

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 385 811**

51 Int. Cl.:  
**C12N 15/113** (2010.01)  
**A61K 31/713** (2006.01)  
**C07H 21/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10007180 .2**  
96 Fecha de presentación: **06.01.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2230304**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **22.09.2010**

54 Título: **Modulación de RNAi de RSV y usos terapéuticos del mismo**

30 Prioridad:  
**07.01.2005 US 642364 P**  
**09.03.2005 US 659828 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.08.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.08.2012**

73 Titular/es:  
**ALNYLAM PHARMACEUTICALS INC.**  
**300 THIRD STREET**  
**CAMBRIDGE, MA 02142, US**

72 Inventor/es:  
**Meyers, Rachel**

74 Agente/Representante:  
**Lehmann Novo, Isabel**

ES 2 385 811 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

Modulación de RNAi de RSV y usos terapéuticos del mismo.

## CAMPO TÉCNICO

5 La invención se refiere al campo de la terapia del virus respiratorio sincitial (RSV) y composiciones y métodos para modulación de la replicación viral, y más particularmente a la regulación decreciente de uno o más genes de un virus respiratorio sincitial por oligonucleótidos vía RNA de interferencia que se administran localmente a los pulmones y al conducto nasal por inhalación intranasal o sistémicamente por inyección intravenosa.

## ANTECEDENTES

10 En virtud de su función natural, el tracto respiratorio está expuesto a un gran número de patógenos transportados por el aire que causan una diversidad de enfermedades respiratorias. La infección viral del tracto respiratorio es la causa más común de hospitalización infantil en el mundo desarrollado con un número estimado de 91.000 admisiones anuales en los Estados Unidos a un coste de 300 millones de dólares. El virus respiratorio sincitial humano (RSV) y el virus de la parainfluenza (PIV) son los dos agentes principales de enfermedad respiratoria; juntos, infectan los tractos respiratorios superior e inferior, conduciendo a crup, neumonía y bronquiolitis (Openshaw, P.J.M. *Respir. Res.* 3 (Suppl 1), S15-S20 (2002), Easton, A.J., et al., *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 390-412 (2004)). El RSV por sí solo infecta hasta el 65% de los bebés dentro del primer año de vida, y prácticamente a todos dentro de los dos primeros años. Es también una causa importante de morbilidad y mortalidad en los ancianos. La inmunidad después de infección de RSV no es completa ni duradera, y por consiguiente, ocurren infecciones repetidas en todos los grupos de edad. Los niños pequeños que sufren bronquiolitis por RSV son más propensos a desarrollar respiración sibilante y asma posteriormente a lo largo de su vida. La investigación para tratamiento eficaz y vacuna contra RSV ha estado en curso durante aproximadamente cuatro décadas con poco éxito (Openshaw, P.J.M. *Respir. Res.* 3 (Suppl 1), S15-S20 (2002), Maggon, K. et al, *Rev. Med. Virol.* 14, 149-168 (2004)). En la actualidad no está aprobada clínicamente ninguna vacuna para cualquiera de las variedades de RSV. Cepas de ambos virus existen también para animales no humanos tales como ganado vacuno, cabras, cerdos y ovejas, causando pérdidas en la agricultura y las industrias lácteas y cárnicas (Easton, A.J. et al., *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 390-412 (2004)).

25 Ambos RSV contienen genomas de RNA no segmentados de cadena negativa y pertenecen a la familia *Paramyxoviridae*. Cierta número de características de estos virus han contribuido a las dificultades de prevención y terapia. Los genomas virales mutan a una tasa elevada debido a la falta de un mecanismo de lectura de pruebas de la replicación de los genomas de RNA, presentando un enfrentamiento significativo el diseño de una vacuna o agente antiviral fiable (Sullender, W.M. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 1-15 (2000)). Los inhibidores prometedoros de la proteína de fusión de RSV (F) fueron abandonados en parte debido a que el virus desarrollaba mutaciones resistentes que se mapeaban en el gen F (Razinkov, V., et. al., *Antivir. Res.* 55, 189-200 (2002), Morton, C.J. et al. *Virology* 311, 275-288 (2003)). Ambos virus se asocian con proteínas celulares, lo que aumenta la dificultad de obtención de material viral exento de células para la vacunación (Burke, E., et al., *Virology* 252, 137-148 (1998), Burke, E., et al., *J. Virol.* 74, 669-675 (2000), Gupta, S., et al., *J. Virol.* 72, 2655-2662 (1998)). Finalmente, la inmunología de ambos, y especialmente la de RSV, es sumamente compleja (Peebles, R.S., Jr., et al., *Viral Immunol.* 16, 25-34 (2003), Haynes, L.M., et al., *J. Virol.* 77, 9831-9844 (2003)). El uso de proteínas de RSV desnaturalizadas como vacunas conduce a "inmunopotenciación" o enfermedad intensificada por la vacuna (Polack, F.P. et al. *J. Exp. Med.* 196, 859-865 (2002)). El problema global se subraya por el reciente cierre de cierto número de programas biofarmacéuticos anti-RSV.

40 El genoma del RSV comprende una cadena simple de RNA de sentido negativo que tiene una longitud de 15222 nucleótidos y produce 11 proteínas principales. (Falsey, A. R, y E. E. Walsh, 2000, *Clinical Microbiological Reviews* 13:371-84). Dos de estas proteínas, las glicoproteínas F (fusión) y G (fijación) son las proteínas principales de la superficie y las más importantes para inducción de inmunidad protectora. La proteína SH (hidrófoba pequeña), la proteína M (matriz) y la proteína M2 (22 kDa) están asociadas con la envoltura viral pero no inducen una respuesta inmune protectora. Las proteínas N (proteína principal asociada a la nucleocápsida), P (fosfoproteína), y L (proteína principal de polimerasa) se encuentran asociadas con el RNA del virión. Las dos proteínas no estructurales, NS1 y NS2, participan probablemente en la interacción hospedador-virus, pero no están presentes en los viriones infecciosos.

45 Las cepas de RSV humano se han clasificado en dos grupos principales, A y B. Se ha demostrado que la glicoproteína G es la más divergente entre las proteínas del RSV. La variabilidad de la glicoproteína G del RSV entre y dentro de los dos grupos RSV se cree es importante para la capacidad del RSV de causar brotes anuales de enfermedad. La glicoproteína G comprende 289-299 aminoácidos (dependiendo de la cepa de RSV), y tiene una estructura de tallo intracelular, transmembranal, y altamente glicosilada de 90 kDa, así como dominios de fijación de heparina. La glicoproteína existe en formas secretadas y fijadas a la membrana.

50 Actualmente no se dispone de métodos satisfactorios de tratamiento de la infección RSV (Maggon K y S. Barik, 2004, *Reviews in Medical Virology* 14:149-68). La infección del tracto respiratorio inferior con RSV es una afección auto-limitante en la mayoría de los casos. No existen líneas orientativas o criterios definitivos en cuanto al modo de

tratamiento o el momento de ingresar o dar de alta a los niños pequeños y muchachos que padecen la enfermedad. La hipoxia, que puede ocurrir en asociación con la infección RSV, puede tratarse con oxígeno vía una cánula nasal. La ventilación mecánica para muchachos con insuficiencia respiratoria, choque, o apnea recurrente puede reducir la mortalidad. Algunos médicos prescriben esteroides. Sin embargo, varios estudios han demostrado que la terapia con esteroides no afecta al curso clínico de los niños y muchachos ingresados en el hospital con bronquiolitis. Así, los corticosteroides, solos o en combinación con broncodilatadores, pueden ser inútiles en el tratamiento de la bronquiolitis en pacientes sanos por lo demás y no ventilados. En niños pequeños y muchachos con enfermedades cardiopulmonares subyacentes, tales como disfasia broncopulmonar y asma, se han utilizado también esteroides.

La ribavirina, un análogo de guanosina con actividad antiviral, ha sido utilizada para tratar niños pequeños y muchachos con bronquiolitis por RSV desde mediados de los años 1980, pero muchos estudios de evaluación de su uso han dado resultados conflictivos. En la mayoría de los centros, el uso de ribavirina está restringido en la actualidad a pacientes inmunodeficientes y a aquellos que están gravemente enfermos.

La gravedad de la bronquiolitis por RSV ha sido asociada con concentraciones bajas de retinol sérico, pero pruebas realizadas en muchachos hospitalizados con bronquiolitis por RSV han demostrado que el suplemento de vitamina A no proporciona efecto beneficioso alguno. Pruebas terapéuticas de 1500 mg/kg de inmunoglobulina de RSV intravenosa o 100 mg/kg de inmunoglobulina inhalada para la infección por RSV del tracto respiratorio inferior no han conseguido tampoco demostrar efectos beneficiosos sustanciales.

En los países desarrollados, el tratamiento de la infección del tracto respiratorio inferior por RSV está limitado generalmente a terapia sintomática. La terapia antiviral se limita usualmente a situaciones amenazantes para la vida debido a su elevado coste y a la falta de consenso en cuanto a la eficacia. En los países en desarrollo, el oxígeno es la terapia principal (cuando está disponible), y la única vía para reducir la mortalidad es la basada en prevención.

El RNA de interferencia o "RNAi" es un término acuñado inicialmente por Fire y colaboradores para describir la observación de que el RNA bicatenario (dsRNA) puede bloquear la expresión génica cuando se introduce en gusanos (Fire *et al.*, *Nature* 391:806-811, 1998). El dsRNA corto dirige la silenciamiento específica de genes y posterior a la transcripción en muchos organismos, con inclusión de vertebrados, y ha proporcionado un nuevo instrumento para el estudio de la función génica. El RNAi se ha sugerido como método de desarrollo de una nueva clase de agentes terapéuticos. Sin embargo, hasta la fecha, éstos se han mantenido en su mayoría como sugerencias sin que ninguna prueba haya demostrado que puede utilizarse terapéuticamente RNAi.

Por consiguiente, existe necesidad de vacunas seguras y eficaces contra RSV, especialmente para niños pequeños y muchachos. Existe necesidad también de agentes y métodos terapéuticos para el tratamiento de la infección por RSV en todas las edades y en individuos inmunodeficientes. Existe asimismo necesidad de métodos científicos para caracterizar la respuesta inmunoprotectora para RSV a fin de que la patogénesis de la enfermedad pueda estudiarse, y pueda facilitarse un cribado de agentes terapéuticos y vacunas. La presente invención resuelve los inconvenientes previos en la técnica por proporcionar métodos y composiciones eficaces para modular o prevenir la infección de RSV. Específicamente, la presente invención representa un avance en la técnica por proporcionar agentes de iRNA que se ha demostrado reducen los niveles de RSV *in vitro* e *in vivo*, siendo asimismo eficaces contra ambos subtipos principales de RSV, y una demostración de la actividad terapéutica de esta clase de moléculas.

WO 2004/090108 describe conjugados de RNAs de interferencia y enumera RSV como una diana para inhibición por fabricación de siRNAs contra los genes P, N y L.

## SUMARIO

La presente invención se define en las reivindicaciones

La presente invención está basada en la demostración *in vitro* e *in vivo* de que RSV puede ser inhibido por administración intranasal de agentes de iRNA, así como por administración parenteral de tales agentes, y la identificación de agentes de iRNA potentes del gen N de RSV que pueden reducir los niveles de RNA con ambos subtipos A y B de RSV. Basándose en estos descubrimientos, la presente invención proporciona composiciones y métodos específicos que son útiles en la reducción de los niveles de mRNA de RSV, los niveles de proteína de RSV y los títulos de virus de RSV en un individuo, *v.g.*, un mamífero, tal como un humano.

La presente invención proporciona específicamente un agente de iRNA que comprende una cadena sentido constituida por SEQ ID NO: 267 y una cadena antisentido constituida por SEQ ID NO: 268.

Adicionalmente, el agente de iRNA puede contener o bien sólo subunidades de ribonucleótidos existentes naturalmente, o puede sintetizarse de tal modo que contenga una o más modificaciones en el azúcar o la base de una o más de las unidades de ribonucleótidos que se incluyen en el agente. El agente de iRNA puede modificarse ulteriormente de tal modo que se fije a un ligando que está seleccionado para mejorar la estabilidad, distribución o absorción celular del agente, *v.g.* colesterol. Los agentes de iRNA pueden encontrarse adicionalmente en forma aislada o pueden formar parte de una composición farmacéutica utilizada para los métodos descritos en esta memoria, particularmente como una composición farmacéutica formulada para administración a los pulmones o al

conducto nasal o formulada para administración parenteral. Las composiciones farmacéuticas pueden contener uno o más agentes de iRNA, y en algunas realizaciones, contener dos o más agentes de iRNA, dirigido cada uno a un segmento diferente de un gen de RSV o a dos genes de RSV diferentes.

5 Se describen en esta memoria métodos para reducir el nivel de mRNA viral de RSV en una célula. Tales métodos comprenden el paso de administrar uno de los agentes de iRNA de la presente invención a un individuo como se describe adicionalmente más adelante. Los presentes métodos utilizan los mecanismos celulares implicados en el RNA de interferencia para degradar selectivamente el mRNA viral en una célula y comprenden el paso de poner en contacto una célula con uno de los agentes antivirales de iRNA de la presente invención. Tales métodos pueden realizarse directamente sobre una célula o pueden realizarse sobre un individuo mamífero por administración a un individuo de uno de los agentes/composiciones farmacéuticas de iRNA de la presente invención. La reducción del mRNA viral en una célula da como resultado una reducción en la cantidad de proteína viral producida, y en un organismo, da como resultado una disminución en el título de virus replicante (como se muestra en los Ejemplos).

15 Los usos y composiciones médicas de la invención, es decir, los usos y las composiciones de agente de iRNA pueden utilizarse con cualquier dosis y/o formulación descrita en esta memoria, así como con cualquier ruta de administración descrita en esta memoria. Es particularmente importante la demostración en esta memoria de la administración intranasal de un agente de iRNA y su capacidad para inhibir la replicación viral en los tejidos respiratorios.

### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 FIG. 1: inhibición in vitro de RSV utilizando agentes de iRNA. Los agentes de iRNA estipulados en la Tabla 1 (a-c) se testaron respecto a actividad anti-RSV en un ensayo de formación de calvas como se describe en los Ejemplos. Cada columna (barra) representa un agente de iRNA estipulado en la Tabla 1 (a-c), v.g. la columna 1 es el primer agente en la Tabla 1a, etc. Se identificaron los agentes activos de iRNA.

25 FIG. 2: Inhibición de la respuesta a la dosis in vitro de RSV utilizando agentes de iRNA. Ejemplos de agentes activos de la Tabla 1 se testaron respecto a actividad anti-RSV en un ensayo de formación de calvas como se describe en los Ejemplos a cuatro concentraciones. Se encontró una respuesta dependiente de la dosis con los agentes iRNA activo testado.

FIG. 3: Inhibición in vitro del subtipo B de RSV utilizando agentes de iRNA. Los agentes de iRNA estipulados en FIG. 2 se testaron respecto a actividad anti-RSV contra el subtipo B en un ensayo de formación de calvas como se describe en los Ejemplos. El subtipo B era inhibido por los agentes de iRNA testados.

30 FIG. 4: Inhibición in vivo de RSV utilizando agentes de iRNA. Agentes como los descritos en la Figura se testaron respecto a actividad anti-RSV en un modelo de ratón como se describe en los Ejemplos. Los agentes de iRNA eran eficaces para reducir los títulos de virus in vivo.

35 FIG. 5: Inhibición in vivo de RSV utilizando AL-DP-1730. Se testó AL-DP-1730 respecto a actividad dependiente de la dosis utilizando los métodos estipulados en los Ejemplos. El agente demostró una respuesta dependiente de la dosis.

FIG. 6: Inhibición in vivo de RSV utilizando agentes de iRNA. Los agentes de iRNA descritos en la Figura se testaron respecto a actividad anti-RSV in vivo como se describe en los Ejemplos.

FIG. 7: Inhibición in vivo de RSV utilizando agentes de iRNA. Los agentes de iRNA descritos en la Figura se testaron respecto a actividad anti-RSV in vivo como se describe en los Ejemplos.

40 FIG. 8A: Inhibición in vivo de RSV utilizando agentes de iRNA administrados tópicamente.

FIG. 8B: Inhibición in vivo de RSV utilizando los agentes de iRNA administrados por vía aerosol. Los agentes de iRNA descritos en la Figura se testaron respecto a actividad anti-RSV in vivo como se describe en los Ejemplos.

FIG. 9: Protección in vivo contra la infección de RSV utilizando agentes de iRNA. Los agentes de iRNA descritos en la Figura se testaron antes del enfrentamiento a RSV para testar su actividad protectora.

### DESCRIPCIÓN DETALLADA

45 Para facilidad de exposición, el término "nucleótido" o "ribonucleótido" se utiliza a veces en esta memoria con referencia a una o más subunidades monómeras de un agente de RNA. Se comprenderá que el uso del término "ribonucleótido" o "nucleótido" en esta memoria puede, en el caso de un RNA o sustituto de nucleótido modificado, referirse también a un nucleótido modificado, o resto de reemplazamiento sustituto, como se describe ulteriormente en esta memoria, en una o más posiciones.

50 Un "agente de RNA", como se utiliza en esta memoria, es un RNA sin modificar, RNA modificado, o sustituto de nucleósido, todos los cuales se describen en esta memoria o son bien conocidos en la técnica de la síntesis de RNA. Si bien se describen numerosos RNAs y sustitutos de nucleósidos modificados, ejemplos preferidos incluyen

aquéllos que tienen mayor resistencia a la degradación por las nucleasas que los RNAs sin modificar. Ejemplos preferidos incluyen aquéllos que tienen una modificación 2' en el azúcar, una modificación en un saliente monocatenario, preferiblemente un saliente monocatenario 3' o, particularmente si es monocatenaria, una modificación 5' que incluye uno o más grupos fosfato o uno o más análogos de un grupo fosfato.

5 Un "agente de iRNA" (abreviatura para "agente de RNA de interferencia"), como se utiliza en esta memoria, es un agente de RNA, que puede regular en sentido decreciente la expresión de un gen diana, v.g. RSV. Si bien no se desea quedar ligados por la teoría, un agente de iRNA puede actuar por uno o más de cierto número de mecanismos, que incluyen escisión post-transcripcional de un mRNA diana al que se hace referencia a veces en la técnica como RNAi, o mecanismos pre-transcripcionales o pre-traduccionales. Un agente de iRNA puede ser un  
10 agente de iRNA bicatenario (ds).

Un "agente de ds iRNA" (abreviatura para "agente de iRNA bicatenario"), como se utiliza en esta memoria, es un agente de iRNA que incluye más de una, y preferiblemente dos, cadenas en las cuales la hibridación intercatenaria puede formar una región de estructura dúplex. En esta memoria, una "cadena" hace referencia a una secuencia contigua de nucleótidos (con inclusión de nucleótidos no existentes naturalmente o modificados). Las dos o más  
15 cadenas pueden ser, o formar cada una parte de moléculas separadas, o pueden estar interconectadas covalentemente, v.g. por un enlazador, v.g. un enlazador de polietilenglicol, para formar una sola molécula. Al menos una cadena puede incluir una región que es suficientemente complementaria a un RNA diana. Dicha cadena se conoce como la "cadena antisentido". Una segunda cadena comprendida en el agente dsRNA que comprende una región complementaria a la cadena antisentido se conoce como la "cadena sentido". No obstante, un agente de ds  
20 iRNA puede formarse también a partir de una sola molécula de RNA que es, al menos en parte, auto-complementaria, formando, v.g., una estructura en horquilla o "mango de sartén" con inclusión de una región dúplex. En tal caso, el término "cadena" hace referencia a una de las regiones de la molécula de RNA que es complementaria a otra región de la misma molécula de RNA.

Aunque, en las células de mamífero, los agentes de ds iRNA largos pueden inducir la respuesta de interferón que es frecuentemente perjudicial, los agentes de ds iRNA cortos no desencadenan la respuesta de interferón, al menos no en tal grado que sea perjudicial para la célula y/o el hospedador. Los agentes de iRNA de la presente invención incluyen moléculas que son suficientemente cortas de tal modo que no desencadenan una respuesta perjudicial de interferón en las células de mamífero. Así, la administración de una composición de un agente de iRNA (v.g.,  
25 formulada como se describe en esta memoria) a una célula de mamífero puede utilizarse para silenciar la expresión de un gen RSV al tiempo que se soslaya una respuesta de interferón perjudicial. Las moléculas que son suficientemente cortas para no desencadenar una respuesta perjudicial de interferón se denominan agentes siRNA o siRNAs en esta memoria. Como se utiliza en esta memoria, "agente siRNA" o "siRNA", se refiere a un agente de iRNA, v.g., un agente de ds iRNA, que es suficientemente corto para no inducir una respuesta perjudicial de interferón en una célula humana, v.g., tiene una región dúplex de menos de 30 pares de nucleótidos.  
30

35 Los agentes de iRNA aislados descritos en esta memoria, con inclusión de agentes de ds iRNA y agentes siRNA, pueden mediar la silenciamiento de un gen, v.g., por degradación del RNA. Por conveniencia, a dicho RNA se hace referencia también en esta memoria como el RNA a silenciar. A un gen de este tipo se hace referencia también como un gen diana. Preferiblemente, el RNA a silenciar es un producto génico de un gen de RSV, particularmente el producto de los genes P, N o L.

40 Como se utiliza en esta memoria, la expresión "media RNAi" hace referencia a la capacidad de un agente para silenciar, de una manera específica de la secuencia, un gen diana. La "silenciamiento de un gen diana" significa el proceso por el cual una célula que contiene y/o secreta un cierto producto del gen diana, cuando no está en contacto con el agente, contendrá y/o secretará al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o 90% menos de dicho producto génico cuando está en contacto con el agente, en comparación con una célula similar que no se ha  
45 puesto en contacto con el agente. Dicho producto del gen diana puede, por ejemplo, ser un RNA mensajero (mRNA), una proteína, o un elemento regulador.

En los usos antivirales de la presente invención, la silenciamiento de un gen diana dará como resultado una reducción en el "título viral" en una célula o en el individuo. Como se utiliza en esta memoria, "reducción en el título viral" hace referencia a una disminución en el número de virus viables producidos por una célula o encontrados en un  
50 organismo que sufre la silenciamiento de un gen diana viral. La reducción en la cantidad celular de virus producida conducirá preferiblemente a una disminución en la cantidad de virus medible producida en los tejidos de un individuo sometido a tratamiento y una reducción en la gravedad de los síntomas de la infección viral. Se hace referencia también a los agentes de iRNA de la presente invención como "agentes de iRNA antivirales".

Como se utiliza en esta memoria, un "gen RSV" se refiere a uno cualquiera de los genes identificados en el genoma del virus RSV (véase Falsey, A.R., y E.E. Walsh, 2000, *Clinical Microbiological Reviews* 13:371-84). Estos genes son fácilmente conocidos en la técnica e incluyen los genes N, P y L que se ilustran en esta memoria.  
55

Como se utiliza en esta memoria, el término "complementario" se utiliza para indicar un grado suficiente de complementariedad tal que ocurre fijación estable y específica entre un compuesto de la invención y una molécula de RNA diana, v.g. una molécula de mRNA viral de RSV. La fijación específica requiere un grado suficiente de

complementariedad para evitar fijación inespecífica del compuesto oligómero a secuencias distintas de la diana en condiciones en las cuales se desea la fijación específica, es decir en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, o en el caso de ensayos *in vitro*, en las condiciones en que se realizan los ensayos. Las secuencias distintas de la diana difieren típicamente por al menos cuatro nucleótidos.

- 5 Como se utiliza en esta memoria, un agente de iRNA es "suficientemente complementario" a un RNA diana, *v.g.* un mRNA diana (*v.g.*, un mRNA de RSV diana) si el agente de iRNA reduce la producción de una proteína codificada por el RNA diana en una célula. El agente de iRNA puede ser también "exactamente complementario" al RNA diana, *v.g.*, el RNA diana y el agente de iRNA se reasocian, preferiblemente para formar un híbrido producido exclusivamente por pares de bases Watson-Crick en la región de complementariedad exacta. Un agente de iRNA
- 10 "suficientemente complementario" puede incluir una región interna (*v.g.*, de al menos 10 nucleótidos) que es exactamente complementaria a un RNA viral diana. Además, en algunas realizaciones, el agente de iRNA discrimina específicamente una diferencia de un solo nucleótido. En este caso, el agente de iRNA media sólo RNAi si se encuentra complementariedad exacta en la región (*v.g.*, dentro de 7 nucleótidos) de la diferencia de un solo nucleótido. Agentes de iRNA preferidos están basados en o consistirán en o comprenderán las secuencias de
- 15 sentido y antisentido estipuladas en los Ejemplos.

Como se utiliza en esta memoria, "esencialmente idéntico" cuando se utiliza haciendo referencia a una primera secuencia de nucleótidos en comparación con una segunda secuencia de nucleótidos significa que la primera secuencia de nucleótidos es idéntica a la segunda secuencia de nucleótidos excepto por una, dos o tres sustituciones de nucleótidos (*v.g.*, adenosina reemplazada por uracilo).

- 20 Como se utiliza en esta memoria, un "individuo" hace referencia a un organismo mamífero sometido a tratamiento para un trastorno mediado por expresión viral, tal como infección de RSV, o sometido a tratamiento profiláctico para prevenir la infección viral. El individuo puede ser cualquier mamífero, tal como un primate, vaca, caballo, ratón, rata, perro, cerdo o cabra. En la realización preferida, el individuo es un humano.
- 25 Como se utiliza en esta memoria, el tratamiento de la infección de RSV se refiere al mejoramiento de cualesquiera puntos finales biológicos o patológicos que 1) está mediado en parte por la presencia del virus en el individuo y 2) cuyo resultado puede verse afectado por reducción del nivel de productos génicos virales presente.

#### **Diseño y Selección de Agentes de iRNA**

- La presente invención está basada en la demostración de la silenciamiento de genes diana de un gen viral respiratorio *in vivo* después de administración local a los pulmones y al conducto nasal de un agente de iRNA sea por
- 30 administración/inhalación intranasal o por vía sistémica/parenteral por inyección y el tratamiento resultante de la infección viral. La presente invención se extiende adicionalmente al uso de agentes de iRNA para más de un virus respiratorio y el tratamiento de ambas infecciones de virus con co-administración de dos o más agentes de iRNA.

- Basándose en estos resultados, se describe un agente de iRNA que puede ser utilizado en el tratamiento de una infección viral, particularmente virus respiratorios y en particular infección de RSV, en forma aislada y como una
- 35 composición farmacéutica descrita más adelante. Tales agentes incluirán una cadena sentido que tiene al menos 15 nucleótidos contiguos o más que son complementarios a un gen viral y una cadena antisentido que tiene al menos 15 nucleótidos contiguos o más que son complementarios a la secuencia de la cadena sentido. Son particularmente útiles agentes de iRNA que están constituidos por, consisten esencialmente en o comprenden una secuencia de nucleótidos del gen P, N, y L de RSV como se estipula en la Tabla 1 (a-c).

- 40 Los agentes de iRNA están basados en y comprenden al menos 15 nucleótidos contiguos o más de uno de los agentes de iRNA que se muestran como activos en la Tabla 1 (a-c). En tales agentes, el agente puede estar constituido, o consistir esencialmente en, o comprender la secuencia entera proporcionada en la tabla o puede comprender 15 o más residuos contiguos estipulados en la Tabla 1 (a-c) junto con nucleótidos adicionales de regiones contiguas del gen diana.

- 45 Un agente de iRNA puede estar diseñado racionalmente basándose en información de secuencia y características deseadas y la información proporcionada en la Tabla 1 (a-c). Por ejemplo, un agente de iRNA puede estar diseñado de acuerdo con la secuencia de los agentes estipulados en la tabla y teniendo en cuenta la secuencia codificante entera del gen diana.

- De acuerdo con ello, se describen agentes de iRNA que comprenden una cadena sentido y cadena antisentido cada una de las cuales comprende una secuencia de al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ó 23 nucleótidos que es esencialmente idéntica a, como se define arriba, una porción de un gen de un virus respiratorio, particularmente los genes de las proteínas P, N o L de RSV. Agentes de iRNA ilustrativos incluyen aquéllos que comprenden 15
- 50 nucleótidos contiguos o más de uno de los agentes estipulados en la Tabla 1 (a-c).

- La cadena antisentido de un agente de iRNA debería ser igual a o al menos 15, 16, 17, 18, 19, 25, 29, 40, ó 50 nucleótidos de longitud. La misma debería ser igual a o menor que 50, 40, ó 30 nucleótidos de longitud. Intervalos preferidos son 15 a 30, 17 a 25, 19 a 23, y 19 a 21 nucleótidos de longitud. Agentes de iRNA ilustrativos incluyen

aquellos que comprenden 15 nucleótidos o más de una de las cadenas antisentido de uno de los agentes indicados en la Tabla 1 (a-c).

5 La cadena sentido de un agente de iRNA debería ser igual a o al menos 15, 16, 17, 18, 19, 25, 29, 40, ó 50 nucleótidos de longitud. La misma debería ser igual a o menor que 50, 40, ó 30 nucleótidos de longitud. Intervalos preferidos son 15 a 30, 17 a 25, 19 a 23, y 19 a 21 nucleótidos de longitud. Agentes de iRNA ilustrativos incluyen aquellos que comprenden 15 nucleótidos o más de una de las cadenas de sentido de uno de los agentes de la Tabla 1 (a-c).

10 La porción bicatenaria de un agente de iRNA debería ser igual a o al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 29, 40 ó 50 pares de nucleótidos de longitud. La misma debería ser igual a o menor que 50, 40, ó 30 pares de nucleótidos de longitud. Intervalos preferidos son 15 a 30, 17 a 25, 19 a 23, y 19 a 21 pares de nucleótidos de longitud.

15 Los agentes estipulados en la Tabla 1 (a-c) tienen una longitud de 21 nucleótidos para cada cadena. Los agentes de iRNA contienen una región bicatenaria de 19 nucleótidos con un saliente de dos nucleótidos en cada uno de los extremos 3' del agente. Estos agentes pueden estar modificados como se describe en esta memoria para obtener agentes equivalentes que comprenden al menos una porción de estas secuencias (15 nucleótidos contiguos o más) y/o modificaciones respecto a las bases y enlaces de oligonucleótidos.

20 Generalmente, los agentes iRNA incluyen una región de complementariedad suficiente al gen viral, *v.g.* la proteína P, N, o L de RSV, y tienen longitud suficiente en términos de nucleótidos, para que el agente de iRNA, o un fragmento del mismo, pueda mediar la regulación decreciente del gen viral específico. Las cadenas antisentido de los agentes de iRNA de la presente invención son con preferencia totalmente complementarias a las secuencias de mRNA del gen viral, como sucede en esta memoria para las proteínas P, L, o N de RSV. Sin embargo, no es necesario que exista complementariedad perfecta entre el agente iRNA y la diana, pero la correspondencia tiene que ser suficiente para permitir que el agente de iRNA, o un producto de escisión del mismo, dirija la silenciación específica de la secuencia, *v.g.*, por escisión de RNAi de un mRNA de RSV.

25 Por tanto, los agentes de iRNA descritos incluyen agentes que comprenden una cadena sentido y una cadena antisentido, cada una de las cuales comprende una secuencia de al menos 16, 17 ó 18 nucleótidos que es esencialmente idéntica, como se define más adelante, a una de las secuencias de un gen viral, particularmente la proteína P, N o L de RSV, tal como los agentes estipulados en la Tabla 1 (a-c), excepto que no más de 1, 2 ó 3 nucleótidos por cadena, respectivamente, han sido sustituidos por otros nucleótidos (*v.g.* adenosina reemplazada por uracilo), mientras que retienen esencialmente la capacidad para inhibir la expresión de RSV en células humanas cultivadas, como se define más adelante. Estos agentes poseerán por tanto al menos 15 nucleótidos o más idénticos a una de las secuencias de un gen viral, particularmente el gen de las proteínas P, L o N de RSV, excepto que se introducen 1, 2 ó 3 apareamientos de bases erróneos con respecto a la secuencia de mRNA del virus diana o entre las cadenas de sentido y antisentido. La tolerancia de apareamientos erróneos respecto a la secuencia del mRNA del virus diana, particularmente en la cadena antisentido, es máxima en las regiones terminales y, si están presentes los mismos, se encuentran preferiblemente en una región o regiones terminales, *v.g.*, dentro de 6, 5, 4, ó 3 nucleótidos de un extremo 5' y/o 3', muy preferiblemente dentro de 6, 5, 4, ó 3 nucleótidos del extremo 5' de la cadena sentido o el término 3' de la cadena antisentido. Las cadenas sentido precisan únicamente tener complementariedad suficiente con la cadena antisentido para mantener el carácter global bicatenario de la molécula.

40 Las cadenas de sentido y antisentido pueden seleccionarse de tal modo que el agente de iRNA incluye una sola cadena o región no apareada en uno o ambos extremos de la molécula, tal como las ilustradas en la Tabla 1 (a-c). Así, un agente de iRNA contiene cadenas de sentido y antisentido, preferiblemente apareadas para contener un saliente, *v.g.* uno o dos salientes 5' o 3' pero preferiblemente un saliente 3' de 2-3 nucleótidos. La mayoría de las realizaciones tendrán un saliente 3'. Los agentes siRNA preferidos tendrán salientes monocatenarios, preferiblemente salientes 3', de 1 a 4, o preferiblemente 2 ó 3 nucleótidos de longitud, en uno o ambos extremos del agente de iRNA. Los salientes pueden ser el resultado de una cadena que sea más larga que la otra, o el resultado de dos cadenas de la misma longitud que están escalonadas. Los extremos 5' están preferiblemente fosforilados.

50 Las longitudes preferidas para la región dúplex son entre 15 y 30, muy preferiblemente 18, 19, 20, 21, 22, y 23 nucleótidos de longitud, *v.g.*, dentro de la gama de agentes siRNA arriba expuesta. Se incluyen también realizaciones en las cuales las dos cadenas del agente siRNA están enlazadas, *v.g.*, enlazadas covalentemente. Están también dentro de la invención estructuras en horquilla o estructuras monocatenarias de otro tipo que proporcionan la región bicatenaria requerida, y preferiblemente un saliente 3'.

#### **Evaluación de los Agentes de iRNA Candidato**

55 Un agente de iRNA candidato puede evaluarse por su capacidad para regular en sentido decreciente la expresión del gen diana. Por ejemplo, un agente de iRNA candidato puede proporcionarse y ponerse en contacto con una célula, *v.g.* una célula humana, que ha sido infectada con o será infectada con el virus de interés, *v.g.*, un virus que contiene el gen diana. Alternativamente, la célula puede transfectarse con un constructo a partir del cual se expresa un gen viral diana, previniendo así la necesidad de un modelo de infectividad viral. El nivel de expresión del gen

diana antes y después del contacto con el agente de iRNA candidato puede compararse, *v.g.*, en cuanto a un nivel de RNA o de proteína o título viral. Si se determina que la cantidad de RNA, proteína o virus expresada por el gen diana es menor después del contacto con el agente de iRNA, puede llegarse a la conclusión de que el agente de iRNA regula en sentido decreciente la expresión del gen diana. El nivel de RNA viral o proteína viral diana en la célula o título viral en una célula o tejido puede determinarse por cualquier método deseado. Por ejemplo, el nivel de RNA diana puede determinarse por análisis mediante transferencia Northern, transcripción inversa acoplada con reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR), análisis de bDNA, o ensayo de protección contra las RNAsas. El nivel de proteína puede determinarse, por ejemplo, por análisis de transferencia Western o inmuno-fluorescencia. El título viral puede detectarse por un ensayo de formación de calvas.

#### 10 **Testado de Estabilidad, Modificación y Retestado de los Agentes de iRNA**

Un agente de iRNA candidato puede evaluarse con respecto a estabilidad, *v.g.*, su susceptibilidad a la escisión por una endonucleasa o exonucleasa, tal como cuando el agente de iRNA se introduce en el cuerpo de un individuo. Pueden emplearse métodos para identificar sitios que son susceptibles de modificación, particularmente escisión, *v.g.*, escisión por un componente encontrado en el cuerpo de un individuo.

15 Cuando se identifican los sitios susceptibles de escisión, puede diseñarse y/o sintetizarse un agente de iRNA adicional en el que el sitio de escisión potencial se hace resistente a la escisión, *v.g.* por introducción de una modificación 2' en el sitio de escisión, *v.g.* un grupo 2'-O-metilo. Este agente de iRNA adicional puede testarse de nuevo respecto a estabilidad, y este proceso puede iterarse hasta que se encuentra un agente de iRNA que exhibe la estabilidad deseada.

#### 20 **Testado in vivo**

Un agente de iRNA identificado como capaz de inhibir la expresión de un gen viral puede testarse respecto a funcionalidad in vivo en un modelo animal (*v.g.*, en un mamífero, tal como un ratón, rata o primate) como se muestra en los ejemplos. Por ejemplo, el agente de iRNA puede administrarse a un animal, y el agente de iRNA evaluarse con respecto a su biodistribución, estabilidad, y su capacidad para inhibir la expresión de un gen viral, por ejemplo RSV o reducir el título de virus.

25 El agente de iRNA puede administrarse directamente al tejido diana, por ejemplo por inyección, o el agente de iRNA puede administrarse al modelo animal del mismo modo que se administraría a un humano. Como se muestra en esta memoria, el agente puede administrarse preferiblemente por inhalación como medio de tratamiento de la infección viral.

30 El agente de iRNA puede evaluarse también en cuanto a su distribución intracelular. La evaluación puede incluir la determinación de si el agente de iRNA fue capturado en la célula. La evaluación puede incluir también determinación de la estabilidad (*v.g.* la semi-vida) del agente de iRNA. La evaluación de un agente de iRNA *in vivo* puede facilitarse por el uso de un agente de iRNA conjugado a un marcador rastreable (*v.g.*, un marcador fluorescente, tal como fluoresceína; un marcador radiactivo, tal como <sup>35</sup>S, <sup>32</sup>P, <sup>33</sup>P, <sup>3</sup>H; partículas de oro; o partículas de antígeno para inmunohistoquímica) o un otro método de detección adecuado.

35 El agente de iRNA puede evaluarse con respecto a su capacidad para regular en sentido decreciente la expresión de genes virales. Los niveles de expresión de genes virales *in vivo* pueden medirse, por ejemplo, por hibridación *in situ*, o por el aislamiento de RNA de un tejido antes y después de la exposición al agente de iRNA. En los casos en que el animal precisa ser sacrificado a fin de recoger el tejido, servirá para comparación un animal de control sin tratar. El mRNA viral diana puede detectarse por cualquier método deseado incluyendo, pero sin carácter limitante, RT-PCR, transferencia Northern, ensayo de DNA ramificado, o ensayo de protección contra las RNAsas. Alternativa o adicionalmente, la expresión de genes virales puede monitorizarse por realización de análisis de transferencia Western sobre extractos de tejido tratados con el agente de iRNA o por ELISA. El título viral puede determinarse utilizando un ensayo de unidades de formación de calvas (pfu).

#### 45 **Química del iRNA**

Se describen en esta memoria agentes de iRNA aislados, *v.g.*, agentes dsRNA, que median RNAi para inhibir la expresión de un gen viral, *v.g.* la proteína P de RSV.

50 Los agentes RNA expuestos en esta memoria incluyen RNA sin modificar por lo demás así como RNA que se ha modificado, *v.g.* para mejorar la eficacia, y polímeros de sustitutos de nucleósidos. El RNA sin modificar se refiere a una molécula en la cual los componentes del ácido nucleico, a saber azúcares, bases, y restos fosfato, son los mismos o esencialmente los mismos que los que existen en la naturaleza, preferiblemente tal como se encuentran naturalmente en el cuerpo humano. La técnica se ha referido a los RNA extraños o inusuales, pero existentes naturalmente, como RNAs modificados, véase, *v.g.*, Limbach *et al.*, (1994) *Nucleic Acids Res.* 22:2183-2196. Tales RNAs extraños o inusuales, denominados a menudo RNAs modificados (debido aparentemente a que éstos son típicamente el resultado de una modificación post-transcripcional) están dentro del término RNA sin modificar, como se utiliza en esta memoria. El RNA modificado, como se utiliza en esta memoria, hace referencia a una molécula en la cual uno o más de los componentes del ácido nucleico, a saber azúcares, bases o restos fosfato, son diferentes

de los que existen en la naturaleza, preferiblemente diferentes de los que existen en el cuerpo humano. Si bien se hace referencia a ellos como "RNAs" modificados, los mismos incluirán por supuesto, debido a la modificación, moléculas que no son RNAs. Los sustitutos de nucleósidos son moléculas en las cuales la cadena principal de ribofosfato está reemplazada con un constructo que no es un ribofosfato que permite que las bases sean presentadas en la relación espacial correcta de tal modo que la hibridación sea sustancialmente similar a la que se observa con una cadena principal de ribofosfato, *v.g.*, miméticos no cargados de la cadena principal de ribofosfato. Ejemplos de cada uno de los anteriores se exponen en esta memoria.

Las modificaciones descritas en esta memoria pueden incorporarse en cualquier RNA bicatenario y molécula semejante a RNA descrita en esta memoria, *v.g.*, un agente de iRNA. Puede ser deseable modificar una o ambas de las cadenas antisentido y sentido de un agente de iRNA. Dado que los ácidos nucleicos son polímeros de subunidades o monómeros, muchas de las modificaciones descritas más adelante ocurren en una posición que se repite dentro de un ácido nucleico, *v.g.*, una modificación de una base, o un resto fosfato, o el O no enlazador de un resto fosfato. En algunos casos, la modificación se encontrará en todas las posiciones objetivo en el ácido nucleico, pero en muchos, y de hecho en la mayoría de los casos, no será así. A modo de ejemplo, una modificación puede ocurrir solamente en una posición terminal 3' o 5', puede ocurrir solamente en una región terminal, *v.g.* en una posición de un nucleótido terminal o en los últimos 2, 3, 4, 5 ó 10 nucleótidos de una cadena. Una modificación puede ocurrir en una región bicatenaria, una región monocatenaria, o en ambas. *V.g.*, una modificación fosforotioato en una posición de O no enlazador puede ocurrir solamente en uno o ambos extremos, puede ocurrir solamente en una región terminal, *v.g.* en una posición en un nucleótido terminal o en los últimos 2, 3, 4, 5, ó 10 nucleótidos de una cadena, o puede ocurrir en regiones bicatenarias y monocatenarias, particularmente en los extremos. Análogamente, una modificación puede ocurrir en la cadena sentido, la cadena antisentido, o ambas. En algunos casos, la cadena sentido y la cadena antisentido tendrán las mismas modificaciones o la misma clase de modificaciones, pero en otros casos la cadena sentido y la cadena antisentido tendrán modificaciones diferentes, *v.g.* en algunos casos puede ser deseable modificar una sola cadena, *v.g.* la cadena sentido.

Dos objetivos primarios para la introducción de modificaciones en los agentes de iRNA son su estabilización frente a la degradación en ambientes biológicos y la mejora de propiedades farmacológicas, *v.g.* propiedades farmacodinámicas, que se exponen con mayor detalle más adelante. Otras modificaciones adecuadas a un azúcar, base o cadena principal de un agente de iRNA se describen en WO2004/064737. Un agente de iRNA puede incluir una base no existente naturalmente, tal como las bases descritas en WO2004/094345. Un agente de iRNA puede incluir un azúcar no existente naturalmente, tal como una molécula portadora cíclica distinta de un carbohidrato. Características ilustrativas de azúcares no existentes naturalmente para uso en agentes de iRNA se describen en WO2004/064737.

Un agente de iRNA puede incluir un enlace internucleotídico (*v.g.*, el enlace quiral fosforotioato) útil para aumentar la resistencia a las nucleasas. Adicionalmente, o como alternativa, un agente de iRNA puede incluir un mimético de ribosa para resistencia mejorada a las nucleasas. Enlaces ilustrativos internucleotídicos y miméticos de ribosa para resistencia mejorada a las nucleasas se describen en WO2004/094345.

Un agente de iRNA puede incluir subunidades monómeras conjugadas con ligandos y monómeros para la síntesis de oligonucleótidos. Monómeros ilustrativos se describen en la solicitud de patente n° US 2005/0107325.

Un agente de iRNA puede tener una estructura ZXY, tal como la descrita en WO2004/094345.

Un agente de iRNA puede estar complejado con un resto anfipático. Restos anfipático ilustrativos para uso con agentes de iRNA se describen en WO2004/094345.

El agente de iRNA puede estar complejado con un agente de administración que caracteriza un complejo modular. El complejo puede incluir un agente portador enlazado a uno o más de (preferiblemente dos o más, más preferiblemente los tres): (a) un agente de condensación (*v.g.* un agente capaz de atraer, *v.g.* fijar, un ácido nucleico, *v.g.*, por interacciones iónicas o electrostáticas); (b) un agente fusogénico (*v.g.* un agente capaz de fusionarse y/o transportarse a través de una membrana celular); y (c) un grupo de direccionamiento, *v.g.*, un agente de direccionamiento a una célula o tejido, *v.g.* una lectina, glicoproteína, lípido o proteína, *v.g.*, un anticuerpo, que se fija a un tipo de célula especificado. Agentes de iRNA complejados con una fuente de administración se describen en WO2004/094345.

Un agente de iRNA puede tener apareamientos no canónicos, por ejemplo entre las secuencias de sentido y antisentido del dúplex iRNA. Características ilustrativas de agentes de iRNA no canónicos se describen en WO2004/094345.

#### **Resistencia mejorada a las nucleasas**

Un agente de iRNA, *v.g.*, un agente de iRNA que está direccionado a RSV, puede tener resistencia mejorada a las nucleasas.

Para resistencia mejorada a las nucleasas y/o afinidad de fijación a la diana, un agente de iRNA, *v.g.* las cadenas de sentido y/o antisentido del agente de iRNA, puede incluir, por ejemplo, unidades ribosa modificadas en 2' y/o enlaces

fosforotioato. V.g., el grupo 2'-hidroxilo (OH) puede estar modificado o reemplazado con cierto número de sustituyentes "oxi" o "desoxi" diferentes.

Ejemplos de modificaciones del grupo "oxi"-2'-hidroxilo incluyen alcoxi o ariloxi (OR), v.g., R = H, alquilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar); polietilenglicoles (PEG),  $O(CH_2CH_2O)_nCH_2CH_2OR$ ; ácidos nucleicos "inmovilizados" (LNA) en los cuales el 2'-hidroxilo está conectado, v.g., por un puente metileno, al carbono 4' del mismo azúcar ribosa; O-AMINA y aminoalcoxi,  $O(CH_2)_nAMINA$ , (v.g., AMINA= $NH_2$ ; alquilamino, dialquilamino, heterocicliil-amino, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, o diheteroarilamino, etilenodiamina, poliamino). Es digno de mención que los oligonucleótidos que contienen solamente el grupo metoxietilo (MOE),  $(OCH_2CH_2OCH_3)$ , un derivado de PEG), exhiben estabildades a las nucleasas comparables a los modificados con la modificación robusta fosforotioato.

Modificaciones "deoxi" incluyen hidrógeno (es decir azúcares desoxirribosa, que son de particular relevancia para las porciones salientes de RNA parcialmente ds); halo (v.g., fluoro); amino (v.g.  $NH_2$ ); alquilamino, dialquilamino, heterocicliilo, arilamino, diarilamino, heteroarilamino, diheteroarilamino, o aminoácido);  $NH(CH_2CH_2NH)_nCH_2CH_2-AMINA$  (AMINA =  $NH_2$ ; alquilamino, dialquilamino, heterocicliil-amino, arilamino, diaril-amino, heteroaril-amino, o diheteroaril-amino), -NHC(O)R (R = alquilo, cicloalquilo, alquilo, aralquilo, heteroarilo o azúcar), ciano; mercapto; alquiltio-alquilo; tioalcoxi; y alquilo, cicloalquilo, arilo, alqueno y alquino, que pueden estar sustituidos opcionalmente con, v.g., una funcionalidad amino.

Sustituyentes preferidos son 2'-metoxietilo, 2'-OCH<sub>3</sub>, 2'-O-alilo, 2'-C-alilo, y 2'-fluoro.

Una manera de aumentar la resistencia consiste en identificar sitios de escisión y modificar tales sitios para inhibir la escisión, como se describe en la Solicitud de Patente U.S. No. 60/559917, del mismo propietario, presentada el 4 de mayo de 2004. Por ejemplo, los dinucleótidos 5'-UA-3', 5'-UG-3', 5'-CA-3', 5'-UU-3', o 5'-CC-3' pueden servir como sitios de escisión. La resistencia mejorada a las nucleasas puede conseguirse por tanto por modificación del nucleótido 5', dando como resultado, por ejemplo, al menos un dinucleótido 5'-uridina-adenina-3' (5'-UA-3') en el cual la uridina es un nucleótido modificado en 2'; al menos un dinucleótido 5'-uridina-guanina-3' (5'-UG-3'), en donde la 5'-uridina es un nucleótido modificado en 2'; al menos un dinucleótido 5'-citidina-adenina-3' (5'-CA-3'), en donde la 5'-citidina es un nucleótido modificado en 2'; al menos un dinucleótido 5'-uridina-uridina-3' (5'-UU-3'), en donde la 5'-uridina es un nucleótido modificado en 2', o al menos un dinucleótido 5'-citidina-citidina-3' (5'-CC-3'), en donde la 5'-citidina es un nucleótido modificado en 2'. El agente de iRNA puede incluir al menos 2, al menos 3, al menos 4 o al menos 5 de tales dinucleótidos. En ciertas realizaciones, todas las pirimidinas de un agente de iRNA llevan una modificación 2', y el agente de iRNA tiene por consiguiente resistencia mejorada a las endonucleasas.

Para maximizar la resistencia a las nucleasas, las modificaciones 2' pueden utilizarse en combinación con una o más modificaciones de enlazadores fosfato (v.g., fosforotioato). Los denominados oligonucleótidos "quiméricos" son aquellos que contienen dos o más modificaciones diferentes.

La inclusión de azúcares furanosa en la cadena principal del oligonucleótido puede producir también la escisión endonucleolítica. Un agente de iRNA puede estar modificado ulteriormente por inclusión de un grupo catiónico 3', o por inversión del nucleósido en el término 3' con un enlace 3'-3'. En otra alternativa, el término 3' puede bloquearse con un grupo aminoalquilo, v.g., un grupo 3'-C5-aminoalquil-dT. Otros conjugados en 3' pueden inhibir la escisión exonucleolítica 3'-5'. Si bien no se desea quedar ligados por la teoría, un conjugado en 3', tal como naproxeno o ibuprofeno, puede inhibir la escisión exonucleolítica por bloquear estéricamente la fijación de la exonucleasa al extremo 3' del oligonucleótido. Incluso pequeñas cadenas alquilo, grupos arilo, o conjugados heterocíclicos o azúcares modificados (D-ribosa, desoxirribosa, glucosa, etc) pueden bloquear las exonucleasas 3'-5'.

Análogamente, los conjugados 5' pueden inhibir la escisión exonucleolítica 5'-3'. Si bien no se desea quedar ligados por la teoría, un conjugado 5', tal como naproxeno o ibuprofeno, puede inhibir la escisión exonucleolítica por bloquear estéricamente la fijación de la exonucleasa al extremo 5' del oligonucleótido. Incluso pequeñas cadenas alquilo, grupos arilo, o conjugados heterocíclicos o azúcares modificados (D-ribosa, desoxirribosa, glucosa, etc) pueden bloquear las 3'-5'-exonucleasas.

Un agente de iRNA puede tener resistencia mejorada a las nucleasas cuando un agente de iRNA en forma dúplex incluye un saliente de nucleótido monocatenario al menos en un extremo. En realizaciones preferidas, el saliente de nucleótido incluye 1 a 4, preferiblemente 2 a 3, nucleótidos no apareados. En una realización preferida, el nucleótido no apareado del saliente monocatenario que es directamente adyacente al par de nucleótidos terminal contiene una base purina, y el par de nucleótidos terminal es un par G-C, o al menos dos de los cuatro últimos pares de nucleótidos complementarios son pares G-C. En realizaciones adicionales, el saliente nucleotídico puede tener uno o dos nucleótidos no apareados, y en una realización ilustrativa el saliente nucleotídico es 5'-GC-3'. En realizaciones preferidas, el saliente nucleotídico se encuentra en el extremo 3' de la cadena antisentido. En una realización, el agente de iRNA incluye el motivo 5'-CGC-3' en el extremo 3' de la cadena antisentido, con lo que se forma un saliente de dos nucleótidos 5'-GC-3'.

Así, un agente de iRNA puede incluir modificaciones a fin de inhibir la degradación, v.g., por las nucleasas, v.g., endonucleasas o exonucleasas, encontradas en el cuerpo de un individuo. A estos monómeros se hace referencia

5 en esta memoria como NRM, o Monómeros promotores de Resistencia a las Nucleasas, las modificaciones correspondientes como modificaciones NRM. En muchos casos estas modificaciones modularán también otras propiedades del agente de iRNA, *v.g.*, la capacidad para interactuar con una proteína, *v.g.*, una proteína de transporte, *v.g.*, seroalbúmina, o un miembro del RISC, o la capacidad de las secuencias primera y segunda para formar un dúplex una con otra o para formar un dúplex con otra secuencia, *v.g.*, una molécula diana.

Una o más modificaciones NRM diferentes pueden introducirse en un agente de iRNA o en una secuencia de un agente de iRNA. Una modificación NRM puede utilizarse más de una vez en una secuencia o en un agente de iRNA.

10 Las modificaciones NRM incluyen algunas que pueden estar situadas únicamente en el extremo y otras que pueden situarse en cualquier posición. Algunas modificaciones NRM que pueden inhibir la hibridación se utilizan preferiblemente sólo en regiones terminales, y más preferiblemente no en el sitio de escisión o en la región de escisión de una secuencia que está direccionada a una secuencia o gen objetivo, particularmente en la cadena antisentido. Las mismas pueden utilizarse en cualquier punto en una cadena sentido, con tal que se mantenga suficiente hibridación entre las dos cadenas del agente de ds iRNA. En algunas realizaciones es deseable poner el NRM en el sitio de escisión o en la región de escisión de una cadena sentido, dado que el mismo puede minimizar la silenciación fuera del objetivo.

15 En la mayoría de los casos, las modificaciones NRM se distribuirán de modo diferente dependiendo de si las mismas están comprendidas en una cadena sentido o antisentido. Si se encuentran en una cadena antisentido, las modificaciones que interfieran con o inhiban la escisión por las endonucleasas no deberían insertarse en la región que está sometida a escisión mediada por RISC, *v.g.*, el sitio de escisión o la región de escisión (descrita en Elbashir *et al.*, 2001, *Genes and Dev.* 15:188, incorporado en esta memoria por referencia). La escisión de la diana tiene lugar aproximadamente en el centro de una cadena antisentido de 20 ó 21 nucleótidos, o aproximadamente 10 ó 11 nucleótidos aguas arriba del primer nucleótido en el mRNA diana que es complementario a la cadena antisentido. Como se utiliza en esta memoria, sitio de escisión se refiere a los nucleótidos a cualquier lado del sitio de escisión, en el mRNA diana o en la cadena del agente de iRNA que está hibridado al mismo. La región de escisión quiere decir los nucleótidos dentro de 1, 2, ó 3 nucleótidos del sitio de escisión, en cualquier dirección.

20 Tales modificaciones pueden introducirse en las regiones terminales, *v.g.*, en la posición terminal o con 2, 3, 4, ó 5 posiciones del término, de una secuencia que está direccionada o una secuencia que no está direccionada a una secuencia en el individuo.

### **Ligandos Fijados**

30 Las propiedades de un agente de iRNA, con inclusión de sus propiedades farmacológicas, pueden verse influidas y modificarse, por ejemplo, por la introducción de ligandos, *v.g.* ligandos fijados.

Una gran diversidad de entidades, *v.g.* ligandos, pueden fijarse a un agente de iRNA, *v.g.*, al portador de una subunidad monómera conjugada a un ligando. Se describen a continuación ejemplos en el contexto de una subunidad monómera conjugada a un ligando, pero ello es sólo un caso preferido, pudiendo acoplarse entidades en otros puntos de un agente de iRNA.

35 Restos preferidos son ligandos, que están acoplados, preferiblemente por enlaces covalentes, sea directa o indirectamente por una fijación intermedia, al portador. El ligando puede estar unido al portador por una fijación intermedia. El ligando o ligando fijado puede estar presente en el monómero conjugado al ligando cuando el monómero conjugado al ligando se incorpora en la cadena de crecimiento. El ligando puede incorporarse en una subunidad monómera "precursora" conjugada al ligando después que se ha incorporado una subunidad monómera "precursora" conjugada en la cadena de crecimiento. Por ejemplo, un monómero que tenga, *v.g.*, una fijación terminada en amino, *v.g.*, TAP-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>NH<sub>2</sub> puede incorporarse en una cadena sentido o antisentido en crecimiento. En una operación subsiguiente, es decir, después de incorporación de la subunidad monómera precursora en la cadena, un ligando que tenga un grupo electrófilo, *v.g.* un grupo pentafluorofenil-éster o -aldehído, puede unirse subsiguientemente al monómero precursor conjugado con el ligando por acoplamiento del grupo electrófilo del ligando con el grupo nucleófilo terminal de la fijación de la subunidad de monómero precursora conjugada con el ligando.

40 Un ligando puede alterar la distribución, el direccionamiento o el tiempo de vida de un agente de iRNA en el cual se incorpore. Un ligando puede proporcionar una afinidad mejorada para una diana seleccionada, *v.g.*, molécula, célula o tipo de célula, compartimiento, *v.g.*, un compartimiento celular u orgánico, tejido, órgano, o región del cuerpo, en comparación *v.g.*, con especies donde se carece de un ligando de este tipo.

45 Ligandos preferidos pueden mejorar el transporte, la hibridación, y las propiedades de especificidad y pueden mejorar también la resistencia a las nucleasas del oligorribonucleótido resultante natural o modificado, o una molécula polimera que comprenda cualquier combinación de los monómeros descritos en esta memoria y/o ribonucleótidos naturales o modificados.

55 Los ligandos en general pueden incluir modificadores terapéuticos, *v.g.*, para mejora de la absorción; compuestos de diagnóstico o grupos informadores, *v.g.*, para monitorización de la distribución; agentes de reticulación; restos que

- 5 confieren resistencia a las nucleasas; y nucleobases naturales o extrañas. Ejemplos generales incluyen moléculas lipófilas, lípidos, lectinas, esteroides (v.g., uvaol, hecogenina, diosgenina), terpenos (v.g., triterpenos, v.g., sarsasapogenina, Friedelina, ácido litocólico derivatizado con epifriedelanol), vitaminas, carbohidratos (v.g., un dextrano, pululano, quitina, quitosano, inulina, ciclodextrina o ácido hialurónico), proteínas, agentes inhibidores de proteínas, moléculas de direccionamiento de integrinas, policationes, péptidos, poliaminas, y miméticos peptídicos.
- El ligando puede ser una molécula naturalmente existente o recombinante o sintética, tal como un polímero sintético, v.g. un poliaminoácido sintético. Ejemplos de poliaminoácidos incluyen casos en que el poliaminoácido es una polilisina (PLL), ácido poli-L-aspártico, ácido poli-L-glutámico, copolímero de anhídrido estireno-ácido maleico, copolímero poli(L-lactida-co-glicolida), copolímero éter divinílico-anhídrico maleico, copolímero N-(2-hidroxipropil)metacrilamida (HPMA), polietilenglicol (PEG), poli(alcohol vinílico) (PVA), poliuretano, poli(ácido 2-etilacrilico), polímeros de N-isopropilacrilamida, o polifosfaceno. Ejemplos de poliaminas incluyen: polietilenimina, polilisina (PLL), espermina, espermidina, poliamina, pseudopéptido-poliamina, poliamina peptidomimética, poliamina dendrimer, arginina, amidina, protamina, restos catiónicos, v.g., lípido catiónico, porfirina catiónica, sal cuaternaria de una poliamina, o un péptido  $\alpha$ -helicoidal.
- 15 Los ligandos pueden incluir también grupos de direccionamiento, v.g., un agente de direccionamiento a una célula o tejido, v.g., una tirotopina, melanotropina, proteína A tensioactiva, carbohidrato de mucina, un poliaminoácido glicosilado, transferrina, bisfosfonato, poliglutamato, poliaspartato, o un péptido RGD o mimético de péptido RGD.
- Los ligandos pueden ser proteínas, v.g., glicoproteínas, lipoproteínas, v.g. lipoproteínas de baja densidad (LDL), o albúminas, v.g. seroalbúmina humana (HSA), o péptidos, v.g., moléculas que tengan una afinidad específica para un co-ligando, o anticuerpos, v.g., un anticuerpo que se fija a un tipo especificado de célula tal como una célula de cáncer, célula endotelial, o célula ósea. Los ligandos pueden incluir también hormonas y receptores hormonales. Los mismos pueden incluir también especies no peptídicas, tales como cofactores, lactosa multivalente, galactosa multivalente, N-acetil-galactosamina, N-acetil-glucosamina, manosa multivalente, o fucosa multivalente. El ligando puede ser, por ejemplo, un lipopolisacárido, un activador de la quinasa MAP p38, o un activador de NF- $\kappa$ B.
- 20 El ligando puede ser una sustancia, v.g. un fármaco, que puede aumentar la absorción del agente de iRNA en la célula, por ejemplo, por rotura del citoesqueleto celular, v.g., por rotura de los microtúbulos, microfilamentos, y/o filamentos intermedios de la célula. El fármaco puede ser, por ejemplo, taxól, vincristina, vinblastina, citochalasin, nocodazol, jasplakinolida, latrunculina A, faloidina, swinholida A, indanocina, o mioservina.
- En un aspecto, el ligando es un lípido o una molécula basada en lípido. Una molécula lipídica o basada en lípido de este tipo está fijada preferiblemente a una proteína del suero, v.g., seroalbúmina humana (HSA). Otras moléculas que pueden fijarse a HSA pueden utilizarse también como ligandos. Por ejemplo, pueden utilizarse naproxeno o aspirina. Un ligando lipídico o basado en lípido puede (a) aumentar la resistencia a la degradación del conjugado, (b) aumentar el direccionamiento o el transporte a una célula o membrana celular diana, y/o (c) puede utilizarse para ajustar la fijación a una proteína del suero, v.g., HSA.
- 30 Puede utilizarse un ligando basado en lípido para modular, v.g. controlar la fijación del conjugado a un tejido diana. Por ejemplo, un ligando lipídico o basado en lípido que se fija a HSA más fuertemente tendrá menor probabilidad de direccionarse al riñón y por consiguiente tendrá menor probabilidad de ser aclarado del cuerpo. Un ligando lipídico o basado en lípido que se fija a HSA menos fuertemente puede utilizarse para direccionar el conjugado al riñón.
- El ligando de base lipídica puede fijarse a HSA. Preferiblemente, el mismo se fija a HSA con afinidad suficiente de tal modo que el conjugado se distribuirá preferiblemente en un tejido distinto del riñón. Sin embargo, se prefiere que la afinidad no sea tan fuerte que la fijación HSA-ligando no pueda invertirse.
- En otro aspecto, el ligando es un resto, v.g., una vitamina o nutriente, que es absorbido por una célula diana, v.g., una célula proliferante. Éstos son particularmente útiles para tratamiento de trastornos caracterizados por proliferación indeseable de células, v.g., del tipo maligno o no maligno, v.g., células de cáncer. Vitaminas ilustrativas incluyen vitamina A, E, y K. otras vitaminas ilustrativas incluyen las vitaminas B, v.g., ácido fólico, B12, riboflavina, biotina, piridoxal u otras vitaminas o nutrientes absorbidos por las células del cáncer.
- 45 En otro aspecto, el ligando es un agente de permeación celular, preferiblemente un agente de permeación celular helicoidal. Preferiblemente, el agente es anfipático. Un agente ilustrativo es un péptido tal como TAT o antenapedia. Si el agente es un péptido, el mismo puede estar modificado, con inclusión de un mimético peptídico, invertómeros, enlaces no peptídicos o pseudopeptídicos, y uso de D-aminoácidos. El agente helicoidal es preferiblemente un agente alfa-helicoidal, que tiene preferiblemente una fase lipófila y una fase lipófila.

### **Modificaciones 5'-fosfato**

- Los agentes de iRNA pueden estar fosforilados en 5' o incluir un análogo fosforilado en el término 5'. Modificaciones del fosfato 5' de la cadena antisentido incluyen aquellas que son compatibles con la silenciación de genes mediada por RISC. Modificaciones adecuadas incluyen: 5'-monofosfato ((HO)2(O)P-O-5'); 5'-difosfato ((HO)2(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); trifosfato 5' ((HO)2(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); la cápsula 5'-guanosina (metilada en 7 o no metilada) (7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); la cápsula 5'-adenosina (Aapp), y cualquier

estructura de cápsula nucleotídica modificada o no modificada. Otras modificaciones 5'-fosfato adecuadas serán conocidas por las personas expertas.

La cadena sentido puede modificarse a fin de desactivar la cadena sentido y prevenir la formación de un RISC activo, reduciendo de este modo potencialmente los efectos fuera del objetivo. Esto puede realizarse por una modificación que previene la fosforilación en 5' de la cadena sentido, *v.g.*, por modificación con un ribonucleótido 5'-O-metilado (véase Nykänen *et al.*, (2001) *ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway*, *Cell* 107, 309-321). Pueden utilizarse también otras modificaciones que previenen la fosforilación, *v.g.*, la sustitución simple del 5'-OH por H en lugar de O-Me. Alternativamente, puede añadirse un grupo de volumen grande al fosfato 5' convirtiéndolo en un enlace fosfodiéster.

## **Administración de agentes de iRNA a tejidos y células**

### **Formulación**

Los agentes de iRNA descritos en esta memoria pueden formularse para administración a un individuo, preferiblemente por administración local a los pulmones y el conducto nasal (tejidos respiratorios) por interpolación o administración intranasal, o por vía parenteral, *v.g.* por inyección.

Para facilidad de exposición, las formulaciones, composiciones, y métodos de esta sección se exponen en gran parte con relación a agentes de iRNA sin modificar. Debe entenderse, sin embargo, que estas formulaciones, composiciones y métodos pueden practicarse con otros agentes de iRNA, *v.g.*, agentes de iRNA modificados, y dicha práctica está dentro de la invención.

Una composición de agente de iRNA formulada puede adquirir una diversidad de estados. En algunos ejemplos, la composición es al menos parcialmente cristalina, uniformemente cristalina, y/o anhidra (*v.g.*, menos de 80, 50, 30, 20 ó 10% de agua). En otro ejemplo, el agente de iRNA se encuentra en fase acuosa, *v.g.* en una solución que incluye agua, siendo esta forma la forma preferida para administración por inhalación.

La fase acuosa o las composiciones cristalinas pueden incorporarse en un vehículo de administración, *v.g.*, un liposoma (particularmente para la fase acuosa), o una partícula (*v.g.*, una micropartícula como puede ser apropiada para una composición cristalina). Generalmente, la composición de agente de iRNA se formula de una manera que es compatible con el método de administración propuesto.

Una preparación de agente de iRNA puede formularse en combinación con otro agente, *v.g.*, otro agente terapéutico o un agente que estabiliza un agente de iRNA, *v.g.*, una proteína que se compleja con el agente de iRNA para formar un iRNP. Otros agentes adicionales incluyen formadores de quelatos, *v.g.*, EDTA (*v.g.*, para eliminar cationes divalentes tales como  $Mg^{2+}$ ), sales, inhibidores de RNAsas, *v.g.*, (un inhibidor de especificidad amplia de RNAsas tal como RNAsina), etcétera.

En una realización, la preparación del agente de iRNA incluye otro agente de iRNA, *v.g.*, un segundo agente de iRNA que puede mediar RNAi con respecto a un segundo gen. Otras preparaciones adicionales pueden incluir al menos 3, 5, 10, 20, 50, ó 100 o más especies de iRNA diferentes. En algunas realizaciones, los agentes están direccionados al mismo virus pero a diferentes secuencias diana. En otra realización, cada agente de iRNA se dirige a un virus diferente. Como se muestra en el ejemplo, más de un virus puede ser inhibido por co-administración simultánea de dos agentes de iRNA, o en intervalos de tiempo cortos, dirigirse cada uno a uno de los virus objeto de tratamiento.

### **Métodos de Tratamiento y Rutas de Administración**

Una composición que incluye un agente de iRNA de la presente invención, *v.g.*, un agente de iRNA que está direccionado a RSV, puede administrarse a un individuo por una diversidad de rutas. Rutas ilustrativas incluyen inhalación, o administración intravenosa, nasal u oral. El medio preferido de administración de los agentes de iRNA de la presente invención es por administración directa a los pulmones y al conducto nasal o sistémicamente por administración parenteral.

Un agente de iRNA puede estar incorporado en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración. Por ejemplo, las composiciones pueden incluir uno o más agentes de iRNA y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza en esta memoria, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" tiene por objeto incluir cualquiera y la totalidad de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de retardo isotónicos y de absorción, y análogos, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en lo que respecta a cualquier medio o agente convencional que sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso de los mismos en las composiciones. Pueden incorporarse también en las composiciones compuestos activos suplementarios.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse de diversas maneras dependiendo de si se desea tratamiento local o sistémico y del área a tratar. La administración puede ser tópica (con inclusión de

las vías intranasal o intrapulmonar), oral o parenteral. La administración parenteral incluye inyección por goteo intravenoso, subcutánea, intraperitoneal o intramuscular.

5 En general, la administración de los agentes de iRNA de la presente invención se hace para conseguir la administración al individuo en el sitio de infección. El medio preferido de conseguir esto es por una administración local a los pulmones o al conducto basal, *v.g.* a los tejidos respiratorios por inhalación, nebulización o administración intranasal, o por administración sistémica, *v.g.*, administración parenteral.

10 Las formulaciones para inhalación o administración parenteral son bien conocidas en la técnica. Dicha formulación puede incluir soluciones acuosas estériles que pueden contener también tampones, diluyentes y otros aditivos adecuados, como por ejemplo PBS o Dextrosa al 5% en agua. Para uso intravenoso, la concentración total de solutos debería controlarse para hacer la preparación isotónica.

15 Los compuestos activos descritos en esta memoria se administran preferiblemente al o a los pulmones o al conducto nasal de un individuo por cualquier medio adecuado. Los compuestos activos pueden administrarse por administración de una suspensión en aerosol de partículas respirables constituida por el compuesto activo o los compuestos activos, que inhala el individuo. El compuesto activo puede aerosolizarse en una diversidad de formas, tales como, pero sin carácter limitante, inhaladores de polvo seco, inhaladores de dosis medidas, o suspensiones líquido/líquido. Las partículas respirables pueden ser líquidas o sólidas. Las partículas pueden contener opcionalmente otros ingredientes terapéuticos tales como amilorida, benzamil o fenamil, estando incluido el compuesto seleccionado en una cantidad eficaz para inhibir la reabsorción de agua por las secreciones mucosas de las vías aéreas, como se describe en la Patente U.S. No. 4.501.729.

20 La composición farmacéutica particulada puede combinarse opcionalmente con un portador a fin de ayudar en la dispersión o el transporte. Un vehículo adecuado tal como un azúcar (es decir dextrosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, manitol) puede mezclarse con el compuesto o compuestos activos en cualquier ratio adecuada (*v.g.*, una ratio 1 a 1 en peso).

25 Las partículas constituidas por el compuesto activo para la práctica de la presente invención deberían incluir partículas de tamaño respirable, es decir, partículas de un tamaño suficientemente pequeño para pasar a través de la boca o nariz y la laringe por inhalación y a los bronquios y alvéolos de los pulmones. En general, las partículas de tamaño comprendido entre aproximadamente 1 y 10 micrómetros (de modo más particular, menos de aproximadamente 5 micrómetros de tamaño) son respirables. Las partículas de tamaño no respirable que están incluidas en el aerosol tienden a depositarse en la garganta y ser tragadas, y la cantidad de partículas no respirables en el aerosol está preferiblemente minimizada. Para administración nasal, se prefiere un tamaño de partícula dentro del intervalo de 10-500 micrómetros a fin de asegurar la retención en la cavidad nasal.

30 Pueden prepararse composiciones farmacéuticas líquidas de compuesto activo para producir un aerosol por combinación del compuesto activo con un vehículo adecuado tal como agua estéril exenta de pirógenos. Las soluciones salinas hipertónicas utilizadas para transportar la presente invención son preferiblemente soluciones estériles exentas de pirógenos, que comprenden de 1 a 15 por ciento (en peso) de la sal fisiológicamente aceptable, y más preferiblemente de 3 a 7 por ciento en peso de la sal fisiológicamente aceptable.

35 Aerosoles de partículas líquidas que comprenden el compuesto activo pueden producirse por cualquier medio adecuado, por ejemplo con un nebulizador de chorro impulsado a presión o un nebulizador ultrasónico. Véase, *v.g.*, la patente U.S. No. 4.501.729. Los nebulizadores son dispositivos disponibles comercialmente que transforman las soluciones o suspensiones del ingrediente activo en una nebulización de aerosol terapéutico por medio de aceleración con un gas comprimido, típicamente aire u oxígeno, a través de un orificio venturi estrecho o por medio de agitación ultrasónica.

40 Formulaciones adecuadas para uso en nebulizadores están constituidas por el ingrediente activo en un portador líquido, comprendiendo el ingrediente activo hasta 40% p/p de la formulación, pero preferiblemente menos de 20% p/p. El portador es típicamente agua (y muy preferiblemente agua estéril exenta de pirógenos) o una solución acuoso-alcohólica diluida, hecha preferiblemente isotónica, pero puede ser hipertónica con fluidos corporales por la adición de, por ejemplo, cloruro de sodio. Aditivos opcionales incluyen conservantes si la formulación no se ha hecho estéril, por ejemplo, hidroxibenzoato de metilo, antioxidantes, agentes saborizantes, aceites volátiles, agentes tampón y agentes tensioactivos.

45 Aerosoles de partículas sólidas que comprenden el compuesto activo pueden producirse análogamente con cualquier generador de aerosoles terapéutico sólido particulado. Los generadores de aerosol para administración de agentes terapéuticos particulados sólidos a un individuo producen partículas que son respirables y generan un volumen de aerosol que contiene una dosis medida predeterminada de un agente terapéutico a una tasa adecuada para administración a humanos. Un tipo ilustrativo de generador de aerosoles particulados sólidos es un insuflador. 50 Formulaciones adecuadas para administración por insuflación incluyen polvos finamente triturados que pueden administrarse por medio de un insuflador o absorberse en la cavidad nasal al modo de una aspiración nasal. En el insuflador, el polvo (*v.g.*, una dosis medida del mismo eficaz para el transporte de los tratamientos descritos en esta memoria) está contenido en cápsulas o cartuchos, hechos típicamente de gelatina o plástico, que o bien se perforan

- o se abren in situ y el polvo se administra por el aire aspirado a través del dispositivo por inhalación o por medio de una bomba accionada manualmente. El polvo empleado en el insuflador está constituido exclusivamente por el ingrediente activo o por una mezcla de polvo que comprende el ingrediente activo, un diluyente adecuado del polvo, tal como lactosa, y un agente tensioactivo opcional. El ingrediente activo comprende típicamente desde 0,1 a 100 p/p de la formulación.
- 5
- Un segundo tipo de generador ilustrativo de aerosoles comprende un inhalador de dosis medidas. Los inhaladores de dosis medidas son dispensadores de aerosol presurizados, que contienen típicamente una formulación en suspensión o solución del ingrediente activo en un propelente licuado. Durante el uso, estos dispositivos descargan la formulación a través de una válvula adaptada para administrar un volumen medido, típicamente de 10 a 200  $\mu$ l, a fin de producir una pulverización de partículas finas que contiene el ingrediente activo. Propelentes adecuados incluyen ciertos compuestos de clorofluorocarbonos, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano y mezclas de los mismos. La formulación puede contener adicionalmente uno o más co-disolventes, por ejemplo, etanol, agentes tensioactivos, tales como ácido oleico o trioleato de sorbitán, antioxidante y agentes saborizantes adecuados.
- 10
- La administración puede ser proporcionada por el propio individuo o por otra persona, v.g., un cuidador sanitario. Un cuidador sanitario puede ser cualquier entidad implicada en la atención sanitaria al humano: por ejemplo, un hospital, hospicio, consulta de médico, clínica de pacientes ambulatorios; un trabajador de cuidados sanitarios tal como un doctor, enfermera, u otro especialista; o un cónyuge o guardián, tal como un progenitor. La medicación puede proporcionarse en dosis medidas o en un dispensador que administra una dosis medida.
- 15
- La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" es la cantidad presente en la composición que es necesaria para proporcionar el nivel deseado de fármaco al individuo a tratar a fin de producir la respuesta fisiológica prevista. En una realización, cantidades terapéuticamente eficaces de dos o más agentes de iRNA, dirigido cada uno a un virus respiratorio diferente, v.g., RSV, se administran simultáneamente a un individuo.
- 20
- La expresión "cantidad fisiológicamente eficaz" es aquella cantidad administrada a un individuo que proporciona el efecto paliativo o curativo deseado.
- 25
- La expresión "portador farmacéuticamente aceptable" significa que el portador puede ser absorbido en los pulmones sin efectos toxicológicos adversos significativos en los mismos.
- El término "co-administración" hace referencia a la administración a un individuo de dos o más agentes, y en particular dos o más agentes de iRNA. Los agentes pueden estar contenidos en una sola composición farmacéutica y administrarse al mismo tiempo, o los agentes pueden estar contenidos en formulaciones farmacéuticas separadas y administrarse serialmente a un individuo. Con tal que los dos agentes puedan detectarse en el individuo al mismo tiempo, se dice que los dos agentes son co-administrados.
- 30
- Los tipos de excipientes farmacéuticos que son útiles como portador incluyen estabilizadores tales como seroalbúmina humana (HSA), agentes de aumento de volumen tales como carbohidratos, aminoácidos y polipéptidos; agentes de ajuste del pH o tampones; sales tales como cloruro de sodio, y análogos. Estos portadores pueden encontrarse en forma cristalina o amorfa, o puede tratarse de una mezcla de ambos.
- 35
- Agentes de aumento de volumen que son particularmente valiosos incluyen carbohidratos, polipéptidos, aminoácidos o combinaciones compatibles de los mismos. Carbohidratos adecuados incluyen monosacáridos tales como galactosa, D-manosa, sorbosa, y análogos; disacáridos, tales como lactosa, trehalosa y análogos; ciclodextrinas, tales como 2-hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina; y polisacáridos, tales como rafinosa, maltodextrinas, dextranos, y análogos; alditoles, tales como manitol, xilitol, y análogos. Un grupo preferido de carbohidratos incluye lactosa, trehalosa, rafinosa, maltodextrinas, y manitol. Polipéptidos adecuados incluyen aspartamo. Los aminoácidos incluyen alanina y glicina, prefiriéndose glicina.
- 40
- Agentes adecuados de ajuste del pH o tampones incluyen sales orgánicas preparadas a partir de ácidos y bases orgánicos, tales como citrato de sodio, ascorbato de sodio, y análogos; se prefiere citrato de sodio.
- 45
- Dosificación.* Un agente de iRNA puede administrarse a una dosis menor que aproximadamente 75 mg por kg de peso corporal, o menor que aproximadamente 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001, ó 0,0005 mg por kg de peso corporal, y menos de 200 nmoles de agente de iRNA (v.g., aproximadamente  $4,4 \times 10^{16}$  copias) por kg de peso corporal, o menos de 1500, 750, 300, 150, 75, 15, 7,5, 1,5, 0,75, 0,15, 0,075, 0,015, 0,0075, 0,0015, 0,00075, 0,00015 nanomoles de agente de iRNA por kg de peso corporal. La dosis unitaria, por ejemplo, puede administrarse por una dosis inhalada o nebulización o por inyección. En un ejemplo, se utilizan intervalos de dosificación de 0,02-25 mg/kg.
- 50
- La administración de un agente de iRNA directamente a los pulmones o al conducto nasal puede realizarse a una dosis en el orden de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 150 mg/conducto nasal.
- 55
- La dosificación puede ser una cantidad eficaz para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno.

- En una realización, la dosis unitaria se administra una sola vez al día. En otro uso, se administra una dosis unitaria dos veces el primer día y luego diariamente. Como alternativa, la dosificación unitaria puede ser menor que una vez al día, *v.g.*, menor que cada 2, 4, 8 ó 30 días. En otra realización, la dosis unitaria no se administra con cierta frecuencia (*v.g.* no con una frecuencia regular). Por ejemplo, la dosis unitaria puede administrarse una sola vez.
- 5 Dado que la silenciación mediada por el agente de iRNA puede persistir durante varios días después de la administración de la composición del agente de iRNA, en muchos casos, es posible administrar la composición con una frecuencia inferior a una vez al día o, en algunos casos, solamente una sola vez durante todo el régimen terapéutico.
- En una realización, se administra a un individuo una dosis inicial, y una o más dosis de mantenimiento de un agente de iRNA, *v.g.*, un agente de iRNA bicatenario, o agente siRNA, (*v.g.*, un precursor, *v.g.* un agente de iRNA mayor que puede procesarse en un agente siRNA, o un DNA que codifica un agente de iRNA, *v.g.* un agente de iRNA bicatenario, o agente siRNA, o precursor del mismo). La o las dosis de mantenimiento son generalmente menores que la dosis inicial, *v.g.*, la mitad de la dosis inicial. Un régimen de mantenimiento puede incluir el tratamiento del individuo con una o más dosis que van desde 0,01 µg a 75 mg/kg de peso corporal por día, *v.g.*, 70, 60, 50, 40,30, 20, 10, 5, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,01, 0,005, 0,001, ó 0,0005 mg por kg de peso corporal por día. Las dosis de mantenimiento se administran preferiblemente no más de una vez cada 5-14 días. Adicionalmente, el régimen de tratamiento puede durar un periodo de tiempo que variará dependiendo de la naturaleza de la enfermedad particular, su gravedad y la condición global del paciente. En realizaciones preferidas, la dosis puede administrarse no más de una vez al día, *v.g.* no más de una vez cada 24, 36, 48 o más horas, *v.g.* no más de una vez cada 5 u 8 días.
- 10 Después del tratamiento, el paciente puede monitorizarse respecto a cambios en su estado y respecto al alivio de los síntomas del estado de enfermedad. La dosificación del compuesto puede aumentarse en el caso de que el paciente no responda significativamente a los niveles de dosificación actuales, o la dosis puede reducirse si se observa un alivio de los síntomas del estado de enfermedad, si el estado de enfermedad ha desaparecido, o si se observan efectos secundarios indeseables.
- En una realización, la composición farmacéutica del agente de iRNA incluye una pluralidad de especies de agentes de iRNA. Las especies de agentes de iRNA pueden tener secuencias que son no solapantes y no adyacentes con respecto a una secuencia diana existente naturalmente, *v.g.*, una secuencia diana del gen RSV. En otra realización, la pluralidad de especies de agentes de iRNA es específica para diferentes genes diana existentes naturalmente. Por ejemplo, un agente de iRNA que está direccionado al gen de la proteína P de RSV puede estar presente en la misma composición farmacéutica que un agente de iRNA que está direccionado a un gen diferente, por ejemplo el gen de la proteína N. En otra realización, los agentes de iRNA son específicos para virus diferentes, *v.g.*, RSV.
- 15 La concentración de la composición del agente de iRNA es una cantidad suficiente para ser eficaz en el tratamiento o la prevención de un trastorno o para regular una condición fisiológica en humanos. La concentración o cantidad de agente de iRNA administrada dependerá de los parámetros determinados para el agente y el método de administración, *v.g.*, nasal, bucal o pulmonar. Por ejemplo, las formulaciones nasales tienden a requerir concentraciones mucho menores de algunos ingredientes a fin de evitar irritación o ardor en los conductos nasales. A veces es deseable diluir una formulación oral hasta 10-100 veces a fin de proporcionar una formulación nasal adecuada.
- Ciertos factores pueden influir en la dosis requerida para tratar eficazmente un individuo, con inclusión pero sin carácter limitante de la gravedad de la enfermedad o trastorno, tratamientos previos, el estado general de salud y/o la edad del individuo, así como otras enfermedades presentes. Se apreciará también que la dosis eficaz de un agente de iRNA tal como un agente siRNA utilizado para tratamiento puede aumentar o disminuir a lo largo del curso de un tratamiento particular. Pueden producirse cambios en la dosificación y hacerse evidentes por los resultados de ensayos de diagnóstico. Por ejemplo, el individuo puede monitorizarse después de la administración de una composición de agente de iRNA. Basándose en la información de la monitorización, puede administrarse una cantidad adicional de la composición del agente de iRNA.
- 20 La invención se ilustra adicionalmente por los ejemplos que siguen, que no deben interpretarse como ulteriormente limitantes.

## EJEMPLOS

### 50 Diseño de siRNAs antivirales contra mRNA de RSV

Se sintetizaron químicamente siRNA contra mRNA P, N, y L de RSV utilizando procedimientos conocidos. Se enumeran las secuencias de siRNA y cierta actividad de subtipo cruzado de inhibición así como valores CI50 (Tabla 1 (a-c)).

### Ensayo *in vitro* e infección de virus

- 55 Se cultivaron células Vero E6 hasta 80% de confluencia en DMEM que contenía 10% de FBS desactivado por calentamiento. Para la introducción de siRNA, se añadieron 4 µl de Transit-TKO a 50 µl de DMEM exento de suero y se incubaron a la temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, se añadió la concentración indicada de siRNA a medio/reactivo TKO respectivamente y se incubaron a la temperatura ambiente durante 10 minutos. Se

añadió mezcla de RNA a 200 µl de DMEM que contenía 10% de FBS y luego a la monocapa de células. Las células se incubaron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 6 horas. La mezcla de RNA se retiró por lavado moderado con 1x de Soluciones Salinas Balanceadas de Hank (HBSS) y se añadieron 300 unidades formadoras de calvas (pfu) por pocillo de RSV/A2 (MOI = 30) a los pocillos y se adsorbieron durante una hora a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub>. Se separó el virus y las células se lavaron con 1x HBSS. Las células se cubrieron con 1% de metilcelulosa en DMEM que contenía 10% de medio FBS, y se incubaron durante 6 días a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se sometieron a inmunotinción respecto a calvas utilizando un anticuerpo monoclonal 131-2A anti-proteína F.

#### Administración de siRNA e infección de virus *in vivo*

Se adquirieron de Harman ratones BALB/c hembra de 4 semanas exentos de patógenos. Los ratones se mantuvieron bajo anestesia durante la infección e instilación intranasal (i.n.). Los ratones se inmunizaron por instilación intranasal con la cantidad indicada de siRNA, sin complejar, o complejo con 5 µl de TKO Transit. Se administraron 150 µg de Synagis (clon del anticuerpo monoclonal 143-6C, anti-proteína F de RSV) y control Isotipo de Ratón (IgG1) por vía intraperitoneal (i.p.) 4 horas antes del enfrentamiento a RSV (10<sup>6</sup> PFU de RSV/A2). Se utilizaron 10 ratones por grupo. Se monitorizaron los pesos de los animales los días 0, 2, 4 y 6 después de la infección. Se extirparon los pulmones el día 6 después de la infección y se ensayaron respecto a RSV por ensayo de inmunotinción de calvas.

#### Ensayo de Inmunotinción de Calvas

Se cultivaron placas de 24 pocillos de células Vero E6 hasta 90% de confluencia en DMEM que contenía 10% de FBS desactivado por calentamiento. Se homogeneizaron los pulmones de los ratones con un homogeneizador manual en 1 ml de PBS de Dulbecco estéril (D-PBS) y se diluyeron 10 veces en DMEM exento de suero. Las diluciones de lisado de pulmón que contenían virus se extendieron en placas de 24 pocillos por triplicado y se adsorbieron durante una hora a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub>. Los pocillos se cubrieron con 1% de metilcelulosa en DMEM que contenía 10% de FBS. A continuación, se incubaron las placas durante 6 días a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 6 días, se retiró el medio suprayacente y las células se fijaron en acetona:metanol (60:40) durante 15 minutos. Se bloquearon las células con 5% de leche en polvo/PBS durante una hora a 37°C. Se añadió una dilución 1:500 de anticuerpo anti-proteína F de RSV (131-2A) a los pocillos y se incubaron durante 2 horas a 37°C. Las células se lavaron dos veces en PBS/0,5% Tween 20. Se añadió una dilución 1:500 de IgG-fosfatasa alcalina anti-ratón de cabra a los pocillos y se incubaron durante una hora a 37°C. Las células se lavaron dos veces en PBS/5% Tween 20. La reacción se desarrolló utilizando el kit II de sustrato de Fosfatasa Alcalina de Vector (Vector Black), y se sometió a contratinción con hematoxilina. Se visualizaron las calvas y se contaron utilizando un Microscopio Olympus Invertido.

#### Ensayo de tratamiento

Se enfrentaron los ratones a RSV (10<sup>6</sup> PFU de RSV/A2) por instilación intranasal el día 0 y se trataron con 50 µg del siRNA indicado, administrado por instilación intranasal, en los momentos indicados (días 1-4 después del enfrentamiento al virus). Se utilizaron 3-5 ratones por grupo y se midieron los títulos virales de los lisados pulmonares el día 5 después del enfrentamiento al virus, como se ha descrito previamente.

#### Inhibición *in vitro* de RSV utilizando agentes de iRNA

Se testaron los agentes de iRNA estipulados en la Tabla 1 (a-c) respecto a actividad anti-RSV en un ensayo de formación de calvas como se ha descrito arriba (Figura 1). Cada columna (barra) representa un agente de iRNA estipulado en la Tabla 1 (a-c), v.g. la columna 1 es el primer agente en la Tabla 1 a, la segunda columna es el segundo agente, y así sucesivamente. Los agentes de iRNA activos se identificaron por el % de virus remanente. Se utilizaron varios agentes que exhibían una inhibición tan alta como 90%. Los resultados se resumen en la Tabla 1 (a-c).

Se determinó la inhibición *in vitro* de RSV de respuesta a la dosis utilizando agentes de iRNA. Ejemplos de agentes activos de la Tabla 1 se testaron respecto actividad anti-RSV en un ensayo de formación de calvas como se describe arriba a cuatro concentraciones. Se encontró una respuesta dependiente de la dosis con los agentes iRNA activo testado (Figura 2) y se resume en la Tabla 1 (a-c).

La inhibición *in vitro* del subtipo RSV B utilizando agentes de iRNA se testó como se ha descrito arriba. Los agentes de iRNA estipulados en la Figura 2 se testaron en cuanto a actividad anti-RSV contra el subtipo B (Figura 3). El subtipo B de RSV era inhibido por los agentes de iRNA testados en grados variables y esto se resume en la Tabla 1 (a-c).

#### Inhibición *in vivo* de RSV utilizando agentes de iRNA

La inhibición *in vivo* de RSV utilizando AL-1729 y AL-1730 se testó como se ha descrito arriba. Los agentes que se describen en la Figura 4 se testaron respecto a actividad anti-RSV en un modelo de ratón. Los agentes de iRNA eran eficaces para reducir los títulos virales *in vivo* y más eficaces que un anticuerpo de control (Mab 143-6c, un Ab de IgG1 de ratón que está aprobado para tratamiento del RSV).

Se testó AL1730 respecto a actividad dependiente de la dosis utilizando los métodos estipulados arriba. El agente exhibía una respuesta dependiente de la dosis (Figura 5).

5 Se testaron agentes de iRNA que exhibían actividad in vitro respecto a actividad anti-RSV in vivo como se ha reseñado anteriormente. Varios agentes exhibían una reducción en los títulos virales de > 4 logs cuando se administraron profilácticamente (Figura 6).

Se testaron agentes de iRNA que exhibían actividad in vitro y/o in vivo respecto a actividad anti-RSV in vivo de acuerdo como en el protocolo de tratamiento reseñado anteriormente. Varios agentes exhibían una reducción en los títulos virales de 2-3 logs (Figura 7) cuando se administraron 1-2 días después de la infección viral.

### **Análisis de la secuencia de los aislados en la secuencia diana**

#### 10 **Método:**

*Crecimiento de los aislados y aislamiento de RNA:* Se obtuvieron de Larry Anderson aislados clínicos de pacientes infectados con RSV en el CDC de Atlanta, Georgia (4 cepas) y John DeVincenzo (Universidad de Tenn., Memphis, 15 cepas). Cuando se cultivaron éstos en HEp-2, células epiteliales humanas (ATCC, Cat #CCL-23), se observó que los cuatro aislados de Georgia crecían más lentamente que las 15 cepas de Tennessee; por tanto, éstas se procesaron y analizaron por separado. El procedimiento se describe brevemente como sigue:

15 Células Vero E6 epiteliales de riñón de mono (ATCC, Cat #CRL-1586), se dejaron crecer hasta 95% de confluencia y se infectaron con una dilución 1/10 de aislados primarios. El virus se absorbió durante una hora a 37°C, después de lo cual se complementaron las células con D-MEM y se incubaron a 37°C. Sobre una base diaria, se monitorizaron las células respecto a efecto citopático (CPE) por microscopía óptica. A 90% de CPE, se recogieron las células por raspado y se redujeron a un sedimento por centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos. Se realizaron preparaciones de RNA por procedimientos estándar de acuerdo con el protocolo del fabricante.

20 **Amplificación del gen N de RSV:** Se recogieron RNAs virales después de la infección y se utilizaron como moldes en reacciones PCR, utilizando iniciadores que se hibridan aguas arriba y aguas abajo del sitio diana ALDP-2017 para amplificar un fragmento de ~ 450 pb. El RNA total se desnaturalizó a 65°C durante 5 minutos en presencia de los iniciadores directo e inverso del gen N de RSV, se guardaron en hielo, y se sometieron después a transcripción inversa con Superscript III (Invitrogen) durante 60 minutos a 55°C y durante 15 minutos a 70°C. Los productos PCR se analizaron por electroforesis en gel sobre un gel de agarosa al 1% y se purificaron por protocolos estándar.

25 **Resultados:** El análisis de la secuencia de los 15 primeros aislados confirmó que el sitio diana para ALDP-2017 se conservaba completamente en todas las cepas. Y lo que es más importante, esta conservación se mantenía en las diversas poblaciones, que incluían aislados de ambos subtipos A y B de RSV. Es interesante que, cuando se analizaron los 4 aislados que crecían más lentamente, se observó que uno de los 4 (LAP6824) tenía una mutación de una sola base en el sitio de reconocimiento de ALDP-2017. Esta mutación cambiaba la secuencia codificante en la posición 13 del gen N de RSV en este aislado de A a G.

#### 35 **Conclusiones**

De 19 aislados de pacientes, se ha determinado la secuencia del gen N de RSV en el sitio diana para ALDP-2017. En 18 de los 19 casos (95%), el elemento de reconocimiento para ALDP-2017 se conserva en un 100%. En uno de los aislados, existe una alteración de una sola base que cambia el nucleótido en la posición 13 de A a G dentro del gen N de RSV. Esta alteración crea un bamboleo simple G:U entre la cadena antisentido de ALDP-2017 y la secuencia diana. Basándose en la comprensión del potencial de hibridación de dicho bamboleo G:U, se predice que ALDP-2017 será eficaz en la silenciamiento del gen N de RSV en este aislado.

### **Datos de silenciamiento en aislados**

#### **Métodos**

45 Se cultivaron células Vero E6 hasta 80% de confluencia en DMEM que contenía 10% de FBS desactivado por calentamiento. Para la introducción de siRNA, se añadieron 4 µl de Transit-TKO a 50 µl de DMEM exento de suero y se incubaron a la temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación, se añadió la concentración indicada de siRNA a medio/reactivo TKO respectivamente y se incubó a la temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadió mixtura de RNA a 200 µl de DMEM que contenía 10% de FBS y luego a la monocapa de células. Las células se incubaron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 6 horas. La mixtura de RNA se separó por lavado moderado con 1x Soluciones Salinas Balanceadas de Hank (HBSS), se añadieron a los pocillos 300 unidades formadoras de calvas (pfu) por pocillo de RSV/A2 (MOI = 30) y se absorbieron durante una hora a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Se eliminó el virus y las células se lavaron con 1x HBSS. Las células se cubrieron con 1% de metilcelulosa en DMEM que contenía 10% de medio FBS, y se incubaron durante 6 días a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Las células se sometieron a inmunotinción respecto a calvas utilizando el anticuerpo monoclonal 131-2A anti-proteína F.

**Resultados:** Se observó silenciación para todos los aislados (Tabla 2)

<b>Nombre del aislado</b>	<b>2 0 1 7 % calvas remanentes</b>	<b>2 1 5 3 % calvas remanentes</b>
RSV/A2	4,49	80,34
RSV/96	5,36	87,50
RSV/87	10,20	79,59
RSV/110	5,41	81,08
RSV/37	4,80	89,60
RSV/67	2,22	91,67
RSV/121	6,25	82,50
RSV/31	4,03	96,77
RSV/38	2,00	92,67
RSV/98	5,13	91,03
RSV/124	3,74	90,37
RSV/95	7,32	64,02
RSV/32	5,45	92,73
RSV/91	8,42	95,79
RSV/110	12,07	94,83
RSV/54	1,90	89,87
RSV/53	7,41	94,07
RSV/33	7,69	95,19

Tabla 2

- 5 **Conclusión:** Todos los aislados clínicos testados eran inhibidos específicamente por siRNA 2017 en una proporción mayor que 85%. Ningún aislado era inhibido significativamente por el control siRNA 2153 apareado erróneamente.

#### **Silenciación en el ensayo basado en plásmido**

##### **Métodos**

- 10 Se siembra una placa de 24 pocillos con células HeLa S6 y se deja crecer hasta 80% de confluencia. Para cada pocillo, se mezcla 1 µg de plásmido N-V5 de RSV con siRNA (a la concentración indicada), en 50 µl de OPTIMEM y se añade a una mezcla Lipofectamina 2000 (Invitrogen)-Optimem preparada de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y se deja reposar durante 20 minutos a la temperatura ambiente para formar un complejo. Se añade el complejo a las células y se incuba a 37°C durante una noche. Se retira el medio, se lavan las células con PBS y se lisan con 50 µl de tampón de lisis (tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM de pH 8,0, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, 0,5%

desoxicolato de sodio, 1% NP-40, 0,05% SDS) durante 1-2 min. La inhibición se cuantifica por medida del nivel de proteína de RSV en los lisados celulares, detectado por transferencia Western con un anticuerpo antiV5.

**Resultados:** Se demostró que la expresión transitoria de plásmido era un ensayo eficaz para los agentes RNAi (Tabla 3).

			Proteína %	Actividad %
1	ALDP2017	10nM	0	100
2		1 nM	0	100
3		100pM	0	100
4		10pM	11,78	88,22
5		1pM	70,63	29,37
6		100fM	72,7	27,3
7	Control	PBS	100	0
8	2153	10nM	94,54	4,5

5

**Tabla 3**

**Conclusiones**

siRNA 2017 inhibe específicamente y de manera dependiente de la dosis la producción de proteína N de RSV cuando se cotransfecta transitoriamente con un plásmido que expresa el gen N de RSV. La inhibición no se observa con el siRNA 2153 de control apareado erróneamente.

10

**Silenciación de RSV por administración de siRNA en aerosol**

**Método**

Se administra una solución de 2 mg/ml de ALDP-1729 o ALDP-1730 por nebulización utilizando un dispositivo aerosol durante un total de 60 segundos. Se preparó el virus a partir de pulmón como se ha descrito arriba y se midió por ELISA en lugar de un ensayo de calvas. El método ELISA mide la concentración de la proteína N de RSV en las células infectadas con virus obtenido de lisados de pulmón de ratón.

15

**ELISA**

Se diluye el lisado de pulmón 1:1 con tampón carbonato-bicarbonato (NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6) hasta una concentración de trabajo de 6-10 µg/100 µ, se añade a cada pocillo de test y se incuba a 37°C durante una hora o durante una noche a 4°C. Los pocillos lavados 3 veces con PBS/0,5% Tween 20 se bloquean luego con 5% de leche en polvo/PBS durante una hora a 37°C o durante una noche a 4°C. El anticuerpo primario (control positivo de proteína F = clon 131-2A; control positivo de proteína G = 130-2G; control negativo = IgG1 normal (BD Pharmingen, Cat. #553454, sueros de test, o sobrenadante de hibridoma) se añade a los pocillos a 1:1000 y se incuba a 37°C durante una hora o durante una noche a 4°C. Los pocillos se lavan 3 veces con PBS/0,5% Tween 20. Se añade el anticuerpo secundario (IgG anti-ratón de cabra (H+L), molécula entera-conjugado con fosfatasa alcalina) diluido 1:1000 a los pocillos (100 µl/pocillo) y se incuba a 37°C durante una hora o durante una noche a 4°C. Se lava 3 veces con PBS/0,5% de Tween 20 y se añade luego el sustrato Npp (Sigmafast) Sigma Aldrich N2770 de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes. Se añaden 200 µl de sustrato/pocillo y se incuba durante 10-15. Se mide la absorbancia a una densidad óptica de 405/495.

20

25

30

**Conclusión**

El administración de siRNA específico de RSV reduce los niveles de la proteína N de RSV en los pulmones de ratón en comparación con el siRNA de control apareado erróneamente (Figura 8 a-b).

5 **Inhibición in vivo el día 3-Profilaxis**

**Método**

Se testó la profilaxis in vivo utilizando el método in vivo arriba descrito, excepto que el siRNA se administró en momentos diferentes antes de la infección con RSV desde 3 días antes a 4 horas antes.

**Resultados**

10 El siRNA administrado intranasalmente hasta 3 días antes del enfrentamiento al virus exhibe silenciamiento significativa *in vivo* (Figura 9).

Tabla 1 (a-c). Secuencias de siRNA

Tabla 1a. Gen I de RSV

Inicio Real	Posición de Inicio en Whitehead	Sentido	SEQ ID NO:	Antisentido	SEQ ID NO:	AL-DP #	% Inh. RSV A2 (5 nM)	% Inh. RSV A2 (500 pM)	% Inh. RSV A2 (50 pM)	% Inh. RSV A2 (5 pM)	% Inh. RSV B (5 nM)
3	1	GGAUCCCAUUUAUUAAUGGAdTdT	1	UCCAUUAAUUAUGGGAUCCdTdT	2	AL-DP-2024	92				
4	2	GAUCCCAUUUAUUAAUGGAAAdTdT	3	UUCCAUUAAUUAUGGGAUCCdTdT	4	AL-DP-2026	82				
49	47	AGUUUUUUAAAAGGUGUUAdTdT	5	UAAACACCUUUUUAAAUAACUdTdT	6	AL-DP-2116					
50	48	GUUUUUUUAAAAGGUGUUAdTdT	7	AUAAACACCUUUUUAAAUAACUdTdT	8	AL-DP-2117					
53	51	AUUUUAAAAGGUGUUAUUCUdTdT	9	GAGAUAAACACCUUUUUAAAUAAdTdT	10	AL-DP-2118					
55	53	UUUUAAAAGGUGUUAUUCUdTdT	11	AAGAGAUAAACCUUUUUAAAUAAdTdT	12	AL-DP-2119					
156	154	AAGUCCACUACUAGAGCAUdTdT	13	AUGCUCUAGUAGUGGACUAdTdT	14	AL-DP-2027	86				
157	155	AGUCCACUACUAGAGCAUAdTdT	15	UAUGCUCUAGUAGUGGACUdTdT	16	AL-DP-2028	90				
158	156	GUCCACUACUAGAGCAUAdTdT	17	AUAUGCUCUAGUAGUGGACdTdT	18	AL-DP-2029	89				
159	157	UCCACUACUAGAGCAUAdTdT	19	CAUAUGCUCUAGUAGUGGAdTdT	20	AL-DP-2030	86				
341	339	GAAGAGCUUAGAAAAUAGdTdT	21	CUUUUUUCUUAUAGCUCUUCdTdT	22	AL-DP-2120					
344	342	GAGCUUAGAAAAUAGUGAdTdT	23	UCACUUUUUCUUAUAGCUCdTdT	24	AL-DP-2121					
347	345	CUUAGAAAAUAGUGAUdTdT	25	ACAUACUUUUUCUUAUAGdTdT	26	AL-DP-2031	15				
554	552	UCAAAAACAACUCUUGAdTdT	27	UUCAAGAGUGUUUGUUUGAdTdT	28	AL-DP-2122					
1004	1002	UAGAGGGAUUUUUUUGUGdTdT	29	GACAUUUUUUUUUUUUUUUUUAdTdT	30	AL-DP-2123					
1408	1406	AUAAAAGGGUUUGUAAAUAdTdT	31	UAUUUACAACCCUUUUUUUUUUAdTdT	32	AL-DP-2124					
1867	1865	CUCAGUGUAGGUAGAAUUGdTdT	33	ACAUUCUACCUACACUGAGdTdT	34	AL-DP-2032	90				
1868	1866	UCAGUUAAGGUAGAAUUGUUdTdT	35	AACAUUUACCUACACUGAdTdT	36	AL-DP-2033	84				
1869	1867	CAGUUAAGGUAGAAUUGUUdTdT	37	AAACAUUUACCUACACUGdTdT	38	AL-DP-2034	86				
1870	1868	AGUGUAGGUAGAAUUGUUdTdT	39	CANACAUUUACCUACACUdTdT	40	AL-DP-2112					
1871	1869	GUGUAGGUAGAAUUGUUdTdT	41	GCAAAACAUUUACCUACACdTdT	42	AL-DP-2113					
1978	1976	ACAAGAUAUGGUAUCUAGdTdT	43	CUAGAUCACCAUAUCUUGdTdT	44	AL-DP-2035	89				
2104	2102	AGCAAAUUCAAAUCAAGCAUdTdT	45	AUUCUUUGAUUGAAUUUGCUdTdT	46	AL-DP-2036	87				

2105	2103	GCAAAUUCALUCAAGCAUUUdT	47	AAUGCUUGAUUGAAUUUGCtTdT	48	AL-DP-2037	91			
2290	2288	GAUGAACAAAGUGGAUUUdT	49	AUAUCCACUUUUGUUCACUCtTdT	50	AL-DP-2038	11			
2384	2382	UAUAUCUCUCAAGGGAAdTdT	51	UUCUUUUGAGAGAUUUUAdTdT	52	AL-DP-2125				
2386	2384	AUAUCUCUCAAGGGAUUUdT	53	AUUUCCUUUUGAGAGAUUUdT	54	AL-DP-2126				
2387	2385	UAUCUCUCAAGGGAUUUdT	55	AUUUCCUUUUGAGAGAUAdTdT	56	AL-DP-2127				
2485	2483	CAUGCACAAGCAUAUUUdT	57	AUUAAUCUCUUUGAGCAUGtTdT	58	AL-DP-2039	87			
2487	2485	UGCUCAAGCAGAUUUUUGtTdT	59	CAAAUAAUCUCUUUGAGCAAdTdT	60	AL-DP-2040	88			
2507	2505	UAGCAUUAAUAUAGCCUUAAAdTdT	61	UUAAAGCTUAUUUAUUGCUAdTdT	62	AL-DP-2041	96	76	73	69
2508	2506	AGCAUUAAUAUAGCCUUAAAdTdT	63	UUAAAGCTUAUUUAUUGCUAdTdT	64	AL-DP-2114				
2509	2507	GCAUUAAUAUAGCCUUAAUdT	65	AUUAAAGCTUAUUUAUUGCCtTdT	66	AL-DP-2042	96	98	97	97
2510	2508	CAUUAAUAUAGCCUUAAUdT	67	AUUAAAGCTUAUUUAUUGCCtTdT	68	AL-DP-2043	97	86	79	75
2765	2763	UAUUAGCAGUUUAUUUAdTdT	69	AUUAAUAAACUGCAUAAUAdTdT	70	AL-DP-2044	97	79	72	67
2767	2765	UUUAGCAGUUUAUUUAdTdT	71	UAAAUUAUAAACUGCAUAAAdTdT	72	AL-DP-2045	15			
3283	3281	AAAAGUCACAACAUAUUAdTdT	73	UAUAUUGUUUGGCACUUUUdT	74	AL-DP-2128				
3284	3282	AAAGUCACAACAUAUAdTdT	75	GUUAAUUGUUUGGCACUUUUdT	76	AL-DP-2046	94	94	91	91
3338	3336	AUAUAGAACCUACAUAUCCtTdT	77	GGAUUUGUAGGUUUAUAdTdT	78	AL-DP-2047	87			
3339	3337	UAUAGAACCUACAUAUCCtTdT	79	AGGAUUGUAGGUUUAUAdTdT	80	AL-DP-2048	84			
3365	3363	UAAGAGUUGUUUAUGAAAGtTdT	81	CUUUCAUAAACAACUCUUAdTdT	82	AL-DP-2129				
4021	4019	ACAGUCAGUAGUAGACCAUdT	83	AUGGUUACUACUGACUGUAdTdT	84	AL-DP-2049	24			
4022	4020	CAGUCAGUAGUAGACCAUdT	85	CAUGGUUACUACUGACUGUAdTdT	86	AL-DP-2050	15			
4023	4021	AGUCAGUAGUAGACCAUdT	87	ACAUGGUUACUACUGACUGUAdTdT	88	AL-DP-2051	87			
4024	4022	GUCAGUAGUAGACCAUUGUdT	89	CACAUGGUUACUACUGACUGUAdTdT	90	AL-DP-2052	96	84	76	69
4025	4023	UCAGUAGUAGACCAUUGUAdTdT	91	UCACAUGGUUACUACUGUAdTdT	92	AL-DP-2053	92	84	79	76
4037	4035	CAUGUGAAUUCUUGCAUCdT	93	GAUGCAGGGAUUUCACAUGtTdT	94	AL-DP-2054	97	79	78	69
4038	4036	AUGUGAAUUCUUGCAUCdT	95	UGAUGCAGGGAUUUCACAUGtTdT	96	AL-DP-2055	88			
4039	4037	UGUGAAUUCUUGCAUCAAdTdT	97	UUGAUGCAGGGAUUUCACAAdTdT	98	AL-DP-2056	16			
4040	4038	GUGAAUUCUUGCAUCAAdTdT	99	AUUGAUGCAGGGAUUUCACAAdTdT	100	AL-DP-2115				
4043	4041	AUUUCCUGCAUCAUAUACCdT	101	GGUAAUUGAUGCAGGGAUUUAdTdT	102	AL-DP-2057	94	91	86	79
4051	4049	GCAUCAUAUACCAGCUUAUAdTdT	103	UAUAAGCUGGUUAUUGAUGCtTdT	104	AL-DP-2058	86			
4052	4050	CAUCAUAUACCAGCUUAUAdTdT	105	CUAUAAGCUGGUUAUUGAUGCtTdT	106	AL-DP-2059	91			
4057	4055	AUACCAGCUUAUAGAACAAAdTdT	107	UUGUUCUAUAAGCUGGUUAUAdTdT	108	AL-DP-2060	92			
4058	4056	UACCAGCUUAUAGAACAAAdTdT	109	GUUGUUCUAUAAGCUGGUUAAdTdT	110	AL-DP-2061	88			

4059	4057	ACCAGCUUAUAGAACCAACAATGT	111	UGUUGUUCUUAUAGCUGGUUdTGT	112	AL-DP-2062	95	79	78	72	94
4060	4058	CCAGCUUUUAGCAACAACAATGT	113	UUGUUUUUCUUAUAGCUGGUdTGT	114	AL-DP-2063	90				
4061	4059	CAGCUUUUAGCAACAACAATGT	115	UUUGUUUUUCUUAUAGCUGGUdTGT	116	AL-DP-2064	94	86	76	67	83
4067	4065	AUAGAACCAACAAAUUUCADTGT	117	UGAUAAUUUGUUUUUCUUAUdTGT	118	AL-DP-2065	91				
4112	4110	UAUUAAACAGAAAAGUUGGHTGT	119	CCAUACUUUUUCUGUUAAAUAdTGT	120	AL-DP-2130					
4251	4249	UGAGAUACAUUUGAUGAAAATGT	121	UUUCAUCAAAUUGUAUCUCAdTGT	122	AL-DP-2066	86				
4252	4250	GAGAUACAUUUGAUGAAAATGT	123	GUUUUCAUCAAAUUGUAUCUCAdTGT	124	AL-DP-2067	92				
4254	4252	GAUACAUUUGAUGAAAATGT	125	AGGUUUUCAUCAAAUUGUAUCdTGT	126	AL-DP-2068	93				
4255	4253	AUACAUUUGAUGAAAATGT	127	GAGUUUCAUCAAAUUGUAUdTGT	128	AL-DP-2069	89				
4256	4254	UACAUUUGAUGAAAATGT	129	GGAGUUUCAUCAAAUUGUAdTGT	130	AL-DP-2074					
4313	4311	AAGUGAUACAAAACAGCAATGT	131	UGCGUUUUUGUAUCACUdTGT	132	AL-DP-2131					
4314	4312	AGUGAUACAAAACAGCAUdTGT	133	AUGCGUUUUUGUAUCACUdTGT	134	AL-DP-2132					
4316	4314	UGAUACAAAACAGCAUdTGT	135	AUAUCGUGUUUUUGUAUCADTGT	136	AL-DP-2133					
4473	4471	UUUAAAGUACUAAUUUAGCUBTGT	137	AGCUAAAUUAGUACUAAAATGT	138	AL-DP-2075					
4474	4472	UUUAGUACUAAUUUAGCUGdTGT	139	CAGCUAAAUUAGUACUAAAATGT	140	AL-DP-2076					
4475	4473	UAAGUACUAAUUUAGCUGdTGT	141	CCAGCUAAAUUAGUACUAAAATGT	142	AL-DP-2077					
4476	4474	AAGUACUAAUUUAGCUGGdTGT	143	UCCAGCUAAAUUAGUACUAAAATGT	144	AL-DP-2078					
4477	4475	AGUACUAAUUUAGCUGGdTGT	145	GUCCAGCUAAAUUAGUACUAAAATGT	146	AL-DP-2079					
4478	4476	GUACUAAUUUAGCUGGACdTGT	147	UGUCCAGCUAAAUUAGUACUAAAATGT	148	AL-DP-2080					
4480	4478	ACUAAUUUAGCUGGACAUdTGT	149	AUUGUCCAGCUAAAUUAGUACUAAAATGT	150	AL-DP-2081					
4483	4481	AUUUAGCUGGACAUUUGGdTGT	151	UCCAAUUGUCCAGCUAAAATGT	152	AL-DP-2082					
4484	4482	AUUUAGCUGGACAUUUGGdTGT	153	AUCCAAUUGUCCAGCUAAAATGT	154	AL-DP-2083					
4486	4484	UUAGCUGGACAUUUGGdTGT	155	GAAUCCAAUUGUCCAGCUAAAATGT	156	AL-DP-2084					
4539	4537	UUUUGAAAAGAUUUGGGdTGT	157	UCCCAAUUCUUUUUCAAAdTGT	158	AL-DP-2134					
4540	4538	UUUUGAAAAGAUUUGGGdTGT	159	CUCCCAAUUCUUUUUCAAAdTGT	160	AL-DP-2135					
4542	4540	UGAAAAGAUUUGGGGAGdTGT	161	CUUCCCAAUUCUUUUUCAAAdTGT	162	AL-DP-2136					
4543	4541	GAAAAGAUUUGGGGAGdTGT	163	CCUCCCAAUUCUUUUUCAAAdTGT	164	AL-DP-2137					
4671	4669	UAUGAACACUUCAGAUUCUdTGT	165	AAGAUUCUGAAGUUCUUAAdTGT	166	AL-DP-2085					
4672	4670	AUGAACACUUCAGAUUCUdTGT	167	GAAGAUUCUGAAGUUCUUAAdTGT	168	AL-DP-2086					
4867	4865	UGCCUUGGUUGUUUAACAAdTGT	169	UGUUUAACAACCCCAAGGGCAdTGT	170	AL-DP-2087					
4868	4866	GCCUUGGUUGUUUAACAAdTGT	171	AUGUUUAACAACCCCAAGGGCAdTGT	172	AL-DP-2088					
5544	5542	UAUAGCAUUCUUAAGGUGAAdTGT	173	UUCACCUUAUGAAGUUCUUAAdTGT	174	AL-DP-2089					
5545	5543	AUAGCAUUCUUAAGGUGAAdTGT	175	CUUCACCUUAUGAAGUUCUUAAdTGT	176	AL-DP-2090					
5546	5544	UAGCAUUCUUAAGGUGAAdTGT	177	CCUUCACCUUAUGAAGUUCUUAAdTGT	178	AL-DP-2091					
5550	5548	AUUCAUAGGUGAAGGAGCAdTGT	179	UGUCUUCUUCACCUUAUGAAGUUAAdTGT	180	AL-DP-2092					

5640	5638	UUCCAUGAUCUAUUAUUUUAdTdT	<u>181</u>	UAAACUAUGAUCUAUUGCAAAdTdT	<u>182</u>	AL-DP-2093			
5641	5639	UGCAAUGAUCUAUUAUUUUACdTdT	<u>183</u>	GUAAACUAUGAUCUAUUGCAAdTdT	<u>184</u>	AL-DP-2094			
5642	5640	GCAAUGAUCUAUUAUUUUACCCdTdT	<u>185</u>	GGUAAACUAUGAUCUAUUGCCdTdT	<u>186</u>	AL-DP-2095			
5643	5641	CAAUGAUCUAUUAUUUUACCCUdTdT	<u>187</u>	AGGUAAACUAUGAUCUAUUGUdTdT	<u>188</u>	AL-DP-2096			
5644	5642	AAUGAUCUAUUAUUUUACCUAdTdT	<u>189</u>	UAGGUAAACUAUGAUCUAUUGdTdT	<u>190</u>	AL-DP-2097			
5645	5643	AUGAUCUAUUAUUUUACCUAUdTdT	<u>191</u>	AUAGGUAAACUAUGAUCUAUdTdT	<u>192</u>	AL-DP-2098			
5647	5645	GAUCAUUAUUUUACCUAUUGdTdT	<u>193</u>	CAUAAGGUAAACUAUGAUCAdTdT	<u>194</u>	AL-DP-2138			
5648	5646	AUCAUUAUUUUACCUAUUGAdTdT	<u>195</u>	UCAUAAGGUAAACUAUGAUdTdT	<u>196</u>	AL-DP-2139			
5649	5647	UCAUUAUUUUACCUAUUGAGdTdT	<u>197</u>	CUCAUAAGGUAAACUAUGAdTdT	<u>198</u>	AL-DP-2140			
5650	5648	CAUUAUUUUACCUAUUGAGUdTdT	<u>199</u>	ACUCAUAAGGUAAACUAUGdTdT	<u>200</u>	AL-DP-2099			
5651	5649	AUAUUUUACCUAUUGAGUUdTdT	<u>201</u>	AACUCAUAAGGUAAACUAUAdTdT	<u>202</u>	AL-DP-2100			
5752	5750	CAUUGGUCUUAUUUAACUAAdTdT	<u>203</u>	UAUGUAAAUAAAGCAUAUGdTdT	<u>204</u>	AL-DP-2101			
5754	5752	UUGGUCUUAUUUAACUAUAdTdT	<u>205</u>	UAUAUGUAAAUAAAGACCAAdTdT	<u>206</u>	AL-DP-2102			
5755	5753	UGGUCUUAUUUAACUAUUAAdTdT	<u>207</u>	UUUAUUGUAAAUAAAGACCAdTdT	<u>208</u>	AL-DP-2103			
5756	5754	GGUCUUAUUUAACUAUUAAdTdT	<u>209</u>	UUUAUUGUAAAUAAAGACCdTdT	<u>210</u>	AL-DP-2141			
5919	5917	AUAUCUUGCUAAGAUUAAdTdT	<u>211</u>	AUCAUCUUGAGCAUGAUAdTdT	<u>212</u>	AL-DP-2142			
5920	5918	UAUCAUGCUAAGAUUAAdTdT	<u>213</u>	UAUCAUCUUGAGCAUGAUAdTdT	<u>214</u>	AL-DP-2104			
5934	5932	UGAUAUUGAUUUUCAAUUAAdTdT	<u>215</u>	UAUUUUGAAAUCAAUUCAdTdT	<u>216</u>	AL-DP-2105			
6016	6014	UACUUAGUCCUUAACAUAAdTdT	<u>217</u>	CUUUUGUAAAGGCAUAAGUAdTdT	<u>218</u>	AL-DP-2106			
6019	6017	UUAGUCCUUAACAUAAGGUCdTdT	<u>219</u>	GACCUAUGUUAAGGACUAAdTdT	<u>220</u>	AL-DP-2107			
6020	6018	UAGUCCUUAACAUAAGGUCCdTdT	<u>221</u>	GGACCUAUGUUAAGGACUAAdTdT	<u>223</u>	AL-DP-2108			
6252	6250	AUAUUCUAUAGCUGGACGUdTdT	<u>223</u>	ACGUCCAGCUAUAAGAAUAdTdT	<u>224</u>	AL-DP-2109			
6253	6251	UAUUCUAUAGCUGGACGUAdTdT	<u>225</u>	UACGUCCAGCUAUAAGAAUAdTdT	<u>226</u>	AL-DP-2110			
6254	6252	AUUCUAUAGCUGGACGUAAAdTdT	<u>227</u>	UUACGUCCAGCUAUAAGAAUAdTdT	<u>228</u>	AL-DP-2111			

Tabla 1b. Gen P de RSV

Inicio Real	Posición de inicio	Sentido	Antisentido	SEQ ID NO:	SEQ ID NO:	AL-DP #	% Inhibición (5 nM)	% Inhibición RSV A2 500 pM	% Inhibición RSV A2 50 pM	% Inhibición RSV A2 5 pM	% Inhibición RSV B (5 nM)
55	53	AAUUCUAGAAUCAUAAdTdT	UUUUGAUUCUAGGAAUUUdTdT	<u>229</u>	<u>230</u>	AL-DP-2000	3				
56	54	AAUUCUAGAAUCAUAAdTdT	UUUUGAUUCUAGGAAUUUdTdT	<u>231</u>	<u>232</u>	AL-DP-2001	4				
58	56	UUCUAGAAUCAUAAGGdTdT	CCUUUUAUUGAUUCUAGGAdTdT	<u>233</u>	<u>234</u>	AL-DP-2002	7				
59	57	UCCUAGAAUCAUAAGGdTdT	CCUUUUAUUGAUUCUAGGAdTdT	<u>235</u>	<u>236</u>	AL-DP-2003	98	93	92	84	97
61	59	CUAGAAUCAUAAGGCAdTdT	UGCCUUUUAUUGAUUCUAGdTdT	<u>237</u>	<u>238</u>	AL-DP-2004	3				
322	320	ACAUUGAUAAACAUGAGdTdT	CUUCAUUGUUUAUCAAAUGdTdT	<u>239</u>	<u>240</u>	AL-DP-2005	7				
323	321	CAUUUGAUAAACAUGAGdTdT	UCUUCAUUGUUUAUCAAAUGdTdT	<u>241</u>	<u>242</u>	AL-DP-2006	5				
324	322	AUUUGAUAAACAUGAGdTdT	UUCUUCAUUGUUUAUCAAAUGdTdT	<u>243</u>	<u>244</u>	AL-DP-2007	4				
325	323	UUUGAUAAACAUGAGdTdT	CUUCUUCAUUGUUUAUCAAAUGdTdT	<u>245</u>	<u>246</u>	AL-DP-2008	7				
426	424	AAGUAAAACUAGGAAUGdTdT	CAUUCCUAGUUUUCACUUdTdT	<u>247</u>	<u>248</u>	AL-DP-2009	2				
427	425	AGUAAAACUAGGAAUGdTdT	GCAUCCUAGUUUUCACUUdTdT	<u>249</u>	<u>250</u>	AL-DP-2010	7				
428	426	GUGAAAACUAGGAAUGdTdT	AGCAUCCUAGUUUUCACdTdT	<u>251</u>	<u>252</u>	AL-DP-2011	4				
429	427	UGAAAACUAGGAAUGdTdT	AAGCAUCCUAGUUUUCAdTdT	<u>253</u>	<u>254</u>	AL-DP-2012	96	77	68	66	92
430	428	GAAUACUAGGAAUGCUdTdT	GAAUACUCCUAGUUUUCdTdT	<u>255</u>	<u>256</u>	AL-DP-2013	98	85	76	75	89
431	429	AAUACUAGGAAUGCUdTdT	UGAAGCAUCCUAGUUUUCdTdT	<u>257</u>	<u>258</u>	AL-DP-2014	98	85	81	68	66
550	548	GAAGCAUUAUGACCAUUGdTdT	CAUUGGCAUUAUAGCUUCdTdT	<u>259</u>	<u>260</u>	AL-DP-2015	7				
551	549	AAGCAUUAUGACCAUUGdTdT	UCAUUGGCAUUAUAGCUUCdTdT	<u>261</u>	<u>262</u>	AL-DP-2016	98	88	82	75	94
		CGAUAAUUAACAGCAAGdTsdT	UCUUGCGUUUAUUAUUCGdTsdT	<u>263</u>	<u>264</u>	AL-DP-1729	90				
		CGAUUAUUAACAGGAUGdTsdT	UCAUCCUGUAUUAUUAUCGdTsdT	<u>265</u>	<u>266</u>	AL-DP-1730					

Tabla 1c. Gen N de RSV

Inicio Real	Sentido	SEQ ID NO	Antisentido	SEQ ID NO	AL-DP #	% Inhibición (5 nM)	% Inhibición RSV A2 500 pM	% Inhibición RSV A2 50 pM	% Inhibición RSV A2 5 pM	% Inhibición RSV B (5 nM)
3	GGCUCUUAAGCAAAAGUCAAGdTdT	267	CUUGACUUUGCUAAGAGCCdTdT	268	AL-DP-2017	98	86	84	80	93
5	CUCUUAAGCAAAAGUCAAGUUdTdT	269	AACUUGACUUUUGCUAAGAGdTdT	270	AL-DP-2018	2				
52	CUGUCAUCCAGCAAAUACAdTdT	271	UGUAUUUGCUGGAGUACAGdTdT	272	AL-DP-2019	5				
53	UGUCAUCCAGCAAAUACAdTdT	273	GUGUAUUUGCUGGAGUACAGdTdT	274	AL-DP-2020	2				
191	UAAUAGGUUUGUUUAUUGCdTdT	275	GCAUAUAACAUAACCUAUUAdTdT	276	AL-DP-2021	3				
379	AUUGAGAUAGAAUCUAGAAdTdT	277	UUCUAGAUUCUAUCUCAAUdTdT	278	AL-DP-2022	98	78	77	75	94
897	AUUCUACCAUUAUUGAAACdTdT	279	GUUCAUAUAUUGGUAGAAUdTdT	280	AL-DP-2023	1				
898	UUCUACCAUUAUUGAAACdTdT	281	UGUUCAAUAUAUUGGUAGAAdTdT	282	AL-DP-2024	7				
899	UCUACCAUUAUUGAAACAAdTdT	283	UUGUUCAAUAUAUUGGUAGAdTdT	284	AL-DP-2025	96	89	84	77	96

Las descripciones son adicionalmente los puntos siguientes:

- 5 1. Un método de reducción de los niveles de una proteína viral, mRNA viral o título de virus en una célula en un individuo que comprende el paso de administrar un agente de iRNA a dicho individuo, en el cual el agente de iRNA comprende una cadena sentido que tiene al menos 15 nucleótidos contiguos o más complementarios al gen de un primer virus respiratorio de mamífero y una cadena antisentido que tiene al menos 15 nucleótidos contiguos o más complementarios a dicha cadena sentido, en el cual dicho gen se selecciona del grupo constituido por el gen P, N, o L de RSV.
- 10 2. El método del punto 1 en el cual dicho agente comprende 15 nucleótidos o más seleccionados de uno de los agentes de la Tabla 1 (a-c).
3. El método del punto 1, en el cual el agente iRNA citado se administra por vía intranasal a un individuo.
4. El método del punto 1, en el cual el agente iRNA citado se administra por inhalación o nebulización a un individuo.
5. El método del punto 1, en el cual el agente iRNA citado reduce el título de virus en dicho individuo.
- 15 6. El método del punto 1 que comprende adicionalmente co-administrar un segundo agente de iRNA a dicho individuo, en el cual dicho segundo agente de iRNA comprende una cadena sentido que tiene al menos 15 nucleótidos contiguos o más complementarios a un segundo gen de dicho virus respiratorio y una cadena antisentido que tiene al menos 15 nucleótidos contiguos o más complementarios a dicha cadena sentido.
7. El método del punto 6 en el cual dicho agente comprende 15 nucleótidos o más seleccionados de uno de los agentes de la Tabla 1 (a-c).
- 20 8. El método del punto 6, en el cual se ha diagnosticado que el individuo sufre una infección viral con dicho primer y dicho segundo virus respiratorio de mamífero.
- 25 9. Un método de reducción de los niveles de una proteína viral de un primer y un segundo gen de un virus respiratorio en una célula en un individuo, que comprende el paso de co-administrar un primer y un segundo agente de iRNA a dicho individuo, en el cual dicho primer agente de iRNA comprende una cadena sentido que tiene al menos 15 nucleótidos contiguos o más complementarios a un primer gen de un virus respiratorio de mamífero y una cadena antisentido que tiene al menos 15 nucleótidos contiguos o más complementarios a dicha cadena sentido, y dicho segundo agente de iRNA comprende una cadena sentido que tiene al menos 15 nucleótidos contiguos o más complementarios a un segundo gen de dicho virus respiratorio de mamífero y una cadena antisentido que tiene al menos 15 nucleótidos contiguos o más complementarios a dicha cadena sentido.
- 30 10. El método del punto 9 en el cual dicho agente comprende 15 nucleótidos o más seleccionados de uno de los agentes de la Tabla 1 (a-c).

# ES 2 385 811 T3

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC.

<120> MODULACIÓN DE RNAI DE RSV Y USOS TERAPÉUTICOS DEL MISMO

<130> R1835 EP/1

<150> US 60/642,364

<151> 2005-01-07

<150> US 60/659,828

<151> 2005-03-09

<160> 284

<170> PatentIn ver. 3.3

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 1

ggaucccauu auuauggat t

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 2

uccauuaawā augggaucct t

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 3

gaucccauuu uuauggaat t

21

<210> 4  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético ;  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <400> 4  
**uuccauuuuu aaugggauct t** 21

<210> 5  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <400> 5  
**aguuuuuuuu aagguguuat t** 21

<210> 6  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <400> 6  
**uaacacuuuu uaaauaacut t** 21

<210> 7  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <400> 7  
**guuuuuuuuuu agguguuat t** 21

<210> 8  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <400> 8  
 auaacaccuu uuaaauaact t 21

<210> 9  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <400> 9  
 auuuuaaagg uguuauucuct t 21

<210> 10  
 <211> 21  
 <212> Secuencia Artificial  
 <213>  
 <220> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético  
 <223>  
 <220> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <223>  
 <400> 10  
 gagauaacac cuuuuaaaut t 21

<210> 11  
 <211> 21  
 <212> Secuencia Artificial  
 <213>  
 <220> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético  
 <223>  
 <220> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
 <223>  
 <400> 11  
 uuaaaaggug uuaucucuut t 21

<210> 12  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 12  
**aagagauaac accuuuuuat t** 21  
  
 <210> 13  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 13  
**aaguaccacua cuagagcaut t** 21  
  
 <210> 14  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 14  
**augcucuagu aguggacuut t** 21  
  
 <210> 15  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético  
  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético  
  
 <400> 15

**aguccacuac uagagcauat t** **21**

<210> 16  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 16** **21**  
**uaugcucuag uaguggacut t**

<210> 17  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 17** **21**  
**guccacuacu agagcauat t**

<210> 18  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 18** **21**  
**auaugcucua guaguggact t**

<210> 19  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 19**

**uccacuacua gagcauau t** **21**

<210> 20  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 20**  
**cauauccu uagcucu t** **21**

<210> 21  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 21**  
**gaagagcuau agaaauaagt t** **21**

<210> 22  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 22**  
**cuuuuuucua uagcucuuct t** **21**

<210> 23  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 23**

**gagcuauaga aauaagugat t** **21**

<210> 24  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 24**  
**ucacuuauuu cuauagcuct t** **21**

<210> 25  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 25**  
**cuauagaaau aagugaugut t** **21**

<210> 26  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 26**  
**acaucacuaa uuucuaugt t** **21**

<210> 27  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 27**

**ucaaaacaac acucuugaat t** **21**

<210> 28  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 28**  
**uucaagagug uuguuuugat t** **21**

<210> 29  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 29**  
**uagagggauu uauuauguct t** **21**

<210> 30  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 30**  
**gacauaauaa aucccucuat t** **21**

<210> 31  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 31**

**auaaaagggg uuguaaaauat t** **21**

<210> 32  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 32**  
**uaauuacaaa cccuuuuaut t** **21**

<210> 33  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 33**  
**cucaguguag guagaaugut t** **21**

<210> 34  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 34**  
**acaauacuacc uacacugagt t** **21**

<210> 35  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 35**

<b>ucaguguagg uagauguut t</b>	<b>21</b>
<b>&lt;210&gt; 36</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 36</b>	
<b>aacauucua cuacacugat t</b>	<b>21</b>
<b>&lt;210&gt; 37</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 37</b>	
<b>caguguaggu agauguuut t</b>	<b>21</b>
<b>&lt;210&gt; 38</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 38</b>	
<b>aaacauucua ccuacacugt t</b>	<b>21</b>
<b>&lt;210&gt; 39</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 39</b>	

<b>aguguaggua gaauguuugt t</b>	<b>21</b>
<b>&lt;210&gt; 40</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 40</b> <b>caaacaauucu accuacacut t</b>	<b>21</b>
<b>&lt;210&gt; 41</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 41</b> <b>guguagguag aauguuugct t</b>	<b>21</b>
<b>&lt;210&gt; 42</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 42</b> <b>gcaaacaauuc uaccuacact t</b>	<b>21</b>
<b>&lt;210&gt; 43</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 43</b>	

<b>acaagauaug gugaucuagt t</b>	<b>21</b>
<p>&lt;210&gt; 44          &lt;211&gt; 21          &lt;212&gt; DNA          &lt;213&gt; Secuencia Artificial</p>	
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</p>	
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</p>	
<b>&lt;400&gt; 44 cuagaucacc auaucuugut t</b>	<b>21</b>
<p>&lt;210&gt; 45          &lt;211&gt; 21          &lt;212&gt; DNA          &lt;213&gt; Secuencia Artificial</p>	
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</p>	
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</p>	
<b>&lt;400&gt; 45 agcaaaauca aucaagcaut t</b>	<b>21</b>
<p>&lt;210&gt; 46          &lt;211&gt; 21          &lt;212&gt; DNA          &lt;213&gt; Secuencia Artificial</p>	
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</p>	
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</p>	
<b>&lt;400&gt; 46 augcuugauu gaauuugcut t</b>	<b>21</b>
<p>&lt;210&gt; 47          &lt;211&gt; 21          &lt;212&gt; DNA          &lt;213&gt; Secuencia Artificial</p>	
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</p>	
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</p>	
<p>&lt;400&gt; 47</p>	

**gcaaaaucaa ucaagcaaut t** **21**

**<210> 48**  
**<211> 21**  
**<212> DNA**  
**<213> Secuencia Artificial**

**<220>**  
**<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético**

**<220>**  
**<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético**

**<400> 48**  
**aaugcuugau ugaauuugct t** **21**

**<210> 49**  
**<211> 21**  
**<212> DNA**  
**<213> Secuencia Artificial**

**<220>**  
**<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético**

**<220>**  
**<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético**

**<400> 49**  
**gaugaacaaa guggauuaut t** **21**

**<210> 50**  
**<211> 21**  
**<212> DNA**  
**<213> Secuencia Artificial**

**<220>**  
**<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético**

**<220>**  
**<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético**

**<400> 50**  
**auaauccacu uuguucauct t** **21**

**<210> 51**  
**<211> 21**  
**<212> DNA**  
**<213> Secuencia Artificial**

**<220>**  
**<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético**

**<220>**  
**<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético**

**<400> 51**

<b>uaauaucucu caaaggaat t</b>	<b>21</b>
<210> 52	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético	
<220>	
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
<400> 52	
<b>uucccuuga gagauauat t</b>	<b>21</b>
<210> 53	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético	
<220>	
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
<400> 53	
<b>auaucucuca aagggaaat t</b>	<b>21</b>
<210> 54	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético	
<220>	
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
<400> 54	
<b>auuuccuuu gagagauat t</b>	<b>21</b>
<210> 55	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético	
<220>	
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
<400> 55	

**uauucucucaa agggaaauut t** **21**

**<210> 56**  
**<211> 21**  
**<212> DNA**  
**<213>** Secuencia Artificial

**<220>**  
**<223>** Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

**<220>**  
**<223>** Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 56** **21**  
**aauuucccuu ugagagauat t**

**<210> 57**  
**<211> 21**  
**<212> DNA**  
**<213>** Secuencia Artificial

**<220>**  
**<223>** Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

**<220>**  
**<223>** Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 57** **21**  
**caugcucaag cagauuauut t**

**<210> 58**  
**<211> 21**  
**<212> DNA**  
**<213>** Secuencia Artificial

**<220>**  
**<223>** Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

**<220>**  
**<223>** Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 58** **21**  
**aauaaucugc uugagcaugt t**

**<210> 59**  
**<211> 21**  
**<212> DNA**  
**<213>** Secuencia Artificial

**<220>**  
**<223>** Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

**<220>**  
**<223>** Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 59**

<b>ugcucaagca gauuauuugt t</b>	<b>21</b>
<p>&lt;210&gt; 60          &lt;211&gt; 21          &lt;212&gt; DNA          &lt;213&gt; Secuencia Artificial</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</p>	
<b>caaauaaucu gcuugagcat t</b>	<b>21</b>
<p>&lt;210&gt; 61          &lt;211&gt; 21          &lt;212&gt; DNA          &lt;213&gt; Secuencia Artificial</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</p>	
<b>uagcauuaaa uagccuuaat t</b>	<b>21</b>
<p>&lt;210&gt; 62          &lt;211&gt; 21          &lt;212&gt; DNA          &lt;213&gt; Secuencia Artificial</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</p>	
<b>uuaggcuau uuaaugcuat t</b>	<b>21</b>
<p>&lt;210&gt; 63          &lt;211&gt; 21          &lt;212&gt; DNA          &lt;213&gt; Secuencia Artificial</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</p>	
<b>&lt;400&gt; 63</b>	

**agcauuuuuu agccuuuuat t** **21**

<210> 64  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 64**  
**uuuuaggcua uuuuauugcut t** **21**

<210> 65  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 65**  
**gcauuuuuuu gccuuuuuut t** **21**

<210> 66  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 66**  
**uuuuaggcu uuuuauugct t** **21**

<210> 67  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 67**

**cauuuuuag ccuuuuuuut t** **21**

<210> 68  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 68**  
**aauuuuaggc uuuuuuauug t** **21**

<210> 69  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 69**  
**uuuuuagcag uuuuuuuuut t** **21**

<210> 70  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 70**  
**aauuuuuuuac ugcauuuuat t** **21**

<210> 71  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 71**



**aaagugcaca acauuauact t** **21**

<210> 76  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 76**  
**guauaauguu gugcacuuut t** **21**

<210> 77  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 77**  
**auauagaacc uacauaucct t** **21**

<210> 78  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 78**  
**ggauauguag guucuaauat t** **21**

<210> 79  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 79**

**uauagaaccu acauauccut t** **21**

**<210> 80**  
**<211> 21**  
**<212> DNA**  
**<213> Artificial Sequence**

**<220>** Secuencia Artificial

**<223>** Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

**<220>** Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> uu**  
**aggauaugua gguucuauat t** **21**

**<210> 81**  
**<211> 21**  
**<212> DNA**  
**<213> Artificial Sequence**

**<220>** Secuencia Artificial

**<223>** Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

**<220>** Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> oi**  
**uaagaguugu uuaugaaagt t** **21**

**<210> 82**  
**<211> 21**  
**<212> DNA**  
**<213> Artificial Sequence**

**<220>** Secuencia Artificial

**<223>** Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

**<220>** Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 82**  
**cuuucauaaaa caacucuuat t** **21**

**<210> 83**  
**<211> 21**  
**<212> DNA**  
**<213>** Secuencia Artificial

**<220>** Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

**<220>** Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 83**

**acagucagua guagaccat t** **21**

<210> 84  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 84**  
**augguacu acugacug t** **21**

<210> 85  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 85**  
**cagucaguag uagaccaug t** **21**

<210> 86  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 86**  
**caugguac uacugacug t** **21**

<210> 87  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 87**

<b>agucaguagu agaccaugut t</b>	<b>21</b>
<b>&lt;210&gt; 88</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 88</b>	
<b>acauggucua cuacugacut t</b>	<b>21</b>
<b>&lt;210&gt; 89</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 89</b>	
<b>gucaguagua gaccaugut t</b>	<b>21</b>
<b>&lt;210&gt; 90</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 90</b>	
<b>cacauggucu acuacugact t</b>	<b>21</b>
<b>&lt;210&gt; 91</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 91</b>	

ucaguaguag accaugugat t 21

<210> 92  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220> Secuencia Artificial  
 <223>

<220> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido  
 <223> sintético

<400> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido  
 ucaca| sintético

21

<210> 93  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220> Secuencia Artificial  
 <223>

<220> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido  
 <223> sintético

<400> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido  
 caugu| sintético

21

<210> 94  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220> Secuencia Artificial  
 <223>

<220> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido  
 <223> sintético

<400> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido  
 gaugc| sintético

21

<210> 95  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220> Secuencia Artificial  
 <223> |

<220> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido  
 <223> sintético |

<400> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido  
 | sintético

<b>augugaauuc ccugcaucat t</b>	<b>21</b>
<210> 96	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético	
<220>	
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
<b>&lt;400&gt; 96</b>	<b>21</b>
<b>ugaugcaggg aaucacaut t</b>	
<210> 97	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético	
<220>	
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
<b>&lt;400&gt; 97</b>	<b>21</b>
<b>ugugaauucc cugcaucaat t</b>	
<210> 98	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético	
<220>	
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
<b>&lt;400&gt; 98</b>	<b>21</b>
<b>uugaugcagg gaauccacat t</b>	
<210> 99	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético	
<220>	
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
<b>&lt;400&gt; 99</b>	

**gugaauuccc ugcaucaaut t** **21**

<210> 100  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220> Secuencia Artificial

<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 100**  
**auugaugcag ggaauucact t** **21**

<210> 101  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 Secuencia Artificial

<220> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 101**  
**aaaucccugc aucaauacct t** **21**

<210> 102  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 Secuencia Artificial

<220> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 102**  
**ggauaugaug caggaauut t** **21**

<210> 103  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 Secuencia Artificial

<220> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 103**

**gcaucaauac cagcuuauat t** **21**

**<210> 104**  
**<211> 21**  
**<212> DNA**  
**<213> Secuencia Artificial**

**<220>**  
**<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético**

**<220>**  
**<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético**

**<400> 104** **21**  
**uaauagcugg uauugaugct t**

**<210> 105**  
**<211> 21**  
**<212> DNA**  
**<213> Secuencia Artificial**

**<220>**  
**<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético**

**<220>**  
**<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético**

**<400> 105** **21**  
**caucaauacc agcuuauagt t**

**<210> 106**  
**<211> 21**  
**<212> DNA**  
**<213> Secuencia Artificial**

**<220>**  
**<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético**

**<220>**  
**<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético**

**<400> 106** **21**  
**cuauagcug guauugaugt t**

**<210> 107**  
**<211> 21**  
**<212> DNA**  
**<213> Secuencia Artificial**

**<220>**  
**<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético**

**<220>**  
**<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético**

**<400> 107**

**auaccagcuu auagaacaat t** **21**

**<210> 108**

**<211> 21**

**<212> DNA**

**<213> Secuencia Artificial**

**<220>**

**<223>** Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

**<220>**

**<223>** Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 108**

**uuguucuaua agcugguaut t** **21**

**<210> 109**

**<211> 21**

**<212> DNA**

**<213> Secuencia Artificial**

**<220>**

**<223>** Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

**<220>**

**<223>** Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 109**

**uaccagcuua uagaacaact t** **21**

**<210> 110**

**<211> 21**

**<212> DNA**

**<213> Secuencia Artificial**

**<220>**

**<223>** Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

**<220>**

**<223>** Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 110**

**guuguucuau aagcugguat t** **21**

**<210> 111**

**<211> 21**

**<212> DNA**

**<213> Secuencia Artificial**

**<220>**

**<223>** Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

**<220>**

**<223>** Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 111**

**accagcuuau agaacaacat t** **21**

<210> 112  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 112**  
**uguuguucua uaagcuggut t** **21**

<210> 113  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 113**  
**ccagcuuaua gaacaacaat t** **21**

<210> 114  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 114**  
**uuguuguucu auaagcuggt t** **21**

<210> 115  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 115**

**cagcuuauag aacaacaaat t** **21**

<210> **116**  
 <211> **21**  
 <212> **DNA**  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 116**  
**uuuguuguuc uauaagcugt t** **21**

<210> **117**  
 <211> **21**  
 <212> **DNA**  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 117**  
**auagaacaac aaauuaucaat t** **21**

<210> **118**  
 <211> **21**  
 <212> **DNA**  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 118**  
**ugauaauuug uuguucauat t** **21**

<210> **119**  
 <211> **21**  
 <212> **DNA**  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 119**

**uauuaacaga aaaguauggt t** **21**

<210> 120  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 120  
**ccaauacuuuu cuguuaauat t** **21**

<210> 121  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 121  
**ugagauacau uugaugaaat t** **21**

<210> 122  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 122  
**uuucaucaaa uguaucucat t** **21**

<210> 123  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 123

**gagauacauu ugaugaaact t** **21**

<210> 124

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 124

**guuucaucaaa auguauuct t** **21**

<210> 125

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 125

**gauacauuug augaaacct t** **21**

<210> 126

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 126

**agguuucauc aaauuauuct t** **21**

<210> 127

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 127

**auacauuuga ugaaccuct t** **21**

<210> 128

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 128

**gagguuucau caaaguaut t**

**21**

<210> 129

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 129

**uacauuugau gaaaccucct t**

**21**

<210> 130

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 130

**ggagguuuca ucaaauguat t**

**21**

<210> 131

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 131

**aagugauaca aaaacagcat t** **21**

<210> 132  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 132 **ugcuguuuuu guaucacut t** **21**

<210> 133  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 133 **agugauaca aaacagcaut t** **21**

<210> 134  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 134 **augcuguuuu uguaucacut t** **21**

<210> 135  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 135

<b>ugauacaaaa acagcauaut t</b>	<b>21</b>
<b>&lt;210&gt; 136</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 136</b>	
<b>auaugcuguu uuuguaucaat t</b>	<b>21</b>
<b>&lt;210&gt; 137</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 137</b>	
<b>uuuaaguacu aaauuagcut t</b>	<b>21</b>
<b>&lt;210&gt; 138</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 138</b>	
<b>agcuaaaaua guacuuaaat t</b>	<b>21</b>
<b>&lt;210&gt; 139</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 139</b>	

**uuaaguacua auuuagcugt t** **21**

**<210> 140**  
**<211> 21**  
**<212> DNA**  
**<213>** Secuencia Artificial

**<220:**  
**<223:** Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

**<220:**  
**<223:** Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 140** **21**  
**cagcuaaaau aguacuuat t**

**<210> 141**  
**<211> 21**  
**<212> DNA**  
**<213>** Secuencia Artificial

**<220:**  
**<223:** Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

**<220:**  
**<223:** Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 141** **21**  
**uaaguacuaa uuuagcugt t**

**<210> 142**  
**<211> 21**  
**<212> DNA**  
**<213>** Secuencia Artificial

**<220:**  
**<223:** Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

**<220:**  
**<223:** Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 142** **21**  
**ccagcuaaaau uaguacuuat t**

**<210> 143**  
**<211> 21**  
**<212> DNA**  
**<213>** Secuencia Artificial

**<220:**  
**<223:** Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

**<220:**  
**<223:** Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 143**

**aaguacuaau uuagcuggat t** **21**

<210> 144

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 144

**uccagcuaaa uuaguacuut t**

**21**

<210> 145

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 145

**aguacuaauu uagcuggact t**

**21**

<210> 146

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 146

**guccagcuaa auuaguacut t**

**21**

<210> 147

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 147

**guacuaauuu agcuggacat t** **21**

<210> 148  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 148**  
**uguccagcua aauuaguact t** **21**

<210> 149  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 149**  
**acuaauuuag cuggacauut t** **21**

<210> 150  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 150**  
**aauguccagc uaaaauagut t** **21**

<210> 151  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 151**

**aaUUUagCUG gacauGGat t** **21**

<210> 152  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 152 **ucCaauGUcc agCuaaaUut t** **21**

<210> 153  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 153 **auUUagCUGg aCaUUGgaut t** **21**

<210> 154  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 154 **auCCaaUGuc cagCuaaaUt t** **21**

<210> 155  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 155

**uuagcuggac auuggauuct t** **21**

<210> 156  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 156**  
**gaauccaaug uccagcuaat t** **21**

<210> 157  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 157**  
**uuuugaaaaa gauuggggat t** **21**

<210> 158  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 158**  
**uccccaaucu uuuucaaatt t** **21**

<210> 159  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 159**

**uuugaaaaag auuggggagt t** **21**

**<210> 160**  
**<211> 21**  
**<212> DNA**  
**<213>** Secuencia Artificial

**<220>**  
**<223>** Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

**<220>**  
**<223>** Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 160** **21**  
**cuccccaauuc uuuuucaaat t**

**<210> 161**  
**<211> 21**  
**<212> DNA**  
**<213>** Secuencia Artificial

**<220>**  
**<223>** Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

**<220>**  
**<223>** Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 161** **21**  
**ugaaaaagau uggggagagt t**

**<210> 162**  
**<211> 21**  
**<212> DNA**  
**<213>** Secuencia Artificial

**<220>**  
**<223>** Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

**<220>**  
**<223>** Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 162** **21**  
**cucucccaa uuuuuucat t**

**<210> 163**  
**<211> 21**  
**<212> DNA**  
**<213>** Secuencia Artificial

**<220>**  
**<223>** Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

**<220>**  
**<223>** Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 163**

**gaaaaagauu ggggagagg t** **21**

<210> **164**  
 <211> **21**  
 <212> **DNA**  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 164**  
**ccucucccca aucuuuuuct t** **21**

<210> **165**  
 <211> **21**  
 <212> **DNA**  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 165**  
**uaugaacacu ucagaucuut t** **21**

<210> **166**  
 <211> **21**  
 <212> **DNA**  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 166**  
**aagaucugaa guguuauat t** **21**

<210> **167**  
 <211> **21**  
 <212> **DNA**  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 167**

**augaacacuu cagaucuuct t** **21**

<210> 168  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 168**  
**gaagaucuga aguguucaut t** **21**

<210> 169  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 169**  
**ugcccuuggg uuguuaacat t** **21**

<210> 170  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 170**  
**uguuaacaac ccaagggcat t** **21**

<210> 171  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 171**

<b>gcccuugggu uguuaacaut t</b>	<b>21</b>
<b>&lt;210&gt; 172</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 172</b>	<b>21</b>
<b>auguaaaca cccaagggt t</b>	
<b>&lt;210&gt; 173</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 173</b>	<b>21</b>
<b>uauagcauuc auaggugaat t</b>	
<b>&lt;210&gt; 174</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 174</b>	<b>21</b>
<b>uucaccuaug aaugcuauat t</b>	
<b>&lt;210&gt; 175</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 175</b>	

<b>auagcauuc uaggugaagt t</b>	<b>21</b>
<210> 176	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético	
<220>	
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
<400> 176	
<b>cuucaccuau gaaugcuaut t</b>	<b>21</b>
<210> 177	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético	
<220>	
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
<400> 177	
<b>uagcauuc uaggugaagt t</b>	<b>21</b>
<210> 178	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético	
<220>	
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
<400> 178	
<b>ccuucaccua ugaaugcuat t</b>	<b>21</b>
<210> 179	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético	
<220>	
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
<400> 179	

<b>auucauaggu gaaggagcat t</b>	<b>21</b>
<b>&lt;210&gt; 180</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 180</b>	<b>21</b>
<b>ugcuccuua ccuaugaaut t</b>	
<b>&lt;210&gt; 181</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 181</b>	<b>21</b>
<b>uugcaaugau cauaguuat t</b>	
<b>&lt;210&gt; 182</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 182</b>	<b>21</b>
<b>uaaacuauga ucauugcaat t</b>	
<b>&lt;210&gt; 183</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 183</b>	

<b>ugcaaugauc auaguuuact t</b>	<b>21</b>
<b>&lt;210&gt; 184</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 184</b>	<b>21</b>
<b>guaaacuaug aucauugcat t</b>	
<b>&lt;210&gt; 185</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 185</b>	<b>21</b>
<b>gcaaugauca uaguuuacct t</b>	
<b>&lt;210&gt; 186</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 186</b>	<b>21</b>
<b>gguaaacuaugaucauugct t</b>	
<b>&lt;210&gt; 187</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 187</b>	

**caaugaucau aguuuaccut t** **21**

**<210> 188**

**<211> 21**

**<212> DNA**

**<213> Secuencia Artificial**

**<220:**

**<223:** Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

**<220:**

**<223:** Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 188**

**agguaaacua ugaucuuugt t** **21**

**<210> 189**

**<211> 21**

**<212> DNA**

**<213> Secuencia Artificial**

**<220:**

**<223:** Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

**<220:**

**<223:** Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 189**

**aaugaucua guuuaccuat t** **21**

**<210> 190**

**<211> 21**

**<212> DNA**

**<213> Secuencia Artificial**

**<220:**

**<223:** Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

**<220:**

**<223:** Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 190**

**uagguaaacu augaucuut t** **21**

**<210> 191**

**<211> 21**

**<212> DNA**

**<213> Secuencia Artificial**

**<220:**

**<223:** Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

**<220:**

**<223:** Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 191**

<b>augaucauag uuuaccuaut t</b>	<b>21</b>
<b>&lt;210&gt; 192</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 192</b>	
<b>auagguaaac uaugaucaut t</b>	<b>21</b>
<b>&lt;210&gt; 193</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 193</b>	
<b>gaucauaguu uaccuauugt t</b>	<b>21</b>
<b>&lt;210&gt; 194</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 194</b>	
<b>caauagguaa acuaugauct t</b>	<b>21</b>
<b>&lt;210&gt; 195</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 195</b>	

<b>auc<u>au</u>guuu acc<u>ua</u>ugat t</b>	<b>21</b>
<b>&lt;210&gt; 196</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 196</b> <b>uca<u>au</u>aggua aac<u>ua</u>ugat t</b>	<b>21</b>
<b>&lt;210&gt; 197</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 197</b> <b>uca<u>u</u>guuuu cc<u>ua</u>uugagt t</b>	<b>21</b>
<b>&lt;210&gt; 198</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 198</b> <b>cuca<u>au</u>aggu aa<u>cu</u>augat t</b>	<b>21</b>
<b>&lt;210&gt; 199</b>	
<b>&lt;211&gt; 21</b>	
<b>&lt;212&gt; DNA</b>	
<b>&lt;213&gt; Secuencia Artificial</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;220&gt;</b>	
<b>&lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</b>	
<b>&lt;400&gt; 199</b>	

**cauaguuuac cuauugagut t** **21**

<210> 200  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 200**  
**acucaauagg uaaacuaugt t** **21**

<210> 201  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 201**  
**auaguuuacc uauugaguut t** **21**

<210> 202  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 202**  
**aacucaauag guaaacuaat t** **21**

<210> 203  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 203**

**cauggucuu auuuacauat t** **21**

<210> 204  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 204** **21**  
**uauguaaaau agaccaaugt t**

<210> 205  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 205** **21**  
**uuggucuuau uuacauuat t**

<210> 206  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 206** **21**  
**uauauguaaa uaagaccaat t**

<210> 207  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 207**

**uggucuuuuu uacauuaat t** **21**

<210> 208  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 208** **21**  
**uuuuuuuuuu auaagaccat t**

<210> 209  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 209** **21**  
**ggucuuuuuu acauuaaat t**

<210> 210  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 210** **21**  
**uuuuuuuuuu aaauagacct t**

<210> 211  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 211**

<b>auaucaugcu caaugaut t</b>	<b>21</b>
<p>&lt;210&gt; 212          &lt;211&gt; 21          &lt;212&gt; DNA          &lt;213&gt; Secuencia Artificial</p>	
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</p>	
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</p>	
<b>aucaucuuga gcaugauat t</b>	<b>21</b>
<p>&lt;210&gt; 213          &lt;211&gt; 21          &lt;212&gt; DNA          &lt;213&gt; Secuencia Artificial</p>	
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</p>	
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</p>	
<b>uaucaugcuc aaugauat t</b>	<b>21</b>
<p>&lt;210&gt; 214          &lt;211&gt; 21          &lt;212&gt; DNA          &lt;213&gt; Secuencia Artificial</p>	
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</p>	
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</p>	
<b>uaucaucuug agcaugauat t</b>	<b>21</b>
<p>&lt;210&gt; 215          &lt;211&gt; 21          &lt;212&gt; DNA          &lt;213&gt; Secuencia Artificial</p>	
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</p>	
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</p>	
<p>&lt;400&gt; 215</p>	

**ugauauugau uucaaaauat t** **21**

<210> 216  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 216** **21**  
**uaauuugaaa ucaauaucat t**

<210> 217  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 217** **21**  
**uacuuagucc uuacaaugt t**

<210> 218  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 218** **21**  
**cuauuguaag gacuaagat t**

<210> 219  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 219**

<b>uuaguccuua caauagguct t</b>	<b>21</b>
<210> 220	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético	
<220>	
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
<400> 220	
<b>gaccuauugu aaggacuaat t</b>	<b>21</b>
<210> 221	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético	
<220>	
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
<400> 221	
<b>uaguccuuac aauaggucct t</b>	<b>21</b>
<210> 222	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético	
<220>	
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
<400> 222	
<b>ggaccuauug uaaggacuat t</b>	<b>21</b>
<210> 223	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Secuencia Artificial	
<220>	
<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético	
<220>	
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético	
<400> 223	

**auauucuaua gcuggacgut t** **21**

<210> 224  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 224**  
**acguccagcu auagaauat t** **21**

<210> 225  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 225**  
**uauucuauag cuggacguat t** **21**

<210> 226  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 226**  
**uacguccagc uauagaauat t** **21**

<210> 227  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético  
 <220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 227**

**auucuauagc uggacgaaat t** 21

<210> 228  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 228**  
**uuacguccag cuauagaat t** 21

<210> 229  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 229**  
**aaauuccuag aaucaaaat t** 21

<210> 230  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 230**  
**uuauugauuc uaggaauut t** 21

<210> 231  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 231**

**aauccuaga aucauaaat t 21**

<210> 232

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 232

**uuuauugau cuaggauut t 21**

<210> 233

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 233

**uuccuagau cauaaaggt t 21**

<210> 234

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 234

**ccuuuuuga uucuaggaut t 21**

<210> 235

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 235

**uccuagaauc aauaaagggt t** **21**

<210> 236  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 236**  
**ccuuuuauug auucuaggat t** **21**

<210> 237  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 237**  
**cuagaaucaa uaaagggcat t** **21**

<210> 238  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 238**  
**ugcccuuuau ugauucuagt t** **21**

<210> 239  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 239**

<b>acauugaua acaugaagt t</b>	<b>21</b>
<p>&lt;210&gt; 240          &lt;211&gt; 21          &lt;212&gt; DNA          &lt;213&gt; Secuencia Artificial</p>	
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</p>	
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</p>	
<b>cuucauuguu aucaaaugut t</b>	<b>21</b>
<p>&lt;210&gt; 241          &lt;211&gt; 21          &lt;212&gt; DNA          &lt;213&gt; Secuencia Artificial</p>	
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</p>	
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</p>	
<b>cauuugauaa caaugaagat t</b>	<b>21</b>
<p>&lt;210&gt; 242          &lt;211&gt; 21          &lt;212&gt; DNA          &lt;213&gt; Secuencia Artificial</p>	
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</p>	
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</p>	
<b>ucuucauugu uaucaaaugt t</b>	<b>21</b>
<p>&lt;210&gt; 243          &lt;211&gt; 21          &lt;212&gt; DNA          &lt;213&gt; Secuencia Artificial</p>	
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</p>	
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</p>	
<p>&lt;400&gt; 243</p>	

**uuuguaaac aaugaagaat t** **21**

<210> 244  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 244**  
**uuuucauug uuaucaaat t** **21**

<210> 245  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 245**  
**uuuguaaca augaagaagt t** **21**

<210> 246  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 246**  
**cuuuucauu guuaucaat t** **21**

<210> 247  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 247**

**aagugaaaaua cuaggaaugt t** **21**

<210> 248  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 248**  
**cauuccuagu auuucacuut t** **21**

<210> 249  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 249**  
**agugaaaauac uaggaaugct t** **21**

<210> 250  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 250**  
**gcauuccuag uauuucacut t** **21**

<210> 251  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 251**

<b>gugaaauacu aggaaugcut t</b>	<b>21</b>
<p>&lt;210&gt; 252          &lt;211&gt; 21          &lt;212&gt; DNA          &lt;213&gt; Secuencia Artificial</p>	
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</p>	
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</p>	
<b>agcauuccua guauuucact t</b>	<b>21</b>
<p>&lt;210&gt; 253          &lt;211&gt; 21          &lt;212&gt; DNA          &lt;213&gt; Secuencia Artificial</p>	
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</p>	
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</p>	
<b>ugaaaauacua ggaaugcuut t</b>	<b>21</b>
<p>&lt;210&gt; 254          &lt;211&gt; 21          &lt;212&gt; DNA          &lt;213&gt; Secuencia Artificial</p>	
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</p>	
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</p>	
<b>aagcauuccu aguauuucat t</b>	<b>21</b>
<p>&lt;210&gt; 255          &lt;211&gt; 21          &lt;212&gt; DNA          &lt;213&gt; Secuencia Artificial</p>	
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético</p>	
<p>&lt;220&gt;          &lt;223&gt; Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético</p>	
<p>&lt;400&gt; 255</p>	

**gaaauacuag gaaugcuuct t** **21**

**<210> 256**  
**<211> 21**  
**<212> DNA**  
**<213>** Secuencia Artificial

**<220>**  
**<223>** Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

**<220>**  
**<223>** Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 256** **21**  
**gaagcauucc uaguauuuct t**

**<210> 257**  
**<211> 21**  
**<212> DNA**  
**<213>** Secuencia Artificial

**<220>**  
**<223>** Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

**<220>**  
**<223>** Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 257** **21**  
**aaauacuagg aaugcuucat t**

**<210> 258**  
**<211> 21**  
**<212> DNA**  
**<213>** Secuencia Artificial

**<220>**  
**<223>** Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

**<220>**  
**<223>** Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 258** **21**  
**ugaagcauuc cuaguauuut t**

**<210> 259**  
**<211> 21**  
**<212> DNA**  
**<213>** Secuencia Artificial

**<220>**  
**<223>** Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

**<220>**  
**<223>** Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 259**

**gaagcauuuaa ugaccaaugt t** **21**

<210> 260  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 260** **21**  
**cauuggucau uaaugcuuct t**

<210> 261  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 261** **21**  
**aagcauuuau gaccaaugat t**

<210> 262  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 262** **21**  
**ucauugguca uaaugcuuct t**

<210> 263  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 263**

**cgauaauaua acagcaagat t** **21**

<210> 264  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 264**  
**ucuugcuguu auauuauaucgt t** **21**

<210> 265  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 265**  
**cgauuauauu acaggaugat t** **21**

<210> 266  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 266**  
**ucauccugua auauaaucgt t** **21**

<210> 267  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 267

**ggcucuagc aaagucaagt t** **21**

<210> 268  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 268** **21**  
**cuugacuuug cuaagagcct t**

<210> 269  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 269** **21**  
**cucuagcaa agucaaguut t**

<210> 270  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 270** **21**  
**aacuugacuu ugcuaagagt t**

<210> 271  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 271**

**cugucaucca gcaaaauacat t** **21**

<210> 272  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 272 **uguauuugcu ggaugacagt t** **21**

<210> 273  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 273 **ugucauccag caaaucact t** **21**

<210> 274  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 274 **guguauuugc uggaugacat t** **21**

<210> 275  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 275

**uaauagguau guuauaugct t** 21

<210> 276

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 276

**gcauauaaca uaccuauuat t** 21

<210> 277

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 277

**auugagauag aaucuagaat t** 21

<210> 278

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 278

**uucuagauuc uaucucaaut t** 21

<210> 279

<211> 21

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 279

**auucuaccau auauugaact t** **21**

<210> 280  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 280** **21**  
**guucaauaua uggugaaut t**

<210> 281  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 281** **21**  
**uucuaccaua uauugaacat t**

<210> 282  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 282** **21**  
**uguucaauau augguagaat t**

<210> 283  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

<220>  
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 283** **21**  
**ucuaccauau auugaacaat t**

**<210> 284**

**<211> 21**

**<212> DNA**

**<213>** Secuencia Artificial

**<220>**

**<223>** Descripción de la secuencia híbrida DNA/RNA: Oligonucleótido sintético

**<220>**

**<223>** Descripción de la Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

**<400> 284**

**uuguucaaua uaugguagat t**

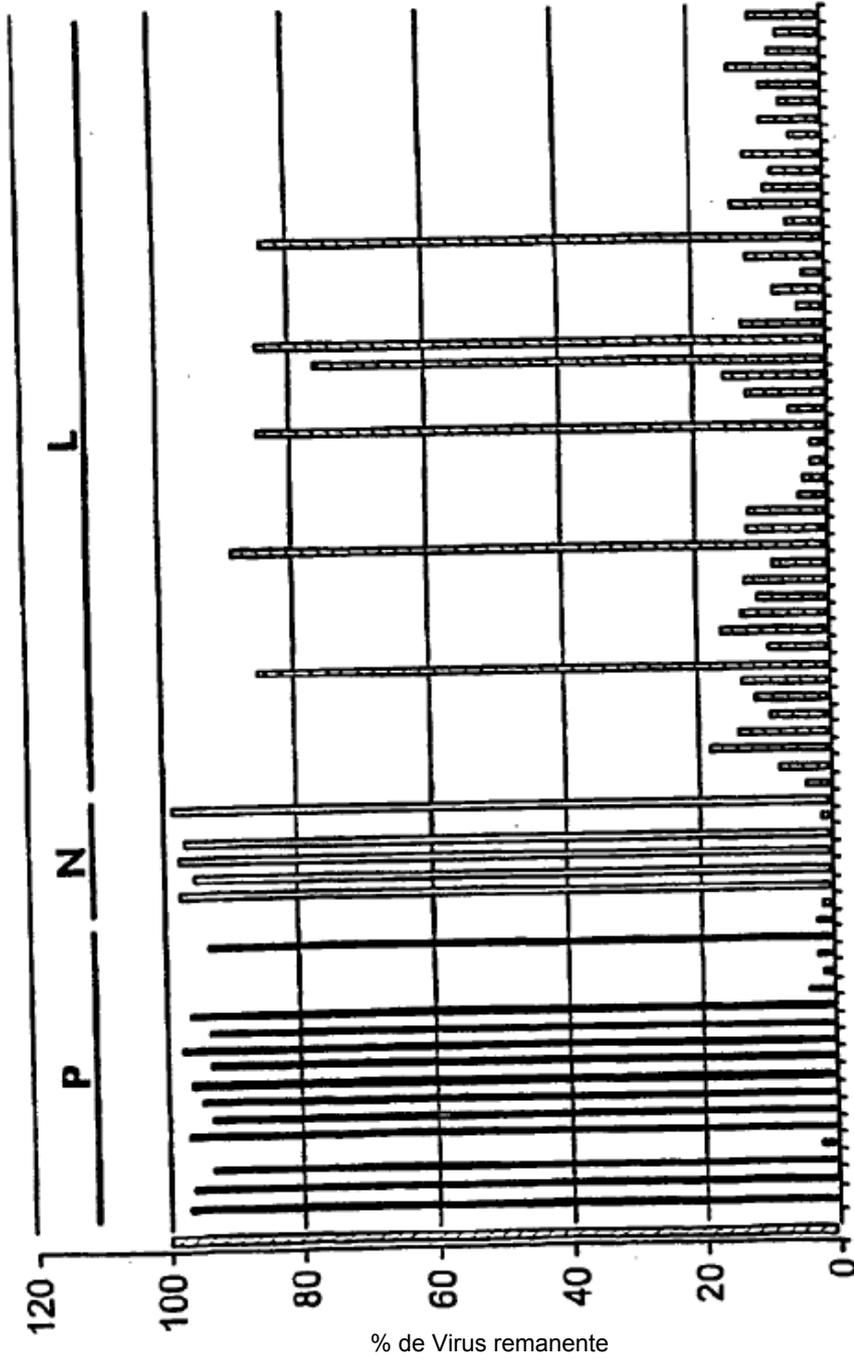
**21**

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Un agente de iRNA aislado que comprende una cadena sentido constituida por SEQ ID NO: 267 y una cadena antisentido constituida por SEQ ID NO: 268.
- 2.- El iRNA de la reivindicación 1, que comprende un fosforotioato o un nucleótido modificado en 2'.
- 5 3.- El iRNA de la reivindicación 2, en el cual el nucleótido modificado en 2' comprende una modificación seleccionada del grupo constituido por: nucleótidos modificados con 2'-desoxi, 2'-fluoro, 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo, 2'-amino y 2'-aminoalcoxi.
- 4.- El iRNA de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende adicionalmente un ligando.
- 10 5.- Una formulación farmacéutica que comprende un agente de iRNA, siendo el agente de iRNA citado como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y en el cual dicha formulación comprende un portador farmacéuticamente aceptable.
- 6.- La formulación de la reivindicación 5, que comprende adicionalmente un agente terapéutico además del agente de iRNA citado.
- 15 7.- La formulación de la reivindicación 6, en el cual dicho agente terapéutico es un segundo agente de iRNA anti-RSV.
- 8.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el cual
- (a) el agente de iRNA citado se encuentra en fase acuosa;
- (b) dicha formulación es al menos parcialmente cristalina, uniformemente cristalina, o anhidra; o
- (c) dicha formulación es un polvo.
- 20 9.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el cual dicha formulación comprende un agente estabilizador de iRNA seleccionado del grupo constituido por un formador de quelatos y un inhibidor de las RNAsas.
- 10.- La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 9, en el cual dicho portador farmacéuticamente aceptable se selecciona del grupo constituido por
- 25 (a) un polipéptido;
- (b) un aminoácido;
- (c) un carbohidrato seleccionado del grupo constituido por un monosacárido, disacárido, o polisacárido; y
- (d) PBS.
- 30 11.- La formulación de la reivindicación 5, en el cual dicha formulación es estéril, exenta de pirógenos, y comprende de uno a quince por ciento en peso de una sal fisiológicamente aceptable.
- 12.- La formulación de la reivindicación 5, en el cual dicha formulación es una partícula respirable
- (a) de aproximadamente 1 a 10 micrómetros de tamaño; o
- (b) de aproximadamente 10 a 500 micrómetros de tamaño.
- 35 13.- La formulación de la reivindicación 5, en el cual dicha formulación es para administración directa a los pulmones o al conducto nasal a una dosis comprendida entre 1 y 150 mg.
- 14.- Un agente de iRNA como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en el tratamiento o la prevención de la infección de RSV en un individuo mamífero.
- 40 15.- El agente de iRNA para uso en el tratamiento o la prevención de la infección de RSV de la reivindicación 14, en el cual el agente de iRNA citado debe administrarse
- (a) por vía intranasal a un individuo, o
- (b) por vía local a los pulmones de dicho individuo.
- 16.- El agente de iRNA para uso en el tratamiento o la prevención de la infección de RSV de la reivindicación 14 ó 15, en el cual el agente de iRNA citado debe administrarse por inhalación o nebulización a un individuo.
- 45 17.- El agente de iRNA para uso en el tratamiento o la prevención de una infección de RSV de una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, en el cual debe co-administrarse a dicho individuo un segundo agente de iRNA, y en el cual dicho segundo agente de iRNA comprende una cadena sentido que tiene al menos 15 nucleótidos contiguos o más complementarios a
- (a) un segundo gen de dicho virus respiratorio o
- (b) un segmento del gen N de RSV, siendo dicho segmento diferente del segmento constituido por la
- 50 secuencia de SEQ ID NO: 267;
- y una cadena antisentido que tiene al menos 15 nucleótidos contiguos o más complementarios a dicha cadena sentido.

- 18.- El agente de iRNA para uso en el tratamiento o la prevención de la infección de RSV de la reivindicación 17, en el cual dicho segundo agente comprende 15 nucleótidos o más seleccionados de uno de los agentes de la Tabla 1 (a-c).
- 5 19.- El agente de iRNA para uso en el tratamiento o la prevención de una infección de RSV de la reivindicación 17, en el cual se ha diagnosticado que el individuo sufre una infección viral con dicho virus respiratorio de mamífero.
- 20.- Un dispositivo que comprende un agente de iRNA como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o constituido por la formulación farmacéutica que se define en una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 13 para generar una suspensión de aerosol o de partículas respirables, en el cual el dispositivo es un nebulizador accionado a presión, un nebulizador ultrasónico, o un generador terapéutico de aerosoles sólido particulado.
- 10 21.- El dispositivo de la reivindicación 20, en el cual el generador terapéutico de aerosoles sólido particulado es un insuflador; o un inhalador de dosis medidas.

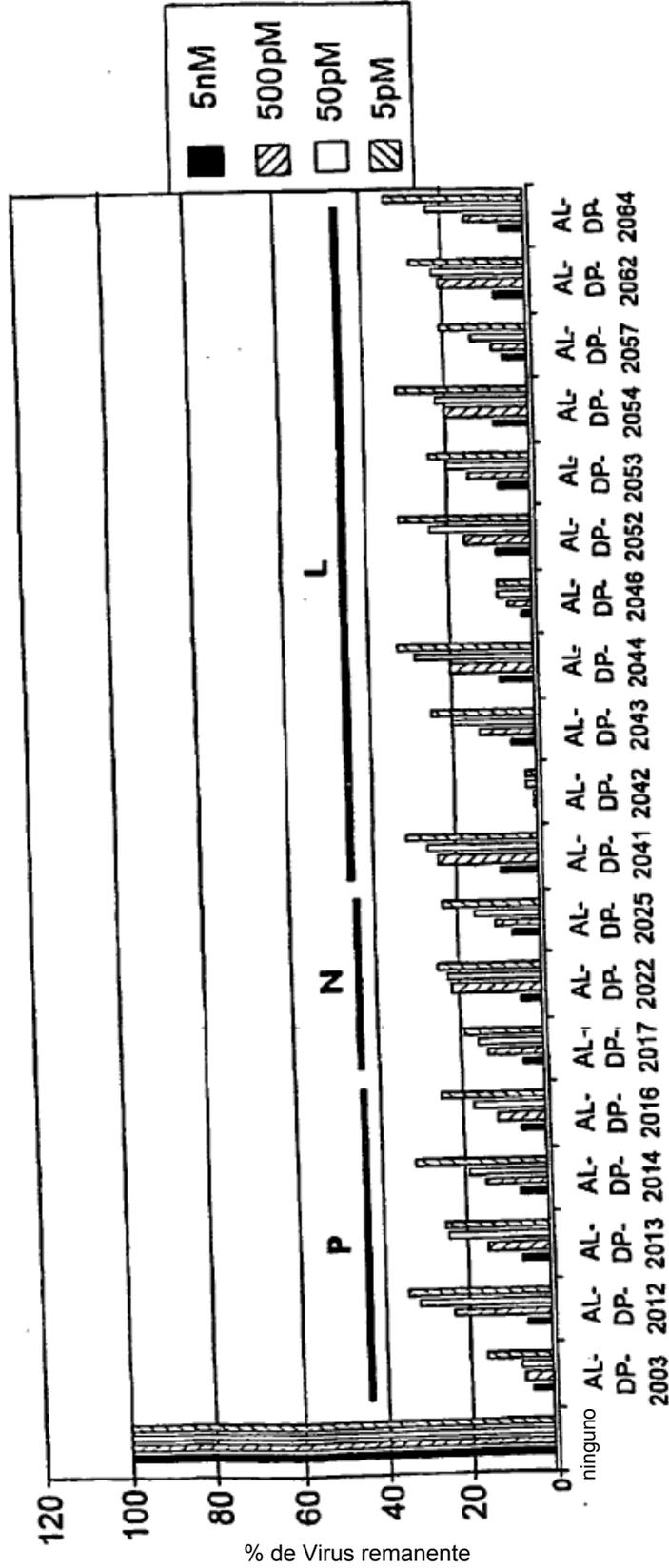
Silenciación in vitro de RSV por siRNAs



siRNAs (5nM)

FIG. 1

Los siRNAs direccionados a los genes de RSV exhiben actividad a dosis muy baja in vitro



siRNAs

FIG. 2



Profilaxis de repetición

Inhibición de RSV por siRNA 10-28-04

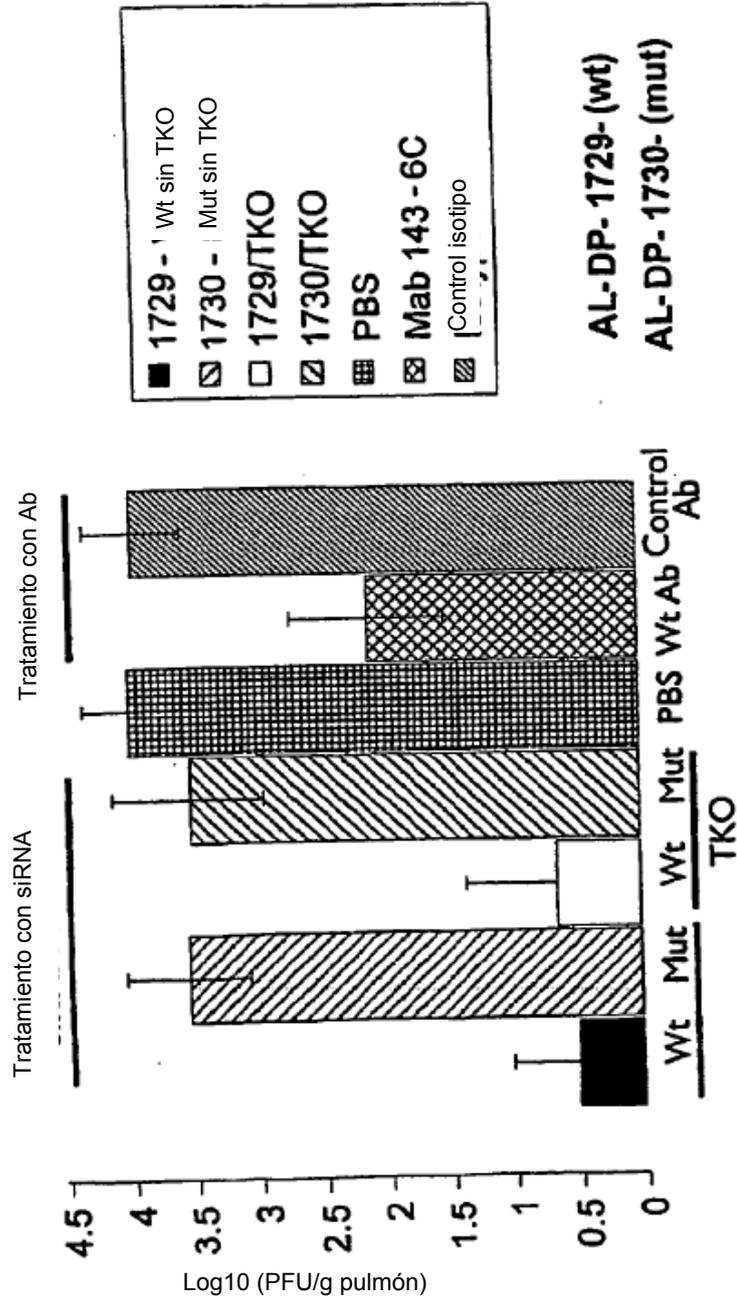


FIG. 4

Reducción dependiente de la dosis en los títulos de RSV en el Pulmón del Ratón pot si RNA wt

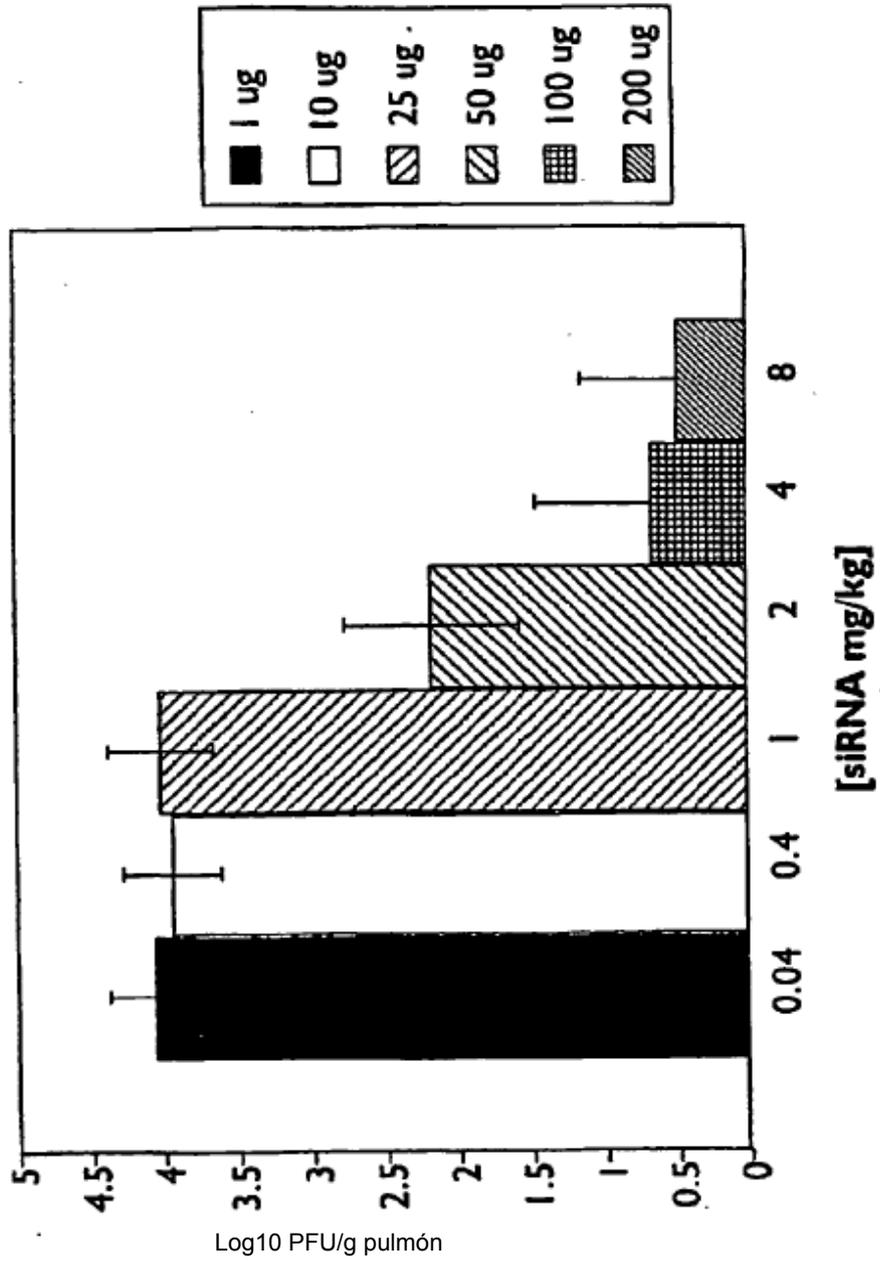


FIG. 5

Inhibición de RSV/A2 por siRNA en ratones BALB/c

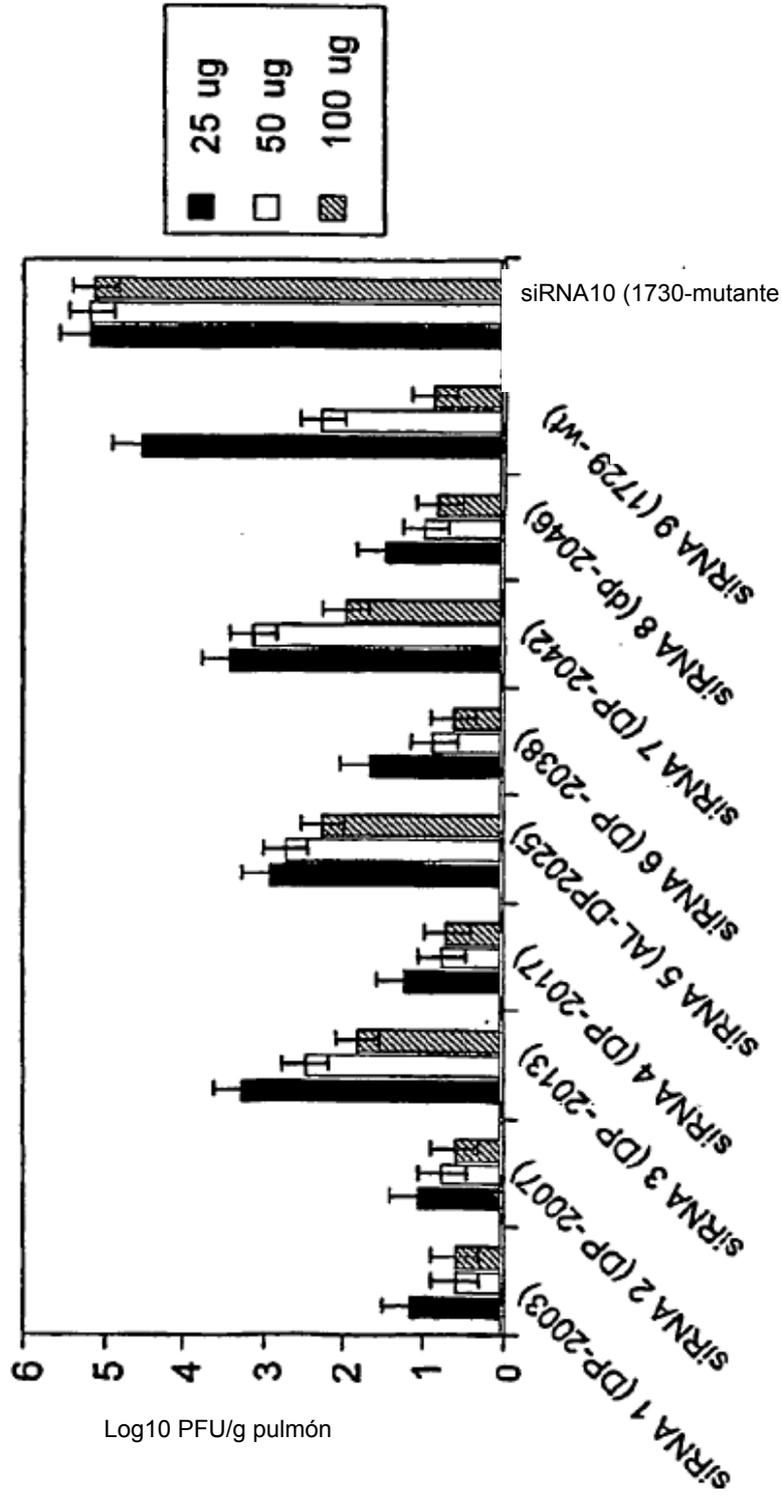
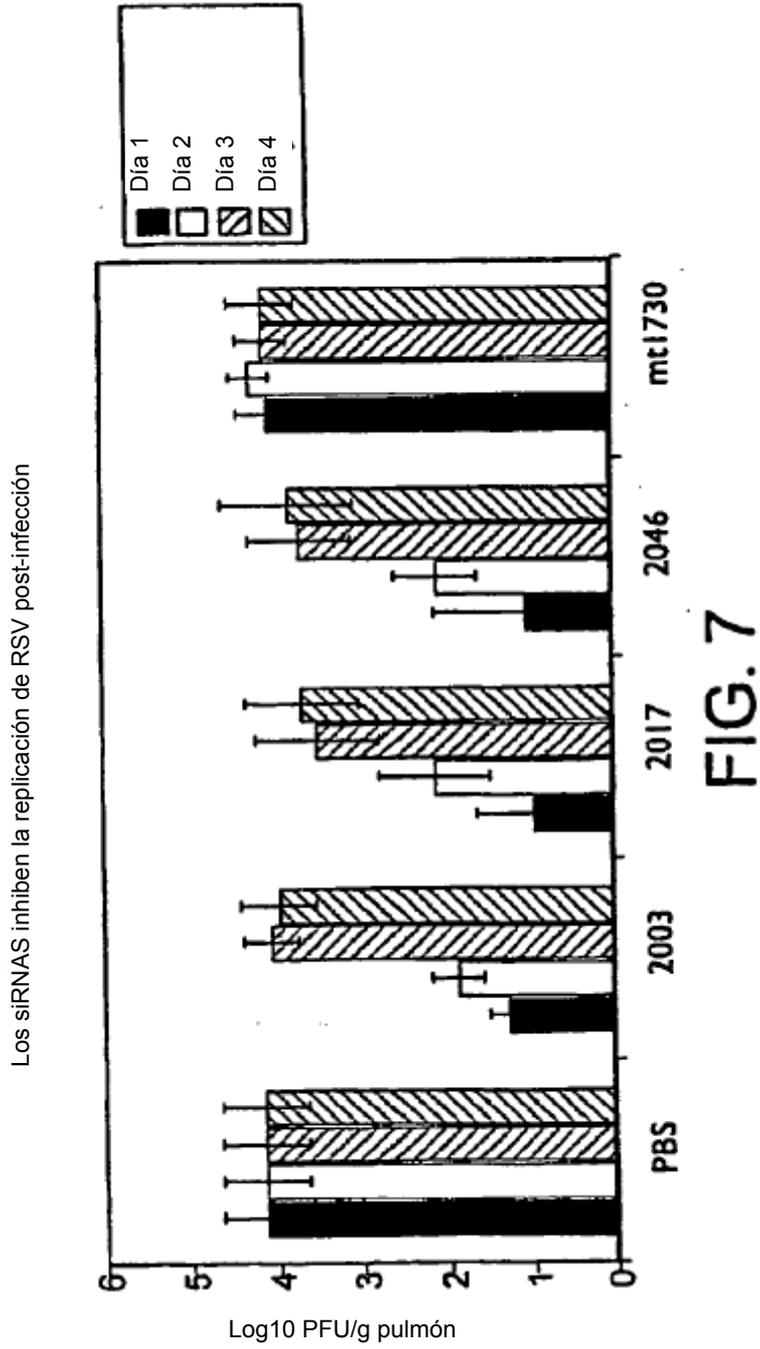
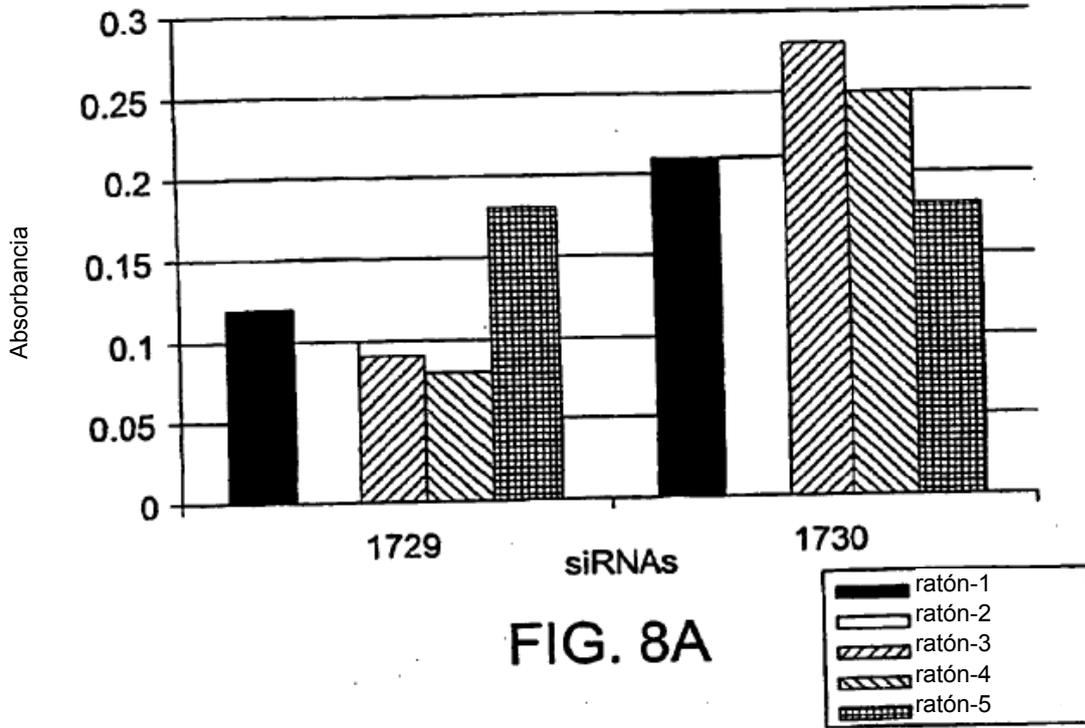


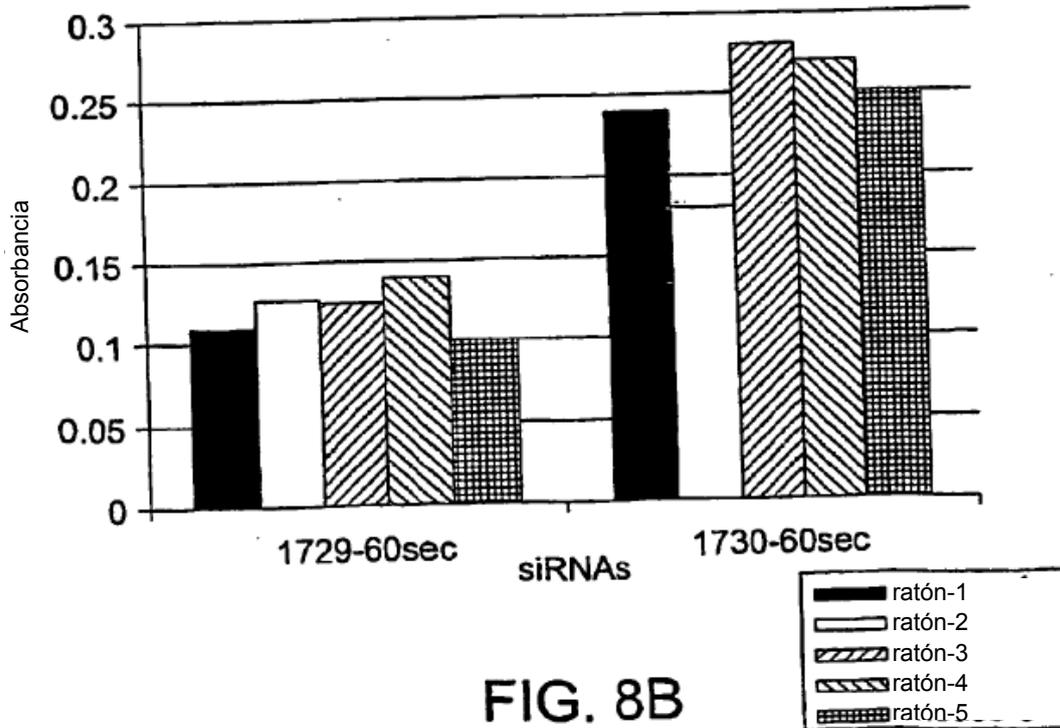
FIG. 6



Administración Tópica



Tratamiento con aerosol (Creare – 60 segundos)



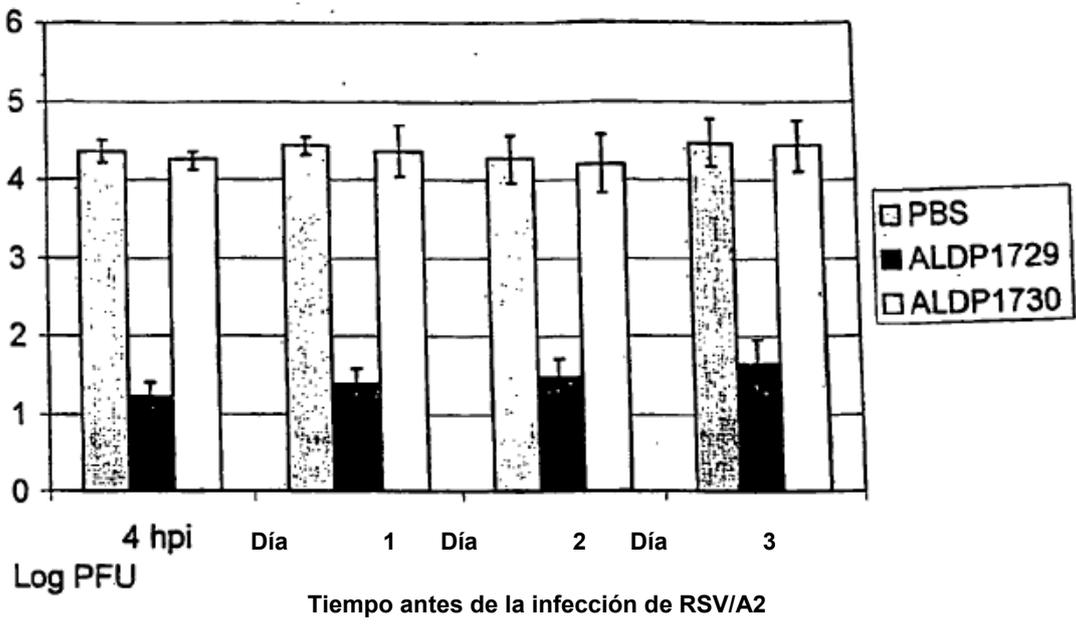


FIG. 9