg	Asp	
5180						5185					5190				
Arg	Glu	Phe	Ser	Thr	Phe	Tyr	Glu	Ser	Leu	Lys	Tyr	Ala	Arg	Val	
5195						5200					5205				
Lys	Glu	Val	Glu	Glu	Met	Cys	Lys	Arg	Ser	Leu	Glu	Ser	Val	Tyr	
5210						5215					5220				
Ser	Leu	Tyr	Pro	Thr	Leu	Ser	Arg	Leu	Gln	Ala	Ile	Gly	Glu	Leu	
5225						5230					5235				
Glu	Ser	Ile	Gly	Glu	Leu	Phe	Ser	Arg	Ser	Val	Thr	His	Arg	Gln	
5240						5245					5250				
Leu	Ser	Glu	Val	Tyr	Ile	Lys	Trp	Gln	Lys	His	Ser	Gln	Leu	Leu	
5255						5260					5265				
Lys	Asp	Ser	Asp	Phe	Ser	Phe	Gln	Glu	Pro	Ile	Met	Ala	Leu	Arg	
5270						5275					5280				
Thr	Val	Ile	Leu	Glu	Ile	Leu	Met	Glu	Lys	Glu	Met	Asp	Asn	Ser	
5285						5290					5295				
Gln	Arg	Glu	Cys	Ile	Lys	Asp	Ile	Leu	Thr	Lys	His	Leu	Val	Glu	
5300						5305					5310				

ES 2 688 619 T3

Leu Ser Ile Leu Ala Arg Thr Phe Lys Asn Thr Gln Leu Pro Glu
5315 5320 5325

Arg Ala Ile Phe Gln Ile Lys Gln Tyr Asn Ser Val Ser Cys Gly
5330 5335 5340

Val Ser Glu Trp Gln Leu Glu Glu Ala Gln Val Phe Trp Ala Lys
5345 5350 5355

Lys Glu Gln Ser Leu Ala Leu Ser Ile Leu Lys Gln Met Ile Lys
5360 5365 5370

Lys Leu Asp Ala Ser Cys Ala Ala Asn Asn Pro Ser Leu Lys Leu
5375 5380 5385

Thr Tyr Thr Glu Cys Leu Arg Val Cys Gly Asn Trp Leu Ala Glu
5390 5395 5400

Thr Cys Leu Glu Asn Pro Ala Val Ile Met Gln Thr Tyr Leu Glu
5405 5410 5415

Lys Ala Val Glu Val Ala Gly Asn Tyr Asp Gly Glu Ser Ser Asp
5420 5425 5430

Glu Leu Arg Asn Gly Lys Met Lys Ala Phe Leu Ser Leu Ala Arg
5435 5440 5445

Phe Ser Asp Thr Gln Tyr Gln Arg Ile Glu Asn Tyr Met Lys Ser
5450 5455 5460

Ser Glu Phe Glu Asn Lys Gln Ala Leu Leu Lys Arg Ala Lys Glu
5465 5470 5475

Glu Val Gly Leu Leu Arg Glu His Lys Ile Gln Thr Asn Arg Tyr
5480 5485 5490

Thr Val Lys Val Gln Arg Glu Leu Glu Leu Asp Glu Leu Ala Leu
5495 5500 5505

Arg Ala Leu Lys Glu Asp Arg Lys Arg Phe Leu Cys Lys Ala Val
5510 5515 5520

Glu Asn Tyr Ile Asn Cys Leu Leu Ser Gly Glu Glu His Asp Met
5525 5530 5535

Trp Val Phe Arg Leu Cys Ser Leu Trp Leu Glu Asn Ser Gly Val
5540 5545 5550

ES 2 688 619 T3

Ser Glu Val Asn Gly Met Met Lys Arg Asp Gly Met Lys Ile Pro
5555 5560 5565

Thr Tyr Lys Phe Leu Pro Leu Met Tyr Gln Leu Ala Ala Arg Met
5570 5575 5580

Gly Thr Lys Met Met Gly Gly Leu Gly Phe His Glu Val Leu Asn
5585 5590 5595

Asn Leu Ile Ser Arg Ile Ser Met Asp His Pro His His Thr Leu
5600 5605 5610

Phe Ile Ile Leu Ala Leu Ala Asn Ala Asn Arg Asp Glu Phe Leu
5615 5620 5625

Thr Lys Pro Glu Val Ala Arg Arg Ser Arg Ile Thr Lys Asn Val
5630 5635 5640

Pro Lys Gln Ser Ser Gln Leu Asp Glu Asp Arg Thr Glu Ala Ala
5645 5650 5655

Asn Arg Ile Ile Cys Thr Ile Arg Ser Arg Arg Pro Gln Met Val
5660 5665 5670

Arg Ser Val Glu Ala Leu Cys Asp Ala Tyr Ile Ile Leu Ala Asn
5675 5680 5685

Leu Asp Ala Thr Gln Trp Lys Thr Gln Arg Lys Gly Ile Asn Ile
5690 5695 5700

Pro Ala Asp Gln Pro Ile Thr Lys Leu Lys Asn Leu Glu Asp Val
5705 5710 5715

Val Val Pro Thr Met Glu Ile Lys Val Asp His Thr Gly Glu Tyr
5720 5725 5730

Gly Asn Leu Val Thr Ile Gln Ser Phe Lys Ala Glu Phe Arg Leu
5735 5740 5745

Ala Gly Gly Val Asn Leu Pro Lys Ile Ile Asp Cys Val Gly Ser
5750 5755 5760

Asp Gly Lys Glu Arg Arg Gln Leu Val Lys Gly Arg Asp Asp Leu
5765 5770 5775

Arg Gln Asp Ala Val Met Gln Gln Val Phe Gln Met Cys Asn Thr
5780 5785 5790

ES 2 688 619 T3

Leu Leu Gln Arg Asn Thr Glu Thr Arg Lys Arg Lys Leu Thr Ile
 5795 5800 5805

Cys Thr Tyr Lys Val Val Pro Leu Ser Gln Arg Ser Gly Val Leu
 5810 5815 5820

Glu Trp Cys Thr Gly Thr Val Pro Ile Gly Glu Phe Leu Val Asn
 5825 5830 5835

Asn Glu Asp Gly Ala His Lys Arg Tyr Arg Pro Asn Asp Phe Ser
 5840 5845 5850

Ala Phe Gln Cys Gln Lys Lys Met Met Glu Val Gln Lys Lys Ser
 5855 5860 5865

Phe Glu Glu Lys Tyr Glu Val Phe Met Asp Val Cys Gln Asn Phe
 5870 5875 5880

Gln Pro Val Phe Arg Tyr Phe Cys Met Glu Lys Phe Leu Asp Pro
 5885 5890 5895

Ala Ile Trp Phe Glu Lys Arg Leu Ala Tyr Thr Arg Ser Val Ala
 5900 5905 5910

Thr Ser Ser Ile Val Gly Tyr Ile Leu Gly Leu Gly Asp Arg His
 5915 5920 5925

Val Gln Asn Ile Leu Ile Asn Glu Gln Ser Ala Glu Leu Val His
 5930 5935 5940

Ile Asp Leu Gly Val Ala Phe Glu Gln Gly Lys Ile Leu Pro Thr
 5945 5950 5955

Pro Glu Thr Val Pro Phe Arg Leu Thr Arg Asp Ile Val Asp Gly
 5960 5965 5970

Met Gly Ile Thr Gly Val Glu Gly Val Phe Arg Arg Cys Cys Glu
 5975 5980 5985

Lys Thr Met Glu Val Met Arg Asn Ser Gln Glu Thr Leu Leu Thr
 5990 5995 6000

Ile Val Glu Val Leu Leu Tyr Asp Pro Leu Phe Asp Trp Thr Met
 6005 6010 6015

Asn Pro Leu Lys Ala Leu Tyr Leu Gln Gln Arg Pro Glu Asp Glu

ES 2 688 619 T3

	6020		6025		6030										
	Thr	Glu	Leu	His	Pro	Thr	Leu	Asn	Ala	Asp	Asp	Gln	Glu	Cys	Lys
	6035						6040					6045			
	Arg	Asn	Leu	Ser	Asp	Ile	Asp	Gln	Ser	Phe	Asp	Lys	Val	Ala	Glu
	6050						6055					6060			
	Arg	Val	Leu	Met	Arg	Leu	Gln	Glu	Lys	Leu	Lys	Gly	Val	Glu	Glu
	6065						6070					6075			
	Gly	Thr	Val	Leu	Ser	Val	Gly	Gly	Gln	Val	Asn	Leu	Leu	Ile	Gln
	6080						6085					6090			
	Gln	Ala	Ile	Asp	Pro	Lys	Asn	Leu	Ser	Arg	Leu	Phe	Pro	Gly	Trp
	6095						6100					6105			

Lys Ala Trp Val
6110

5	<210> 362														
	<211> 85														
	<212> ARN														
	<213> Artificial														
10	<220>														
	<223> Secuencia precursora														
	<400> 362														
	gggaagggcu ucagccaggc uagugcaguc ugcuuugugc caacacuggg gugaugacug														60
	cccuagucua gcugaagcuu uuccc														85
15	<210> 363														
	<211> 7														
	<212> ARN														
	<213> Artificial														
20	<220>														
	<223> Secuencia semilla														
	<400> 363														
25	ucagcca		7												
	<210> 364														
	<211> 22														
	<212> ARN														
	<213> Artificial														
30	<220>														
	<223> Secuencia madura														
	<400> 364														
35	uucagccagg cuagucagu cu						22								
	<210> 365														
	<211> 240														

ES 2 688 619 T3

<212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 5 <223> Secuencia clonada en vector lentiviral

 <400>365
 acaacttctc aatgagtctg ccctcactgt ccaacaattg agctgagaat ataagaaggg 60
 aagggttca gccaggctag tgcagtctgc tttgtgcca cactggggtg atgactgccc 120
 tagtctagct gaagcttttc cttctttct acaccagct caagtcccag gtccataaaa 180
 cctttagaaa ctcttcagaa actctttaga gcttcagaag ctcttgagaa ttggaagatg 240
 10
 <210> 366
 <211> 7
 <212> ARN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> Secuencia semilla

 <400> 366
 20 uucagcc 7

 <210> 367
 <211> 7
 <212> ARN
 25 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia semilla
 30
 <400> 367
 cagccag 7

 <210> 368
 <211> 21
 35 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 40
 <400> 368
 uucagccagg cuagugcagu c 21

 <210> 369
 <211> 22
 45 <212> ARN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> Secuencia isomiR
 50
 <400> 369
 cuucagccag gcuagugcag uc 22
 55
 <210> 370
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Artificial

ES 2 688 619 T3

<220>
<223> Secuencia isomiR

5 <400> 370
ucagccaggc uagugcaguc u 21

10 <210> 371
<211> 20
<212> ARN
<213> Artificial

15 <220>
<223> Secuencia isomiR

20 <400> 371
uucagccagg cuagugcagu 20

25 <210> 372
<211> 24
<212> ARN
<213> Artificial

<220>
<223> Secuencia isomiR

25 <400> 372
cuucagccag gcuagugcag ucug 24

REIVINDICACIONES

1. Molécula de miARN-323, isomiR, o un precursor del mismo,
 5 o una composición que comprende dicha molécula de miARN-323, isomiR, o un precursor del mismo,
 para el uso como un medicamento para prevenir, tratar, revertir, curar y/o retrasar una enfermedad o una
 condición asociada a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio
 de la mucosa preneoplásico,
 donde dicha molécula de miARN-323 o isomiR comprende la secuencia semilla identificada como SEQ ID N.º:
 10 11, 12, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69 y/o 70 y tiene al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o
 el 100 % de identidad con las SEQ ID N.º: 22, 23, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214,
 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228 y/o 229,
 donde dicho precursor es un ácido nucleico que tiene al menos el 90 % de identidad con la SEQ ID N.º: 3 y/o 31
 y tiene una longitud de al menos 50 nucleótidos.
- 15 2. Molécula de miARN-323, isomiR, o un precursor del mismo, o una composición que comprende dicha
 molécula de miARN-323, isomiR, o un precursor del mismo para el uso según la reivindicación 1, donde la
 enfermedad o condición es HNSCC.
- 20 3. Composición para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende además otra
 molécula de miARN, equivalente tal como una imitación, isomiR o precursor del mismo que es una molécula de
 miARN-181-a, un equivalente tal como una imitación o un isomiR, o un precursor del mismo.
- 25 4. Método para diagnosticar una enfermedad o condición asociada a un carcinoma de células escamosas tal
 como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de la mucosa preneoplásico en un sujeto, donde el método
 incluye los pasos de:
- (a) determinar el nivel de expresión de una molécula de miARN-323 como se identifica en la
 reivindicación 1 en un sujeto donde dicho nivel de expresión se determina *ex vivo* en una muestra
 obtenida a partir de dicho sujeto, y opcionalmente
- 30 (b) comparar el nivel de expresión de dicha molécula tal y como se define en (a) con un valor de
 referencia para el nivel de expresión de dicha molécula, donde el valor de referencia es preferiblemente
 el valor medio para el nivel de expresión de dicha molécula en un sujeto sano.
- 35 5. Método según la reivindicación 4, que comprende en el paso (a) determinar el nivel de expresión de otra
 molécula de miARN, equivalente o precursor del mismo como se identifica en la reivindicación 3.
- 40 6. Método según la reivindicación 4, donde una enfermedad o condición asociada a un carcinoma de células
 escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de la mucosa preneoplásico se diagnostica
 cuando la comparación lleva al hallazgo de una reducción del nivel de expresión de dicha molécula de miARN-
 323.
- 45 7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, donde una enfermedad o condición asociada a un
 carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un cambio de la mucosa
 preneoplásico se diagnostica cuando la comparación lleva al hallazgo de una reducción del nivel de expresión de
 dicha molécula de miARN-323 como se identifica en la reivindicación 1 y una reducción del nivel de expresión de
 al menos una otra molécula de miARN, equivalente o un precursor del mismo como se identifica en la
 reivindicación 3.
- 50 8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, donde el nivel de expresión de dicho miARN se
 determina indirectamente cuantificando la cantidad de la secuencia de nucleótidos.
- 55 9. Método para la identificación de una sustancia capaz de prevenir, tratar, revertir y/o retrasar una condición o
 enfermedad asociada a un carcinoma de células escamosas tal como el cáncer de cabeza y de cuello o un
 cambio de la mucosa preneoplásico en un sujeto, donde el método incluye los pasos de:
- (a) proporcionar una población de células de prueba capaz de expresar una molécula de miARN-323
 como se identifica en la reivindicación 1, preferiblemente la población de prueba comprende células,
 más preferiblemente la población de células de prueba comprende células de mamíferos, aún más
 preferiblemente células humanas;
- 60 (b) poner en contacto o incubar la población de células de prueba con la sustancia;
- (c) determinar el nivel de expresión de dicha molécula de miARN-323 o el nivel de actividad o de estado
 estable de dicha molécula de miARN-323 en la población de células de prueba puesta en contacto o
 incubada con la sustancia;
- 65 (d) comparar el nivel de expresión, de actividad o de estado estable determinado en (c) con el nivel de
 expresión, de actividad o de estado estable de dicha molécula de miARN-323 en una población de
 células de prueba que no está en contacto con la sustancia; y

(e) identificar una sustancia que produce una diferencia en el nivel de expresión, de actividad o de estado estable de dicha molécula de miARN-323 entre la población de células de prueba que está en contacto con la sustancia y la población de células de prueba que no está en contacto con la sustancia.

- 5 10. Método según la reivindicación 9, en el que los niveles de expresión, las actividades o los niveles de estado estable de al menos otra molécula de miARN, equivalente o precursor del mismo se comparan, preferiblemente donde la otra molécula de miARN, equivalente o precursor del mismo es como se identifica en la reivindicación 3.

Fig 1a

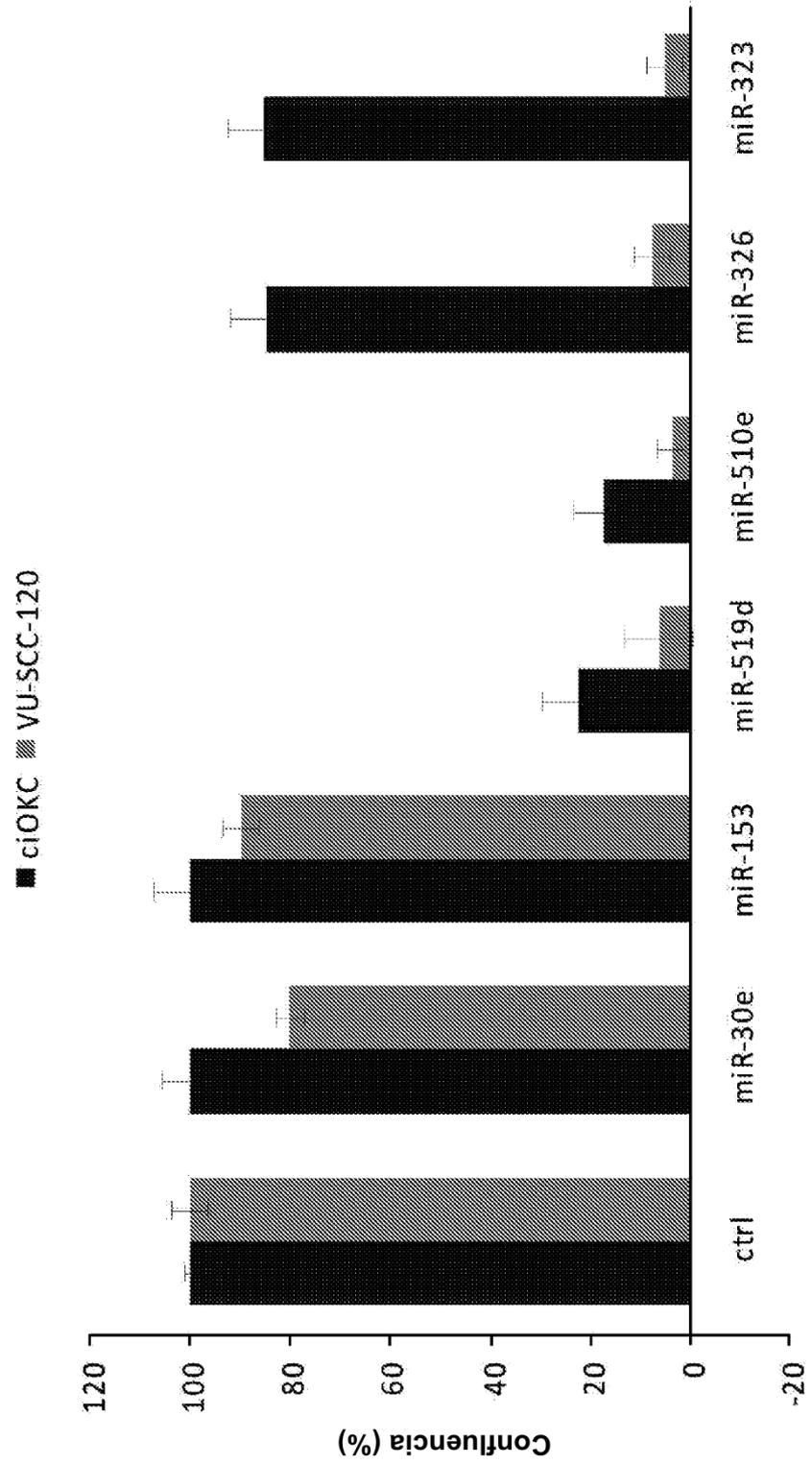


Fig 1b

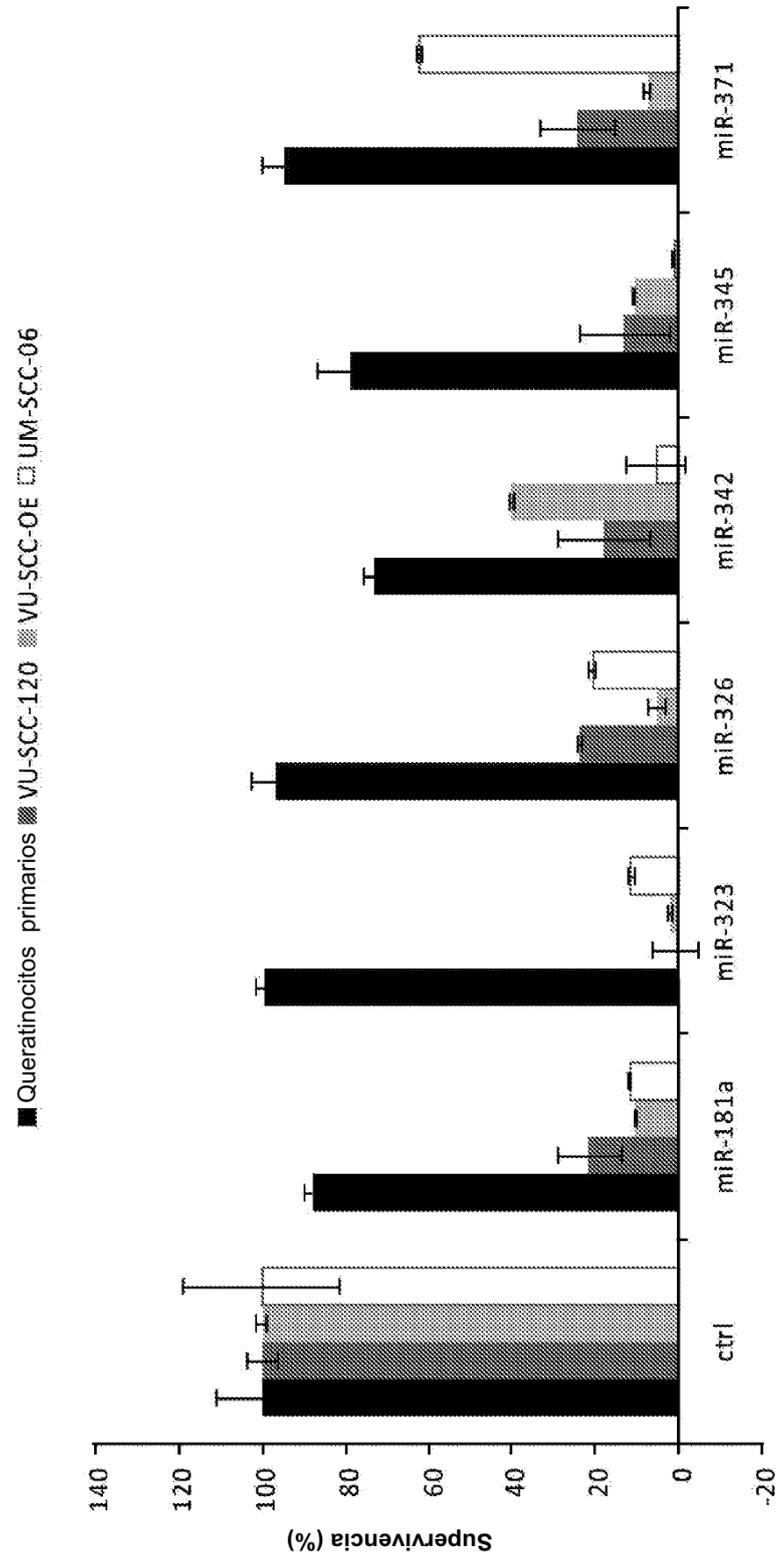


Fig 2a

Siha (cérvix)

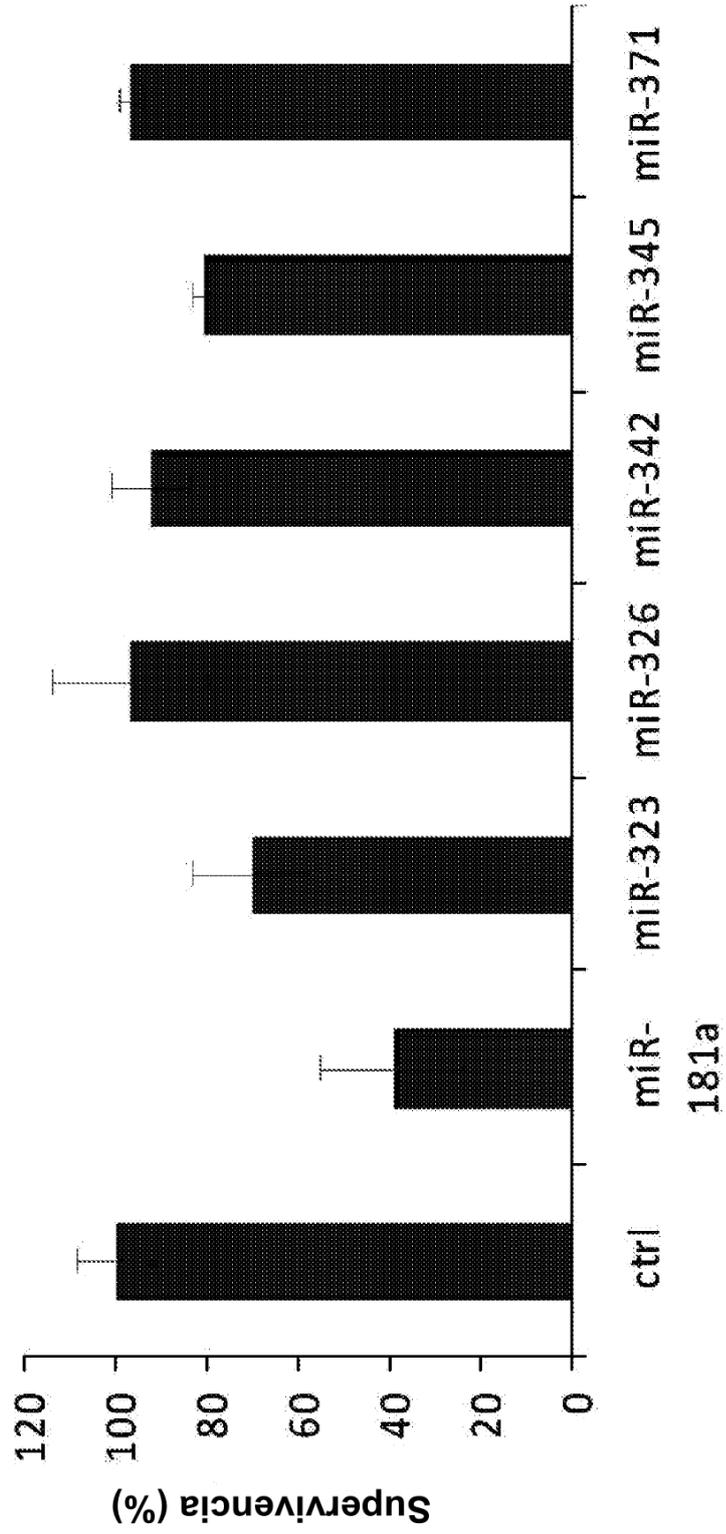


Fig 2b

MCF7 (mama)

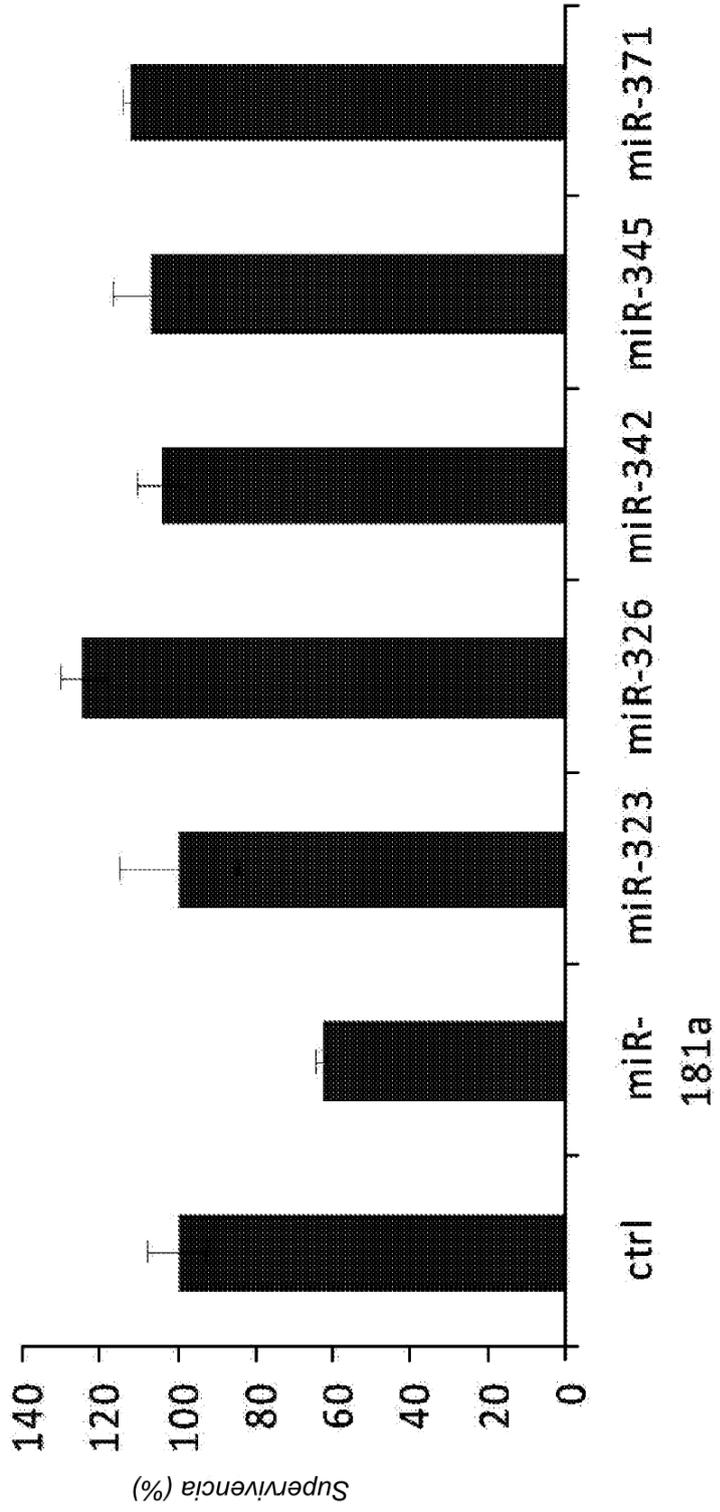


Fig 2c

HT29 (colon)

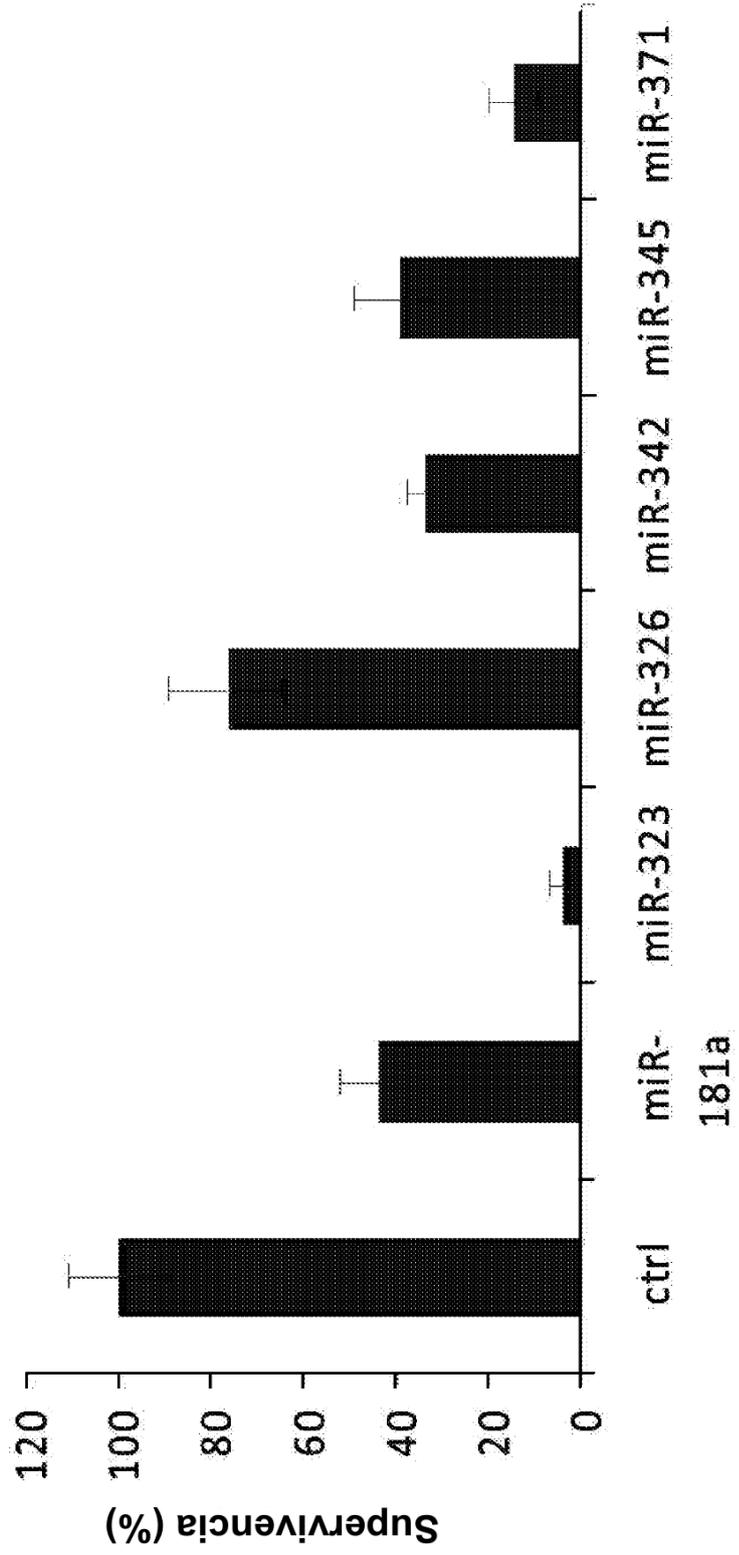


Fig 2d

U87 (glioblastoma)

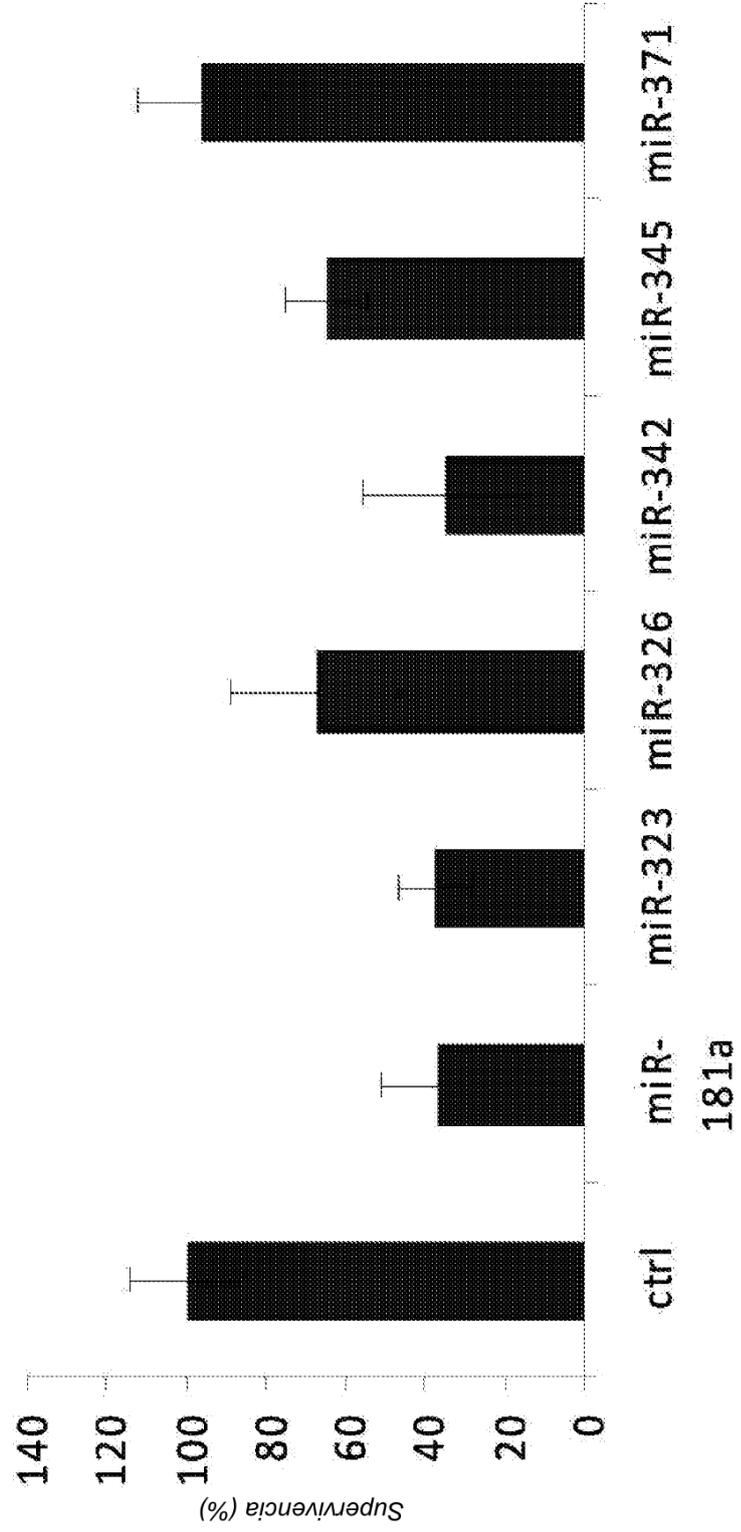


Fig 3b

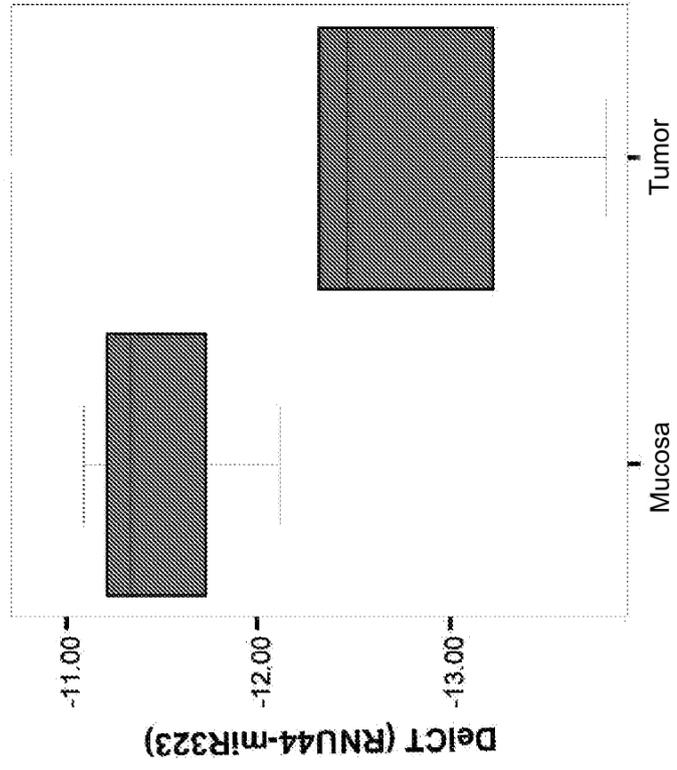


Fig 3a

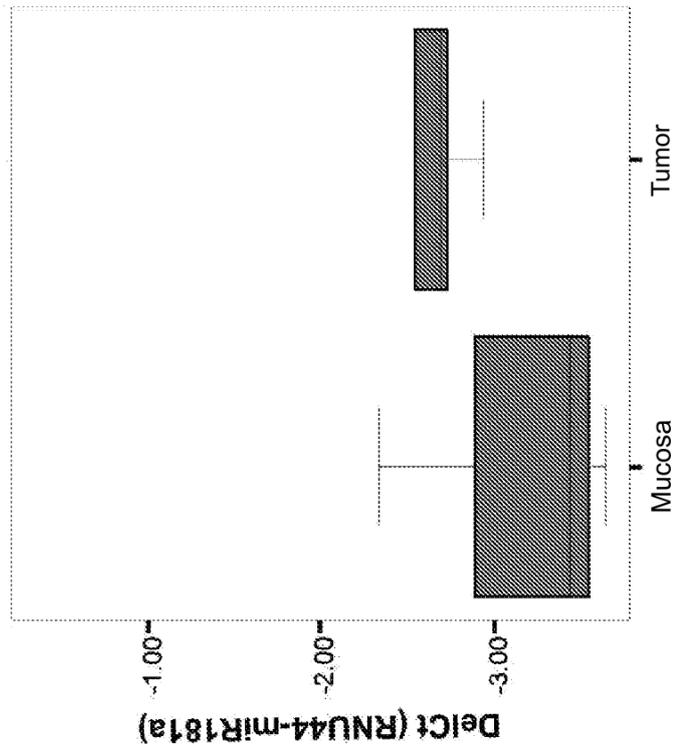


Fig 3c

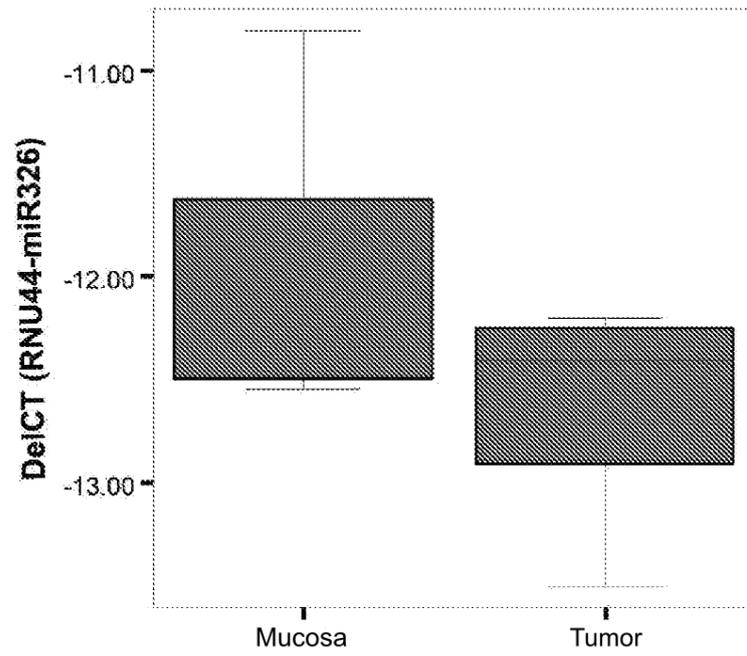


Fig 3e

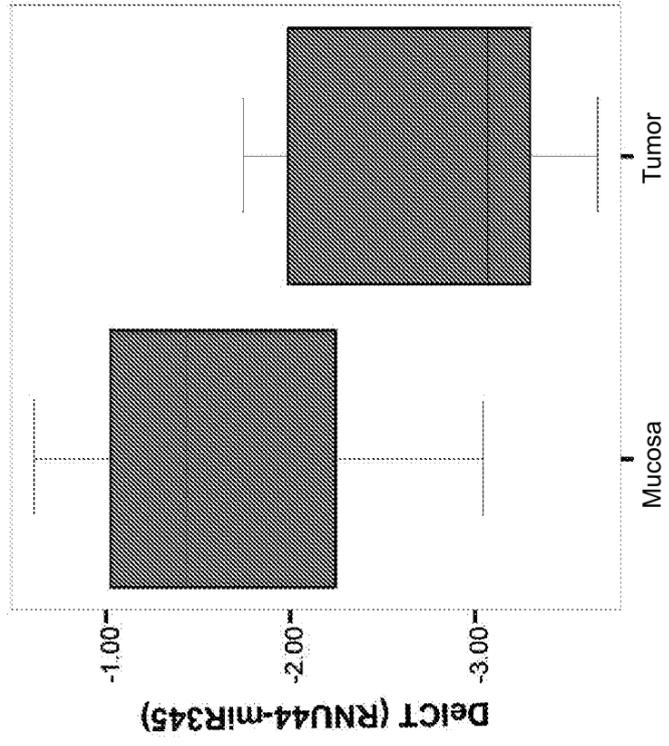


Fig 3d

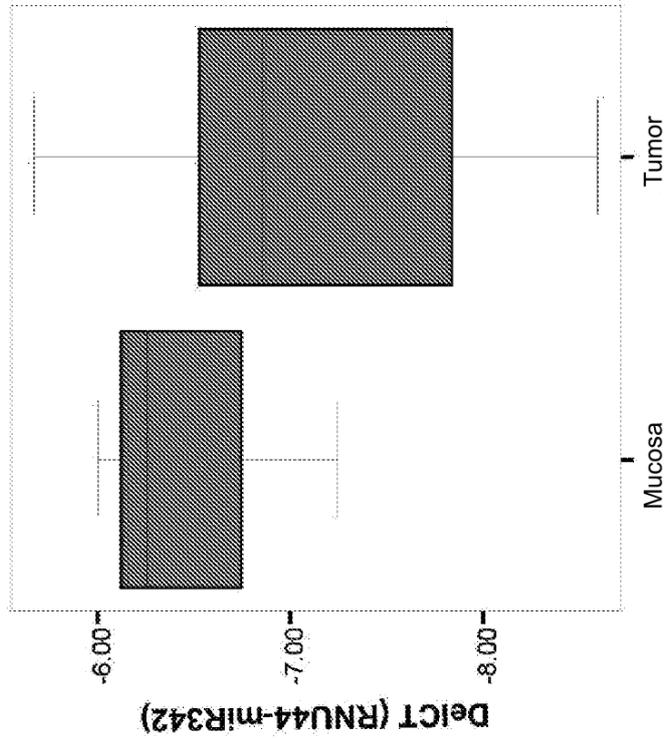


Fig 4a

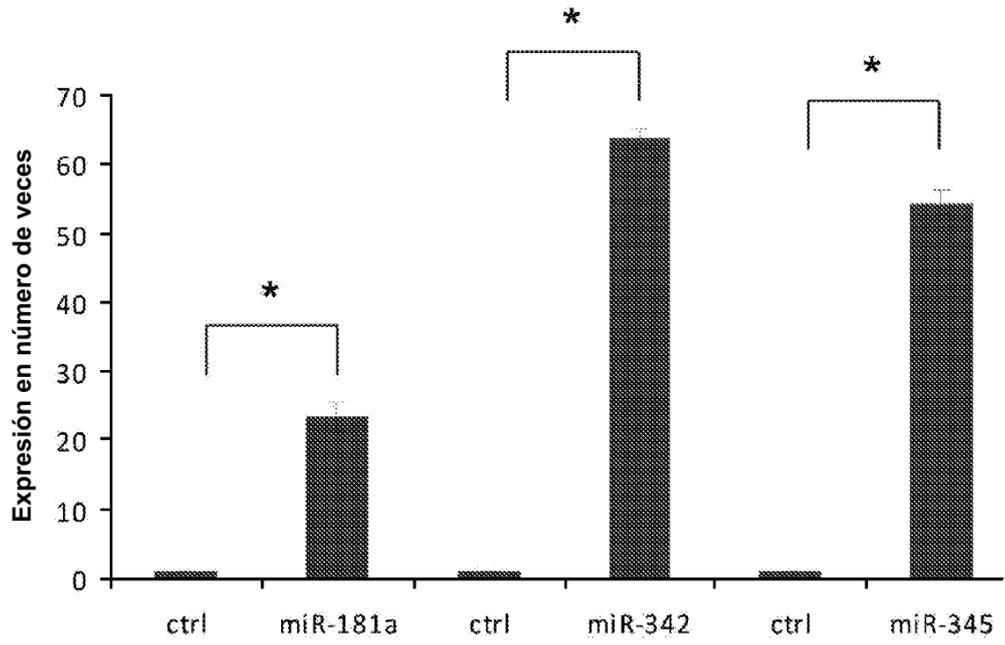


Fig 4b

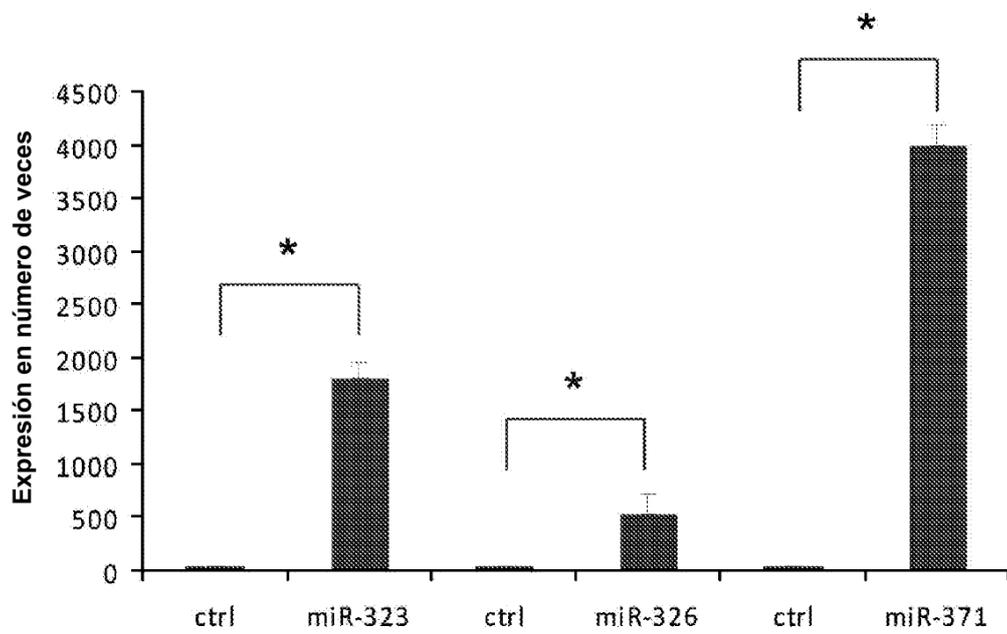


Fig 4c

	miR-181a	miR-326	miR-371	miR-345	miR-323	miR-342
miR-181a	1.000					
miR-326	0.572	1.000				
miR-371	0.113	0.119	1.000			
miR-345	0.373	0.573	0.158	1.000		
miR-323	0.099	0.087	0.602	0.170	1.000	
miR-342	0.074	0.065	0.388	0.123	0.577	1.000

Fig 4d

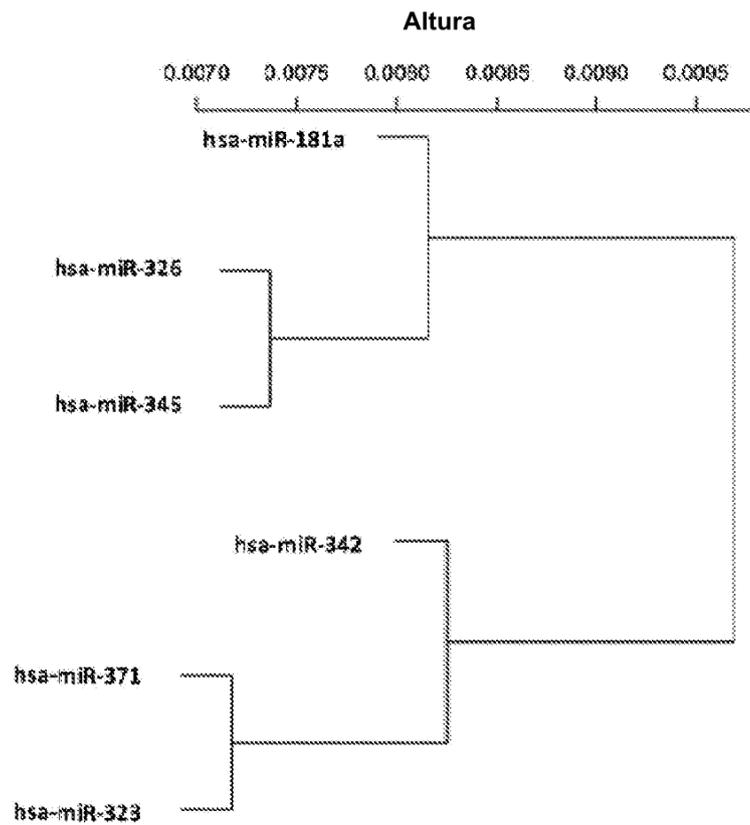


Fig 5a

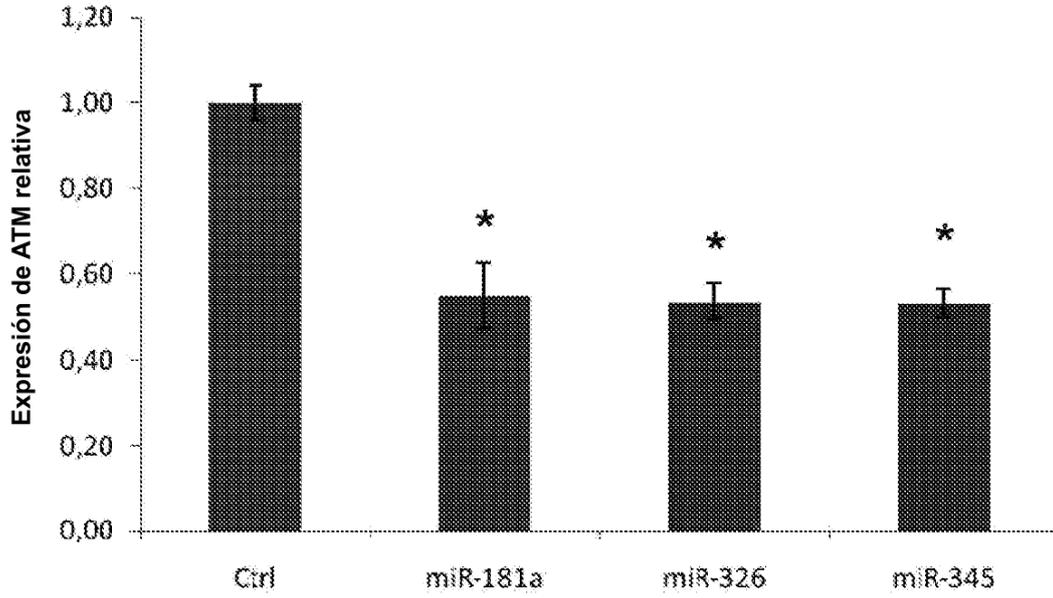


Fig 5b

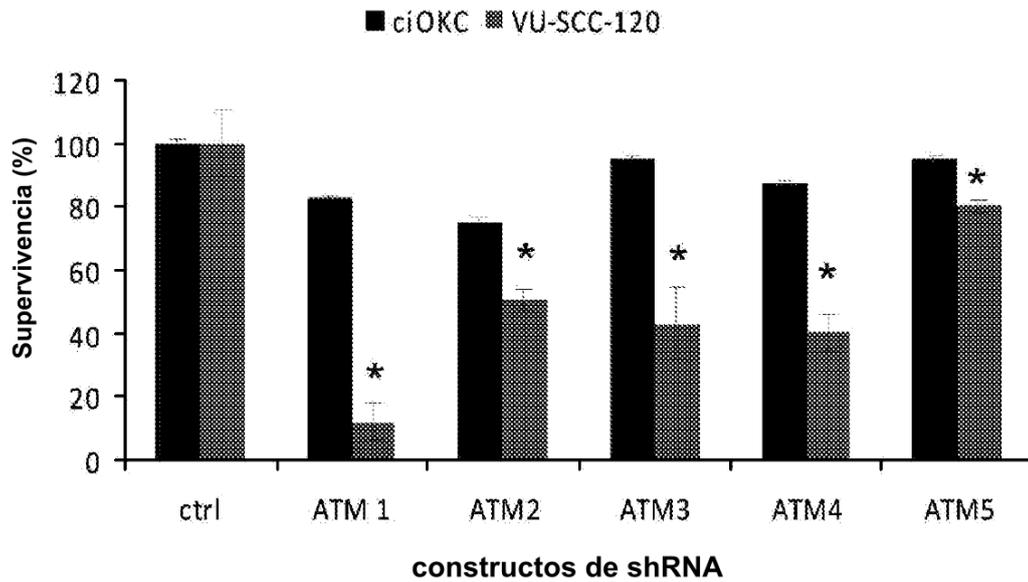


Fig 5c

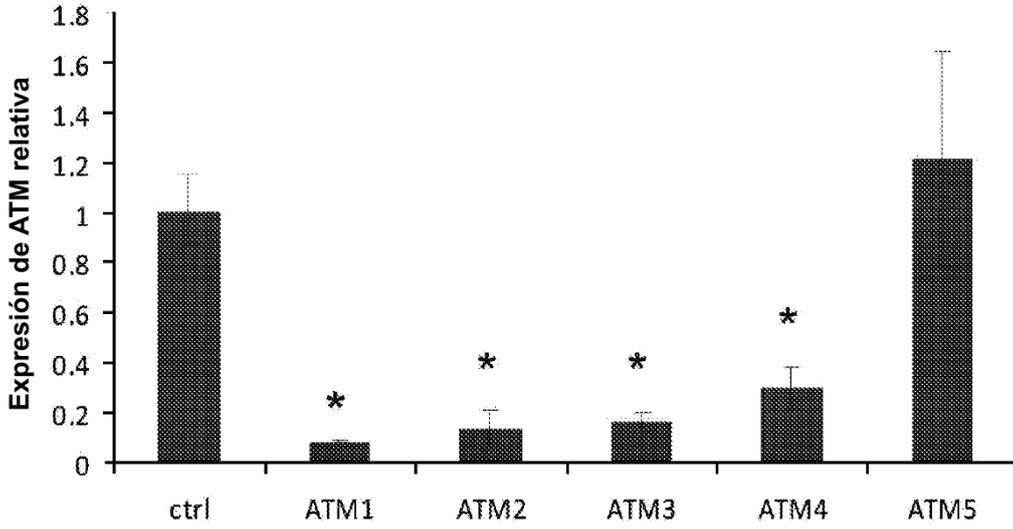


Fig 5d

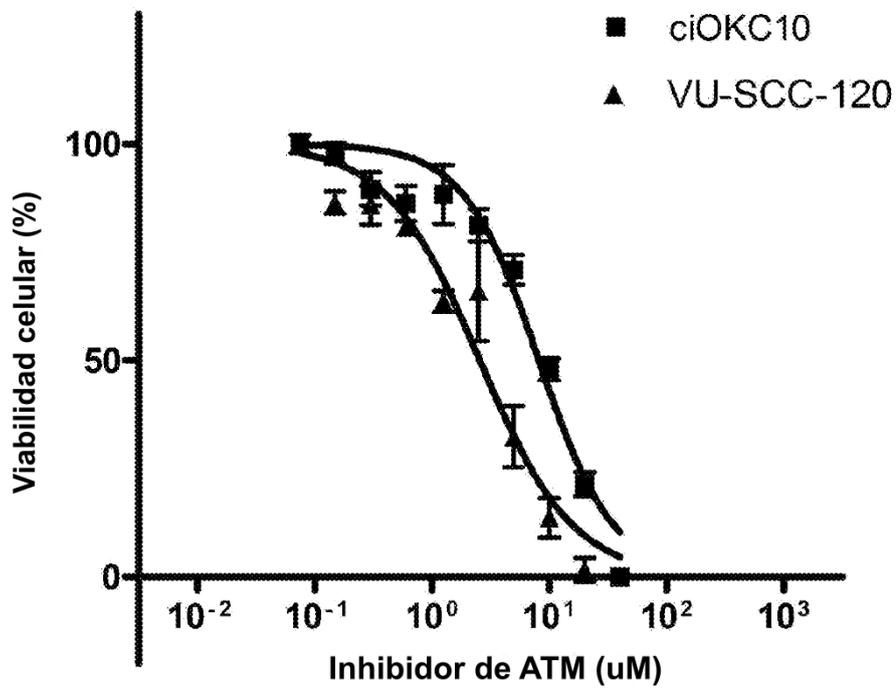


Fig 5e

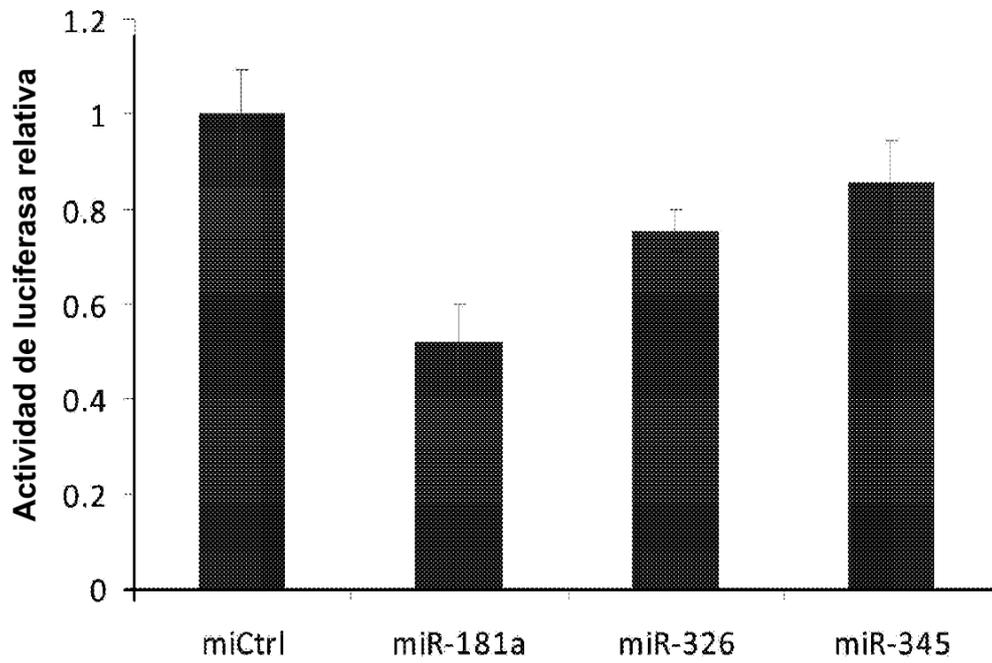


Fig 5f

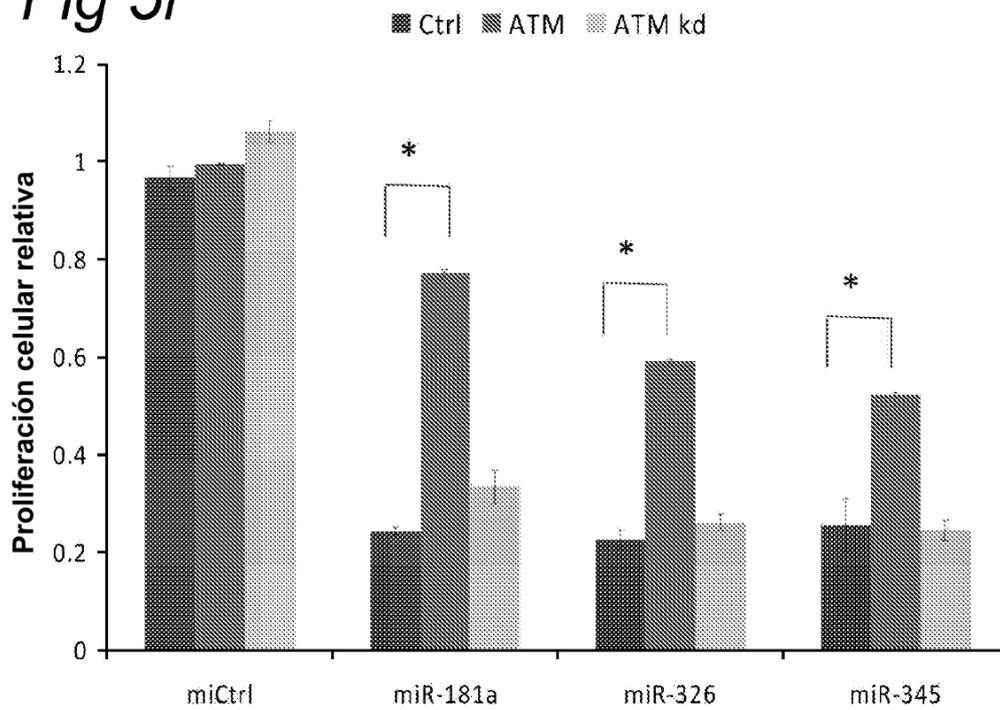


Fig. 6

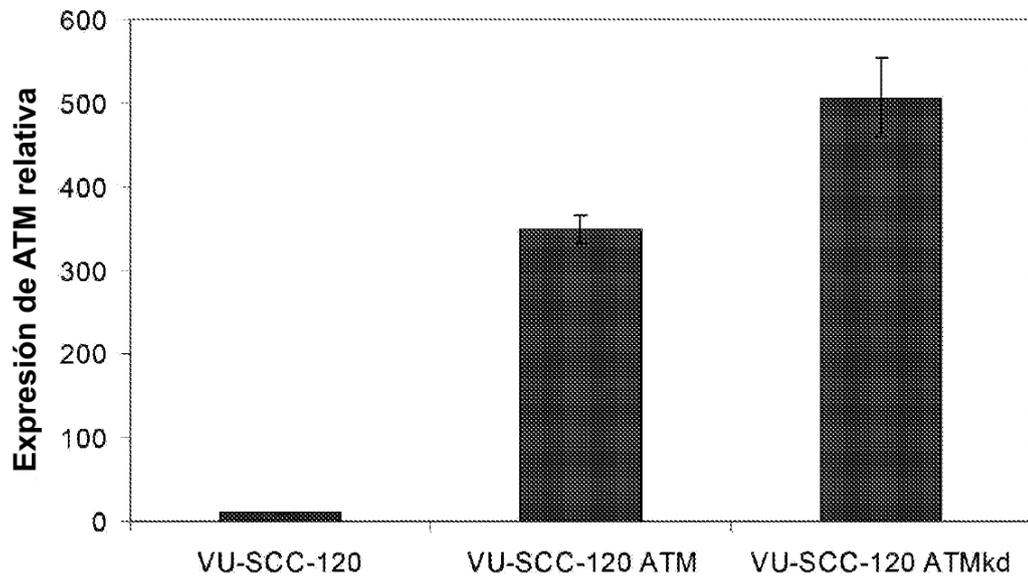


Fig. 7

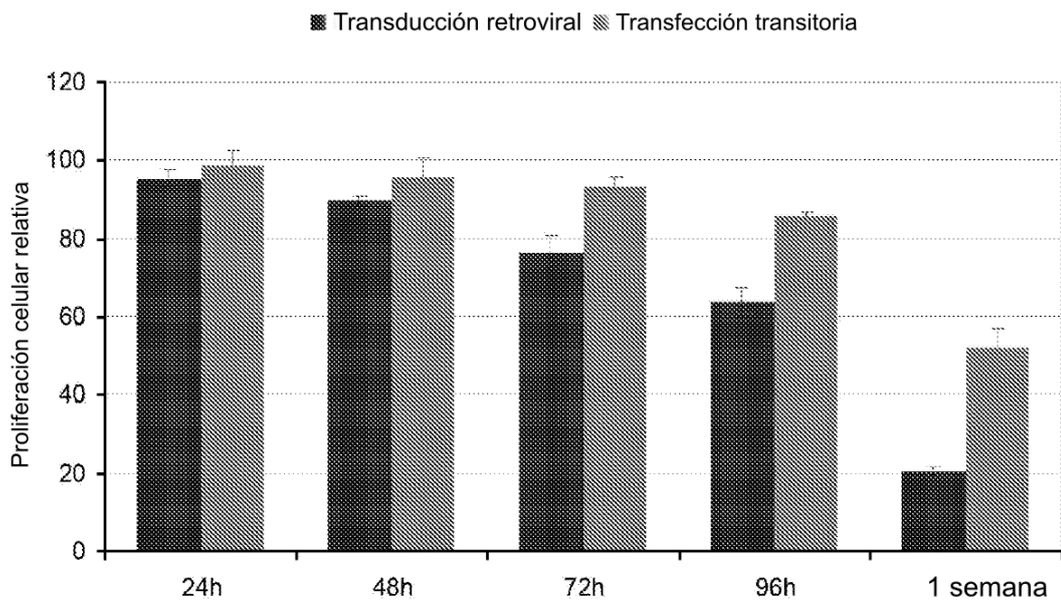


Fig. 8

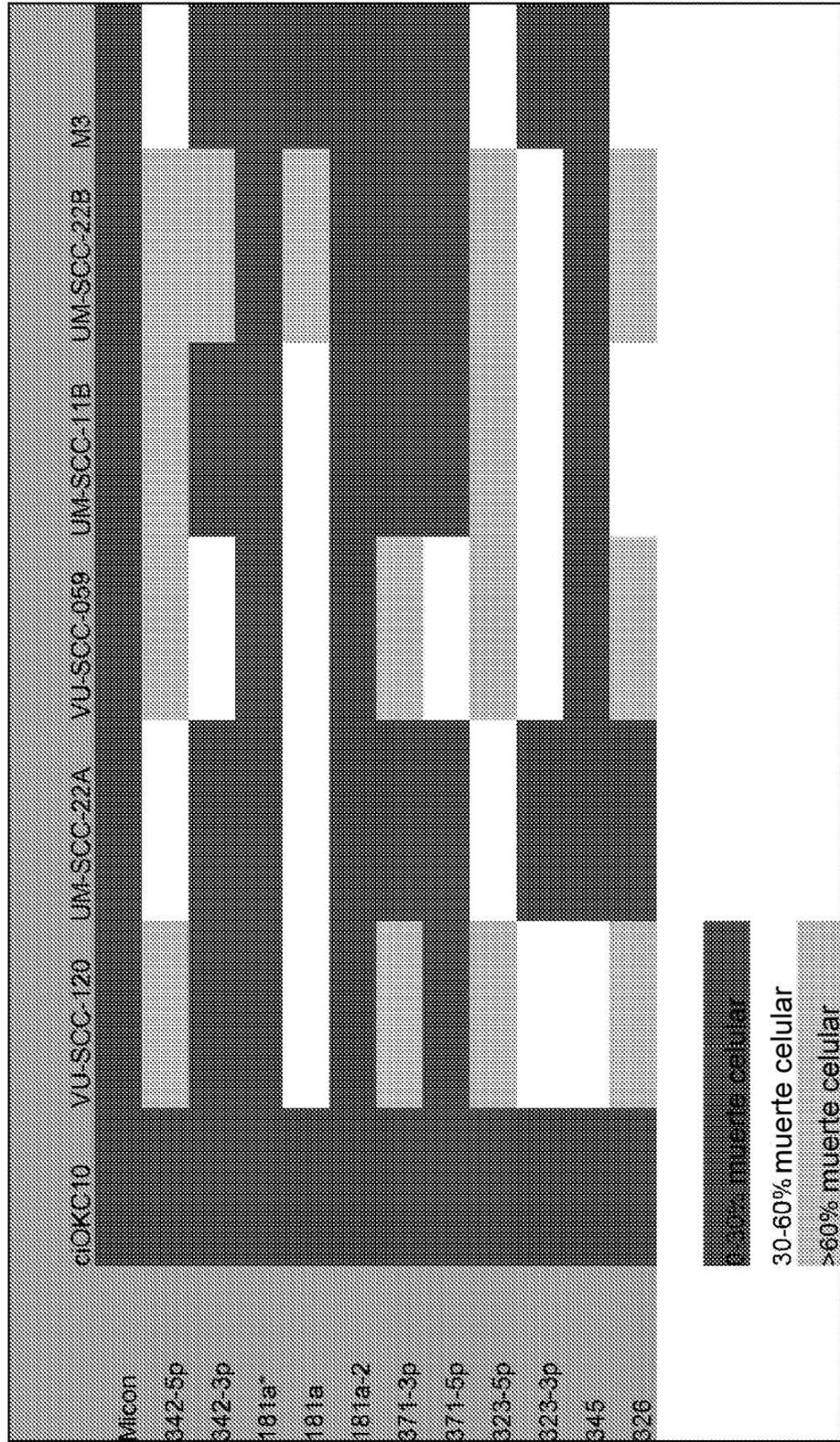


Fig. 9a

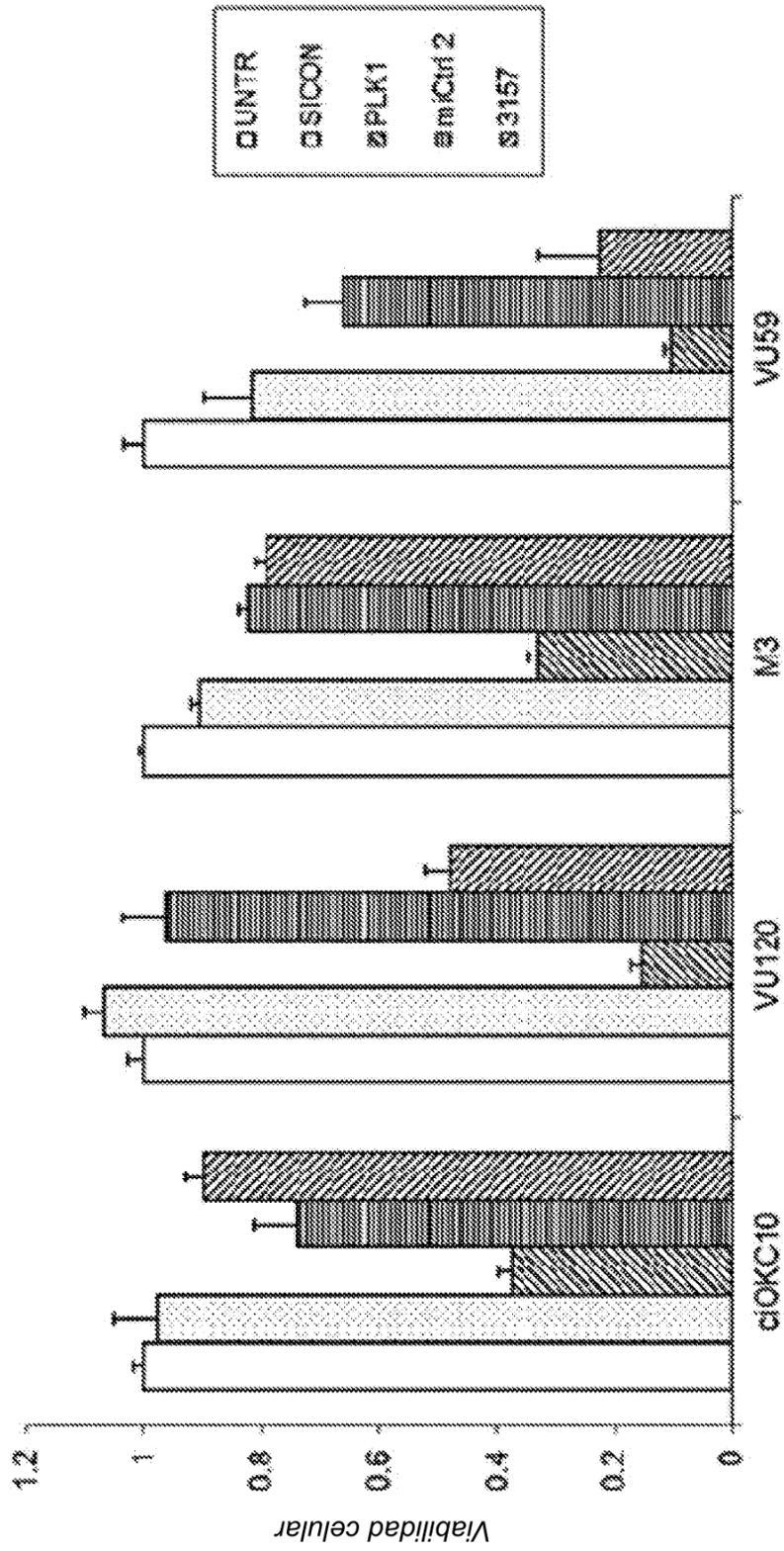


Fig. 9b

