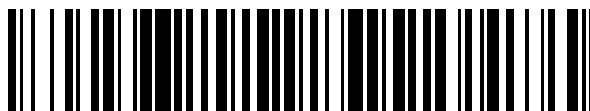


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 423 060**

51 Int. Cl.:

<b>C12N 15/11</b>	(2006.01)	<b>A61K 47/12</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/113</b>	(2010.01)		
<b>C07K 14/475</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/713</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/712</b>	(2006.01)		
<b>A61K 47/48</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/7088</b>	(2006.01)		
<b>A61K 48/00</b>	(2006.01)		
<b>A61K 47/02</b>	(2006.01)		
<b>A61K 47/10</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.03.2005 E 11001330 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2013 EP 2365077**

54 Título: **Agentes iRNA que tienen como diana al VEGF**

30 Prioridad:

**12.03.2004 US 552620 P**  
**05.04.2004 US 559824 P**  
**25.01.2005 US 647191 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**17.09.2013**

73 Titular/es:

**ALNYLAM PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)**  
**300 Third Street, 3rd Floor**  
**Cambridge, MA 02142, US**

72 Inventor/es:

**DE FOUGEROLLES, ANTONIN;**  
**FRANK-KAMENETSKY, MARIA;**  
**MANOHARAN, MUTHIAH;**  
**RAJEEV, KALLANTHOTTAHIL G. y**  
**HADWIGER, PHILIPP**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 423 060 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

Agentes iRNA que tienen como diana al VEGF

## CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención pertenece al campo de agentes iRNA que pueden inhibir la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Se describe el uso de secuencias de siRNA que tienen como diana a VEGF para tratar afecciones o trastornos relacionados con la expresión indeseada de VEGF, *por ejemplo* degeneración macular relacionada con la edad o retinopatía diabética.

## ANTECEDENTES

10 VEGF (también conocido como factor de permeabilidad vascular, VPF) es una citocina multifuncional que estimula la angiogénesis, la proliferación de células epiteliales, y la supervivencia de células endoteliales. VEGF se puede producir mediante una amplia variedad de tejidos, y su sobreexpresión o expresión aberrante puede dar como resultado una variedad de trastornos, incluyendo trastornos retinianos tales como degeneración macular relacionada con la edad y retinopatía diabética, cáncer, asma, y otros trastornos angiogénicos.

15 La degeneración macular es una causa principal de ceguera en los Estados Unidos de América, y la frecuencia de este trastorno aumenta con la edad. Degeneración macular se refiere al grupo de enfermedades en las que las células que perciben la visión en la zona macular de la retina funcionan mal o pierden función, y pueden dar como resultado una pérdida debilitante de la visión central vital o de la visión detallada. La degeneración macular del adulto (AMD), que es la forma más habitual de degeneración macular, se produce en dos formas principales. El noventa por ciento de personas con AMD tiene la forma descrita como degeneración macular "seca". Se ve afectada un área de la retina, lo que conduce a la ruptura lenta de células en la mácula, y a una pérdida gradual de la visión central. La otra forma de AMD es degeneración macular "húmeda". Aunque sólo el 10% de las personas con AMD tienen este tipo, da cuenta del 90% de ceguera de la enfermedad. A medida que AMD seca avanza, comienzan a crecer nuevos vasos sanguíneos y provocar AMD "húmeda". Estos nuevos vasos sanguíneos pierden a menudo sangre y fluido bajo la mácula. Esto provoca un daño rápido a la mácula, lo que puede conducir a la pérdida de visión central en un espacio de tiempo corto. Los agentes iRNA que tienen como diana a VEGF pueden ser útiles para el tratamiento de degeneración macular húmeda y seca.

20 La interferencia con RNA o "RNAi" es la expresión inicialmente acuñada 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). dsRNA corto dirige el silenciamiento post-transcripcional, específico de genes, en muchos organismos, incluyendo vertebrados, y ha proporcionado una nueva herramienta para estudiar la función génica. Se ha sugerido RNAi como un método para desarrollar una nueva clase de agentes terapéuticos. Sin embargo, hasta la fecha, estos han permanecido mayoritariamente como sugerencias, sin prueba demostrada de que RNAi se puede usar terapéuticamente.

25 La presente invención da un paso en la técnica al proporcionar un paseo génico detallado a lo largo del gen de VEGF y un análisis estructural detallado de modificaciones que se pueden emplear para estabilizar la molécula frente a la degradación e incrementar la captación celular y selección de dianas.

## SUMARIO DE LA INVENCIÓN

30 La invención proporciona compuestos, composiciones y métodos como se definen en las reivindicaciones y útiles para modular la expresión de VEGF. La invención proporciona compuestos, composiciones y métodos útiles para modular la expresión de la actividad de VEGF mediante interferencia con RNA (RNAi) usando pequeñas moléculas de ácidos nucleicos, tales como moléculas de RNA corto de interferencia (siRNA), RNA bicatenario (dsRNA), microRNA (miRNA) y RNA de horquilla corto (shRNA), que caen colectivamente bajo el término general de agentes iRNA. Los agentes iRNA pueden ser moléculas de ácidos nucleicos sin modificar o químicamente modificadas. Los agentes iRNA se pueden sintetizar químicamente o expresar a partir de un vector, o se pueden sintetizar enzimáticamente. La invención proporciona diversos agentes iRNA sintéticos químicamente modificados capaces de modular la expresión o actividad del gen de VEGF en células y en mamífero mediante RNAi. El uso de un agente iRNA químicamente modificado puede mejorar una o más propiedades de un agente iRNA a través de una mayor resistencia a la degradación, mayor especificidad para seleccionar como dianas a restos, captación celular mejorada, y similar.

35 Se describe un agente iRNA que reduce la expresión de un gen de VEGF. El gen de VEGF puede incluir una secuencia codificante de VEGF y/o secuencias reguladoras de VEGF, tales como pueden existir 5' o 3' de un marco de lectura abierto (ORF) de VEGF.

40 En una realización, la invención proporciona un agente iRNA aislado, como se define en las reivindicaciones, y que incluye una secuencia sentido y antisentido, en el que las secuencias sentido y antisentido pueden formar un dúplex de RNA. En particular, la invención proporciona un agente iRNA aislado, que comprende una secuencia sentido y una secuencia antisentido, en el que las secuencias sentido y antisentido forman un dúplex de RNA, y en el que la

secuencia antisentido comprende una secuencia nucleotídica suficientemente complementaria a una secuencia diana de alrededor de 19 a 23 nucleótidos de una secuencia nucleotídica de VEGF, y en el que dicha secuencia diana difiere en no más de 1, 2 ó 3 nucleótidos de la secuencia de SEC ID NO: 344. La secuencia sentido puede incluir una secuencia nucleotídica que es idéntica o sustancialmente idéntica a una secuencia diana de alrededor de 19 a 23 nucleótidos de una secuencia de VEGF. Se describe que la secuencia de VEGF que se selecciona como diana incluye la secuencia de una cualquiera de SEC ID NOs:2-401 (véase Tabla 1).

La secuencia sentido del agente iRNA descrito puede incluir una secuencia idéntica o sustancialmente idéntica a cualquiera de las secuencias dianas de VEGF, *por ejemplo* sustancialmente idéntica a cualquiera de las secuencias sentido proporcionadas en la Tabla 1, SEC ID NOs:2-401. La secuencia antisentido del agente iRNA puede incluir una secuencia complementaria a o sustancialmente complementaria a cualquiera de las secuencias dianas, *por ejemplo* complementaria a cualquiera de SEC ID NOs:2-401. Por "sustancialmente idéntica" se quiere decir que el desemparejamiento entre las secuencias nucleotídicas es menor que 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5%, o 1%. Preferiblemente, no más de 1, 2, 3, 4 ó 5 nucleótidos difieren entre la secuencia diana y la secuencia sentido. Además, las secuencias que son "complementarias" entre sí (*por ejemplo*, secuencias sentido y antisentido) pueden ser completamente complementarias, o pueden tener no más de 1, 2, 3, 4 ó 5 nucleótidos que carecen de complementariedad total.

Los pares sentido y antisentido de las secuencias de un agente iRNA pueden incluir uno cualquiera de los agentes proporcionados en la Tabla 2, o una secuencia que difiere en la hebra sentido de la secuencia citada en no más de 1, 2, 3, 4 ó 5 nucleótidos, y en la hebra antisentido en no más de 1, 2, 3, 4 ó 5 nucleótidos, o en ambas hebras en no más de 1, 2, 3, 4 ó 5 nucleótidos.

En una realización preferida, las secuencias sentido de un agente iRNA incluyen las secuencias SEC ID NO:608, o una secuencia que difiere de la secuencia citada en no más de 1, 2, o nucleótidos.

La secuencia antisentido del agente iRNA descrito puede incluir una secuencia totalmente complementaria o sustancialmente complementaria a cualquiera de las secuencias dianas de VEGF, *por ejemplo* complementaria o sustancialmente complementaria a cualquiera de SEC ID NOs:2-401.

La secuencia antisentido del agente iRNA descrito incluye una secuencia seleccionada del grupo que consiste en cualquiera de las secuencias antisentido proporcionadas en la Tabla 2, o una secuencia que difiere de la secuencia citada en no más de 1, 2, 3, 4 ó 5 nucleótidos. Esta secuencia antisentido puede ser completamente complementaria a una secuencia sentido, o tiene no más de 1, 2, 3, 4 ó 5 nucleótidos desemparejados con la secuencia sentido.

En una realización preferida, la secuencia antisentido de un agente iRNA incluye la secuencia SEC ID NO:609, o una secuencia que difiere de la secuencia citada en no más de 1, 2, o nucleótidos.

En otra realización, el agente iRNA está químicamente modificado. Por ejemplo, el agente iRNA puede incluir un resto no nucleotídico. Una modificación química u otro resto no nucleotídico puede estabilizar las secuencias sentido y antisentido frente a la degradación nucleolítica. Adicionalmente, se pueden usar conjugados para incrementar la captación y seleccionar como diana la captación del agente iRNA hacia tipos celulares particulares. Las modificaciones preferidas incluyen aquellas proporcionadas específicamente en los Ejemplos, Tablas 6-19.

En otra realización, el agente iRNA incluye un saliente en 3' que oscila de 1 a alrededor de 6 nucleótidos. Como se usa aquí, un "saliente en 3'" se refiere a al menos un nucleótido no emparejado que se extiende desde el extremo 3' de una secuencia de iRNA. El saliente en 3' puede incluir ribonucleótidos o desoxirribonucleótidos, o ribonucleótidos modificados o desoxirribonucleótidos modificados. El saliente en 3' tiene preferiblemente una longitud de 1 a alrededor de 5 nucleótidos, más preferiblemente una longitud de 1 a alrededor de 4 nucleótidos, y lo más preferible una longitud de alrededor de 2 a alrededor de 4 nucleótidos. El saliente en 3' se puede producir en la secuencia sentido o antisentido, o en ambas secuencias de un agente iRNA.

El agente iRNA puede incluir una secuencia antisentido que tiene 23 nucleótidos complementarios a la secuencia de VEGF diana, y una secuencia sentido que tiene al menos 21 nucleótidos. Cada secuencia puede incluir al menos 21 nucleótidos que son complementarios entre sí, y al menos la secuencia antisentido puede tener un saliente en 3' de dos nucleótidos.

En una realización, tanto las secuencias sentido como antisentido del agente iRNA incluye un saliente en 3', cuya longitud puede ser igual o diferente para cada secuencia. En una realización, el saliente en 3' en cada secuencia oscila desde una longitud de 1 hasta alrededor de 6 (*por ejemplo*, de 1 a alrededor de 3) nucleótidos. El saliente en 3' puede estar en ambas secuencias del agente iRNA, y tiene una longitud de dos nucleótidos. El saliente en 3' puede estar en ambas secuencias del agente iRNA, y los salientes en 3' incluyen dos restos de ácido timidílico ("TT").

Un agente iRNA puede incluir una secuencia antisentido que tiene alrededor de 19 a 25 (*por ejemplo*, alrededor de 19, 20, 21, 22, 23, 24, ó 25) nucleótidos con complementariedad con una secuencia de RNA que codifica una proteína de VEGF. El agente iRNA puede incluir además una secuencia sentido que tiene alrededor de 19 a 25 (*por*

*ejemplo*, alrededor de 19, 20, 21, 22, 23, 24, ó 25) nucleótidos, y las secuencias antisentido y sentido pueden tener secuencias nucleotídicas distintas con al menos alrededor de 19, 20 ó 21 nucleótidos complementarios.

Un agente iRNA puede incluir una región antisentido que tiene alrededor de 19 a alrededor de 25 (*por ejemplo*, alrededor de 19 a alrededor de 23) nucleótidos con complementariedad con una secuencia de RNA que codifica VEGF, y una región sentido que tiene alrededor de 19 a 25 (*por ejemplo*, alrededor de 19 a alrededor de 23) nucleótidos. Las regiones sentido y antisentido se pueden incluir en una molécula lineal con al menos alrededor de 19 nucleótidos complementarios. La secuencia sentido puede incluir una secuencia nucleotídica que es sustancialmente idéntica a una secuencia nucleotídica de VEGF.

El agente iRNA puede incluir una secuencia antisentido de alrededor de 21 nucleótidos complementaria a la secuencia diana de VEGF, y una secuencia sentido de alrededor de 21 nucleótidos complementaria a la secuencia antisentido. El agente iRNA puede incluir un resto no nucleotídico. En una realización, la secuencia sentido o antisentido del agente iRNA puede incluir un nucleótido de 2'-O-metil (2'-OMe) pirimidina, un nucleótido 2'-desoxi (*por ejemplo*, desoxi-citodina), un nucleótido de 2'-desoxi-2'-fluoro (2'-F) pirimidina, un nucleótido 2'-O-metoxietilo (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropilo (2'-O-AP), 2'-O-N-metilacetamido (2'-O-NMA), 2'-O-dimetilaminoetiloxietilo (2'-DMAEOE), 2'-O-dimetilaminoetilo (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropilo (2'-O-AP), un nucleótido 2'-hidroxi, o un nucleótido 2'-ara-fluoro, o un ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico alargado (ENA), ácido nucleico de hexosa (HNA), ácido nucleico ciclohexénico (CeNA), ribo-diflorotoluilo, 5-alilamino-pirimidinas, o pirimidinas 5-Me-2'-modificadas. Una modificación en 2' es preferiblemente una modificación 2'-OMe, y más preferiblemente una modificación 2'-fluoro. En una realización preferida, uno o más nucleótidos modificados en 2' están en la hebra sentido del agente iRNA.

Un agente iRNA puede incluir modificación de nucleobases, tal como una modificación catiónica, tal como una modificación catiónica 3'-abásica. La modificación catiónica puede ser, *por ejemplo*, un alquilamino-dT (*por ejemplo*, un amino C6-dT), un conjugado alilamínico, un conjugado de pirrolidina, un ftalamido, un conjugado de hidroxiprolinol o un conjugado de aminooxi, en uno o más de los nucleótidos terminales del agente iRNA. Un conjugado alquilamino-dT está preferiblemente unido al extremo 3' de la hebra sentido o antisentido de un agente iRNA. Un enlazador pirrolidínico está unido preferiblemente al extremo 3' o 5' de la hebra sentido, o al extremo 3' de la hebra antisentido. Una alil amina uridina está preferiblemente en el extremo 3' o 5' de la hebra sentido, y no en el extremo 5' de la hebra antisentido. Un conjugado aminooxi se puede unir a un hidroxil prolinol, y en el extremo 3' o 5' de las hebras sentido o antisentido.

Un agente iRNA que tiene como diana a VEGF puede incluir un conjugado, *por ejemplo*, para facilitar la entrada en una célula o inhibir la escisión exo- o endonucleolítica. El conjugado puede ser, *por ejemplo*, un lipófilo, un terpeno, un agente de unión de proteína, una vitamina, un hidrato de carbono, un retinoide o un péptido. *Por ejemplo*, el conjugado puede ser naproxeno, nitroindol (u otro conjugado que contribuye a apilar interacciones), folato, ibuprofeno, retinol o un enlazador pirimidínico C5. En otras realizaciones, los conjugados son conjugados lipídicos de glicéridos (*por ejemplo* derivados de dialquil glicéridos), conjugados de vitamina E, o tiocolesterol. Preferiblemente, los conjugados están en el extremo 3' de la hebra antisentido, o en el extremo 5' o 3' de la hebra sentido, y preferiblemente los conjugados no están en el extremo 3' de la hebra antisentido y en el extremo 3' de la hebra sentido.

En una realización, el conjugado es naproxeno, y el conjugado está preferiblemente en el extremo 5' o 3' de las hebras sentido o antisentido. En una realización, el conjugado es colesterol o tiocolesterol, y el conjugado está preferiblemente en el extremo 5' o 3' de la hebra sentido y no está presente preferiblemente en la hebra antisentido. En algunas realizaciones, el colesterol está conjugado al agente iRNA mediante un enlazador pirrolidínico, o un enlazador de serinol, o un enlazador de hidroxiprolinol. En otra realización, el conjugado es ácido colánico, y el ácido colánico está unido al extremo 5' o 3' de la hebra sentido, o al extremo 3' de la hebra antisentido. En una realización, el ácido colánico está unido al extremo 3' de la hebra sentido y al extremo 3' de la hebra antisentido. En otra realización, el conjugado es ácido retinol, y el ácido retinol está unido al extremo 5' o 3' de la hebra sentido, o al extremo 3' de la hebra antisentido. En una realización, el ácido retinol está unido al extremo 3' de la hebra sentido y al extremo 3' de la hebra antisentido.

En un aspecto, un agente iRNA de la invención tiene actividad de RNAi que modula la expresión de RNA codificado por un gen de VEGF. Los genes de VEGF pueden compartir cierto grado de identidad de secuencia entre sí, y de este modo los agentes iRNA pueden tener como diana a una clase de genes de VEGF, o, como alternativa, genes de VEGF específicos, al seleccionar como dianas a secuencias que están compartidas entre diferentes dianas de VEGF o que son únicas para una diana específica de VEGF. Por lo tanto, en una realización, un agente iRNA puede seleccionar como diana una región conservada de una secuencia nucleotídica de VEGF (*por ejemplo*, secuencia de RNA). La región conservada puede tener identidad de secuencia con varias secuencias diferentes relacionadas con VEGF (*por ejemplo*, isoformas de VEGF diferentes, variantes de ajuste, genes mutantes, etc.). De este modo, un agente iRNA puede tener como dianas a varias secuencias diferentes relacionadas con VEGF.

En una realización, un agente de iRNA está químicamente modificado. En otra realización, el agente iRNA incluye una molécula dúplex en la que una o más secuencias de la molécula dúplex están químicamente modificadas. Los ejemplos no limitantes de tales modificaciones químicas incluyen enlaces internucleotídicos de fosforotioato, 2'-

desoxirribonucleótidos, 2'-O-metil ribonucleótidos, 2'-desoxi-2'-fluoro ribonucleótidos, nucleótidos de "bases universales", nucleótidos "acíclicos", 5'-C-metil nucleótidos, y la incorporación de restos abásicos desoxi invertidos y/o de glicerilo terminales. Estas modificaciones químicas, cuando se usan en agentes iRNA, pueden ayudar a conservar la actividad de RNAi de los agentes en células, y puede incrementar la estabilidad de los agentes iRNA en el suero.

Un agente iRNA puede incluir una o más modificaciones químicas, y las secuencias sentido y antisentido del RNA bicatenario tiene una longitud de alrededor de 21 nucleótidos.

Se pueden modificar, preferiblemente mediante un fosforotioato, el primer y preferiblemente los primeros dos enlaces internucleotídicos en el extremo 5' de las secuencias antisentido y/o sentido. Se pueden modificar, preferiblemente mediante un fosforotioato, el primer, y preferiblemente los primeros dos, tres o cuatro enlaces internucleotídicos en el extremo 3' de una secuencia sentido y/o antisentido. Más preferiblemente, el extremo 5' tanto de las secuencias sentido como antisentido, y el extremo 3' tanto de la secuencia sentido como antisentido se modifican como se describe.

Un agente iRNA que media la disminución de la expresión de VEGF puede incluir una o más modificaciones químicas que modulan la afinidad de unión entre las secuencias sentido y antisentido del constructo de iRNA.

Un agente iRNA puede incluir una o más modificaciones químicas que pueden modular la captación celular del agente iRNA.

Un agente iRNA puede incluir una o más modificaciones químicas que mejoran la farmacocinética del agente iRNA. Tales modificaciones químicas incluyen, pero no se limitan a, conjugados, tales como ligandos para receptores celulares, *por ejemplo*, péptidos derivados de ligandos proteicos de origen natural; secuencias de localización de proteínas; anticuerpos; aptámeros de ácidos nucleicos; vitaminas y otros cofactores, tales como folato, retinoides y N-acetilgalactosamina; polímeros, tales como polietilenglicol (PEG, *por ejemplo* PEG 5 y PEG20); fosfolípidos; poliaminas, tales como espermina o espermidina; y otros.

El agente iRNA puede incluir una molécula dúplex seleccionada del grupo que consiste en AL-DP-4003, AL-DP-4116, AL-DP-4015, AL-DP-4120, AL-DP-4002, AL-DP-4115, AL-DP-4014, AL-DP-4119, AL-DP-4094, AL-DP-4118, AL-DP-4107, AL-DP-4122, AL-DP-4004, AL-DP-4117, AL-DP-4016, AL-DP-4121, AL-DP-4127, AL-DP-4128, AL-DP-4129, y AL-DP-4055 (véanse las Tablas 2 y 3).

En una realización preferida, el agente iRNA incluye un dúplex descrito como AL-DP-4094, que incluye la secuencia antisentido 5' AAGCUCAUCUCUCC'UAUGUGCUG 3' (SEC ID NO:609) y la secuencia sentido 5' GCACAUAGGAGAGAUGAGCUU 3' (SEC ID NO:608).

También se describe un agente iRNA que incluye un dúplex descrito como AL-DP-4004, que incluye la secuencia sentido 5'CUUUCUUJGGUCUGCAUUCACAU 3' (SEC ID NO:635) y la secuencia sentido 5' GUGAAUGCAGACCAAAGAAAG 3' (SEC ID NO:634), un agente iRNA que incluye un dúplex descrito como AL-DP-4015, que incluye la secuencia antisentido 5' GUACUCCUGGAAGAUGUCCTT 3' (SEC ID NO:551) y la secuencia sentido 5' GGACAUCUCCAGGAGUACTT 3' (SEC ID NO:550), y el agente iRNA que incluye un dúplex descrito como AL-DP-4055, que incluye la secuencia antisentido 5' UGCAGCCUGGGACCACUUGTT 3' (SEC ID NO:457) y la secuencia sentido 5' CAAGUGGUCCCAGGCUGCATT 3' (SEC ID NO:456).

La secuencia antisentido de un agente iRNA descrito aquí puede no hibridarse a una secuencia fuera de diana. Por ejemplo, la secuencia antisentido puede tener menos de 5, 4, 3, 2 ó 1 nucleótido complementario a una secuencia fuera de diana. Por "fuera de diana" se quiere decir una secuencia distinta de una secuencia nucleotídica de VEGF.

La hebra sentido se puede modificar para inhibir el silenciamiento fuera de diana. La hebra sentido puede incluir un resto de colesterol, tal como colesterol unido a la hebra sentido mediante un enlazador de pirrolidina.

La secuencia antisentido de un agente iRNA descrito aquí se puede hibridar a una secuencia de VEGF en un ser humano y a una secuencia de VEGF en un mamífero no humano, *por ejemplo* un ratón, rata, o mono.

También se describe un método para suministrar un agente iRNA, *por ejemplo* un agente iRNA descrito aquí, al ojo de un sujeto, *por ejemplo* a un sujeto mamífero, tal como un ratón, una rata, un mono o un ser humano.

También se describe aquí un método para suministrar un agente iRNA al ojo de un sujeto, *por ejemplo* un sujeto mamífero, tal como un ratón, una rata, un mono o un ser humano.

El agente iRNA se puede suministrar a una célula o células en una región coroidea del ojo. El agente iRNA puede reducir la expresión del gen de VEGF en un sitio diana en el ojo. Un agente iRNA suministrado al ojo, *por ejemplo* células coroides del ojo, puede ser un agente iRNA sin modificar.

El agente iRNA se puede estabilizar con enlaces de fosforotioato. El extremo 3' de las secuencias sentido o antisentido, o de ambas, del agente iRNA se puede modificar con un grupo catiónico, tal como una modificación catiónica básica en 3'. La modificación catiónica puede ser, *por ejemplo*, un alquilamino-dT (*por ejemplo* un C6

amino-dT), una alilamina, una pirrolidina, un ftalimido, un hidroxiprolinol, una poliamina, un péptido catiónico, o un aminoácido catiónico en uno o más de los nucleótidos terminales del agente iRNA. La modificación puede ser un resto catiónico externo o terminal. En realizaciones preferidas, se une una pirrolidina protectora para tapar el extremo 3' o 5' de la hebra sentido, o el extremo 3' de la hebra antisentido.

5 La secuencia sentido o antisentido, o ambas, del agente iRNA se puede modificar con un azúcar, *por ejemplo* un glucoconjugado o un componente alquilglucosídico, *por ejemplo*, glucosa, manosa, 2-desoxi-glucosa, o un análogo del mismo. En otra realización, el agente iRNA se puede conjugar a un sustrato enzimático, *por ejemplo* un sustrato para el que la enzima relativa está presente en una cantidad mayor, en comparación con el nivel enzimático en otros tejidos del cuerpo, *por ejemplo* en tejidos distintos del ojo.

10 Al menos alrededor de 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más del agente iRNA administrado al sujeto puede alcanzar al ojo. Entre alrededor de 30-90%, 40-80% o 50-70% del agente iRNA administrado al sujeto puede alcanzar al ojo.

15 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición, *por ejemplo* una composición farmacéutica que incluye un agente iRNA de la presente invención en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. El agente iRNA puede ser cualquier agente descrito aquí. En otra realización, el agente iRNA está modificado químicamente, tal como con cualquier modificación química descrita aquí. Los agentes iRNA modificados incluyen aquellos proporcionados en las Tablas 2-19.

20 Se describe un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección en un sujeto. El método puede incluir administrar al sujeto una composición de la invención en condiciones adecuadas para el tratamiento o prevención de la enfermedad o afección en un sujeto, sola o juntamente con uno o más compuestos terapéuticos adicionales.

25 El agente iRNA se puede administrar en o cerca del sitio de la expresión indeseada de VEGF, *por ejemplo* mediante un catéter u otro dispositivo de colocación (*por ejemplo*, un pelete retiniano o un implante que incluye un material poroso, no poroso, o gelatinoso). El agente iRNA se puede administrar vía un implante intraocular, que se puede insertar, por ejemplo, en una cámara anterior o posterior del ojo; o en la esclera, espacio transcoroidal, o una región avascularizada exterior al vítreo. El implante se puede colocar sobre una región avascular, tal como sobre la esclera, para permitir la difusión transcleral del fármaco al sitio deseado de tratamiento, *por ejemplo* al espacio intraocular y mácula del ojo. Además, el sitio de difusión transcleral está preferiblemente próximo a la mácula.

Un agente iRNA se puede administrar al ojo mediante inyección, por ejemplo mediante inyección intraocular, retiniana o subretiniana.

30 Un agente iRNA se puede administrar tópicamente al ojo, tal como mediante un parche o colirios líquidos, o mediante iontoforesis. Los ungüentos o líquidos en gotas se pueden suministrar mediante sistemas de suministro ocular conocidos en la técnica, tales como aplicadores o goteros para colirios.

Un iRNA se puede suministrar en o cerca de un sitio de neovascularización.

35 Un agente iRNA se puede administrar repetidamente. La administración de un agente iRNA se puede llevar a cabo a lo largo de un intervalo de periodos de tiempo. Se puede administrar horariamente, diariamente, una vez cada pocos días, semanalmente, o mensualmente. El tiempo de administración puede variar de un paciente a otro, dependiendo de factores tales como la gravedad de los síntomas del paciente. Por ejemplo, se puede administrar una dosis eficaz de un agente iRNA a un paciente una vez al mes durante un período de tiempo indefinido, o hasta que el paciente ya no requiere terapia. Además, se pueden usar composiciones de liberación sostenida que contienen un agente iRNA para mantener una dosis relativamente constante en el área de las secuencias nucleotídicas diana de VEGF.

40 Un agente iRNA se puede suministrar al ojo en una dosis del orden de alrededor de 0,00001 mg a alrededor de 3 mg por ojo, o preferiblemente alrededor de 0,0001-0,001 mg por ojo, alrededor de 0,03-3,0 mg por ojo, alrededor de 0,1-3,0 mg por ojo, o alrededor de 0,3-3,0 mg por ojo.

45 Un agente iRNA se puede administrar profilácticamente, tal como para prevenir o ralentizar el comienzo de una enfermedad o afección que afecta al ojo. Por ejemplo, un iRNA se puede administrar a un paciente que es susceptible a o de otro modo tiene riesgo de trastorno neovascular.

Un ojo de un ser humano se puede tratar con un agente iRNA descrito aquí, y en otra realización se tratan los dos ojos de un ser humano.

50 Se describe un método para inhibir la expresión de VEGF. Tal método incluye administrar una cantidad eficaz de un agente iRNA de la presente invención.

Se describe un método para tratar degeneración macular de comienzo en el adulto. El método incluye administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente iRNA de la presente invención.

En una realización, un ser humano ha sido diagnosticado con degeneración macular del adulto (AMD) seca, y en otra realización, el ser humano se ha diagnosticado con AMD húmeda.

Un ser humano tratado con un agente iRNA descrito aquí puede tener alrededor de 50 años de edad, *por ejemplo* entre las edades de 75 y 80 años, y el ser humano ha sido diagnosticado con degeneración macular de comienzo en el adulto. Un ser humano tratado con un agente iRNA descrito aquí puede tener edades entre 30 y 50 años, y el ser humano ha sido diagnosticado con degeneración macular de comienzo tardío. Un ser humano tratado con un agente iRNA descrito aquí puede tener edades entre 5 y 20 años, y el ser humano ha sido diagnosticado con degeneración macular de comienzo medio. Un ser humano tratado con un agente iRNA descrito aquí puede tener 7 años de edad o más joven, y el ser humano ha sido diagnosticado con degeneración macular de comienzo temprano.

Se describen métodos para tratar cualquier enfermedad o trastorno caracterizado por la expresión indeseada de VEGF. Realizaciones particularmente preferidas incluyen el tratamiento de trastornos del ojo o de la retina, que se caracterizan por la expresión indeseada de VEGF. La enfermedad o trastorno puede ser una retinopatía diabética, glaucoma neovascular, un tumor o cáncer metastásico (*por ejemplo*, cáncer de colon o de mama), una enfermedad pulmonar (*por ejemplo*, asma o bronquitis), artritis reumatoide, o psoriasis. Otros trastornos angiogénicos pueden ser tratados mediante los métodos expuestos en la invención.

Se describe también un kit que contiene un agente iRNA de la invención.

El agente iRNA del kit puede estar químicamente modificado, y puede ser útil para modular la expresión de un gen diana de VEGF en una célula, tejido u organismo. El kit puede contener más de un agente iRNA de la invención.

Excepto que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados aquí tienen el mismo significado que el que se entiende normalmente por una persona experta normal en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos aquí en la práctica o el ensayo de la presente invención, más abajo se describen métodos y materiales útiles. Los materiales, métodos y ejemplos son solamente ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIGURA 1 es la secuencia nucleotídica del mRNA de la forma de 121 aminoácidos del factor de crecimiento endotelial vascular, VEGF121. El primer nucleótido del codón iniciador es el nucleótido 1. El péptido señal va desde el nucleótido 1 al 78.

La FIGURA 2 es una representación gráfica de un análisis comparativo de las actividades de siRNAs con un solo saliente y con dos salientes en ensayos *in vitro* en células HeLa. Las líneas continuas con símbolos negros representan el siRNA con un solo saliente, las líneas continuas con símbolos en blanco representan los siRNAs con dos salientes; las líneas discontinuas representan los siRNAs de control. El hVEGF del siRNA de control se describe en Reich et al. (Mol. Vis. 9:210, 2003); el hrmVEGF del siRNA de control se describe en Filleur et al. (Cancer Res. 63:3919, 2003). "L2000" se refiere al reactivo Lipofectamina 2000. La expresión de hVEGF (eje y) se refiere a la expresión de VEGF endógena.

La FIGURA 3 es una representación gráfica de un análisis comparativo de las actividades de siRNAs con un solo saliente y con dos salientes en células ARPE-19. Las líneas continuas con símbolos negros representan el siRNA con un solo saliente; las líneas continuas con símbolos en blanco representan los siRNAs con dos salientes; las líneas discontinuas representan los siRNAs de control. El hVEGF del siRNA de control se describe en Reich et al. (Mol. Vis. 9:210, 2003); el hrmVEGF del siRNA de control se describe en Filleur et al. (*más arriba*). "L2000" se refiere al reactivo Lipofectamina 2000. La expresión de hVEGF (eje y) se refiere a la expresión de VEGF endógena.

La FIGURA 4 es una representación gráfica de un análisis comparativo de las actividades de siRNAs en células HeLa de siRNAs con un solo saliente con sus siRNAs romos análogos, en los que el número de nucleótidos emparejados por bases es 21. El hVEGF del siRNA de control se describe en Reich et al. (Mol. Vis. 9:210, 2003); el hrmVEGF del siRNA de control se describe en Filleur et al. (*más arriba*). "L2000" se refiere al reactivo Lipofectamina 2000. La expresión de hVEGF (eje y) se refiere a la expresión de VEGF endógena.

La FIGURA 5 es una representación gráfica de un análisis comparativo de las actividades de siRNAs en células HeLa de siRNAs con dos salientes con sus siRNAs romos análogos, en los que el número de nucleótidos emparejados por bases es 19. El hVEGF del siRNA de control se describe en Reich et al. El hrmVEGF del siRNA de control se describe en Filleur et al. (*más arriba*). "L2000" se refiere al reactivo Lipofectamina 2000. La expresión de hVEGF (eje y) se refiere a la expresión de VEGF endógena.

La FIGURA 6A es una representación gráfica de las actividades de siRNAs con un solo saliente y con dos salientes que tienen como dianas a ORF 319 (SEC ID NO:320) (AL-DP-4002 y AL-DP-4014, respectivamente) y ORF 343 (SEC ID NO:344) (AL-DP-4094 y AL-DP-4107, respectivamente) en células con oxígeno normal (normoxia, 20% de oxígeno).

La FIGURA 6B es una representación gráfica de las actividades de siRNAs con un solo saliente y con dos salientes que tienen como dianas a ORF 319 (SEC ID NO:320) (AL-DP-4002 y AL-DP-4014,

respectivamente) y ORF 343 (SEC ID NO:344) (AL-DP-4094 y AL-DP-4107, respectivamente) en células en condiciones hipóxicas (1% de oxígeno).

La FIGURA 6C es una representación gráfica de las actividades de siRNAs con un solo saliente y con dos salientes que tienen como dianas a ORF 319 (SEC ID NO:320) (AL-DP-4002 y AL-DP-4014, respectivamente) y ORF 343 (SEC ID NO:344) (AL-DP-4094 y AL-DP-4107, respectivamente) en células en condiciones hipóxicas (130  $\mu$ M de defoxamina).

La FIGURA 7 es una representación gráfica de las actividades comparativas de siRNA sin modificar con dos salientes (AL-DP-4014) y siRNAs modificados con fosforotioato (AL-DP-4127, AL-DP-4128, AL-DP-4129) que tienen como dianas a ORF 319 (SEC ID NO:320) en células HeLa. El hVEGF del siRNA de control se describe en Reich et al. (*más arriba*); el hrmVEGF del siRNA de control se describe en Filleur et al. (*más arriba*). "L2000" se refiere al reactivo Lipofectamina 2000. La expresión de hVEGF (eje y) se refiere a la expresión de VEGF endógena.

La FIGURA 8A es una representación gráfica de las actividades de siRNAs que tienen como diana a ORF 319 (SEC ID NO:320) (AL-DP-4014 y AL-DP-4127) y una versión mutada AL-DP-4140 (Tabla 5) en células en condiciones normales de oxígeno normoxia, 20% de oxígeno). El siRNA de control Cand5 es idéntico al control de hVEGF de la FIGURA 7, y se describe en Reich et al. (*más arriba*). "L2000" se refiere al reactivo Lipofectamina 2000. La expresión de VEGF (eje y) se refiere a la expresión de VEGF endógena.

La FIGURA 8B es una representación gráfica de las actividades de siRNA que tiene como diana a ORF 319 (SEC ID NO:320) (AL-DP-4014 y AL-DP-4127) y una versión mutada AL-DP-4140 (Tabla 5) en células en condiciones normales o hipóxicas (hipoxia, 1% de oxígeno). Los siRNAs de control se describen para la FIGURA 8A.

Las FIGURAS 9A-9E son representaciones gráficas de las actividades de siRNAs que tienen la secuencia de AL-DP-4094 pero que difieren en la inclusión de modificaciones nucleotídicas (véase la Tabla 4). Figura 9A: hebras sentido descritas como SEC ID NO: 652, y hebras antisentido descritas como SEC ID NOS 653-658, respectivamente, en orden de aparición. Figura 9B: hebras sentido descritas como SEC ID NO: 659, y hebras antisentido descritas como SEC ID NOS 653-658, respectivamente, en orden de aparición. Figura 9C: hebras sentido descritas como SEC ID NO: 660, y hebras antisentido descritas como SEC ID NOS 653-658, respectivamente, en orden de aparición. Figura 9D: hebras sentido descritas como SEC ID NO: 661, y hebras antisentido descritas como SEC ID NOS 653-658, respectivamente, en orden de aparición. Figura 9E: hebras sentido descritas como SEC ID NOS: 662-665, 652, 652 y 652, y hebras antisentido descritas como SEC ID NOS 653, 653, 653, 653 y 666-668, respectivamente, en orden de aparición. El siRNA de control "Acuity" es idéntico al control Cand5 de la FIGURA 8A, y el control de hVEGF de la FIGURA 7. El siRNA de control "Filleur" es el equivalente del siRNA de control de hrmVEGF de la FIGURA 7.

La FIGURA 10 es una representación gráfica de la actividad de silenciamiento de siRNA *in vitro* en células HeLa.

La FIGURA 11 es un barrido de RP-HPLC de siRNA AL-DP-4094 tras la incubación en suero humano.

La FIGURA 12 es un resumen del cartografiado del fragmento de AL-DP-4094 según se determina mediante LC/MS. El análisis se llevó a cabo tras la incubación del siRNA en suero humano (SEC ID NOS: 608-609, 1080-1082, 1082-1083, 608, 611, 611 y 1084, respectivamente, en orden de aparición).

Las FIGURAS 13-29 son gráficas de la actividad de silenciamiento de siRNAs modificados con 2'-O-metilo y/o 2'-fluoro *in vitro* en células HeLa (Tabla 6).

La FIGURA 30 son gráficas de la actividad de silenciamiento de siRNAs modificados con 2'-O-metilo y/o 2'-fluoro alternos *in vitro* en células HeLa (Tabla 7).

Las FIGURAS 31-33 son gráficas de la actividad de silenciamiento de siRNAs conjugados con colesterol y ácido colónico *in vitro* en células HeLa (Tabla 8).

La FIGURA 34 es una gráfica de la actividad de silenciamiento de siRNAs conjugados con naproxeno *in vitro* en células HeLa (Tabla 9).

La FIGURA 35 es una gráfica de la actividad de silenciamiento de siRNAs conjugados con biotina *in vitro* en células HeLa (Tabla 10).

La FIGURA 36 es una gráfica de la actividad de silenciamiento de siRNAs conjugados con 5'-retinal *in vitro* en células HeLa (Tabla 11).

La FIGURA 37 es una gráfica de la actividad de silenciamiento de siRNAs modificados con ribo-difluorotoluido *in vitro* en células HeLa (Tabla 13).



La FIGURA 38 es una gráfica de la actividad de silenciamiento de siRNAs modificados con 2'arafluoro-2'-desoxi-nucleósido *in vitro* en células HeLa (Tabla 14).

FIGURA 39: Soportes de 5'-O-DMTr-2'-desoxi-2'-fluoro A, C, G y U CPG para la síntesis oligonucleotídica. Estos soportes se usaron para las síntesis de secuencias seleccionadas enunciadas en las Tablas 6 y 7.

5 FIGURA 40: Bloques de construcción de conjugado de colesterol y ácido 5β-colánico (o colánico) para la conjugación a oligonucleótidos. Estos bloques de construcción se usaron para las síntesis de secuencias seleccionadas enunciadas en la Tabla 8.

FIGURA 41: Bloques de construcción de <sup>5Me</sup>C y <sup>5Me</sup>U RNA para la síntesis oligonucleotídica. Estos bloques de construcción se usaron para las síntesis de secuencias seleccionadas enunciadas en la Tabla 8.

10 FIGURA 42. Bloques de construcción de naproxeno-*trans*-4-hidroxi-L-prolinol y naproxeno-serinol para la conjugación a oligonucleótidos. Estos bloques de construcción se usaron para la síntesis de secuencias seleccionadas enunciadas en la Tabla 9.

15 FIGURA 43. Bloques de construcción de biotina-*trans*-4-hidroxi-L-prolinol y biotina-serinol para la conjugación a oligonucleótidos. Estos bloques de construcción se usaron para la síntesis de secuencias seleccionadas enunciadas en la Tabla 10.

FIGURA 44. Bloques de construcción para la conjugación post-sintética – enfoque oxímico. Estos bloques de construcción se usaron para la síntesis de secuencias seleccionadas enunciadas en la Tabla 11.

FIGURA 45. Bloques de construcción para la conjugación post-sintética – enfoque de éster activo. Estos bloques de construcción se usaron para la síntesis de secuencias seleccionadas enunciadas en la Tabla 12.

20 FIGURA 46. DFT amidito y CPG para la síntesis oligonucleotídica. Estos bloques de construcción se usaron para la síntesis de secuencias seleccionadas enunciadas en la Tabla 13.

FIGURA 47. 2'-Desoxi-2'-araf amidito para la síntesis oligonucleotídica. Estos bloques de construcción se usaron para la síntesis de secuencias seleccionadas enunciadas en la Tabla 14.

25 FIGURA 48. *P*-metilfosforamidito de <sup>5Me</sup>U y ribo C(N<sup>Ac</sup>). Estos bloques de construcción se usaron para la síntesis de secuencias seleccionadas enunciadas en la Tabla 15.

FIGURA 49. C5-aminoalil U amidito. Estos bloques de construcción se usaron para la síntesis de secuencias seleccionadas enunciadas en la Tabla 16.

FIGURA 50. Bloques de construcción del conjugado con tiocolésterol.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS TABLAS

30 La Tabla 1 proporciona las secuencias en el gen de VEGF que son seleccionadas como dianas por los agentes de la presente invención. Estas secuencias también pueden ser la hebra sentido de algunos de los agentes iRNA de la presente invención.

La Tabla 2 proporciona 123 dúplex de iRNA que tienen como diana al gen de VEGF, la secuencia diana en el gen de VEGF y datos de actividad que se describen en los Ejemplos.

35 La Tabla 3 proporciona dúplex de iRNA que se modifican para contener estabilizaciones de fosforotioato y datos de actividad que se describen en los Ejemplos.

La Tabla 4 proporciona dúplex de iRNA basados en el dúplex de AL-DP-4094 que se modifican para la estabilización, y datos de actividad que se describen en los Ejemplos.

40 La Tabla 5 proporciona datos de actividad de los dúplex de iRNA en células HeLa para varios agentes iRNA de la presente invención.

La Tabla 6 proporciona agentes iRNA con datos de actividad en células HeLa para agentes que contienen una o más modificaciones de fosforotioato, 2'-O-metilo y 2'-fluoro.

La Tabla 7 proporciona agentes iRNA con datos de actividad en células HeLa para agentes que contienen modificaciones alternas de 2'-O-metilo y 2'-fluoro.

45 Las Tablas 8 A y B proporcionan agentes iRNA con datos de actividad en células HeLa para agentes que contienen conjugados de colesterol o ácido colánico.

La Tabla 9 proporciona agentes iRNA con datos de actividad en células HeLa para agentes que contienen conjugados de naproxeno.

La Tabla 10 proporciona agentes iRNA con datos de actividad en células HeLa para agentes que contienen conjugados de biotina.

La Tabla 11 proporciona agentes iRNA que contienen conjugados aldehídicos, retinianos y otros retinoides.

La Tabla 12 proporciona agentes iRNA que contienen conjugados de polietilenglicol.

5 La Tabla 13 proporciona agentes iRNA con datos de actividad en células HeLa para agentes que contienen modificaciones ribo-difluorotolúílicas.

La Tabla 14 proporciona agentes iRNA con datos de actividad en células HeLa para agentes que contienen modificaciones de 2'-arafluoro-2'-desoxi-nucleósido.

La Tabla 15 proporciona agentes iRNA que contienen modificaciones de metilfosfonato.

10 La Tabla 16 proporciona agentes iRNA que contienen modificaciones C5 alilamínicas.

La Tabla 17 proporciona agentes iRNA que contienen una variedad y combinaciones de las modificaciones como se señalan en la Tabla.

La Tabla 18 proporciona la caracterización física de agentes iRNA que contienen una variedad y combinaciones de las modificaciones como se señalan en la Tabla.

15 DESCRIPCIÓN DETALLADA

(dsRNA) bicatenario dirige el silenciamiento de mRNA específico de secuencias a través de un procedimiento conocido como interferencia de RNA (RNAi). El procedimiento se produce en una amplia variedad de organismos, incluyendo mamíferos y otros vertebrados.

20 Se ha demostrado que fragmentos de 21-23 nt de dsRNA son mediadores específicos de secuencias del silenciamiento de RNA, *por ejemplo* provocando una degradación del RNA. Aunque no se desea estar atado por la teoría, puede ser que una señal molecular, que puede ser simplemente la longitud específica de los fragmentos, presente en estos fragmentos de 21-23 nt, reclute factores celulares que median RNAi. Se describen aquí métodos para preparar y administrar estos fragmentos de 21-23 nt, y otros agentes iRNAs, y su uso para inactivar específicamente la función génica. El uso de agentes iRNA u oligonucleótidos producidos recombinantemente o sintetizados químicamente de la misma naturaleza o de naturaleza similar permite la selección como diana de mRNAs específicos para el silenciamiento en células de mamíferos. Además, también se pueden usar fragmentos de agentes dsRNA más largos, *por ejemplo*, como se describe más abajo.

30 Aunque, en células de mamíferos, dsRNAs largos pueden inducir la respuesta de interferón, lo que frecuentemente es perjudicial, siRNAs no disparan la respuesta de interferón, al menos no en un grado que sea perjudicial para la célula y el hospedante. En particular, la longitud de las secuencias sentido y antisentido en un agente iRNA puede ser menor que 31, 30, 28, 25, ó 23 nt, *por ejemplo* suficientemente corta para evitar inducir una respuesta de interferón perjudicial. De este modo, la administración de una composición de agentes iRNA (*por ejemplo* formulados como se describe aquí) a una célula de mamífero se puede usar para silenciar la expresión de un gen diana mientras se evita la respuesta de interferón. Además, el uso de una especie discreta de agente iRNA se puede usar para seleccionar como diana de forma selectiva un alelo de un gen diana, *por ejemplo* en un sujeto heterocigoto para el alelo.

40 La secuencia complementaria de la diana (la secuencia antisentido) de un agente iRNA, tal como un dúplex iRNA, puede tener un 5' fosfato, y se puede utilizar ATP para mantener el resto de 5'-fosfato en el siRNA ((Nykanen et al., Cell 107:309, 2001); sin embargo, se ha demostrado que los agentes iRNA que carecen de un 5'-fosfato son activos cuando se introducen de forma exógena, sugiriendo que la 5'-fosforilación de los constructos de siRNA se puede producir *in vivo*.

45 Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). El VEGF, también conocido como factor de permeabilidad vascular, es un factor de crecimiento angiogénico. VEGF es una glucoproteína homodímera de 45 kDa, que existe en al menos tres isoformas diferentes. Las isoformas de VEGF se expresan en células endoteliales. El gen de VEGF contiene 8 exones que expresan una isoforma proteica de 189 aminoácidos. Una isoforma de 165 aminoácidos carece de los restos codificados por el exón 6, mientras que una isoforma de 121 aminoácidos carece de los restos codificados por los exones 6 y 7. VEGF145 es una isoforma que se predice que contiene 145 aminoácidos y carece del exón 7.

50 VEGF puede actuar sobre células endoteliales uniéndose a un receptor de tirosina cinasa endotelial, tal como Flt-1 (VEGFR-1) o KDR/flk-1 (VEGFR-2). VEGFR-2 se expresa en células endoteliales, y está implicado en la diferenciación de células endoteliales y vasculogénesis. Un tercer receptor, VEGFR3, ha sido implicado en la linfogénesis.

Las diversas isoformas tienen actividades biológicas e implicaciones clínicas diferentes. Por ejemplo, VEGF145 induce angiogénesis e igualmente VEGF189 (pero diferentemente de VEGF165) VEGF145 se une eficientemente a la matriz extracelular mediante un mecanismo que no depende de sulfatos de heparina asociados a la matriz extracelular. El mRNA que corresponde a la secuencia codificante de VEGF121 humano (número de acceso de Genbank AF214570, SEC ID NO:1) se muestra en la FIG. 1. VEGF presenta actividad como un mitógeno y quimioatrayente de células endoteliales *in vitro*, e induce permeabilidad vascular y angiogénesis *in vivo*. VEGF es segregado por una amplia variedad de tipos de células cancerosas, y promueve el crecimiento de tumores al inducir el desarrollo de vasculatura asociada a tumores. Se ha demostrado que la inhibición de la función de VEGF limita tanto el crecimiento de tumores experimentales primarios como la incidencia de metástasis en ratones inmunocomprometidos. VEGF es también expresado a niveles anormalmente elevados en enfermedades inflamatorias, tales como artritis reumatoide y psoriasis, y está implicado en la inflamación, vías respiratorias y remodelación vascular que se produce durante episodios asmáticos. La expresión elevada de VEGF también está correlacionada con varias formas de neovascularización ocular, que conduce a menudo a pérdida de visión grave, incluyendo retinopatía diabética, retinopatía de premadurez, y degeneración macular.

Agentes iRNA. Un "agente RNA", como se usa aquí, es un RNA sin modificar, RNA modificado, o un sustituto nucleosídico. Los ejemplos preferidos incluyen aquellos que tienen una mayor resistencia a la degradación con nucleasas que la que tienen los RNAs sin modificar. Los ejemplos preferidos incluyen aquellos que tienen una modificación de azúcar en 2', una modificación en un saliente monocatenario, preferiblemente un saliente monocatenario en 3', o, particularmente si es monocatenario, una modificación en 5' que incluye uno o más grupos fosfato o uno o más análogos de un grupo fosfato.

Un "agente iRNA", como se usa aquí, es un agente RNA que puede disminuir, o que se puede escindir en un agente RNA que puede disminuir, la expresión de un gen diana, preferiblemente un RNA diana endógeno o patógeno. Aunque no se desea estar atado por la teoría, un agente iRNA puede actuar mediante uno o más de un número de mecanismos, incluyendo escisión post-transcripcional de un mRNA diana, algunas veces denominada en la técnica como RNAi, o mecanismos pretranscripcionales o pretraduccionales. Un agente iRNA puede incluir una sola hebra, o puede incluir más de una hebra, *por ejemplo* puede ser un agente iRNA bicatenario. Si el agente iRNA es monocatenario, se prefiere particularmente que incluya una modificación en 5' que incluya uno o más grupos fosfato o uno o más análogos de un grupo fosfato.

El agente iRNA debería incluir una región de suficiente homología con el gen diana, y tener una longitud suficiente en términos de nucleótidos, de manera que el agente iRNA, o un fragmento del mismo, pueda mediar una disminución del gen diana. (Para facilidad de exposición, el término nucleótido o ribonucleótido se usa algunas veces aquí en referencia a una o más subunidades monómeras de un agente RNA. Se entenderá aquí que el uso del término "ribonucleótido" o "nucleótido" puede referirse aquí también, en el caso de un RNA modificado o un sustituto nucleotídico, a un nucleótido modificado, o un resto de sustitución suplente en una o más posiciones). De este modo, el agente iRNA es o incluye una región que es al menos parcialmente, y en algunas realizaciones totalmente, complementaria al RNA diana. No es necesario que haya una complementariedad perfecta entre el agente iRNA y la diana, pero la correspondencia debe ser suficiente para permitir que el agente iRNA, o un producto de escisión del mismo, dirija el silenciamiento específico de secuencias, *por ejemplo* mediante escisión por RNAi del RNA diana, *por ejemplo* mRNA.

La complementariedad, o grado de homología con la hebra diana, es muy crítica en la hebra antisentido. Aunque se desea a menudo la complementariedad perfecta, particularmente en la hebra antisentido, algunas realizaciones pueden incluir, particularmente en la hebra antisentido, uno o más, pero preferiblemente 6, 5, 4, 3, 2 o menos emparejamientos (con respecto al RNA diana). Los desemparejamientos, particularmente en la hebra antisentido, son muy tolerados en las regiones terminales, y, si están presentes, son preferiblemente en una región o regiones terminales, *por ejemplo* en 6, 5, 4 ó 3 nucleótidos del término 5' y/o 3'. La hebra sentido sólo necesita ser suficientemente complementaria con la hebra antisentido para mantener el carácter bicatenario global de la molécula.

Las regiones monocatenarias de un agente iRNA se modificarán a menudo o incluirán suplentes nucleotídicos, *por ejemplo* la región o regiones desapareadas de una estructura de horquilla de pelo, *por ejemplo* una región que enlaza dos regiones complementarias, pueden tener modificaciones o suplentes nucleosídicos. También está favorecida la modificación para estabilizar uno o más términos 3' o 5' de un agente iRNA, *por ejemplo* contra exonucleasas, o para favorecer el agente sRNA antisentido para que entre en RISC. Las modificaciones pueden incluir enlazadores de amino C3 (o C6, C7, C12), enlazadores de tiol, enlazadores carboxílicos, espaciadores no nucleotídicos (C3, C6, C9, C12, abásicos, trietilenglicol, hexaetilenglicol), reactivos especiales de biotina o de fluoresceína que aparecen como fosforamiditos y que pueden tener otro grupo hidroxilo protegido con DMT, que permiten múltiples acoplamientos durante la síntesis del RNA.

Los agentes iRNA incluyen: moléculas que son suficientemente largas para disparar la respuesta de interferón (que han sido escindidas por Dicer (Bernstein et al., Nature 409:363-366, 2001)) y entran en un RISC (complejo de silenciamiento inducido por RNAi); y moléculas que son suficientemente cortas de manera que no disparan la respuesta de interferón (moléculas las cuales también pueden ser escindidas por Dicer y/o entrar en un RISC), *por ejemplo* moléculas que son de un tamaño que permite la entrada en un RISC, *por ejemplo* moléculas que se

5 asemejan a productos de escisión por Dicer. Las moléculas que son suficientemente cortas de manera que no disparan una respuesta de interferón se denominan aquí agentes sRNA o agentes iRNA más cortos. "Agente sRNA o agente iRNA más corto", como se usa aquí, se refiere a un agente iRNA, *por ejemplo* un agente RNA bicatenario o un agente monocatenario, que es suficientemente corto de manera que no induce una respuesta de interferón perjudicial en una célula humana, *por ejemplo* tiene una región en dúplex de menos de 60 pero preferiblemente menos de 50, 40, ó 30 pares nucleotídicos. El agente sRNA, o su producto de escisión, puede disminuir un gen diana, *por ejemplo* induciendo RNAi con respecto a un RNA diana, preferiblemente un RNA diana endógeno o patógeno.

10 Cada hebra de un agente sRNA puede ser igual o menor que 30, 25, 24, 23, 22, 21, ó 20 nucleótidos en longitud. La hebra tiene preferiblemente una longitud de al menos 19 nucleótidos. Por ejemplo, cada hebra puede tener una longitud entre 21 y 25 nucleótidos. Los agentes sRNA preferidos tienen una región dúplex de 17, 18, 19, 29, 21, 22, 23, 24, ó 25 pares nucleotídicos, y uno o más salientes, preferiblemente uno o dos salientes en 3', de 2-3 nucleótidos.

15 Un "agente iRNA monocatenario", como se usa aquí, es un agente iRNA que está formado por una sola molécula. Puede incluir una región en dúplex, formada emparejando hebras de manera interna, *por ejemplo* puede ser, o incluir, una estructura de horquilla de pelo o de asa de sartén. Los agentes iRNA monocatenarios son preferiblemente antisentido con respecto a la molécula diana. En realizaciones preferidas, los agentes iRNA monocatenarios están fosforilados en 5' o incluyen un análogo fosforílico en el término de 5'. Las modificaciones con fosfato en 5' incluyen aquellas que son compatibles con el silenciamiento génico mediado por RISC. Las modificaciones adecuadas incluyen: 5'-monofosfato ((HO)2(O)P-O-5'); 5'-difosfato ((HO)2(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-trifosfato ((HO)2(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); una tapa de 5'-guanosina (7-metilada o no metilada) (7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-OP(HO)(O)-O-5'); una tapa de 5'-adenosina (A<sub>ppp</sub>), y cualquier estructura de tapa nucleotídica modificada o sin modificar (N-O-5'-(HO)(O)PO-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-monotiofosfato (fosfortioato; (HO)2(S)P-O-5'); 5'-monoditiofosfato (fosforditioato; (HO)(HS)(S)P-O-5'), 5'-fosfortiolato ((HO)2(O)P-S-5'); cualquier combinación adicional de monofosfato sustituido con oxígeno/azufre, difosfato y trifosfatos (*por ejemplo* 5'-alfa-tiotrifosfato, 5'-gamma-tiotrifosfato, etc.), 5'-fosforamidatos ((HO)2(O)P-NH-5', (HO)(NH2)(O)P-O-5'), 5'-alquilfosfonatos (R = alquilo = metilo, etilo, isopropilo, propilo, etc., *por ejemplo* RP(OH)(O)-O-5', (OH)2(O)P-5'-CH2-), 5'-alquileterfosfonatos (R = éter alquílico = metoximetilo (MeOCH2-), etoximetilo, etc., *por ejemplo* RP(OH)(O)-O-5'-). (Estas modificaciones también se pueden usar con la hebra antisentido de un iRNA bicatenario).

30 Un agente iRNA monocatenario debería ser suficientemente largo de manera que pueda entrar en el RISC y participar en la escisión de un mRNA diana mediada por RISC. Un agente iRNA monocatenario tiene al menos 14, y más preferiblemente al menos 15, 20, 25, 29, 35, 40, ó 50 nucleótidos. Preferiblemente tiene una longitud de menos de 200, 100 ó 60 nucleótidos.

35 Los agentes iRNA de horquilla de pelo tendrán una región dúplex igual o al menos 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, ó 25 pares nucleotídicos. La región dúplex tendrá preferiblemente una longitud igual o menor que 200, 100 ó 50. Los intervalos preferidos para la región dúplex son una longitud de 15-30, 17 a 23, 19 a 23, y 19 a 21 pares nucleotídicos. La horquilla de pelo tendrá preferiblemente una región desapareada monocatenaria saliente o terminal, preferiblemente el lado 3', y preferiblemente el lado antisentido de la horquilla de pelo. Los salientes preferidos tienen una longitud de 2-3 nucleótidos.

40 Un "agente iRNA bicatenario (ds)", como se usa aquí, es un agente iRNA que incluye más de una, y preferiblemente dos, hebras en las que la hibridación intercatenaria puede formar una región de estructura de dúplex.

45 Otras modificaciones adecuadas a un azúcar, base, o cadena principal de un agente iRNA se describen en la Solicitud PCT n° PCT/US2004/01193, presentada el 16 de enero de 2004, también nuestra. Un agente iRNA puede incluir una base de origen no natural, tal como las bases descritas en la Solicitud PCT n° PCT/US2004/011822, presentada el 16 de abril de 2004, también nuestra. Un agente iRNA puede incluir un azúcar de origen no natural, tal como una molécula portadora cíclica que no es un hidrato de carbono. Las características ejemplares de azúcares de origen no natural para uso en agentes iRNA se describen en la Solicitud PCT n° PCT/US2004/11829, presentada el 16 de abril de 2003, también nuestra.

50 Un agente iRNA puede incluir un enlace internucleotídico (*por ejemplo*, el enlace de fosfortioato quiral), útil para incrementar la resistencia a nucleasas. Además, o como alternativa, un agente iRNA puede incluir una imitación de ribosa para aumentar la resistencia a nucleasas. Los enlaces internucleotídicos e imitadores de ribosa ejemplares para aumentar la resistencia a nucleasas se describen en la Solicitud PCT n° PCT/US2004/07070, presentada el 8 de marzo de 2004, también nuestra.

55 Un agente iRNA puede tener una estructura ZXY, tal como se describe en la Solicitud PCT n° PCT/US2004/07070, presentada el 8 de marzo de 2004, también nuestra.

Un agente iRNA se puede complejar con un resto anfipático. Los restos anfipáticos ejemplares para uso con agentes iRNA se describen en la solicitud PCT n° PCT/US2004/07070, presentada el 8 de marzo de 2004, también nuestra.

El agente iRNA se puede complejar a un agente de suministro que presenta un complejo modular. El complejo puede incluir un agente portador enlazado a uno o más de (preferiblemente dos o más, más preferiblemente los tres de): (a) un agente de condensación (*por ejemplo*, un agente capaz de atraer, *por ejemplo* unirse a, un ácido nucleico, *por ejemplo* a través de interacciones iónicas o electrostáticas); (b) un agente fusógeno (*por ejemplo*, un agente capaz de fundirse y/o ser transportado a través de una membrana celular); y (c) un grupo seleccionador de dianas, *por ejemplo* un agente seleccionador de dianas celulares o tisulares, *por ejemplo* una lectina, glucoproteína, lípido o proteína, *por ejemplo* un anticuerpo, que se une a un tipo celular específico. Los agentes iRNA complejados a un agente de suministro se describen en la Solicitud PCT nº PCT/US2004/07070, presentada el 8 de marzo de 2004, también nuestra.

5

Un agente iRNA puede tener emparejamientos no canónicos, tal como entre las secuencias sentido y antisentido del dúplex de iRNA. Las características ejemplares de agentes iRNA no canónicos se describen en la Solicitud PCT nº PCT/US2004/07070, presentada el 8 de marzo de 2004, también nuestra.

10

Muchos de estos tipos de modificaciones se proporcionan en los Ejemplos y se describen en las Tablas 3-18.

#### Diseño de iRNA

La presente invención se basa en un paseo génico del gen de VEGF para identificar agentes iRNA activos que se pueden usar para reducir el nivel de VEGF mRNA en una célula. No todas las secuencias de agentes iRNA potenciales en el gen de VEGF son activas, teniendo también muchas de las cuales efectos fuera de diana significativos. La presente invención avanza la técnica al seleccionar aquellas secuencias que son activas y no tienen efectos fuera de diana significativos. Además, las secuencias escogidas por el agente iRNA de la presente invención están conservadas entre múltiples especies, permitiendo que se use un único agente para estudios con animales y toxicológicos, así como usarlo con fines terapéuticos en seres humanos.

15

20

Basándose en estos resultados, la invención proporciona específicamente un agente iRNA que se puede usar para tratar trastornos mediados por VEGF, particularmente en el ojo, tal como AMD, en forma aislada y como composición farmacéutica descrita más abajo. Tales agentes incluirán una hebra sentido que tiene al menos 15 o más nucleótidos contiguos que son complementarios al gen de VEGF, y una hebra antisentido que tiene al menos 15 o más nucleótidos contiguos que son complementarios a la secuencia de la hebra sentido. Son particularmente útiles los agentes iRNA que tienen una hebra sentido que comprende, consiste esencialmente o consiste en una secuencia nucleotídica proporcionada en la Tabla 1, tales como aquellos agentes señalados en la Tabla 2, o cualquiera de las modificaciones proporcionadas en las Tablas 3-18.

25

Los agentes iRNA candidatos se pueden diseñar llevando a cabo, como se hace aquí, un análisis de paseo génico del gen de VEGF que servirá como la diana de iRNA. Se pueden generar y ensayar agentes candidatos solapantes, adyacentes, o separados de forma estrecha, que corresponden a toda o parte de la región transcrita. Cada uno de los agentes iRNA se puede ensayar y evaluar para determinar la capacidad para disminuir la expresión génica diana (véase más abajo, "Evaluación de agentes iRNA candidatos").

30

Los agentes iRNA se basan en y comprenden al menos 15 o más nucleótidos contiguos de uno de los agentes iRNA que se muestra que es activo en la Tabla 2, o las secuencias modificadas proporcionadas en las Tablas 3-18. En tales agentes, el agente puede comprender, consistir o consistir esencialmente en toda la secuencia proporcionada en la Tabla, o puede comprender 15 o más restos contiguos junto con nucleótidos adicionales procedentes de regiones contiguas del gen diana.

35

Un agente iRNA se puede diseñar racionalmente basándose en la información de secuencia y las características deseadas y la información de la secuencia diana proporcionada en la Tabla 1. Por ejemplo, un agente iRNA se puede diseñar según la temperatura de fusión relativa del dúplex candidato. Generalmente, el dúplex debería tener una temperatura de fusión menor en el extremo 5' de la hebra antisentido que en el extremo 3' de la hebra antisentido.

40

En consecuencia, se describen agentes iRNA que comprenden una hebra sentido y una hebra antisentido, comprendiendo cada una una secuencia de al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 ó 23 nucleótidos, que es esencialmente idéntica a uno de los agentes proporcionados en la Tabla 1 ó 2.

45

La hebra antisentido de un agente iRNA debería tener una longitud igual o al menos 15, 16, 17, 18, 19, 25, 29, 40, ó 50 nucleótidos. Debería tener una longitud igual o menor que 50, 40 ó 30 nucleótidos. Los intervalos preferidos son una longitud de 15-30, 17 a 25, 19 a 23, y 19 a 21 nucleótidos. Los agentes iRNA ejemplificados incluyen aquellos que comprenden 15 o más nucleótidos de uno de los agentes en la Tabla 2 (o son complementarios a la secuencia diana proporcionada en la Tabla 1) pero no tienen una longitud mayor que 25 nucleótidos.

50

La hebra sentido de un agente iRNA debería ser igual a una longitud o tener una longitud al menos de 15, 16, 17, 18, 19, 25, 29, 40, ó 50 nucleótidos. Debería tener una longitud igual o menor que 50, 40 ó 30 nucleótidos. Los intervalos preferidos tienen una longitud de 15-30, 17 a 25, 19 a 23, y 19 a 21 nucleótidos. Los agentes iRNA ejemplificados incluyen aquellos que comprenden una longitud de 15 o más nucleótidos procedentes de los agentes en la Tabla 2 (o la secuencia diana en la Tabla 2) pero no más de 25 nucleótidos.

55

La porción bicatenaria de un agente iRNA debería tener una longitud igual o al menos 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 29, 40, ó 50 pares nucleotídicos. Debería tener una longitud igual o menor que 50, 40 ó 30 pares nucleotídicos. Los intervalos preferidos tienen una longitud de 15-30, 17 a 25, 19 a 23, y 19 a 21 pares nucleotídicos.

5 Los agentes proporcionados en la Tabla 2 tienen una longitud de 23 nucleótidos para cada hebra. Los agentes iRNA contienen una región bicatenaria de 21 nucleótidos, con un saliente de 2 nucleótidos en cada uno de los extremos 3' del agente. Estos agentes se pueden modificar como se describe aquí para obtener agentes equivalentes que comprenden al menos una porción de estas secuencias (15 o más nucleótidos contiguos) y/o modificaciones a las bases oligonucleotídicas y enlaces. Se prefieren particularmente la modificación en los agentes proporcionados en las Tablas 3-18.

10 Generalmente, los agentes iRNA incluyen una región de complementariedad suficiente con el gen de VEGF, y tienen una longitud suficiente en términos de nucleótidos de manera que el agente iRNA, o un fragmento del mismo, pueden mediar la disminución del gen de VEGF. Las hebras antisentido de los agentes iRNA de la presente invención son preferiblemente complementarias de forma total a las secuencias de mRNA del gen de VEGF. Sin embargo, no es necesario que haya perfecta complementariedad entre el agente iRNA y la diana, pero la correspondencia debe ser suficiente para permitir que el agente iRNA, o su producto de escisión, dirija el silenciamiento específico de la secuencia, *por ejemplo* mediante escisión por RNAi de un VEGF mRNA.

15 Por lo tanto, los agentes iRNA incluyen agentes que comprenden una hebra sentido y una hebra antisentido, comprendiendo cada una una secuencia de al menos 16, 17 ó 18 nucleótidos que es esencialmente idéntica, como se define más abajo, a una de las secuencias del gen de VEGF, tal como aquellos agentes proporcionados en la Tabla 2, excepto que no más de 1, 2 ó 3 nucleótidos por hebra, respectivamente, han sido sustituidos por otros nucleótidos (*por ejemplo* adenosina sustituida por uracilo), a la vez que se retiene esencialmente la capacidad para inhibir la expresión de VEGF. Por lo tanto, estos agentes poseerán al menos 15 o más nucleótidos idénticos al gen de VEGF, pero se introducen 1, 2 ó 3 desemparejamientos de bases con respecto a la secuencia de VEGF mRNA o entre la hebra sentido y antisentido. Los desemparejamientos con respecto a la secuencia de VEGF mRNA diana, particularmente en la hebra antisentido, son muy tolerados en las regiones terminales, y, si están presentes, están preferiblemente en una región o regiones terminales, *por ejemplo* en 6, 5, 4 ó 3 nucleótidos de un término 5' y/o 3', muy preferiblemente en 6, 5, 4, ó 3 nucleótidos del término 5' de la hebra sentido o el término 3' de la hebra antisentido. La hebra sentido sólo necesita ser suficientemente complementaria a la hebra antisentido para mantener el carácter bicatenario global de la molécula.

20 Se prefiere que las hebras sentido y antisentido se escojan de manera que el agente iRNA incluya una sola hebra o una región desapareada en uno o ambos extremos de la molécula, tales como se ejemplifican en la Tabla 2 (así como también las Tablas 3-18). De este modo, un agente iRNA contiene hebras sentido y antisentido, preferiblemente emparejadas para contener un saliente, *por ejemplo* uno o dos salientes en 5' o 3', pero preferiblemente un saliente en 3' de 2-3 nucleótidos. La mayoría de las realizaciones tendrán un saliente en 3'. Los agentes siRNA preferidos tendrán salientes monocatenarios, preferiblemente salientes en 3', de 1 a 4, o preferiblemente 2 ó 3 nucleótidos, en longitud, en uno o ambos extremos del agente iRNA. Los salientes pueden ser el resultado de que una hebra sea más larga que la otra, o el resultado de que las dos hebras de la misma longitud estén escalonadas. Los extremos en 5' están preferiblemente fosforilados.

25 La región en dúplex puede tener una longitud entre 15 y 30, muy preferiblemente 18, 19, 20, 21, 22, y 23 nucleótidos, *por ejemplo* en el intervalo del agente siRNA explicado anteriormente. También se incluyen realizaciones en las que las dos hebras del agente siRNA están enlazadas, *por ejemplo* enlazadas covalentemente. También están dentro de la invención las estructuras de horquilla de pelo u otras estructuras monocatenarias que proporcionan la región bicatenaria requerida, y preferiblemente un saliente en 3'.

30 Síntesis de agentes iRNA. Los oligonucleótidos (*por ejemplo*, ciertos oligonucleótidos modificados o porciones de ribonucleótidos que carecen de oligonucleótidos) se pueden sintetizar usando protocolos conocidos en la técnica, por ejemplo como se describe en Caruthers et al., *Methods in Enzymology* 211:3, 1992; Thompson et al., *Publicación PCT Internacional* nº WO 99/54459; Wincott et al., *Nucleic Acids Res.* 23:2677, 1995; Wincott et al., *Methods Mol. Bio.* 74:59, 1997; Brennan et al., *Biotechnol. Bioeng.* 61:33, 1998; y Brennan, patente U. S. nº 6.001.311. La síntesis de oligonucleótidos hace uso de grupos protectores y de acoplamiento de ácidos nucleicos habituales, tales como dimetoxitritilo en el extremo 5', y fosforamiditos en el extremo 3'.

35 El método de síntesis usado para RNA que incluye ciertos agentes iRNA de la invención sigue el procedimiento como se describe en Usman et al., *J. Chem. Soc.* 109:7845, 1987; Scaringe et al., *Nucleic Acids Res.* 18:5433, 1990; Wincott et al., *Nucleic Acids Res.* 23:2677, 1995; y Wincott et al., *Methods Mol. Bio.* 74:59, 1997; y hace uso de grupos protectores y de acoplamiento de ácidos nucleicos habituales, tales como dimetoxitritilo en el extremo 5', y fosforamiditos en el extremo 3'. En los Ejemplos se proporcionan descripciones detalladas de una variedad de métodos sintéticos para producir agentes iRNA modificados.

40 Como alternativa, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención se pueden sintetizar separadamente y se pueden unir juntas post-sintéticamente, por ejemplo mediante ligación (Moore et al., *Science* 256:9923, 1992; Draper et al., *publicación PCT Internacional* nº WO 93/23569; Shabarova et al., *Nucleic Acids Res.* 19:4247, 1991; Bellon et

al., Nucleosides & Nucleotides 16:951, 1997; Bellon et al., Bioconjugate 8:204, 1997), o mediante hibridación tras la síntesis y/o desprotección.

Un agente iRNA también se puede ensamblar a partir de dos secuencias o fragmentos de ácidos nucleicos distintos, en los que un fragmento incluye la región sentido y el segundo fragmento incluye la región antisentido del agente iRNA.

Los agentes iRNA se pueden modificar ampliamente para potenciar la estabilidad mediante modificación con grupos resistentes a nucleasas, por ejemplo 2'-amino, 2'-C-alilo, 2'-fluoro, difluorotoluido, 5-alilamino-pirimidinas, 2'-O-metilo, 2'-H (para un repaso, véase Usman y Cedergren, Trends in Biochem. Sci. 17:34, 1992). Los constructos de iRNA se pueden purificar mediante electroforesis en gel usando métodos generales, o se pueden purificar mediante cromatografía de líquidos a alta presión (HPLC; véase Wincott et al., *más arriba*), y se pueden resuspender en agua.

Los agentes iRNA se pueden expresar a partir de unidades de transcripción insertadas en vectores de DNA o RNA. Los vectores recombinantes pueden ser plásmidos de DNA o vectores víricos. Los vectores víricos que expresan el agente iRNA se pueden construir basándose, pero sin limitarse a, en virus adenoasociados, retrovirus, adenovirus, o alfavirus. Los vectores recombinantes capaces de expresar los agentes iRNA se pueden suministrar como se describe aquí, y persistir en células diana. Como alternativa, se pueden usar vectores víricos que proporcionan expresión transitoria de los agentes iRNA.

Evaluación de agentes iRNA. Cualquiera de los agentes iRNA descritos aquí se pueden evaluar y modificar según lo siguiente. Un agente iRNA puede ser susceptible a escisión mediante una endonucleasa o exonucleasa, tal como cuando se introduce el agente iRNA en el cuerpo de un sujeto. Se pueden usar métodos para determinar sitios de escisión, *por ejemplo* escisión endo- y exonucleolítica en un agente iRNA, y para determinar el mecanismo de escisión. Un agente iRNA se puede modificar para inhibir tal escisión.

Se puede evaluar un dsRNA, *por ejemplo* un agente iRNA, para identificar sitios que son susceptibles a la modificación, particularmente escisión, *por ejemplo* escisión mediante un componente encontrado en el cuerpo de un sujeto. El componente puede ser específico para un área particular del cuerpo, tal como un tejido particular, órgano, o fluido corporal (*por ejemplo*, sangre, plasma, o suero). Los sitios en un agente iRNA que son susceptibles a escisión, ya sea mediante escisión endonucleolítica o exonucleolítica, en ciertas áreas del cuerpo, pueden ser resistentes a la escisión en otras áreas del cuerpo.

Un método para evaluar un agente iRNA puede incluir: (1) determinar el punto o puntos en los que una sustancia presente en el cuerpo de un sujeto, y preferiblemente un componente presente en un compartimento del cuerpo en el que se va a introducir un dsRNA terapéutico (esto incluye compartimentos en los que el agente terapéutico se introduce directamente, *por ejemplo* la circulación, así como en compartimentos a los que se dirige eventualmente el agente terapéutico, *por ejemplo* el hígado o riñón; en algunos casos, *por ejemplo*, el ojo, los dos son el mismo), escinde un dsRNA, *por ejemplo* un agente iRNA; y (2) identificar uno o más puntos de escisión, *por ejemplo* endonucleolítica, exonucleolítica, o ambas, en el dsRNA. Opcionalmente, el método incluye además proporcionar un RNA (*por ejemplo*, un agente iRNA) modificado para inhibir la escisión en tales sitios.

Las etapas descritas anteriormente se pueden lograr usando uno o más de los siguientes ensayos:

(i)

(a) poniendo en contacto un dsRNA candidato, *por ejemplo* un agente iRNA, con un agente de ensayo (*por ejemplo*, un agente biológico),

(b) usando un ensayo a base de tamaños, *por ejemplo* electroforesis en gel, para determinar si el agente iRNA está escindido. En una realización preferida, se toma un transcurso de tiempo, y se aplica un número de muestras, incubadas durante diferentes tiempos, al ensayo a base de tamaños. En realizaciones preferidas, el dsRNA candidato no está marcado. El método puede ser un método "Stains All".

(ii)

(a) suministrando un dsRNA candidato, *por ejemplo*, un agente iRNA, que está radiomarcado;

(b) poniendo en contacto el dsRNA candidato con un agente de ensayo,

(c) usando un ensayo a base de tamaños, *por ejemplo* electroforesis en gel, para determinar si el agente iRNA está escindido. Se puede tomar un transcurso de tiempo, en el que se incuba un número de muestras durante tiempos diferentes y se aplica al ensayo a base de tamaños. La determinación se puede realizar en condiciones que permiten la determinación del número de nucleótidos presentes en un fragmento. Por ejemplo, una muestra incubada se hace pasar sobre un gel que tiene marcadores que permiten asignar la longitud de los productos escindidos. El gel puede incluir un patrón que es una digestión "escalera". Se puede marcar la hebra tanto sentido como antisentido. Preferiblemente, sólo

se marca una hebra en un experimento particular. El marcador se puede incorporar en el extremo 5', el extremo 3', o en una posición interna. La longitud de un fragmento (y de este modo el punto de escisión) se puede determinar a partir del tamaño del fragmento basándose en la escalera y el cartografiado usando una endonucleasa específica del sitio tal como RNAsa T1.

5 (iii) El fragmento producido por cualquier método, *por ejemplo* uno descrito aquí, *por ejemplo* uno de los anteriores, se puede analizar mediante espectrometría de masas. Tras el contacto del iRNA con el agente de ensayo, el iRNA se puede purificar (*por ejemplo*, se puede purificar parcialmente), tal como mediante extracción con fenol-cloroformo, seguido de la precipitación. Entonces se puede usar cromatografía de líquidos para separar los fragmentos, y se puede usar la espectrometría de masas para determinar la masa  
10 de cada fragmento. Esto permite la determinación del mecanismo de escisión, *por ejemplo* si es mediante escisión directa con fosfato, tal como mediante escisión con exonucleasa en 5' o 3', o mediada por la formación de un fosfato cíclico vía 2'OH.

La información que se refiere a un sitio de escisión se puede usar para seleccionar un átomo de la cadena principal, un azúcar o una base, para la modificación, *por ejemplo* una modificación para disminuir la escisión.

15 Las modificaciones ejemplares incluyen modificaciones que inhiben la degradación endonucleolítica, incluyendo las modificaciones descritas aquí. Las modificaciones particularmente favorecidas incluyen: modificación en 2', *por ejemplo* un nucleótido 2'-O-metilado o 2'-desoxinucleótido (*por ejemplo*, 2'-desoxicitodina), o un nucleótido 2'-fluoro, difluorotoluido, 5-Me-2'-pirimidinas, 5-alilamino-pirimidinas, 2'-O-metoxietílico, 2'-hidroxi, o 2'-ara-fluoro nucleótido, o un ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico alargado (ENA), ácido nucleico de hexosa (HNA), o ácido  
20 nucleico de ciclohexeno (CeNA). En una realización, la modificación de 2' está en la uridina de al menos un dinucleótido de 5'-uridina-adenina-3' (5'-UA-3'), al menos un dinucleótido de 5'-uridina-guanina-3' (5'-UG-3'), al menos un dinucleótido de 5'-uridina-uridina-3' (5'-UU-3'), o al menos un dinucleótido de 5'-uridina-citidina-3' (5'-UC-3'), o en la citidina de al menos un dinucleótido de 5'-citidina-adenina-3' (5'-CA-3'), al menos un dinucleótido de 5'-citidina-citidina-3' (5'-CC-3'), o al menos un dinucleótido de 5'-citidina-uridina-3' (5'-CU-3'). La modificación de 2'  
25 también se puede aplicar a todas las pirimidinas en un agente iRNA. En una realización preferida, la modificación de 2' es una modificación 2'OMe en la hebra sentido de un agente iRNA. En una realización más preferida, la modificación de 2' es una modificación 2' fluoro, y el 2' fluoro está en la hebra sentido o antisentido, o en ambas hebras.

30 La modificación de la cadena principal, *por ejemplo* con la sustitución de un O por un S en la cadena principal de fosfato, *por ejemplo* la provisión de una modificación de fosforotioato, se puede usar para inhibir la actividad de endonucleasas. En algunas realizaciones, un agente iRNA se ha modificado sustituyendo uno o más ribonucleótidos por desoxirribonucleótidos. Preferiblemente, los desoxirribonucleótidos adyacentes están unidos mediante enlaces de fosforotioato, y el agente iRNA no incluye más de cuatro desoxirribonucleótidos consecutivos en las hebras sentido o antisentido. La sustitución de la U por un enlazador C5 amino, la sustitución de una A por G (se prefieren  
35 cambios de secuencia localizados en la hebra sentido y no en la hebra antisentido), o la modificación del azúcar en la posición 2', 6', 7' u 8' pueden también inhibir la escisión del agente iRNA mediante endonucleasas. Las realizaciones preferidas son aquellas en las que está presente una o más de estas modificaciones en la hebra sentido pero no en la antisentido, o realizaciones en las que la hebra antisentido tiene muchas menos de tales modificaciones.

40 Las modificaciones ejemplares también incluyen aquellas que inhiben la degradación mediante exonucleasas. Aquí se pueden encontrar ejemplos de modificaciones que inhiben la degradación exonucleolítica. En una realización, un agente iRNA incluye un enlace de fosforotioato o una modificación P-alquílica en los enlaces entre uno o más de los nucleótidos terminales de un agente iRNA. En otra realización, uno o más nucleótidos terminales de un agente iRNA incluyen una modificación de azúcar, *por ejemplo* una modificación de azúcar en 2' o 3'. Las modificaciones de  
45 azúcar ejemplares incluyen, por ejemplo, un nucleótido 2'-O-metilado, un 2'-desoxinucleótido (*por ejemplo*, desoxicitodina), 2'-desoxi-2'-fluoro (2'-F) nucleótido, 2'-O-metoxietilo (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropilo (2'-O-AP), 2'-O-N-metilacetamido (2'-O-NMA), 2'-O-dimetilaminoetiloxietilo (2'-DMAEOE), 2'-O-dimetilaminoetilo (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropilo (2'-O-AP), 2'-hidroxi nucleótido, o un 2'-ara-fluoro nucleótido, o un ácido nucleico bloqueado (LNA), ácido nucleico alargado (ENA), ácido nucleico de hexosa (HNA), ácido nucleico ciclohexénico (CeNA). Una  
50 modificación en 2' es preferiblemente 2'OMe, más preferiblemente 2'fluoro.

Las modificaciones descritas para inhibir la escisión exonucleolítica se pueden combinar sobre un único agente iRNA. Por ejemplo en una realización, al menos un nucleótido terminal de un agente iRNA tiene un enlace de fosforotioato y una modificación de azúcar en 2', *por ejemplo* una modificación 2'F o 2'OMe. En otra realización, al menos un nucleótido terminal de un agente iRNA tiene una modificación 5'Me-pirimidina y una modificación de  
55 azúcar en 2', *por ejemplo* una modificación 2'F o 2'OMe.

Para inhibir la escisión mediante exonucleasas, un agente iRNA puede incluir una modificación de nucleobase, tal como una modificación catiónica, tal como una modificación catiónica 3'-abásica. La modificación catiónica puede ser, *por ejemplo*, un alquilamino-dT (*por ejemplo*, un C6 amino-dT), un conjugado alilamino, un conjugado de pirrolidina, un conjugado de ftalimido o de hidroxiprolinol, o uno o más de los nucleótidos terminales del agente  
60 iRNA. Un conjugado de alquilamino-dT está preferiblemente unido al extremo 3' de la hebra sentido o antisentido de



un agente iRNA. Un ligador de pirrolidina está preferiblemente unido al extremo 3' o 5' de la hebra sentido, o al extremo 3' de la hebra antisentido. Una alil amina uridina está preferiblemente en el extremo 3' o 5' de la hebra sentido, y no en el extremo 5' de la hebra antisentido.

5 El agente iRNA puede incluir un conjugado en uno o más de los nucleótidos terminales del agente iRNA. El conjugado puede ser, por ejemplo, un lipófilo, un terpeno, un agente de unión a proteína, una vitamina, un hidrato de carbono, un retinoide, o un péptido. Por ejemplo, el conjugado puede ser naproxeno, nitroindol (u otro conjugado que contribuye a apilar las interacciones), folato, ibuprofeno, colesterol, retinoides, PEG, o un ligador de C5 pirimidina. En otras realizaciones, los conjugados son conjugados de lípidos glicéridos (*por ejemplo* derivados de dialquil glicérido), conjugados de vitamina E, o tiocolesteroles. Preferiblemente, los conjugados están en el extremo 3' de la hebra antisentido, o en el extremo 5' o 3' de la hebra sentido, y preferiblemente los conjugados no están en el extremo 3' de la hebra antisentido y en el extremo 3' de la hebra sentido.

15 En una realización, el conjugado es naproxeno, y el conjugado está preferiblemente en el extremo 5' o 3' de las hebras sentido o antisentido. En una realización, el conjugado es colesterol, y el conjugado está preferiblemente en el extremo 5' o 3' de la hebra sentido y no está preferiblemente en la hebra antisentido. En algunas realizaciones, el colesterol está conjugado al agente iRNA mediante un enlazador de pirrolidina, o un enlazador de serinol, aminooxi, o un enlazador de hidroxiprolinol. En otras realizaciones, el conjugado es un dU-colesterol, o el colesterol está conjugado al agente iRNA mediante un enlace de disulfuro. En otra realización, el conjugado es ácido colánico, y el ácido colánico está unido al extremo 5' o 3' de la hebra sentido, o al extremo 3' de la hebra antisentido. En una realización, el ácido colánico está unido al extremo 3' de la hebra sentido y al extremo 3' de la hebra antisentido. En otra realización, el conjugado es PEG5, PEG20, naproxeno o retinal.

20 Uno o más nucleótidos terminales pueden tener un enlace 2'-5'. Preferiblemente, un enlace 2'-5' aparece en la hebra sentido, *por ejemplo* el extremo 5' de la hebra sentido.

El agente iRNA puede incluir un L-azúcar, preferiblemente en el extremo 5' o 3' de la hebra sentido.

25 El agente iRNA puede incluir un metilfosfonato en uno o más nucleótidos terminales para potenciar la resistencia a exonucleasas, *por ejemplo* en el extremo 3' de las hebras sentido o antisentido del agente iRNA.

Un agente iRNA se puede haber modificado sustituyendo uno o más ribonucleótidos por desoxirribonucleótidos. Preferiblemente, los desoxirribonucleótidos adyacentes están unidos mediante enlaces de fosforotioato, y el agente iRNA no incluye más de cuatro desoxirribonucleótidos consecutivos en las hebras sentido o antisentido.

30 Un agente iRNA que tiene una mayor estabilidad en células y muestras biológicas puede incluir una modificación de difluorotoluido (DFT), *por ejemplo* 2,4-difluorotoluidil uradilo, o una sustitución de guanidina a inosina.

Los métodos descritos se pueden usar para seleccionar y/u optimizar un dsRNA terapéutico, *por ejemplo* un agente iRNA. Los dsRNAs, *por ejemplo* agentes iRNA, obtenidos mediante un método descrito aquí están dentro de la invención.

35 Los métodos se pueden usar para evaluar un dsRNA candidato, *por ejemplo* un agente iRNA candidato, que no está modificado, o que incluye una modificación, *por ejemplo* una modificación que inhibe la degradación, selecciona como diana la molécula de dsRNA, o modula la hibridación. Tales modificaciones se describen aquí. Se puede combinar un ensayo de escisión con un ensayo para determinar la capacidad de un candidato modificado o no modificado para silenciar la diana. Por ejemplo, se puede (opcionalmente) ensayar un candidato para evaluar su capacidad para silenciar una diana (o secuencia fuera de diana), evaluar su susceptibilidad a la escisión, modificarlo (*por ejemplo*, como se describe aquí, *por ejemplo* para inhibir la degradación) para producir un candidato modificado, y ensayar el candidato modificado en busca de la capacidad para silenciar así como la capacidad para resistir la degradación. El procedimiento se puede repetir. Las modificaciones se pueden introducir una cada vez o en grupos. A menudo será conveniente usar un método a base de células para monitorizar la capacidad para silenciar un RNA diana. Esto puede ser seguido por un método diferente, *por ejemplo* un método de animal completo, para confirmar la actividad.

45 La información sobre sitios de escisión obtenida mediante un método descrito aquí se puede usar para modificar un dsRNA, *por ejemplo* un agente iRNA.

50 Optimización de la actividad de las moléculas de ácido nucleico de la invención. Las moléculas de ácido nucleico químicamente sintetizadas con modificaciones (base, azúcar y/o fosfato) pueden evitar su degradación mediante ribonucleasas del suero, que pueden incrementar su potencia (véase, *por ejemplo*, Eckstein et al., Publicación Internacional nº WO 92/07065; Perrault et al., Nature 344:565, 1990; Phieken et al., Science 253:314, 1991; Usman y Cedergren, Trends in Biochem. Sci. 17:334, 1992; Usman et al., Publicación Internacional nº WO 93/15187; y Rossi et al., Publicación Internacional nº WO 91/03162; Sproat, patente U.S. nº 5.334.711; Gold et al., patente U.S. nº 6.300.074; y Burgin et al., *más arriba*). Todas las referencias anteriores describen diversas modificaciones químicas que se pueden hacer a los restos de base, de fosfato y/o de azúcar de las moléculas de ácido nucleico descritas aquí. Se desean modificaciones que potencian su eficacia en células, y la eliminación de bases de las moléculas de ácido nucleico para acortar tiempos de la síntesis oligonucleotídica y reducir los requisitos químicos.

Igualmente se describen aquí otras modificaciones adecuadas a un azúcar, base, o cadena principal de un agente iRNA.

Hay varios ejemplos en la técnica que describen modificaciones de azúcar, de base y de fosfato que se pueden introducir en moléculas de ácido nucleico con una potenciación significativa de su estabilidad a nucleasas y eficacia. Por ejemplo, los oligonucleótidos se modifican para potenciar la estabilidad y/o potenciar la actividad biológica mediante modificación con grupos resistentes a nucleasas, por ejemplo modificaciones de bases nucleotídicas 2'-amino, 2'-C-alilo, 2'-fluoro, 2'-O-metilo 2'-O-alilo, 2'-H, (para un repaso, véanse Usman y Cedergren, Trends in Biochem. Sci. 17:34, 1992; Usman et al., Nucleic Acids Symp. Ser. 31:163, 1994; Burgin et al., Biochemistry 35:14090, 1996). La modificación de azúcares de moléculas de ácido nucleico se ha descrito ampliamente en la técnica (véanse Eckstein et al., Publicación Internacional PCT n° WO 92/07065; Perrault et al., Nature 344:565, 1990; Pieken et al. Science 253:314, 1991; Usman y Cedergren, Trends in Biochem. Sci. 17:334, 1992; Usman et al., Publicación Internacional PCT n° WO93/15187; Sproat, patente U.S. n° 5.334.711, y Beigelman et al., J. Biol. Chem. 270:25702, 1995; Beigelman et al., Publicación Internacional PCT n° WO 97/26270; Beigelman et al., patente U.S. n° 5.716.824; Usman et al., patente U.S. n° 5.627.053; Woolf et al., Publicación Internacional PCT n° WO 98/13526; Karpeisky et al., Tetrahedron Lett. 39:1131, 1998; Earnshaw y Gait, Biopolymers (Nucleic Acid Sciences) 48:39, 1998; Verma y Eckstein, Annu. Rev. Biochem. 67:99, 1998; y Burlina et al., Bioorg. Med. Chem. 5:1999, 1997). Tales publicaciones describen métodos generales y estrategias para determinar la localización de la incorporación de modificaciones de azúcares, de bases y/o de fosfatos y similares en moléculas de ácido nucleico sin catálisis modulante. A la vista de tales enseñanzas, se pueden usar modificaciones similares como se describe aquí para modificar las moléculas de ácido nucleico de iRNA de la actual invención en tanto que no se vea significativamente inhibida la capacidad de los agentes iRNA para promover RNAi en las células.

Mientras que la modificación química de los enlaces internucleotídicos de oligonucleótidos con enlaces de fosforotioato, de fosforoditioato, y/o de 5'metilfosfonato mejora la estabilidad, las modificaciones excesivas pueden provocar cierta toxicidad o una actividad disminuida. Por lo tanto, cuando se diseñan moléculas de ácido nucleico, se debería de minimizar la cantidad de estos enlaces internucleotídicos. La reducción en la concentración de estos enlaces debería disminuir la toxicidad, dando como resultado una mayor eficacia y mayor especificidad de estas moléculas.

Los extremos 3' y 5' de un agente iRNA se pueden modificar. Tales modificaciones pueden estar en el extremo 3', en el extremo 5', o en ambos extremos de la molécula. Pueden incluir la modificación o sustitución e un fosfato terminal completo, o de uno o más de los átomos del grupo fosfato. Por ejemplo, los extremos 3' y 5' de un oligonucleótido se pueden conjugar a otras entidades moleculares funcionales tales como restos marcadores, *por ejemplo* fluoróforos (*por ejemplo*, pireno, TAMRA, fluoresceína, colorantes Cy3 o Cy5) o grupos protectores (basados, *por ejemplo*, en azufre, silicio, boro o éster). Las entidades moleculares funcionales se pueden unir al azúcar mediante un grupo fosfato y/o mediante un espaciador. El átomo terminal del espaciador se puede conectar a o sustituir al átomo enlazante del grupo fosfato o al grupo C-3' o C-5' O, N, S o C del azúcar. Como alternativa, el espaciador puede conectarse a o sustituir el átomo terminal de un suplente nucleotídico (*por ejemplo*, PNA's). Estos espaciadores o enlazadores pueden incluir, *por ejemplo*, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>N-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>O-, -(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>S-, O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH (*por ejemplo*, n = 3 ó 6), azúcares abásicos, amida, carboxi, amina, oxiamina, oxiamina, tioéter, disulfuro, tiourea, sulfonamida, o morfolino, o biotina y reactivos de fluoresceína. Cuando se interpone un conjunto espaciador/fosfato-entidad molecular funcional-espaciador/fosfato entre dos secuencias de un agente iRNA, el conjunto puede sustituir un bucle de RNA de horquilla de pelo en un agente RNA de tipo horquilla de pelo. El extremo 3' puede ser un grupo -OH. Aunque no se desea estar atados por la teoría, se cree que la conjugación de ciertos restos puede mejorar las propiedades de transporte, hibridación y especificidad. Nuevamente, aunque no se desea estar atados por la teoría, puede ser deseable introducir alteraciones terminales que mejoren la resistencia a nucleasas. Otros ejemplos de modificaciones terminales incluyen colorantes, agentes intercalantes (*por ejemplo*, acridinas), agentes de reticulación (*por ejemplo* psoraleno, mitomicina C, porfirinas (TPPC4, texafirina, safirina), hidrocarburos aromáticos policíclicos (*por ejemplo*, fenazina, dihidrofenazina), endonucleasas artificiales (*por ejemplo*, EDTA), portadores lipófilos (*por ejemplo*, colesterol, ácido cólico, adamantano, ácido acético, ácido 1-pireno butírico, dihidrotestosterona, 1,3-bis-O(hexadecil)glicerol, grupo geraniloxihexilo, hexadecilglicerol, borneol, mentol, 1,3-propanodiol, grupo heptadecilo, ácido palmítico, ácido mirístico, ácido O3-(oleil)litocólico, ácido O3-(oleil)colénico, dimetoxitritilo, o fenoxazina) y conjugados peptídicos (*por ejemplo*, péptido de antennapedia, péptido Tat), agentes alquilantes, fosfato, amino, mercapto, PEG (*por ejemplo*, PEG-40K), MPEG, [MPEG]<sub>2</sub>, poliamino, alquilo, alquilo sustituido, marcadores radiomarcados, enzimas, haptenos (*por ejemplo*, biotina), facilitadores del transporte/absorción (*por ejemplo*, aspirina, vitamina E, ácido fólico), y ribonucleasas sintéticas (*por ejemplo*, imidazol, bisimidazol, histamina, agrupaciones de imidazol, conjugados de acridina-imidazol, complejos de tetraazamacrociclos con Eu<sup>3+</sup>). En algunas realizaciones, los conjugados tales como retinol o ácido retinoico se pueden unir al extremo 5' o 3', o a ambos extremos, de un agente iRNA. El uso de tales conjugados puede mejorar la captación específica y el suministro de agentes iRNA a las células que expresan receptores de retinol, tales como células epiteliales de pigmentos retinianos.

Se pueden añadir modificaciones terminales por varias razones, tales como modular la actividad o modular la resistencia a la degradación. Las modificaciones terminales útiles para modular la actividad incluyen la modificación del extremo 5' con fosfato o análogos de fosfato. Por ejemplo, en realizaciones preferidas, los agentes iRNA, especialmente secuencias antisentido, se fosforilan en 5' o incluyen un análogo fosforílico en el término 5'. Las

modificaciones con fosfato en 5' incluyen aquellas que son compatibles con el silenciamiento génico mediado por RISC. Las modificaciones adecuadas incluyen: 5'-monofosfato ((HO)<sub>2</sub>(O)P-O-5'); 5'-difosfato ((HO)<sub>2</sub>(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-trifosfato ((HO)<sub>2</sub>(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); tapa de 5'-guanosina (7-metilada o no metilada) (7m-G-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); tapa de 5'-adenosina (A<sub>pp</sub>), y cualquier estructura de tapa nucleotídica modificada o sin modificar (N-O-5'-(HO)(O)P-O-(HO)(O)P-O-P(HO)(O)-O-5'); 5'-monotiofosfato (fosfortioato; (HO)<sub>2</sub>(S)P-O-5'); 5'-monoditiofosfato (fosforditioato; (HO)(HS)(S)P-O-5'), 5'-fosfortiolato ((HO)<sub>2</sub>(O)P-S-5'); cualquier combinación adicional de monofosfato sustituido con oxígeno/azufre, difosfato y trifosfatos (*por ejemplo* 5'-alfa-tiotrifosfato, 5'-gamma-tiotrifosfato, etc.), 5'-fosforamidatos ((HO)<sub>2</sub>(O)P-NH-5', (HO)(NH<sub>2</sub>)(O)P-O-5'), 5'-alquilfosfonatos (R = alquilo = metilo, etilo, isopropilo, propilo, etc., *por ejemplo* RP(OH)(O)-O-5', (OH)<sub>2</sub>(O)P-5'-CH<sub>2</sub>-), 5'-alquileterfosfonatos (R = éter alquílico = metoximetilo (MeOCH<sub>2</sub>-), etoximetilo, etc., *por ejemplo*

También se describen conjugados y/o complejos de agentes iRNA de la invención. Tales conjugados y/o complejos se pueden usar para facilitar el suministro de agentes iRNA a un sistema biológico, tal como una célula. Los conjugados y complejos proporcionados por la actual invención pueden proporcionar actividad terapéutica transfiriendo compuestos terapéuticos a través de membranas celulares, alterando la farmacocinética, y/o modulando la localización de moléculas de ácido nucleico de la invención. La presente invención engloba el diseño y síntesis de nuevos conjugados y complejos para el suministro de moléculas, incluyendo, pero sin limitarse a, moléculas pequeñas, lípidos, fosfolípidos, nucleósidos, nucleótidos, ácidos nucleicos, anticuerpos, toxinas, polímeros cargados negativamente y otros polímeros, *por ejemplo* proteínas, péptidos, hormonas, hidratos de carbono, polietilenglicoles, o poliaminas, a través de las membranas celulares. En general, los transportadores descritos se diseñan para ser usados individualmente o como parte de un sistema de múltiples componentes, con o sin enlazadores degradables. Se espera que estos compuestos mejoren el suministro y/o localización de moléculas de ácido nucleico de la invención en un número de tipos celulares que se originan a partir de diferentes tejidos, en presencia o ausencia de suero (véase Sullenger y Cech, patente U.S. n° 5.854.038). Los conjugados de las moléculas descritas aquí se pueden unir a moléculas biológicamente activas vía enlazadores que son biodegradables, tales como moléculas enlazadoras de ácidos nucleicos biodegradables.

Administración de los agentes iRNA. Un paciente que ha sido diagnosticado con un trastorno caracterizado por la expresión indeseada de VEGF se puede tratar mediante la administración de un agente iRNA descrito aquí para bloquear los efectos negativos de VEGF, aliviando de ese modo los síntomas asociados con la expresión génica indeseada de VEGF. *Por ejemplo*, el agente iRNA puede aliviar los síntomas asociados con una enfermedad del ojo, tal como un trastorno neovascular. En otros ejemplos, el agente iRNA se puede administrar para tratar un paciente que tiene un tumor o cáncer metastásico, tal como cáncer de colon o de mama; una enfermedad pulmonar, tal como asma o bronquitis; o una enfermedad autoinmunitaria tal como artritis reumatoide o psoriasis. Los agentes iRNA anti-VEGF se pueden administrar sistémicamente, *por ejemplo* oralmente o mediante inyección intramuscular o mediante inyección intravenosa, en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable adaptado para la vía de administración. Un agente iRNA puede comprender un vehículo de suministro, incluyendo liposomas, para la administración a un sujeto, portadores y diluyentes y sus sales, y/o puede estar presente en formulaciones farmacéuticamente aceptables. Los métodos para el suministro de moléculas de ácido nucleico se describen en Akhtar et al., Trends in Cell Bio. 2:139, 1992; Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar, 1995; Maurer et al., Mol. Membr. Biol., 16:129, 1999; Hofland y Huang, Handb. Exp. Pharmacol. 137:165, 1999; y Lee et al., ACS Symp. Ser. 752:184, 2000. Beigelman et al., patente U.S. n° 6.395.713 y Sullivan et al., PCT WO 94/02595 describen además los métodos generales para suministrar moléculas de ácido nucleico. Las moléculas de ácido nucleico se pueden administrar a células mediante una variedad de métodos conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, pero sin restringirse a, encapsulamiento en liposomas, mediante iontoforesis, o mediante incorporación en otros vehículos, tales como hidrogeles, ciclodextrinas (véase, *por ejemplo*, Gonzalez et al., Bioconjugate Chem. 10:1068, 1999), nanocápsulas biodegradables, y microesferas bioadhesivas, o mediante vectores proteínicos (O'Hare y Normand, Publicación Internacional PCT n° WO 00/53722).

En los presentes métodos, el agente iRNA se puede administrar al sujeto como agente iRNA desnudo, junto con un agente de suministro, o como un vector plasmídico o vírico recombinante que expresa el agente iRNA. Preferiblemente, el agente iRNA se administra como iRNA desnudo.

El agente iRNA de la invención se puede administrar al sujeto por cualquier medio adecuado para suministrar el agente iRNA a las células del tejido en o cerca del área de la expresión indeseada de VEGF, tal como en o cerca de un área de neovascularización. *Por ejemplo*, el agente iRNA se puede administrar mediante una pistola génica, electroporación, o mediante otras vías de administración parenterales.

Las vías de administración entéricas adecuadas incluyen el suministro oral.

Las vías de administración parenterales adecuadas incluyen la administración intravascular (*por ejemplo*, inyección de bolo intravenoso, infusión intravenosa, inyección de bolo intraarterial, infusión intraarterial e instilación mediante catéter en la vasculatura); inyección peri- e intratisular (*por ejemplo*, inyección intraocular, inyección intrarretiniana, o inyección subretiniana); inyección subcutánea o deposición, incluyendo infusión subcutánea (tal como mediante bombas osmóticas); aplicación directa al área en o próxima al sitio de neovascularización, *por ejemplo* mediante un catéter u otro dispositivo de colocación (*por ejemplo*, un pelete retiniano o un implante que comprende un material

poroso, no poroso, o gelatinoso). Se prefiere que las inyecciones o infusiones del agente iRNA se administren en o cerca del sitio de neovascularización.

5 El agente iRNA de la invención se puede suministrar usando un implante intraocular. Tales implantes pueden ser implantes biodegradables y/o biocompatibles, o pueden ser implantes no biodegradables. Los implantes pueden ser permeables o impermeables al agente activo, y se pueden insertar en una cámara del ojo, tal como las cámaras anterior o posterior, o se pueden implantar en la esclera, espacio transcoroidal, o en una región avascularizada exterior al vítreo. En una realización preferida, el implante se puede colocar sobre una región avascular, tal como sobre la esclera, para permitir la difusión transcleral del fármaco al sitio deseado de tratamiento, *por ejemplo* el espacio intraocular y la mácula del ojo. Además, el sitio de difusión transcleral está preferiblemente próximo a la mácula.

10 El agente iRNA de la invención también se puede administrar tópicamente, por ejemplo mediante parche o mediante aplicación directa al ojo, o mediante iontoforesis. Los ungüentos, pulverizaciones, o líquidos en gotas se pueden suministrar mediante sistemas de suministro oculares conocidos en la técnica, tales como aplicadores o goteros para ojos. Las composiciones se pueden administrar directamente a la superficie del ojo o al interior del párpado. Tales composiciones pueden incluir mucomiméticos tales como ácido hialurónico, sulfato de condroitina, hidroxipropilmetilcelulosa o poli(alcohol vinílico), conservantes tales como ácido sórbico, EDTA o cloruro de bencilcronio, y las cantidades habituales de diluyentes y/o vehículos.

15 El agente iRNA de la invención se puede proporcionar en composiciones de liberación sostenida, tales como las descritas en, por ejemplo, las patentes U.S. n<sup>os</sup> 5.672.659 y 5.595.760. El uso de composiciones de liberación inmediata o sostenida depende de la naturaleza de la afección que se esté tratando. Si la afección consiste en un trastorno agudo o hiperagudo, el tratamiento con una forma de liberación inmediata se preferirá con respecto a una composición de liberación prolongada. Como alternativa, para ciertos tratamientos preventivos o a largo plazo, puede ser apropiada una composición de liberación sostenida.

20 Un agente iRNA se puede inyectar al interior del ojo, tal como con una aguja u otro dispositivo de suministro.

25 El agente iRNA de la invención se puede administrar en una única dosis o en múltiples dosis. Cuando la administración del agente iRNA de la invención es mediante infusión, la infusión puede ser una única dosis sostenida, o se puede suministrar mediante múltiples infusiones. Se prefiere la inyección del agente directamente en el tejido en o cerca del sitio de neovascularización. También se prefieren múltiples inyecciones del agente en el tejido en o cerca del sitio de neovascularización.

30 Los niveles de dosificación del orden de alrededor de 1 µg/kg a 100 mg/kg de peso corporal por administración son útiles en el tratamiento de enfermedades neovasculares. Cuando se administra directamente al ojo, el intervalo de dosificación preferido es alrededor de 0,00001 mg a alrededor de 3 mg por ojo, o preferiblemente alrededor de 0,0001-0,001 mg por ojo, alrededor de 0,03-3,0 mg por ojo, alrededor de 0,1-3,0 mg por ojo, o alrededor de 0,3-3,0 mg por ojo. Un experto en la técnica también puede determinar fácilmente un régimen de dosificación apropiado para administrar el agente iRNA de la invención a un sujeto dado. Por ejemplo, el agente iRNA se puede administrar al sujeto una vez, por ejemplo como una única inyección o deposición en o cerca del sitio de neovascularización. Como alternativa, el agente iRNA se puede administrar una vez o dos veces al día a un sujeto durante un período de alrededor de tres a alrededor de veintiocho días, más preferiblemente de alrededor de siete a alrededor de diez días. En un régimen de dosificación preferido, el agente iRNA se inyecta en o cerca de un sitio de expresión indeseada de VEGF (tal como cerca de un sitio de neovascularización), una vez al día durante siete días. Cuando un régimen de dosificación comprende múltiples administraciones, se entiende que la cantidad eficaz de agente iRNA administrada al sujeto puede comprender la cantidad total de agente iRNA administrada a lo largo de todo el régimen de dosificación. Un experto en la técnica apreciará que las dosis individuales exactas se pueden ajustar en cierto modo dependiendo de una variedad de factores, incluyendo el agente iRNA específico que se administra, el tiempo de administración, la vía de administración, la naturaleza de la formulación, la velocidad de excreción, el trastorno particular que se está tratando, la gravedad del trastorno, la farmacodinámica del agente iRNA, y la edad, sexo, peso, y salud general del paciente. Se han de esperar amplias variaciones en el nivel de dosificación necesario a la vista de las eficiencias diferentes de las diversas vías de administración. Por ejemplo, generalmente se esperaría que la administración oral requiera niveles de dosificación mayores que la administración mediante inyección intravenosa o intravítrea. Las variaciones en estos niveles de dosificación se pueden ajustar usando rutinas de optimización empíricas estándar, que son bien conocidas en la técnica. Los niveles de dosificación y patrones precisos terapéuticamente eficaces se determinan preferiblemente por el médico en consideración a los factores identificados anteriormente.

35 40 45 50 55 Además de tratar enfermedades neovasculares preexistentes, los agentes iRNA de la invención se pueden administrar profilácticamente a fin de prevenir o ralentizar el comienzo de estos trastornos y trastornos relacionados. En aplicaciones profilácticas, un iRNA de la invención se administra a un paciente susceptible a o de otro modo con riesgo de una enfermedad neovascular particular.

Los agentes iRNA presentados por la invención se formulan preferiblemente como composiciones farmacéuticas antes de administrarlas a un sujeto, según técnicas conocidas en la técnica. Las composiciones farmacéuticas de la

presente invención se caracterizan como al menos estériles y libres de pirógenos. Como se usa aquí, "formulaciones farmacéuticas" incluye formulaciones para uso humano y veterinario. Los métodos para preparar composiciones farmacéuticas de la invención están dentro de la pericia en la técnica, por ejemplo como se describe en Remington's Pharmaceutical Science, 18ª ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1990), y The Science and Practice of Pharmacy, 2003, Gennaro et al.

Las presentes formulaciones farmacéuticas comprenden un agente iRNA de la invención (*por ejemplo*, 0,1 a 90% en peso), o una sal fisiológicamente aceptable del mismo, mezclado con un medio portador fisiológicamente aceptable. Los medios portadores fisiológicamente aceptables preferidos son agua, agua tamponada, disolución salina normal, disolución salina al 0,4%, glicina al 0,3%, ácido hialurónico, y similares.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden comprender excipientes y/o aditivos farmacéuticos convencionales. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen estabilizantes, antioxidantes, agentes que ajustan la osmolalidad, tampones, y agentes que ajustan el pH. Los aditivos adecuados incluyen tampones fisiológicamente biocompatibles (*por ejemplo*, hidrocloreto de trometamina), adiciones de quelantes (tales como, *por ejemplo*, DTPA o DTPA-bisamida) o complejos de quelatos de calcio (como *por ejemplo* DTPA de calcio, CaNaDTPA-bisamida), u, opcionalmente, adiciones de sales de calcio o de sodio (*por ejemplo*, cloruro de calcio, ascorbato de calcio, gluconato de calcio o lactato de calcio). Las composiciones farmacéuticas de la invención se pueden envasar para uso en forma líquida, o se pueden liofilizar.

Para composiciones sólidas, se pueden usar vehículos sólidos no tóxicos convencionales; *por ejemplo*, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio, y similar.

*Por ejemplo*, una composición farmacéutica sólida para administración oral puede comprender cualquiera de los vehículos y excipientes enumerados anteriormente, y 10-95%, preferiblemente 25%-75%, de uno o más agentes iRNA de la invención.

*Por "formulación farmacéuticamente aceptable"* se quiere decir una composición o formulación que permite la distribución eficaz de las moléculas de ácido nucleico de la actual invención en la localización física más adecuada para su actividad deseada. Los ejemplos no limitantes de agentes adecuados para la formulación con las moléculas de ácido nucleico de la actual invención incluyen: inhibidores de P-glucoproteínas (tales como PluronicP85), que pueden potenciar la entrada de fármacos en el SNC (Jolliet-Riant y Tillement, *Fundam. Clin. Pharmacol.* 13:16, 1999); polímeros biodegradables, tales como microesferas de poli(DL-lactida-co-glicolida) para el suministro de liberación sostenida. Otros ejemplos no limitantes de estrategias de suministro para las moléculas de ácido nucleico de la actual invención incluyen material descrito en Boado et al., *J. Pharm. Sci.* 87:1308, 1998; Tyler et al., *FEBS Lett.* 421:280, 1999; Pardridge et al., *PNAS USA.* 92:5592, 1995; Boado, *Adv. Drug Delivery Rev.* 15:73, 1995; Aldrian-Herrada et al., *Nucleic Acids Res.* 26:4910, 1998; y Tyler et al., *PNAS USA* 96:7053, 1999.

También se describe el uso de la composición que comprende liposomas modificados en la superficie que contienen lípidos de poli(etilenglicol) (modificados con PEG, o liposomas de circulación prolongada o liposomas sigilosos). Estas formulaciones ofrecen un método para incrementar la acumulación de fármacos en tejidos diana. Esta clase de vehículos farmacéuticos resiste la opsonización y eliminación mediante el sistema fagocítico mononuclear (MPS o RES), permitiendo de este modo tiempos de circulación sanguínea más prolongados y una mejor exposición tisular al fármaco encapsulado (Lasic et al., *Chem. Rev.* 95:2601, 1995; Ishiwata et al., *Chem. Phare. Bull.* 43:1005, 1995).

Se ha demostrado que tales liposomas se acumulan selectivamente en tumores, presumiblemente mediante extravasación y captura en los tejidos diana neovascularizados (Lasic et al., *Science* 267:1275, 1995; Olcu et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1238:86, 1995). Los liposomas de circulación prolongada potencian la farmacocinética y farmacodinámica de DNA y RNA, particularmente en comparación con los liposomas catiónicos convencionales, que se sabe que se acumulan en tejidos del MPS (Liu et al., *J. Biol. Chem.* 42:24864, 1995; Choi et al., *Publicación PCT Internacional* n° WO 96/10391; Ansell et al., *Publicación PCT Internacional* n° WO 96/10390; Holland et al., *Publicación PCT Internacional* n° WO 96/10392). Los liposomas de circulación prolongada también protegen igualmente a los fármacos de la degradación por nucleasas en un mayor grado en comparación con los liposomas catiónicos, basándose en su capacidad para evitar la acumulación en tejidos del MPS metabólicamente agresivos tales como el hígado y el bazo.

También se describen composiciones preparadas para el almacenamiento o administración, que incluyen una cantidad farmacéuticamente eficaz de los compuestos deseados en un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos o diluyentes aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica, y se describen, *por ejemplo*, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985).

*Por ejemplo*, se pueden proporcionar conservantes, estabilizantes, colorantes y agentes saborizantes. Estos incluyen benzoato de sodio, ácido sórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. Además, se pueden usar antioxidantes y agentes de suspensión.

Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención se pueden administrar a un sujeto en combinación con otros compuestos terapéuticos para incrementar el efecto terapéutico global. El uso de múltiples compuestos para tratar una indicación puede incrementar los efectos beneficiosos a la vez que reduce la presencia de efectos secundarios.

5 Como alternativa, ciertos agentes iRNA de la actual invención se pueden expresar en células de promotores eucariotas (*por ejemplo*, Izant y Weintraub, Science 229:345, 1985; McGarry y Lindquist, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:399, 1986; Scanlon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:10591, 1991; Kashani-Sabet et al., Antisense Res. Dev. 2:3, 1992; Dropulic et al., J. Virol. 66:1432, 1992; Weerasinghe et al., J. Virol. 65:5531, 1991; Ojwanget al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10802, 1992; Chen et al., Nucleic Acids Res. 20:4581, 1992; Sarver et al., Science 247:1222, 1990; Thompson et al., Nucleic Acids Res. 23:2259, 1995; Good et al., Gene therapy 4:45, 1997). Los expertos en la técnica sabrán que cualquier ácido nucleico se puede expresar en células eucariotas a partir del vector de DNA/RNA apropiado. La actividad de tales ácidos nucleicos se puede aumentar mediante su liberación a partir del transcrito primario mediante un ácido nucleico enzimático (Draper et al., PCT WO 93/23569, y Sullivan et al., PCT WO 94/02595; Ohkawa et al., Nucleic Acids Symp. Ser. 27:156, 1992; Taira et al., Nucleic Acids Res. 19:5125, 1991; Ventura et al., Nucleic Acids Res. 21:3249, 1993; Chowrira et al., J. Biol. Chem. 269:25856, 1994).

Las moléculas de RNA de la presente invención se pueden expresar a partir de unidades de transcripción (véase, por ejemplo, Couture et al., Trends in Genetics 12:510, 1996) insertadas en vectores de DNA o RNA. Los vectores recombinantes pueden ser plásmidos de DNA o vectores víricos. Los vectores víricos que expresan agentes iRNA se pueden construir basándose, pero sin limitarse a, en virus adenoasociados, retrovirus, adenovirus, o alfavirus. Los constructos a base de Pol III se pueden usar para expresar moléculas de ácido nucleico de la invención (véase, por ejemplo, Thompson, patentes U. S. n<sup>os</sup> 5.902.880 y 6.146.886). Los vectores recombinantes capaces de expresar los agentes iRNA se pueden suministrar como se describe anteriormente, y pueden persistir en células diana. Como alternativa, se pueden usar vectores víricos que proporcionan expresión transitoria de moléculas de ácido nucleico. Tales vectores se pueden administrar de forma repetida según sea necesario. Una vez expresado, el agente iRNA interactúa con el mRNA diana y genera una respuesta RNA<sub>i</sub>. El suministro de vectores que expresan agentes iRNA puede ser sistémico, tal como mediante administración intravenosa o intramuscular, mediante administración a células diana explantadas de un sujeto, seguido de la reintroducción en el sujeto, o por cualquier otro medio que permitiese la introducción en la célula diana deseada (para un repaso, véase Couture et al., Trends in Genetics 12:510, 1996).

Las indicaciones oftálmicas adicionales para los agentes iRNA de la invención incluyen retinopatía diabética proliferativa (la etapa más grave de retinopatía diabética), uveítis (una afección inflamatoria del ojo que conduce a menudo a adema macular), edema macular cistoide tras cirugía de cataratas, degeneración miópica (una afección en la que un paciente con un grado elevado de miopía desarrolla neovascularización corooidal), degeneración macular inflamatoria (una afección en la que un paciente con inflamación en el área macular debido a infecciones u otras causas desarrolla neovascularización corooidal), y neovascularización del iris (una complicación seria de retinopatía diabética u oclusión de la vena retiniana que implica crecimiento de nuevos vasos sanguíneos sobre la superficie del iris).

Las indicaciones no oftálmicas adicionales para los agentes iRNA de la invención incluyen cáncer, incluyendo, pero sin limitarse a, cáncer renal y de colon, y psoriasis. Los tumores sólidos y sus metástasis se basan en el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos para su supervivencia.

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria crónica de la piel, que provoca que las células de la piel crezcan demasiado rápidamente, dando como resultado parches blancos o rojos gruesos de piel. Los datos preclínicos y clínicos sugieren que el crecimiento de vasos sanguíneos y la fuga de vasos sanguíneos inducidos por VEGF desempeñan un papel en el desarrollo de esta afección.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no se deberían interpretar como limitantes adicionalmente.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1: Diseño de siRNA

Se identificaron cuatrocientas secuencias diana con los exones 1-5 de la secuencia de mRNA de VEGF-A121 (véase la Tabla 1, SEC ID NOs 2-401), y los siRNAs correspondientes que las seleccionan como dianas se sometieron a un cribado bioinformático.

Para asegurar que las secuencias fueron específicas para la secuencia de VEGF y no para secuencias de cualquier otro gen, las secuencias diana se comprobaron frente a las secuencias en Genbank usando el motor de búsqueda BLAST proporcionado por NCBI. El uso del algoritmo BLAST se describe en Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403, 1990; y Altschul y Gish, Meth. Enzymol. 266:460, 1996.

También, los siRNAs se priorizaron en busca de su capacidad para reaccionar de forma cruzada con secuencias de VEGF de mono, de rata y de ser humano.

De estas 400 secuencias diana potenciales, se seleccionaron 80 para el análisis mediante cribado experimental, a fin de identificar un pequeño número de candidatos principales. Se diseñó un total de 114 moléculas de siRNA para estas 80 secuencias diana 114 (Tabla 2).

### Ejemplo 2: Síntesis de los oligonucleótidos de siRNA

5 Se sintetizó RNA en sintetizadores Expedite 8909, ABI 392 y ABI394 (Applied Biosystems, Applied Biosystems GmbH, Frankfurter Str. 129b, 64293 Darmstadt, Alemania) a una escala de 1  $\mu$ mol empleando un soporte sólido CPG y Expedite RNA phosphoramidites (ambos de Prologo Biochemie GmbH, Georg-Hyken-Str.14, Hamburg, Alemania). Se obtuvieron reactivos auxiliares de Mallinckrodt Baker (Im Leuschnerpark 4:64347 Griesheim, Alemania). Los enlaces de fosforotioato se introdujeron mediante sustitución de la disolución del oxidante yodo por una disolución del reactivo de Beaucage en acetonitrilo (5% en peso por volumen).

10 La escisión de los oligorribonucleótidos a partir del soporte sólido, y la desprotección de las bases, se logró con una mezcla 3:1 (v/v) de metilamina (41%) en agua y metilamina (33%) en etanol. La 2'-desililación se llevó a cabo según procedimientos consolidados (Wincott et al., Nucleic Acids Res. 23:2677-2684, 1995). Los oligorribonucleótidos brutos se purificaron mediante HPLC de intercambio aniónico usando una columna de 22 x 250 mm DNAPac PA 100 con tampón A que contiene 10 mM de NaClO<sub>4</sub>, Tris 20 mM, pH 6,8, urea 6 M, y con tampón B que contiene NaClO<sub>4</sub> 400 mM, Tris 20 mM, pH 6,8, urea 6 M. El caudal fue 4,5 ml/min., partiendo de 15% de Tampón B, que se incrementó hasta 55% durante 45 minutos.

15 Los compuestos purificados se caracterizaron mediante LC/ESI-MS (LC: Ettan Micro, Amersham Biosciences Europe GmbH, Munzinger Strasse 9, 79111 Freiburg, Alemania, ESI-MS: LCQ, Deca XP, Thermo Finnigan, Im Steingrund 4-6, 63303 Dreieich, Alemania) y electroforesis capilar (P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis System, Beckman Coulter GmbH, 85702 Unterschleißheim, Alemania). La pureza de los oligorribonucleótidos aislados fue al menos 85%.

20 Los rendimientos y concentraciones se determinaron mediante absorción de UV de una disolución del RNA respectivo a una longitud de onda de 260 nm usando un espectrofotómetro. RNA bicatenario se generó mezclando una disolución equimolar de hebras complementarias en tampón de hibridación (fosfato de sodio 20 mM, pH 6,8; cloruro de sodio 100 mM), calentando en un baño de agua a 85-90°C durante 3 minutos, y enfriando hasta la temperatura ambiente durante un período de 3-4 horas. El RNA se mantuvo a -20°C hasta el uso.

### Ejemplo 3: Cribado de eficacia de siRNAs

30 Usando dos cribados de eficacia, el siRNA de VEGF se cribó en busca de su capacidad para convertirse en candidato principal. La Tabla 2 muestra las eficiencias relativas de algunos de los siRNAs en su capacidad para inhibir la expresión de un gen de VEGF endógeno. En este proceso, el número de siRNAs candidatos se aventó. Se cultivó una estirpe de células epiteliales humanas Hela o ARPE-19 (estirpe de células epiteliales de pigmento retiniano humanas con propiedades diferenciadas (Dunn et al., Exp. Eye Res. 62:155, 1996) en placas de 96 pocillos (17.000 células/pocillo) en 100  $\mu$ l de suero fetal bovino al 10% en Medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM).

35 Cuando las células alcanzaron una confluencia de aproximadamente 90% (aproximadamente 24 horas más tarde), se transfecieron con diluciones de tres veces en serie de siRNA, partiendo de 20 nM. Se usaron 0,4  $\mu$ l de reactivo de transfección Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) por pocillo, y las transfecciones se llevaron a cabo según el protocolo del fabricante. A saber, los complejos de siRNA:Lipofectamine™ 2000 se prepararon según lo siguiente. Se diluyó la cantidad apropiada de siRNA en Medio Sérico Reducido Opti-MEM I sin suero, y se mezcló suavemente. La Lipofectamine™ 2000 se mezcló suavemente antes del uso, y después, para cada pocillo de una placa de 96 pocillos, se diluyeron 0,4  $\mu$ l en 25  $\mu$ l de Medio Sérico Reducido Opti-MEM I sin suero, y se mezcló suavemente y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación durante 5 minutos, se combinó 1  $\mu$ l del siRNA diluido con la Lipofectamine™ 2000 diluida (el volumen total es 26,4  $\mu$ l). El complejo se mezcló suavemente y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente para permitir que se formasen los complejos de siRNA:Lipofectamine™ 2000. Después, se añadieron 100  $\mu$ l de suero fetal bovino al 10% en DMEM a cada uno de los complejos de siRNA:Lipofectamine™ 2000, y se mezcló suavemente moviendo la placa hacia delante y hacia atrás. Se añadieron 100  $\mu$ l de la mezcla anterior a cada pocillo que contiene las células, y las placas se incubaron a 37°C en una incubadora de CO<sub>2</sub> durante 24 horas, después el medio de cultivo se retiró, y se añadieron 100  $\mu$ l de suero fetal bovino al 10% en DMEM. Después del cambio del medio, se recogió medio acondicionado a las 24 horas (células HeLa) o a las 72 horas (células ARPE-19), y se llevó a cabo un ELISA de VEGF humano usando el kit DuoSet human VEGF ELISA Development kit (R&D Systems, Inc. Minneapolis, MN 55413). Este kit contiene el componente básico requerido para el desarrollo de ELISAs de tipo sándwich para medir VEGF humano natural y recombinante en sobrenadantes de cultivo celular y suero.

Los materiales usados incluyeron:

55 Anticuerpo de captura – 576  $\mu$ g/ml de anticuerpo de cabra anti-VEGF humano cuando se reconstituye con 0,25 ml de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, pH 7,2-7,4, filtrado con filtro de 0,2  $\mu$ m). Después de la reconstitución, se almacenó a 2-8°C durante un tiempo de hasta 60 días, o se repartió en alícuotas y se almacenó a -20°C a -70°C en un congelador descongelador manual durante un

tiempo de hasta 6 meses. Se diluyó hasta una concentración de trabajo de 0,8 µg/ml en PBS sin proteína portadora.

5 Anticuerpo de detección – 4,5 µg/ml de anticuerpo de cabra biotinilado anti-VEGF humano cuando se reconstituye con 1,0 ml de Diluyente Reactivo (seroalbúmina bovina al 1% en PBS, pH 7,2-7,4, filtrado con filtro de 0,2 µm. Después de la reconstitución, se almacenó a 2-8°C durante un período de hasta 60 días, o se repartió en alícuotas y se almacenó a -20°C a -70°C en un congelador descongelador manual durante un periodo de hasta 6 meses. Se diluyó hasta una concentración de trabajo de 25 ng/ml en Diluyente Reactivo.

10 Patrón: 110 ng/ml de recombinante cuando se reconstituye con 0,5 ml de Diluyente Reactivo. Se permitió al patrón descansar durante un mínimo de 15 minutos con agitación suave antes de obtener las diluciones. El Patrón reconstituido se puede almacenar a 2-8°C durante un período de hasta 60 días, o se puede repartir en alícuotas y se puede almacenar a -20°C a -70°C en un congelador descongelador manual durante un período de hasta 6 meses. Se recomienda una curva estándar de siete puntos usando diluciones en serie de 2 veces en Diluyente Reactivo, y un patrón elevado de 4000 pg/ml.

15 Estreptavidina-HRP: 1,0 ml de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante. Se almacenó a 2-8°C durante un período de hasta 6 meses. Se diluyó hasta la concentración de trabajo especificada en la etiqueta del vial.

Se siguió el protocolo general de ELISA (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN).

20 Los controles incluyeron nada de siRNA, siRNA de VEGF humano (Cand5, (antiguamente hVEGF5) Reich et al., Mol Vis. 9:210, 2003) y un siRNA que empareja una secuencia de 21 nt conservada entre el VEGF humano, de rata y de ratón (VEGF hrm, Filleur et al., Cancer Res. 63:3919-3922, 2003).

25 Las actividades de los siRNAs se compararon con la actividad del siRNA de VEGF humano de control de Reich et al. (*más arriba*), representando “+” una actividad más baja, representando “++” actividad similar y representando “+++” una actividad más elevada que siRNA de VEGF humano de control (Tabla 2). La FIG. 2 muestra las actividades de siRNAs de salientes individuales y dobles en células HeLa. Las líneas continuas con símbolos negros representan el siRNA con un solo saliente, las líneas continuas con símbolos blancos representan los siRNAs con salientes dobles; las líneas discontinuas representan los siRNAs de control. Todos los siRNAs son más activos que los siRNAs de control, y pueden inhibir la expresión de VEGF en aproximadamente 80%. Por el contrario, el siRNA de Reich et al. (*más arriba*) redujo el nivel de hVEGF endógeno en aproximadamente 20% en las mismas condiciones experimentales. De forma similar, en las mismas condiciones experimentales, el siRNA a base de hrmVEGF de la secuencia de consenso (Filleur et al., *más arriba*) redujo el nivel de expresión en aproximadamente 45%.

35 La FIG. 3 muestra las actividades de siRNAs de un solo saliente y de saliente doble en células ARPE-19. Las líneas continuas con símbolos negros representan el siRNA de un solo saliente, las líneas continuas con símbolos blancos representan los siRNAs con salientes dobles; las líneas discontinuas representan los siRNAs de control. Todos los siRNAs son más activos que los siRNAs de control, y pueden inhibir la expresión de VEGF en aproximadamente 90%. Por el contrario, el siRNA de Reich et al. (Mol. Vis. 9:210, 2003) redujo el nivel de hVEGF en aproximadamente 35% en las mismas condiciones experimentales. De forma similar, en las mismas condiciones experimentales, el siRNA basado en hrmVEGF de la secuencia de consenso (Filleur et al., *más arriba*) redujo el nivel de expresión en aproximadamente 70%.

40 Las FIGs. 4 y 5 muestran los resultados de una comparación de los siRNAs de un solo saliente y de dos salientes con sus siRNAs análogos con extremos romos, respectivamente, en células HeLa. Los resultados están de acuerdo con los datos de Elbashir et al. (Genes & Development 15:188, 2001), por cuanto la presencia de un saliente en un siRNA confiere una mayor eficiencia en la inhibición del silenciamiento génico. Sin embargo, es importante señalar que la actividad de los siRNAs de extremos romos es comparable a los resultados logrados usando los siRNAs de control.

#### 45 **Ejemplo 4: Ensayo *in vitro* para el silenciamiento de la síntesis de VEGF en condiciones hipóxicas**

50 Se cultivaron células HeLa humanas en placas de 96 pocillos a 10.000 células/pocillo en 100 µl de medio de crecimiento (FBS al 10% en DMEM). 24 horas después de la siembra de las células, cuando las células alcanzaron una confluencia de aproximadamente 50%, se transfectaron con diluciones de tres veces en serie de siRNA, partiendo de 30 nM. Se usaron 0,2 µl de reactivo de transfección Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen Corporation, Carlsbad CA) por pocillo, y las transfecciones se llevaron a cabo como se describe en el inserto del producto de Invitrogen. Los controles incluyeron nada de siRNA, siRNA de VEGF humano (Reich et al., Mol. Vis. 9:210, 2003) y un siRNA que empareja una secuencia de 21 nt conservada entre el VEGF humano, de rata y de ratón (hrmVEGF, Filleur et al., Cancer Res. 63:3919-3922, 2003). Las transfecciones se realizaron por duplicado en cada placa. Adicionalmente, las placas duplicadas se transfectaron de manera que 24 horas después de la transfección se pudiesen cambiar los medios de crecimiento y una placa se pudiese mantener en condiciones normales de crecimiento con oxígeno (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 20% de oxígeno) y la placa duplicada se pudiese mantener en condiciones hipóxicas (37°C, 1% de oxígeno, el resto nitrógeno). Las condiciones hipóxicas se mantuvieron usando



un Pro-ox Oxygen Controller (BioSpherix, Ltd., Redfield, NY) unido a la cámara de cultivo *in vitro* Pro-ox. Las células se mantuvieron en condiciones normóxicas o hipóxicas durante 24 horas después del cambio de los medios. El medio de cultivo acondicionado se recogió entonces de ambas placas y se ensayó para determinar los niveles segregados de VEGF en un DuoSet VEGF ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN). Los ensayos se llevaron a cabo según el protocolo del fabricante, y como se describe en el Ejemplo 2.

Para hipoxia químicamente inducida por deferoxamina, se usaron 130  $\mu$ M de deferoxamina (Sigma D9533). Se añadió deferoxamina al medio de crecimiento reciente, 24 horas después de la transfección. Las células tratadas con deferoxamina se hicieron crecer entonces en condiciones normales de crecimiento (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>, 20% de oxígeno).

La FIG. 6 muestra los resultados obtenidos con los siRNAs (tanto siRNAs de un solo saliente como siRNAs de dos salientes) dirigidos contra las regiones de ORF que tienen los primeros nucleótidos que corresponden a 319 y 343 respectivamente, junto con los siRNAs de control. En condiciones hipóxicas, ya sea 1% de oxígeno (FIG. 6B) o 130  $\mu$ M de deferoxamina (FIG. 6C), tres de los siRNAs experimentales lograron casi un 95% de inhibición de la expresión de VEGF, a saber, AL-DP-4094 (un solo saliente) dirigido a ORF 343, y ambos siRNAs (un solo saliente y dos salientes) dirigidos a ORF 319. Los siRNAs de control de Reich et al. (*más arriba*) y de Filleur et al. (*más arriba*) demostraron una capacidad para inhibir la expresión de VEGF en 45% y 85% respectivamente.

Las FIGs. 8A y 8B muestran los resultados obtenidos con los siRNAs AL-DP-4014, una versión modificada con fosforotioato de AL-DP-4014 (AL-DP-4127, véase la Tabla 3) y una versión de AL-DP-4014 (AL-DP-4140, véase la Tabla 5). Tanto en condiciones normales como hipóxicas, el siRNA sin modificar (AL-DP-4014) y el siRNA modificado con fosforotioato (AL-DP-4127) redujeron la expresión de VEGF endógena a 20% de su nivel de expresión original. En condiciones hipóxicas, el siRNA modificado con fosforotioato anuló esencialmente la expresión de VEGF.

#### **Ejemplo 5: Las moléculas de siRNA de VEGF modificadas retienen actividad completa y muestran una estabilidad potenciada**

Se obtuvieron derivados de fosforotioato para el AL-DP-4014, que tiene como diana a ORF 319 de VEGF, y se presentan en la Tabla 3. Estos siRNAs se ensayaron en un ensayo de células HeLa descrito en el Ejemplo 3, y la FIG. 7 muestra que estos derivados son tan activos en el ensayo HeLa como el siRNA sin modificar.

Se sintetizó un panel de siRNAs que retuvo la secuencia del siRNA AL-DP-4094 (Tabla 1) pero incluyó diferentes modificaciones que incluyen enlaces de fosforotioato, nucleótidos modificados con O-metilo, y nucleótidos modificados con 2'-fluoro (Tabla 4). El panel de siRNAs se ensayó en células HeLa, y las FIGs. 9A-9E demuestran que todas las versiones modificadas del siRNA AL-DP-4094 redujeron efectivamente la expresión de VEGF en más de 90%, mostrando una mayor eficacia que cualquiera de los dos siRNAs de VEGF previamente identificados ("Acuity" in Reich et al. (*más arriba*), y "Filleur" in Filleur et al. (*más arriba*)). La FIG. 10 muestra también datos de ensayos *in vitro* en células HeLa. La gráfica en la FIG. 10 muestra que el siRNA AL-DP-4094 sin modificar y un siRNA AL-DP-4004 modificado con fosforotioato (AL-DP-4219) redujeron la expresión de VEGF en más de 70% (FIG. 10). Las versiones mezcladas del compuesto AL-DP-4094 (por ejemplo, AL-DP-4216 y AL-DP-4218 (secuencias mostradas más abajo; los nucleótidos subrayados representan nucleótidos desparejados en comparación con AL-DP-4094)) no inhibieron la expresión de VEGF. Un siRNA que tiene como diana el gen de luciferasa de luciérnaga (AL-DP-3015; véase más abajo) tampoco inhibió la expresión de VEGF.

AL-DP-4216	AL4094 MI s	5'-GCACAUUGGACAGUUGUGGUU-3'	SEC ID n°: 1065
	AL4094 MI as	'3-GUCGUGUAACCGUCAACACCAA-5'	SEC ID n°: 1064
AL-DP-4218	AL4094 M5 s	5'-GCACAUAGAAGUGACGCGCUU-3'	SEC ID n°: 1062
	AL4094 M5 as	'3-GUCGUGUAUCUUCACUGCGCGAA-5'	SEC ID n°: 1063
AL-DP-3015		5'-GAACUGUGUGAGAGGUCCU-3'	SEC ID n°: 830
		'3-CGCUUGACACACUCUCCAGGA-5'	SEC ID n°: 831

Se llevó a cabo la técnica Stains-All (Sigma, St. Louis, MO) para examinar la estabilidad de los siRNAs modificados. Para llevar a cabo el ensayo, se incubó un dúplex de siRNA en suero humano al 90%, a 37°C. Las muestras de la mezcla de reacción se paralizaron en diversos puntos de tiempo (a 0, 0,25, 1, 2, 4, y 24 horas) y se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida. La escisión del RNA a lo largo del tiempo proporcionó información con respecto a la susceptibilidad del dúplex de siRNA a la degradación por nucleasas del suero.

Se encontró que las modificaciones O-metilica y 2'-fluoro, usadas en combinación con modificaciones de fosforotioato, potencian la estabilidad en un grado mayor que cuando las modificaciones de fosforotioato se usan

solas. Por ejemplo, las versiones modificadas del siRNA AL-DP-4094 incluyeron un siRNA modificado con fosforotioato (AL-DP-4198), siRNAs modificados con fosforotioato más O-metilo (*por ejemplo*, AL-DP-4180, AL-DP-4175, y AL-DP-4220), y siRNAs modificados con fosforotioato más O-metilo más 2'-fluoro (*por ejemplo*, AL-DP-4197 y AL-DP-4221) (Tabla 4). Se encontró que los siRNAs AL-DP-4180, AL-DP-4175, y ALDP-4197 son más estables en suero humano que el siRNA AL-DP-4198. Se determinó que la modificación con fosforotioato estabilizó los siRNAs frente a la degradación exonucleolítica, y las modificaciones de O-metilo y 2'-fluoro estabilizaron a los siRNAs frente a la degradación endonucleolítica.

### Ejemplo 6: Ensayo de estabilidad *in vitro* de siRNAs de VEGF en diferentes tejidos oculares y suero de rata

#### 1. Preparación de homogenados tisulares

Se cortaron tejidos de ojos completos, retinas, y humores vítreos reunidos procedentes de al menos tres ratas, y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. El tejido congelado se pulverizó sobre hielo seco, usando instrumentos que se enfriaron previamente en hielo seco. Se añadió 1 ml de tampón RIPA (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, Na<sub>2</sub>EDTA 1 mM, desoxicolato sódico al 0,5% ácido desoxicólico, 1% de IGEPAL CA-630, 0,05% de SDS) al polvo de tejido congelado, y la mezcla se mezcló a conciencia y de forma vigorosa. El homogenado se centrifugó a 10.000 x g durante 5 min. a 4°C, y se desechó el pelete. Se transfirieron alícuotas de 100 µl del sobrenadante a tubos de microcentrifugadora previamente enfriados, y se almacenó a -70°C o se usó inmediatamente en el ensayo de estabilidad.

#### 2. Marcaje del extremo 5' de siRNA monocatenario sentido o antisentido usando T4 polinucleótido cinasa y $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP

Se usaron los siguientes reactivos:

- T4 Polinucleótido Cinasa (PNK) 10 unidades/µl (New England Biolabs, Beverly, MA)
- 10X tampón de T4 PNK (Tris-HCl 700 mM, MgCl<sub>2</sub> 100 mM, ditiotreitolo (DTT) 50 mM, pH 7,6)
- Gamma-32p-ATP (PerkinElmer, Shelton, CT) 250 µCi, 3000 Ci/mmol (3,3 µM)
- Lotes madre de 10 µM de RNA oligo sintético diluido en H<sub>2</sub>O
- Columnas Microspin Sephadex™ G-25 (Amersham Biosciences)
- Agua libre de RNAsa y 0,65 ml tubos de microcentrifugadora (1,5 ml)

Una reacción de cinasa de 25 µl contenía:

2,5 µl	de lote de 10 µM sentido o antisentido (conc. final 1 µM)
2,5 µl	10X Tampón PNK (1X)
1,5 µl	$\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (aproximadamente 0,2 nM)
1,0 µl	10 unidades/µl T4 PNK (10 unidades)
17,5 µl	dH <sub>2</sub> O

La mezcla de reacción se incubó a 37°C durante 1 hora (baño de agua) antes de fraccionar el siRNA marcado a través de las columnas Sephadex™ G-25 giratorias (Amersham). Se usaron 0,5 µl para determinar el número de recuentos por minuto (cpm)/ml de la muestra radiomarcada.

#### 3. Escalera de la hidrólisis parcial alcalina de siRNA monocatenario radiomarcado

Para generar una muestra de marcadores de tamaño, se sometió una porción del siRNA marcado en el extremo 5' con  $\gamma^{32}\text{P}$  a hidrólisis alcalina según lo siguiente:

se incubaron 30 µl de reacción de hidrólisis que contiene 2,5 µl de siRNA marcado en el extremo 5' (sentido o antisentido), 6,0 µl de 0,5 M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> (pH 9,5), 1,5 µl de tRNA 10 mg/ml, y 20,0 µl de dH<sub>2</sub>O a 90°C durante 7,5 min., después se enfrió en hielo o a 4°C. Para el análisis electroforético en gel, se usaron 30 µl de formamida al 90%, Na<sub>2</sub>EDTA 50 mM, DTT 10 mM, y XC&BB (xileno cianol y azul de bromofenol), de los cuales se usó 1 µl + 4 µl de colorante de formamida.

#### 4. Hibridación de dúplex de siRNA de mezcla madre 1 µM radiomarcado

Se prepararon 30  $\mu$ l de mezcla madre 1  $\mu$ M de diferentes dúplex de siRNA, en los que la hebra sentido o la hebra antisentido estaba radiomarcada.

Las muestras se calentaron a 90°C durante 2 min., y después se incubaron a 37°C durante 1 hora, y después se almacenaron a -20°C hasta que se usaron.

#### 5. Control de calidad del dúplex de siRNA:

Las muestras del dúplex de siRNA se analizaron mediante electroforesis a través de poliacrilamida al 15% en gel de Tris-borato, EDTA (TBE). La electroforesis se llevó a cabo a 150V durante 1 hora antes de hacer pasar las muestras. Las muestras se prepararon mezclando 0,5-1  $\mu$ l de dúplex de siRNA o monocatenario, 3-3,5  $\mu$ l de 0,5X TBE, 1  $\mu$ l de 5X colorante de carga nativo (volumen total = 5  $\mu$ l).

#### 6. Reacciones de estabilidad

Se añadieron 2  $\mu$ l de dúplex de siRNA a 18  $\mu$ l de suero o lisado tisular o control de tampón en tubo de PCR (0,2 ml). Una muestra en el punto de tiempo cero se retiró inmediatamente tras la adición del dúplex de siRNA eliminando 2  $\mu$ l y añadiéndolos a 18  $\mu$ l de formamida al 90%, EDTA 50 mM, DTT 10 mM y xileno cianol y azul de bromofenol (XC & BB). Se retiraron otras muestras después de 15 min., 30 min., 1 hora, 2 horas, y 4 horas, y se trataron de forma similar. Estas muestras se almacenaron en una placa de 96 pocillos. En algunos experimentos, los puntos de tiempo se extendieron a 8, 24 y 48 horas. Los puntos de tiempo de las muestras para el tampón (disolución salina tamponada con fosfato, PBS, 1X PBS de trabajo que contiene cloruro de sodio 0,14 M, cloruro de potasio 0,003 M, fosfato de potasio 0,002 M, fosfato de sodio 0,01 M) se tomaron a cero y en el último punto de tiempo del experimento. Las muestras se analizaron mediante electroforesis a través de geles de poliacrilamida al 20% (previamente pasadas a 75 W durante 1 hora) en 1 X TBE (10 X = Tris 890 mM, ácido bórico 890 mM, EDTA 20 mM, pH 8,0). El gel se transfirió a un casete de fosforoimagen, se cubrió con una pantalla potenciadora y se barrió tras exposición durante toda la noche.

El análisis en gel de poliacrilamida indicó que el entorno ocular contiene unas pocas menos nucleasas que el suero humano. El ensayo de la forma sin modificar del siRNA de VEGF AL-DP-4014 para determinar la estabilidad en el extracto de ojo de rata reveló solamente la presencia de actividad de exonucleasa. En suero humano, los experimentos con AL-DP-4127 y -4140 (Tablas 4 y 5) indicaron que las modificaciones de fosforotioato modificadas terminalmente protegieron contra la degradación exonucleolítica pero no contra la actividad endonucleolítica. Estos resultados fueron consistentes con experimentos llevados a cabo en extractos de ojo completo de rata. Los derivados de fosforotioato AL-DP-4127 y -4140, terminalmente modificados, se estabilizaron frente a la actividad de exonucleasas, en comparación con el siRNA AL-DP-4014 sin modificar y el siRNA Cand5 sin modificar (Reich et al. (*más arriba*)). Sin embargo, los siRNAs -4127 y -4140 todavía se sometieron a degradación endonucleolítica.

Las modificaciones al compuesto principal AL-DP-4094 estabilizó al siRNA frente a la degradación exonucleolítica y endonucleolítica. El siRNA modificado con fosforotioato AL-DP-4198 se degradó en un grado similar al compuesto 4094 sin modificar, pero la adición de modificaciones O-metilicas, como en AL-DP-4180 y AL-DP-4220, estabilizó los siRNAs en extractos de ojo completo de rata.

De forma importante, los siRNAs fueron generalmente más estables en lisados de retina de rata que en los extractos de ojo completo de rata descritos anteriormente. Ni el siRNA AL-DP-4094 sin modificar, ni los siRNAs modificados AL-DP-4198, -4180, o -4220 se degradaron en los lisados de retina.

#### **Ejemplo 7. Los sitios sensibles a endonucleasas se cartografiaron en siRNA AL-DP-4094**

La estabilidad del siRNA AL-DP-4094 se examinó mediante la técnica Stains-All y técnicas de radiomarcado tras la incubación en suero humano (véase anteriormente). Estos ensayos revelaron susceptibilidad a exo- y endonucleasas. Para examinar el perfil del fragmento del siRNA tras la incubación en suero, se usó RP-HPLC FIG. 11.

Tras la incubación del siRNA -4094 en suero humano, los fragmentos se extrajeron con fenol-cloroformo y se precipitaron, y después se sometieron a análisis de LC/MS. La FIG. 12 describe los fragmentos identificados y las características asociadas.

#### **Ejemplo 8: Estudio detallado de las modificaciones a siRNAs que tienen como diana a VEGF (Tabla 6)**

Se sintetizaron y evaluaron ocho patrones diferentes importantes de modificación química de los dúplex de siRNA que tienen como diana al mRNA de VEGF (Tabla 6). Las modificaciones de azúcar de ribosa usadas fueron 2'-O-metilo (2'OMe) o 2'-fluoro (2'F). Tanto las pirimidinas (Py) como purinas (Pu) se pudieron modificar como se proporciona en la Tabla 6.

Los primeros cuatro patrones (A-D) incorporaron 2'OMe en ambas hebras en cualquier otra posición. Se sintetizaron cuatro configuraciones: 1) en cada posición par en la hebra sentido y en cada posición impar en la hebra antisentido,

2) en cada posición impar en la hebra sentido y en cada posición par en la hebra antisentido, 3) en las posiciones pares en ambas hebras, y 4) en las posiciones impares en ambas hebras.

El quinto patrón (E) incorporó la modificación 2'OMe en todos los nucleótidos pirimidínicos tanto en la hebra sentido como antisentido del dúplex.

5 El patrón F incluyó los dúplex con modificaciones 2'OMe solamente en pirimidinas en dinucleótidos 5'-PyPu-3', especialmente sólo en los sitios UA, CA, UG (ambas hebras).

En el patrón G, los dúplex tuvieron la modificación 2'F en pirimidinas de la hebra antisentido y las modificaciones 2'OMe en pirimidinas en la hebra sentido.

10 El patrón (H) tuvo hebras antisentido con pirimidinas modificadas con 2'F en los dinucleótidos 5'-PyPu-3', sólo en los sitios UA, CA, UG (ambas hebras), y tuvo hebras sentido con modificaciones 2'OMe sólo en pirimidinas en dinucleótidos 5'-PyPu-3', sólo en los sitios UA, CA, UG (ambas hebras).

A-D 2'-OMe completamente alternos (ambas hebras)  
Cuatro configuraciones: par/impar; impar/par; par/par; impar/impar

E: 2'OMe Py (ambas hebras)

F 2'OMe Py sólo en los sitios UA, CA, UG (ambas hebras)

G: 2'OME todas las Py (sentido)  
2'F todas las Py (antisentido)

H 2'OME Py sólo en los sitios UA, CA, UG (antisentido)  
2'F Py sólo en los sitios UA, CA, UG (antisentido)

Se ensayaron 17 dúplex de VEGF progenitores diferentes de la Tabla 2

### 1. Evaluación de la estabilidad en suero de los dúplex de siRNA

15 Se incubaron dúplex de siRNA 2  $\mu$ M (concentración final) en suero humano reunido al 90% a 37°C. Las muestras se paralizaron en hielo seco después de 30 minutos, 4 horas, y 24 horas. Para cada secuencia de siRNA, se incubó una muestra a la misma concentración en ausencia de suero (en PBS) a 37°C durante 24 horas. Después de que todas las muestras se paralizaron, se extrajo RNA usando fenol:cloroformo, y se concentró mediante precipitación con etanol. Las muestras se secaron al aire y se resuspendieron en un tampón de carga desnaturalizante. Un tercio de cada punto de tiempo se analizó en un gel de acrilamida al 20% (19:1), urea 7 M, 1XTBE, que se hizo pasar a 60°C. El RNA se visualizó tiñendo con la disolución Stains-All. Se realizó una evaluación cualitativa de la estabilidad de cada siRNA modificado mediante comparación con el siRNA sin modificar progenitor para cada conjunto de dúplex. Los controles de PBS sirvieron como marcadores para la calidad del siRNA de entrada.

### 2. Estabilidad de químicas modulares de VEGF

25 Se cribaron cuatro químicas modulares: 1) todas las pirimidinas sustituidas con 2'-O-metilo (2'OMe) en las hebras tanto sentido como antisentido, 2) pirimidinas en los pares UA, UG, CA, sustituidas con 2'OMe en las hebras tanto sentido como antisentido, 3) todas las pirimidinas sustituidas con 2'OMe en la hebra sentido, y con 2'-fluoro (2'F) en la hebra antisentido, 4) pirimidinas en los pares UA, UG, CA, sustituidas con 2'OMe en la hebra sentido y con 2'F en la hebra antisentido. En total, se cribaron 85 siRNAs, incluyendo los dúplex progenitores sin modificar más las cuatro químicas modulares.

30 De los 85 siRNAs cribados, 35 fueron estables durante al menos 24 horas según se evaluó mediante comparación visual con los dúplex sin modificar progenitores. Estos 35 dúplex tuvieron 2'OMe pirimidinas en ambas hebras o 2'OMe pirimidinas en la hebra sentido y 2'F en la hebra antisentido (químicas 1 y 3 anteriores). De los dúplex con un menor número de restos modificados, sólo cinco tuvieron al menos ~50% de material de longitud completa que queda en el punto de tiempo de 4 horas, en comparación con su progenitor sin modificar.

35 La sustitución de todas las pirimidinas con 2'OMe o 2'F protege a los siRNAs de la degradación con nucleasas del suero durante ~24 h en suero humano al 90% a 37°C. Los dúplex protegidos tuvieron apenas 85%-100% de material de longitud completa que queda a las 24 horas, en comparación con el dúplex incubado en ausencia de suero. La modificación mínima de pirimidinas en los pares dinucleotídicos UA, UG y CA sólo estabilizó varios siRNAs con respecto a su progenitor sin modificar, pero no estabilizó suficientemente la resistencia a nucleasas a largo plazo. Algunos sitios potenciales de RNasa A no se protegieron mediante metilación (YpN, por ejemplo UC, UU), y ésta es probablemente la razón para la menor resistencia a endonucleasas del suero.

### 3. Análisis de la actividad de los dúplex

Los dúplex se ensayaron para determinar la actividad en el ensayo de células HeLa como se describe anteriormente. La Tabla 6 y las Figuras 13-29 proporcionan un sumario y gráficas de las actividades de los dúplex en células HeLa para cada una de las modificaciones descritas anteriormente.

#### Síntesis de los agentes iRNA

#### 5 Síntesis de RNA usando monómeros de desprotección "rápida"

##### 1. Síntesis de RNA

Se sintetizaron oligorribonucleótidos usando tecnología de fosforamidito sobre fase sólida empleando un sintetizador AKTA 10 (Amersham Biosciences) a escalas que oscilan desde 35 hasta 60  $\mu$ moles. La síntesis se llevó a cabo sobre soportes sólidos hechos de vidrio de poro controlado (CPG, 520 Å, con una carga de 70  $\mu$ moles/g) o poliestireno (con una carga de 71  $\mu$ moles/g). Todos los amiditos se disolvieron en acetonitrilo anhidro (70 mM), y se añadieron tamices moleculares (3 Å). Como disolución activadora, se usó 5-etiltiotetrazol (ETT, 600 mM en acetonitrilo). Los tiempos de acoplamiento fueron 8 minutos. La oxidación se llevó a cabo con una mezcla de yodo/agua/piridina (50 mM/10%/90% (v/v)) o empleando una disolución 100 mM de 3-etoxi-1,2,4-ditiazolin-5-ona (EDITH) en acetonitrilo anhidro a fin de introducir enlaces de fosforotioato. Se usaron reactivos de protección con tapa estándar. Se conjugó colesterol a RNA vía el extremo 5' o 3' de la hebra sentido comenzando a partir de un CPG modificado con colesterol (descrito más abajo) usando un enlazador de hidroxiprolinol. El grupo protector DMT se eliminó del RNA conjugado al colesterol, pero el DMT se dejó en el RNA sin conjugar, para facilitar la purificación.

##### 2. Escisión y desprotección de oligonucleótido unido al soporte

Tras la síntesis en fase sólida, el RNA se escindió del soporte haciendo pasar 14 ml de una mezcla 3:1 (v/v) de metilamina al 40% en agua y metilamina en etanol a través de la columna de síntesis durante un período de tiempo de 30 min. Para el RNA conjugado a colesterol, la relación de metilamina en agua a metilamina en etanol fue 1:13. El eluyente se dividió en cuatro viales de 15 ml con tapa de rosca, y se calentó hasta 65°C durante 30 min. adicionales. Esta disolución se secó subsiguientemente a presión reducida en un concentrador centrífugo. El residuo en cada vial se disolvió en 250  $\mu$ l de *N*-metilpirrolidin-2-ona (NMP), y se añadieron 120  $\mu$ l de trietilamina (TEA) y 160  $\mu$ l de TEA-3HF. Esta mezcla se llevó hasta 65°C durante 2 h. Después de enfriar hasta la temperatura ambiente, se añadieron 1,5 ml de NMP y 1 ml de etoxitrimetilsilano. Después de 10 min., el oligorribonucleótido se precipitó añadiendo 3 ml de éter. Los peletes se recogieron mediante centrifugación, se desecharon los sobrenadantes, y los sólidos se reconstituyeron en 1 ml de tampón de fosfato de sodio 10 mM.

##### 3. Purificación de oligorribonucleótidos

Los oligonucleótidos brutos se purificaron mediante HPLC de fase inversa en un sistema AKTA Explorer (Amersham Biosciences) usando una columna 16/10 HR (Amersham Biosciences) empaquetada hasta una altura del lecho de 10 cm con Source RPC 15. El tampón A fue fosfato de sodio 10 mM, y el tampón B contenía acetonitrilo al 65% en tampón A. Se empleó un caudal de 6,5 ml/min. Se registraron trazas de UV a 260, 280 y 290 nm. Para oligorribonucleótidos en DMT, se usó un gradiente de 7% de B a 45% de B con 10 volúmenes de columna (CV), y para el RNA conjugado a colesterol se empleó un gradiente de 5% de B a 100% de B en 14 CV. Las fracciones apropiadas se reunieron y se concentraron a presión reducida hasta aproximadamente 10 ml. Los oligonucleótidos en DMT se trataron con un volumen de un tercio de NaOAc 1M, pH 4,25, durante varias horas a temperatura ambiente.

Finalmente, los oligonucleótidos purificados se desalaron mediante cromatografía de exclusión molecular en una columna que contiene Sephadex G-25. Las disoluciones oligonucleotídicas se concentraron hasta un volumen < 15 ml. Las concentraciones de las disoluciones se determinaron midiendo la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro de UV. Hasta la hibridación, las hebras individuales se almacenaron como disoluciones congeladas a -20°C.

##### 4. Análisis de oligorribonucleótidos

El RNA conjugado a colesterol se analizó mediante CGE y LC/MS. El RNA sin conjugar también se analizó mediante IEX-HPLC. El análisis de CGE se llevó a cabo en un instrumento BeckmanCoulter PACE MDQ CE, equipado con un detector de longitud de onda fija a 254 nm. Se usó un capilar eCap DNA (BeckmanCoulter) con una longitud efectiva de 20 cm. Todas las muestras de RNA monocatenario se analizaron en condiciones desnaturalizantes que contienen urea 6 M (eCap ssDNA100 Gel Buffer Kit, BeckmanCoulter) a 40°C. Las muestras se inyectaron electrocinéticamente con 10 kV durante 5-8 s. El voltaje del experimento fue 15 kV.

El análisis de IEX HPLC se llevó a cabo en un sistema Dionex BioLC equipado con un detector de longitud de onda fija (260 y 280 nm), un horno de columna, un automuestreador, y un desgasificador interno. Se usó una columna Dionex DNAPac P100 (4\*250 mm) a un caudal de 1,0 ml/min. y 30°C. Se inyectó RNA sin conjugar (20  $\mu$ l, concentración 1 OD/ml). El Eluyente A contenía Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, NaBr 10 mM, acetonitrilo al 10%, pH 11 y el Eluyente B tenía NaBr 1 M en Eluyente A. La elución comenzó con 20% de B durante 1 min., y después se empleó un gradiente lineal con una concentración diana de 80% de B durante 20 min.

El análisis de LC-MS se llevó a cabo en un sistema Ettan  $\mu$ LC (Amersham Bioscience) equipado con un calentador de columna Jetstream y un detector de longitud de onda fija (254 nm). Un sistema ThermoFinnigan LCQ DecaXP ESI-MS con fuente de micropulverización y detector de trampa de iones se acopló en línea a la HPLC. Se inyectaron muestras de oligonucleótidos (muestra de 25  $\mu$ l, concentración 1 OD/ml en agua para RNA sin conjugar, y 40  $\mu$ l para RNA conjugado a colesterol) en una columna Waters Xterra C8 MS (2,1 x 50 mm; tamaño de partículas 2,5  $\mu$ m) con un caudal de 200  $\mu$ l/min. a 60°C. La composición del eluyente A fue hexafluoroisopropanol (HFIP) 400 mM, TEA 16,3 mM en H<sub>2</sub>O, pH 7,9, y el eluyente B fue metanol. Para RNA sin conjugar, la elución comenzó con 7% de B durante 3 min., y después se usó un gradiente de 7% de B a 25% de B en 13 min. Para el material conjugado a colesterol, las condiciones de partida fueron 35% de B durante 3 min., y después la concentración de eluyente B se incrementó hasta 75% de B en 30 min. En la Tabla 6 se proporcionan las figuras del análisis.

#### 5. Hibridación de oligorribonucleótidos

Las hebras complementarias se hibridaron combinando disoluciones equimolares de RNA. La mezcla se liofilizó y reconstituyó con un volumen apropiado de tampón de hibridación (NaCl 100 mM, fosfato de sodio 20 mM, pH 6,8) para lograr la concentración deseada. Esta disolución se colocó en un baño de agua a 95°C, y después se enfrió hasta la temperatura ambiente en 3 h. El grado de formación de dúplex se monitorizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) al 10% nativa, y las bandas se visualizaron tiñendo con el reactivo Stains All<sup>®</sup> (Sigma).

Síntesis de RNA usando monómeros de desprotección "estándar" que incluyen ribo y 2'-O-metil fosforamiditos

#### A. RNA/2'OMe (extremos tioato)

Las moléculas de RNA químicas con nucleótidos 2'-OMe se sintetizaron en una máquina 394 ABI usando el ciclo estándar escrito por el fabricante, con modificaciones de unas pocas etapas de espera. El soporte sólido fue CPG (500A). Los monómeros fueron fosforamiditos de RNA o fosforamiditos de 2'OME RNA con grupos protectores estándar, y se usaron a concentraciones de 0,15 M en acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN), excepto que se señale de otro modo. Específicamente, los fosforamiditos de RNA fueron fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>6</sup>-benzoi-2'-O-tbutildimetilsilil-adenosina-3'-O-( $\beta$ -cianoetil-N,N'-diisopropilo), fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>2</sup>-isobutiril-2'-O-tbutildimetilsilil-guanosina-3'-O-( $\beta$ -cianoetil-N,N'-diisopropilo), fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>4</sup>-acetil-2'-O-tbutildimetilsilil-citidina-3'-O-( $\beta$ -cianoetil-N,N'-diisopropilo) y fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-tbutildimetilsilil-uridina-3'-O-( $\beta$ -cianoetil-N,N'-diisopropilo); los fosforamiditos de 2'OME RNA fueron fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>6</sup>-benzoi-2'-O-metil-adenosina-3'-O-( $\beta$ -cianoetil-N,N'-diisopropilo), fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>2</sup>-isobutiril-2'-O-metil-guanosina-3'-O-( $\beta$ -cianoetil-N,N'-diisopropilo), fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>4</sup>-acetil-2'-O-metil-citidina-3'-O-( $\beta$ -cianoetil-N,N'-diisopropilo) y fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-metil-uridina-3'-O-( $\beta$ -cianoetil-N,N'-diisopropilo). Los tiempos de acoplamiento fueron 10 min. para todos los monómeros. Los detalles de los otros reactivos son como siguen: Activador: 5-(etiltio)-1H-tetrazol (0,25M); grupo protector de tapa A: 5% de anhídrido acético/THF/piridina; grupo protector de tapa B: 10% de N-metilimidazol/THF. La oxidación de fosfato implicó THBP (10% en ACN) durante 10 min., mientras que la oxidación de fosforotioato utilizó 0,05 M del reactivo EDITH/acetonitrilo. La destrilación se logró con 3% de TCA/diclorometano. El grupo protector DMT se eliminó tras la última etapa del ciclo.

Tras la terminación de la síntesis, el vidrio de poro controlado (CPG) se transfirió a un tubo de microcentrifugadora estéril con tapa de rosca. El oligonucleótido se escindió, y los grupos de base y de fosfato se desprotegeron simultáneamente con 1,0 ml de una mezcla de metilamina etanólica:amoníaco (metilamina 8M en etanol/amoníaco acuoso al 30%) (1:1) durante 5 horas a 55°C. El tubo se enfrió de forma breve en hielo, y después la disolución se transfirió a un tubo de centrifugadora de 5 ml; a esto le siguió un lavado de tres veces con 0,25 ml de acetonitrilo al 50%. Los tubos se enfriaron a -80°C durante 15 min., antes de secar en un liofilizador.

El residuo blanco obtenido se resuspendió en 200  $\mu$ l de NMP/Et<sub>3</sub>N/Et<sub>3</sub>N-HF, y se calentó a 65°C durante 1,5 h para eliminar los grupos TBDMS en la posición 2'. Los oligonucleótidos se precipitaron entonces en éter dietílico seco (400  $\mu$ l) que contiene Et<sub>3</sub>N (1%). El líquido se eliminó cuidadosamente para producir un pelete en la parte inferior del tubo. El éter residual se eliminó en el concentrador a vacío para dar el RNA "bruto" como un material blanco esponjoso. Las muestras se disolvieron en 1 ml de agua libre de RNasa, y se cuantificaron midiendo la absorbancia a 260 nm. Este material bruto se almacenó a -20°C.

Los oligonucleótidos brutos se analizaron y purificaron mediante HPLC. Los oligonucleótidos brutos se analizaron y purificaron mediante HPLC de par iónico de fase inversa (RP IP). El análisis de RP HPLC se llevó a cabo en un sistema Gilson LC, equipado con un detector de longitud de onda fija (260 y 280 nm), un horno de columna, un automuestreador y un desgasificador interno. Se usó una columna XTerra C18 (4,6\*250 mm) a un caudal de 1,0 ml/min. a 65°C. Se inyectó RNA (20  $\mu$ l para el experimento analítico, 1 ml para el experimento preparativo a una concentración de 1 OD/ml). El Eluyente A contenía TEAAc 0,1 M, agua HPLC, pH 7,0, y el Eluyente B tenía TEAAc 0,1 M en agua HPLC, acetonitrilo al 70%, pH 7,0. La elución comenzó con 10% de B durante 2 min., seguido de 25% de B en 4 min., y después se empleó un gradiente lineal con una concentración diana de 50% de B durante otros 30 min. Los oligonucleótidos secos purificados se desalaron entonces usando Sephadex G25M.

#### B. Síntesis de oligonucleótidos con modificaciones 2'-fluoro

Las moléculas RNA se sintetizaron en una máquina 394 ABI usando el ciclo estándar escrito por el fabricante, con modificaciones de unas pocas etapas de espera. El soporte sólido fue CPG (500A, TsT AG 001 de AM Chemicals LLC, y el rC y rU procedieron de Prime Synthesis). Los monómeros fueron fosforamiditos de RNA o fosforamiditos de 2'F con grupos protectores estándar, y se usaron a concentraciones de 0,15 M en acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN), excepto que se establezca de otro modo. Específicamente, los fosforamiditos de RNA fueron fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>6</sup>-benzoil-2'-O-tbutildimetilsilil-adenosina-3'-O-(β-cianoetil-N,N'-diisopropilo), fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>2</sup>-isobutiril-2'-O-tbutildimetilsilil-guanosina-3'-O-(β-cianoetil-N,N'-diisopropilo), fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>4</sup>-acetil-2'-O-tbutildimetilsilil-citidina-3'-O-(β-cianoetil-N,N'-diisopropilo) y fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-tbutildimetilsilil-uridina-3'-O-(β-cianoetil-N,N'-diisopropilo); los fosforamiditos de 2'F RNA fueron fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>4</sup>-acetil-2'-fluoro-2'-desoxicidina-3'-O-(β-cianoetil-N,N'-diisopropilo) y fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-2'-fluoro-2'-desoxiuridina-3'-O-(β-cianoetil-N,N'-diisopropilo). Los tiempos de acoplamiento fueron 10 min. para todos los monómeros. Los detalles de los otros reactivos son como siguen: Activador: 5-etiltiotetrazol (0,25 M); grupo protector de tapa A: 5% de anhídrido acético/THF/piridina; grupo protector de tapa B: 10% de N-metilimidazol/THF; la oxidación de fosfato implicó THBP (10% en ACN) durante 10 min., mientras que la oxidación de fosforotioato utilizó 0,05 M del reactivo EDITH/acetonitrilo. La destritolación se logró con 3% de TCA/diclorometano. El grupo protector DMT se eliminó tras la última etapa del ciclo.

Tras la terminación de la síntesis, CPG se transfirió a un tubo de microcentrifugadora estéril con tapa de rosca. El oligonucleótido se escindió, y los grupos de base y de fosfato se desprotegieron simultáneamente con 1,0 ml de una mezcla de amoníaco etanólico (1:3) durante 7 horas a 55°C. El tubo se enfrió de forma breve en hielo, y después la disolución se transfirió a un tubo de centrifugadora de 5 ml; a esto le siguió un lavado de tres veces con 0,25 ml de acetonitrilo al 50%. Los tubos se enfriaron a -80°C durante 15 min., antes de secar en un liofilizador.

El residuo blanco obtenido se resuspendió en 200 ul de NMP/Et<sub>3</sub>N/Et<sub>3</sub>N-HF, y se calentó a 50°C durante 16 h para eliminar los grupos TBDMS en la posición 2'. Los oligonucleótidos se precipitaron entonces en éter dietílico seco (400 ul) que contiene Et<sub>3</sub>N (1%). El líquido se eliminó cuidadosamente para producir un pelete en la parte inferior del tubo. El éter residual se eliminó en el concentrador a vacío para dar el RNA "bruto" como un material blanco esponjoso. Las muestras se disolvieron en 1 ml de agua libre de RNasa, y se cuantificaron midiendo la absorbancia a 260 nm. Este material bruto se almacenó a -20°C.

Los oligonucleótidos brutos se analizaron y purificaron mediante HPLC. Los oligonucleótidos secos purificados se desalaron entonces usando Sephadex G25M.

### C. Síntesis de oligorribonucleótidos de RNA modificados con fosforotioato

Los oligonucleótidos se sintetizaron en una máquina 394 ABI (ALN 0208) usando el ciclo de 93 etapas estándar escrito por el fabricante, con modificaciones de unas pocas etapas como se describe más abajo. El soporte sólido fue vidrio de poro controlado (CPG, 2 μmoles rA CPG, 520A, o rU CPG, 500A). Los monómeros fueron fosforamiditos de RNA con grupos protectores estándar usados a concentraciones de 0,15 M en acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN), excepto que se establezca de otro modo. Específicamente, los fosforamiditos de RNA fueron fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>6</sup>-benzoil-2'-O-tbutildimetilsilil-adenosina-3'-O-(β-cianoetil-N,N'-diisopropilo), fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>2</sup>-isobutiril-2'-O-tbutildimetilsilil-guanosina-3'-O-(β-cianoetil-N,N'-diisopropilo), fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>4</sup>-acetil-2'-O-tbutildimetilsilil-citidina-3'-O-(β-cianoetil-N,N'-diisopropilo) y fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-tbutildimetilsilil-uridina-3'-O-(β-cianoetil-N,N'-diisopropilo). Los tiempos de acoplamiento fueron 10 minutos. Los detalles de los otros reactivos fueron como sigue: activador: 5-etiltiotetrazol (0,25 M); grupo protector de tapa A: 5% de anhídrido acético/THF/piridina; grupo protector de tapa B: 10% de N-metilimidazol/THF; la oxidación de PS, 0,05 M de reactivo EDITH/acetonitrilo. La destritolación se logró con 3% de TCA/diclorometano.

Tras terminar la síntesis, el CPG se transfirió a un tubo de microcentrifugadora estéril con tapa de rosca. El oligonucleótido se escindió, y simultáneamente los grupos de base y de fosfato se desprotegieron con 1,0 ml de una mezcla de metilamina etanólica:amoníaco (1:1) durante 5 horas a 55°C. El tubo se enfrió de forma breve en hielo, y después se transfirió la disolución a un tubo de centrifugadora de 5 ml; a esto le siguió un lavado con 3 x 0,25 ml de acetonitrilo al 50%. Los tubos se enfriaron a -80°C durante 15 min., antes de secar en un liofilizador.

El residuo blanco obtenido se resuspendió en 200 μl de TEA 3HF, y se calentó a 65°C durante 1,5 h para eliminar los grupos TBDMS en la posición 2'. Los oligonucleótidos se precipitaron entonces mediante adición de 400 μl de MeOH seco. El líquido se eliminó tras girar en una microcentrifugadora durante 5 minutos en la velocidad más elevada disponible. El metanol residual se eliminó en un concentrador de vacío. Las muestras se disolvieron en 1 ml de agua libre de RNasa, y se cuantificaron midiendo la absorbancia a 260 nm. El material bruto se almacenó a -20°C. Los oligonucleótidos se analizaron y purificaron mediante HPLC, y después se desalaron usando Sephadex G25M.

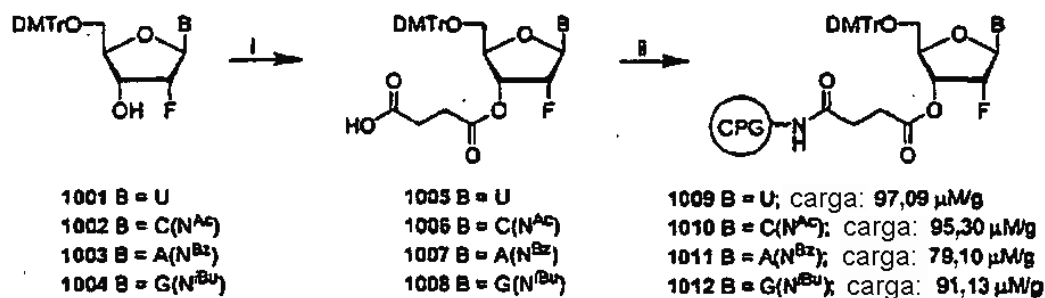
### Ejemplo 9. Síntesis de oligonucleótidos con 2'-F RNA y 2'-O-Me RNA alternos (Tabla 7)

Síntesis de CPGs para 2'F

Los CPGs de los 5'-O-DMTr-2-desoxi-2'-fluororribonucleósidos con protección de base apropiada se sintetizaron

como se muestra en el Esquema A. 5'-O-DMTr-2'-desoxi-2'-fluoro-N<sup>Bz</sup>-A y 5'-O-DMTr-2'-desoxi-2'-fluoro-N<sup>Bu</sup>-G se sintetizaron como se da a conocer (Kawasaki et al., J. Med. Chem., 1993, 36, 831). La reacción de los compuestos **1001** con anhídrido succínico en presencia de DMAP en dicloruro de etileno produjo el compuesto **1005**. El compuesto **1005** se trató con 2,2'-ditiobis(5-nitropiridina) (DTNP) y trifenilfosfina en presencia de DMAP en acetonitrilo-dicloruro de etileno, y subsiguientemente con Icaa CPG como se da a conocer por Kumar et al. (Nucleosides & Nucleotides, 1996, 15, 879) dando el CPG deseado **1009**. La carga del CPG se determinó como se da a conocer en la bibliografía (Prakash et al., J. Org. Chem., 2002, 67, 357). Los CPGs de 2'-desoxi-2'-fluoro A, C y G adecuadamente protegidos se obtuvieron como se describe anteriormente (Esquema A).

Esquema A<sup>a</sup>: Icaa CPG de 2'-desoxi-2'-FA(N<sup>Bz</sup>), C(N<sup>Ac</sup>), G(N<sup>iBu</sup>) y U



<sup>a</sup> (i) anhídrido succínico, DMAP/EDC (ii) DTNP, Ph<sub>3</sub>P, DMAP y Icaa CPG.

Las moléculas de RNA quiméricas con 2'-F RNA y 2'-O-Me RNA alternos se sintetizaron en una máquina 394 ABI usando el ciclo estándar escrito por el fabricante, con modificaciones de unas pocas etapas de espera. El soporte sólido fue CPG (500A). Los monómeros fueron fosforamiditos de 2'-F RNA o fosforamiditos de 2' OMe RNA con grupos protectores estándar, y se usaron a concentraciones de 0,15 M en acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) excepto que se establezca de otro modo. Específicamente, los fosforamiditos de 2'OMe RNA fueron fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>6</sup>-benzoyl-2'-O-metil-adenosina-3'-O-(β-cianoetil-N,N'-diisopropilo), fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>2</sup>-isobutiril-2'-O-metil-guanosina-3'-O-(β-cianoetil-N,N'-diisopropilo), fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>4</sup>-acetil-2'-O-metil-citidina-3'-O-(β-cianoetil-N, N'-diisopropilo) y fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-metil-uridina-3'-O-(β-cianoetil-N,N'-diisopropilo). Los fosforamiditos de 2'F RNA, fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>4</sup>-acetil-2'-fluoro-2'-desoxicitidina-3'-O-(β-cianoetil-N,N'-diisopropilo), fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-2'-fluoro-2'-desoxiuridina-3'-O-(β-cianoetil-N,N'-diisopropilo). Fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-2'-fluoro-N<sup>2</sup>-isobutiril-2'-desoxiguanosina-3'-O-(β-cianoetil-N,N'-diisopropilo) y fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-2'-fluoro-N<sup>2</sup>-isobutiril-2'-desoxiguanosina-3'-O-(β-cianoetil-N,N'-diisopropilo). Los tiempos de acoplamiento fueron 10 min. para todos los monómeros. Los detalles de los otros reactivos son los siguientes: Activador: 5-etiltiotetrazol (0,25 M); grupo protector de tapa A: 5% de anhídrido acético/THF/piridina; grupo protector de tapa B: 10% de N-metilimidazol/THF; la oxidación de fosfato 0,02M de I<sub>2</sub>/THF/H<sub>2</sub>O, mientras que la oxidación de PS se llevó a cabo usando el reactivo de EDITH como se describe anteriormente. La destitilación se logró con 3% de TCA/diclorometano. El grupo protector DMT final se eliminó en el sintetizador.

Tras terminar la síntesis, el CPG se transfirió a un tubo de microcentrifugadora estéril con tapa de rosca. El oligonucleótido se escindió, y los grupos de base y de fosfato se desprotegieron simultáneamente con 1,0 ml de una mezcla de etanol:amoníaco (1:3) durante 7 horas a 55°C. El tubo se enfrió de forma breve en hielo, y después la disolución se transfirió a un tubo de centrifugadora de 5 ml. A esto le siguió un lavado de tres veces con 0,25 ml de acetonitrilo al 50%. Los tubos se enfriaron a -80°C durante 15 min., antes de secar en un liofilizador para dar el RNA "bruto" como un material esponjoso blanco. Las muestras se disolvieron en 1 ml de agua libre de RNasa, y se cuantificaron midiendo la absorbancia a 260 nm. Este material bruto se almacenó a -20°C.

Los oligonucleótidos brutos se analizaron y purificaron mediante geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 20%. Los oligonucleótidos secos purificados se desalaron entonces usando Sephadex G25M (Amersham Biosciences).

#### B. Análisis de la actividad de los dúplex

Los dúplex se ensayaron para determinar la actividad en el ensayo de células HeLa descrito anteriormente. La Tabla 7 y la Figura 30 proporcionan gráficas de las actividades en células HeLa para cada una de las modificaciones descritas anteriormente.

#### Ejemplo 10. Moléculas de VEGF conjugadas (Tablas 8, 9, 10 y 18)

##### 1. Síntesis:

Las moléculas de RNA se sintetizaron en una máquina ABI-394 (Applied Biosystems) usando el ciclo de 93 etapas estándar escrito por el fabricante, con las modificaciones a unas pocas etapas de espera como se describe más



5 abajo. El soporte sólido fue vidrio de poro controlado (CPG, 1  $\mu$ mol, 500 A), y los monómeros fueron fosforamiditos de RNA con grupos protectores estándar fosforamidito de (5'-O-dimetoxitritil-N<sup>6</sup>-benzoil-2'-O-t-butildimetilsilil-adenosina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilo, fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>4</sup>-acetil-2'-O-t-butildimetilsilil-citidina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilo, fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>2</sup>-isobutil-2'-O-t-butildimetilsilil-guanosina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilo, y fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-t-butildimetilsilil-uridina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilo. Todos los amiditos se usaron a una concentración de 0,15 M en acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) y un tiempo de acoplamiento de 6 min. para los monómeros sin modificar y modificados con 2'-O-Me y 12 min. para los monómeros modificados y conjugados. Como activador, se usó 5-etiltiotetrazol (0,25 M). Para la oxidación de PO, se usó yodo/agua/piridina, y para la oxidación de PS se usó el reactivo de Beaucage (2%) en acetonitrilo anhidro. El tiempo de sulfurización fue alrededor de 6 min. Todas las síntesis se llevaron a cabo en una escala de 1  $\mu$ mol.

Reactivos	Concentración		Etapas de espera o de acoplamiento
Activador:	0,25M	5-Etiltio-1H-tetrazol	720 s
oxidación de PO	0,02M	Yodo en THF/agua/piridina	20 s
oxidación de PO	0,02M	Hidroperóxido de t-butilo	600 s
oxidación de PS	2%	Reactivo de Beaucage/Acetonitrilo anh.	360 s (espera de 200 s + pulso de 30 s + espera de 130 s)
Protector de tapa A	5%	Anhídrido fenoxiacético al 5%/THF/piridina	20 s
Protector de tapa B	10%	N-metilimidazol al 10%/THF	20 s
Destritilación	TCA al 3%	Ácido tricloroacético/diclorometano	70 s

Se usaron los siguientes tipos de modificaciones para llevar a cabo la síntesis usando estos protocolos:

1. Cadena principal de fosfodiéster sin modificar (PO) sólo
- 15 2. Fosforotioato (PS) sólo
3. 2'-O-Me, PS
4. 3'-Naproxeno, 2'F- 5Me-U, PS
5. 5'-Colesterol, PS
6. 3'-Colesterol, PS
- 20 7. 2'F- 5Me-U, PS
8. 3'-Biotina, 2'F- 5Me-U, PS
9. Ácido 3'-colánico, 2'F- 5Me-U, PS
10. Metilfosfonato
11. C-5 alilamino rU

- 25 2. Desprotección – I (desprotección de la nucleobase)

Tras terminar la síntesis, el vidrio de poro controlado (CPG) se transfirió a un vial con tapa de rosca o a un tubo de microcentrifugadora libre de RNasa con tapa de rosca. El oligonucleótido se escindió del soporte, y los grupos protectores de base y de fosfato se retiraron simultáneamente usando una mezcla de amoníaco etanólico (amoníaco (28-30%:etanol (3:1))-(1,0 ml) durante 15 h a 55°C. El vial se enfrió de forma breve en hielo, y después la mezcla de amoníaco etanólico se transfirió a un nuevo tubo de microcentrifugadora. El CPG se lavó con porciones de agua desionizada (2 x 0,1 ml). El sobrenadante se combinó, se enfrió en hielo seco durante 10 min., y después se secó en un concentrador de vacío.

- 30 3. Desprotección-II (eliminación del grupo 2'-O-TBDMS)

El residuo blanco obtenido se resuspendió en una mezcla de trietilamina, trihidrofluoruro de trietilamina (TEA.3HF, aprox. 24% de HF) y 1-metil-2-pirrolidinona (NMP) (4:3:7) (400 ul), y se calentó a 65°C durante 90 min. para eliminar los grupos terc-butildimetilsilílicos (TBDMS) en la posición 2'. La reacción se paralizó entonces con isopropoxitrimetilsilano (iPrOMe<sub>3</sub>Si, 400 ul) y se incubó adicionalmente en el bloque de calentamiento dejando las tapas abiertas durante 10 min. Esto provoca que el aducto volátil de fluoruro de isopropoxitrimetilsililo se vaporice. El reactivo de parálisis residual se eliminó secando en un concentrador de vacío. Se añadió trietilamina al 3% en éter dietílico (1,5 ml). La mezcla se sometió a centrifugación. Se formó un pelete de RNA. El sobrenadante se eliminó pipeteando sin perturbar el pelete. El pelete se secó en un concentrador de vacío. El RNA bruto se obtuvo como un material blanco esponjoso en el tubo de microcentrifugadora.

5

10

#### 4. Cuantificación de oligómero bruto o análisis bruto

Las muestras se disolvieron en agua desionizada (1,0 ml) y se cuantificaron según lo siguiente: primero se llevó a cabo un blanco con agua sola (1 ml). Una muestra de la disolución de RNA (20 ul) se diluyó con agua (980 ul) y se mezcló bien en un tubo de microcentrifugadora, después se transfirió a una cubeta, y se obtuvo la lectura de la absorbancia a 260 nm. El material bruto se secó y se almacenó a -20°C.

15

#### 5. Análisis de MS:

Las muestras brutas (0,1 OD) se analizaron usando LC-MS.

#### 6. Purificación de oligómeros

##### (a) Purificación mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

20

Los oligonucleótidos se purificaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en placa vertical usando un Owl's Separation Systems (Portsmouth, NH). La acrilamida de grado electroforético (40%), la N,N'-metileno-bis(acrilamida) (BIS), el persulfato de amonio (APS, N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED), azul de bromofenol (BPB), xileno cianol (XC), 10 x TBE (tris-hidroxi-metilaminometano 0,89 M, borato pH 8,3, etilendiaminotetraacetato de sodio 20 mM) procedían de National Diagnostics (Atlanta, GA). Se preparó el gel desnaturalizante al 12% para purificación de los oligorribonucleótidos no modificados y modificados. El grosor de los geles preparativos fue 1,5 mm. El tampón de carga fue formamida al 80% en 10x TBE. Tras eliminar las placas de vidrio, los geles se cubrieron con Saran Wrap®, y se colocaron sobre una placa de TLC fluorescente iluminada mediante una lámpara de UV sostenida manualmente para la visualización. Las bandas deseadas se cortaron y se agitaron toda la noche en 2 ml de agua o acetato de sodio 0,03 M. El eluyente se eliminó secando en un concentrador de vacío.

25

##### (b) Purificación mediante cromatografía de líquidos de altas prestaciones (HPLC):

30

Condición A: Purificación de 2'-O-Me/PS oligorribonucleótidos sin modificar:

La cantidad de muestra inyectada es alrededor de ~100 OD.

Columna: Dionex PA-100 Semiprep.

Tampón A: Agua

Tampón B: Tris.Cl 0,25 M pH 8,0

35

Tampón C: Perclorato de sodio 0,375 M

Calentamiento: 65°C

Tiempo	Caudal	Tampón A	Tampón B	Tampón C	Rendimiento Total	Pureza
0	5,00	88%	10%	2,0%	40-60%	85-98%
3,0	5,00	88%	10%	2,0%		
30,0	5,00	57,0	10%	33,0		
35,0	5,00	88%	10%	2,0%		
40,0	5,00	88%	10%	2,0%		

Condición B: Protocolos para la purificación de 2'-O-Me/PS oligorribonucleótidos:

Columna: Dionex PA-100 Semiprep.

Tampón A: Agua

Tampón B: Tris.Cl 0,25 M pH 8,0

Tampón C: Perclorato de sodio 0,8 M

Calentamiento: 65°C

Tiempo	Caudal	Tampón A	Tampón B	Tampón C	Rendimiento Total	Pureza
0	5,00	88%	10%	2,0%	~40-60%	85-98%
3,0	5,00	88%	10%	2,0%		
30,0	5,00	57,0	10%	33,0		
35,0	5,00	88%	10%	2,0%		
40,0	5,00	88%	10%	2,0%		

5

### 7. Desalado del oligómero purificado

El oligómero seco purificado se desaló entonces usando Sephadex G-25 M. El cartucho se acondicionó con 10 ml de agua desionizada tres veces. Finalmente, el oligómero purificado, disuelto completamente en 2,5 ml de agua libre de RNAsa, se aplicó al cartucho con una elución gota a gota muy lenta. El oligómero libre de sal se eluyó con 3,5 ml de agua desionizada directamente en un vial con tapa de rosca. El material de RNA purificado se secó en un concentrador de vacío y se almacenó a -20°C.

10

siRNAs conjugados a biotina (Tabla 10)

#### 1. Síntesis:

15

20

25

Las moléculas de RNA se sintetizaron en una máquina ABI-394 (Applied Biosystems) usando el ciclo de 93 etapas estándar escrito por el fabricante, con las modificaciones a unas pocas etapas de espera como se describe más abajo. El soporte sólido fue vidrio de poro controlado (CPG, 1  $\mu$ mol, 500 A), y los monómeros fueron fosoramiditos de RNA con grupos protectores estándar (fosoramidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>6</sup>-benzoi-2'-O-t-butildimetilsilil-adenosina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilo, fosoramidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>4</sup>-acetil-2'-O-t-butildimetilsilil-citidina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilo, fosoramidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>2</sup>-isobutiril-2'-O-t-butildimetilsilil-guanosina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilo, y fosoramidito de 5'-O-dimetoxitritil-2'-O-t-butildimetilsilil-uridina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilo. El CPG modificado y los amiditos se sintetizaron usando métodos conocidos y como se describen aquí. Todos los amiditos se usaron a una concentración de 0,15 M en acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) y un tiempo de acoplamiento de 6 min. para monómeros sin modificar y modificados 2'-O-Me, y 12 min. para monómeros modificados y conjugados. Como activador, se usó 5-etiltio-1H-tetrazol (0,25 M). Para la oxidación de PO, se usó yodo/agua/piridina, y para la oxidación de PS se usó el reactivo de Beaucage (2%) en acetonitrilo anhidro. El tiempo de sulfurización es alrededor de 6 min. Para la síntesis de siRNAs conjugados a 3'-biotina, se usó peróxido de t-butilhidrógeno como agente oxidante (tiempo de oxidación 10 min.).

Reactivo	Concentración		Etapas de espera o de acoplamiento
Activador:	0,25M	5-Etiltio-tetrazol	300 s para oligos sin modificar y 720 s para oligos modificados
oxidación de PO	0,02M	Yodo en THF/agua/piridina	20 s
oxidación de PO	0,02M	Hidroperóxido de t-butilo	600 s
oxidación de PS	2%	Reactivo de Beaucage/Acetonitrilo anh.	360 s (espera de 200 s + pulso de 30 s + espera de 130 s)
Protector de tapa A	5%	Anhídrido fenoxiacético al 5%/THF/piridina	20 s
Protector de tapa B	10%	N-metilimidazol al 10%/THF	20 s
Destritilación	TCA al 3%	Ácido tricloracético/diclorometano	70 s

#### 2. Desprotección-I (desprotección de nucleobase)

Tras terminar la síntesis, el vidrio de poro controlado (CPG) se transfirió a un vial con tapa de rosca o a un tubo de microcentrifugadora libre de RNasa con tapa de rosca. El oligonucleótido se escindió del soporte con la eliminación simultánea de los grupos protectores de base y de fosfato con una mezcla de amoníaco etanólico [amoníaco (28-30%):etanol (3:1) 1,0 ml] durante 15 h a 55°C. El vial se enfrió brevemente en hielo, y después la mezcla de amoníaco etanólico se transfirió a un nuevo tubo de microcentrifugadora. El CPG se lavó con porciones de agua desionizada (2 x 0,1 ml). El filtrado combinado se colocó entonces en hielo seco durante 10 min., y se secó en un concentrador de vacío.

### 3. Desprotección-II (eliminación del grupo 2'-O-TBDMS)

El residuo blanco obtenido se resuspendió en una mezcla de trietilamina, trihidrofluoruro de trietilamina (TEA.3HF, aprox. 24% de HF) y 1-metil-2-pirrolidiona (NMP) (4:3:7) (400 ul), y se calentó a 65°C durante 90 min. para eliminar los grupos terc-butildimetilsilílicos (TBDMS) en la posición 2'. La reacción se paralizó entonces con isopropoxitrimetilsilano (iPrOMe<sub>3</sub>Si, 400 ul) y se incubó posteriormente en el bloque de calentamiento dejando las tapas abiertas durante 10 min. (Esto provoca que el aducto de fluoruro de isopropoxitrimetilsililo volátil se vaporice). El reactivo de paralización residual se eliminó secando en un concentrador de vacío. Se añadió trietilamina al 3% en éter dietílico (1,5 ml), y la mezcla se sometió a centrifugación para producir un pelete de RNA. El sobrenadante se eliminó pipeteando sin perturbar el pelete. El pelete se secó en un concentrador de vacío. El RNA bruto se obtuvo como un material blanco esponjoso en el tubo de microcentrifugadora.

### 4. Cuantificación de oligómero bruto o análisis bruto

Las muestras se disolvieron en agua desionizada (1,0 ml) y se cuantificaron según lo siguiente: en primer lugar se llevó a cabo un blanco con agua sola (1 ml). Una muestra de la disolución de RNA (20 ul) se diluyó con agua (980 ul) y se mezcló bien en un tubo de microcentrifugadora, después se transfirió a una cubeta, y se obtuvo la lectura de la absorbancia a 260 nm. El material bruto se secó y se almacenó a -20°C.

### 5. Análisis de MS:

Las muestras del RNA (0,1 OD) se analizaron usando MS.

### 6. Purificación de oligómeros

Purificación mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE)

Los oligonucleótidos se purificaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) en placa vertical, usando un Owl's Separation Systems (Portsmouth, NH). La acrilamida de grado electroforético (40%), la N,N'-metileno-bis(acrilamida) (BIS), el persulfato de amonio (APS, N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED), el azul de bromofenol (BPF), xileno cianol (XC), 10 x TBE (0,89 M). Trishidroxi-metilaminometano, borato (pH 8,3), etilendiaminotetraacetato de sodio 20 mM) procedieron de National Diagnostics (Atlanta, GA). Se preparó el gel desnaturizante al 12% para la purificación de los oligorribonucleótidos. El grosor del gel preparativo fue 1,5 mm. El tampón de carga fue formamida al 80% en 10x TBE. Después de eliminarlos de las placas de vidrio de PAGE, los geles se cubrieron con Saran Wrap® y se colocaron sobre una placa de TLC fluorescente iluminada mediante una lámpara de UV sostenida manualmente (Upland, CA) para visualización. Las bandas deseadas se cortaron y se agitaron toda la noche en agua (2 ml) o acetato de sodio 0,03 M. El eluyente se eliminó y se secó en un concentrador de vacío. Todas las secuencias conjugadas a biotina se purificaron mediante PAGE.

### 7. Desalado del oligómero purificado

El oligómero seco purificado se desaló entonces usando Sephadex G-25 M (Amersham Biosciences). El cartucho se acondicionó tres veces con agua desionizada (10 ml cada vez). Finalmente, el oligómero purificado, disuelto completamente en 2,5 ml de agua libre de RNasa, se aplicó al cartucho con una elución gota a gota muy lenta. El oligómero libre de sal se eluyó con agua desionizada (3,5 ml) directamente en un vial con tapa de rosca. El material de RNA purificado se secó en un concentrador de vacío y se almacenó a -20°C.

### 8. Control de calidad

(a) Electroforesis en gel capilar (CGE)

(b) LC/MS por electropulverización

Una muestra del oligómero (aprox. 0,10 OD) se disolvió en agua (50 ul y 100 ml en tubos separados), y entonces se pipeteó en viales especiales para CGE y el análisis de LC/MS.

### 9. Análisis de la actividad de los dúplex

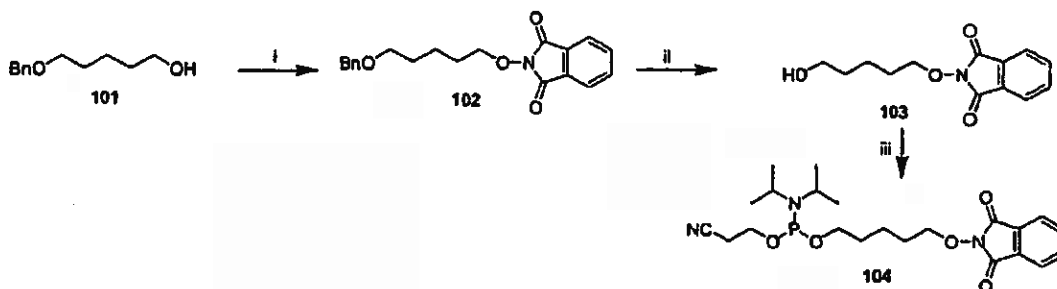
Los dúplex se ensayaron para determinar la actividad en el ensayo de células HeLa descrito más arriba. Las Tablas 8, 9, 10 y 18 y las Figuras 31-35 proporcionan datos y gráficas de las actividades en células HeLa para cada una de las modificaciones descritas anteriormente.

**Ejemplo 11: Conjugación de retinoides a RNA (Tabla 14)**

Conjugación de todo-*trans*-retinal a oligonucleótidos (RNA):

El fosforamidito **104** se sintetizó como se muestra en el Esquema B para la conjugación de retinal a oligonucleótidos.

Esquema B: Síntesis de bloques de construcción de conjugación post-sintética para la conjugación de retinal – enfoque oxímico 1 para la conjugación 5'



<sup>a</sup> (i) Ph<sub>3</sub>P, DIAD, *N*-hidroxiftalimida / MeCN; (ii) H<sub>2</sub>, Pd-C (10%), 1 atm/EtOAc; (iii) Fosfitilación

Etapa 1: Compuesto **102**: Se recogieron monobencilpentan-1,5-diol (15,70 g, 80,82 mmoles), Ph<sub>3</sub>P (25,43 g, 96,84 mmoles) y *N*-hidroxiftalimida (116,0 g, 98,08 mmoles) en CH<sub>3</sub>CN anhidro (100 ml) en una atm. de argón. Se añadió gota a gota DIAD puro (20,0 ml, 103,25 mmoles) en la disolución agitada durante un período de 20 minutos, y la agitación se continuó durante 24 h. La reacción se monitorizó mediante TLC. Los disolventes se eliminaron a vacío; y el residuo se trituró con éter dietílico y se filtró. El residuo se lavó con éter, se filtró, y el filtrado se combinó. Se añadió gota a gota hexano en el filtrado hasta que éste dio turbidez, y subsiguientemente la disolución se volvió homogénea añadiéndola éter. La disolución homogénea se almacenó a 5°C durante 24 h. El Ph<sub>3</sub>PO precipitado se separó por filtración, se lavó con una mezcla de éter:hexano (1:1). El filtrado combinado se evaporó hasta sequedad, y el residuo se purificó mediante cromatografía en columna en gel de sílice ultrarrápida (10-15% de EtOAc en hexano) para obtener 24,5 g (89,3%) de compuesto **102** como un aceite amarillo pálido viscoso. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25°C): 7,84-7,82 (m, 2H); 7,75-7,73 (m, 2H); 7,34-7,33 (m, 4H); 7,29-7,26 (m, 1H); 4,51 (s, 2H); 4,22-4,18 (t, J(H,H) = 6,71 Hz, 2H); 3,52-3,48 (t, J(H,H) = 6,4 Hz, 2H); 2,04-1,78 (m, 2H); 1,73-1,56 (m, 4H). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25°C): 163,9, 138,8, 134,6, 129,2, 128,6, 127,8, 127,7, 123,7, 78,6, 73,1, 70,3, 29,6, 28,2, 22,5.

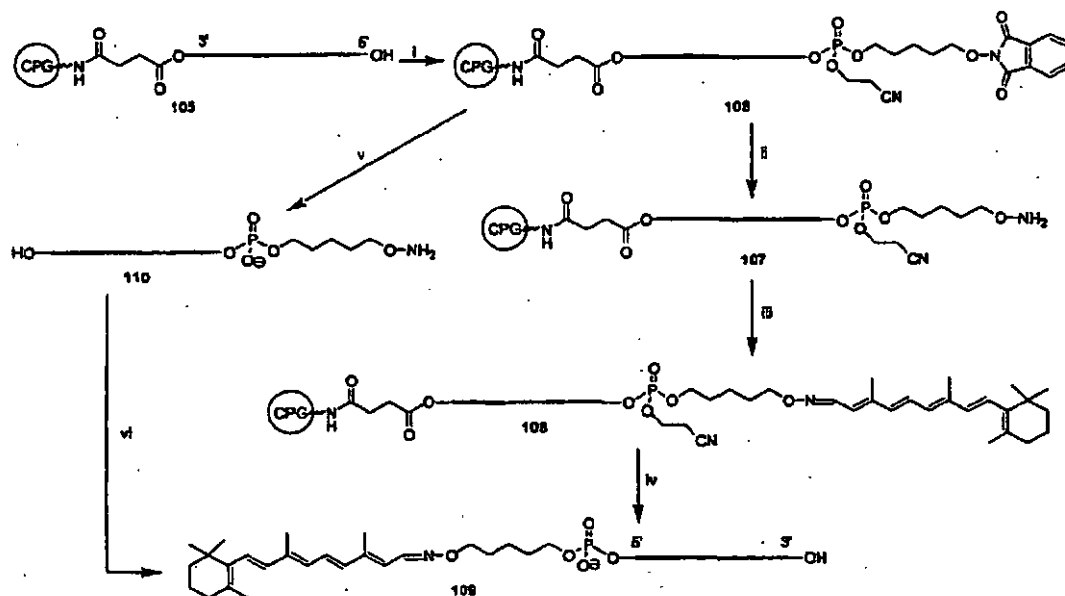
Etapa 2: Compuesto **103**: Se recogió compuesto **102** (23,5 g, 69,29 mmoles) en 100 ml de EtOAc/metanol (1:1). La mezcla se desgasificó y se purgó con argón, a esto se añadieron 2,4 g de Pd-C (10% húmedo, tipo Degusa). La mezcla se hidrogenó entonces toda la noche, se filtró a través de un lecho de celita a través de un embudo sinterizado. El residuo se pasó subsiguientemente a través de una columna de gel de sílice y se separó por elución usando EtOAc al 40% en hexano para obtener el compuesto **103** (15,70 g, 90,9%) como un sólido blanco. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25°C) 7,83-7,81 (bm, 2H); 7,75-7,73 (bm, 2H); 4,23-4,19 (t, J(H, H) = 6,4 Hz, 2H); 3,70-3,66 (t, J(H,H) = 5,80 Hz, 2H); 1,83-1,79 (m, 2H); 1,67-1,60 (m, 4H). RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25°C) □ 163,9, 134,7, 129,1, 123,7, 78,6, 62,7, 32,4, 28,0, 22,0.

Etapa 3: Compuesto **104**: Se recogieron compuesto **103** (5,4 g, 21,67 mmoles) y trietilamina (4 ml, 28,69 mmoles) en EtOAc anhidro (30 ml) en argón. se añadió gota a gota diisopropilclorofosforamidito de 2-cianoetilo (5,00 ml, 21,97 mmoles) a la mezcla de reacción. Inmediatamente se formó un precipitado blanco de Et<sub>3</sub>N.HCl tras la adición del reactivo, y la reacción estuvo terminada en 10 min. (se monitorizó mediante TLC). El precipitado se filtró a través de un embudo sinterizado, y el disolvente se eliminó a presión reducida. El residuo se cargó directamente en una columna de gel de sílice para purificación. Se eluyó con hexano/EtOAc 9:1 para producir compuesto **104** como un aceite amarillo, 8,68 g (89,13%). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25°C) □ 7,85-7,81 (m, 2H); δ 7,77-7,72 (m, 2H); 4,22-4,19 (t, J(H,H) = 6,80 Hz, 2H); 3,91-3,76 (m, 2H); 3,72-3,53 (m, 4H); 2,67-2,63 (t, J(H,H) = 6,71 Hz, 2H); 1,86-1,78 (m, 2H); 1,73-1,66 (m, 2H); 1,62-1,56 (m, 2H); 1,19-1,16 (m, 12H). RMN <sup>31</sup>P (162 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25°C) δ 145,09. RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>, 25°C) δ 163,9, 134,7, 129,2, 123,7, 117,9, 78,6, 64,0, 63,4, 58,7, 58,5, 43,2, 43,1, 31,1, 31,0, 28,1, 24,9, 24,8, 24,7, 22,3, 20,6, 20,5.

Etapa 4: Conjugación de todo-*trans*-retinal a oligonucleótido: Todo-*trans*-retinal se conjugó a oligonucleótido como se muestra en el Esquema C. El compuesto **104** se acopló a un oligonucleótido **105** unido a sólido en condiciones estándar de síntesis de oligonucleótidos en fase sólida, para obtener el compuesto **106**. El grupo protector ftalimido en el compuesto **106** se eliminó selectivamente tratando con hidrato de hidrazinio como se da a conocer por Salo et al. (Bioconjugate Chem. 1999, 10, 815), para obtener el compuesto **107**. El tratamiento del compuesto **107** con todo-*trans*-retinal en condición oscura dio el compuesto **108** como se da en la bibliografía (Bioconjugate Chem. 1999, 10, 815). La desprotección y purificación del oligonucleótido de RNA estándar en la oscuridad produjo el conjugado deseado **109** de oligonucleótido-retinal. El compuesto **109** también se obtuvo a partir del compuesto **110** como se muestra en el Esquema C. La desprotección y purificación completas del compuesto **106** produjo un oligonucleótido **110** libre sin unir, que se hizo reaccionar subsiguientemente con todo-*trans*-retinal para dar el compuesto **109**

deseado.

Esquema C: Conjugación de todo-*trans*-retinal a oligonucleótidos



<sup>a</sup> (i) Fosforamidito **104**, (ciclo de síntesis de oligonucleótido estándar); (ii) Hidrato de hidrazinio/Py/AcOH (0,124/4/7); (iii) todo-*trans*-retinal en DMF o MeCN; (iv) Desprotección (MeNH<sub>2</sub>, TEA.3HF) y purificación del oligonucleótido (RNA); (v) Desprotección (MeNH<sub>2</sub>, TEA.3HF) y purificación del oligonucleótido (RNA); (vi) todo-*trans*-retinal en DMSO-H<sub>2</sub>O

Etapa 4.1. Síntesis de oligonucleótidos:

Todos los oligonucleótidos, excepto AL-3166 se sintetizaron en un sintetizador de DNA ABI 490. Para la síntesis de oligonucleótidos, se usaron soportes sólidos de vidrio de poro controlado comercialmente disponibles (dT-CPG y U-CPG, 500 Å) y fosforamiditos de RNA con grupos protectores estándar, fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>6</sup>-benzoil-2'-t-butildimetilsilil-adenosina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilo, fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>4</sup>-acetil-2'-t-butildimetilsilil-citidina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilo, fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>2</sup>-isobutiril-2'-t-butildimetilsilil-guanosina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilo, y fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-2'-t-butildimetilsilil-uridina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilo. Todos los fosforamiditos se usaron a una concentración de 0,15M en acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN). Se usó un tiempo de acoplamiento de 10 minutos. El activador fue 5-etil tiotetrazol (0,25M), y para la oxidación de PO se usó yodo/agua/piridina.

La secuencia AL-3166 se sintetizó en el sintetizador AKTAoligopilot. Todos los fosforamiditos se usaron a una concentración de 0,2M en acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) excepto para guanosina, que se usó una concentración de 0,2M en THF al 10%/acetonitrilo (v/v). Se usó un tiempo de acoplamiento/reciclado de 16 minutos. El activador fue 5-etil tiotetrazol (0,75M), para la oxidación de PO se usó yodo/agua/piridina, y para la oxidación de PS se usó PADS (2%) en 2,6-lutidina/ACN (1:1 v/v).

El fosforamidito con el enlazador aminooxi se sintetizó como se describe anteriormente, y se usó a una concentración de 0,15M en acetonitrilo. El tiempo de acoplamiento para el fosforamidito con enlazador de aminooxi fue 15 minutos. Para todas las secuencias, el acoplamiento del fosforamidito con ligador de aminooxi se llevó a cabo en el sintetizador de DNA ABI 390.

Etapa 4.2. Escisión del grupo protector ftalimido a partir de los oligonucleótidos con enlazador de aminooxi

Tras el acoplamiento del enlazador de aminooxi, el CPG se trató con 2,5 ml o 0,5M de acetato de hidrazinio en piridina (0,16/4/2 hidrazina anhidra, piridina, ácido acético) usando un método de jeringuilla dual. Cada 5 minutos, las jeringuillas se empujaron hacia delante y hacia atrás para obtener una nueva disolución en el CPG. Después del tratamiento con acetato de hidrazinio, el CPG se lavó con 2 x 5 ml de piridina, seguido de 3 x 5 ml de acetonitrilo. Se inundó con argón seco durante 30 segundos, y después se secó el CPG.

Etapa 4.3. Conjugación en el soporte con los aldehídos

El 1-pireno-carboxaldehído y el todo-*trans*-retinal procedieron de Aldrich, y se usaron a concentraciones de 0,5M en DMF. El 4-ceto-retinol se usó a una concentración de 0,13M en DMF. El CPG procedente de lo anterior se añadió a las disoluciones aldehídicas. La conjugación se llevó a cabo toda la noche (~16 h) a temperatura ambiente. Después

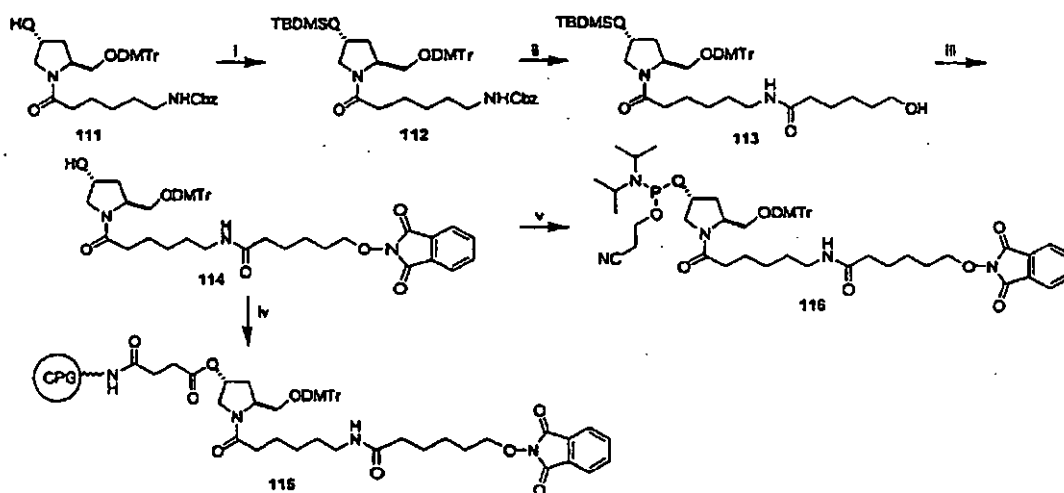
de terminar la reacción, el CPG se aclaró con DMF, seguido de acetonitrilo, y se secó al aire durante 10-15 minutos. Para la secuencia AL-3213, la conjugación tanto con todo-*trans*-retinal como con 1-pireno-carboxaldehído se llevó a cabo también en acetonitrilo. En el caso de 1-pireno-carboxaldehído, el aldehído no se disolvió completamente a 0,5M, y la disolución se usó como tal sin filtración para eliminar el aldehído sin disolver.

- 5 Etapa 4.4. Desprotección-I (desprotección de nucleobase) de oligonucleótidos conjugados en soporte
- Para oligonucleótidos conjugados a retinal en soporte, el soporte se transfirió a un tubo de 5 ml (VWR). El oligonucleótido se escindió del soporte con desprotección simultánea de los grupos de base y de fosfato con 1 ml de metilamina acuosa al 40% durante 15 min. a 65°C. El tubo se enfrió de forma breve en hielo, y después la metilamina se filtró en un nuevo tubo de 15 ml. El CPG se lavó con 3 x porciones de 1 ml de DMSO.
- 10 Etapa 4.5. Desprotección-II (eliminación del grupo 2' TBDMS) de los oligonucleótidos conjugados en soporte
- A la mezcla anterior se añadieron 1,5 ml de trihidrofluoruro de trietilamina (TREAT-HF) y se calentó a 60°C durante 15 minutos para eliminar los grupos *terc*-butildimetilsililo (TBDMS) en la posición 2'. La reacción se paralizó entonces con 5,5 ml de acetato de sodio 50 mM (pH 5,5), y se almacenó en el congelador hasta la purificación.
- Etapa 4.6. Conjugación con aldehídos tras la desprotección
- 15 La conjugación con los aldehídos (1-pireno-carboxaldehído y todo-*trans*-retinal) después de la desprotección de los oligonucleótidos con enlazador de aminooxi también se llevó a cabo como una estrategia de conjugación alternativa.
- Etapa 4.7. Desprotección-I (desprotección de nucleobase) para la conjugación tras la desprotección
- El soporte se transfirió a un tubo de 2 ml con tapón de rosca. El oligonucleótido se escindió del soporte con desprotección simultánea de los grupos de base y de fosfato con 0,5 ml de metilamina acuosa al 40% durante 15 min. a 65°C. El tubo se enfrió de forma breve en hielo, y la metilamina se filtró después a un nuevo tubo de 15 ml. El CPG se lavó con 2 x porciones de 0,5 ml de acetonitrilo al 50%/agua. La mezcla se congeló entonces en hielo seco y se secó a vacío en un concentrador de vacío.
- 20
- Etapa 4.8. Desprotección-II (eliminación del grupo 2' TBDMS) para la conjugación tras la desprotección
- El residuo seco se resuspendió en 0,5 ml de trihidrofluoruro de trietilamina (TEA.3HF) y se calentó a 60°C durante 15 minutos para eliminar los grupos *terc*-butildimetilsililo (TBDMS) en la posición 2'. La mezcla de reacción se enfrió entonces hasta la temperatura ambiente, y el RNA se precipitó con 2 ml de metanol seco y se secó a vacío en un concentrador de vacío. La muestra se disolvió entonces en 2 ml de agua y se mantuvo congelada en un congelador hasta el análisis posterior.
- 25
- Etapa 4.9. Cuantificación de oligómero bruto o análisis bruto
- Para todas las muestras, se diluyó una alícuota de 1 µl, de 10 µl o de 30 µl con 999 µl, 990 µl o 970 µl de agua desionizada libre de nucleasas (1,0 ml), y se obtuvo la lectura de la absorbancia a 260 nm.
- 30
- Etapa 4.10. Purificación de oligómeros conjugados
- (a) Análisis de LC/MS del bruto
- Los oligómeros brutos se analizaron en primer lugar mediante LC/MS, para encontrar la presencia y abundancia del producto final esperado.
- 35
- (b) Purificación en fase inversa
- Las muestras conjugadas se purificaron mediante HPLC de fase inversa en una columna RPC-Source15 (21,5 x 1 cm). El sistema de tampón fue: A = acetato de sodio 20 mM en ACN al 10%, pH 8,5, y B = acetato de sodio 20 mM en ACN al 70%, pH 8,5, con un caudal de 5,0 ml/min., y longitudes de onda de 260 y 375. Las fracciones que contienen los oligonucleótidos de longitud completa se desalaron entonces de forma individual.
- 40
- Etapa 4.11. Desalado de oligonucleótidos purificados
- Las fracciones de los oligonucleótidos purificados se desalaron usando las columnas PD-10 Sephadex G-25. En primer lugar, las columnas se equilibraron con 25-30 ml de agua. Las muestras se aplicaron entonces en un volumen de 2,5 ml. Las muestras se eluyeron entonces en una fracción libre de sal de 3,5 ml. Las fracciones desaladas se combinaron juntas y se mantuvieron congeladas hasta que se necesitaron.
- 45
- Etapa 4.12. Electroforesis en gel capilar (CGE), HPLC de intercambio iónico (IEX) y LC/MS por electropulverización
- Aproximadamente 0,3 OD de los oligonucleótidos desalados se diluyeron en agua hasta 300 µl, y después se pipetearon en viales especiales para el análisis de CGE, IEX y LC/MS.

Etapa 5. Conjugación de todo-*trans*-retinal al extremo 3' de oligonucleótidos (RNA):

El fosforamidito **116** para la conjugación en 5' y el soporte de CPG **115** para la conjugación en 3' de los retinoides se sintetizaron como se muestra en el Esquema D. El soporte de CPG **115** se usó para la conjugación en 3' de los retinoides a oligonucleótidos.

- 5 Esquema D<sup>a</sup>. Síntesis de bloques de construcción de conjugación post-sintética para la conjugación de retinal – enfoque oxímico 2 para la conjugación a 3' y a 5'.



<sup>a</sup> (i) TBDMS-Cl, imidazol/Py, rt; (ii) (a) H<sub>2</sub>, Pd-C (10%)/EtOAc-MeOH, 4 h y (b)  $\square$ -Caprolactona, TEA, 55°C, 24 h; (iii) TEA-3HF/THF; (iv) (a) Anhídrido succínico, DMAP/EDC, 24 h, y (b) DTNP, Ph<sub>3</sub>P, DMAP seguido de la adición de Icaa CPG; (v) Fosfitilación

Etapa 5.1: Compuesto **112**: El compuesto **111** (120,0 g, 30,01 mmoles) se agitó toda la noche con TBDMS-Cl (5,43 g, 36,02 mmoles) en presencia de imidazol (7,5 g, 110,16 mmoles) en piridina anhidra (100 ml). Tras eliminar la piridina, el producto se extrajo en acetato de etilo (300 ml), se lavó con bicarbonato de sodio acuoso, seguido de tratamiento estándar. El residuo obtenido se sometió a cromatografía en columna en gel de sílice ultrarrápida, usando metanol al 1% en diclorometano como eluyente para producir el compuesto **112** como un sólido blanco pálido (24,4 g, cuant. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO, 25°C): D 7,33-7,13 (bm, 15H, explica 14H después de intercambio de D<sub>2</sub>O); 6,87-6,82 (bm, 4H); 5,01 (s, 0,2H, rotámero secundario); 4,99 (s, 1,8H, rotámero principal), 4,68-4,64 (m, 0,72 H, rotámero principal); 4,14-4,07 (bm, 1H), 3,72 (s, 7H), 3,38-3,36 (m, 0,6H, rotámero secundario); 3,26-3,21 (m, 1,4H, rotámero principal); 3,08-3,07 (m, 0,3H, rotámero secundario); 2,99-2,89 (m, 2,7H, rotámero principal); 2,22-2,12 (m, 2H), 2,04-1,78 (m, 2H); 1,48-1,23 (m, 6H), 0,84, 0,82 (s, 9H, rotámeros principal y secundario); 0,05 (d, J(H,H) = 1,5 Hz, 4,3H, rotámero principal); 0,03-0,02 (d, J(H,H) = 5,5 Hz, 1,7H).

Etapa 5.2: Compuesto **113**: El compuesto **112** (9,4 g, 14,54 mmoles) se suspendió en 15 ml de  $\beta$ -caprolactona, y se añadieron 10 ml de TEA a la suspensión. La mezcla de reacción se agitó en argón a una temperatura del baño de 55°C durante 24 h. La terminación de la reacción se monitorizó mediante análisis TLC. TEA se eliminó de la mezcla de reacción a vacío, y se añadieron al residuo 150 ml de diclorometano-hexano (mezcla 2:1). La disolución homogénea así obtenida se cargó directamente en una columna de gel de sílice, y se eluyó con diclorometano-hexano (2:1) seguido de diclorometano puro. La elución de la columna de sílice con metanol al 4% en diclorometano produjo el compuesto **113** deseado como un sólido blanco (8,73 g, 78,9%). RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, [D<sub>6</sub>]DMSO, 25°C)  $\delta$  7,72-7,68 (bm, 1H, intercambiable con D<sub>2</sub>O); 7,33-7,16 (m, 9H); 6,88-6,84 (m, 4H); 4,68-4,62 (m, 0,8H); 4,57-4,52 (m, 0,2H); 4,34-4,31 (t, J(H,H) = 5,18 Hz, 1H, intercambiable con D<sub>2</sub>O); 4,14-4,08 (bm, 1H); 3,74-3,67 (m, 7H); 3,39-3,32 (m, 3,3H); 3,25-3,21 (m, 1,7H); 3,09-2,88 (m, 4H).

## 6. Análisis de la actividad de los dúplex

Los dúplex se ensayaron para determinar la actividad en el ensayo de células HeLa descrito anteriormente. La Tabla 14 y la Figura 38 proporcionan datos y una gráfica de las actividades en células HeLa para cada una de las modificaciones descritas anteriormente.

## Ejemplo 12: Conjugación de polietilenglicol a siRNA (Tabla 12)

Oligonucleótidos con enlazador de amino para la conjugación a PEG



General. La cromatografía preparativa de intercambio iónico se llevó a cabo en TSKgel-SuperQ-5PW (Tosoh). La cromatografía analítica de intercambio iónico se llevó a cabo en un DNAPac Pa100 (Dionex). Los espectros de masas mediante ionización por pulverización electrónica se registraron con un Agilent 1100 MSD-SL.

5 Técnicas de HPLC. El RNA se analizó mediante cromatografía de intercambio iónico DNAPac Pa100, (columna, 4 x 250 mm, analítica), se calentó hasta 30°C, caudal 1,5 ml min<sup>-1</sup>, tampón A = Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,020M en CH<sub>3</sub>CN al 10%, pH 11; tampón B = tampón A + NaBr 1 M en CH<sub>3</sub>CN al 10%, pH 11, gradiente lineal de 0 a 75% en 53 min. Las condiciones de LC/ESI-MS fueron las siguientes: columna XTerra C8 (2,1 x 30 mm, 2,5 μm), gradiente lineal de 5 a 35% en 2 min. y de 35 a 70% en 30,5 min., caudal 0,200 ml min<sup>-1</sup>, tampón A = HFIP 400 mM/TEA 16,3 mM en H<sub>2</sub>O, tampón B = metanol al 100%. El RNA se purificó mediante cromatografía de intercambio iónico (columna empaquetada de nuestro laboratorio 5 cm, TSKgel-SuperQ-5PW, 20 μm), se calentó hasta 75°C, caudal 50 ml min<sup>-1</sup>, tampón A = Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,020M en CH<sub>3</sub>CN al 10%, pH 8,5; tampón B = tampón A + NaBr 1 M en CH<sub>3</sub>CN al 10%, pH 8,5, gradiente lineal de 20 a 55% en 120 min.

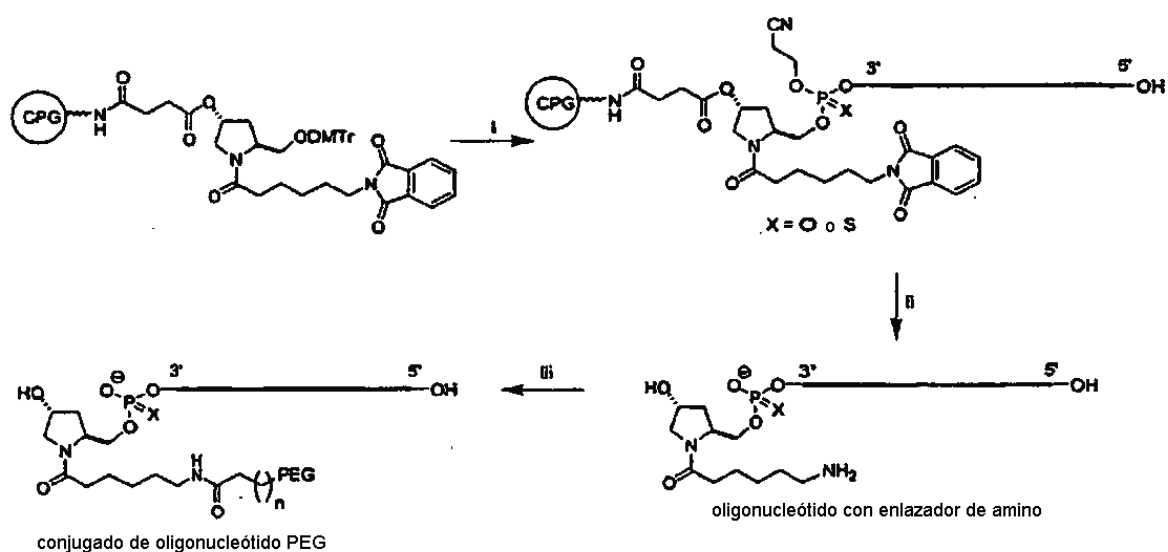
15 Síntesis de RNA. El RNA protegido se ensambló en un AKTA Oligo Pilot 100 a una escala de 100-150 μmoles usando un soporte personalizado de nuestro laboratorio y química de fosoramidito. Los fosoramiditos se usaron como disoluciones 0,2 moles l<sup>-1</sup> en CH<sub>3</sub>CN seco, con un tiempo de acoplamiento de 900 s, y se usaron los protocolos de síntesis recomendados por el fabricante. Después de la síntesis, el RNA unido al soporte se trató con CH<sub>3</sub>NH<sub>2</sub> acuosa (40%) durante 90 minutos a 45°C, se enfrió, se filtró y se lavó con DMSO (3 x 40 ml). El filtrado se trató entonces con TEA.3HF (60 ml) durante 60 minutos a 40°C, y se paralizó con NaOAc acuoso (0,05M, pH 5,5, 200 ml). La síntesis fue seguida de HPLC de intercambio iónico analítica, HPLC preparativa, y después desalado en Sephadex G-25.

Etapa 1. Síntesis de oligonucleótido:

En el Esquema E se muestra un enfoque de conjugación general.

25 Todos los oligonucleótidos se sintetizaron en un sintetizador AKTAoligopilot. Para la síntesis de oligonucleótidos, se usó un soporte sólido de vidrio de poro controlado comercialmente disponible (dT-CPG, 500 Å) o el soporte sólido de ftalimido-hidroxi-prolinol y fosoramiditos de RNA con grupos protectores estándar, fosoramidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>6</sup>-benzoyl-2'-t-butildimetilsilil-adenosina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilo, fosoramidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>4</sup>-acetil-2'-t-butildimetilsilil-citidina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilo, fosoramidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>2</sup>-isobutiril-2'-t-butildimetilsilil-guanosina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilo, y fosoramidito de 5'-O-dimetoxitritil-2'-t-butildimetilsilil-uridina-3'-O-N,N'-diisopropil-2-cianoetilo. Todos los fosoramiditos se usaron a una concentración de 0,2M en acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN), excepto para guanosina, que se usó a una concentración de 0,2M en THF al 10%/acetonitrilo (v/v). Se usó un tiempo de acoplamiento/reciclado de 16 minutos. El activador fue 5-etil tiotetrazol (0,75M), para la oxidación de PO se usó yodo/agua/piridina, y para la oxidación de PS se usó PADS (2%) en 2,6-lutidina/ACN (1:1 v/v). El fosoramidito con enlazador de amino se sintetizó y se usó a una concentración de 0,2M en acetonitrilo. El tiempo de acoplamiento/reciclado para el fosoramidito con enlazador de amino fue 16 minutos.

35 Esquema E<sup>a</sup>: Pegilación en oligonucleótidos de RNA



<sup>a</sup> (i) Síntesis de oligonucleótidos en fase sólida; (ii) Desprotección y purificación; (iii) Éster de PEG-NHS, NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,1, 1 h.

Etapa 2. Desprotección-I (desprotección de nucleobase)

Tras terminar la síntesis, el soporte se transfirió a una botella de vidrio de 100 ml. El oligonucleótido se escindió del soporte con desprotección simultánea de los grupos de base y de fosfato con 40 ml de metilamina acuosa al 40% durante 90 min. a 45°C. La botella se enfrió de forma breve en hielo, y después la metilamina se filtró en una nueva botella de 500 ml. El CPG se lavó con 3 x porciones de 40 ml de DMSO. La mezcla se enfrió entonces en hielo seco.

5 Etapa 3. Desprotección-II (eliminación del grupo 2' TBDMS)

A la mezcla anterior se añadieron 60 ml de trihidrofluoruro de trietilamina (TREAT-HF) y se calentó a 40°C durante 60 minutos para eliminar los grupos *tert*-butildimetilsililo (TBDMS) en la posición 2'. La reacción se paralizó entonces con 220 ml de acetato de sodio 50 mM (pH 5,5) y se almacenó en un congelador hasta la purificación.

Etapa 4. Cuantificación de oligómero bruto o análisis bruto

10 Para todas las muestras, se diluyó una alícuota de 10 µl con 990 µl de agua desionizada libre de nucleasas (1,0 ml), y se obtuvo la lectura de la absorbancia a 260 nm.

Etapa 5. Purificación de oligómeros

(a) Purificación mediante HPLC

15 Los oligómeros brutos se analizaron en primer lugar mediante HPLC (Dionex PA 100). El sistema de tampón fue: A = fosfato 20 mM pH 11, B = fosfato 20 mM, NaBr 1,8 M, pH 11, caudal 1,0 ml/min., y longitud de onda 260-280 nm. Para cada muestra, se realizaron inyecciones de 5-15 µl. Las muestras se purificaron mediante HPLC en una columna TSK-Gel SuperQ-5PW (20) (17,3 x 5 cm). El sistema de tampón fue: A = fosfato 20 mM en ACN al 10%, pH 8,5, y B = fosfato 20 mM, NaBr 1,0 M en ACN al 10%, pH 8,5, con un caudal de 50,0 ml/min., y longitud de onda 260 y 294. Las fracciones que contienen los oligonucleótidos de longitud completa se reunieron entonces, se evaporaron  
20 y se reconstituyeron hasta ~100 ml con agua desionizada.

Etapa 6. Desalado del oligómero purificado

25 Los oligonucleótidos purificados se desalaron en un AKTA Explorer (Amersham Biosciences) usando una columna Sephadex G-25. En primer lugar, la columna se lavó con agua a un caudal de 25 ml/min. durante 20-30 min. La muestra se aplicó entonces en fracciones de 25 ml. Las fracciones libres de sal eluidas se combinaron juntas, se secaron y se reconstituyeron en 50 ml libre de RNasa.

Etapa 7. Electroforesis en gel capilar (CGE) y LC/MS mediante electropulverización

Ejemplo 0,15 OD de oligonucleótidos desalados se diluyeron en agua hasta 150 µl, y después se pipetearon en viales especiales para el análisis de CGE y LC/MS.

Etapa 8. Conjugación a PEG

30 A) Condiciones iniciales de reacción. El RNA purificado y desalado se liofilizó. Se disolvió RNA (1 mg) en NaHCO<sub>3</sub> acuoso (0,1M, 200 µl, pH 8,1) y DMF (200 µl cada vez). Se añadió PEG 5 K (13 equivalentes, 10 mg) o 20K (3,4 equivalentes, 10 mg) directamente al vial de reacción, y se sometió a remolino a conciencia. La reacción continuó toda la noche a 4°C, y le siguió la HPLC de intercambio iónico analítica. Cuando la  
35 reacción alcanzó una terminación del >85%, se paralizó con NaOAc acuoso (0,05M, pH 5,5) hasta que el pH fue ~7.

B) Conjugación en tampón de fosfato. El RNA purificado y desalado se liofilizó. Se disolvió una muestra de RNA (1 mg) en tampón de borato de sodio (200 µl, 0,05M, pH 10). Se disolvió PEG 5K (3 mg, 4,5 equivalentes Sunbright ME-50HS, NOF Corp.) en CH<sub>3</sub>CN (200 µl). La disolución de RNA se añadió a la disolución de PEG, y se sometió a remolino a conciencia. La reacción continuó durante una hora a temperatura ambiente, y le siguió la HPLC de intercambio iónico analítica. Cuando la reacción alcanzó una  
40 terminación del >85%, se paralizó con NaOAc acuoso (0,05M, pH 5,5) hasta que el pH fue ~7.

C) Comparación de enlazador de PEG (AS y HS). Se disolvió una muestra de RNA (1 mg) en NaHCO<sub>3</sub> acuoso (0,1M, 200 µl, pH 8,1) y DMF (200 µl). Se añadió PEG 5K (13,5 eq., 10 mg, Sunbright ME-50HS o Sunbright ME-50AS, NOF Corp.) directamente al vial de reacción, y se sometió a remolino a conciencia. La  
45 reacción continuó toda la noche a 4°C, y le siguió la HPLC de intercambio iónico analítica. Cuando la reacción alcanzó una terminación del >85%, se paralizó con NaOAc acuoso (0,05M, pH 5,5) hasta que el pH fue ~7.

D) Conjugación a PEG optimizada final. El RNA purificado y desalado se liofilizó. Se disolvió una muestra de RNA (50 mg) en NaHCO<sub>3</sub> acuoso (0,1M, 2 ml, pH 8,1) y DMF (1 ml). Se disolvió PEG 20K (aproximadamente 2,7 eq., 400-520 mg Sunbright ME-200HS, diferentes cantidades para diferentes secuencias en este  
50 intervalo) en CH<sub>3</sub>CN (2 ml). La disolución de RNA se añadió a la disolución de PEG, y se sometió a remolino a conciencia. Se añadió H<sub>2</sub>O (250 ml) a la reacción para disminuir la turbidez. La reacción continuó durante

una hora a temperatura ambiente, y le siguió la HPLC de intercambio iónico analítica. Cuando la reacción alcanzó una terminación del >85%, se paralizó con NaOAc acuoso (0,05M, pH 5,5) hasta que el pH fue ~7.

#### Etapa 9. Análisis de la actividad de los dúplex

5 Los dúplex se ensayaron para determinar la actividad en el ensayo de células HeLa como se describe anteriormente. La Tabla 12 y figura 45 proporciona datos de las actividades en células HeLa para cada una de las modificaciones descritas anteriormente.

#### Ejemplo 13: Síntesis de oligonucleótidos que contienen el nucleósido ribo-difluorotoluilo (DFT) (Tabla 13)

10 Las moléculas RNA se sintetizaron en una máquina 394 ABI usando el ciclo estándar escrito por el fabricante, con modificaciones de unas pocas etapas de espera. El soporte sólido fue 500 Å dT CPG (2 umoles). Los monómeros fueron fosforamiditos de RNA o el amidito de ribo-difluorotoluilo. Todos tuvieron grupos protectores estándar, y se usaron a concentraciones de 0,15 M en acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN), excepto que se señale de otro modo. Específicamente, los fosforamiditos fueron fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>6</sup>-benzoil-2'-O-tbutildimetilsilil-adenosina-3'-O-(β-cianoetil-N,N'-diisopropilo), fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>2</sup>-isobutiril-2'-O-tbutildimetilsilil-guanosina-3'-O-(β-cianoetil-N,N'-diisopropilo), fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>4</sup>-acetil-2'-O-tbutildimetilsilil-citidina-3'-O-(β-cianoetil-N,N'-diisopropilo), fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-difluorotoluil-O-tbutildimetilsilil-3'-O-(β-cianoetil-N,N'-diisopropilo) (0-12 M). Los tiempos de acoplamiento fueron 7 min. para todos los monómeros de RNA y 10 min. para el monómero de DFT. Los detalles de los otros reactivos son como siguen: Activador: 5-etiltio-1H-tetrazol (0,25M), grupo protector de tapa A: anhídrido acético al 5%/THF/piridina, grupo protector de tapa B: N-metilimidazol al 10%/THF; la oxidación de fosfato implicó 0,02M de I<sub>2</sub>/THF/H<sub>2</sub>O. La destrilación se logró con TCA al 3%/diclorometano. El grupo protector DMT se eliminó después de la última etapa del ciclo.

20 Después de terminar la síntesis, el CPG se transfirió a un tubo de microcentrifugadora estéril con tapa de rosca. El oligonucleótido se escindió, y los grupos de base y de fosfato se desprotegieron simultáneamente con 1,0 ml de una mezcla de amoníaco etanólico (1:3) durante 16 horas a 55°C. El tubo se enfrió brevemente en hielo, y después la disolución se transfirió a un tubo de centrifugadora de 5 ml. A esto le siguió un lavado de tres veces con 0,25 ml de acetonitrilo al 50%. Los tubos se enfriaron a -80°C durante 15 min., antes de secar en un liofilizador.

30 El residuo blanco obtenido se resuspendió en 200 μl de trihidrofluoruro de trietilamina, y se calentó a 65°C durante 1,5 h para eliminar los grupos TBDMS en la posición 2'. Los oligonucleótidos se precipitaron entonces en metanol seco (400 μl). El líquido se eliminó con cuidado para producir un pelete en la parte inferior del tubo. El metanol residual se eliminó en un concentrador de vacío para dar un material blanco esponjoso. Las muestras se disolvieron en 1 ml de agua libre de RNasa, y se cuantificaron midiendo la absorbancia a 260 nm. Este material bruto se almacenó a -20°C.

Los oligonucleótidos brutos se analizaron y purificaron mediante geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 20%. Los oligonucleótidos secos purificados se desalaron entonces usando Sephadex G25M.

35 Los dúplex se ensayaron para determinar la actividad en el ensayo de células HeLa descrito anteriormente. La Tabla 13 y la Figura 46 proporcionan datos y gráficas de las actividades en células HeLa para cada una de las modificaciones descritas anteriormente.

#### Ejemplo 14: Síntesis de RNA modificado con 2'-ara-fluoro-2'-desoxi-nucleósidos (Tabla 14)

40 Las moléculas RNA quiméricas se sintetizaron en una máquina 394 ABI usando el ciclo estándar escrito por el fabricante, con modificaciones a unas pocas etapas de espera. El soporte sólido fue 500 Å dT CPG (2 μmoles). Los monómeros fueron fosforamiditos de RNA o fosforamiditos de 2'-arafluoro-2'-desoxi(2' ara F). Todos los monómeros tuvieron grupos protectores estándar, y se usaron a concentraciones de 0,15 M en acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN), excepto que se señale de otro modo. Específicamente, los fosforamiditos de RNA fueron fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>6</sup>-benzoil-2'-O-tbutildimetilsilil-adenosina-3'-O-(α-cianoetil-N,N'-diisopropilo), fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>2</sup>-isobutiril-2'-O-tbutildimetilsilil-guanosina-3'-O-(β-cianoetil-N,N'-diisopropilo), fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>4</sup>-acetil-2'-O-tbutildimetilsilil-citidina-3'-O-(β-cianoetil-N,N'-diisopropilo), y fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>4</sup>-acetilo-2'-O-tbutildimetilsilil-uridina-3'-O-(β-cianoetil-N,N'-diisopropilo); los fosforamiditos de 2'ara F fueron fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>6</sup>-benzoil-2'-arafluoro-2'-desoxi-citidina-3'-O-(β-cianoetil-N,N'-diisopropilo), y fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-N<sup>4</sup>-arafluoro-2'-desoxiuridina-3'-O-(β-cianoetil-N,N'-diisopropilo), y fosforamidito de 5'-O-dimetoxitritil-2'-arafluoro-timidina-3'-O-(β-cianoetil-N,N'-diisopropilo). Los tiempos de acoplamiento fueron 10 min. para todos los monómeros. Los detalles de los otros reactivos son como siguen: Activador: 5-etiltio-1H-tetrazol (0,25M), grupo protector de tapa A: anhídrido acético al 5%/THF/piridina, grupo protector de tapa B: N-metilimidazol al 10%/THF; la oxidación de fosfato implicó 0,02M de I<sub>2</sub>/THF/H<sub>2</sub>O. La destrilación se logró con TCA al 3%/diclorometano. El grupo protector DMT final se eliminó después del último ciclo.

55 Tras terminar la síntesis, el CPG se transfirió a un tubo de microcentrifugadora estéril con tapa de rosca. El oligonucleótido se escindió, y los grupos de base y de fosfato se desprotegieron simultáneamente con 1,0 ml de una

mezcla de amoníaco etanólico concentrado (1:3) durante 5 horas a 55°C. El tubo se enfrió brevemente en hielo, y después la disolución se transfirió a un tubo de centrifugadora de 5 ml; a esto le siguió un lavado de tres veces con 0,25 ml de acetonitrilo al 50%. Los tubos se enfriaron a -80°C durante 15 min., antes de secar en un liofilizador.

5 El residuo blanco obtenido se resuspendió en 200 µl de trihidrofluoruro de trietilamina, y se calentó a 65°C durante 1,5 h para eliminar los grupos TBDMS en la posición 2'-OH. Los oligonucleótidos se precipitaron entonces en metanol seco (400 µl). El líquido se eliminó con cuidado para producir un pelete en la parte inferior del tubo. El metanol residual se eliminó en un concentrador de vacío para dar un material blanco esponjoso. Las muestras se disolvieron en 1 ml de agua libre de RNasa, y se cuantificaron midiendo la absorbancia a 260 nm. Este material bruto se almacenó a -20°C.

10 Los oligonucleótidos brutos se analizaron y purificaron mediante geles desnaturalizantes de poli(acrilamida) al 20%. Los oligonucleótidos secos purificados se desalaron entonces usando Sephadex G25M (Amersham Biosciences).

Los dúplex se ensayaron para determinar la actividad en el ensayo de células HeLa descrito anteriormente. La Tabla 14 y la Figura 47 proporcionan datos y gráficas de las actividades en células HeLa para cada una de las modificaciones descritas anteriormente.

15 **Ejemplo 15: Desprotección de siRNAs modificados con metilfosfonato (Tabla 15)**

Etapa 1 de desprotección:

20 Tras terminar la síntesis, el vidrio de poro controlado (CPG) se transfirió a un vial con tapa de rosca. Al soporte se añadió una disolución (0,5 ml) que consiste en acetonitrilo/etanol/NH<sub>4</sub>OH (45:45:10). El vial se cerró herméticamente y se dejó a temperatura ambiente durante 30 min. Se añadió etilendiamina (0,5 ml) al vial y se dejó a temperatura ambiente durante 6 horas adicionales. El sobrenadante se decantó, y el soporte se lavó dos veces con acetonitrilo/agua 1:1 (0,5 ml). El sobrenadante combinado se diluyó con agua (15 ml). El pH se ajustó a 7,0 con HCl 6 M en AcCN/H<sub>2</sub>O (1:9). La muestra se desaló usando un cartucho Seppak C<sub>18</sub>, y después se secó en un concentrador de vacío.

Etapa 2 de desprotección (eliminación del grupo 2'-O-TBDMS)

25 El residuo blanco obtenido se resuspendió en una mezcla de trietilamina, trihidrofluoruro de trietilamina (TEA.3HF aprox. 24% de HF) y 1-metil-2-pirrolidinona (NMP) (4:3:7) (400 µl), y se calentó a 65°C durante 90 min. para eliminar los grupos terc-butildimetilsililo (TBDMS) en la posición 2'. La reacción se paralizó entonces con isopropoxitrimetilsilano (iPrOMe<sub>3</sub>Si, 400 µl) y se incubó posteriormente en el bloque de calentamiento dejando las tapas abiertas durante 10 min. (Esto provoca que el aducto volátil de fluoruro de isopropoxitrimetilsililo se vaporice).

30 El reactivo de paralización residual se eliminó secando en un concentrador de vacío. Se añadió trietilamina al 3% en éter dietílico (1,5 ml), y la mezcla se sometió a centrifugación para producir un pelete de RNA. El sobrenadante se eliminó mediante pipeteo sin perturbar el pelete. El pelete se secó en un concentrador de vacío. El RNA bruto se obtuvo como un material blanco esponjoso en el tubo de microcentrifugadora.

Purificación:

35 Todas las secuencias modificadas con metilfosfonato se purificaron mediante PAGE

Análisis de la actividad de los dúplex

Los dúplex se ensayaron para determinar la actividad en el ensayo de células HeLa descrito anteriormente. La Tabla 15 y figura 48 proporciona datos de las actividades en células HeLa para cada una de las modificaciones descritas anteriormente.

40 Tabla 1. Secuencias diana en VEGF 121

SEC ID nº:	ORF	SECUENCIA DIANA EN VEGF121 mRNA 5' a 3'
2	1	AUGAACUUUCUGCUGUCUUGGU
3	2	UGAACUUUCUGCUGUCUUGGGUG
4	3	GAACUUUCUGCUGUCUUGGGUGC
5	4	AACUUUCUGCUGUCUUGGGUGCA
6	5	ACUUUCUGCUGUCUUGGGUGCAU

ES 2 423 060 T3

SEC ID nº:	ORF	SECUENCIA DIANA EN VEGF121 mRNA 5' a 3'
7	6	CUUUCUGCUGUCUUGGGUGCAUU
8	7	UUUCUGCUGUCUUGGGUGCAUUG
9	8	UUCUGCUGUCUUGGGUGCAUUGG
10	9	UCUGCUGUCUUGGGUGCAUUGGA
11	10	CUGCUGUCUUGGGUGCAUUGGAG
12	11	UGCUGUCUUGGGUGCAUUGGAGC
13	12	GCUGUCUUGGGUGCAUUGGAGCC
14	13	CUGUCUUGGGUGCAUUGGAGCCU
15	14	UGUCUUGGGUGCAUUGGAGCCUU
16	15	GUCUUGGGUGCAUUGGAGCCUUG
17	16	UCUUGGGUGCAUUGGAGCCUUGC
18	17	CUUGGGUGCAUUGGAGCCUUGCC
19	18	UUGGGUGCAUUGGAGCCUUGCCU
20	19	UGGGUGCAUUGGAGCCUUGCCUU
21	20	GGGUGCAUUGGAGCCUUGCCUUG
22	21	GGUGCAUUGGAGCCUUGCCUUGC
23	22	GUGCAUUGGAGCCUUGCCUUGC
24	23	UGCAUUGGAGCCUUGCCUUGCUG
25	24	GCAUUGGAGCCUUGCCUUGCUGC
26	25	CAUUGGAGCCUUGCCUUGCUGCU
27	26	AUUGGAGCCUUGCCUUGCUGCUC
28	27	UUGGAGCCUUGCCUUGCUGCUCU
29	28	UGGAGCCUUGCCUUGCUGCUCUA
30	29	GGAGCCUUGCCUUGCUGCUCUAC
31	30	GAGCCUUGCCUUGCUGCUCUACC
32	31	AGCCUUGCCUUGCUGCUCUACCU
33	32	GCCUUGCCUUGCUGCUCUACCUC
34	33	CCUUGCCUUGCUGCUCUACCUC
35	34	CUUGCCUUGCUGCUCUACCUC
36	35	UUGCCUUGCUGCUCUACCUC
37	36	UGCCUUGCUGCUCUACCUC
38	37	GCCUUGCUGCUCUACCUC
39	38	CCUUGCUGCUCUACCUC
40	39	CUUGCUGCUCUACCUC

ES 2 423 060 T3

SEC ID nº:	ORF	SECUENCIA DIANA EN VEGF121 mRNA 5' a 3'
41	40	UUGCUGCUCUACCUCCACCAUGC
42	41	UGCUGCUCUACCUCCACCAUGCC
43	42	GCUGCUCUACCUCCACCAUGCCA
44	43	CUGCUCUACCACCACCAUGCCAA
45	44	UGCUCUACCUCCACCAUGCCAAG
46	45	GCUCUACCUCCACCAUGCCAAGU
47	46	CUCUACCUCCACCAUGCCAAGUG
48	47	UCUACCUCCACCAUGCCAAGUGG
49	48	CUACCUCCACCAUGCCAAGUGGU
50	49	UACCUCCACCAUGCCAAGUGGUC
51	50	ACCUCCACCAUGCCAAGUGGUCC
52	51	CCUCCACCAUGCCAAGUGGUCCC
53	52	CUCCACCAUGCCAAGUGGUCCCA
54	53	UCCACCAUGCCAAGUGGUCCCAG
55	54	CCACCAUGCCAAGUGGUCCCAGG
56	55	CACCAUGCCAAGUGGUCCCAGGC
57	56	ACCAUGCCAAGUGGUCCCAGGCU
58	57	CCAUGCCAAGUGGUCCCAGGCUG
59	58	CAUGCCAAGUGGUCCCAGGCUGC
60	59	AUGCCAAGUGGUCCCAGGCUGCA
61	60	UGCCAAGUGGUCCCAGGCUGCAC
62	61	GCCAAGUGGUCCCAGGCUGCACC
63	62	CCAAGUGGUCCCAGGCUGCACCC
64	63	CAAGUGGUCCCAGGCUGCACCCA
65	64	AAGUGGUCCCAGGCUGCACCAU
66	65	AGUGGUCCCAGGCUGCACCCAUG
67	66	GUGGUCCCAGGCUGCACCCAUGG
68	67	UGGUCCCAGGCUGCACCCAUGGC
69	68	GGUCCCAGGCUGCACCCAUGGCA
70	69	GUCCCAGGCUGCACCCAUGGCAG
71	70	UCCCAGGCUGCACCCAUGGCAGA
72	71	CCCAGGCUGCACCCAUGGCAGAA
73	72	CCAGGCUGCACCCAUGGCAGAAG
74	73	CAGGCUGCACCCAUGGCAGAAGG

ES 2 423 060 T3

SEC ID nº:	ORF	SECUENCIA DIANA EN VEGF121 mRNA 5' a 3'
75	74	AGGCUGCACCCAUGGCAGAAGGA
76	75	GGCUGCACCCAUGGCAGAAGGAG
77	76	GCUGCACCCAUGGCAGAAGGAGG
78	77	CUGCACCCAUGGCAGAAGGAGGA
79	78	UGCACCCAUGGCAGAAGGAGGAG
80	79	GCACCCAUGGCAGAAGGAGGAGG
81	80	CACCCAUGGCAGAAGGAGGAGGG
82	81	ACCCAUGGCAGAAGGAGGAGGGC
83	82	CCAUGGCAGAAGGAGGAGGGCA
84	83	CCAUGGCAGAAGGAGGAGGGCAG
85	84	CAUGGCAGAAGGAGGAGGGCAGA
86	85	AUGGCAGAAGGAGGAGGGCAGAA
87	86	UGGCAGAAGGAGGAGGGCAGAAU
88	87	GGCAGAAGGAGGAGGGCAGAAUC
89	88	GCAGAAGGAGGAGGGCAGAAUCA
90	89	CAGAAGGAGGAGGOCAGAAUCAU
91	90	AGAAGGAGGAGGGCAGAAUCAUC
92	91	GAAGGAGGAGGGCAGAAUCAUCA
93	92	AAGGAGGAGGGCAGAAUCAUCAC
94	93	AGGAGGAGGGCAGAAUCAUCACG
95	94	GGAGGAGGGCAGAAUCAUCACGA
96	95	GAGGAGGGCAGAAUCAUCACGAA
97	96	AGGAGGGCAGAAUCAUCACCAAG
98	97	GGAGGGCAGAAUCAUCACGAAGU
99	98	GAGGGCAGAAUCAUCACGAAGUG
100	99	AGGGCAGAAUCAUCACGAAGUGG
101	100	GGGCAGAAUCAUCACGAAGUGGU
102	101	GGCAGAAUCAUCACGAAGUGGUG
103	102	GCAGAAUCAUCACGAAGUGGUGA
104	103	CAGAAUCAUCACGAAGUGGUGAA
105	104	AGAAUCAUCACGAAGUGGUGAAG
106	105	GAAUCAUCACGAAGUGGUGAAGU
107	106	AAUCAUCACGAAGUGGUGAAGUU
108	107	AUCAUCACGAAGUGGUGAAGUUC

ES 2 423 060 T3

SEC ID nº:	ORF	SECUENCIA DIANA EN VEGF121 mRNA 5' a 3'
109	108	UCAUCACGAAGUGGUGAAGUUCA
110	109	CAUCACGAAGUGGUGAAGUUCAU
111	110	AUCACGAAGUGGUGAAGUUCAUG
112	111	UCACGAAGUGGUGAAGUUCAUGG
113	112	CACGAAGUGGUGAAGUUCAUGGA
114	113	ACGAAGUGGUGAAGUUCAUGGAU
115	114	CGAAGUGGUGAAGUUCAUGGAUG
116	115	GAAGUGGUGAAGUUCAUGGAUGU
117	116	AAGUGGUGAAGUUCAUGGAUGUC
118	117	AGUGGUGAAGUUCAUGGAUGUCU
119	118	GUGGUGAAGUUCAUGGAUGUCUA
120	119	UGGUGAAGUUCAUGGAUGUCUAU
121	120	GGUGAAGUUCAUGGAUGUCUAUC
122	121	GUGAAGUUCAUGGAUGUCUAUCA
123	122	UGAAGUUCAUGGAUGUCUAUCAG
124	123	GAAGUUCAUGGAUGUCUAUCAGC
125	124	AAGUUCAUGGAUGUCUAUCAGCG
126	125	AGUUCAUGGAUGUCUAUCAGCGC
127	126	GUUCAUGGAUGUCUAUCAGCGCA
128	127	UUCAUGGAUGUCUAUCAGCGCAG
129	128	UCAUGGAUGUCUAUCAGCGCAGC
130	129	CAUGGAUGUCUAUCAGCGCAGCU
131	130	AUGGAUGUCUAUCAGCGCAGCUA
132	131	UGGAUGUCUAUCAGCGCAGCUAC
133	132	GGAUGUCUAUCAGCGCAGCUACU
134	133	GAUGUCUAUCAGCGCAGCUACUG
135	134	AUGUCUAUCAGCGCAGCUACUGC
136	135	UGUCUAUCAGCGCAGCUACUGCC
137	136	GUCUAUCAGCGCAGCUACUGCCA
138	137	UCUAUCAGCGCAGCUACUGCCAU
139	138	CUAUCAGCGCAGCUACUGCCAUC
140	139	UAUCAGCGCAGCUACUGCCAUCC
141	140	AUCAGCGCAGCUACUGCCAUCCA
142	141	UCAGCGCAGCUACUGCCAUCCAA



ES 2 423 060 T3

SEC ID nº:	ORF	SECUENCIA DIANA EN VEGF121 mRNA 5' a 3'
143	142	CAGCGCAGCUACUGCCAUCCAAU
144	143	AGCGCAGCUACUGCCAUCCAAUC
145	144	GCGCAGCUACUGCCAUCCAAUCG
146	145	CGCAGCUACUGCCAUCCAAUCGA
147	146	GCAGCUACUGCCAUCCAAUCGAG
148	147	CAGCUACUGCCAUCCAAUCGAGA
149	148	AGCUACUGCCAUCCAAUCGAGAC
150	149	GCUACUGCCAUCCAAUCGAGACC
151	150	CUACUGCCAUCCAAUCGAGACCC
152	151	UACUGCCAUCCAAUCGAGACCCU
153	152	ACUGCCAUCCAAUCGAGACCCUG
154	153	CUGCCAUCCAAUCGAGACCCUGG
155	154	UGCCAUCCAAUCGAGACCCUGGU
156	155	GCCAUCCAAUCGAGACCCUGGUG
157	156	CCAUCCAAUCGAGACCCUGGUGG
158	157	CAUCCAAUCGAGACCCUGGUGGA
159	158	AUCCAAUCGAGACCCUGGUGGAC
160	159	UCCAAUCGAGACCCUGGUGGACA
161	160	CCAAUCGAGACCCUGGUGGACAU
162	161	CAAUCGAGACCCUGGUGGACAUC
163	162	AAUCGAGACCCUGGUGGACAUCU
164	163	AUCGAGACCCUGGUGGACAUCUU
165	164	UCGAGACCCUGGUGGACAUCUUC
166	165	CGAGACCCUGGUGGACAUCUUCC
167	166	GAGACCCUGGUGGACAUCUUCCA
168	167	AGACCCUGGUGGACAUCUUCCAG
169	168	GACCCUGGUGGACAUCUUCCAGG
170	169	ACCCUGGUGGACAUCUUCCAGGA
171	170	CCCUGGUGGACAUCUUCCAGGAG
172	171	CCUGGUGGACAUCUUCCAGGAGU
173	172	CUGGUGGACAUCUUCCAGGAGUA
174	173	UGGUGGACAUCUUCCAGGAGUAC
175	174	GGUGGACAUCUUCCAGGAGUACC
176	175	GUGGACAUCUUCCAGGAGUACCC

ES 2 423 060 T3

SEC ID nº:	ORF	SECUENCIA DIANA EN VEGF121 mRNA 5' a 3'
177	176	UGGACAUCUUCCAGGAGUACCCU
178	177	GGACAUCUUCCAGGAGUACCCUG
179	178	GACAUCUUCCAGGAGUACCCUGA
180	179	ACAUCUUCCAGGAGUACCCUGAU
181	180	CAUCUUCCAGGAGUACCCUGAUG
182	181	AUCUUCCAGGAGUACCCUGAUGA
183	182	UCUUCCAGGAGUACCCUGAUGAG
184	183	CUUCCAGGAGUACCCUGAUGAGA
185	184	UUCCAGGAGUACCCUGAUGAGAU
186	185	UCCAGGAGUACCCUGAUGAGAUC
187	186	CCAGGAGUACCCUGAUGAGAUCG
188	187	CAGGAGUACCCUGAUGAGAUCGA
189	188	AGGAGUACCCUGAUGAGAUCGAG
190	189	GGAGUACCCUGAUGAGAUCGAGU
191	190	GAGUACCCUGAUGAGAUCGAGUA
192	191	AGUACCCUGAUGAGAUCGAGUAC
193	192	GUACCCUGAUGAGAUCGAGUACA
194	193	UACCCUGAUGAGAUCGAGUACAU
195	194	ACCCUGAUGAGAUCGAGUACAUC
196	195	CCCUGAUGAGAUCGAGUACAUCU
197	196	CCUGAUGAGAUCGAGUACAUCUU
198	197	CUGAUGAGAUCGAGUACAUCUUC
199	198	UGAUGAGAUCGAGUACAUCUUCA
200	199	GAUGAGAUCGAGUACAUCUUCAA
201	200	AUGAGAUCGAGUACAUCUUCAAG
202	201	UGAGAUCGAGUACAUCUUCAAGC
203	202	GAGAUCGAGUACAUCUUCAAGCC
204	203	AGAUCGAGUACAUCUUCAAGCCA
205	204	GAUCGAGUACAUCUUCAAGCCAU
206	205	AUCGAGUACAUCUUCAAGCCAUC
207	206	UCGAGUACAUCUUCAAGCCAUCC
208	207	CGAGUACAUCUUCAAGCCAUCCU
209	208	GAGUACAUCUUCAAGCCAUCCUG
210	209	AGUACAUCUUCAAGCCAUCCUGU

ES 2 423 060 T3

SEC ID nº:	ORF	SECUENCIA DIANA EN VEGF121 mRNA 5' a 3'
211	210	GUACAUCUUCAAGCCAUCCUGUG
212	211	UACAUCUUCAAGCCAUCCUGUGU
213	212	ACAUCUUCAAGCCAUCCUGUGUG
214	213	CAUCUUCAAGCCAUCCUGUGUGC
215	214	AUCUUCAAGCCAUCCUGUGUGCC
216	215	UCUUCAAGCCAUCCUGUGUGCCC
217	216	CUUCAAGCCAUCCUGUGUGCCCC
218	217	UUCAAGCCAUCCUGUGUGCCCCU
219	218	UCAAGCCAUCCUGUGUGCCCCUG
220	219	CAAGCCAUCCUGUGUGCCCCUGA
221	220	AAGCCAUCCUGUGUGCCCCUGAU
222	221	AGCCAUCCUGUGUGCCCCUGAUG
223	222	GCCAUCCUGUGUGCCCCUGAUGC
224	223	CCAUCCUGUGUGCCCCUGAUGCG
225	224	CAUCCUGUGUGCCCCUGAUGCGA
226	225	AUCCUGUGUGCCCCUGAUGCGAU
227	226	UCCUGUGUGCCCCUGAUGCGAUG
228	227	CCUGUGUGCCCCUGAUGCGAUGC
229	228	CUGUGUGCCCCUGAUGCGAUGCG
230	229	UGUGUGCCCCUGAUGCGAUGCGG
231	230	GUGUGCCCCUGAUGCGAUGCGGG
232	231	UGUGCCCCUGAUGCGAUGCGGGG
233	232	GUGCCCCUGAUGCGAUGCGGGGG
234	233	UGCCCCUGAUGCGAUGCGGGGGC
235	234	GCCCCUGAUGCGAUGCGGGGGCU
236	235	CCCCUGAUGCGAUGCGGGGGCUG
237	236	CCCUGAUGCGAUGCGGGGGCUGC
238	237	CCUGAUGCGAUGCGGGGGCUGCU
239	238	CUGAUGCGAUGCGGGGGCUGCUG
240	239	UGAUGCGAUGCGGGGGCUGCUGC
241	240	GAUGCGAUGCGGGGGCUGCUGCA
242	241	AUGCGAUGCGGGGGCUGCUGCAA
243	242	UGCGAUGCGGGGGCUGCUGCAU
244	243	GCGAUGCGGGGGCUGCUGCAAUG

ES 2 423 060 T3

SEC ID nº:	ORF	SECUENCIA DIANA EN VEGF121 mRNA 5' a 3'
245	244	CGAUGC GGGGGCUGCUGCAAUGA
246	245	GAUGC GGGGGCUGCUGCAAUGAC
247	246	AUGC GGGGGCUGCUGCAAUGACG
248	247	UGC GGGGGCUGCUGCAAUGACGA
249	248	GCGGGGCUGCUGCAAUGACGAG
250	249	CGGGGCUGCUGCAAUGACGAGG
251	250	GGGGCUGCUGCAAUGACGAGGG
252	251	GGGGCUGCUGCAAUGACGAGGGC
253	252	GGGCUGCUGCAAUGACGAGGGCC
254	253	GGCUGCUGCAAUGACGAGGGCCU
255	254	GCUGCUGCAAUGACGAGGGCCUG
256	255	CUGCUGCAAUGACGAGGGCCUCG
257	256	UGCUGCAAUGACGAGGGCCUGGA
258	257	GCUGCAAUGACGAGGGCCUGGAG
259	258	CUGCAAUGACGAGGGCCUGGAGU
260	259	UGCAAUGACGAGGGCCUGGAGUG
261	260	GCAAUGACGAGGGCCUGGAGUGU
262	261	CAAUGACGAGGGCCUGGAGUGUG
263	262	AAUGACGAGGGCCUGGAGUGUGU
264	263	AUGACGAGGGCCUGGAGUGUGUG
265	264	UGACGAGGGCCUGGAGUGUGUGC
266	265	GACGAGGGCCUGGAGUGUGUGCC
267	266	ACGAGGGCCUGGAGUGUGUGCCC
268	267	CGAGGGCCUGGAGUGUGUGCCCA
269	268	GAGGGCCUGGAGUGUGUGCCCAC
270	269	AGGGCCUGGAGUGUGUGCCCACU
271	270	GGGCCUGGAGUGUGUGCCCACUG
272	271	GGCCUGGAGUGUGUGCCCACUGA
273	272	GCCUGGAGUGUGUGCCCACUGAG
274	273	CCUGGAGUGUGUGCCCACUGAGG
275	274	CUGGAGUGUGUGCCCACUGAGGA
276	275	UGGAGUGUGUGCCCACUGAGGAG
277	276	GGAGUGUGUGCCCACUGAGGAGU
278	277	GAGUGUGUGCCCACUGAGGAGUC

ES 2 423 060 T3

SEC ID nº:	ORF	SECUENCIA DIANA EN VEGF121 mRNA 5' a 3'
279	278	AGUGUGUGCCCACUGAGGAGUCC
280	279	GUGUGUGCCCACUGAGGAGUCCA
281	280	UGUGUGCCCACUGAGGAGUCCAA
282	281	GUGUGCCCACUGAGGAGUCCAAC
283	282	UGUGCCCACUGAGGAGUCCAACA
284	283	GUGCCCACUGAGGAGUCCAACAU
285	284	UGCCCACUGAGGAGUCCAACAUC
286	285	GCCCACUGAGGAGUCCAACAUCA
287	286	CCCACUGAGGAGUCCAACAUCAC
288	287	CCACUGAGGAGUCCAACAUCACC
289	288	CACUGAGGAGUCCAACAUCACCA
290	289	ACUGAGGAGUCCAACAUCACCAU
291	290	CUGAGGAGUCCAACAUCACCAUG
292	291	UGAGGAGUCCAACAUCACCAUGC
293	292	GAGGAGUCCAACAUCACCAUGCA
294	293	AGGAGUCCAACAUCACCAUGCAG
295	294	GGAGUCCAACAUCACCAUGCAGA
296	295	GAGUCCAACAUCACCAUGCAGAU
297	296	AGUCCAACAUCACCAUGCAGAUU
298	297	GUCCAACAUCACCAUGCAGAUUA
299	298	UCCAACAUCACCAUGCAGAUUUAU
300	299	CCAACAUCACCAUGCAGAUUAUG
301	300	CAACAUCACCAUGCAGAUUAUGC
302	301	AACAUCACCAUGCAGAUUAUGCG
303	302	ACAUCACCAUGCAGAUUAVGCGG
304	303	CAUCACCAUGCAGAUUAUGCGGA
305	304	AUCACCAUGCAGAUUAUGCGGAU
306	305	UCACCAUGCAGAUUAUGCGGAUC
307	306	CACCAUGCAGAUUAUGCGGAUCA
308	307	ACCAUGCAGAUUAUGCGGAUCAA
309	308	CCAUGCAGAUUAUGCGGAUCAA
310	309	CAUGCAGAUUAUGCGGAUCAAAC
311	310	AUGCAGAUUAUGCGGAUCAAACC
312	311	UGCAGAUUAUGCGGAUCAAACCU

ES 2 423 060 T3

SEC ID nº:	ORF	SECUENCIA DIANA EN VEGF121 mRNA 5' a 3'
313	312	GCAGAUUAUGCGGAUCAAAACCUC
314	313	CAGAUUAUGCGGAUCAAAACCUCA
315	314	AGAUUAUGCGGAUCAAAACCUCAC
316	315	GAUUAUGCGGAUCAAAACCUCACC
317	316	AUUAUGCGGAUCAAAACCUCACCA
318	317	UUAUGCGGAUCAAAACCUCACCAA
319	318	UAUGCGGAUCAAAACCUCACCAAG
320	319	AUGCGGAUCAAAACCUCACCAAGG
321	320	UGCGGAUCAAAACCUCACCAAGGC
322	321	GCGGAUCAAAACCUCACCAAGGCC
323	322	CGGAUCAAAACCUCACCAAGGCCA
324	323	GGAUCAAAACCUCACCAAGGCCAG
325	324	GAUCAAAACCUCACCAAGGCCAGC
326	325	AUCAAAACCUCACCAAGGCCAGCA
327	326	UCAAAACCUCACCAAGGCCAGCAC
328	327	CAAACCUCACCAAGGCCAGCACA
329	328	AAACCUCACCAAGGCCAGCACAU
330	329	AACCUCACCAAGGCCAGCACAU
331	330	ACCUCACCAAGGCCAGCACAUAG
332	331	CCUCACCAAGGCCAGCACAUAGG
333	332	CUCACCAAGGCCAGCACAUAGGA
334	333	UCACCAAGGCCAGCACAUAGGAG
335	334	CACCAAGGCCAGCACAUAGGAGA
336	335	ACCAAGGCCAGCACAUAGGAGAG
337	336	CCAAGGCCAGCACAUAGGAGAGA
338	337	CAAGGCCAGCACAUAGGAGAGAU
339	338	AAGGCCAGCACAUAGGAGAGAUG
340	339	AGGCCAGCACAUAGGAGAGAUGA
341	340	GGCCAGCACAUAGGAGAGAUGAG
342	341	GCCAGCACAUAGGAGAGAUGAGC
343	342	CCAGCACAUAGGAGAGAUGAGCU
344	343	CAGCACAUAGGAGAGAUGAGCUU
345	344	AGCACAUAGGAGAGAUGAGCUUC
346	345	GCACAUAGGAGAGAUGAGCUUCC

ES 2 423 060 T3

SEC ID nº:	ORF	SECUENCIA DIANA EN VEGF121 mRNA 5' a 3'
347	346	CACAUAGGAGAGAUGAGCUUCCU
348	347	ACAUAGGAGAGAUGAGCUUCCUA
349	348	CAUAGGAGAGAUGAGCUUCCUAC
350	349	AUAGGAGAGAUGAGCUUCCUACA
351	350	UAGGAGAGAUGAGCUUCCUACAG
352	351	AGGAGAGAUGAGCUUCCUACAGC
353	352	GGAGAGAUGAGCUUCCUACAGCA
354	353	GAGAGAUGAGCUUCCUACAGCAC
355	354	AGAGAUGAGCUUCCUACAGCACA
356	355	GAGAUGAGCUUCCUACAGCACAA
357	356	AGAUGAGCUUCCUACAGCACAAAC
358	357	GAUGAGCUUCCUACAGCACAAACA
359	358	AUGAGCUUCCUACAGCACAAACAA
360	359	UGAGCUUCCUACAGCACAAACAAA
361	360	GAGCUUCCUACAGCACAAACAAAU
362	361	AGCUUCCUACAGCACAAACAAAUG
363	362	GCUUCCUACAGCACAAACAAAUGU
364	363	CUUCCUACAGCACAAACAAAUGUG
365	364	UCCUACAGCACAAACAAAUGUGA
366	365	UCCUACAGCACAAACAAAUGUGAA
367	366	CCUACAGCACAAACAAAUGUGAAU
368	367	CUACAGCACAAACAAAUGUGAAUG
369	368	UACAGCACAAACAAAUGUGAAUGC
370	369	ACAGCACAAACAAAUGUGAAUGCA
371	370	CAGCACAAACAAAUGUGAAUGCAG
372	371	AGCACAAACAAAUGUGAAUGCAGA
373	372	GCACAACAAAUGUGAAUGCAGAC
374	373	CACAACAAAUGUGAAUGCAGACC
375	374	ACAACAAAUGUGAAUGCAGACCA
376	375	CAACAAAUGUGAAUGCAGACCAA
377	376	AACAAAUGUGAAUGCAGACCAAA
378	377	ACAAAUGUGAAUGCAGACCAAAG
379	378	CAAAUGUGAAUGCAGACCAAAGA
380	379	AAAUGUGAAUGCAGACCAAAGAA

ES 2 423 060 T3

SEC ID nº:	ORF	SECUENCIA DIANA EN VEGF121 mRNA 5' a 3'
381	380	AAUGUGAAUGCAGACCAAAGAAA
382	381	AUGUGAAUGCAGACCAAAGAAAG
383	382	UGUGAAUGCAGACCAAAGAAAGA
384	383	GUGAAUGCAGACCAAAGAAAGAU
385	384	UGAAUGCAGACCAAAGAAAGAU
386	385	GAAUGCAGACCAAAGAAAGAUAG
387	386	AAUGCAGACCAAAGAAAGAUAGA
388	387	AUGCAGACCAAAGAAAGAUAGAG
389	388	UGCAGACCAAAGAAAGAUAGAGC
390	389	GCAGACCAAAGAAAGAUAGAGCA
391	390	CAGACCAAAGAAAGAUAGAGCAA
392	391	AGACCAAAGAAAGAUAGAGCAAG
393	392	GACCAAAGAAAGAUAGAGCAAGA
394	393	ACCAAAGAAAGAUAGAGCAAGAC
395	394	CCAAAGAAAGAUAGAGCAAGACA
396	395	CAAAGAAAGAUAGAGCAAGACAA
397	396	AAAGAAAGAUAGAGCAAGACAAG
398	397	AAGAAAGAUAGAGCAAGACAAGA
399	398	AGAAAGAUAGAGCAAGACAAGAA
400	399	GAAAGAUAGAGCAAGACAAGAAA
401	400	AAAGAUAGAGCAAGACAAGAAAA



TABLA 2

Posición de ORF	SEC ID n°:	Secuencia diana (5'-3')	Alnylam DUP ID	Hebra	SEC ID n°:	Secuencias	Eficacia HeLa	Eficacia hRPE
1	2	AUGAACUUUCUGCUGUCUUGGGU	AL-DP-4043	S AS	402 403	5 GAACUUUCUGCUGUCUUGGGUCUUGGGU 3 3 UACUUGAAACGACAGAACCCCA 5	+++	NA
22	23	GUGCAUUGGAGCCUUGCCUUGCU	AL-DP-4077	S AS	404 405	5 GCAUUGGAGCCUUGCCUUGCU 3 3 CACGUAACCUCCGGAACGGAACCGA 5	+++	NA
47	48	UCUACCUCCACCAUGCCAAGUGG	AL-DP-4021	S AS	406 407	5 UACCUCCACCAUGCCAAGUTT 3 3 TTAUGGAGGUGGUACGGUUCA 5	+	NA
48	49	CUACCUCCACCAUGCCAAGUGGU	AL-DP-4109	S AS	408 409	5 ACCUCCACCAUGCCAAGUTT 3 3 TTUGGAGGUGGUACGGUUCAC 5	+	NA
50	51	ACCUCCACCAUGCCAAGUGGUCC	AL-DP-4006	S AS	410 411	5 CUCCACCAUCCCAAGUGGUCC 3 3 UGGAGGUGGUACGGUUCACCAGG 5	++	+
			AL-DP-4083	S AS	412 413	5 CUCCACCAUGCAAGUGGUTT 3 3 TTGAGGUGGUACGGUUCACCA 5	++	++
51	52	CCUCCACCAUGCCAAGUGGUCCC	AL-DP-4047	S AS	414 415	5 UCCACCAUGCCAAGUGGUCCC 3 3 GGAGGUGGUACGGUUCACCAGGG 5	+	NA
			AL-DP-4017	S AS	416 417	5 UCCACCAUGCCAAGUGGUUCTT 3 3 TTAGCUGGUACGGUUCACCAG 5	+	NA
52	53	CUCCACCAUGCCAAGUGGUCCCA	AL-DP-4048	S AS	418 419	5 CCACCAUGCCAAGUGGUCCCA 3 3 GAGGUGGUACGGUUCACCAGGGU 5	++	++
			AL-DP-4103	S AS	420 421	5 CCACCAUCCCAAGUGUCUUCTT 3 3 TTGGUGGUACGGUUCACCAGG 5	++/+	++
53	54	UCCACCAUGCCAAGUGGUCCCAGO	AL-DP-4035	S AS	422 423	5 CACCAUGCCAAGUGGUCCCAG 3 3 AGGUGGUACGGUUCACCAGGGUC 5	++	+

54			AL-DP-4018	S	424	5 CACCAUGCCAAGUGGUCCCCTT 3 3 TTGUGGUACGGUUCACCCAGGG 5	+++	+
	55	CCACCAUGCCAAGUGGUCCCAGG	AL-DP-4036	S AS	426 427	5 ACCAUUCCAAGUGGUCCCAGG 3 3 CGUGUACGCUUCACCCAGGGUCC 5	+++	++
			AL-DP-4084	S AS	428 429	5 ACCAU GCCAAGUGGUCCCATT 3 3 TTUGGUACGGUUCACCCACCGU 5	++	+
55	56	CACCAUGCCAAGUGGUCCCAGGC	AL-DP-4093	S AS	430 431	5 CCAUCCCAAGUGGUCCCAGGC3 3 GUGGUACGGUUCACCCAGGUCCG 5	++	+
			AL-DP-4085	S AS	432 433	5 CCAUGCCAAGUGGUCCCAGTT 3 3 TTGGUACGGUUCACCCAGGGUC 5	+	+
56	57	ACCAUGCCAAGUGGUCCCAGGCU	AL-DP-4037	S AS	434 435	5 CAUGCCAAGUGGUCCCAGGCU 3 3 UCCUACGCUUCACCCAGCCUCCGA 5	+	+
			AL-DP-4054	S AS	436 437	5 CAUGCCAAGUGGUCCCACGAC 3 3 TTGUACGGUUCACCCAGGGUCC 5	++	+
57	58	CCAUGCCAAGUGGUCCCAGCCUG	AL-DP-4036	S AS	438 439	5 AUGCCAAGUUCUCCCAGGCUG 3 3 GGUACGGUUCACCCAGGGUCCGAC 5	++	++
			AL-DP-4086	S AS	440 441	5 AUGCCAACUGGUCCCAGGCTT 3 3 TTACCGUUCACCCAGGGUCCG 5	+	+
58	59	CAUGCCAAGUGGUCCCAGGCUGC	AL-DP-4049	S AS	442 443	5 UGCCAAGUGGUCCCAGGCUC 3 3 GUACGGUUCACCCAGGUCCGACG 5	++	++
			AL-DP-4087	S AS	444 445	5 UGCCAAGUGGUCCCAGGCUTT 3 3 TTACGGUUCACCCAGGGUCCGA 5	+	+
59	60	AUGCCAAGUGGUCCCAGGCUGCA	AL-DP-4001	S AS	446 447	5 GCCAAGUGGUCCCAGGCUGCA 3 3 UACGGUUCACCCAGGGUCCGACGU 5	++	++

60			AL-DP-4052	S	448	5 GCCAAGUGGUGCCAGGCUGTT 3 3 TTCGGUUCACCAGGGUCCGAC 5	+++	++
61		UGCCAAGUGGUGCCAGGCUGCAC	AL-DP-4007	AS	449			
				S	450	5 CCAAGUGGUGCCAGGCUGCAC 3	+++	++
				AS	451	3 ACGGUUCACCAGGGUCCGACGUG 5		
			AL-DP-4088	S	452	5 CCAAGUGGUGCCAGGCUGCTT 3	+++	++
				AS	453	3 TTGGUUCACCAGGGUCCGACG 5		
61		GCCAAGUGGUGCCAGGCUGCACC	AL-DP-4070	S	454	5 CAAGUGGUGCCAGGCUGCACC 3	++	++
				AS	455	3 CGGUUCACCAGGGUCCGACGUGG 5		
			AL-DP-4055	S	456	5 CAAGUGGUGCCAGGCUGCATT 3	+++	+
				AS	457	3 TTGUUCACCAGGGUCCGACGU 5		
62		CCAAGUGGUGCCAGGCUGCACC	AL-DP-4071	S	458	5 AAGUGGUGCCAGGCUGCACC 3	+	NA
				AS	459	3 GGUUCACCAGGGUCCGACGUGCG 5		
			AL-DP-4056	S	460	5 AAGUGGUGCCAGGCUGCACTT 3	++	NA
				AS	461	3 TTUUCACCAGGGUCCGACGUG 5		
63		CAAGUGGUGCCAGGCUGCACC	AL-DP-4072	S	462	5 AGUGGUGCCAGGCUGCACC 3	++	+
				AS	463	3 GUUCACCAGGGUCCGACGUGGGU 5		
			L-DP-4057	S	464	5 AGUGGUGCCAGGCUGCACCCTT 3	++/+	++
				AS	465	3 TTUUCACCAGGGUCCGACGUGG 5		
64		AAGUGGUGCCAGGCUGCACC	AL-DP-4066	S	466	5 GUGGUGCCAGGCUGCACCCTT 3	+	NA
				AS	467	3 TTCACCAGGGUCCGACGUGGG 5		
99		AGGCAGAAUCAACGAAGUGG	AL-DP-4032	S	468	5 GGCAGAAUCAACGAAGUTT 3	+++	NA
				AS	469	3 TTCCGUCUUAAGUAGUGCUUCA 5		
100		GGGCAGAAUCAACGAAGUGG	AL-DP-4023	S	470	5 GCAGAAUCAACGAAGUGTT 3	++	NA
				AS	471	3 TTCGUCUUAAGUAGUGCUUCAC 5		

101	102	GGCAGAAUCAUCACGGAAGUGGUG	AL-DP-4024	S	472	5 CAGAAUCAUCACGGAAGUGGTT 3 3. TTGUCUUAGUAGUGCUUCACC 5	+	NA
102	103	GCAGAAUCAUCACGGAAGUGGUUGA	AL-DP-4076	S AS	474 475	5 AGAAUCAUCACGGAAGUGGUGA 3 3 CGUCUJAGUAGUGCUUCACCACU 5	++	NA
103	104	CAGAAUCAUCACGGAAGUGGUGAA	AL-DP-4025	S AS	476 477	5 AGAAUCAUCACGGAAGUGGUTT 3 3 TTUCUJAGUAGUGCUUCACCA 5	++	NA
104	105	AGAAUCAUCACGGAAGUGGUGAAG	AL-DP-4110	S AS	478 481	5 GAAUCAUCACGGAAGUGGUGTT 3 3 WUUJAGUAGUGCUUCACCACU 5	+	NA
105	106	GAAUCAUCACGGAAGUGGUGAAGU	AL-DP-4068	S AS	482 483	5 AUCAUCACGGAAGUGGUGAATT 3 3 TTUJAGUAGUGCUUCACCACUU 5	+	NA
113	114	ACGAAUGUGGUGAAGUJUCAUGGAU	AL-DP-4078	S AS	484 485	5 GAAUGUGGUGAAGUJUCAUGGAU 3 3 UGCUUCACCACUUCAAAGUACCUA 5	+++	NA
121	122	GUGAAGUUC AUGGAUGUCUAUCA	AL-DP-4080	S AS	486 487	5 GAAGUUC AUGGAUGUCUAUCA 3 3 CACUUC AAGUACCUACAGAUAGU 5	+++	NA
129	130	CAUGGAUGUCUAUCAGCGCAGCU	AL-DP-4111	S AS	488 489	5 UGGAUGUCUAUCAGCGCAGTT 3 3 TTACCUACAGAUAGUCGGGUC 5	+++	NA
130	131	AUGGAUGUCUAUCAGCGCAGCUA	AL-DP-4041	S AS	490 491	5 GGAUGUCUAUCAGCGCAGCUA 3 3 UACCUACAGAUAGUCGGGUCGUAU 5	+++	NA
131	132	UGGAUGUCUAUCAGCGCAGCUAC	AL-DP-4062	S AS	492 493	5 GGAUGUCUAUCAGCGCAGCTT 3 3 TTCCUACAGAUAGUCGGGUCG 5	+++	NA
131	132	UGGAUGUCUAUCAGCGCAGCUAC	AL-DP-4069	S AS	494 495	5 GAUGUCUAUCAGCGCAGCUTT 3 3 TTCUACAGAUAGUCGGGUCUA 5	+++	NA

132	133	GGAUGUCUAUCAGCGCAGCUACU	AL-DP-41112	S	496	5 AUGUCUAUCAGCGCAGCUATT 3 3 TTUACAGAUAGUCGGUCGAU 5	+	NA
133	134	GAUGUCUAUCAGCCAGCUACUG	AL-DP-4026	AS	497			
134	135	AUGUCUAUCAGCGCAGCUACUGC	AL-DP-4095	S	498	5 UGUCUAUCAGCGCAGCUACTT 3 3 TTACAGAUAGUCGGUCGAUG 5	++	NA
135	136	UGUCUAUCAGCGCAGCUACUGCC	AL-DP-4027	AS	499			
144	145	GCGCAGCUACUGCCAUCCAAUUG	AL-DP-4081	S	500	5 GUCUAUCAGCGCAGCUACUGC 3 3 UACAGAUAGUCGGUCGAUGACG 5	+++	NA
146	147	GCAGCUACUCCAUCCAAUCGAG	AL-DP-4098	AS	501			
149	150	GCUACUGCCAUCCAAUCGAGACC	AL-DP-4028	S	502	5 GUCUAUCAGCGCAGCUACUTT 3 3 TTCAGAUAGUCGGUCGAUGA 5	+++	NA
150	151	CUACUGCCAUCCAAUCGAGACCC	AL-DP-4029	AS	503			
151	152	UACUGCCAUCCAAUCGAGACCCU	AL-DP-4030	S	504	5 UCUAUCAGCGCAGCUACUGTT 3 3 TTAGAUAGUCGGUCGAUGAC 5	+	NA
152	153	ACUGCCAUCCAAUCGAGACCCUG	AL-DP-4031	AS	505			
166	167	GAGACCCUGGUGGACAUCUCCCA	AL-DP-4008	S	506	5 GCAGCUACUGCCAUCCAAUUGC 3 3 CGCGUCGAUGACGGUAGGUUAGC 5	+++	NA
				S	507			
				AS	508	5 AGCUACUGCCAUCCAAUCGAG 3 3 CGUCGAUGACGGUAGGUUAGCUC 5	+++	NA
				S	509			
				AS	510	5 UACUGCCAUCCAAUCGAGATT 3 3 TTAUGACGGUAGGUUAGCUCU 5	++	NA
				S	511			
				AS	512	5 ACUGCCAUCCAAUCGAGACTT 3 3 TTUGACGGUAGGUUAGCUCUG 5	+	NA
				S	513			
				AS	514	5 CUGCCAUCCAAUCGAGACCTT 3 3 TTGACGGUAGGUUAGCUCUGG 5	+++	NA
				S	515			
				AS	516	5 UGCCAUCCAAUCGAGACCTT 3 3 TTACGGUAGGUUAGCUCUGGG 5	+	NA
				S	517			
				AS	518	5 GACCCUGGUGGACAUCUCCCA 3 3 CUCUGGGACCCACCUJAGAAAGGU 5	++	+
				S	519			
				AS				

167			AL-DP-4058	S	520	5 GACCCUGGUGGACAUCUUCTT 3 3 TTCUGGGACCACCUCUGUAGAAG 5	++	++
168	168	AGACCCUGGUGGACAUCUCCAG	AL-DP-4009	S AS	522 523	5 ACCCUGGUGGACAUCUCCAG 3 3 UCUGGGACCACCUCUGUACAAGGUC 5	++	NA
168	169	GACCCUGGUGGACAUCUCCAGG	AL-DP-4010	S AS	524 525	5 ACCCUGGUGGACAUCUUCTT 3 3 TTUGGGACCACCUCUGUAGAAGG 5	+	NA
169	170	ACCCUGGUGGACAUCUCCAGGA	AL-DP-4073	S AS	526 527	5 CCCUGGUGGACAUCUCCAGG3 3 CUGGGACCACCUCUGUAGAAGGUCC 5	+	+
170	171	CCUGGUGGACAUCUCCAGGAG	AL-DP-4089	S AS	528 529	5 CCCUGGUGGACAUCUCCATT 3 3 TTGGGACCACCUCUGUAGAAGGU 5	+++	++
171	172	CCUGGUGGACAUCUCCAGGAGU	AL-DP-4074	S AS	530 531	5 CCUGGUGGACAUCUCCAGGA3 3 UGGGACCACCUCUGUAGAAGGUCCU 5	++	+
172	173	CUGGUGGACAUCUCCAGGAGUA	AL-DP-4039	S AS	532 533	5 CCUGGUGGACAUCUCCAGTT 3 3 TTGGACCACCUCUGUAGAACGUC 5	+++	++
173	174	UGGUGGACAUCUCCAGGATT 3	AL-DP-4090	S AS	534 535	5 CUGGUGGACAUCUCCAGGAG 3 3 GGGACCACCUCUGUAGAAGGUCCUC 5	+	NA
174	175	UGGUGGACAUCUCCAGGATT 3	AL-DP-4089	S AS	536 537	5 CUGGUGGACAUCUCCAGTT 3 3 TTGACCACCUCUGUAGAAGGUCC 5	+	NA
175	176	UGGUGGACAUCUCCAGGATT 3	AL-DP-4074	S AS	538 539	5 UGGUGGACAUCUCCAGGAGU 3 3 GGACCACCUCUGUAGAAGGUCCUCA 5	++	+
176	177	UGGUGGACAUCUCCAGGATT 3	AL-DP-4090	S AS	540 541	5 UGGUGGACAUCUCCAGGATT 3 3 TTACCACCUCUGUAGAAGGUCCU 5	++	++
177	178	UGGUGGACAUCUCCAGGATT 3	AL-DP-4039	S AS	542 543	5 GGUGGACAUCUCCAGGAGUA 3 3 GACCACCUCUGUAGAAGGUCCAU 5	++	++

175			AL-DP-4091	S	544	5 GGUGGACAUCUCCAGGAGTT 3 3 TTCCACCUGUAGAAGGUCCUC 5	+	+
176		GUGGACAUCUCCAGGAGUACCC	AL-DP-4003	AS	545		++	++
			AL-DP-4116	S	546	5 GGACAUCUCCAGGAGUACCC 3 3 CCUGUAGAAGGUCCUCAUGGG 5	+	NA
			AL-DP-4015	AS	547		++	++
			AL-DP-4120	S	548	5 GGACAUCUCCAGGAGUACTT 3 3 CCUGUAGAAGGUCCUCAUGGG 5	+	NA
			AL-DP-4099	AS	549		++	++
179	180	ACAUCUCCAGGAGUACCCUGAU	AL-DP-4032	S	550	5 GGACAUCUCCAGGAGUACTT 3 3 CCUGUAGAAGGUCCUCAUG 5	+	NA
191	192	AGUACCCUGAUGAGAUCCGACUAC	AL-DP-4042	AS	551	5 AUCUCCAGGAGUACCCUGAU 3 3 UGUAGAAGGUCCUCAUGGGACUA 5	+++	NA
192	193	GUACCCUGAUGAGAUCCGAGUACA	AL-DP-4063	S	552	5 UAACCCUGAUGAGAUCCGAGUTT 3 3 TTAUGGGACUACUCUAGCUCA 5	+++	NA
209	210	AGUACAUCUUAAGCCAUCCUGU	AL-DP-4064	AS	553	5 ACCCUGAUGAGAUCCGAGUACA 3 3 CAUGGGACUACUCUAGCUCAUGU 5	+++	NA
260	261	GCAAUGACGAGGGCCUGGAGUGU	AL-DP-4044	S	554	5 ACCCUGAUGAGAUCCGAGUATT 3 3 TTUGGGACUACUCUAGCUCAU 5	+	NA
263	264	AUGACGAGGGCCUGGAGUGUGUG	AL-DP-4045	AS	555	5 UACAUCUUAAGCCAUCCUTT 3 3 TTAUGUAGAAGUUCGGUAGGA 5	+	NA
				S	556	5 AAUGACGAGGGCCUCGAGUGU 3 3 CGUUAUCUCUCCCGGACCUCACA 5	+	NA
				AS	557	5 GACGAGGGCCUGGAGUGUGU 3 3 UACUGUCCCGGACCUCACACAC	+	NA

279	280	GUGUGUGCCCCACUGAGGAGUCCA	AL-DP-4046	S	568	5 GUGUGCCCCACUGAGGAGUCCA 3 3 CACACACGGGUGACUCCUCAGGU5	+++	NA
281	282	GUGUGCCCCACUGAGGAGUCCAAC	AL-DP-4096	AS	569	5 GUGCCCAACUGACAGUCCAAC 3 3 CACACGGGUGACUCCUCAGGUUG 5	+++	NA
283	284	GUGCCACUGAGGAGUCCAACAU	AL-DP-4040	S	572	5 GCCCACUGAGGAGUCCAACAU 3 3 CACGGGUGACUCCUCAGGUUGUA 5	+++	NA
289	290	ACUGAGGAGUCCAACAUCACCAU	AL-DP-4065	S	574	5 U GAGGAG U CCAACAU CACCTT 3 3 TTACUCCUCAGGUUGUAGUGG 5	+	NA
302	303	ACAUCACCAUGCAGAUUAUGCGG	AL-DP-4100	S	576	5 AUCACCAUGCAGAUUAUGCGG 3 3 UGUAGUGGUACGUCUAAUACGCC 5	++	NA
305	306	UCACCAUGCAGAUUAUGCGGAUC	AL-DP-4033	AS	578	5 ACCAUGCAGAUUAUGCGGATT 3 3 TTUGGUACGUCUAAUACGCCU 5	++	NA
310	311	AUGCAGAUUAUGGGGAUCAAACC	AL-DP-4101	S	580	5 GCAGAUUAUGCGGAUCAAACC 3 3 UACGUCUAAUACGCCUAGUUUGG 5	+++	NA
312	313	GCAGAUUAUGGGGAUCAAACCUC	AL-DP-4102	S	582	5 AGAUUAUGCGGAUCAAACCUC 3 3 CGUCUAAUACGCCUAGUUUGGAG 5	+++	NA
315	316	GAUUAUGCGGAUCAAACCUCACC	AL-DP-4034	AS	584	5 UUAUGCGGAUCAAACCUCATT 3 3 TTAUACGCCUAGUUUGGAGU 5	++	NA
316	317	AUUAUGCGGAUCAAACCUCACCA	AL-DP-4113	S	586	5 UAUGCGGAUCAAACCUCACTT 3 3 TTAUACGCCUAGUUUGGAGUG 5	++	NA
317	318	UUAUGCGGAUAAACCUCACCAA	AL-DP-4114	S	588	5 AUGCCGAUCAAACCUCACCTT 3 3 TTUACGCCUACUUUCGACUUGG 5	+	NA
319	320	AUGCGGAUCAAACCUCACCAAGG	AL-DP-4002	S	590	5 CCCGAUCAAACCUCACCAAGG 3 3 UACCCUAGUUUGGAGUGGUUCC 5	+++	+++



			AL-DP-4115	S	592	5 GCGGAUCAAAACCUCACCAA 3 3 CGCCUAGUUUGGAGUGGUU 5	+++	NA
			AL-DP-4014	AS	593			
				S	594	5 GCGGAUCAAAACCUCACCAATT 3	+++	+++
				AS	595	3 TTCGCCUAGUUUGGAGUGGUU 5		
			AL-DP-4119	S	596	5 GCGGAUCAAAACCUCACCAA 3	+++	NA
				AS	597	3 CGCCCUAGUUUGGACUHHUU 5		
321	322	GCGGAUCAAAACCUCACCAAGGCC	AL-DP-4013	S	598	5 GGAUCAAAACCUCACCAAGGCC 3	++	NA
				AS	599	3 CGCCUACUUUCCACUCUCCGCG 5		
341	342	GCCAGCACAUAGGAGAGAGAGC	AL-DP-4075	S	600	5 CAGCACAUAGGAGAGAGAGC 3	+++	++
				AS	601	3 CGGUCGUGUAUCCUCUCUCG 5		
			AL-DP-4105	S	602	5 CAGCACAUAGGAGAGAGATT 3	++	++
				AS	603	3 TTGUCGUGUAUCCUCUCUACU 5		
342	343	CCAGCACAUAGGAGAGAGGCU	AL-DP-4050	S	604	5 AGCACAUAGGAGAGAGAGGU 3	+++	+++
				AS	605	3 GGUCGUGUAUCCUCUCUACUCGA 5		
			AL-DP-4106	S	606	5 AGCACAUAGGAGAGAGATT 3	++	+++
				AS	607	3 TTUCGUGUAUCCUCUCUACUC 5		
343	344	CAGCACAUAGGAGAGAGAGGCUU	AL-DP-4094	S	608	5 GCACAUAGGAGAGAGAGGCUU 3	+++	+++
				AS	609	3 GUCGUGUAUCCUCUCUACUCGAA 5		
			AL-DP-4118	S	610	5 GCACAUAGGAGAGAGAGGCUU 3	+	NA
				AS	611	3 CGUGUAUCCUCUCUCUACUCGAA 5		
			AL-DP-4107	S	612	5 GCACAUAGGAGAGAGAGGCTT 3	+++	+++
				AS	613	3 TTCGUGUAUCCUCUCUACUCG 5		
			AL-DP-4112	S	614	5 GCACAUAGGAGAGAGAGAG C 3	++	NA
				AS	615	3 CGUGUAUCCUCUCUACUCG 5		

344	345	AGCACAUAGGAGACAUGAGCUUC	AL-DP-4012	S	616	5 CACAUAGGAGAGAUGAGGUUC 3 3 UCGUGUAUCCUCUCUACUCGAAG 5	+++	+++
			AL-DP-4108	AS	617			
				S	618	5 CACAUAGGAGAGAGAUGAGCUTT 3	+++	+++
				AS	619	3 TTGUCUAUCCUCUCUACUCUA 5		
346	347	CACAUAGGAGAGAUGAGCUUCU	AL-DP-4051	S	620	5 CAUAGGAGAGAUGAGCUUCU 3	+++	+++
				AS	621	3 GUGUAUCCUCUCUACUCGAAGGA 5		
			AL-DP-4061	S	622	5 CAUAGGAGAGAUGAGCUUCUUCTT 3	+++	+++
				AS	623	3 TTGUUCCUCUCUACUCGAAG 5		
349	350	AUAGGAGAGAUGAGCUUCUACA	AL-DP-4082	S	624	5 AGGAGAGAUGAGCUUCUACA 3	+++	NA
				AS	625	3 UAUCCUCUCUACUCGAAGGAUGU 5		
369	370	ACAGCACAAACAAUUGUGAAUGCA	AL-DP-4079	S	626	5 AGCACAAACAAUUGUGAAUGCA 3	++	NA
				AS	627	3 UGUCGUGUUGUUUACACUUCUACGU 5		
372	373	GCACAACAAUUGUGAAUGCAGAC	AL-DP-4097	S	628	5 ACAACAAUUGUGAAUGCAGAC 3	++	NA
				AS	629	3 CGUGUUCUUUACACUUCUACGUUCUG 5		
379	380	AAUUGAAUUGCAGACCAAAAGAA	AL-DP-4067	S	630	5 AUGUAAUUGCAGACCAAAAGTT 3	++	NA
				AS	631	3 TTUACACUUACGUCUGGUUUUC 5		
380	381	AAUGUAAUUGCAGACCAAAAGAAA	AL-DP-4092	S	632	5 UGUGAAUUGCAGACCAAAAGATT 3	+++	NA
				AS	633	3 TTACACUUACGUCUGGUUUUCU 5		
381	382	AUGUAAUUGCAGACCAAAAGAAAG	AL-DP-4004	S	634	5 GUGAAUUGCAGACCAAAAGAAAG 3	+++	++
				AS	635	3 UACACUUACGUCUGGUUUUCUUC 5		
			L-DP-4117	S	636	5 GUGAAUUGCAGACCAAAAGAAAG 3	+++	NA
				AS	637	3 CACUUCGUCUGGUUUUCUUC 5		
			AL-DP-4016	S	538	5 GUGAAUUGCAGACCAAAAGAAATT 3	+++	+++
				AS	639	3 TTCACUUACGUCUGGUUUUCU 5		

383			AL-DP-4121	S	640	5 GUGAAUGCAAACCAAAGAA 3 3 CACUUACGUCUGGUUUUCUU 5	++	NA
	384		AL-DP-4005	S	642	5 GAAUGCAGACCAMGAAAAGAU 3	+++	++
				AS	641	3 CACUUACGUCUGGUUUUCUU 5		
			AL-DP-4053	S	644	5 GAAUGCAGACCAAAAGTT 3	+++	++
				AS	645	3 TTCUUACGUCUGGUUUUCUUUC 5		

TABLA 3 – Las moléculas de siRNA estabilizadas con fosforotioato son versiones modificadas de AL-DP-4014.

Posición de ORF	Aln Dúplex #	Secuencia de los dúplex	SEC ID n°:	Eficacia
319	ALN-DP-4127	5'-G*C*GGAUCAAAACCUCACCA*A*dT*dT-3'	646	+++
		3'-dT*dT*C*GCCUAGUUUGGAGUGG*U*U-5'	647	
319	ALN-DP-4128	5'-G*C*GGAUCAAAACCUC*ACC*A*A*dT*dT-3'	648	+++
		3'-dT*dT*CGCCUAGUUUGGAGUGGU*U-5'	649	
319	ALN-DP-4129	5'-G*C*GGAUCAAAACCUC*ACC*A*A*dT*dT-3'	650	+++
		3'-dT*dT*C*GCCUAGUUUGGAGUGG*U*U-5'	651	

\* indica la posición de un grupo fosforotioato

Tabla 4. Eficacia *in vitro* de la serie de AL-DP-4094 modificada

siRNA	Eficacia	5'-hebra sentido-3'	3'-hebra antisentido-5'	SEC ID n <sup>os</sup>
AL-DP-4198	AL4554	+++	5'-GsCACAUAGGAGAGAUGAGCU <sub>s</sub> U-3'	652
	AL4557		'3-GsUCGUGUAUCCUCUCUACUCGAsA-5	653
AL-DP-4165	AL4554	+++	5'-GsCACAUAGGAGAGAUGAGCU <sub>s</sub> U-3'	652
	AL4558		'3-GsU <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> GUGUAUCCUCUCUACUGAsA-5	654
AL-DP-4166	AL4554	+++	5'-GsCACAUAGGAGAGAUGAGCU <sub>s</sub> U-3'	652
	AL4559		'3-GsU <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> CUGUAU <sub>OMe</sub> CCUCUCUACVGAAsA-5	655
AL-DP-4167	AL4554	+++	5'-GsCACAUAGGAGAGAUGAGCU <sub>s</sub> U-3'	652
	AL4560		'3-GsU <sub>OMe</sub> CGU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CCUCUCUAC <sub>OMe</sub> UCGAA-5	656
AL-DP-4168	AL4554	+++	5'- GsCACAUAG GAGAGAUGAGCU <sub>s</sub> U-3'	652
	AL4561		'3-GsU <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CCUCUCUAC <sub>OMe</sub> UCGAA-5	657
AL-DP-4169	AL4554	+++	5'-GsCACAUAGGAGAGAUGAGCU <sub>s</sub> U-3'	652
	AL4562		'3-GsU <sub>OMe</sub> dCGU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CCUCUCUAdCUCGAA-5	658
AL-DP-4170	AL4555	+++	5'-GsCACAU <sub>2-OMe</sub> AGGAGAGAUGAGCU <sub>s</sub> U-3'	659
	AL4557		'3-GsUCGUGUAUCCUCUCUACUCGAsA-5	653
AL-DP-4171	AL4555	+++	5'-GsCACAU <sub>2'OMe</sub> AGGAGAGAUGAGCU <sub>s</sub> U-3'	659
	AL4558		3-GsU <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> GUGUAUCCUCUCUACUGAsA-5	654
AL-DP-4172	AL4555	+++	5'-GsCACAU <sub>2'OMe</sub> AGGAGAGAUGAGCU <sub>s</sub> U-3'	659
	AL4559		'3-GsU <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> GUGUAU <sub>OMe</sub> CCUCUCUACUGAsA-5	655
AL-DP-4173	AL4555	+++	5'-GsCACAU <sub>2'OMe</sub> AGGAGAGAUGAGCU <sub>s</sub> U-3'	659
	AL4560		'3-GsU <sub>OMe</sub> CGU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CCUCUCUAC <sub>OMe</sub> UCGAA-5	656

ES 2 423 060 T3

siRNA		Eficacia	5'-hebra sentido-3' 3'-hebra antisentido-5'	SEC ID n <sup>os</sup>
AL-DP-4174	AL4555	+++	5'-GsCACAU <sub>2'OMe</sub> AGGAGAGAUGAGCU <sub>sU</sub> -3'	659
	AL4561		'3-GsU <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CCUCUCUAC <sub>OMe</sub> UCGAA-'5	657
AL-DP-4175	AL4555	+++	5'-GsCACAU <sub>2'OMe</sub> AGGAGAGAUGAGCU <sub>sU</sub> -3'	659
	AL4562		'3-GsU <sub>OMe</sub> dCGU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CCUCUCUAdCUCGAA-'5	658
AL-DP-4176	AL4556	+++	5'-GC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCU <sub>OMe</sub> SU-3'	660
	AL4557		'3-GsUCGUGUAUCCUCUCUACUCGAsA-'5	653
AL-DP-4177	AL4556	+++	5'-GC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCU <sub>OMe</sub> SU-3'	660
	AL4558		'3-GsU <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> GUGUAUCCUCUCUACUGAsA-'5	654
AL-DP-4178	AL4556	+++	5'-GC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> GGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCU <sub>OMe</sub> SU-3'	660
	AL4559		-3-GsU <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> GUGUAU <sub>OMe</sub> CCUCUCUACUGAsA-'5	655
AL-DP-4179	AL4556	+++	5'-GC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCU <sub>OMe</sub> SU-3'	660
	AL4560		'3-GsU <sub>OMe</sub> CGU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CCUCUCUAC <sub>OMe</sub> UCGAA-'5	656
AL-DP-4180	AL4556	+++	5'-GC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCU <sub>OMe</sub> SU-3'	660
	AL4561		3-GsU <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CCUCUCUAC <sub>OMe</sub> UCGAA-'5	657
AL-DP-4181	AL4556	+++	5'-GC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCU <sub>OMe</sub> SU-3'	660
	AL4562		'3-GsU <sub>OMe</sub> dCGU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CCUCUCUAdCUCGAA-'5	658
AL-DP-4220	AL2780	+++	5'-GsC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCU <sub>OMe</sub> SU-3'	939
	AL2781		'3-GsU <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CCUCUCUAC <sub>OMe</sub> UCGAsA-'5	995
AL-DP-4182	AL4563	+++	5'-G dC A dC AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCU <sub>OMe</sub> SU-3'	661
	AL4557		'3-GsUCGUGUAUCCUCUCUACUCGAsA-'5	653
AL-DP-4183	AL4563	+++	5'-G dC A dC AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCU <sub>OMe</sub> SU-3'	661
	AL4558		'3-GSU <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> GUGUAUCCUCUCUACUGAsA-'5	654
AL-DP-4184	AL4563	+++	5'-G dC A dC AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCU <sub>OMe</sub> SU-3'	661
	AL4559		'3-GSU <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> GUGUAU <sub>OMe</sub> CCUCUCUACUGAsA-'5	655
AL-DP-4185	AL4563	+++	5'-G dC A dC AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCU <sub>OMe</sub> SU-3'	661
	AL4560		'3-GSU <sub>OMe</sub> CGU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CCUCUCUAC <sub>OMe</sub> UCGAA-'5	656
AL-DP-4186	AL4563	+++	5'-G dC A dC AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCU <sub>OMe</sub> SU-3'	661
	AL4561		'3-GsU <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CCUCUCUAC <sub>OMe</sub> UCGAA-'5	657
AL-DP-4187	AL4563	+++	5'-G dC A dC AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCU <sub>OMe</sub> SU-3'	661
	AL4562		'3-GSU <sub>OMe</sub> dCGU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CCUCUCUAdCUCGAA-'5	658

ES 2 423 060 T3

siRNA		Eficacia	5'-hebra sentido-3' 3'-hebra antisentido-5'	SEC ID n <sup>os</sup>
AL-DP-4188	AL4564	+++	5'-GSCACAU <sub>F</sub> AGGAGAGAUGAGCUsU-3'	662
	AL4557		'3-GsUCGUGUAUCCUCUCUACUCGAsA-'5	653
AL-DP-4189	AL4565	+++	5'-GC <sub>F</sub> AC <sub>F</sub> AU <sub>F</sub> AGGAGAGAU <sub>F</sub> GAGCU <sub>F</sub> sU-3'	663
	AL4557		'3-GsUCGUGUAUCCUCUCUACUCGAsA-'5	653
AL-DP-4190	AL4566	+++	5'-GC <sub>F</sub> AC <sub>F</sub> AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCU <sub>OMe</sub> sU-3'	664
	AL4557		'3-GSUCGUGUAUCCUCUCUACUCGAsA-'5	653
AL-DP-4191	AL4567	+++	5'-GC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> AU <sub>F</sub> AGGAGAGAU <sub>F</sub> GAGCU <sub>F</sub> sU-3'	665
	AL4557		'3-GsUCGUGUAUCCUCUCUACUCGAsA-'5	653
AL-DP-4192	AL4554	+++	5'-GsCACAUAGGAGAGAUGAGCUsU-3'	652
	AL4568		'3-GSU <sub>F</sub> GUFGU <sub>F</sub> AU <sub>F</sub> CCUCUCUACFUCGAA-'5	666
AL-DP-4193	AL4554	+++	5'-GsCACAUAGGAGAGAUGAGCUsU-3'	652
	AL4569		'3-GsU <sub>F</sub> CGU <sub>F</sub> GU <sub>F</sub> AU <sub>F</sub> CCUCUCUAC <sub>OMe</sub> UCGAA-'5	667
AL-DP-4194	AL4554	+++	5'-GsCACAUAGGAGAGAUGAGCUsU-3'	652
	AL4570		'3-GsU <sub>OMe</sub> CGU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CCUCUCUAC <sub>F</sub> UCGAA-'5	668
AL-DP-4197	AL4556	ND	5'-GC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCU <sub>OMe</sub> sU-3'	660
	AL4568		'3-GSU <sub>F</sub> GU <sub>F</sub> GU <sub>F</sub> AU <sub>F</sub> CCUCUCUAC <sub>F</sub> UCGAA-'5	666
AL-DP-4221	AL2780	+++	5'-GsC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCU <sub>OMe</sub> sU-3'	669
	AL2782		'3-GSU <sub>F</sub> CGU <sub>F</sub> GU <sub>F</sub> AU <sub>F</sub> CCUCUCUAC <sub>F</sub> UCGAsA-'5	670
AL-DP-4195	AL4571	"Diseño Atugen" basado en un solo saliente + 5'-GcAcAuAgGaGaGaUgAgCusU-3'		671
	AL4572	'3-gsUcGuGuAuCcUcUcUaCuCgAa-'5		672
d desoxinucleótido				
OMe 2'O-Metilo				
F 2'Fluoro				
s enlace de fosforotioato				
N Desemparejamientos en controles mezclados				

Tabla 5. Eficacia *in vitro* de siRNAs en células HeLa

siRNA	Progenitor sin modificar	Hebra #	Eficacia	5'-hebra sentido-3' 3'- hebra antisentido-5'	SEC ID nº
AL-DP-4374	AL-DP-4055	AL2732 AL2740	+++	5' CsAAAGUGGUCCAGGCGCATsT 3' 3' TstGUUCACCAGGGUCCGACGSU 5'	673 674
AL-DP-4375	AL-DP-4015	AL2728 AL2730	+++	5' GsGACAUCUCCAGGAGUACTsT 3' 3' TstCCUGUAGAAGGUCCUCAUSG 5'	675 676
AL-DP-4379	AL-DP-4088	AL2963 AL2964	+++	5' C <sub>OMe</sub> AAGU <sub>OMe</sub> GGU <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> AGGC <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> TsT 3' 3' TSTGGU <sub>F</sub> U <sub>F</sub> AC <sub>F</sub> AGGGU <sub>F</sub> C <sub>F</sub> CGAC <sub>F</sub> G 5'	677 678
AL-DP-4380	AL-DP-4014	AL2966 AL2967	+++	5' G <sub>OMe</sub> GGAU <sub>OMe</sub> AAAC <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> AAATsT 3' 3' 'TsTC <sub>F</sub> GC <sub>F</sub> U <sub>F</sub> AGU <sub>F</sub> U <sub>F</sub> GGAGU <sub>F</sub> GGU <sub>F</sub> Up5'	679 680
AL-DP-4219	AL-DP-4004	AL2712 AL2720	+++	5' GsUGAAUGCAGACC <sub>OMe</sub> AAAGAAAG 3' 3' UsACACUUACGUCUGGUUUUCUUUsC 5'	681 682
L-DP-4140	AL-DP-4014	AL2281 AL2282	-	5' GsCsGGAAACAAUCCUGACCAsTsT 3' 3' TstCGCCUUGUUAGGACUGGsUsU 5'	683 684
OMe 2'O-Metilo					
F 2'Fluoro					
s enlace de fosforitoato					
N Desemparejamiento en controles mezclados					

Tabla 6. Oligonucleótidos con modificaciones de fosforitoato, 2'-O-metilo, y 2'-fluoro, y eficacia in vitro frente a VEGF.

AL-DP# progenitor y ORF	AL-DP-#	AL-SQ-#	Secuencia de los dúplex y modificaciones	SEC ID n <sup>os</sup>	Eficacia in vitro	Masa	Coefficiente de extinción
4103 ORF 52	4034	4132	CCACCAU GCCAAG U G U CCdTdT	685	++		
			dTdTG GUGGUACGGUU CACCAG G	686			
	4222	2510	CsCOMeSACOMeCAOMeUGOMeCCOMeAAOMeGUOMeGGOMeUCOMeSCsdTsdT	687	-	6810,3	189,72
		2511	dTsdTsGsGOMeUGOMeGUOMeACOMeGGOMeUUOMeCAOMeCCOMeAsGOMeSg	688		6947,4	199,62
	4223	2540	COMeSsCsAOMeCCOMeAAOMeGCOMeCAOMeAGOMeJGOMeGUOMeCsCOMeSdTsdT	689	-	6824,3	189,72
		2541	dTsdTsGOMeSsGUOMeGGOMeUAOMeCGOMeGUOMeUCOMeACOMeSsGOMeSg	690		6961,4	199,62
	4224	2510	CsCOMeSACOMeCAOMeUGOMeCCOMeAAOMeGUOMeGGOMeUCOMeSsCsdTsdT	687	+/-	6810,3	189,72
		2541	dTsdTsGOMeSsGUOMeGGOMeUAOMeCGOMeGUOMeUCOMeACOMeSsGOMeSg	690		6961,4	199,62
	4225	2540	COMeSsCsAOMeCCOMeAAOMeGUOMeGGOMeUCOMeSsCsCOMeSdTsdT	689	-	6824,3	189,72
		2511	dTsdTsGsGOMeUGOMeGUOMeACOMeGGOMeUUOMeCCOMeAsGOMeSsGOMeSg	688		6947,4	199,62
	4226	2570	COMeSsCOMeACOMeCOMeAAOMeGUOMeGGOMeUCOMeSsCsCOMeSdTsdT	691	-	6790,4	189,72
		2571	dTsdTGGUOMeGGUOMeACOMeGGUOMeUOMeCOMeACOMeAGsG	692		6885,4	199,62
	4227	2600	CsCOMeACCOMeAAOMeGUOMeGGOMeUCOMeSsCsCOMeSdTsdT	693	-	6706,2	189,72
		2601	dTsdTGGUOMeGGUOMeACOMeGGUOMeUCOMeSsCsCOMeSdTsdT	694		6843,3	199,62
	4228	2570	COMeSsCOMeACOMeCOMeAAOMeGUOMeGGOMeUCOMeSsCsCOMeSdTsdT	691	-	6790,4	189,72
		2631	dTsdTGGUOMeGGUOMeACOMeGGUOMeUCOMeSsCsCOMeSdTsdT	695		6789,1	199,62
	4229	2600	CsCOMeACCOMeAAOMeGUOMeGGOMeUCOMeSsCsCOMeSdTsdT	693	+	6706,2	189,72
		2661	dTsdTGGUOMeGGUOMeACOMeGGUOMeUCOMeSsCsCOMeSdTsdT	696		6783,1	199,62
4088 ORF 60	4042		CCAAGUGGUCCCCAGGCGUCdTdT	697	+++		
	4140		dTdTGGUUCACCCAGGUCGACG	698			



4230	2512	CSC <sub>OMe</sub> SAA <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> SCsdTsdT	699	-	6866,3	190,35
	2513	dTsdTsGsG <sub>OMe</sub> UU <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> AsC <sub>OMe</sub> sG	700		6906,4	194,31
4231	2542	C <sub>OMe</sub> sCSA <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> GSC <sub>OMe</sub> sdTsdT	701	-	6880,4	190,35
	2543	dTsdTSG <sub>OMe</sub> sGU <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> sCsG <sub>OMe</sub>	702		6920,4	194,31
4232	2512	CsC <sub>OMe</sub> sAA <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> sCsdTsdT	699	-	6866,3	190,35
	2543	TsdTsG <sub>OMe</sub> sGU <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> sCSG <sub>OMe</sub>	702		6920,4	194,31
4233	2542	C <sub>OMe</sub> sCsA <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> GsC <sub>OMe</sub> sdTsdT	701	-	6880,4	190,35
	2513	dTsdTsGsG <sub>OMe</sub> UU <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> AsC <sub>OMe</sub> sG	700		6906,4	194,31
4234	2572	C <sub>OMe</sub> sC <sub>OMe</sub> AAQU <sub>OMe</sub> QU <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> AAQQC <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> QC <sub>OMe</sub> dTsdT	703	-	6832,4	190,35
	2573	dTsdTGGU <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> AGGGU <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> GAC <sub>OMe</sub> sG	704		6858,4	194,31
4235	2602	CsC <sub>OMe</sub> AAAGU <sub>OMe</sub> GGUCC <sub>OMe</sub> AGGU <sub>OMe</sub> GCdTsdt	705	+	6748,2	190,35
	2603	dTsdTGGUUCAC <sub>OMe</sub> CAGGGU <sub>OMe</sub> CCGAC <sub>OMe</sub> sG	706		6788,2	194,31
4236	2572	C <sub>OMe</sub> sC <sub>OMe</sub> AAAGU <sub>OMe</sub> GGU <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> AGGC <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> dTsdT	703	+++	6832,4	190,35
	2633	dTsdTGGUpUpCpACpAGGGUFCpCFGAC <sub>OMe</sub> sG	707		6750,1	194,31
4237	2602	CsC <sub>OMe</sub> AAAGU <sub>OMe</sub> GGUCC <sub>OMe</sub> AGGU <sub>OMe</sub> GCdTsdt	705	+++	6748,2	190,35
	2663	dTsdTGGU <sub>F</sub> UCAC <sub>F</sub> CAGGGU <sub>F</sub> CCGAC <sub>F</sub> sG	708		6740,1	194,31
4055 ORF 61	4043	CAAGUGGUCCCAGGUCGAdTdt	709	+++		
	4141	dTdtGUUCACCAGGGUCCGACGU	710			
4358	2736	CA <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> AdTsdT	711	-		
	2744	dTsdTGU <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> U	712			
4359	2737	C <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> dTsdT	713	-		
	2745	dTsdTGU <sub>OMe</sub> UU <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub>	714			
4360	2736	CA <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> AdTsdT	711	-		
	2745	dTsdTGU <sub>OMe</sub> UU <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub>	714			

4361	2737	C <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> dTsdT	713	-	
	2744	dTsdTGU <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> U	712		
4362	2735	C <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> GGU <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> Co <sub>Me</sub> AGGCo <sub>Me</sub> U <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> AdTsdT	715	-	
	2743	dTsdTGU <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> AC <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> AGGGU <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> Co <sub>Me</sub> GAC <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub>	716		
4363	2734	C <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> GGUCC <sub>OMe</sub> AGGCU <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> AdTsdT	717	-	
	2742	dTsdTGU <sub>OMe</sub> UCAC <sub>OMe</sub> CAGGGU <sub>OMe</sub> CCGAC <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub>	718		
4364	2735	C <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> GGU <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> Co <sub>Me</sub> AGGCo <sub>Me</sub> U <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> AdTsdT	715	-?	
	2747	dTsdTGU <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> FC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> FC <sub>OMe</sub> AGGGU <sub>OMe</sub> FC <sub>OMe</sub> GAG <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> F	719		
4365	2734	C <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> GGUCC <sub>OMe</sub> AGGCU <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> AdTsdT	717	+++	
	2746	dTsdTGU <sub>OMe</sub> UCAC <sub>OMe</sub> FCAGGGU <sub>OMe</sub> FCGAC <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> F	720		
4019 ORF 102	4003	AGAAUCAUCACGAAUGGUdTdT	721	++	
	4070	dTdTUCUAGUAGUUCUACCCA	722		
4238	2514	AsG <sub>OMe</sub> sAA <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> AUCA <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> sUdTsdt	723	-	216,9
	2515	dTsdTsUsCo <sub>Me</sub> UU <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> UU <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> CsCo <sub>Me</sub> sA	724		191,16
4239	2544	A <sub>OMe</sub> sGsA <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> GsU <sub>OMe</sub> sdTsdt	725	-	216,9
	2545	dTsdTsU <sub>OMe</sub> sCU <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> SCsA <sub>OMe</sub>	726		191,16
4240	2514	AsG <sub>OMe</sub> sAA <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> AUCA <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> sUdTsdt	723	-	216,9
	2545	dTsdTsU <sub>OMe</sub> sCU <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> sCsA <sub>OMe</sub>	726		191,16
4241	2544	A <sub>OMe</sub> sGsA <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> GsU <sub>OMe</sub> sdTsdt	725	-	216,9
	2515	dTsdTsUsCo <sub>Me</sub> UU <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> UU <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> CsCo <sub>Me</sub> sA	724		191,16
4242	2574	A <sub>OMe</sub> sGAAU <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> AU <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> GAAGU <sub>OMe</sub> GGU <sub>OMe</sub> dTsdt	727	-	216,9
	2575	dTsdTU <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> U <sub>OMe</sub> AGU <sub>OMe</sub> AGU <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> AC <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> sA	728		191,16
4243	2604	AsGAAUC <sub>OMe</sub> AUC <sub>OMe</sub> ACGGAAGU <sub>OMe</sub> GGUdTsdt	729	-	216,9
	2605	dTsdTUCUAGU <sub>OMe</sub> AGU <sub>OMe</sub> GCUUCAC <sub>OMe</sub> CsA	730		191,16

4244	2574	A <sub>OMe</sub> sGAAU <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> AU <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> ACo <sub>Me</sub> GAAGU <sub>OMe</sub> GGU <sub>OMe</sub> dTsdt	727	+	6847,4	216,9
	2635	dTsdTU <sub>F</sub> CFU <sub>F</sub> AGU <sub>F</sub> AGU <sub>F</sub> GC <sub>OMe</sub> U <sub>F</sub> CFAC <sub>F</sub> CFSA	731		6624,0	191,16
4245	2604	AsGAAU <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> AU <sub>OMe</sub> ACGGAAGU <sub>OMe</sub> deGGUdTsdt	729	++	6791,2	216,9
	2665	dTsdTUCUUAGU <sub>F</sub> AGU <sub>F</sub> GCUUCAC <sub>F</sub> CSa	732		6606,0	191,16
4111 ORF 129	4007	UGGAUGUCUAUCAGCGCAGdTdT	733	+++		
	4074	dTdTACCUCACAGAUAGUCGGGUC	734			
4246	2516	UsG <sub>OMe</sub> sGA <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> sGsdTsdt	735	-	6892,3	200,34
	2517	dTsdTsAsC <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> AG <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> sC	736		6835,3	198,36
4247	2546	U <sub>OMe</sub> sGsG <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> AsG <sub>OMe</sub> sdTsdt	737	-	6906,4	200,34
	2547	dTsdTsA <sub>OMe</sub> sCC <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> sUSC <sub>OMe</sub>	738		6849,4	198,36
4248	2516	UsC <sub>OMe</sub> sGA <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> sGsdTsdt	735	-	6892,3	200,34
	2547	dTsdTsA <sub>OMe</sub> sCC <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> sUsC <sub>OMe</sub>	738		6849,4	198,36
4249	2546	U <sub>OMe</sub> sGsG <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> dTsdt	737	-	6906,4	200,34
	2517	dTsdTsAsC <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> AG <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> sC	736		6835,3	198,36
4250	2576	U <sub>OMe</sub> sGGAU <sub>OMe</sub> GUC <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> AG <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> A <sub>OMe</sub> GdTsdt	739	-	6844,3	200,34
	2577	dTsdTAC <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> U <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> AGAU <sub>OMe</sub> AGU <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> GC <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> sC <sub>OMe</sub>	740		6801,4	198,36
4251	2606	UsGGAU <sub>OMe</sub> GUCU <sub>OMe</sub> AUC <sub>OMe</sub> AGCGCo <sub>Me</sub> AGdTsdt	741	-	6788,2	200,34
	2607	dTsdTAC <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> CUAC <sub>OMe</sub> AGAU <sub>OMe</sub> AGU <sub>OMe</sub> CGCGU <sub>OMe</sub> sC	742		6731,2	198,36
4252	2576	U <sub>OMe</sub> sGGAU <sub>OMe</sub> GUC <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> AG <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> A <sub>OMe</sub> GdTsdt	739	+	6844,3	200,34
	2637	dTsdTAC <sub>F</sub> CFU <sub>F</sub> AC <sub>F</sub> AGAU <sub>OMe</sub> AGU <sub>F</sub> CFGC <sub>F</sub> GU <sub>F</sub> sCF	743		6681,1	198,36
4253	2606	UsGGAU <sub>OMe</sub> GUCU <sub>OMe</sub> AUC <sub>OMe</sub> AGCGCo <sub>Me</sub> AGdTsdt	744	+++	6788,2	200,34
	2667	dTsdTAC <sub>F</sub> CFU <sub>F</sub> AC <sub>F</sub> AGAU <sub>OMe</sub> AGU <sub>F</sub> CGCGU <sub>F</sub> sC	745		6671,1	198,36
4028 ORF 149	4014	UACUGCCAUCCAUCCGAGdTdT	746			
	4081	dTdT AUGACGGUAGGUUAGCUCU	747			

4254	2518	UsA <sub>OMe</sub> sCU <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> sAsdTsdT	748	No	6819,3	201,69
	2519	dTsdTsAsU <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> JA <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> sU <sub>OMe</sub> sU	749	data	6893,3	201,69
4255	2548	U <sub>OMe</sub> sAsC <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> GsA <sub>OMe</sub> sdTsdT	750	No	6833,4	201,69
	2549	dTsdTsA <sub>OMe</sub> sUG <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> JA <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> UU <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> sCsU <sub>OMe</sub>	751	data	6907,4	201,69
4256	2518	UsA <sub>OMe</sub> sCU <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> sAsdTsdT	748	No	6819,3	201,69
	2549	dTsdTsA <sub>OMe</sub> sUG <sub>OMe</sub> eAC <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> JA <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> UU <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> sCSU <sub>OMe</sub>	751	data	6907,4	201,69
4257	2548	U <sub>OMe</sub> sAsC <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> GsA <sub>OMe</sub> sdTsdT	750	No	6833,4	201,69
	2519	dTsdTsASU <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> JA <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> UsC <sub>OMe</sub> sU	749	data	6893,3	201,69
4258	2578	U <sub>OMe</sub> sAC <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> AAU <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> GAGAdTsdT	752	-	6785,4	201,69
	2579	dTsdTAU <sub>OMe</sub> GAC <sub>OMe</sub> GGU <sub>OMe</sub> AGGU <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> AGC <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> sU <sub>OMe</sub>	753		6845,3	201,69
4259	2608	UsACU <sub>OMe</sub> GCC <sub>OMe</sub> AUCC <sub>OMe</sub> AAUCCGAGAdTsdT	754	++	6701,2	201,69
	2609	dTsdTAU <sub>OMe</sub> GAC <sub>OMe</sub> GGU <sub>OMe</sub> AGGU <sub>OMe</sub> UAGCUCsU	755		6775,2	201,69
4260	2578	U <sub>OMe</sub> sAC <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> AAU <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> GAGAdTsdT	752	+	6785,4	201,69
	2639	dTsdTAU <sub>OMe</sub> FAC <sub>OMe</sub> GGU <sub>OMe</sub> FAGGU <sub>OMe</sub> FAGC <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> F <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> F	756		6721,1	201,69
4261	2608	UsACU <sub>OMe</sub> eeGCC <sub>OMe</sub> AUCC <sub>OMe</sub> AAUCCGAGAdTsdT	754	+	6701,2	201,69
	2669	dTsdTAU <sub>OMe</sub> FAC <sub>OMe</sub> GGU <sub>OMe</sub> FAGGU <sub>OMe</sub> UAGCUCsU	757		6727,1	201,69
4060 ORF 168	4061	CCCUGGUGGACAUCUCCAdTsdT	758	+++		
	4159	dTsdTGGGACCACCUCUAGAAAGGU	759			
4262	2520	CsC <sub>OMe</sub> sCU <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> UU <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> sAsdTsdT	760	-	6788,3	185,13
	2521	dTsdTsGsG <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> GsG <sub>OMe</sub> sU	761		6954,4	208,89
4263	2550	C <sub>OMe</sub> sCsC <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> CsA <sub>OMe</sub> sdTsdT	762	-	6802,3	185,13
	2551	dTsdTsG <sub>OMe</sub> sGG <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> JA <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> sGU <sub>OMe</sub>	763		6968,5	208,89
4264	2520	CSC <sub>OMe</sub> eeSCU <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> UU <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> sAsdTsdT	760	-	6788,3	185,13
	2551	dTsdTsG <sub>OMe</sub> sGG <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> JA <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> sGsU <sub>OMe</sub>	763		6968,5	208,89

4265	2550	C <sub>OMe</sub> sCSC <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> CsA <sub>OMe</sub> sdtSdt	762	-	6802,3	185,13
	2521	dTsdTsGsG <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> GsG <sub>OMe</sub> sU	761		6954,4	208,89
4266	2580	C <sub>OMe</sub> sC <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> U <sub>OMe</sub> GGU <sub>OMe</sub> GGAC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> U <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> Co <sub>Me</sub> Co <sub>Me</sub> AdTsdT	764	-	6782,3	185,13
	2581	dTsdTGGGAC <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> Co <sub>Me</sub> Co <sub>Me</sub> U <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AGAAGsU <sub>OMe</sub>	765		6878,4	208,89
4267	2610	CsCCU <sub>OMe</sub> GGU <sub>OMe</sub> GGAC <sub>OMe</sub> AUCUUC <sub>OMe</sub> AdTsdT	766	+	6670,1	185,13
	2611	dTsdTGGGAC <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> Co <sub>Me</sub> Co <sub>Me</sub> CU <sub>OMe</sub> GAAGGsU <sub>OMe</sub>	767		6836,3	208,89
4268	2580	C <sub>OMe</sub> sC <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> U <sub>OMe</sub> GGU <sub>OMe</sub> GGAC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> U <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> Co <sub>Me</sub> Co <sub>Me</sub> AdTsdT	764	++	6782,3	185,13
	2641	dTsdTGGGAC <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> Co <sub>Me</sub> Co <sub>Me</sub> U <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AGAAGGsU <sub>OMe</sub>	768		6778,2	208,09
4269	2610	CsCCU <sub>OMe</sub> GGU <sub>OMe</sub> GGAC <sub>OMe</sub> AUCUUC <sub>OMe</sub> AdTsdT	766	+	6670,1	185,13
	2671	dTsdTGGGAC <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> Co <sub>Me</sub> Co <sub>Me</sub> CU <sub>OMe</sub> GAAGGsU <sub>OMe</sub>	769		6772,2	208,89
4015 ORF 175	4066	GGACAUUCUCCAGGAGUACdTd	770	+++		
	4164	dTdTCCU <sub>OMe</sub> GUAGAAGGUCCUCAUG	771			
4270	2522	GsG <sub>OMe</sub> sAC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> sCsdT	772	-	6875,4	202,32
	2523	dTsdTsCsCo <sub>Me</sub> UG <sub>OMe</sub> JA <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> AsU <sub>OMe</sub> sG	773		6852,3	196,38
4271	2552	G <sub>OMe</sub> sGsA <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> UU <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AsC <sub>OMe</sub> sdtSdt	774	-	6889,4	202,32
	2553	dTsdTsC <sub>OMe</sub> sCU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> sUsG <sub>OMe</sub>	775		6866,3	196,38
4272	2522	GsG <sub>OMe</sub> sAC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> sCsdTsdT	772	-	6875,4	202,32
	2553	dTsdTsC <sub>OMe</sub> sCU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> sUsG <sub>OMe</sub>	775		6866,3	196,38
4273	2552	G <sub>OMe</sub> sGsA <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> UU <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AsC <sub>OMe</sub> sdtSdt	774	-	6889,4	202,32
	2523	dTsdTsCsCo <sub>Me</sub> UG <sub>OMe</sub> JA <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> AsU <sub>OMe</sub> sG	773		6852,3	196,38
4274	2582	G <sub>OMe</sub> sGAC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> Co <sub>Me</sub> Co <sub>Me</sub> Co <sub>Me</sub> Co <sub>Me</sub> AGGAGU <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> dTsdT	776	-	6827,4	202,32
	2583	dTsdTCo <sub>Me</sub> Co <sub>Me</sub> U <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AGAAGGU <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> Co <sub>Me</sub> U <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> Co <sub>Me</sub> AsU <sub>OMe</sub> sG	777		6818,3	196,38
4275	2612	GsGAC <sub>OMe</sub> AUCUUC <sub>OMe</sub> AGGAGU <sub>OMe</sub> ACdTsdT	778	-	6743,2	202,32
	2613	dTsdTCCU <sub>OMe</sub> GUAGAAGGU <sub>OMe</sub> CCUCAU <sub>OMe</sub> sG	779		6720,1	196,38

4276	2582	G <sub>OMe</sub> sGAC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> U <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> U <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> Co <sub>Me</sub> AGGAGU <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> dTsdt	776	-	6827,4	202,32
	2643	dTsdTC <sub>F</sub> CF <sub>F</sub> U <sub>F</sub> GAAGGU <sub>F</sub> CF <sub>F</sub> U <sub>F</sub> CF <sub>F</sub> AU <sub>F</sub> SG	780		6698,0	196,38
4277	2612	GsGAC <sub>OMe</sub> AUCUUCC <sub>OMe</sub> AGGAGU <sub>OMe</sub> ACdTsdt	778	+++	6743,2	202,32
	2673	dTsdTCCU <sub>F</sub> GAAGGU <sub>F</sub> CCUCAU <sub>F</sub> SG	781		6684,0	196,38
4032 ORF 191	4025	UACCCUGAGGAGUGdTd	782	+++		
	4092	dTdT AUGGGACUACUCUAGCUCA	783			
4278	2524	UsA <sub>OMe</sub> sCC <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> sUsdTsdT	784	+	6876,3	203,67
	2525	dTsdTsAsU <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> UsC <sub>OMe</sub> sA	785		6836,3	199,71
4279	2554	U <sub>OMe</sub> sAsC <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> GsU <sub>OMe</sub> sdtTsdt	786	+	6890,4	203,67
	2555	dTsdTsA <sub>OMe</sub> sUG <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> sCsA <sub>OMe</sub>	787		6850,3	199,71
4280	2524	UsA <sub>OMe</sub> sCC <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> sUsdTsdT	784	++	6876,3	203,67
	2555	dTsdTsA <sub>OMe</sub> sUG <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> sCsA <sub>OMe</sub>	787		6850,3	199,71
4281	2554	U <sub>OMe</sub> sAsC <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> GsU <sub>OMe</sub> sdtTsdt	786	-	6890,4	203,67
	2525	dTsdTsAsU <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> sCsA <sub>OMe</sub>	785		6836,3	199,71
4282	2584	U <sub>OMe</sub> sAC <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> U <sub>OMe</sub> GAU <sub>OMe</sub> GAGAU <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> GAGU <sub>OMe</sub> dTsdt	788	-	6828,3	203,67
	2585	dTsdTAU <sub>OMe</sub> GGGACU <sub>OMe</sub> ACUCU <sub>OMe</sub> AGCU <sub>OMe</sub> sA	789		6802,3	199,71
4283	2614	UsACCCU <sub>OMe</sub> GAU <sub>OMe</sub> GAGAU <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> GAGU <sub>OMe</sub> dTsdt	790	+++	6744,2	203,67
	2615	dTsdTAU <sub>OMe</sub> GGGAC <sub>OMe</sub> UAC <sub>OMe</sub> UCUAGCUCsA	791		6704,1	199,71
4284	2584	U <sub>OMe</sub> sAC <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> U <sub>OMe</sub> GAU <sub>OMe</sub> GAGAU <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> GAGU <sub>OMe</sub> dTsdt	788	+++	6828,3	203,67
	2645	dTsdTAU <sub>F</sub> GGGAC <sub>F</sub> U <sub>F</sub> AC <sub>F</sub> U <sub>F</sub> CF <sub>F</sub> U <sub>F</sub> AGC <sub>F</sub> U <sub>F</sub> CF <sub>F</sub> sA	792		6682,0	199,71
4285	2614	UsACCCU <sub>OMe</sub> GAU <sub>OMe</sub> GAGAU <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> GAGU <sub>OMe</sub> dTsdt	790	++	6744,2	203,67
	2675	dTsdTAU <sub>F</sub> GGGAC <sub>F</sub> UAC <sub>F</sub> UCUAGCUCsA	793		6668,0	199,71
4033 ORF 305	4026	ACCAUGCAGAUUAGCGGAdTd	794	++		
	4093	dTdTUGGUACGUCUAAUACGCCU	795			

## ES 2 423 060 T3

4286	2526	AsC <sub>OMe</sub> sCA <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> UU <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> sAsdTsdTMeGG <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> MoSAsdTsdT	796	++	6899,4	209,61
	2527	dTsdTUsG <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> CsC <sub>OMe</sub> sU	797		6813,3	193,77
4287	2556	A <sub>OMe</sub> sCsC <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> GsA <sub>OMe</sub> sdTsdT	798	+	6913,4	209,61
	2557	dTsdTUs <sub>OMe</sub> sGG <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> sCsU <sub>OMe</sub>	799		6827,3	193,77
4288	2526	AsC <sub>OMe</sub> sCA <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> UU <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> sAsdTsdT	796	-	6899,4	209,61
	2557	dTsdTUs <sub>OMe</sub> sGG <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> sCs <sub>OMe</sub>	799		6827,3	193,77
4289	2556	A <sub>OMe</sub> sCsC <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> GsA <sub>OMe</sub> sdTsdT	798	-	6913,4	209,61
	2527	dTsdTUsG <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> CsC <sub>OMe</sub> sU	797		6813,3	193,77
4290	2586	A <sub>OMe</sub> sCC <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> AdTsdT	800	-	6837,4	209,61
	2587	dTsdTU <sub>OMe</sub> sGG <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> sCs <sub>OMe</sub>	801		6793,3	193,77
4291	2616	AsCC <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> AdTsdT	802	-	6795,3	209,61
	2617	dTsdTU <sub>OMe</sub> sGG <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> sCs <sub>OMe</sub>	803		6709,2	193,77
4292	2586	A <sub>OMe</sub> sCC <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> AdTsdT	800	+++	6837,4	209,61
	2647	dTsdTU <sub>OMe</sub> sGG <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> sCs <sub>OMe</sub>	804		6645	193,77
4293	2616	AsCC <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> AdTsdT	802	+++	6795,3	209,61
	2677	dTsdTU <sub>OMe</sub> sGG <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> sCs <sub>OMe</sub>	805		6649,0	193,77
4014 ORF 319	4112	GCGGAUCAAAACCUCACCAAdTsdT	806	+++		
	4180	dTsdTU <sub>OMe</sub> sGG <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> sCs <sub>OMe</sub>	807			
4294	2528	GsC <sub>OMe</sub> sGG <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> AdTsdT	808	+	6841,4	206,28
	2529	dTsdTUs <sub>OMe</sub> sGG <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> sCs <sub>OMe</sub>	809		6886,3	192,42
4295	2558	G <sub>OMe</sub> sCsC <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> AdTsdT	810	-	6855,4	206,28
	2559	dTsdTUs <sub>OMe</sub> sGG <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> sCs <sub>OMe</sub>	811		6900,3	192,42
4296	2528	GsC <sub>OMe</sub> sGG <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> AdTsdT	808	-	6841,4	206,28
	2559	dTsdTUs <sub>OMe</sub> sGG <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> sCs <sub>OMe</sub>	811		6900,3	192,42

4297	2558	G <sub>OMe</sub> sC <sub>sG<sub>OMe</sub></sub> G <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> As <sub>OMe</sub> SdTsdt	810	-	6855,4	206,28
	2529	dTsdtCsG <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> UU <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> GsU <sub>OMe</sub> SU	809		6886,3	192,42
4298	2588	G <sub>OMe</sub> sC <sub>OMe</sub> GGAU <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> AAAC <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> U <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> AC <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> AAAdTsdt	812	-	6793,4	206,28
	2589	dTsdtC <sub>OMe</sub> G <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> U <sub>OMe</sub> AGU <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> GGAGU <sub>OMe</sub> GGU <sub>OMe</sub> SU <sub>OMe</sub>	813		6852,3	192,42
4299	2618	GsCGGAUC <sub>OMe</sub> AAAC <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> AdTsdt	814	-	6709,2	206,28
	2619	dTsdtCGCCUAGU <sub>OMe</sub> UUGGAGU <sub>OMe</sub> GGU <sub>OMe</sub> SU	815		6754,1	192,42
4300	2588	G <sub>OMe</sub> sC <sub>OMe</sub> GGAU <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> AAAC <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> U <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> AC <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> AdTsdt	812	+	6793,4	206,28
	2649	dTsdtC <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> CF <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> AGU <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> GGAGU <sub>OMe</sub> GGU <sub>OMe</sub> SU <sub>OMe</sub>	816		6716,0	192,42
4301	2618	GsCGGAUC <sub>OMe</sub> AAAC <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> AdTsdt	814	+++	6709,2	206,28
	2679	dTsdtCGCCUAGU <sub>OMe</sub> UUGGAGU <sub>OMe</sub> GGU <sub>OMe</sub> SU	817		6718,0	192,42
4123 ORF 330	4362	ACCUCACCAAGGCCAGCAdTd	818	++		
	4363	dTdTUGGAGUGGUUCCGGUCGUG	819			
4302	2530	AsC <sub>OMe</sub> sCU <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> sCsdTsdt	820	+	6816,4	197,64
	2531	dTsdtUsG <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> UU <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> GsU <sub>OMe</sub> SG	821		6941,3	191,7
4303	2560	A <sub>OMe</sub> sC <sub>sC<sub>OMe</sub></sub> UC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> As <sub>OMe</sub> SdTsdt	822	-	6830,4	197,64
	2561	dTsdtU <sub>OMe</sub> SGG <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> SUsG <sub>OMe</sub>	823		6955,4	191,7
4304	2530	AsC <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> sCsdTsdt	820	-	6816,4	197,64
	2561	dTsdtU <sub>OMe</sub> SGG <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> SUsG <sub>OMe</sub>	823		6955,4	191,7
4305	2560	A <sub>OMe</sub> sC <sub>sC<sub>OMe</sub></sub> UC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> As <sub>OMe</sub> SdTsdt	822	-	6830,4	197,64
	2531	dTsdtUsG <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> UU <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> GsU <sub>OMe</sub> SG	821		6941,3	191,7
4306	2590	A <sub>OMe</sub> sC <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> AC <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> AAAGG <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> AG <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> AdTsdt	824	-	6782,4	197,64
	2591	dTsdtU <sub>OMe</sub> GGAGU <sub>OMe</sub> GGU <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> Co <sub>Me</sub> GGU <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> GU <sub>OMe</sub> SG <sub>OMe</sub>	825		6893,3	191,7
4307	2620	AsCCU <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> AAAGGCC <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> Co <sub>Me</sub> AdTsdt	826	-	6698,2	197,64
	2621	dTsdtUGGAGU <sub>OMe</sub> GGU <sub>OMe</sub> UCCGGU <sub>OMe</sub> CGU <sub>OMe</sub> SG	827		6823,2	191,7



4308	2590	A <sub>OMe</sub> S <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> A <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> AGG <sub>OMe</sub> AGC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> dTsdt	824	-	6782,4	197,64
	2651	dTsdTU <sub>F</sub> GGAGU <sub>F</sub> GGU <sub>F</sub> U <sub>F</sub> C <sub>F</sub> CGU <sub>F</sub> C <sub>F</sub> GU <sub>F</sub> S <sub>OMe</sub>	828		6785,1	191,7
4309	2620	AsCCU <sub>OMe</sub> ACC <sub>OMe</sub> AAGGCC <sub>OMe</sub> AGC <sub>OMe</sub> ACdTsdt	826	+	6698,2	197,64
	2681	dTsdTUGGAGU <sub>F</sub> GGU <sub>F</sub> U <sub>F</sub> JCCGGU <sub>F</sub> CGU <sub>F</sub> sG	829		6775,1	191,7
4094so ORF 343	4326	GCACAUAGGAGAGAGGCUU	608	+++		
	4327	GUCGUGUAUCCUCUCUACUCGAA	609			
4310	2532	Gs <sub>OMe</sub> sA <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> sCsU <sub>OMe</sub> sU	832	-	7019,5	222,12
	2533	GsU <sub>OMe</sub> sCsG <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> GsA <sub>OMe</sub> sA	833		7487,6	206,91
4311	2562	G <sub>OMe</sub> sCA <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> GsC <sub>OMe</sub> sUsU <sub>OMe</sub>	834	-	7033,5	222,12
	2563	C <sub>OMe</sub> sGsU <sub>OMe</sub> sGU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> sAsA <sub>OMe</sub>	835		7501,7	206,91
4312	2532	Gs <sub>OMe</sub> sA <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> sCsU <sub>OMe</sub> sU	832	-	7019,5	222,12
	2563	C <sub>OMe</sub> sGsU <sub>OMe</sub> sGU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> sAsA <sub>OMe</sub>	835		7501,7	206,91
4313	2562	G <sub>OMe</sub> sCsA <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> GsC <sub>OMe</sub> sUsU <sub>OMe</sub>	834	-	7033,5	222,12
	2533	GsU <sub>OMe</sub> sCsG <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> GsA <sub>OMe</sub> sA	833		7487,6	206,91
4314	2592	Gs <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGC <sub>OMe</sub> sUsU <sub>OMe</sub>	836	+	6929,4	222,12
	2593	GSU <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> GAsA	837		7495,8	206,91
4315	2622	Gs <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCUsU	838	+++	6887,3	222,12
	2623	GsU <sub>OMe</sub> CGU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CCUCUCUAC <sub>OMe</sub> UCGAsA	839		7355,5	206,91
4316	2592	Gs <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGC <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> sU <sub>OMe</sub>	836	+++	6929,4	222,12
	2663	GSU <sub>F</sub> C <sub>F</sub> GU <sub>F</sub> GU <sub>F</sub> AU <sub>F</sub> C <sub>F</sub> U <sub>F</sub> C <sub>F</sub> U <sub>F</sub> AC <sub>F</sub> U <sub>F</sub> C <sub>F</sub> GASA	840		7283,3	206,91
4317	2622	Gs <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCUsU	838	+	6887,3	222,12
	2683	GSU <sub>F</sub> CGU <sub>F</sub> GU <sub>F</sub> AU <sub>F</sub> CCUCUCUAC <sub>F</sub> UCGASA	841		7291,3	206,91
4107do ORF 343	4117	GCACAUAGGAGAGAGGcTdT	842	+++		
	4185	dTdTcGUGUAUCCUCUCUACUCG	843			

4318	2534	GsC <sub>OMe</sub> sAC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> sCscTsdT	844	+	7001,5	222,12
	2535	dTsdTsCsG <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> USC <sub>OMe</sub> sG	845		6726,2	176,58
4319	2564	G <sub>OMe</sub> sCsA <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> GsC <sub>OMe</sub> sdTsdT	846	-	7015,5	222,12
	2565	dTsdTsC <sub>OMe</sub> sGU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> sCs <sub>OMe</sub>	847		6740,2	176,58
4320	2534	GsC <sub>OMe</sub> sAC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> sCscTsdT	844	-	7001,5	222,12
	2565	dTsdTsC <sub>OMe</sub> sGU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> sCsG <sub>OMe</sub>	847		6740,2	176,58
4321	2564	G <sub>OMe</sub> sCSA <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> GsC <sub>OMe</sub> sdTsdT	846	-	7015,5	222,12
	2535	dTsdTsCsG <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> UsC <sub>OMe</sub> sG	845		6726,2	176,58
4322	2594	G <sub>OMe</sub> sC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGC <sub>OMe</sub> dTsdT	848	-	6897,4	222,12
	2595	dTsdTc <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> sG	849		6748,3	176,58
4323	2624	GsC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCdTsdT	850	+++	6883,3	222,12
	2625	dTsdTCG <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CCUCUCUAC <sub>OMe</sub> UCsG	851		6608,0	176,58
4324	2594	G <sub>OMe</sub> sC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGC <sub>OMe</sub> dTsdT	848	+++	6897,4	222,12
	2655	dTsdTc <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> sG	852		6579,9	176,58
4325	2624	GsC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCdTsdT	850	+++	6883,3	222,12
	2685	dTsdTCG <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CCUCUCUAC <sub>OMe</sub> UCsG	853		6559,9	176,58
4061 ORF 346	4119	CAUAGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCUUCdTd	854	+++		
	4187	dTdTGUAUCCUCUCUACUCGAAG	855			
4326	2536	CsA <sub>OMe</sub> sUA <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> UU <sub>OMe</sub> sCsdTsdT	856	+	6939,4	213,57
	2537	dTsdTsGsU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> AsA <sub>OMe</sub> sG	857		6773,2	189,81
4327	2566	C <sub>OMe</sub> sAsU <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> UsC <sub>OMe</sub> sdTsdT	858	-	6953,4	213,57
	2567	dTsdTsG <sub>OMe</sub> sUA <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> A <sub>OMe</sub> sAsG <sub>OMe</sub>	859		6787,3	189,81
4328	2536	CsA <sub>OMe</sub> sUA <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> GGA <sub>OMe</sub> UU <sub>OMe</sub> sCsdTsdT	856	-	6939,4	213,57
	2567	dTsdTsG <sub>OMe</sub> sUA <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> sAsG <sub>OMe</sub>	859		6787,3	189,81



4340	2598	U <sub>OMe</sub> SGU <sub>OMe</sub> GAAU <sub>OMe</sub> GAAU <sub>OMe</sub> G <sub>OMe</sub> AGAC <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> AAAGAdTsdT	873	+++	6856,4	222,84
	2659	dTsdTAC <sub>F</sub> AC <sub>F</sub> U <sub>F</sub> U <sub>F</sub> AC <sub>F</sub> GU <sub>F</sub> C <sub>F</sub> U <sub>F</sub> GGU <sub>F</sub> U <sub>F</sub> C <sub>F</sub> SU <sub>F</sub>	877		6586,9	185,22
4341	2628	UsGU <sub>OMe</sub> GAAU <sub>OMe</sub> G <sub>OMe</sub> GACC <sub>OMe</sub> AAAGAdTsdT	875	++	6842,3	222,84
	2689	dTsdTAC <sub>F</sub> AC <sub>F</sub> U <sub>F</sub> U <sub>F</sub> AC <sub>F</sub> GU <sub>F</sub> C <sub>F</sub> U <sub>F</sub> GGU <sub>F</sub> U <sub>F</sub> C <sub>F</sub> SU <sub>F</sub>	878		6586,9	185,22
4004 so ORF 381	4338	GUGAAU <sub>OMe</sub> GAGACCAAAAGAAAG	879	+++		
	4339	UACACUUACGUCUGGUUUUCUUUC	880			
4366	2716	GsU <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> CAA <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> SG	881	+		
	2724	UsA <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> UU <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> UU <sub>OMe</sub> sC	882			
4367	2717	GOMeSUG <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> AsG <sub>OMe</sub>	883	-		
	2725	U <sub>OMe</sub> sAC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> UU <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> UU <sub>OMe</sub> JC <sub>OMe</sub> UU <sub>OMe</sub> UsC <sub>OMe</sub>	884			
4368	2716	GsU <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> sG	881	+		
	2725	U <sub>OMe</sub> sAC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> UU <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> GG <sub>OMe</sub> UU <sub>OMe</sub> JC <sub>OMe</sub> UU <sub>OMe</sub> UsC <sub>OMe</sub>	884			
4369	2717	GOMeSUG <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> UG <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> GA <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> AG <sub>OMe</sub> AA <sub>OMe</sub> AsG <sub>OMe</sub>	883	+		
	2724	UsA <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> UA <sub>OMe</sub> CG <sub>OMe</sub> UC <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> UU <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> UU <sub>OMe</sub> sC	882			
4370	2715	GsU <sub>OMe</sub> GAAU <sub>OMe</sub> G <sub>OMe</sub> GAC <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> AAAAGAAAsG	885	-		
	2723	U <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> GGU <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> sC <sub>OMe</sub>	886			
4371	2714	GsU <sub>OMe</sub> GAAU <sub>OMe</sub> G <sub>OMe</sub> eAGACC <sub>OMe</sub> AAAAGAAAsG	887	+++		
	2722	UsACAC <sub>OMe</sub> UUAC <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> CU <sub>OMe</sub> GGU <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> sC	888			
4372	2715	GsU <sub>OMe</sub> GAAU <sub>OMe</sub> G <sub>OMe</sub> AGAC <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> AAAAGAAAsG	885	+++		
	2727	U <sub>F</sub> SAC <sub>F</sub> AC <sub>F</sub> U <sub>F</sub> U <sub>F</sub> AC <sub>F</sub> GU <sub>F</sub> C <sub>F</sub> U <sub>F</sub> GGU <sub>F</sub> U <sub>F</sub> C <sub>F</sub> SU <sub>F</sub>	889			
4373	2714	GsU <sub>OMe</sub> GAAU <sub>OMe</sub> G <sub>OMe</sub> AGACC <sub>OMe</sub> AAAAGAAAsG	887	++		
	2726	UsACAC <sub>F</sub> UUAC <sub>F</sub> GU <sub>F</sub> CU <sub>F</sub> GGU <sub>F</sub> U <sub>F</sub> U <sub>F</sub> sC	890			
<p>Los dúplex se muestran con la hebra sentido escrita de 5' a 3'. La hebra antisentido complementaria está escrita debajo de la hebra sentido en la dirección 3' a 5'. "d" en minúsculas indica un desoxinucleótido; todas las otras posiciones son ribo. "s" en minúsculas indica un enlace de fosforotioato. El subíndice "OMe" indica un azúcar 2-O-metilico, y el subíndice "F" indica un azúcar modificado con 2'-fluoro. El coeficiente de extinción es el valor a 260 nm (*10<sup>-3</sup>).</p>						

Tabla 7. Oligonucleótidos con modificaciones 2'-O-metílica y 2'-fluoro alternas que tienen como diana a VEGF (SEC ID NOs 891-908, respectivamente).

AL-DP-# progenitor	AL-DP-#	AL-SQ-#	Secuencia de los dúplex y modificaciones	Eficacia	Masa observada	OD/mg	Coefficiente de extinción
4060	4399	3082	G <sub>OMe</sub> S <sub>G</sub> F <sub>G</sub> O <sub>Me</sub> U <sub>F</sub> G <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> O <sub>Me</sub> A <sub>F</sub> G <sub>OMe</sub> A <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> C <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> U <sub>G</sub> O <sub>M</sub> , F <sub>S</sub> A <sub>OMe</sub>	-	6151,47	27,5	169
		3091	C <sub>OMe</sub> S <sub>C</sub> F <sub>OMe</sub> U <sub>F</sub> G <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> O <sub>Me</sub> A <sub>F</sub> C <sub>OMe</sub> A <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> C <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> U <sub>F</sub> C <sub>OMe</sub> C <sub>F</sub> S <sub>A</sub> O <sub>Me</sub> G <sub>F</sub> S <sub>G</sub> O <sub>Me</sub> G <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> C <sub>F</sub> C <sub>OMe</sub> A <sub>F</sub> C <sub>OMe</sub> C <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> A <sub>F</sub> G <sub>OMe</sub> A <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> G <sub>OMe</sub> S <sub>U</sub> F				
4015	4400	3083	G <sub>OMe</sub> S <sub>G</sub> F <sub>A</sub> O <sub>Me</sub> C <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> U <sub>F</sub> C <sub>OMe</sub> U <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> C <sub>F</sub> C <sub>OMe</sub> A <sub>F</sub> G <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> A <sub>F</sub> S <sub>C</sub> O <sub>Me</sub>	+	6238,49	29	186
		3092	C <sub>F</sub> S <sub>C</sub> O <sub>Me</sub> U <sub>F</sub> G <sub>OMe</sub> U <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> A <sub>F</sub> G <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> C <sub>F</sub> O <sub>Me</sub> U <sub>F</sub> C <sub>OMe</sub> A <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> S <sub>G</sub> F				
4032	4401	3084	U <sub>OMe</sub> S <sub>A</sub> F <sub>C</sub> O <sub>Me</sub> C <sub>F</sub> C <sub>OMe</sub> U <sub>F</sub> G <sub>OMe</sub> A <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> U <sub>F</sub> C <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> S <sub>U</sub> O <sub>Me</sub>	+++	6239,47	31,8	188
		3093	A <sub>F</sub> S <sub>U</sub> O <sub>Me</sub> G <sub>F</sub> G <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> C <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> A <sub>F</sub> C <sub>OMe</sub> U <sub>F</sub> C <sub>OMe</sub> U <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> C <sub>OMe</sub> U <sub>F</sub> C <sub>OMe</sub> S <sub>A</sub> F				
4033	4402	3085	A <sub>OMe</sub> S <sub>C</sub> F <sub>C</sub> O <sub>Me</sub> A <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> C <sub>OMe</sub> A <sub>F</sub> G <sub>OMe</sub> A <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> U <sub>F</sub> C <sub>F</sub> G <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> S <sub>A</sub> O <sub>Me</sub>	+	6262,54	30,7	194
		3094	U <sub>F</sub> S <sub>G</sub> O <sub>Me</sub> meG <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> A <sub>F</sub> C <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> C <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> A <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> U <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> C <sub>F</sub> G <sub>OMe</sub> C <sub>F</sub> C <sub>OMe</sub> S <sub>U</sub> F				
4014	4403	3086	G <sub>OMe</sub> S <sub>C</sub> F <sub>G</sub> O <sub>Me</sub> G <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> U <sub>F</sub> C <sub>OMe</sub> A <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> A <sub>F</sub> C <sub>OMe</sub> C <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> C <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> C <sub>F</sub> C <sub>OMe</sub> A <sub>F</sub> S <sub>A</sub> O <sub>Me</sub>	++	6204,65	26,4	190
		3095	C <sub>F</sub> S <sub>G</sub> O <sub>Me</sub> C <sub>F</sub> C <sub>OMe</sub> U <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> U <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> G <sub>OMe</sub> A <sub>F</sub> G <sub>OMe</sub> U <sub>F</sub> G <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> U <sub>s</sub> U <sub>F</sub>				
4094so	4404	3087	G <sub>OMe</sub> S <sub>C</sub> F <sub>A</sub> O <sub>Me</sub> C <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> U <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> G <sub>OMe</sub> A <sub>F</sub> G <sub>OMe</sub> A <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> S <sub>C</sub> O <sub>Me</sub>	+	6364,57	31,3	206
		3096	C <sub>F</sub> S <sub>G</sub> O <sub>Me</sub> U <sub>F</sub> G <sub>OMe</sub> U <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> U <sub>F</sub> C <sub>OMe</sub> C <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> C <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> A <sub>F</sub> C <sub>OMe</sub> S <sub>G</sub> F				
4061	4405	3088	C <sub>OMe</sub> S <sub>A</sub> F <sub>U</sub> C <sub>OMe</sub> A <sub>F</sub> G <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> U <sub>F</sub> G <sub>OMe</sub> A <sub>F</sub> G <sub>OMe</sub> C <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> U <sub>F</sub> S <sub>C</sub> O <sub>Me</sub>	+++	6302,59	32,8	198
		3097	G <sub>F</sub> S <sub>U</sub> O <sub>Me</sub> A <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> C <sub>F</sub> C <sub>OMe</sub> U <sub>F</sub> C <sub>OMe</sub> U <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> C <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> C <sub>F</sub> G <sub>OMe</sub> A <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> S <sub>G</sub> F				
4092	4406	3089	U <sub>OMe</sub> S <sub>G</sub> F <sub>U</sub> O <sub>Me</sub> G <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> A <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> C <sub>OMe</sub> A <sub>F</sub> G <sub>OMe</sub> A <sub>F</sub> C <sub>OMe</sub> C <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> A <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> S <sub>A</sub> O <sub>Me</sub>	++	6309,63	33,6	207
		3098	A <sub>F</sub> S <sub>C</sub> O <sub>Me</sub> A <sub>F</sub> C <sub>OMe</sub> U <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> A <sub>F</sub> C <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> C <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> G <sub>OMe</sub> U <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> U <sub>F</sub> C <sub>OMe</sub> S <sub>U</sub> F				
4004 so	4407	3090	G <sub>OMe</sub> S <sub>U</sub> F <sub>G</sub> O <sub>Me</sub> A <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> U <sub>F</sub> G <sub>OMe</sub> C <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> C <sub>F</sub> O <sub>Me</sub> A <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> A <sub>F</sub> G <sub>OMe</sub> A <sub>F</sub> S <sub>A</sub> O <sub>Me</sub>	+++	6332,67	30,5	213
		3099	C <sub>F</sub> S <sub>A</sub> O <sub>Me</sub> C <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> U <sub>F</sub> A <sub>OMe</sub> C <sub>F</sub> G <sub>OMe</sub> U <sub>F</sub> C <sub>OMe</sub> U <sub>F</sub> G <sub>OMe</sub> G <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> C <sub>F</sub> U <sub>OMe</sub> S <sub>U</sub> F				

Los dúplex se muestran con la hebra sentido escrita de 5' a 3'. La hebra antisentido complementaria está escrita debajo de la hebra sentido en la dirección 3' a 5'. "s" en minúsculas indica un enlace de fosforitoato. El subíndice "OMe" indica un azúcar 2'-O-metílico, y el subíndice "F" indica un azúcar modificado con 2-fluoro. Los dúplex progenitores tuvieron nucleótidos desapareados en uno o ambos extremos del dúplex. Estos dúplex tienen extremos romos. El coeficiente de extinción es el valor a 260 nm (\*10<sup>-3</sup>).

Tabla 8A-B. Conjugados a colesterol y a ácido colánico de secuencias de VEGF activas (monohebras) (SEC ID NOs 909-922, respectivamente).

AL-DP-# progenitor	AL-SQ #	Hebra	Secuencia y modificaciones	Masa calculada	Masa encontrada	Pureza	OD
4014	2363	sentido	GsCsGGAUCAAACCUC <sub>OMe</sub> ACC <sub>OMe</sub> AsAdTsdTs-Chol	7466,5	7463,8	98,2	
4014	2697	sentido	Chol-sGsCGGAUC <sub>OMe</sub> AA ACCUC <sub>OMe</sub> ACC <sub>OMe</sub> AadTsdT	7232,3	7430,3	98,0	
4014	2698	sentido	Chol-sGsCGGAUC <sub>OMe</sub> AAACCUC <sub>OMe</sub> ACC <sub>OMe</sub> AadTsdT	7446,3	7444,3	91,0	
4014	2699	sentido	GsCGGAUC <sub>OMe</sub> ACCUC <sub>OMe</sub> ACC <sub>OMe</sub> AadTs-Chol	7265,7	7265,7	98,0	
4060	4940	sentido	Chol-C <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> GGU <sub>OMe</sub> GGAC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> AdTsdT			100	550
4060	2641	sentido	Chol-sC <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> GGU <sub>OMe</sub> GGAC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> AdTsdT			100	583
4033	4935	sentido	Chol-A <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> AGAU <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> GGAdTsdT			100	562
4033	4941	sentido	Chol-sA <sub>OMe</sub> CC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> AGAU <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> GGAdTsdT			100	480
4061	4936	sentido	Chol-C <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGC <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> dTsdT			100	532
4061	4942	sentido	Chol-sC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGC <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> dTsdT			98,2	514
4094	2965	sentido	Chol-GC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGC <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> sU <sub>OMe</sub>	7205,7	7205,4	89,0	
4014	2701	sentido	GsCGGAUC <sub>OMe</sub> AAAACCUC <sub>OMe</sub> ACC <sub>OMe</sub> AAAdTs-Colánico	7219,8	7219,4	88,2	
4014	2702	sentido	GsCGGAUC <sub>OMe</sub> AAAACCUC <sub>OMe</sub> ACC <sub>OMe</sub> AAAdTs-Colánico	7276,3	7274,9	71,3	
4014	2696	antisentido	Us <sup>5Me</sup> -U <sub>F</sub> -GG <sup>5Me</sup> -U <sub>F</sub> -GAGGU <sup>5Me</sup> -U <sub>F</sub> -GAUCCCGCAdTs-Colánico				

Las hebras se muestran escritas 5' a 3'. "s" en minúsculas indica un enlace de fosforotioato. La "d" en minúsculas indica un resto desoxi. El subíndice "OMe" indica un azúcar 2'-O-metilico. El subíndice "F" indica un 2'-fluoro. "Chol-" indica un conjugado de hidroxiprolinol colesterol. "Colánico" indica un conjugado de ácido colánico. "5Me" indica una 5-metil-uridina.

Tabla 8B

AL-DP-# progenitor	AL-DP-#	AL-SQ-#	Hebra	Secuencia y modificaciones	SEC ID n°	Eficacia	Masa calculada	Masa encontrada	Pureza
4014	4206	2363	sentido	GsCSGGAUCAAACCUC <sub>OMe</sub> ACC <sub>OMe</sub> AsAdTsTs-Chol	909	+	7466,5	7463,8	98,2
		2381	as	UsUGGUGAGGUUUUGAUCCGGdTsdt	923				
4014	4351	2697	sentido	Chol-sGsCGGAUC <sub>OMe</sub> AA ACCUC <sub>OMe</sub> ACC <sub>OMe</sub> AAdTsdt	910	-	7232,3	7430,3	98,0
		4180	as	UUGGUGAGGUUUUGAUCCGGCTT	924				
4014	4352	2698	sentido	Chol-sGsCGGAUC <sub>OMe</sub> AAACCUC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> CoMeAAAdTsdt	911	-	446,3	7444,3	91,0
		4180	as	UUGGUGAGGUUUUGAUCCGGCTT	924				
4014	4353	2699	sentido	GsCGGAUC <sub>OMe</sub> AAACCUC <sub>OMe</sub> ACC <sub>OMe</sub> AAAdTs-Chol	912	++	7265,7	7265,7	98,0
		4180		UUGGUGAGGUUUUGAUCCGGCTT	924				
4094	4381	2965	sentido	Chol-GC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGC <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> SU <sub>OMe</sub>	919	++	7205,7	7205,4	89,0
		2945	as	AAGfcUfCAfUfCfUfCfUfUfUfUGfUGsCfUsG	925				
4014	4209	2701	sentido	GsCGGAUC <sub>OMe</sub> AAACCUC <sub>OMe</sub> ACC <sub>OMe</sub> AAAdTs-Colánico	926	++	7219,8	7219,4	88,2
		2381	as	UsUGGUGAGGUUUUGAUCCGGdTsdt	927				
4014	4210	2702	sentido	GsCGGAUC <sub>OMe</sub> AAACCUC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> CoMeAAAdTs-Colánico	928	++	7276,3	7274,9	71,3
		2381	as	UsUGGUGAGGUUUUGAUCCGGdTsdt	923				
4014	4357	4112	sentido	GCGGAUCAAAACCUCACCCAATT	929	+++			
		2696	antisentido	Us <sup>SMe</sup> -Uf-GG <sup>SMe</sup> -Uf-GAGGU <sup>SMe</sup> -Uf <sup>SMe</sup> -Uf-GAUCCGGCdTs-Colánico	922				
4094	4390	2949	ss	Chol-G <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> UAGGAGAGA <sub>OMe</sub> UGAGC <sub>OMe</sub> UsU	930	+++			
		2945	as	AAGfcUfCAfUfCfUfCfUfUfUfUGfUGfCfUsG	925				
4094	4391	2950	ss	G <sub>OMe</sub> SCA <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> UAGGAGAGA <sub>OMe</sub> UGAGC <sub>OMe</sub> UU-Chol	931	+++			
		2945	as	AAGfcUfCAfUfCfUfCfUfUfUfUGfUGfCfUsG	925				
4094	4392	2951	ss	Tio-Chol-G <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> CA <sub>OMe</sub> UAGGAGAGA <sub>OMe</sub> UGAGC <sub>OMe</sub> UsU	932	+++			
		2945	as	AAGfcUfCAfUfCfUfCfUfUfUfUGfUGfCfUsG	925				





Tabla 9. Conjugados a naproxeno de secuencia de VEGF activa.

AL-DP-# progenitor	AL-DP-#	AL-SQ #	Secuencia y modificaciones	Eficacia	Masa calculada	Masa encontrada	Pureza
4014	4355	2694 as	Us <sup>5Me</sup> U <sub>F</sub> -GG <sup>5Me</sup> U <sub>F</sub> -GAGGU <sup>5Me</sup> U <sub>F</sub> <sup>5Me</sup> U <sub>F</sub> -GAUCCCGCdTsdTs-Naproxeno (SEC ID n°:935)	+++	7269,4	7270,7	80,1
		4112 ss	GCGGAUCAAAACCCUACCAATT (SEC ID n°:929)				

La hebra antisentido del dúplex se muestra escrita 5' a 3'. "s" en minúsculas indica un enlace de fosforitoato. La "d" en minúsculas indica un desoxi. El subíndice "F" indica un azúcar modificado con 2'-fluoro. "5MeU" indica una 5-metil-uridina. "Naproxeno" indica un naproxeno conjugado al oligonucleótido mediante un enlazador de serinol.

Tabla 10. Conjugado a biotina de oligonucleótidos activos que tienen como diana a VEGF.

AL-DP-# progenitor	AL-DP-#	AL-SQ-#	Hebra	Secuencia y modificaciones	Eficacia	Masa calc.	Masa Exp.	Pureza
4014	4356	4112	sentido	5 GCGGAUCAAAACCUCACCAATT 3 (SEC ID n°:929)	+++			
		2695	antisentido	Us <sup>5Me</sup> U <sub>F</sub> GG <sup>5Me</sup> U <sub>F</sub> GAGGU <sup>5Me</sup> U <sub>F</sub> GAUCCGGCdTsdTs-Biotina (SEC ID n°:936)		7285,4	7284,3	70,2
4220		3071	sentido	AsAGCUC <sub>OMe</sub> AUCUCUC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> GC <sub>OMe</sub> U <sub>OMe</sub> S <sub>OMe</sub> Gs-Biotina (SEC ID n°:937)	Usado para ELISA	7872,1	7871,89	82,02

Los oligonucleótidos están escritos 5' a 3'. "s" en minúsculas indica un enlace de fosforotioato. La "d" en minúsculas indica un desoxi. El subíndice "OMe" indica un azúcar 2'-O-metilico, y el subíndice "F" indica un azúcar modificado con 2'-fluoro. "5MeU" indica una 5-metil-uridina.

Tabla 11a-b. Conjugación de aldehídos, retinal y otros retinoides a los siRNAs de VEGF y oligonucleótidos modelo.

Secuencia ID	Secuencia*	Masa calc.	Masa encontrada	CGE (%)
AL-3174	Q25-dTdTdTdTdTdT dTdTdTdTdTdT	3767,22	3769,09	A
AL-3175	Q26-dTdTdTdTdTdT dTdTdTdTdTdT	3980,07	3981,37	A
AL-3176	Q27-dTdTdTdTdTdT dTdTdTdTdTdT	4034,24	4035,56	A
AL-4326	GCACAUAGGAGAGAUGAGCUU (SEC ID n°:608)	6799,22	6798,88	A
AL-3177	Q25-GCACAUAGGAGAGAUGAGCUU (SEC ID n°:938)		B	A
AL-3178	Q27-GCACAUAGGAGAGAUGAGCUU (SEC ID n°:941)	7246,66	7246,53	97% <sup>c</sup>
AL-3166	GCACAUAGGAGAGAUGAGCU <sub>s</sub> U (SEC ID n°:671)	6815,16	6815,10	A
AL-3184	Q25-GCACAUAGGAGAGAUGAGCU <sub>s</sub> U (SEC ID n°: 996)	6995,16	B	A
AL-3185	Q27-GCACAUAG GAGAGAUGAG CUsU (SEC ID n°: 1066)	7261,6	7262,47	97,8 <sup>c</sup>
AL-3193	Q28-GCACAUAGGAGAGAUGAGCU <sub>s</sub> U (SEC ID n°:1067)	7277,61	E	F
AL-3211	GAACUGUGUGUGAGAGGUCC <sub>s</sub> U (SEC ID n°:940)	6785,10	B	A
AL-3212	Q25-GAACUGUGUGUGAGAGGUCC <sub>s</sub> U (SEC ID n°: 1068)	6965,10	G	G
AL-3213	Q27-GAACUGUGUGUGAGAGGUCC <sub>s</sub> U (SEC ID n°: 1069)	7231,54	G	G
AL-3214	Q26-GAACUGUGUGUGAGAGGUCC <sub>s</sub> U (SEC ID n°: 1070)	7177,37	G	G

Tabla 11. b

AL-DP-#	AL-SQ-#	Secuencia 5'-3'	Comentarios
AL-DP-4410	AL3178	Q27-GCACAUAGGAGAGAUGAGCUU (SEC ID n°:941)	5'Retinal 4094
	AL4327	AAGCUCAUCUCUCCUAUGUGCUG (SEC ID n°:609)	
AL-DP-4413	AL3185	Q27-GCACAUAGGAGAGAUGAGCU <sub>s</sub> U (SEC ID n°:1066)	5'Retinal, 3'PS 4094
	AL3167	AAGCUCAUCUCUCCUAUGUGCU <sub>s</sub> G (SEC ID n°:942)	
<p>Q25 = enlazador de aminooxi                      Q26 = 1-pireno-carboxaldehído-aminooxi&gt;                      Q27 = todo-<i>trans</i> -retinal-aminooxi                      Q28 = 4-ceto-retinol</p> <p>(A) Estas muestras no se purificaron, y de este modo no se analizaron mediante CGE.                      (B) Estas muestras no se analizaron como se usaron en la reacción de conjugación en la siguiente etapa.                      (C) Hubo dos isómeros (E y Z), y mientras que se observaron dos picos en la CGE, sólo se observó un pico en la LC/MS con una sola masa. Por lo tanto, el % de CGE es el area de los dos picos en la CGE añadidas juntas.                      (D) En la mezcla bruta sólo había un poco del producto deseado.                      (E) Se observaron dos picos en la LC/MS, con masas de 7276,42 y 7277,72. Las masas se pueden explicar mediante la oxidación fácil de retinal a retinal.                      (F) Los dos productos principales tienen 33% y 67% mediante CGE.                      (G) A determinar.</p>			

Tabla 12. Conjugados a polietilenglicol de secuencias de VEGF activas y conjugados de control.

AL-DP-# progenitor	AL-SQ #	Hebra	Secuencia y modificaciones	MW esperado	MW observado <sup>2</sup>	Tiempo de retención de HPLC	Cantidad de partida	% de rendimiento
4094	3194	VEGF sentido	GCACAUAGGAGAGAGACGUUs-HP-N H2 (SEC ID n°: 943)	7107,46	7107,2	37,497	466,67 mg	25,9
4094	3195	VEGF sentido	GCACAU AGG AGAGAUGACGU Us-HP-NH2-20KPEG (SEC ID n°:1071)	27213,19	28333,51-29614,44	31,283	50 mg	33,8
5167	3164	control	GsUCAUCACACUCUGAAUACCAAU-HP-NH2 (SEC ID n°: 944)	6932,33	6932,15	19,733	491,4 mg	34,7
5167	3170	control	GsUCAUCACACUCUGAAUACCAAU-HP-NH2-5KPEG (SEC ID n°:1072)	11746,19	11000-13000	16,822	50 mg	38,4
5167	3171	control	GsUCAUCACACUCUGAAUACCAAU-HP-NH2-20KPEG (SEC ID n°:1073)	26746,19	27456-29524	16,164	50 mg	39,2
1000	2936	control	NH2-HP-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTsdT (SEC ID n°:945)	6915,3	6915,01	20,506		
1000	3187	control	5KPEG-NH2-HP-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTsdT (SEC ID n°:1074)	12021,46	11847-13256	17,829	50 mg	39,2
1000	3188	control	20KPEG-NH2-HP-CUUACGCUGAGUACUUCGAdTsdT (SEC ID n°:1075)	27021,46	27440-29289	16,921	50 mg	33,6
1000	2937	control	CsUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT-HP-NH2 (SEC ID n°:946)	6915,3	6915,06	20,537		
1000	3172	control	CsUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT-HP-NH2-5KPEG (SEC ID n°:1076)	12021,46	12300-13034	17,578	50 mg	48,0
1000	3173	control	CsUUACGCUGAGUACUUCGAdTdT-HP-NH2-20KPEG (SEC ID n°:1077)	27021,46	27000-29000	17,087	50 mg	52,0

Las hebras se muestran escritas 5' a 3'. "s" en minúsculas indica un enlace de fosforitoato. La "d" en minúsculas indica un resto desoxi. "HP-NH2" o "NH2-HP" indica un conjugado de hidroxiprolinol amina usado como control. "HP-NH2-20KPEG" o "20KPEG-NH2-HP" indica conjugación a polietilenglicol (20K) a través del enlazador de hidroxiprolinol. "HP-NH2-5KPEG" o "5KPEG-NH2-HP" indica conjugación a polietilenglicol (5K) a través del enlazador de hidroxiprolinol. El control en esta columna indica que el oligonucleótido no es complementario a VEGF. Los oligonucleótidos 3164, 3170, y 3171 tienen como diana a ApoB, y los oligonucleótidos 2936, 3187, 3188, 2937, 3172, y 3173 tienen como diana a luciferasa.

<sup>2</sup> El intervalo observado en el peso molecular es debido a la polidispersidad del material de partida de PEG.

ES 2 423 060 T3

Tabla 13. Oligonucleótidos que tienen como diana a VEGF con la modificación ribo-difluorotolúlica.

AL-DP-# progenitor	AL-DP-#	AL-SQ-#	SEC ID N <sup>os</sup>	Secuencia de los dúplex y modificaciones	Tipo	Eficacia <i>in vitro</i>	T <sub>m</sub> (°C)
4014	4014	4112	806	GCGGAUCAAACCUCACCAAdTdT	Control	+++	80
		4180	807	dTdTCGCCUAGUUUGGAGUGGUU			
4014		4112	806	GCGGAUCAAACCUCACCAAdTdT	Desemparejamiento antisentido	+	75
		2957	947	dTdTCGCCUAGUUAGGAGUGGUU			
4014		4112	806	GCGGAUCAAACCUCACCAAdTdT	Desemparejamiento antisentido	+	75
		2958	948	dTdTCGCCUAGUUUGGAGUGGUU			
4014		4112	806	GCGGAUCAAACCUCACCAAdTdT	Desemparejamiento antisentido	++	75
		2959	949	dTdTCGCCUAGUUCGGAGUGGUU			
4014	4347	4112	806	GCGGAUCAAACCUCACCAAdTdT	Difluorotoluido	++	76
		2472	950	dTdTCGCCUAGUUFGGAGUGGUU			
4014	4348	4112	806	GCGGAUCAAACCUCACCAAdTdT	Difluorotoluido	++	
		2473	951	dTdTCGCCUAGUFUGGAGUGGUU			
4014.	4349	4112	806	GCGGAUCAAACCUCACCAAdTdT	Difluorotoluido	++	
		2474	952	dTdTCGCCUAGFUGGAGUGGUU			
4014	4350	4112	806	GCGGAUCAAACCUCACCAAdTdT	Difluorotoluido	+	70
		2475	953	dTdTCGCCUAGFFFGGAGUGGUU			
4014		2953	954	GCGGAUCAAGCCUCACCAAdTdT	Desemparejamiento sentido		77
		4180	807	dTdTCGCCUAGUUUGGAGUGGUU			
4014		2954	955	GCGGAUCAACCCUCACCAAdTdT	Desemparejamiento sentido		73
		4180	807	dTdTCGCCUAGUUUGGAGUGGUU			
4014		2955	956	GCGGAUCAUCCUCACCAAdTdT	Desemparejamiento sentido		73
		4180	807	dTdTCGCCUAGUUUGGAGUGGUU			

Los duplex se muestran con la hebra sentido escrita 5' a 3'. La hebra antisentido complementaria está escrita 3' a 5'. "d" en minúsculas indica a desoxinucleótido; todas las otras posiciones son ribo. "s" en minúsculas indica un enlace de fosforotioato. "F" indicades unaa modificación ribo-difluorotolúlica. Las posiciones alteradas con respecto al duplex de control se indicant en negrita.

Tabla 14. Oligonucleótidos con 2'-arrafuoro-2'-desoxi-nucleósidos que tiene como diana a VEGF.

AL-DP-# progenitor	AL-DP #	AL-SQ-#	Hebra	Secuencia y modificaciones	Eficacia	Masa esperada	Masa observada	Pureza mediante HPLC
4014	4342	2478	antisentido	UT <sub>araF</sub> GGT <sub>araF</sub> GAGGUU <sub>araF</sub> T <sub>araF</sub> GAUCCCGCdTdT (SEC ID n°:957)	++	6728,02	6727,25	92,82
		4112	sentido	GCGGAUCAAAACCUCACCAATT (SEC ID n°: 929)				
4014	4343	2479	antisentido	UT <sub>araF</sub> GGT <sub>araF</sub> GAGGUU <sub>araF</sub> T <sub>araF</sub> GAUCCCGCdTdT (SEC ID n°:958)	+++	6744,04	6743,22	91,97
		4112	sentido	G CG G AU CAAACCU CACCAATT (SEC ID n°: 929)				
4014	4344	2480	antisentido	UU <sub>araF</sub> GGU <sub>araF</sub> GAGGUU <sub>araF</sub> T <sub>araF</sub> GAUCCCGCdTdT (SEC ID n°:959)	++	6685,94	6685,13	94,83
		4112	sentido	G CG G AU CAAACCU CACCAATT (SEC ID n°: 929)				
4014	4345	2481	antisentido	UU <sub>araF</sub> GGU <sub>araF</sub> GAGGUU <sub>araF</sub> T <sub>araF</sub> GAUCCCGCdTdT (SEC ID n°:960)	+++	6687,93	6687,11	91,97
		4112	sentido	G CG G AU CAAACCU CACCAATT (SEC ID n°: 929)				
4014	4346	2814	sentido	GCGGAUC <sub>Caraf</sub> AAACCUC <sub>Caraf</sub> AC <sub>Caraf</sub> AAAdTdT (SEC ID n°:961)	+++	6699,14	6698,42	97,60
		4180	antisentido	UUGGUGAGGUUUUGAUCCCGCTT (SEC ID n°:924)				

Las secuencias se muestran escritas 5' a 3'. "c" en minúsculas indica un desoxinucleótido. "U<sub>araF</sub>" indica una 2'-arrafuoro-2'-desoxi-uridina, "T<sub>araF</sub>" indica una 2'-arrafuoro-2'-desoxi-timidina, y "C<sub>Caraf</sub>" indica una 2'-arrafuoro-2'-desoxi-citidina.

Tabla 15. RNAs de VEGF modificados con metilfosfonato.

AL-DP-# progenitor	AL-SQ #	Hebra	Secuencia y modificaciones	Masa calculada	Masa encontrada	Pureza
4014	2501	sentido	GsCsGGAUC <sub>mp</sub> AA ACCUC <sub>mp</sub> A CcmpAsAsdTsdT (SEC ID n°:962)	6712,50		
4014	2502	antisentido	UsU <sub>mp</sub> sGGUGAGGUU <sub>mp</sub> UGAUCCGsCsdTsdT (SEC ID n°:963)	6758,97	6766,1	
4014	2503	antisentido	USU <sub>mp</sub> SGGU <sub>mp</sub> GAGGUU <sub>mp</sub> GAUCCGsCsdTsdT(SEC ID n°:964)	6756,44	6743,99	

Los oligonucleótidos se muestran escritos 5' a 3'. "s" en minúsculas indica un enlace de fosforitoato. El subíndice "mp" indica un enlace de metilfosfonato. "d" en minúsculas indica un desoxinucleótido.

Tabla 16. RNAs de VEGF modificados con C-5Allilamino.

AL-DP-# progenitor	AL-SQ #	Hebra	Secuencia y modificaciones	Masa calculada	Masa encontrada	Pureza
4014	2504	antisentido	UsU <sub>aa</sub> sG GU <sub>aa</sub> GAGGUUU <sub>aa</sub> GAUCCGgCsdTsdT (SEC ID n°:965)	6925,38	6924,9	92,4
4014	2505	antisentido	USU <sub>aa</sub> sGGU <sub>aa</sub> GAGGUUU <sub>aa</sub> U <sub>aa</sub> GAUCCGgCsdTsdT (SEC ID n°:966)	6980,40	6979,8	90,0

Los oligonucleótidos se muestran escritos 5' a 3'. "s" en minúsculas indica un enlace de fosforitoato. El subíndice "aa" indica una modificación allilamino. "d" en minúsculas indica un desoxinucleótido.



Tabla 17. Modificaciones varias a RNA de VEGF (monohebras).

AL-DP-# progenitor	AL-SQ #	Hebra	SEC ID n°s	Secuencia y modificaciones	Masa calculada	Masa encontrada	Pureza
4107	2192	sentido	967	GsCACAUAGGAGAGAUAGAGCsdTsdT	6843,36	6842,6	84,0
4107	2193	antisentido	968	GsCUCAUCUCUCC'UAUGUGCsdTsdT	6584,3	6584,1	80,0
4107	2194	sentido	969	GsCsACAUAGGAGAGAUAGAGsCsdTsdT	6875,0	6874,2	88,7
4107	2196	antisentido	970	GsCACAUAGGAGAGAUAGAGCsdTsdT	6875,5	6874,0	88,7
4014	2281	desemparejamiento sentido	971	GsCsGGAAACAUAUCCUGACCAsAsdTsdT	6755,4	6753,9	82,9
4014	2282	desemparejamiento antisentido	972	UsUsGGUCAGGAUUGUUCCGsCsdTsdT	6720,0	6719,9	96,7
4014	2299	desemparejamiento sentido	973	GCGGAACAUAUCCUGACCAATT	6675,0	6673,8	85,9
4014	2300	desemparejamiento antisentido	974	UUGGUCAGGAUUGUUCGGCTT	6639,9	6638,5	86,5
4014	2200	sentido	975	GsCsGGAUCAAACCCUCACCAsAsdTsdT	6715,4	6714,3	86,0
4014	2201	antisentido	976	UsUsGGUGAGGUUUGAUCCCGsCsdTsdT	6760,3	6759,6	91,2
4014	2202	sentido	977	GsCGGAUCAAAACCUCACCAAsdTsdT	6683,2	6682,3	95,7
4014	2203	antisentido	978	UsUGGUGAGGUUUGAUCCCGCsdTsdT	6728,1	6727,3	87,6
4351	2206	sentido	979	UUCUUUGGUCUGCAUUCAC	5913,4	5912,3	98,0
4359	2207	sentido	980	UsUGGUGAGGUUUGAUCCCGsCsdTsdT	6760,3	6759,05	92,0
4014	2210	sentido	981	GsCsGGAUCAAACCCUCsACCsAsAsdTsdT	6747,5	6746,6	82,7
4014	2212	sentido	982	GsCsUCAUCUCUCCUsAUGUGsCsdTsdT	6616,3	6614,8	78,9
4014	2323	sentido	983	GsCsGGAUCAAACCCU <sub>OMe</sub> ACC <sub>OMe</sub> AsAsdTsdT	6743,4	6742,3	90,0
4014	2324	sentido	984	GsCsGGAUCAAACCCU <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> AsAsdTsdT	6771,5	6770,4	86,8
4014	2325	sentido	985	GsCsGGAUCAAACCCU <sub>OMe</sub> sACC <sub>OMe</sub> SAsAsdTsdT	6775,5	6774,6	87,6

AL-DP-# progenitor	AL-SQ-#	Hebra	SEC ID n <sup>o</sup> s	Secuencia y modificaciones	Masa calculada	Masa encontrada	Pureza
4014	2499	sentido	986	GsCsGGAUC <sub>OMe</sub> AAACCUC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> AsAsdTsdT	6771	6771,1	84,8
4014	2500	sentido	987	GsCsGGAUdCAAAACCUdCAAdCdCAsAsdTsdT	6651,4	6650,6	82,6
4014	2506	antisentido	988	Us <sup>5Me</sup> UFsGG <sup>5Me</sup> UFGAGGUU <sup>5Me</sup> UF <sub>F</sub> GAUCCGsCsdTsdT	6808,4	6808	82,0
4014	2507	antisentido	989	UsUFsGG <sup>5Me</sup> UF <sub>F</sub> GAGGU <sup>5Me</sup> UF <sup>5Me</sup> UF <sub>F</sub> GAUCCCGsCsdTsdT	6824,3	6823,3	80,2
4014	2508	antisentido	990	Us <sup>5Me</sup> UFsGG <sup>5Me</sup> UF <sub>F</sub> GAGG <sup>5Me</sup> UF <sup>5Me</sup> UF <sub>F</sub> UGAUCCCGsCsdTsdT	6824,3	6823,4	84,3
4014	2509	antisentido	991	UsU <sub>OMe</sub> sGGU <sub>OMe</sub> GAGGU <sup>5Me</sup> UF <sup>5Me</sup> UF <sub>F</sub> GAUCCCGsCsdTsdT	6820,3	6822,0	85,0
4220	2780	antisentido	992	GSC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCU <sub>OMe</sub> sU	6901,38	6900,77	89,29
4060 <sup>1</sup>	2808	sentido	993	AsGsCsUsUsAsAsCsCsUsGsUsCsCsUsCsAsA	6230,57		
4060 <sup>1</sup>	2809	antisentido	994	UsUsGsAsAsGsGsAsCsAsGsGsUsUsAsAsGsCsU	6413,73		

Los oligonucleótidos se muestran escritos 5' a 3'. "s" en minúsculas indica un enlace de fosforotioato. "d" en minúsculas indica un desoxi. El subíndice "ome" indica un azúcar modificado con 2'-O-metilo. El subíndice "F" indica un 2'-fluoro. "<sup>5Me</sup>U" indica una 5-metil uridina.

<sup>1</sup> El duplex progenitor tiene salientes de dT. El dúplex modificado con fosforotioato tiene extremos romos.

Tabla 18. Características físicas de los compuestos de VEGF derivados de los dúplex 4094, 4060, 4033, 4061, 4004, 4014, 4107 y 4003

Dúplex progenitor	AL-SQ-#	SEC ID nº	Hebras sentido	Hebras antisentido	Modificaciones	Masa calc.	Masa obs.
AL-DP-4094	4326	608	5'-GCACAUAGGAGAGAGAGCUU-3'	5'-GCACAUAGGAGAGAGAGCUU-3'		6670,1	6670,0
	4327	609	3'-GUCCGUGAUGGUCUCUACUCGAA-5'			7220,3	7220,0
	Sec. modif.				Modificaciones		
	4554	997	5'-G'CACAUAGGAGAGAGAGCUU-3'	5'-G'CACAUAGGAGAGAGAGCUU-3'	2PS	6830.3	6830,0
	4557	998	5'-A'AGCUCAUCUCUCCUAUGUGCU'G-3'	5'-A'AGCUCAUCUCUCCUAUGUGCU'G-3'	2PS	7252.4	7252,0
	4555	999	5'-G*CACAuAGGAGAGAGAGCU*U-3'	5'-G*CACAuAGGAGAGAGAGCU*U-3'	2xPS; 1xOMe	6844.3	6844,0
	4558	1000	5'-A*AGCUCAUCUCUCCUAUGUGcu*G-3'	5'-A*AGCUCAUCUCUCCUAUGUGcu*G-3'	2PS, 2xOMe	7280.4	7280,0
	4556	1001	5'-GcAcAuAGGAGAGAGAGCU*U-3'	5'-GcAcAuAGGAGAGAGAGCU*U-3'	1xPS; SxOMe	6884.3	6884,0
	4559	1002	5'-A*AGCUCAUCUCUCCUAUGUgcu*G-3	5'-A*AGCUCAUCUCUCCUAUGUgcu*G-3	2xPS, 3xOMe	7294.4	7293,0
	4563	1003	5'-G(dC)A(dC)AuAGGAGAGAGAGCU*U-3'	5'-G(dC)A(dC)AuAGGAGAGAGAGCU*U-3'	1xPS, 3xOMe, 2xdC	6824.3	6824,0
	4560	1004	5'-AAGCUcAUCUCUCCUAUGuGcu*G-3'	5'-AAGCUcAUCUCUCCUAUGuGcu*G-3'	1xPS, 5xOMe	7306.4	7306,0
	4564	1005	5'-G-CACAU <sub>2,F</sub> AGGAGAGAGAGCU*U-3'	5'-G-CACAU <sub>2,F</sub> AGGAGAGAGAGCU*U-3'	2xPS; 1x2F	6832.2	6831,0
	4561	1006	5'-AAGCUcAUCUCUCCUAUGuGcu*G-3'	5'-AAGCUcAUCUCUCCUAUGuGcu*G-3'	1xPS, 6xOMe	7320,4	7320,0
	4565	1007	5'-GC <sub>2F</sub> AC <sub>2F</sub> AU <sub>2F</sub> AGGAGAGAU <sub>2F</sub> GAGCU <sub>2F</sub> *U-3*	5'-GC <sub>2F</sub> AC <sub>2F</sub> AU <sub>2F</sub> AGGAGAGAU <sub>2F</sub> GAGCU <sub>2F</sub> *U-3*	1xPS; 5x2F	6824.3	6823,0
	4562	1008	5'-AAGCU(dC)AUCUCUCCUAUGuG(dC)u*G-3'	5'-AAGCU(dC)AUCUCUCCUAUGuG(dC)u*G-3'	1xPS, 4xOMe, 2xdC	7260.4	7260,0
	4566	1009	5'-GC <sub>2F</sub> AC <sub>2F</sub> AuAGGAGAGAGAGCU*U-3'	5'-GC <sub>2F</sub> AC <sub>2F</sub> AuAGGAGAGAGAGCU*U-3'	1xPS, 3xOMe, 2x2F	6860.3	6859,0
	4568	1010	5'-AAGCUC <sub>2F</sub> AUCUCUCCU <sub>2F</sub> AU <sub>2F</sub> GU <sub>2F</sub> GCU <sub>2F</sub> <sup>4</sup> G-3'	5'-AAGCUC <sub>2F</sub> AUCUCUCCU <sub>2F</sub> AU <sub>2F</sub> GU <sub>2F</sub> GCU <sub>2F</sub> <sup>4</sup> G-3'	1xPS, 5x2F	7246.4	7244,0
	4567	1011	5'-GcAcAU <sub>2F</sub> AGGAGAGAU <sub>2F</sub> GAGCU <sub>2F</sub> *U-3'	5'-GcAcAU <sub>2F</sub> AGGAGAGAU <sub>2F</sub> GAGCU <sub>2F</sub> *U-3'	1xPS, 2xOMe, 3x2F	6848.3	6847,0
	4569	1012	5'-AAGCUcAUCUCUCCU <sub>2F</sub> AU <sub>2F</sub> GU <sub>2F</sub> GCU <sub>2F</sub> *G-3'	5'-AAGCUcAUCUCUCCU <sub>2F</sub> AU <sub>2F</sub> GU <sub>2F</sub> GCU <sub>2F</sub> *G-3'	1xPS, 1xOMe, 4x2F	7258.4	tbd
	4567	1013	5'-GcAcAU <sub>2F</sub> AGGAGAGAU <sub>2F</sub> GAGCU <sub>2F</sub> *U-3'	5'-GcAcAU <sub>2F</sub> AGGAGAGAU <sub>2F</sub> GAGCU <sub>2F</sub> *U-3'	1xPS, 2xOMe, 3x2F	6848.3	6847,0
	4570	1014	5'-AAGCUC <sub>2F</sub> AUCUCUCCUAUGuGcu*G-3'	5'-AAGCUC <sub>2F</sub> AUCUCUCCUAUGuGcu*G-3'	1xPS, 4xOMe, 1x2F	7294.4	7292,0



	Sec. modif.				Modificaciones	
	2596	1032	5'-CAUAGGAGAGAGAUAGGcuucT*T		1xPS, 2' <sup>OMe</sup> @allPy	6846,3
	2657	1033	3'-TTGuAuccucucuACucGAAG-5'		1xPS, 2'F@Py	6604,1
	4936	1034	5'-(Chol)CAUAGGAGAGAGAUAGGcuucT*T		1xPS, 2' <sup>OMe</sup> @Py,	Tbd
	2657	1035	3'-TTGuAuccucucuACucGAAG-5'		5'Chol 1xPS, 2'F@Py	6604,1
	4937	1079	5'-(Chol)*CAUAGGAGAGAGAUAGGcuucT*T		2xPS, 2' <sup>OMe</sup> @Py,	7567,2
	2657	1035	3'-TTGuAuccucucuACucGAAG-5'		5'Chol 1xPS, 2'F@Py	6604,1
AL-DP-4331	2626	1036	5'-cAUAGGAGAGAGAUAGGCUUCU*T-3'		1xPS, 3x 2' <sup>OMe</sup>	6790,3
	2627	1037	3'-T*TGUAUCCUCUCUAcUCGAAG-5'		1xPS, 3x 2' <sup>OMe</sup>	6624,1
AL-DP-4004	4338	1038	5'-GUGAAUGCAGACACCAAAGAAAG-3'			tbd
	4339	1039	3'-UACACUUACGUCUGGUUUUUUUUC-5'			
	Sec. modif.				Modificaciones	
	4350	1040	5'-GUGAAUGCAGACACCAAAGAA-3'		romo	6153,8
	4351	1041	5'-UUCUUUGGUCUGCAUUCAC-3'		romo	5912,5
	4338	1038	5'-GUGAAUGCAGACACCAAAGAAAG3'		romo	6829,3
	4344	1042	5'-CUUUUUUGGUCUGCAUUCAC-3'		romo	6523,9
AL-DP-4371	2714	1043	5'-GuGAAUGcAGACcAAAAGAAA*G-3'		1xPS, 4x 2' <sup>OMe</sup>	6900,4
	2722	1044	3'-U*ACAcUUAcGuCUGGUUUUUUUUC-5'		1xPS, 4x2' <sup>OMe</sup>	7231,3
AL-DP-4014	4112	806	5'-GCGGAUCAAAACCCUACCAATT-3'			6634,1
	4180	807	3'-TTGCCUAGUUUGGAGUGGUU-5'			6679,1
	Sec. modif.				Modificaciones	
	4318	1045	5'-GCGGAUCAAAACCCUACCAAGG-3'		romo	6717,2
	4342	1046	5'-CCUUGGUGAGGUUUUGAUCCCGC-3'		romo	6681,0

	4346	1047	5'-GCCGAUCAAACCUCACCAA-3'	romo	6025,7	6026,5
	4347	1048	5'-UUGGUGAGGUUUGAUCCCGC-3'	romo	6070,6	6071,3
AL-DP-4127	4358	1049	5'-G*C*GGAUCAAACCUCACCA*A*T*T-3*	(2+3)PS	6714,4	6714,8
	2201	1050	3'-T*T*C*GCCUAGUUUGGAGUGG*U*U-5'	(2+3)PS	6759,3	lbd
AL-DP-4107	4117	1051	5'-GCACAUAGGAGAGAGAGCTT-3'		6794,2	6794,0
	4185	1052	3'-TTCGUGUAUCCUCUACUCG-5'		6518,9	6519,0
	Sec. modif.			Modificaciones		
	4326	1053	5'-GCACAUAGGAGAGAGAGCUU-3'		6799,2	lbd
	4345	1054	5'-AAGCUCAUCUCUCCUJUGUC-3'	romo	6569,0	6568,5
	4354	1055	5'-G*C*ACAUAGGAGAGAGAGC*T*T-3'	(1+2)PS	6842,4	6842,5
	4356	1056	5'-G*C*ACAUAGGAGAGAGAGC*T*T-3'	(2+3)PS	6874,5	tbd
AL-DP-4003	4286	1057	5'-GGACAUUCCAGGAGUACCC-3'		6670,1	6669,5
	4287	1058	5'-GGUACUCCUGGAAGAUGUCCAC-3'		7361,5	7362,0
	Sec. modif.			Modificaciones		
	4348	1059	5'-GGACAUUCCAGGAGUAC-3'	romo	6059,7	6059,5
	4349	1060	5'-GUACUCCUGGAAGAUGUCC-3'	romo	6036,7	6036,8
	4286	1057	5'-GGACAUUCCAGGAGUACCC-3'	romo	6671,1	tbd
	4343	1061	5'-GGUACUCCUGGAAGAUGUCC-3'	romo	6727,1	6727,5
Abreviaturas usadas:						
Letras en minúsculas: 2'OMe ribonucleótidos T: Desoxitimidina (Chol): Colesterol Letras en mayúsculas seguido del subíndice 2'F: 2'F ribonucleótidos (dC): Desoxicitidina Tbd: a determinar						
Letras en mayúsculas: ribonucleótidos normales *: enlace de fosforitoato Altern.: alterno						

Se describen además los siguientes apartados:

- 5 1. Un agente iRNA aislado, que comprende una secuencia sentido y una secuencia antisentido, en el que las secuencias sentido y antisentido forman un dúplex de RNA, y en el que la secuencia antisentido comprende una secuencia nucleotídica suficientemente complementaria a una secuencia diana de alrededor de 19 a 23 nucleótidos de una secuencia nucleotídica de VEGF, y en el que dicha secuencia diana difiere en no más de 1, 2 ó 3 nucleótidos de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NOs: 1-401.
- 10 2. El agente iRNA del apartado 1, en el que la secuencia sentido comprende una secuencia que difiere en no más de 1, 2 ó 3 nucleótidos de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NOs: 2-401.
- 15 3. El agente iRNA del apartado 1, en el que la secuencia sentido comprende una secuencia que difiere en no más de 1, 2 ó 3 nucleótidos de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO:456, SEC ID NO:546, SEC ID NO:548, SEC ID NO:550, SEC ID NO:552, SEC ID NO:590, SEC ID NO:592, SEC ID NO:594, SEC ID NO:596, SEC ID NO:608, SEC ID NO:610, SEC ID NO:612, SEC ID NO:614, SEC ID NO:634, SEC ID NO:636, SEC ID NO:638, SEC ID NO:640, SEC ID NO:646, SEC ID NO: 648, and SEC ID NO:650.
- 20 4. El agente iRNA del apartado 3, en el que la secuencia difiere en no más de 1, 2 ó 3 nucleótidos de SEC ID NO: 608.
- 25 5. El agente iRNA del apartado 1, en el que la secuencia antisentido comprende una secuencia que difiere en no más de 1, 2 ó 3 nucleótidos de una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID NO:457, SEC ID NO:547, SEC ID NO:549, SEC ID NO:551, SEC ID NO:553, SEC ID NO:591, SEC ID NO:593, SEC ID NO:595, SEC ID NO:597, SEC ID NO:609, SEC ID NO:611, SEC ID NO:613, SEC ID NO:615, SEC ID NO:635, SEC ID NO:637, SEC ID NO:639, SEC ID NO:641, SEC ID NO:647, SEC ID NO: 649, and SEC ID NO:651.
- 30 6. La secuencia antisentido del apartado 5, en la que la secuencia difiere en no más de 1, 2 ó 3 nucleótidos de SEC ID NO:609.
- 35 7. El agente iRNA del apartado 1, en el que el agente iRNA comprende además un resto no nucleotídico.
- 40 8. El iRNA del apartado 7, en el que las secuencias sentido y antisentido están estabilizadas contra la degradación nucleolítica.
- 45 9. El agente iRNA del apartado 1, que comprende además un saliente en 3', en el que dicho saliente en 3' comprende de 1 a 6 nucleótidos.
- 50 10. El iRNA del apartado 9, que comprende además un segundo saliente en 3', en el que dicho segundo saliente en 3' comprende de 1 a 6 nucleótidos.
11. El agente iRNA del apartado 1, que comprende además un fosforotioato en el primer enlace internucleotídico en el extremo 5' de las secuencias antisentido y sentido.
12. El agente iRNA del apartado 1, que comprende además un fosforotioato en el primer enlace internucleotídico en el extremo 3' de las secuencias antisentido y sentido.
13. El agente iRNA del apartado 1, que comprende además un fosforotioato en el primer enlace internucleotídico en el extremo 5' de las secuencias antisentido y sentido, y un fosforotioato en el primer enlace internucleotídico en el extremo 3' de las secuencias antisentido y sentido.
14. El agente iRNA del apartado 1, que comprende además un nucleótido modificado en 2'.
15. El agente iRNA del apartado 14, en el que el nucleótido modificado en 2' comprende una modificación seleccionada del grupo que consiste en: 2'-desoxi, 2'-desoxi-2'-fluoro, 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropilo (2'-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetilo (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropilo (2'-O-DMAP), 2'-O-dimetilaminoetiloxietilo (2'-O-DMAEOE), y 2'-O-N-metilacetamido (2'-O-NMA).
16. Un método para reducir la cantidad de RNA de VEGF en una célula de un sujeto, que comprende poner en contacto la célula con un agente iRNA de uno cualquiera de los apartados 1-15.
17. Un método para obtener un agente iRNA de cualquiera de los apartados 1-15, comprendiendo el método la síntesis del agente iRNA, en el que las hebras sentido y antisentido comprenden al menos una modificación que estabiliza el agente iRNA frente a la degradación nucleolítica.
18. Una composición farmacéutica que comprende un agente iRNA del apartado 1, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
19. Un método para inhibir la expresión de VEGF, que comprende administrar una cantidad eficaz de un agente iRNA del apartado 1.

20. Un método para tratar un ser humano que se ha diagnosticado por tener o que tiene riesgo de tener degeneración macular de adulto (AMD), que comprende administrar a un sujeto que necesite tal tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente iRNA del apartado 1.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> DE FOUGEROLLES, ANTONIN FRANK-KAMENETSKY, MARIA MANOHARAN, MUTHIAH RAJEEV, KALLANTHOTTAHIL G. HADWIGER, PHILLIPP  
 <120> AGENTES iRNA QUE TIENEN COMO DIANA A VEGF  
 <130> P3345 EP/1  
 <150> US 60/647,191
- 10 <151>25/01/2005  
 <150> US 60/559,824  
 <151> 04/05/2004  
 <150> US 60/552,620  
 <151> 03/12/2004
- 15 <160>3  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 344  
 <211> 23  
 <212> ARN
- 20 <213> Homo sapiens  
 <400> 344  
 cagcacauag gagaugag cuu 23  
 <210> 608  
 <211>21
- 25 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético  
 <400> 608
- 30 gcacauagga gagaugagcu u 21  
 <210> 609  
 <211> 23  
 <212> ARN  
 <213> Secuencia artificial
- 35 <220>  
 <223> Descripción de la secuencia artificial: oligonucleótido sintético  
 <400> 609  
 aagcucaucu cuccaugug cug 23



## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un agente iRNA aislado, que comprende una secuencia sentido y una secuencia antisentido, en el que las secuencias sentido y antisentido forman un dúplex de RNA, y en el que la secuencia antisentido comprende una secuencia nucleotídica suficientemente complementaria a una secuencia diana de alrededor de 19 a 23 nucleótidos de una secuencia nucleotídica de VEGF, y en el que dicha secuencia diana difiere en no más de 1, 2 ó 3 nucleótidos de la secuencia de SEC ID NO: 344.
2. El agente iRNA de la reivindicación 1, en el que la secuencia sentido comprende una secuencia que difiere en no más de 1, 2 ó 3 nucleótidos de la secuencia de SEC ID NO: 344.
- 10 3. El agente iRNA de la reivindicación 1, en el que la secuencia sentido comprende una secuencia que difiere en no más de 1, 2 ó 3 nucleótidos de la secuencia de SEC ID NO: 608.
4. El agente iRNA de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la secuencia antisentido comprende una secuencia que difiere en no más de 1, 2 ó 3 nucleótidos de la secuencia de SEC ID NO: 609.
5. El agente iRNA de la reivindicación 1, en el que dicha secuencia antisentido comprende la secuencia de SEC ID NO: 609, y dicha secuencia sentido comprende la secuencia de SEC ID NO: 608.
- 15 6. El agente iRNA de la reivindicación 1, en el que dicha secuencia antisentido consiste en la secuencia de SEC ID NO: 609, y dicha secuencia sentido consiste en la secuencia de SEC ID NO: 608.
7. El agente iRNA de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el agente iRNA comprende además un resto no nucleotídico, en el que dicho resto no nucleotídico se selecciona preferiblemente de naproxeno, colesterol, tio-colesterol, ácido colánico y ácido retinoico.
- 20 8. El iRNA de la reivindicación 7, en el que las secuencias sentido y antisentido se estabilizan frente a la degradación nucleolítica.
9. El agente iRNA de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, 7 y 8, que comprende además uno o dos salientes en 3', en el que dicho saliente o salientes en 3' comprenden de 1 a 6 nucleótidos.
10. El agente iRNA de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además
- 25 (a) un fosforotioato en el primer enlace internucleotídico en el extremo 5' de las secuencias antisentido y sentido; y/o
- (b) un fosforotioato en el primer enlace internucleotídico en el extremo 3' de las secuencias antisentido y sentido.
- 30 11. El agente iRNA de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además un nucleótido modificado en 2'.
12. El agente iRNA de la reivindicación 11, en el que el nucleótido modificado en 2' comprende una modificación seleccionada del grupo que consiste en: 2'-desoxi, 2'-desoxi-2'-fluoro, 2'-O-metilo, 2'-O-metoxietilo (2'-O-MOE), 2'-O-aminopropilo (2'-O-AP), 2'-O-dimetilaminoetilo (2'-O-DMAOE), 2'-O-dimetilaminopropilo (2'-O-DMAP), 2'-O-dimetilaminoetiloxietilo (2'-O-DMAEOE), y 2'-O-N-metilacetamido (2'-O-NMA).
- 35 13. Un método in vitro para reducir la cantidad de RNA de VEGF en una célula de un sujeto, que comprende poner en contacto la célula con un agente iRNA de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
14. Un método para obtener un agente iRNA de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, comprendiendo el método la síntesis del agente iRNA, en el que las hebras sentido y antisentido comprenden al menos una modificación que estabiliza al agente iRNA contra la degradación nucleolítica.
- 40 15. Una composición farmacéutica que comprende un agente iRNA de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
16. Un método para inhibir la expresión de VEGF, que comprende administrar una cantidad eficaz de un agente iRNA de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, con la condición de que se excluya cualquier método de tratamiento del cuerpo humano o animal mediante terapia.
- 45 17. Un agente iRNA de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para uso en el tratamiento de un ser humano diagnosticado por tener o que tiene riesgo de tener degeneración macular del adulto (AMD).
18. Un agente iRNA de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, para uso en el tratamiento de tumor o cáncer metastásico.

1 augaacuuc ugcugucuu ggugcaugg agccuugcc ugcugcucua ccuccaccu  
61 gccaauggu ccagggcug acccauggc gaaggaggag ggcagaauca ucacgaagug  
121 gugaauguca uggaugucua ucagcgagc uacugccauc caucgagac ccugguggac  
181 aucuuccagg aguaccuga ugagaucgag uacaucuca agccauccug ugugccccug  
241 augcgaugcg ggggucugc caugacgag ggccuggagu guggcccac ugaggagucc  
301 aacauacca ugcagauuu gcggaucaaa ccucaccaag gccagacau aggagagaug  
361 agcuuccuac agcaacaaca augugaaugc agaccaaga aagauagagc aagacaagaa  
421 aaaugugaca agccgaggcg guga (SEC ID NO:1)

FIG. 1

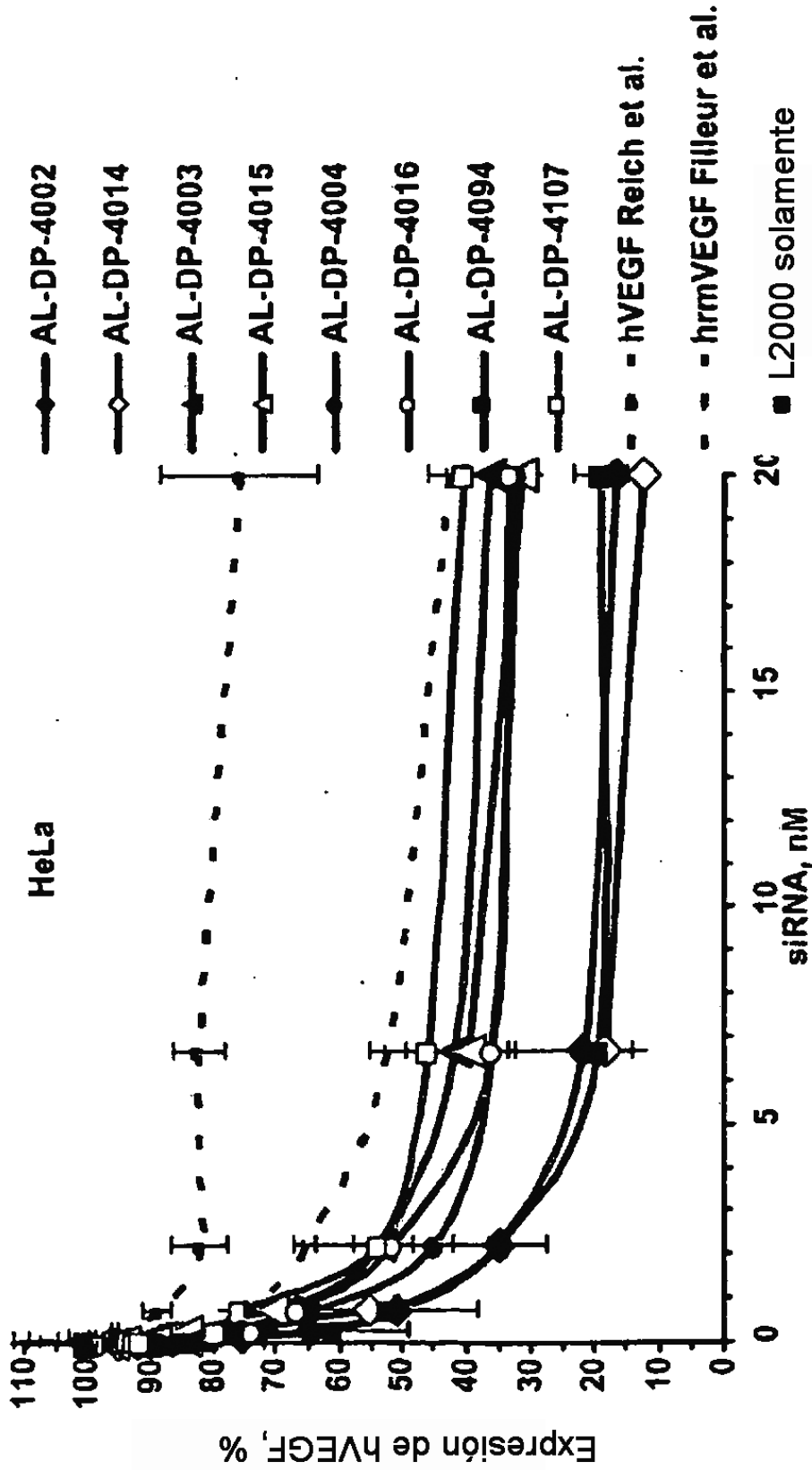


FIG. 2

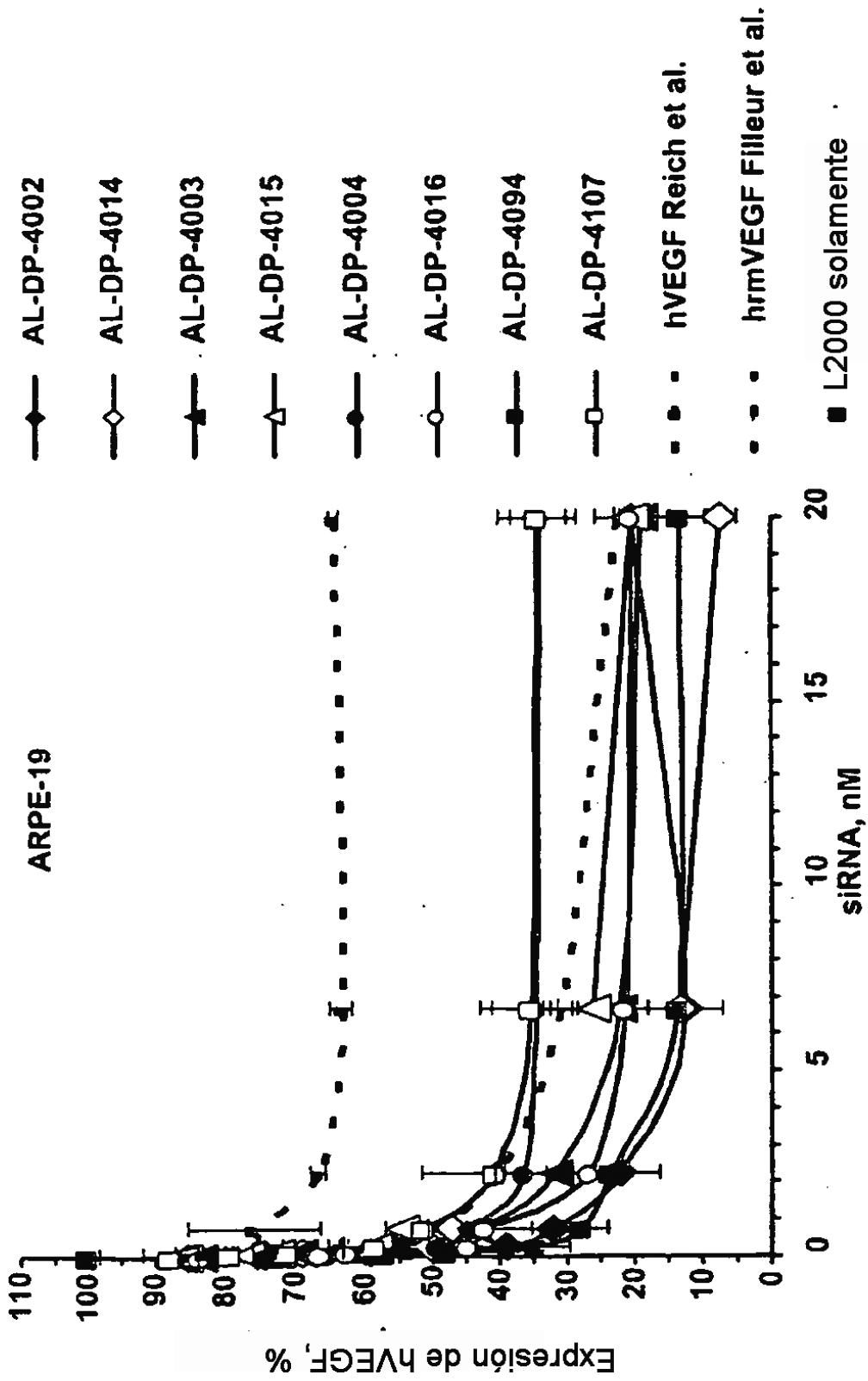


FIG. 3

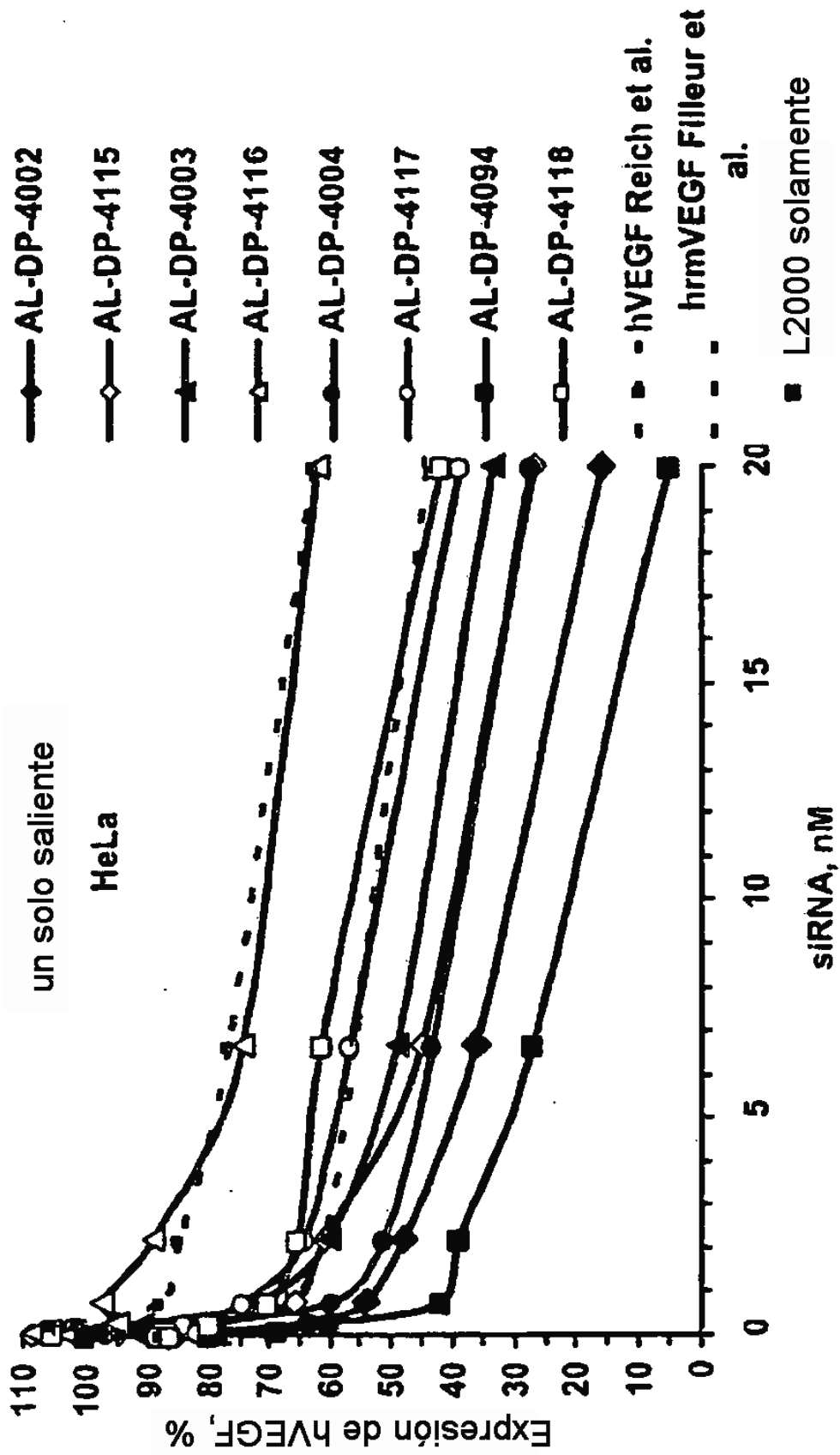


FIG. 4

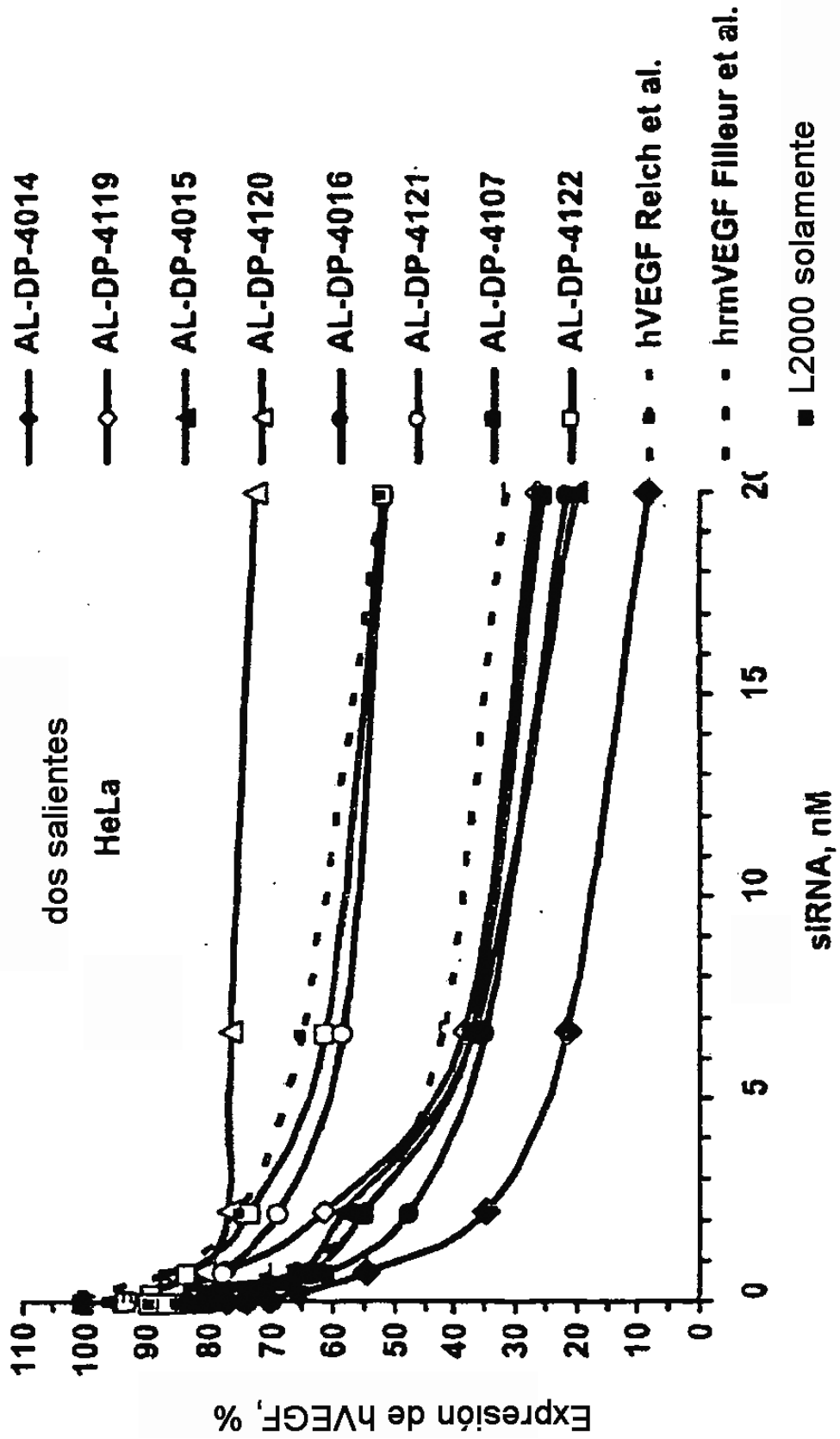


FIG. 5

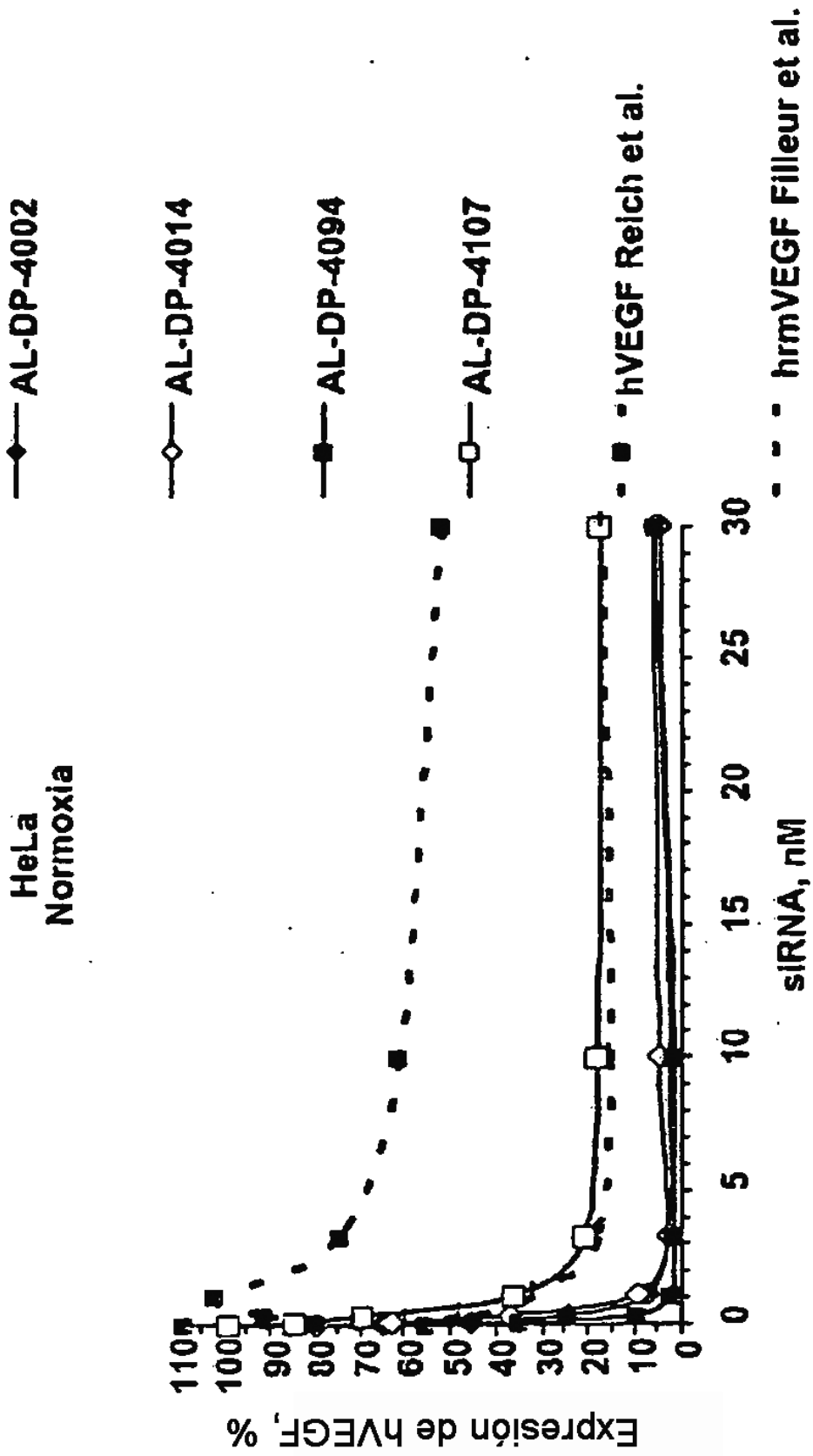


FIG. 6A

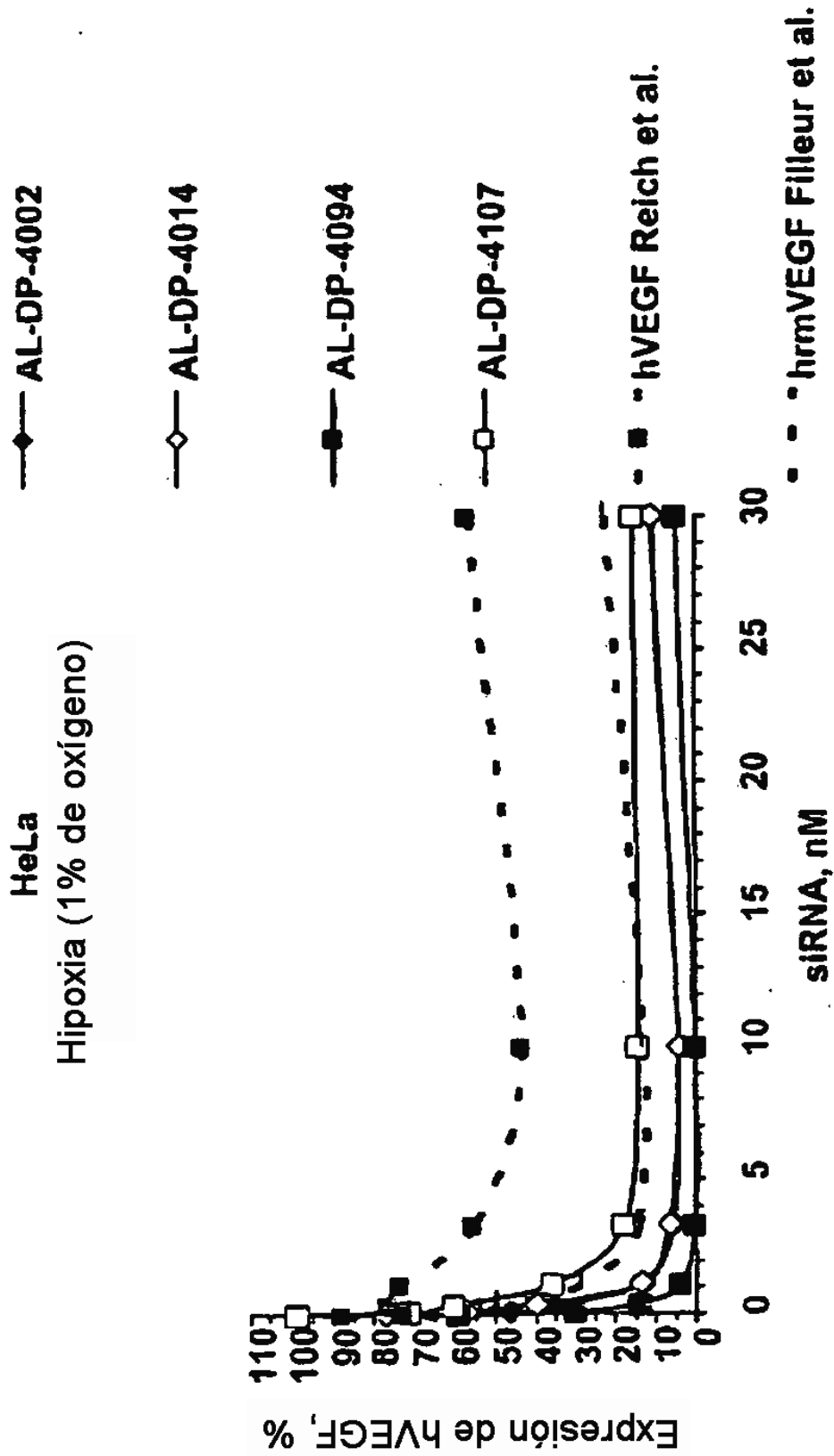


FIG. 6B



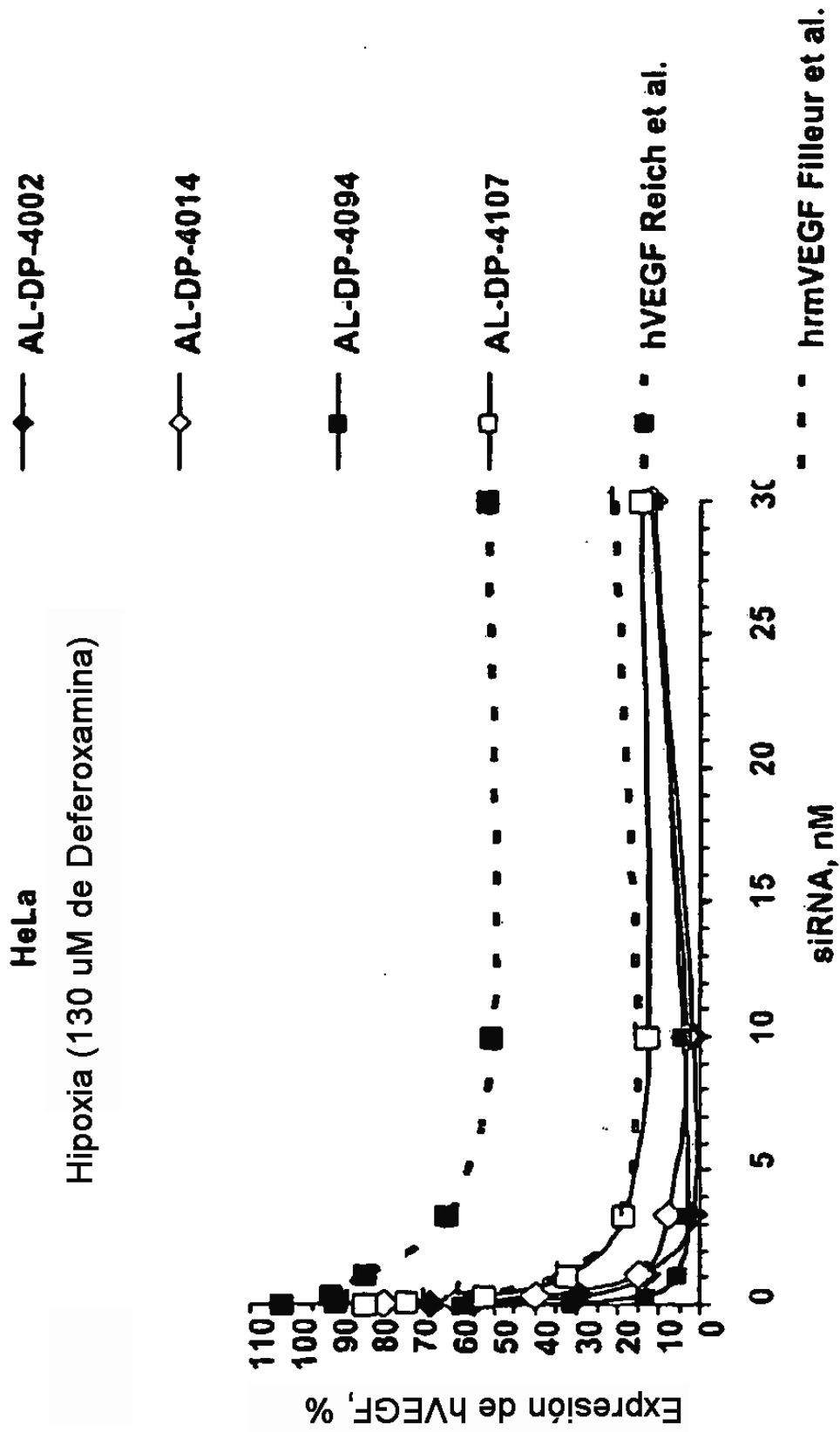


FIG. 6C

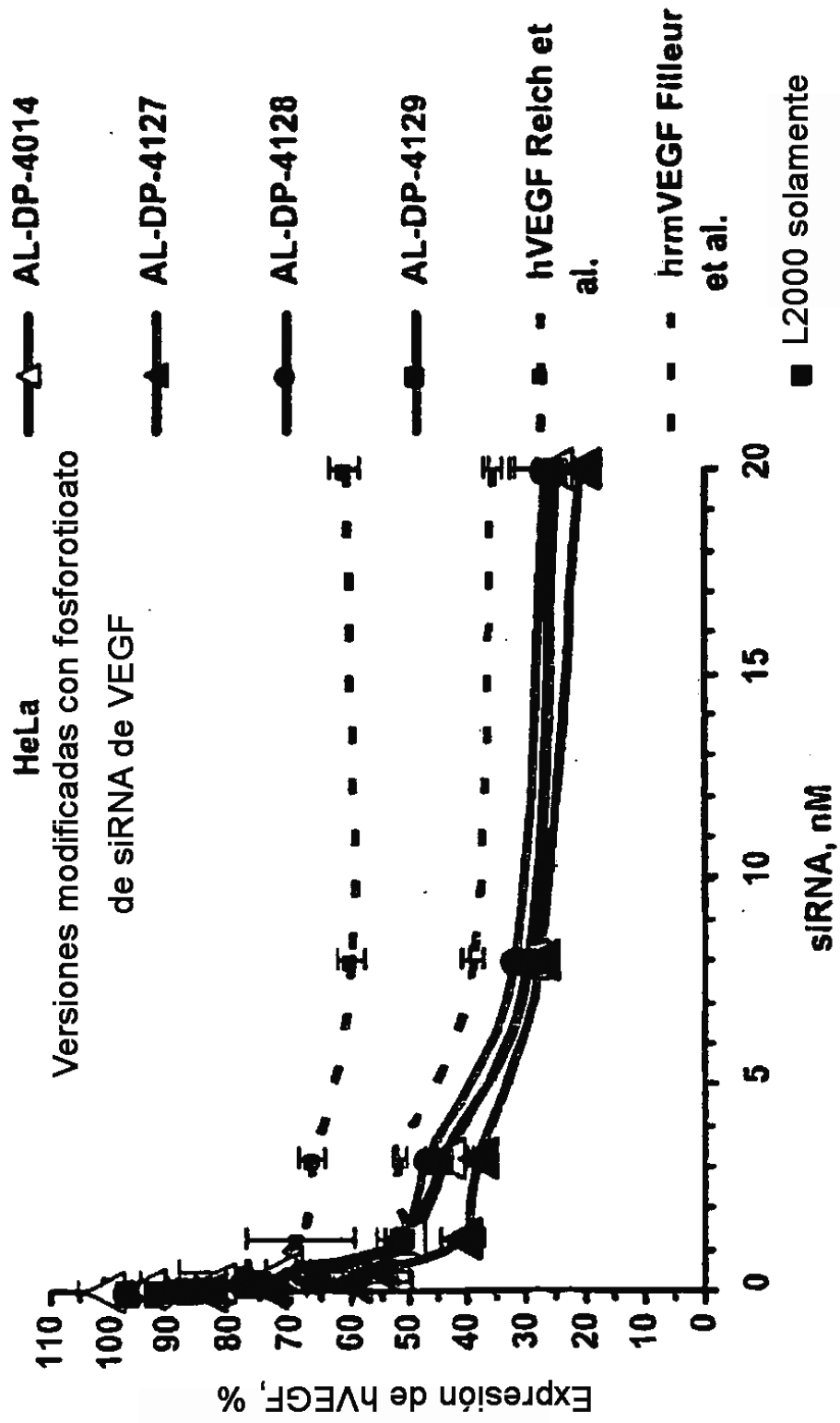


FIG. 7

FIG. 8B HeLa - Hipoxia

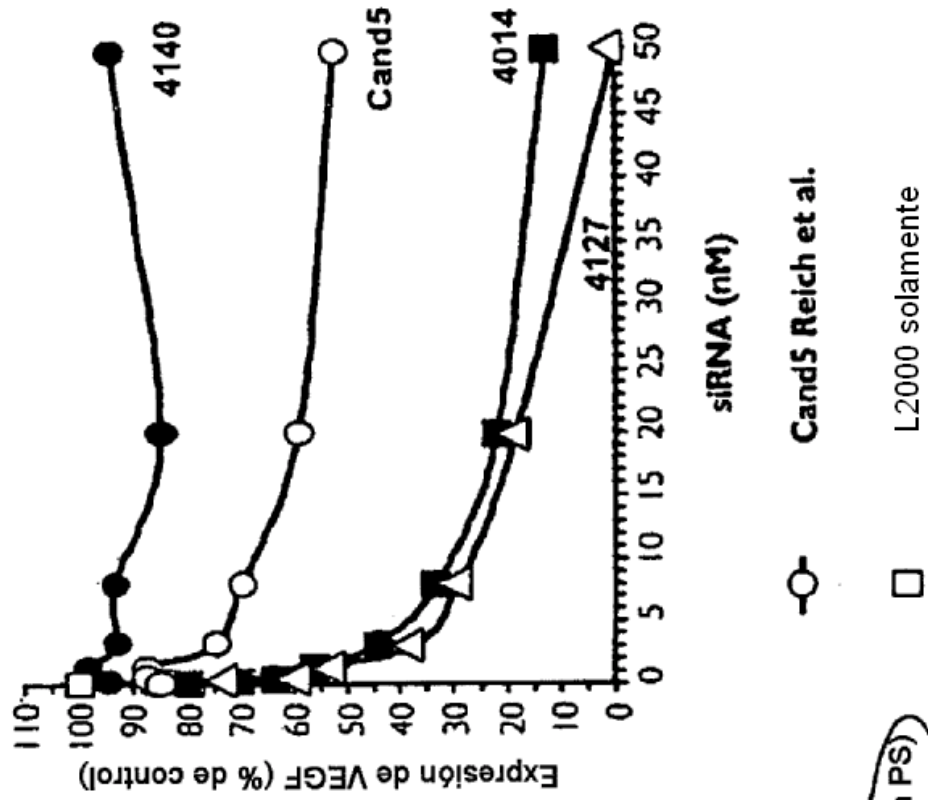
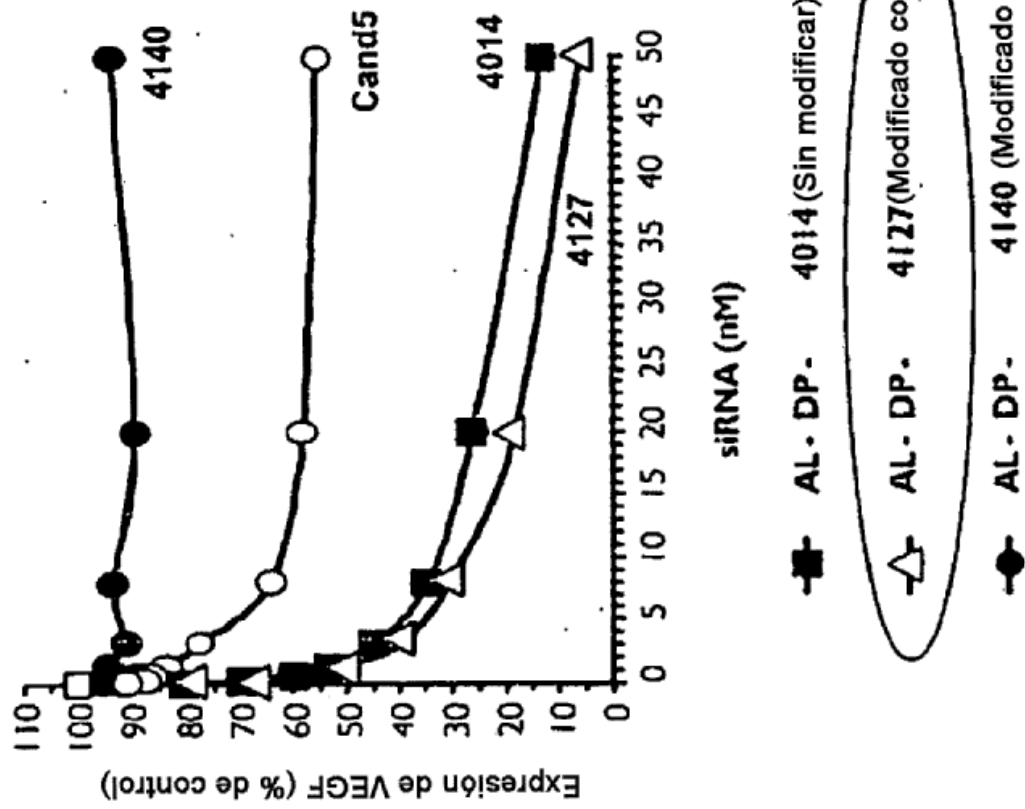
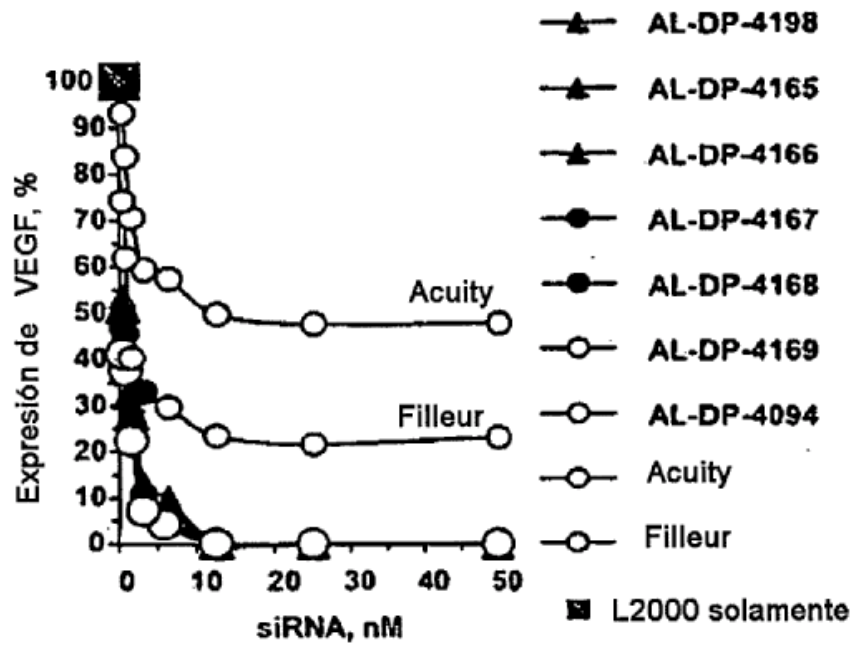


FIG. 8A HeLa - Normoxia

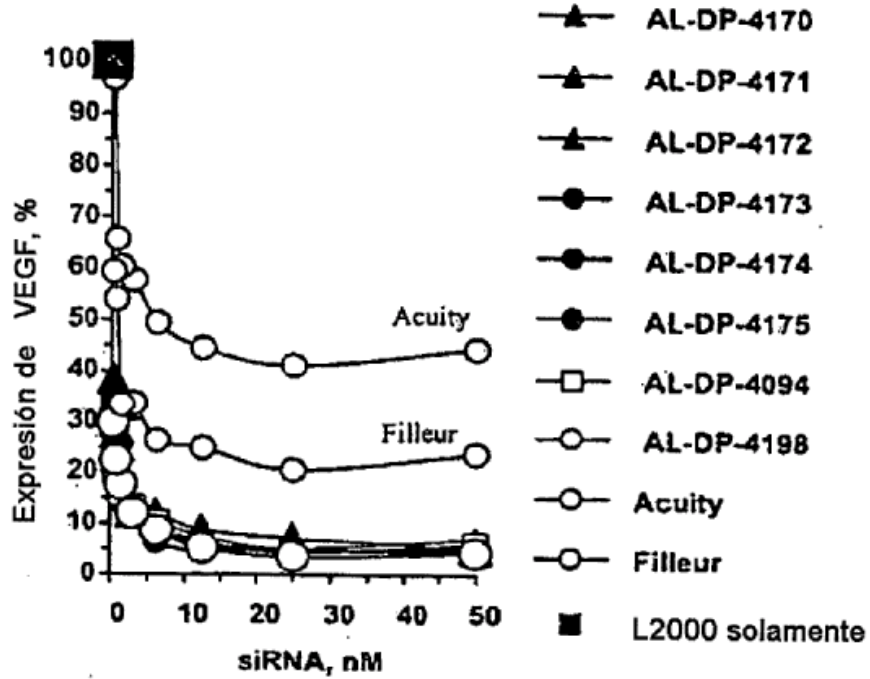


- AL - DP - 4014 (Sin modificar)
- △ AL - DP - 4127 (Modificado con PS)
- AL - DP - 4140 (Modificado Mutado)
- Cand5 Reich et al.
- L2000 solamente



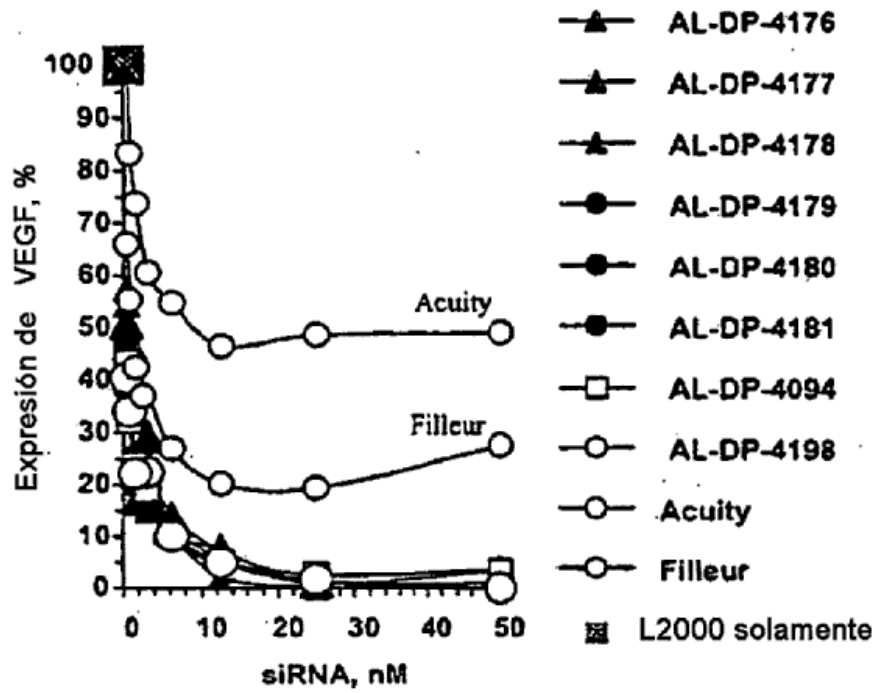
AL-DP-4198	5' - G <sub>β</sub> CACAUAGGAGAGAUGAGCU <sub>β</sub> U - 3' 3' - G <sub>β</sub> UCGUGUAUCCUCUCUACUCGAA - 5'
AL-DP-4165	5' - G <sub>β</sub> CACAUAGGAGAGAUGAGCU <sub>β</sub> U - 3' 3' - G <sub>β</sub> U <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> GUGUAUCCUCUCUACUCGAA - 5'
AL-DP-4166	5' - G <sub>β</sub> CACAUAGGAGAGAUGAGCU <sub>β</sub> U - 3' 3' - G <sub>β</sub> U <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> GUGUAU <sub>OMe</sub> CCUCUCUACUCGAA - 5'
AL-DP-4167	5' - G <sub>β</sub> CACAUAGGAGAGAUGAGCU <sub>β</sub> U - 3' 3' - G <sub>β</sub> U <sub>OMe</sub> CGU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CCUCUCUAC <sub>OMe</sub> UCGAA - 5'
AL-DP-4168	5' - G <sub>β</sub> CACAUAGGAGAGAUGAGCU <sub>β</sub> U - 3' 3' - G <sub>β</sub> U <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CCUCUCUAC <sub>OMe</sub> UCGAA - 5'
AL-DP-4169	5' - G <sub>β</sub> CACAUAGGAGAGAUGAGCU <sub>β</sub> U - 3' 3' - G <sub>β</sub> U <sub>OMe</sub> _dCGU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CCUCUCUA_dCUCGAA - 5'

FIG. 9A



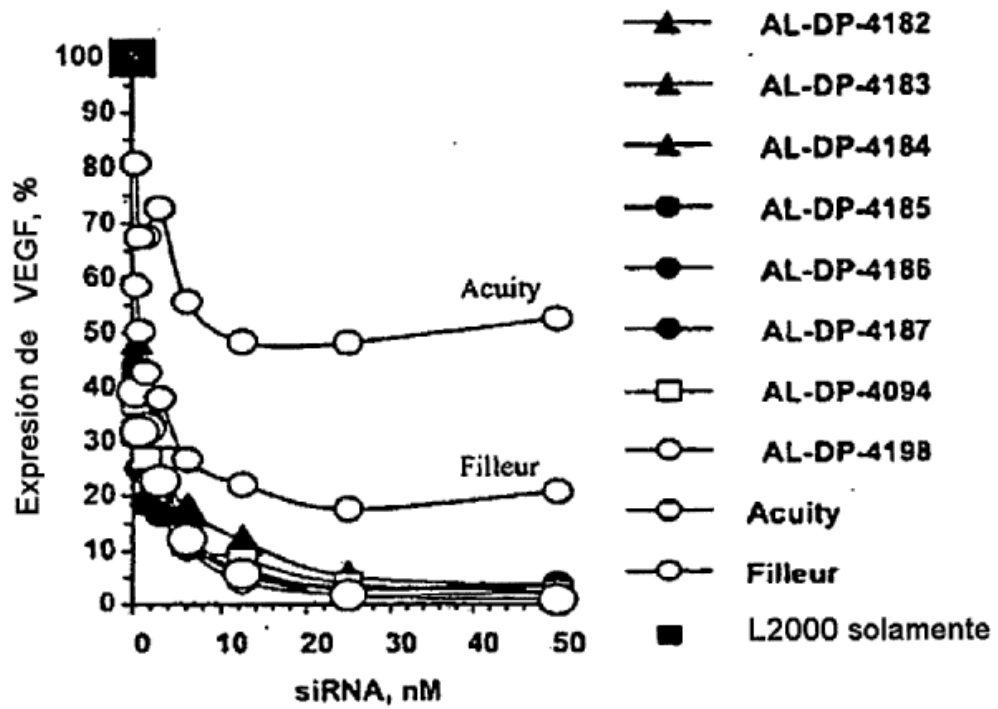
AL-DP-4170	5' - G <sub>β</sub> CACAU <sub>2</sub> 'OM <sub>e</sub> AGGAGAGAUGAGCU <sub>β</sub> U-3' 3'-G <sub>β</sub> UCGUGUAUCCUCUCUACUCGAsA - 5'
AL-DP-4171	5' - G <sub>β</sub> CACAU <sub>2</sub> 'OM <sub>e</sub> AGGAGAGAUGAGCU <sub>β</sub> U-3' 3'-G <sub>β</sub> UOM <sub>e</sub> COM <sub>e</sub> GUGUAUCCUCUCUACUGAsA - 5'
AL-DP-4172	5' - G <sub>β</sub> CACAU <sub>2</sub> 'OM <sub>e</sub> AGGAGAGAUGAGCU <sub>β</sub> U-3' 3'-G <sub>β</sub> UOM <sub>e</sub> COM <sub>e</sub> GUGUAUOM <sub>e</sub> CCUCUCUACUGAsA - 5'
AL-DP-4173	5' - G <sub>β</sub> CACAU <sub>2</sub> 'OM <sub>e</sub> AGGAGAGAUGAGCU <sub>β</sub> U-3' 3'-G <sub>β</sub> UOM <sub>e</sub> CGUOM <sub>e</sub> GUOM <sub>e</sub> AUOM <sub>e</sub> CCUCUCUACOM <sub>e</sub> UCGAA - 5'
AL-DP-4174	5' - G <sub>β</sub> CACAU <sub>2</sub> 'OM <sub>e</sub> AGGAGAGAUGAGCU <sub>β</sub> U-3' 3'-G <sub>β</sub> UOM <sub>e</sub> COM <sub>e</sub> GUOM <sub>e</sub> GUOM <sub>e</sub> AUOM <sub>e</sub> CCUCUCUACOM <sub>e</sub> UCGAA - 5'
AL-DP-4175	5' - G <sub>β</sub> CACAU <sub>2</sub> 'OM <sub>e</sub> AGGAGAGAUGAGCU <sub>β</sub> U-3' 3'-G <sub>β</sub> UOM <sub>e</sub> -dCGUOM <sub>e</sub> GUOM <sub>e</sub> AUOM <sub>e</sub> CCUCUCUA-dCUCGAA - 5'

FIG. 9B



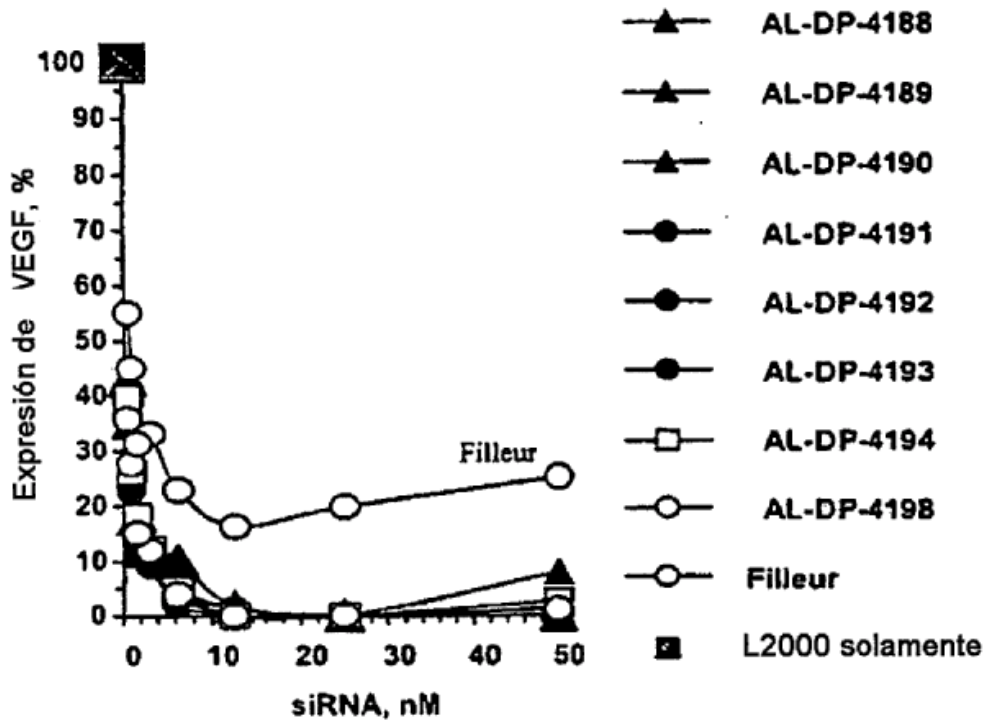
AL-DP-4176	5'-GC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCU <sub>OMe</sub> BU-3' 3'-G <u>B</u> UCGUGUAUCCUCUCUACUCGAsA-5
AL-DP-4177	5'-GC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCU <sub>OMe</sub> BU-3' 3'-G <u>B</u> U <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> GUGUAUCCUCUCUACUGAsA-5
AL-DP-4178	5'-GC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCU <sub>OMe</sub> BU-3' 3'-G <u>B</u> U <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> GUGUAU <sub>OMe</sub> CCUCUCUACUGAsA-5
AL-DP-4179	5'-GC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCU <sub>OMe</sub> BU-3' 3'-G <u>B</u> U <sub>OMe</sub> CGU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CCUCUCUAC <sub>OMe</sub> UCGAA-5
AL-DP-4180	5'-GC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCU <sub>OMe</sub> BU-3' 3'-G <u>B</u> U <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CCUCUCUAC <sub>OMe</sub> UCGAA-5
AL-DP-4181	5'-GC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCU <sub>OMe</sub> BU-3' 3'-G <u>B</u> U <sub>OMe</sub> -dCGU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CCUCUCUA-dCUCGAA-5

FIG. 9C



AL-DP-4182	5'-G dC A dC AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCU <sub>OMe</sub> BU-3' 3'-G <sub>B</sub> UCGUGUAUCCUCUCUACUCGABA-5
AL-DP-4183	5'-G dC A dC AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCU <sub>OMe</sub> BU-3' 3'-G <sub>B</sub> U <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> GUGUAUCCUCUCUACUGABA-5
AL-DP-4184	5'-G dC A dC AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCU <sub>OMe</sub> BU-3' 3'-G <sub>B</sub> U <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> GUGUAU <sub>OMe</sub> CCUCUCUACUGABA-5
AL-DP-4185	5'-G dC A dC AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCU <sub>OMe</sub> BU-3' 3'-G <sub>B</sub> U <sub>OMe</sub> CGU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CCUCUCUAC <sub>OMe</sub> UCGAA-5
AL-DP-4186	5'-G dC A dC AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCU <sub>OMe</sub> BU-3' 3'-G <sub>B</sub> U <sub>OMe</sub> C <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CCUCUCUAC <sub>OMe</sub> UCGAA-5
AL-DP-4187	5'-G dC A dC AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCU <sub>OMe</sub> BU-3' 3'-G <sub>B</sub> U <sub>OMe</sub> dCGU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CCUCUCUA dCUCGAA-5

FIG. 9D



AL-DP-4188	5' - GBCACAU <sub>2P</sub> AGGAGAGAUGAGCU <sub>8U</sub> -3' 3' - G <sub>8U</sub> CGUGUAUCCUCUCUACUCGAA - 5'
AL-DP-4189	5' - GC <sub>2P</sub> AC <sub>2P</sub> AU <sub>2P</sub> AGGAGAGAU <sub>2P</sub> GAGCU <sub>2P</sub> BU-3' 3' - G <sub>8U</sub> CGUGUAUCCUCUCUACUCGAA - 5'
AL-DP-4190	5' - GC <sub>2P</sub> AC <sub>2P</sub> AU <sub>OMe</sub> AGGAGAGAU <sub>OMe</sub> GAGCU <sub>OMe</sub> BU-3' 3' - G <sub>8U</sub> CGUGUAUCCUCUCUACUCGAA - 5'
AL-DP-4191	5' - GC <sub>OMe</sub> AC <sub>OMe</sub> AU <sub>2P</sub> AGGAGAGAU <sub>2P</sub> GAGCU <sub>2P</sub> BU-3' 3' - G <sub>8U</sub> CGUGUAUCCUCUCUACUCGAA - 5'

AL-DP-4192	5' - GBCACAUAGGAGAGAGAUGAGCU <sub>8U</sub> -3' 3' - G <sub>8U</sub> <sub>2P</sub> CGU <sub>2P</sub> GU <sub>P2</sub> AU <sub>2P</sub> CCUCUCUAC <sub>2P</sub> UCGAA - 5'
AL-DP-4193	5' - GBCACAUAGGAGAGAGAUGAGCU <sub>8U</sub> -3' 3' - G <sub>8U</sub> <sub>2P</sub> CGU <sub>2P</sub> GU <sub>P2</sub> AU <sub>2P</sub> CCUCUCUAC <sub>OMe</sub> UCGAA - 5'
AL-DP-4194	5' - GBCACAUAGGAGAGAGAUGAGCU <sub>8U</sub> -3' 3' - G <sub>8U</sub> <sub>OMe</sub> CGU <sub>OMe</sub> GU <sub>OMe</sub> AU <sub>OMe</sub> CCUCUCUAC <sub>2P</sub> UCGAA - 5'

FIG. 9E



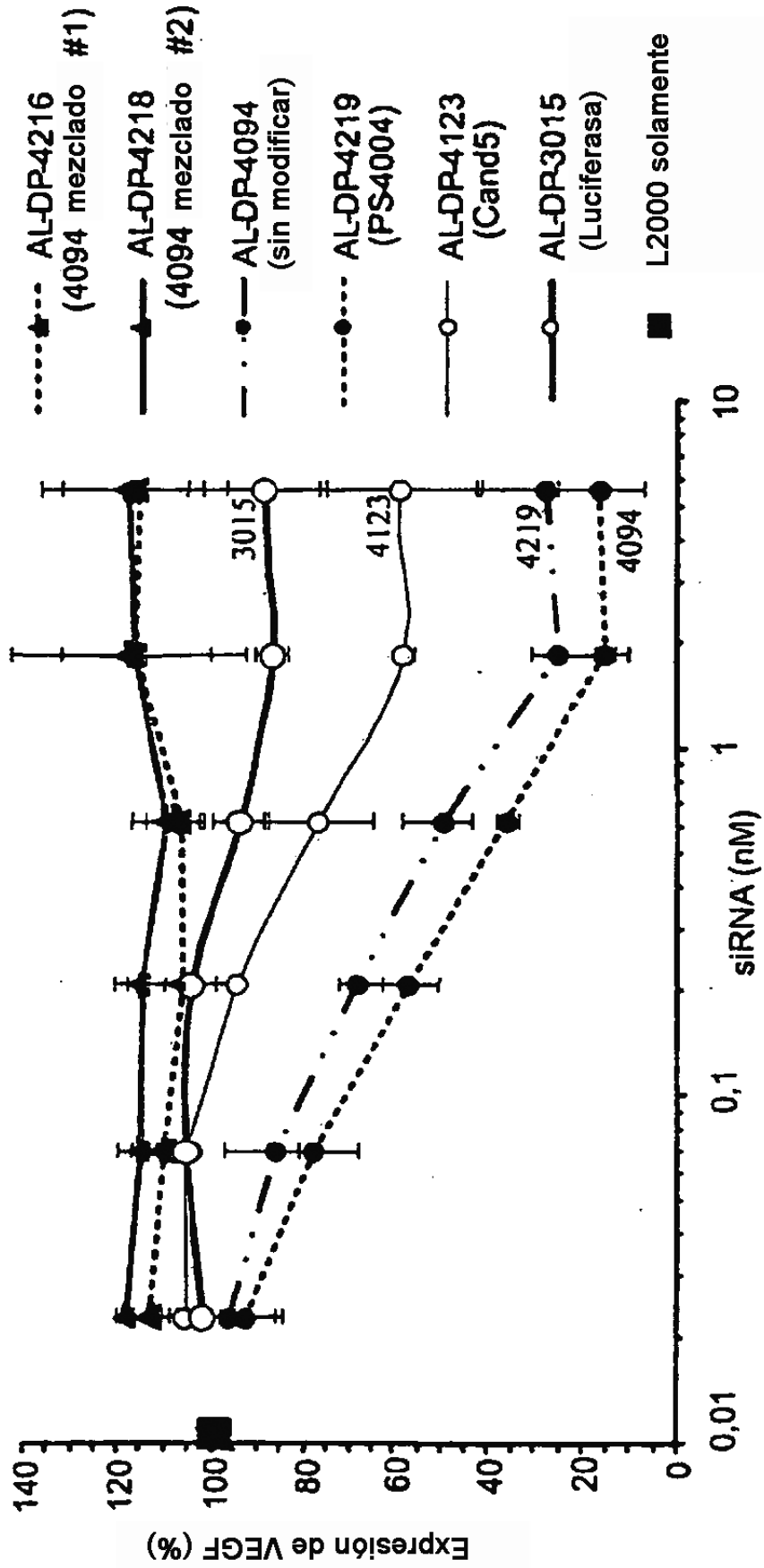


FIG. 10

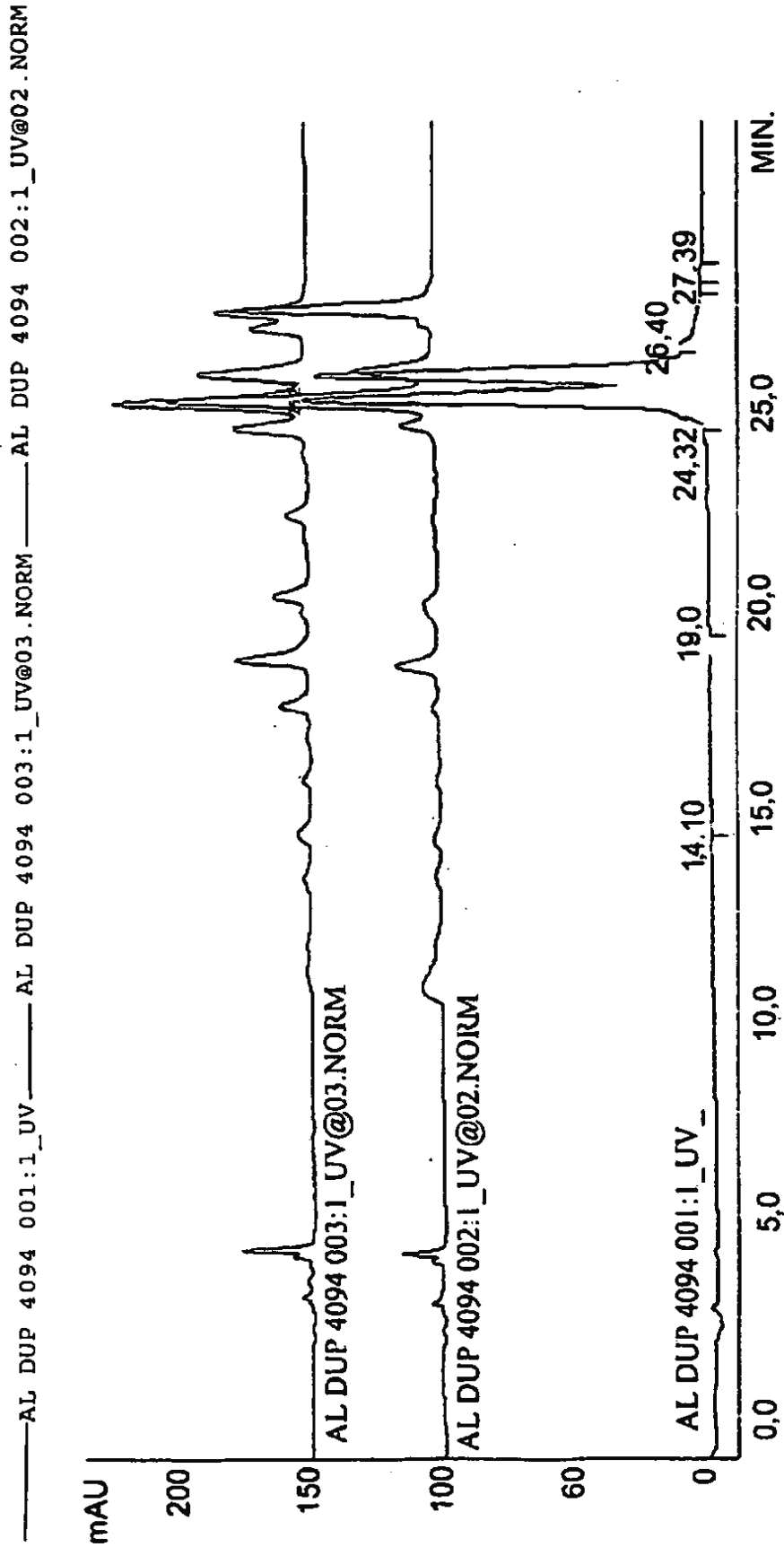


FIG. 11

ES 2 423 060 T3

AL-DUP-4094_120 min.			5'-GCACAU AGGAGAG AUGAGCU-3'				
			3'. GUCGLGUAUCCUCUCUACUCGAA-5'				
RT [min] Hebra	3-Exo/Endo	Sitio de escisión	Fragmento	Fosfato	Masa cal.	Masa exp.	Observaciones
1,17 sentido	endo	U <sub>6</sub> -A <sub>7</sub>	5'-GCACAU	3-Fosfato	1920,2	1920,0	* algunas masas sin identificar
10,34 antisentido	endo	U <sub>8</sub> -C <sub>9</sub>	UACUCGAA-5'	Fosfato cíclico	2554,5	2554,0	pequeño después de 30 min cinética lenta
14,61 sentido	3-exo del siguiente fragmento		AGGAGAGAUGAGCU	-	4571,8	4572,0	
15,85 sentido	endo	U <sub>6</sub> -A <sub>7</sub>	AGGAGAGAUGAGCU-3	-	4878,0	4878,0	
17,32 antisentido	endo	U <sub>15</sub> -A <sub>16</sub>	UCCUCUCUACUCGAA-5'	Fosfato cíclico	4693,8	4693,0	
19,37 antisentido	endo	U <sub>15</sub> -A <sub>16</sub>	UCCUCUCUACUCGAA.5'	3-Fosfato	4711,8	4711,0	no detectado después de 30 min
21,45 sentido	3-exo	n-1	5'-GCACAUAGGAGAGAUGAGCU	-	6492,0	6492,5	pequeño después de 30 min
22,16 sentido	FLP		5'-GCACAUAGGAGAGAUGAGCU-3'	-	6798,2	6797,5	sólo pequeñas cantidades de as-FLP detectadas
22,86 antisentido	3-exo	n-2	CGUGUAUCCUCUCUACUCGAA-5'	Fosfato cíclico	6630,9	6631,0	
23,91 antisentido	3-exo	n-2	CGUGUAUCCUCUCUACUCGAA-5'	3-Fosfato	6648,9	6648,0	no detectado después de 30 min
24,32 antisentido	3-exo	n-1	UCCUGUAUCCUCUCUACUCGAA-5'	3-Fosfato	6955,1	6954,8	

FIG. 12

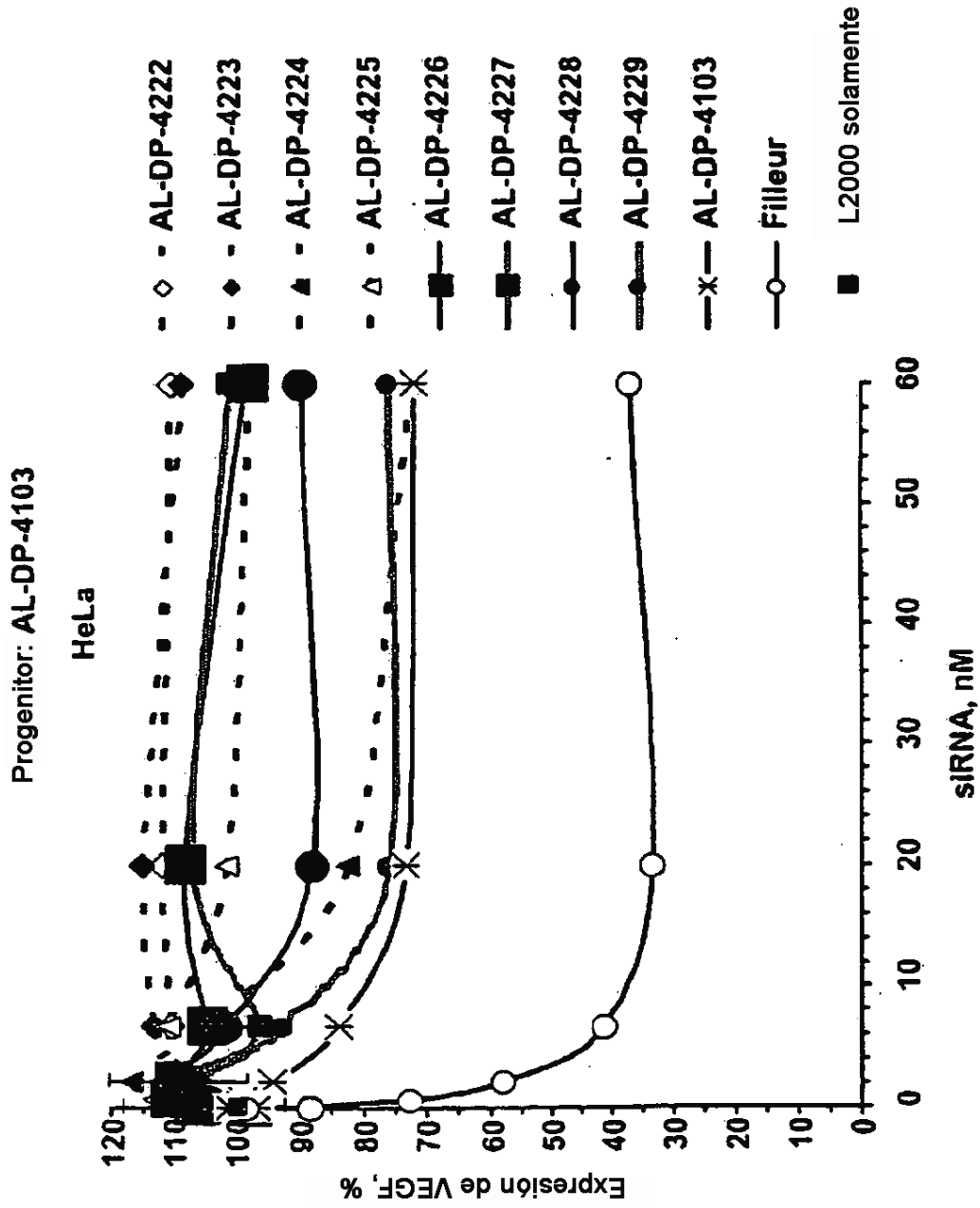


FIG. 13

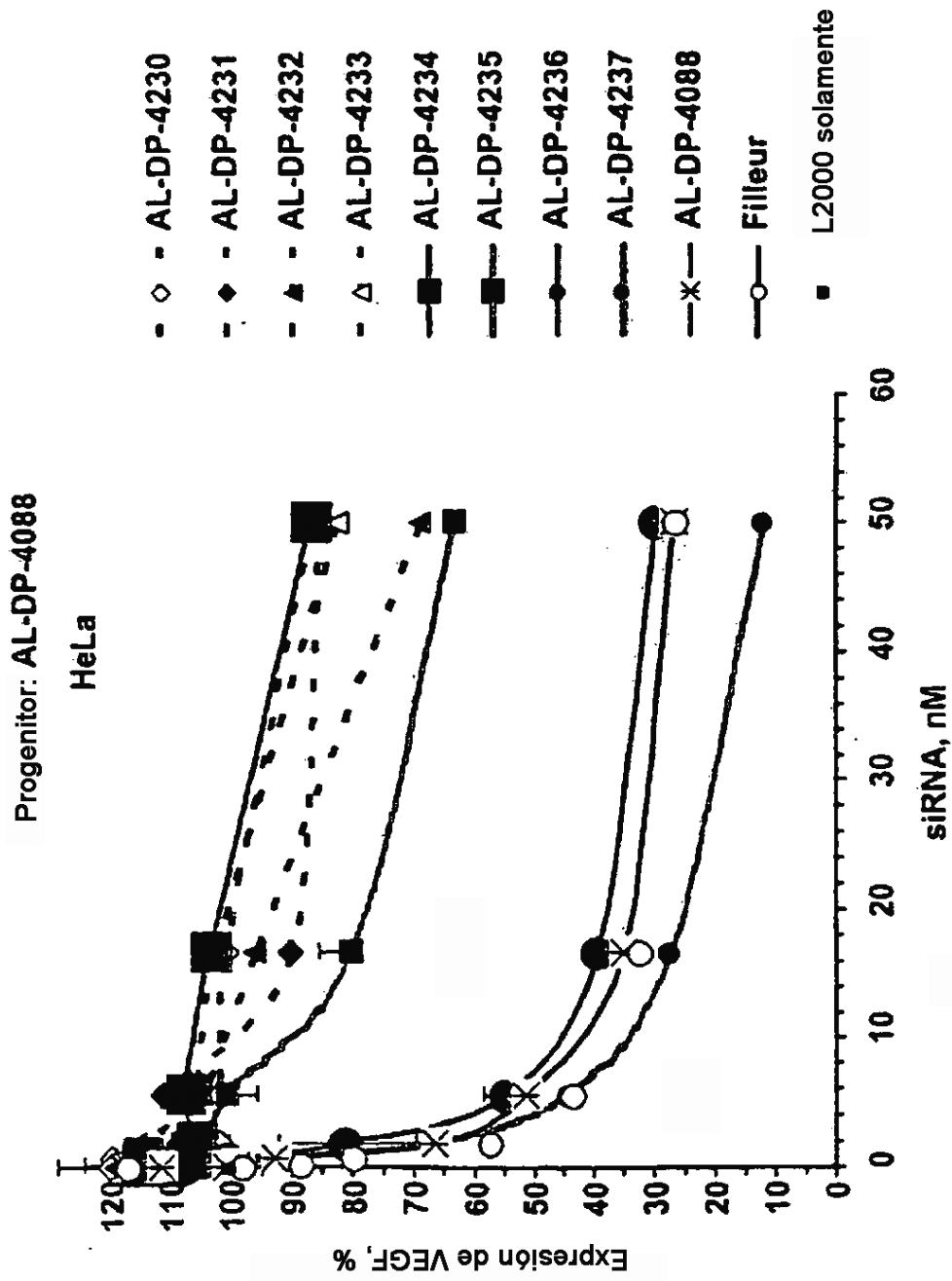


FIG. 14

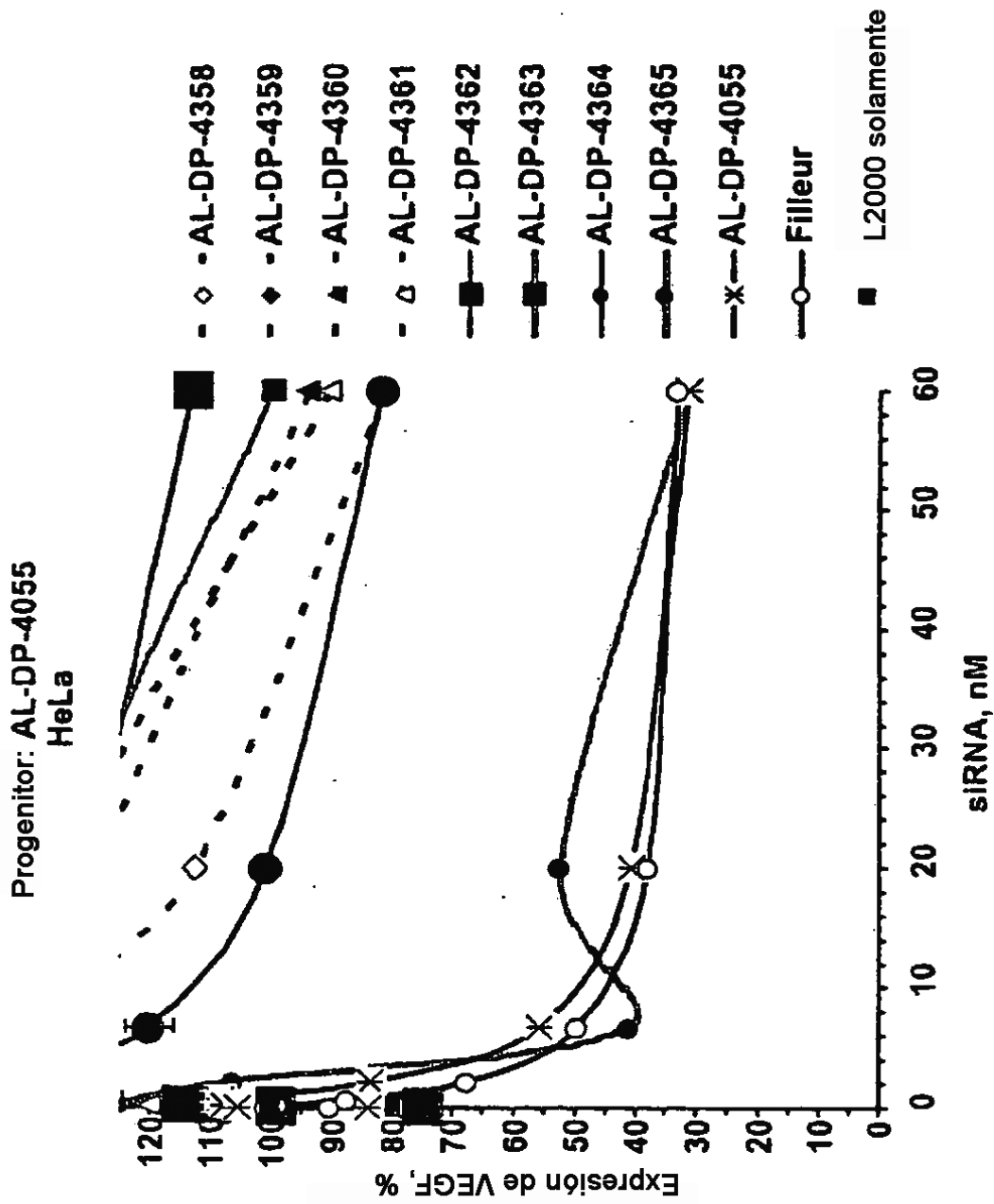


FIG. 15

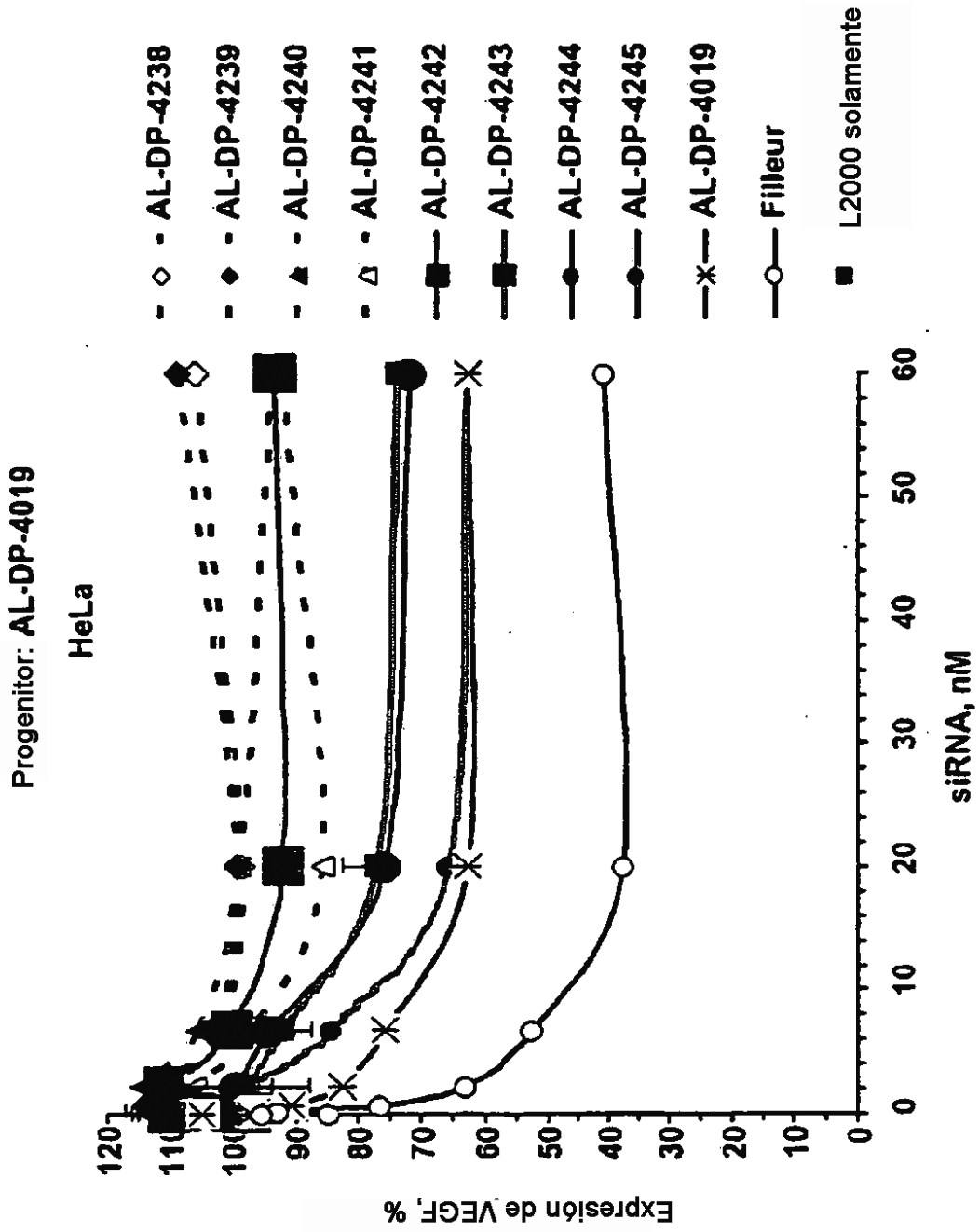


FIG. 16

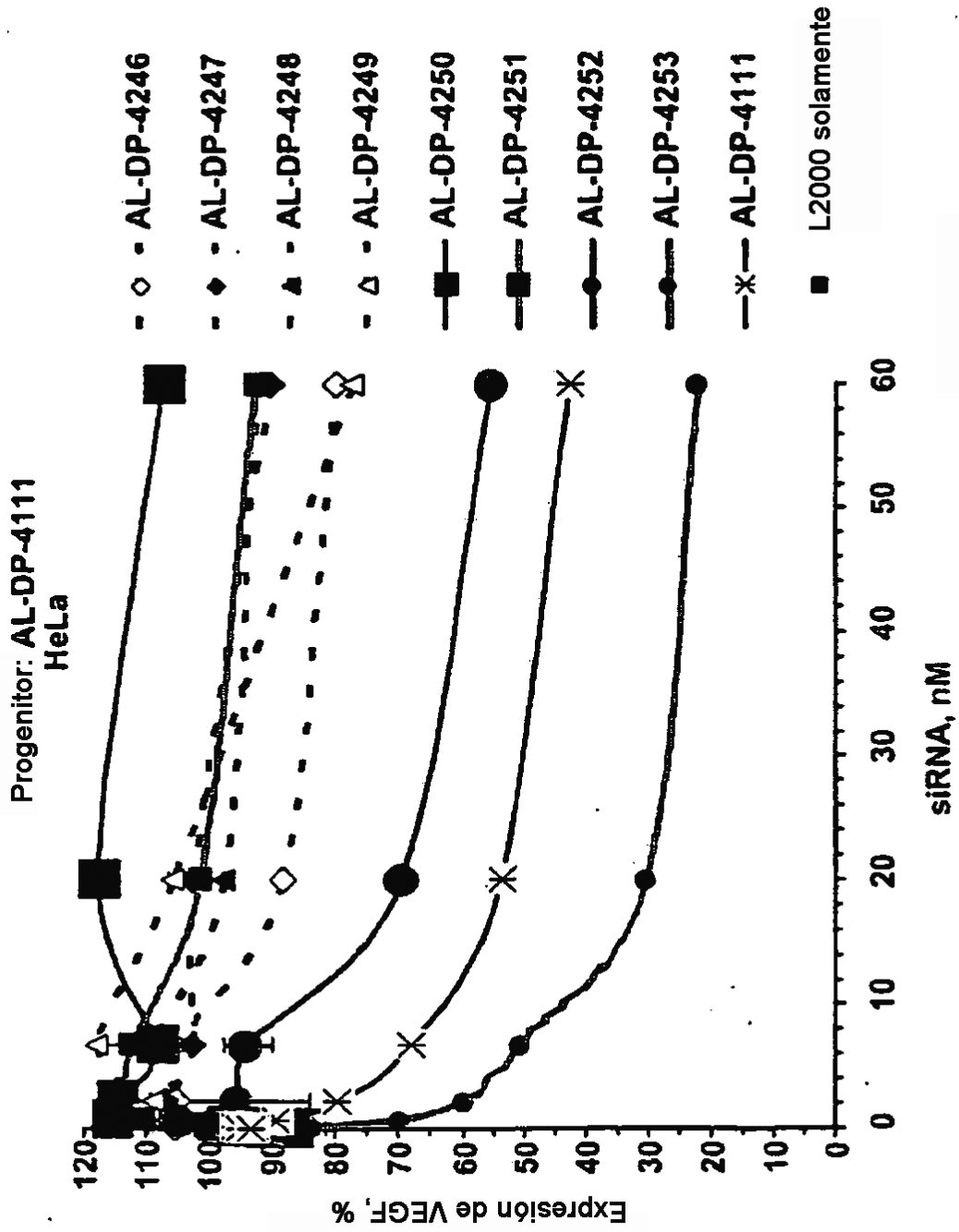


FIG. 17



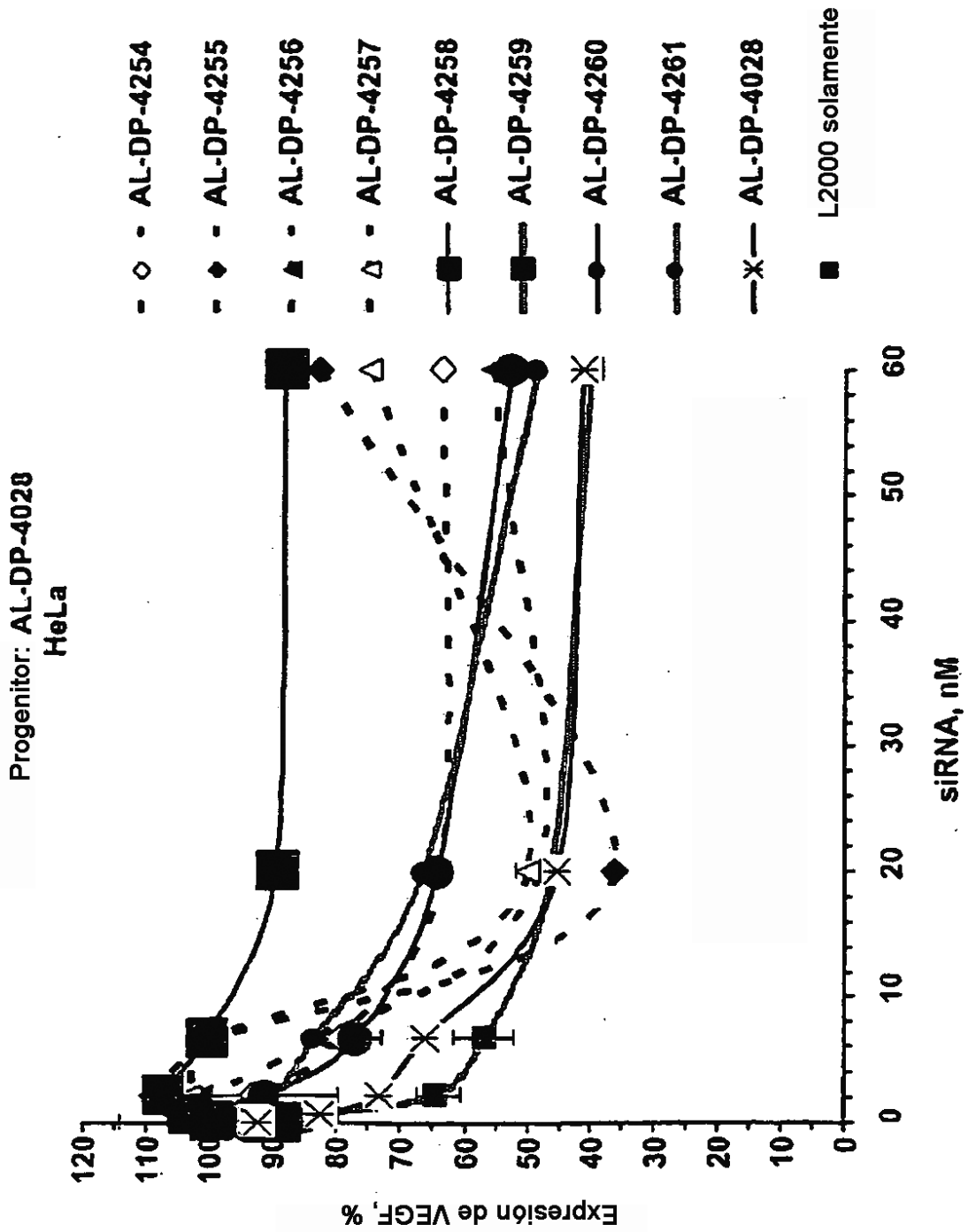


FIG. 18

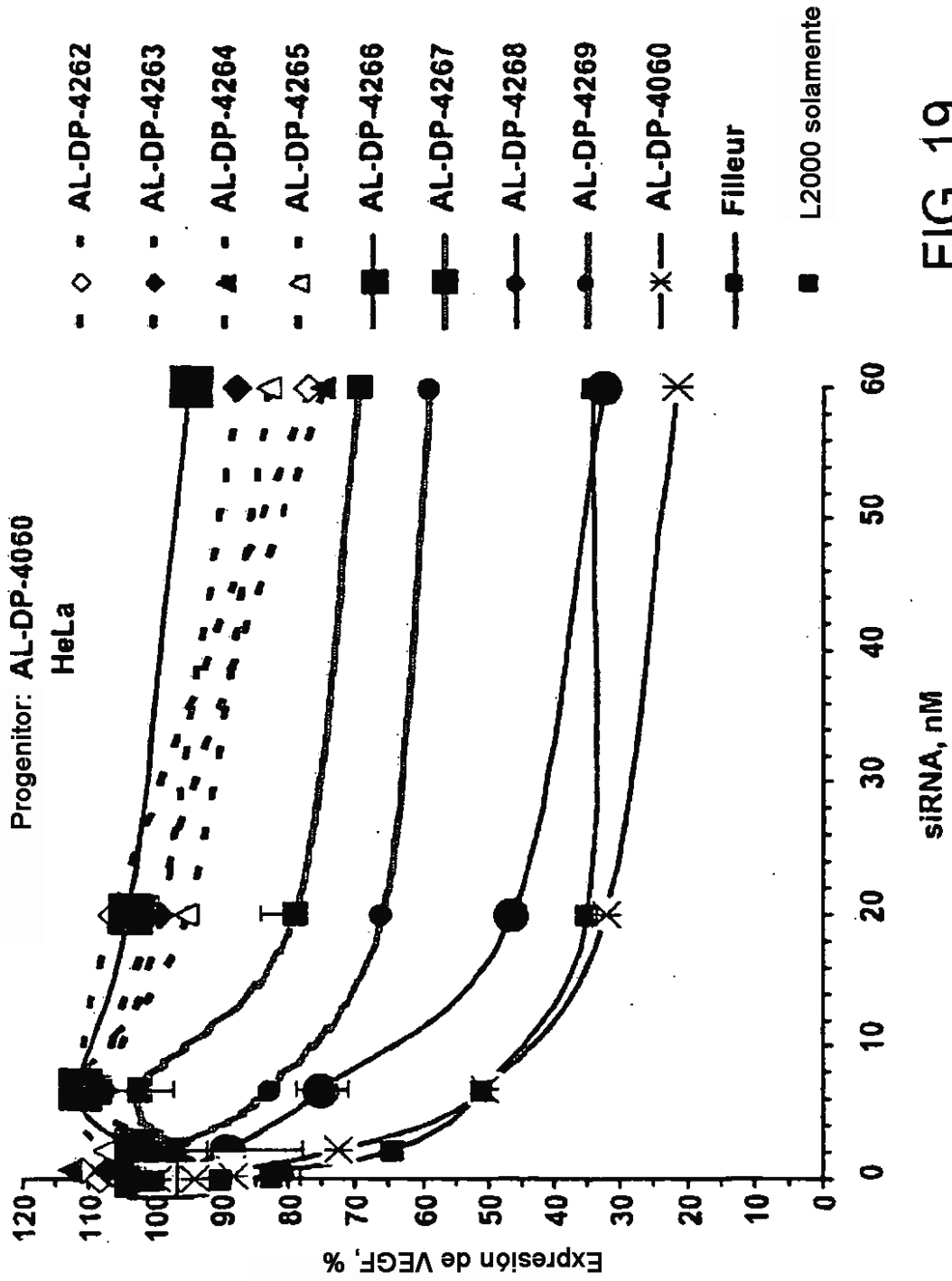


FIG. 19

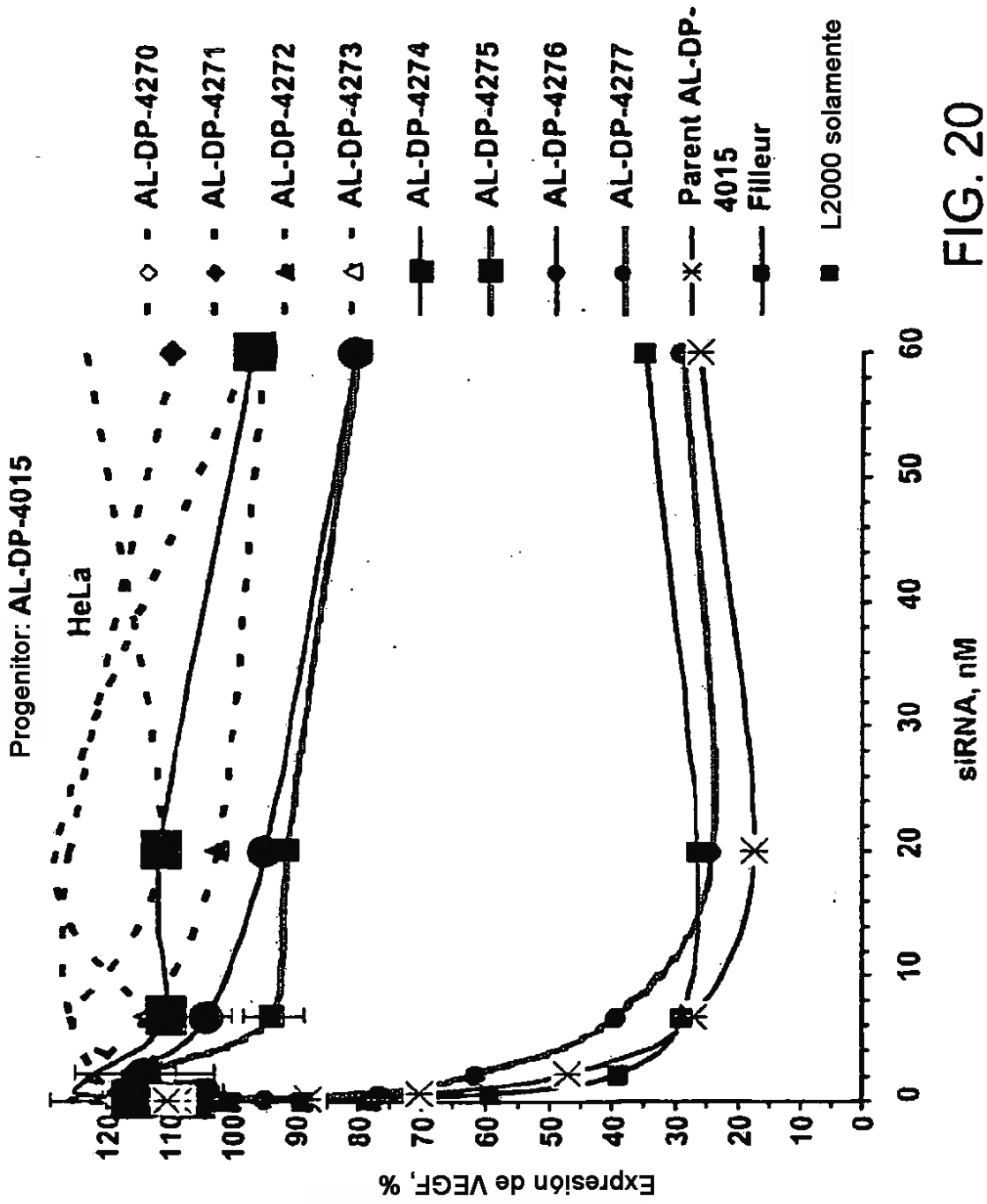


FIG. 20

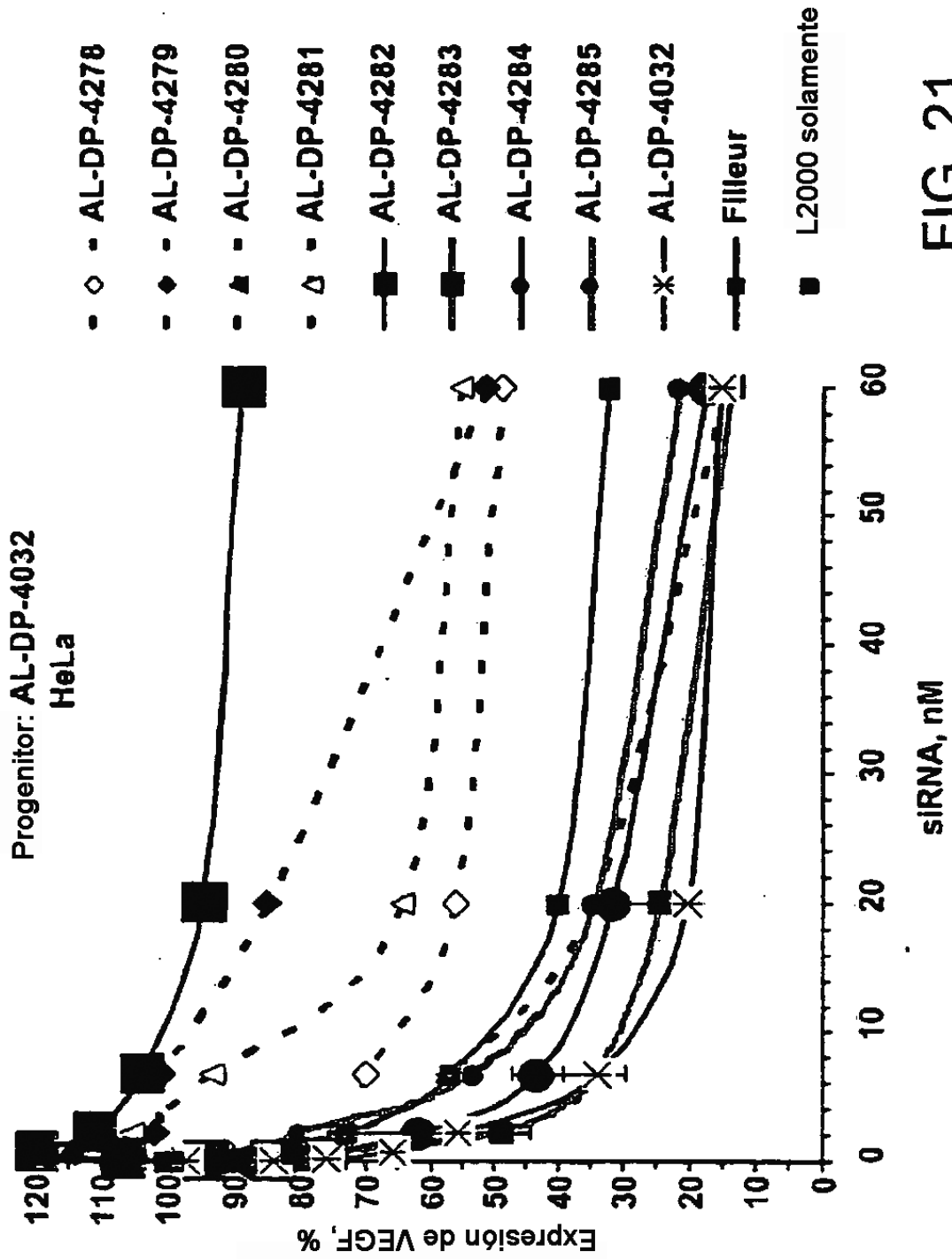


FIG. 21

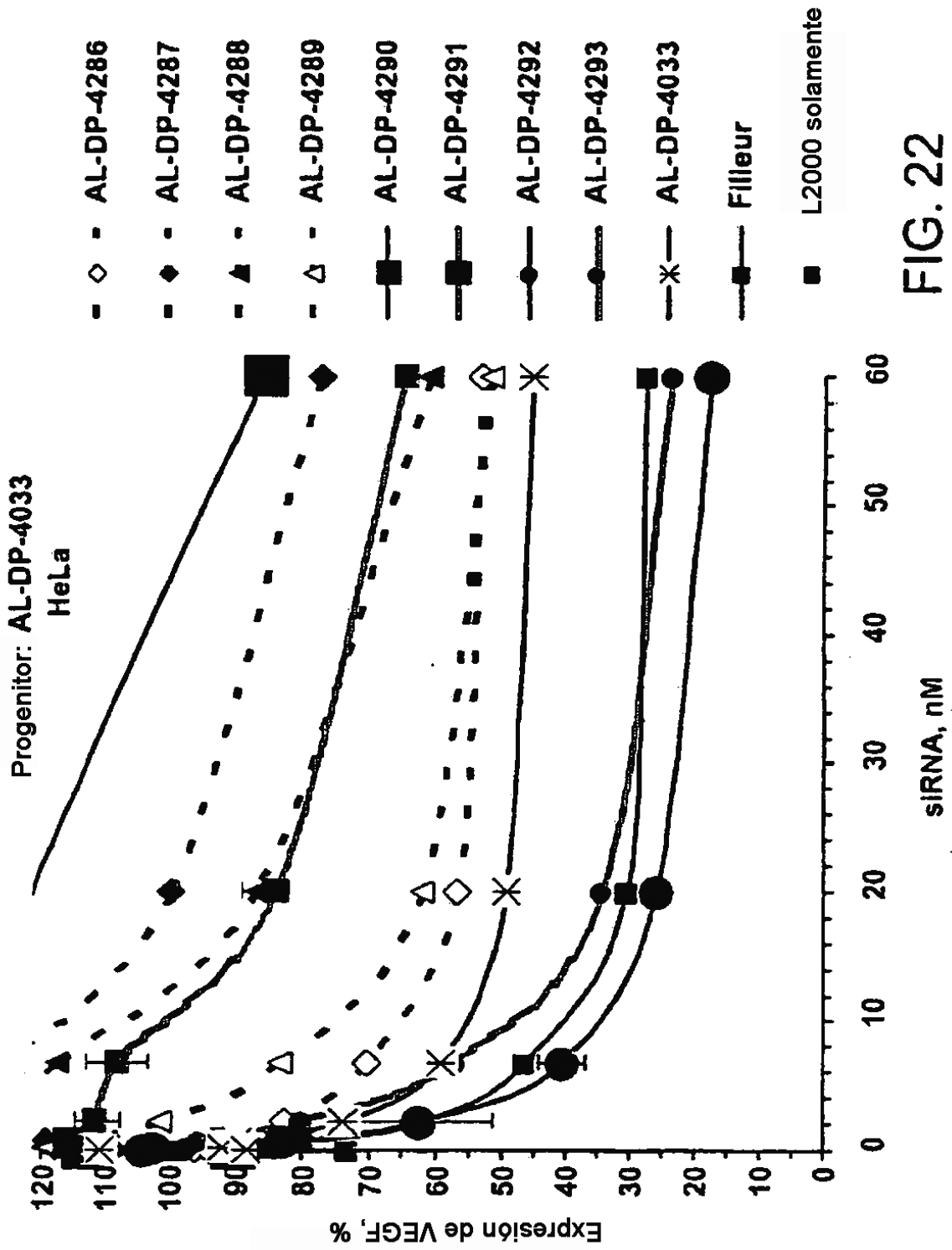


FIG. 22

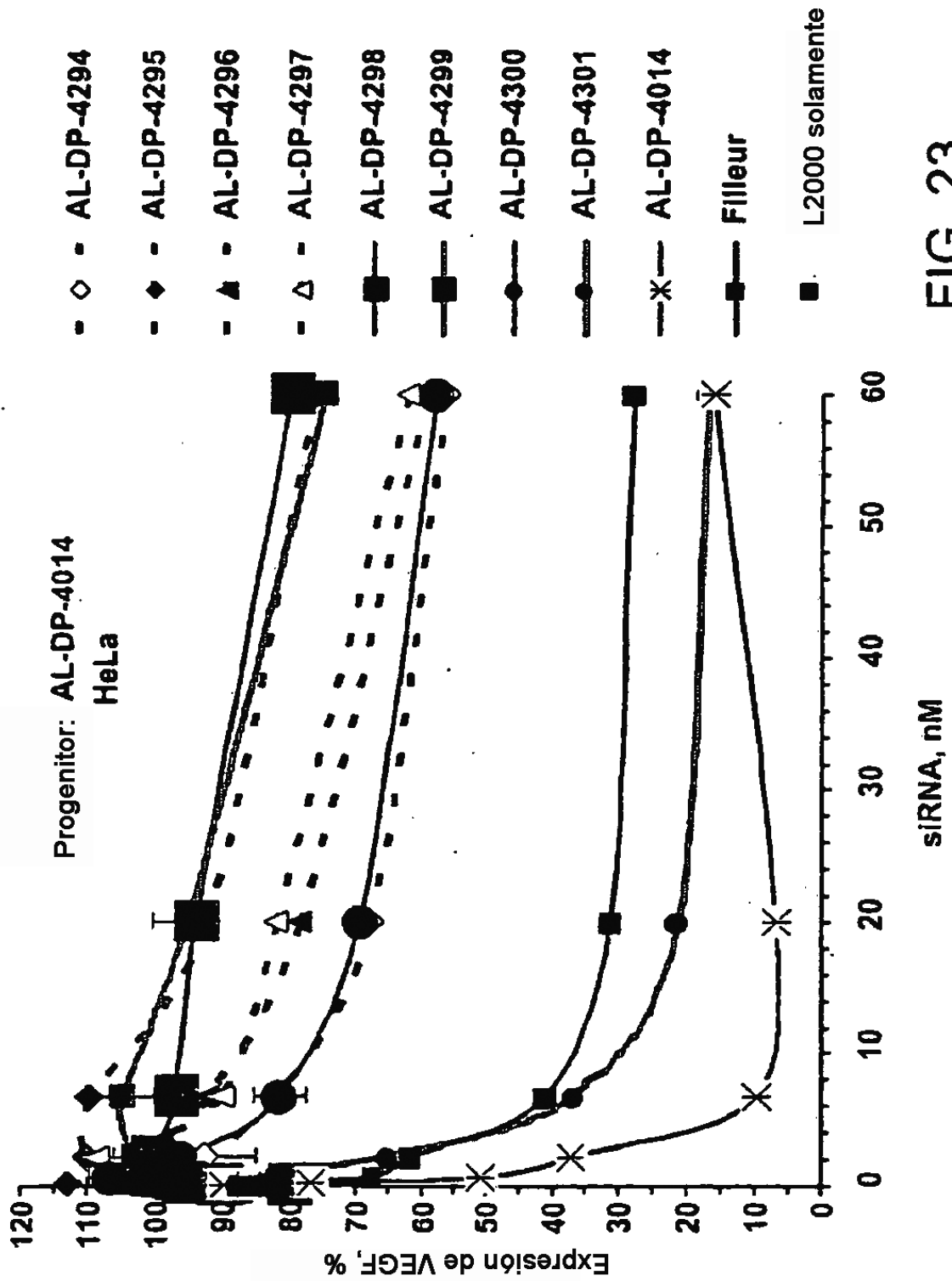


FIG. 23

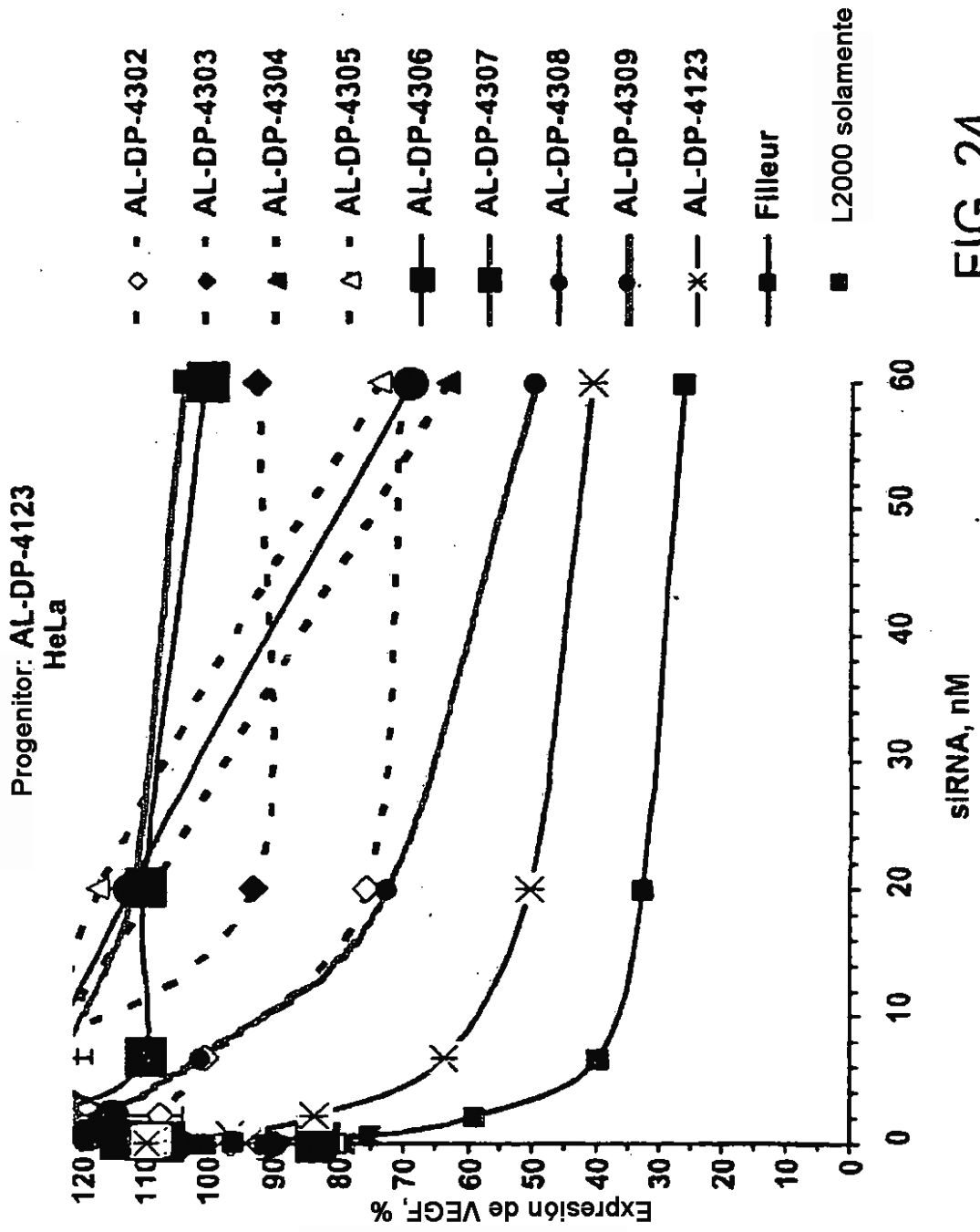


FIG. 24

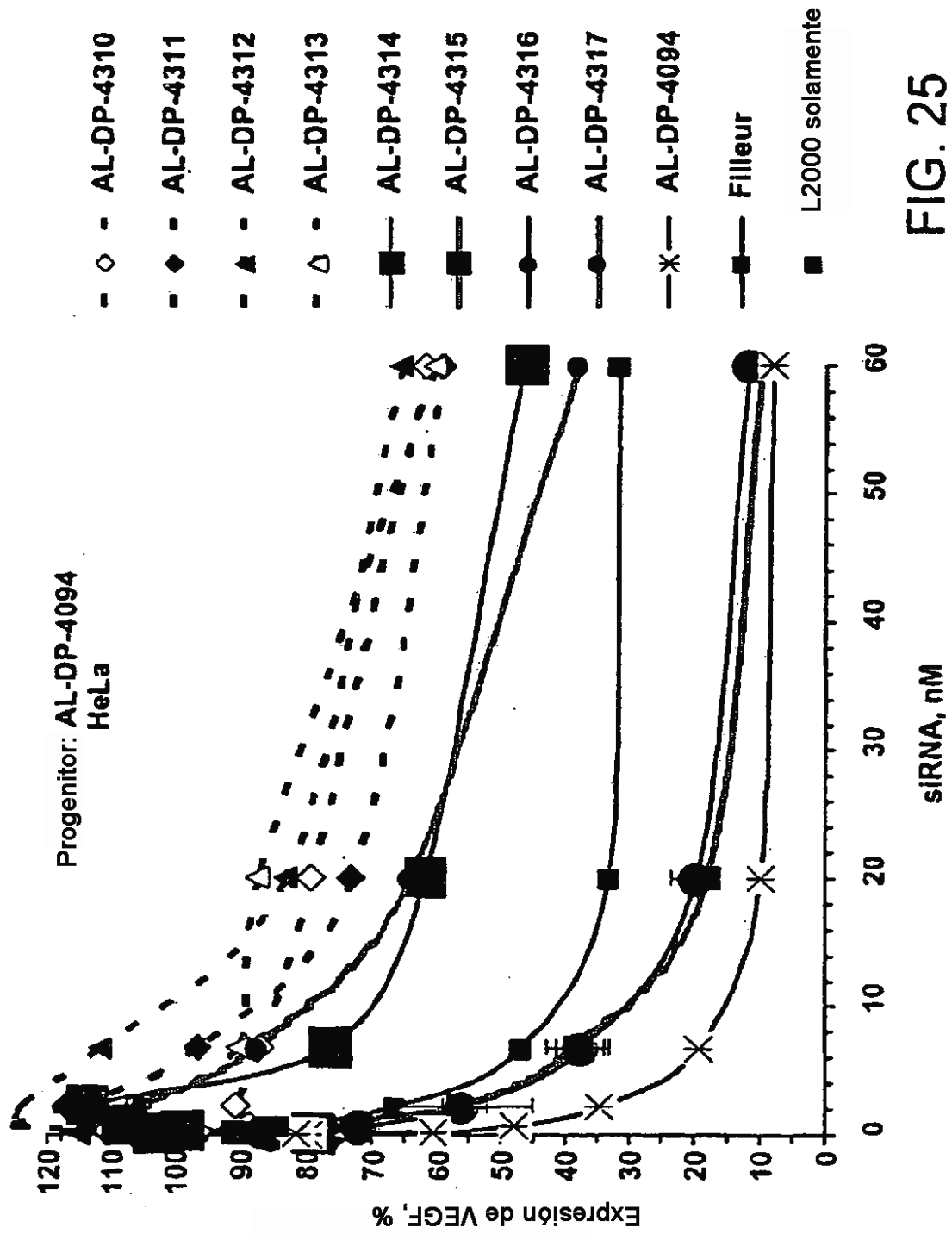


FIG. 25



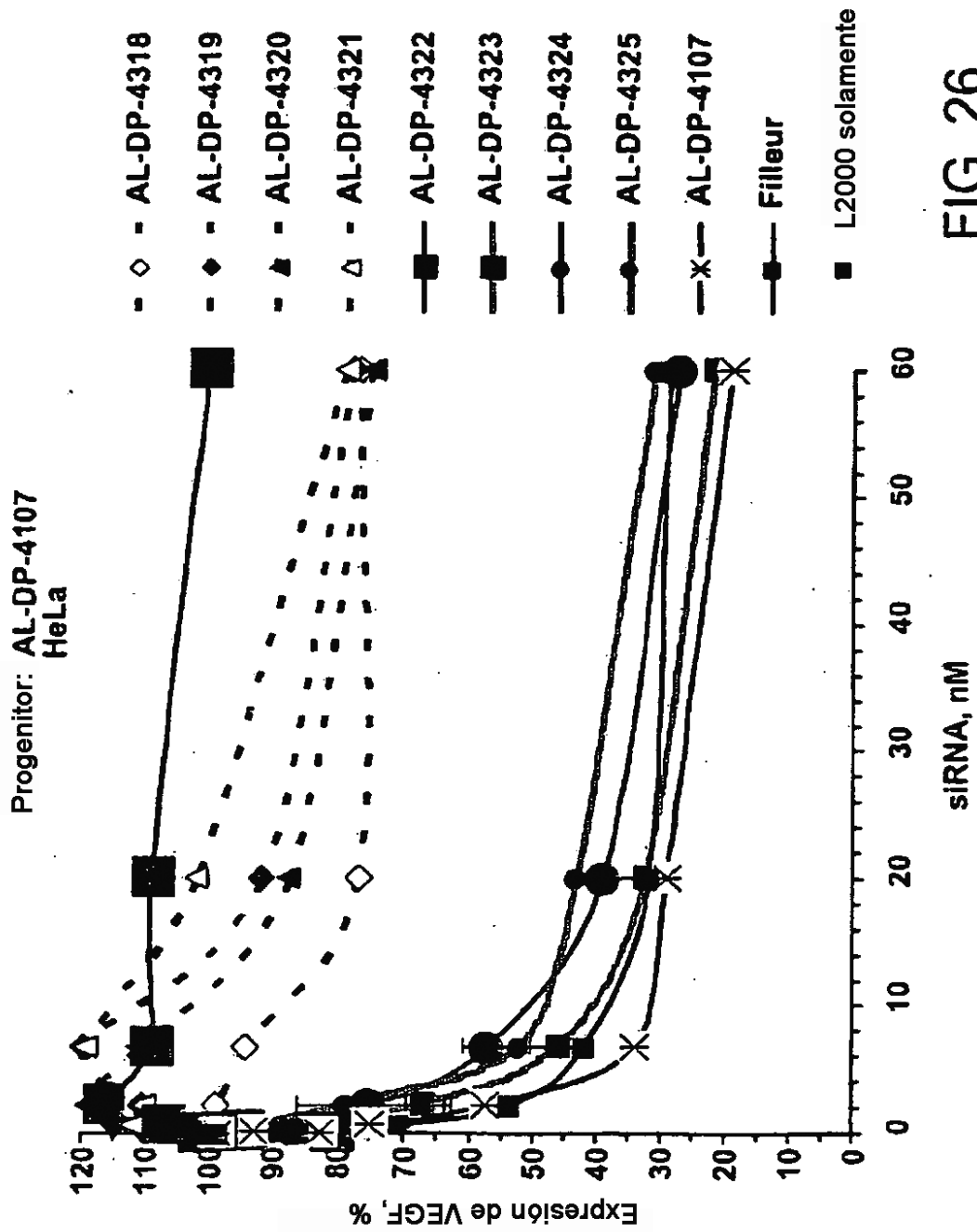


FIG. 26

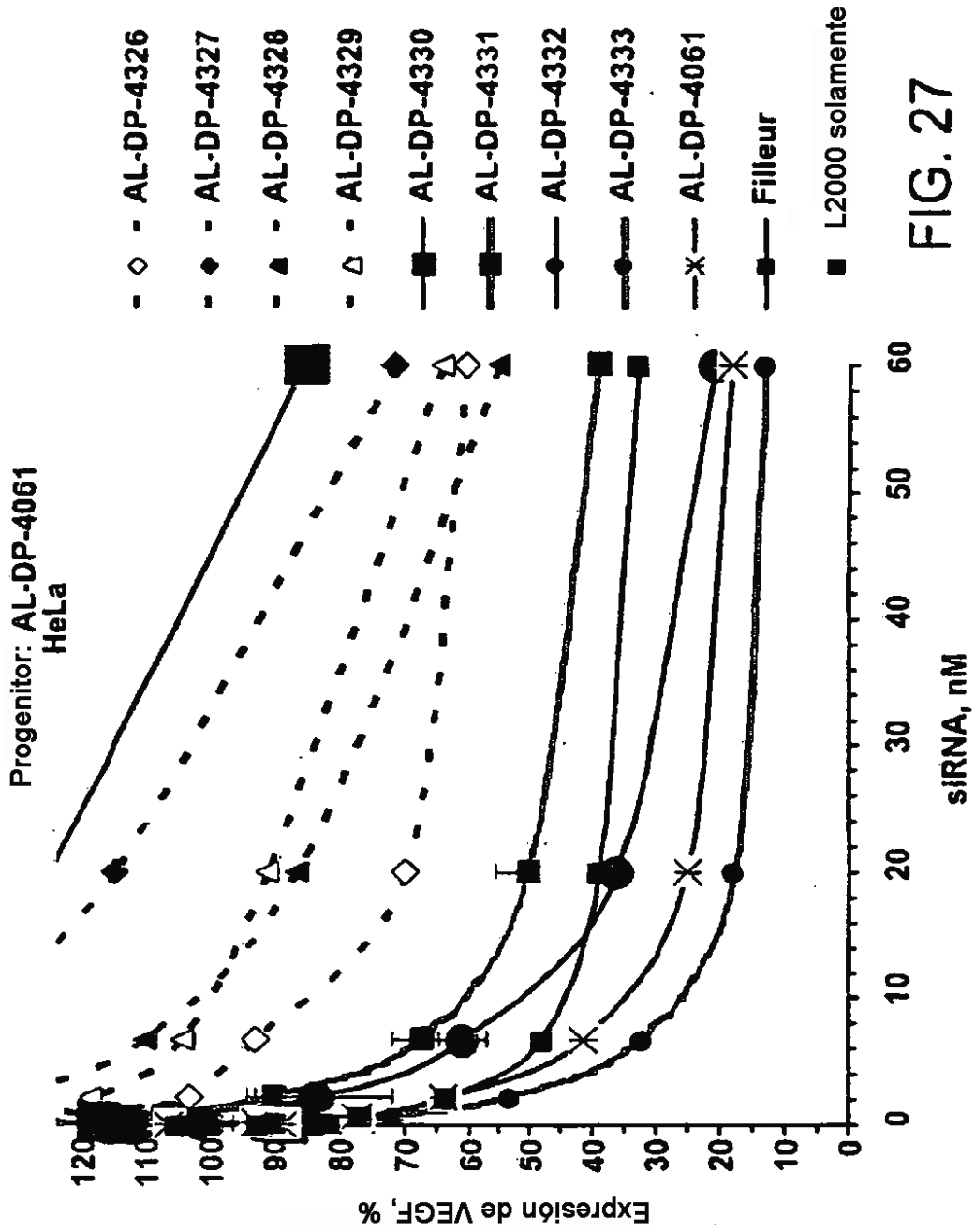


FIG. 27

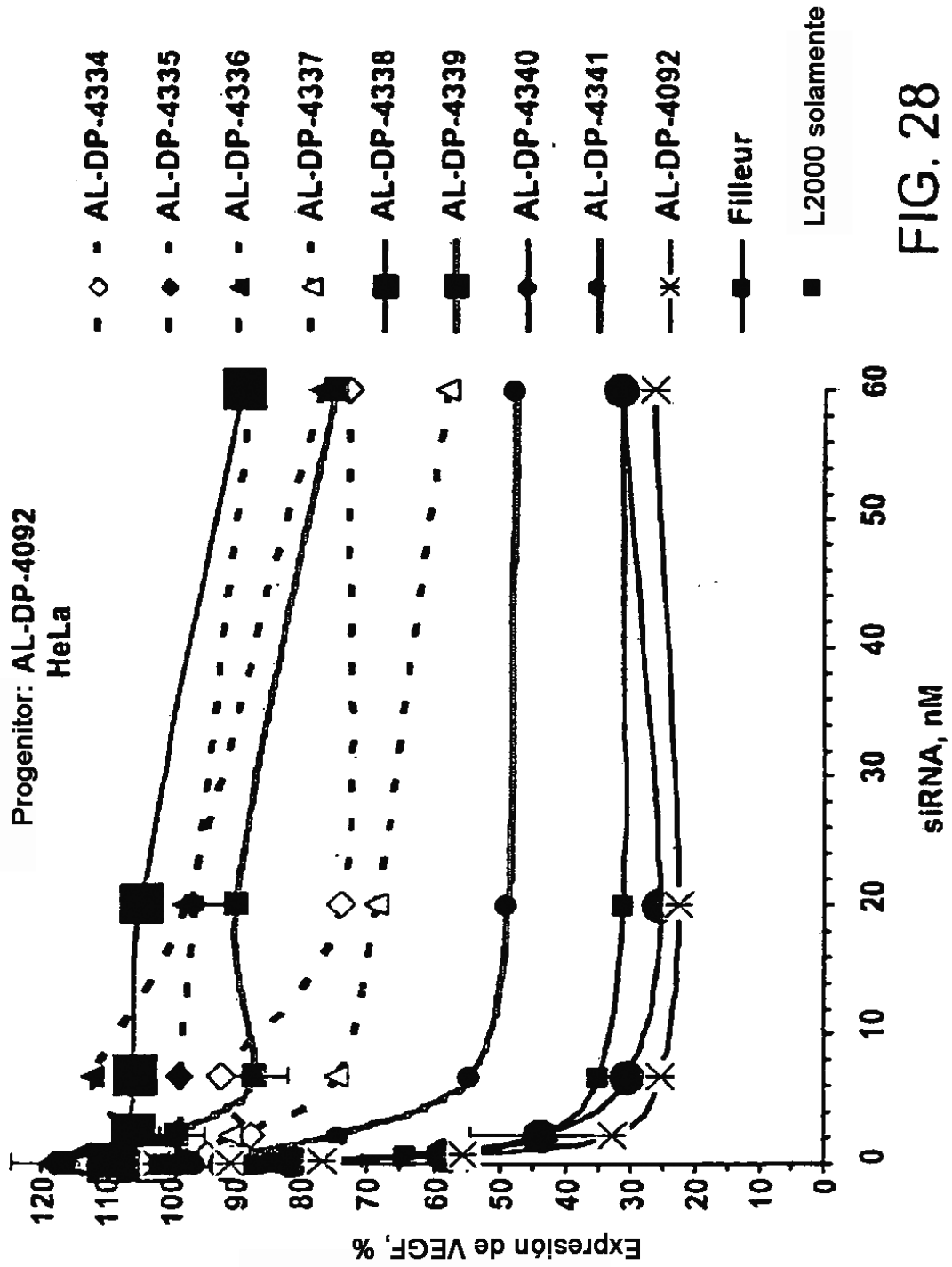


FIG. 28

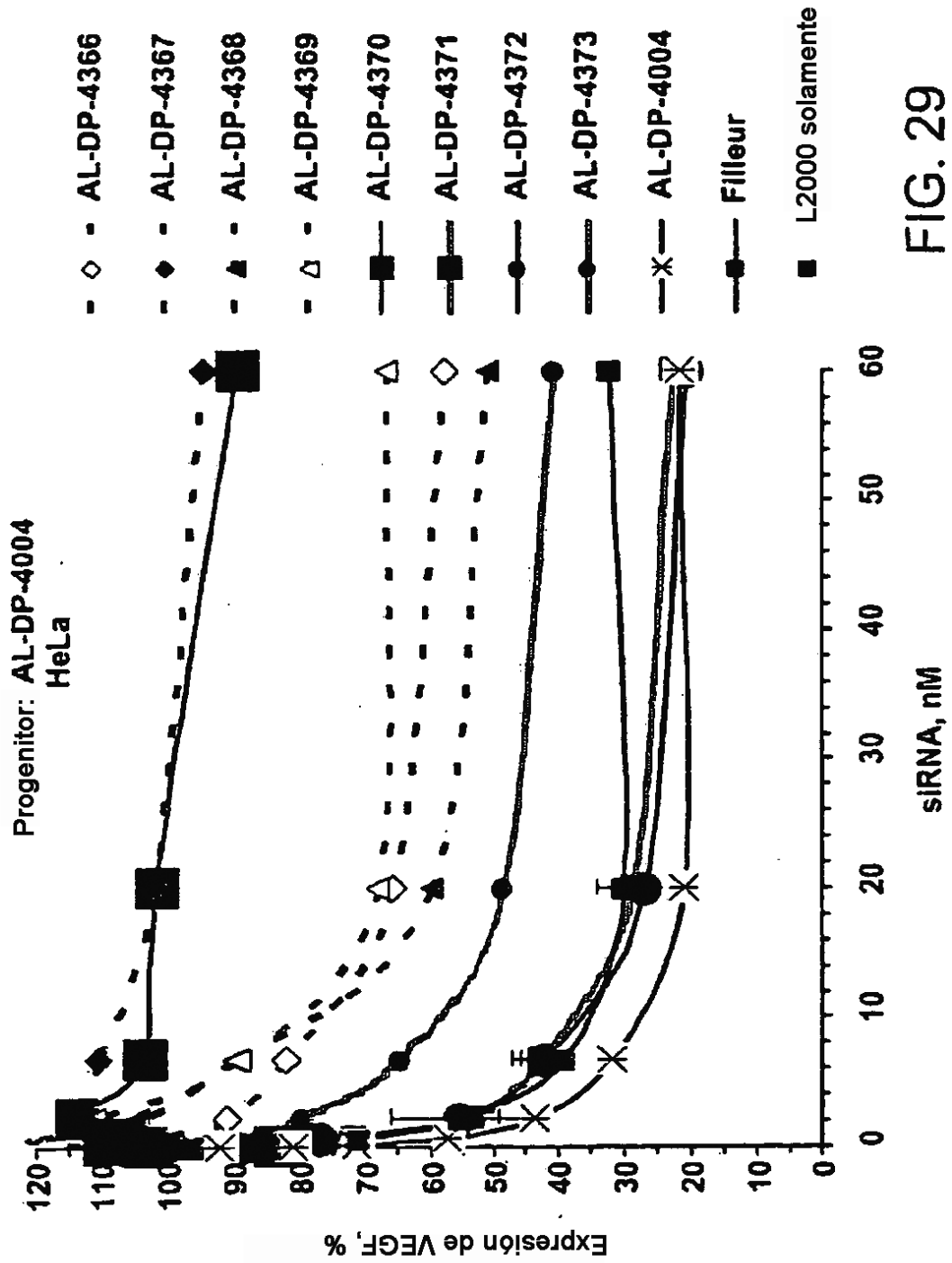


FIG. 29

2'OMe y 2'F alternos

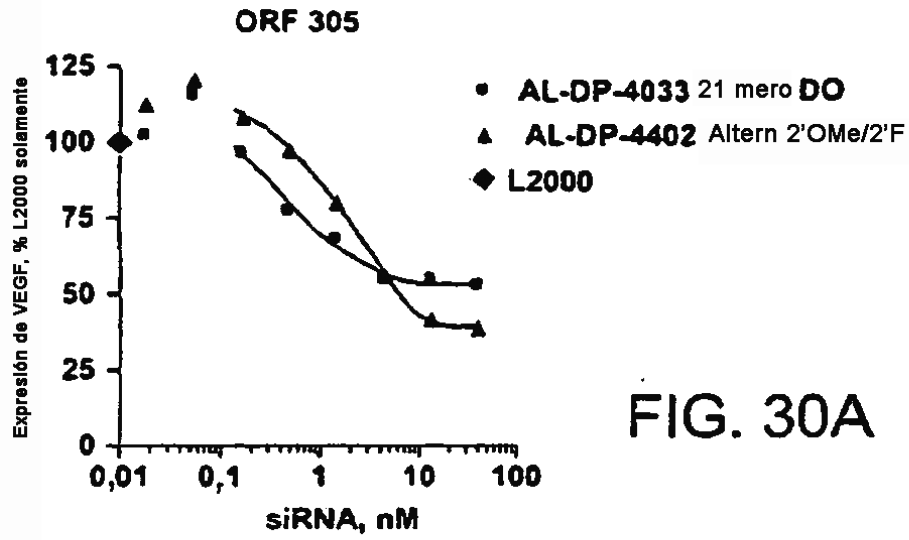


FIG. 30A

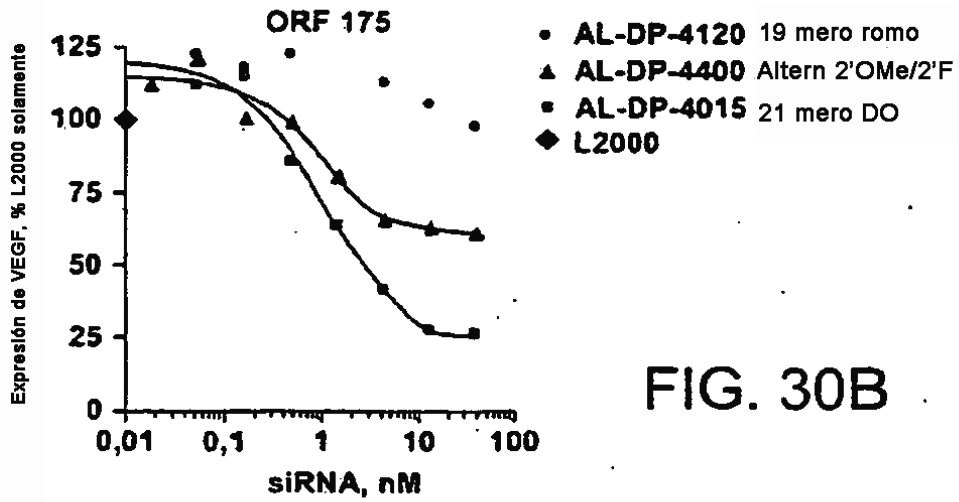


FIG. 30B

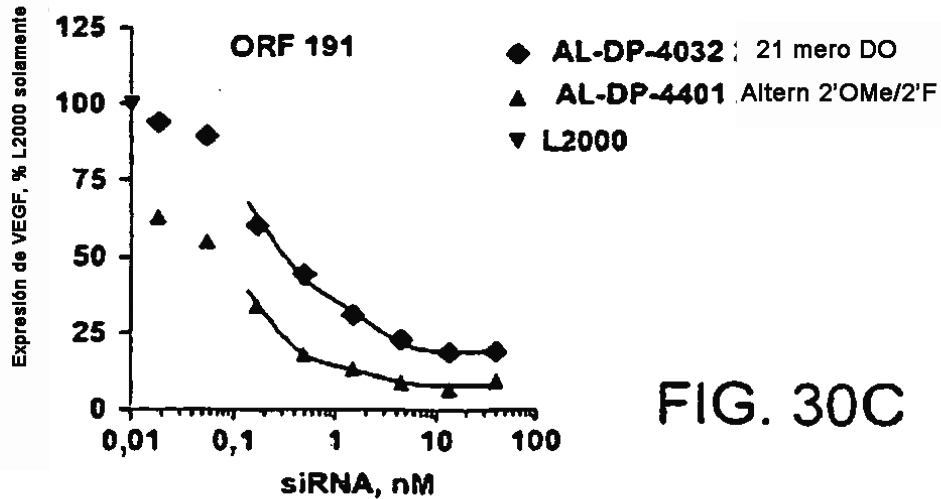


FIG. 30C

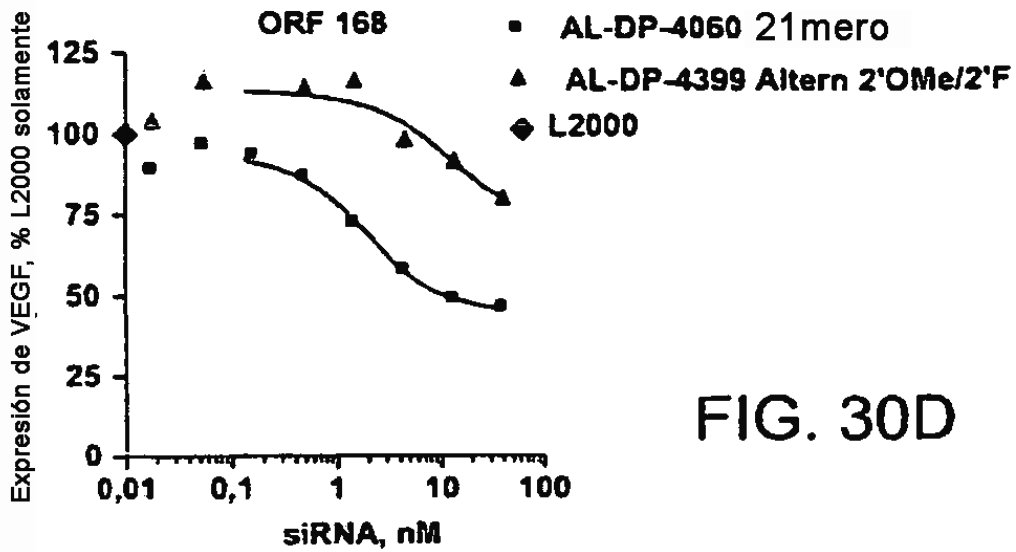


FIG. 30D

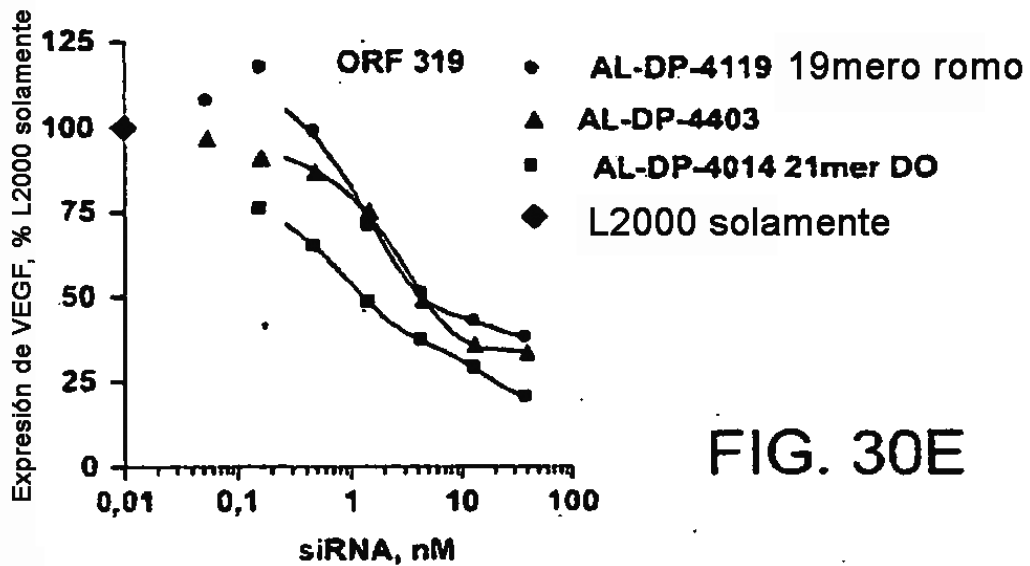


FIG. 30E

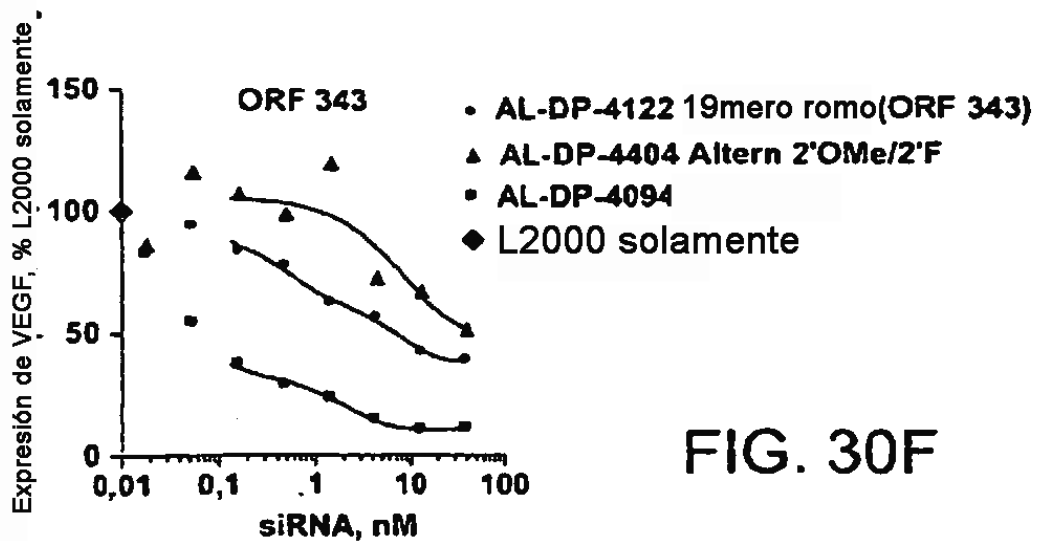
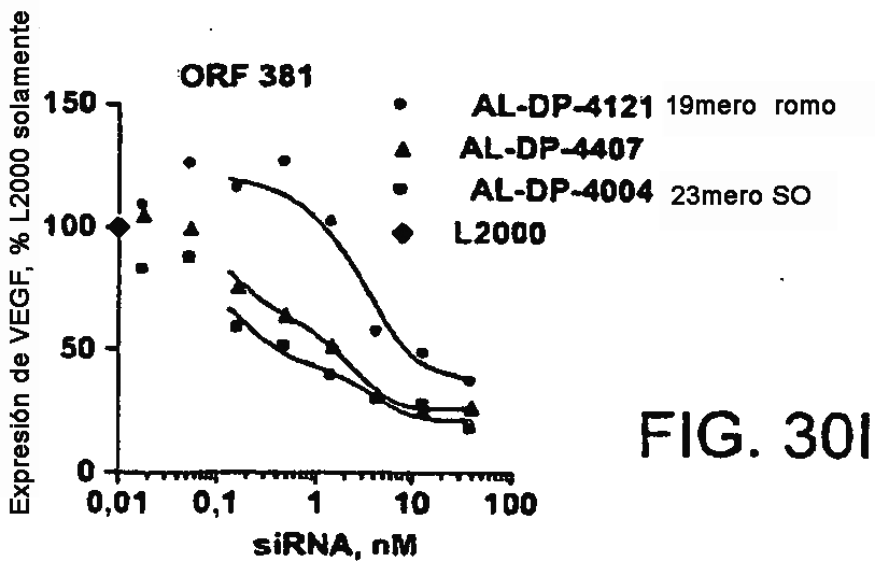
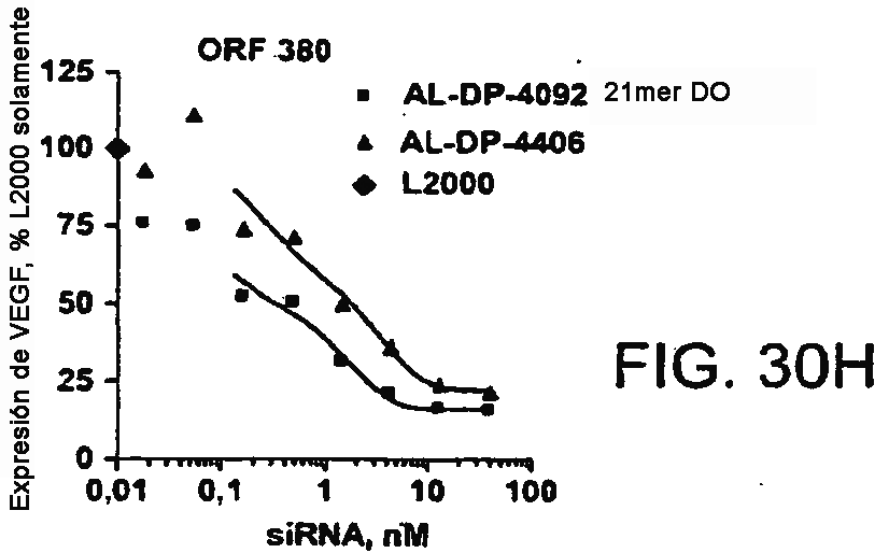
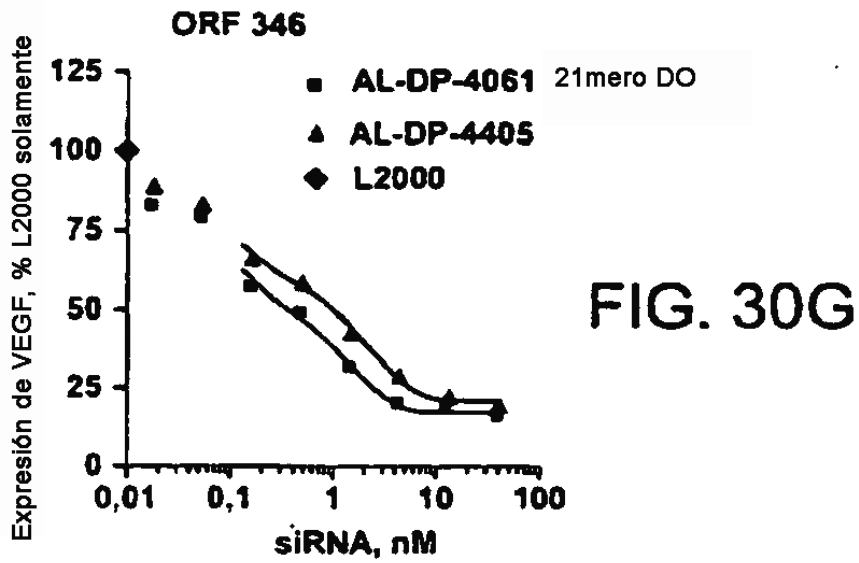


FIG. 30F



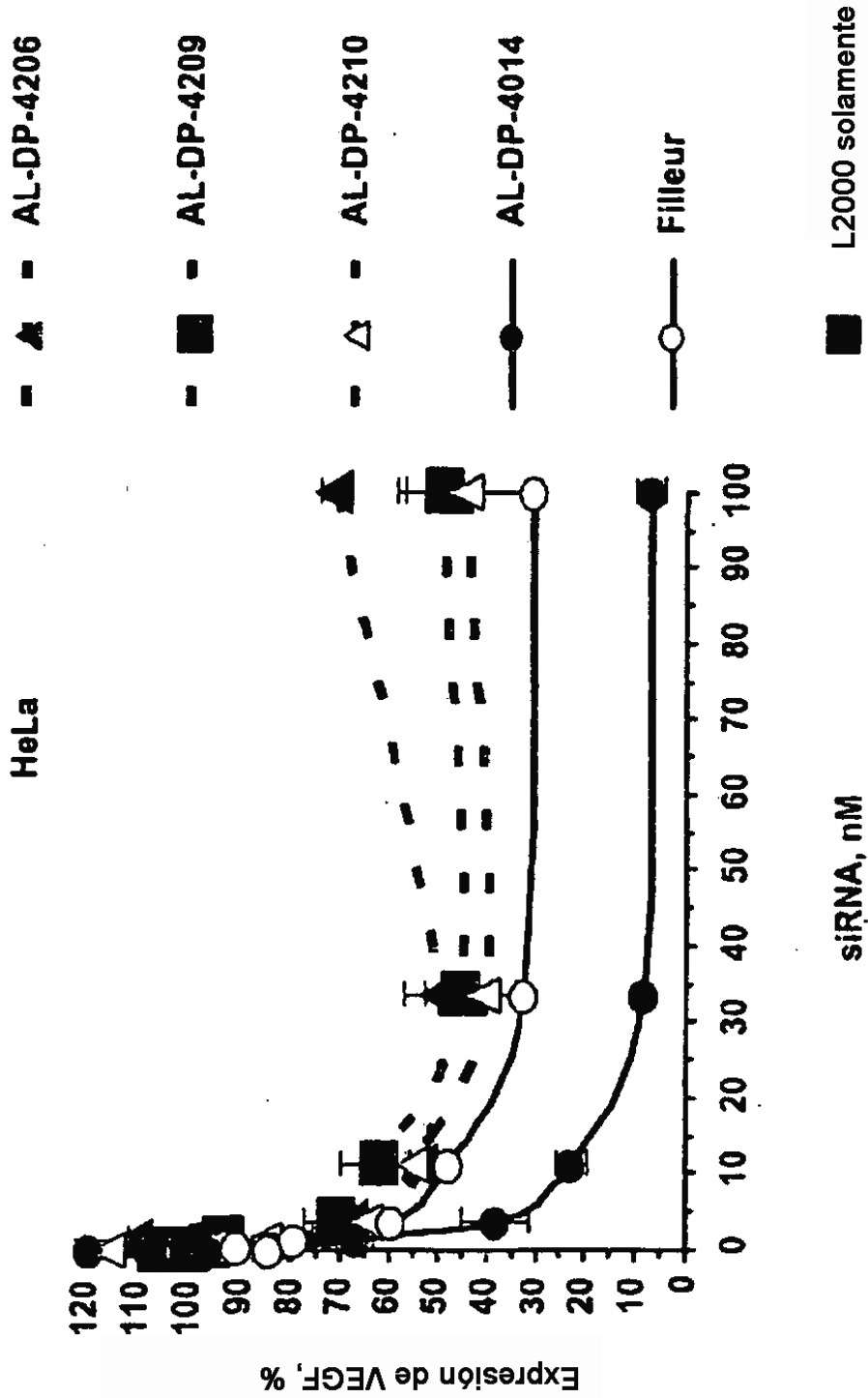


FIG. 31



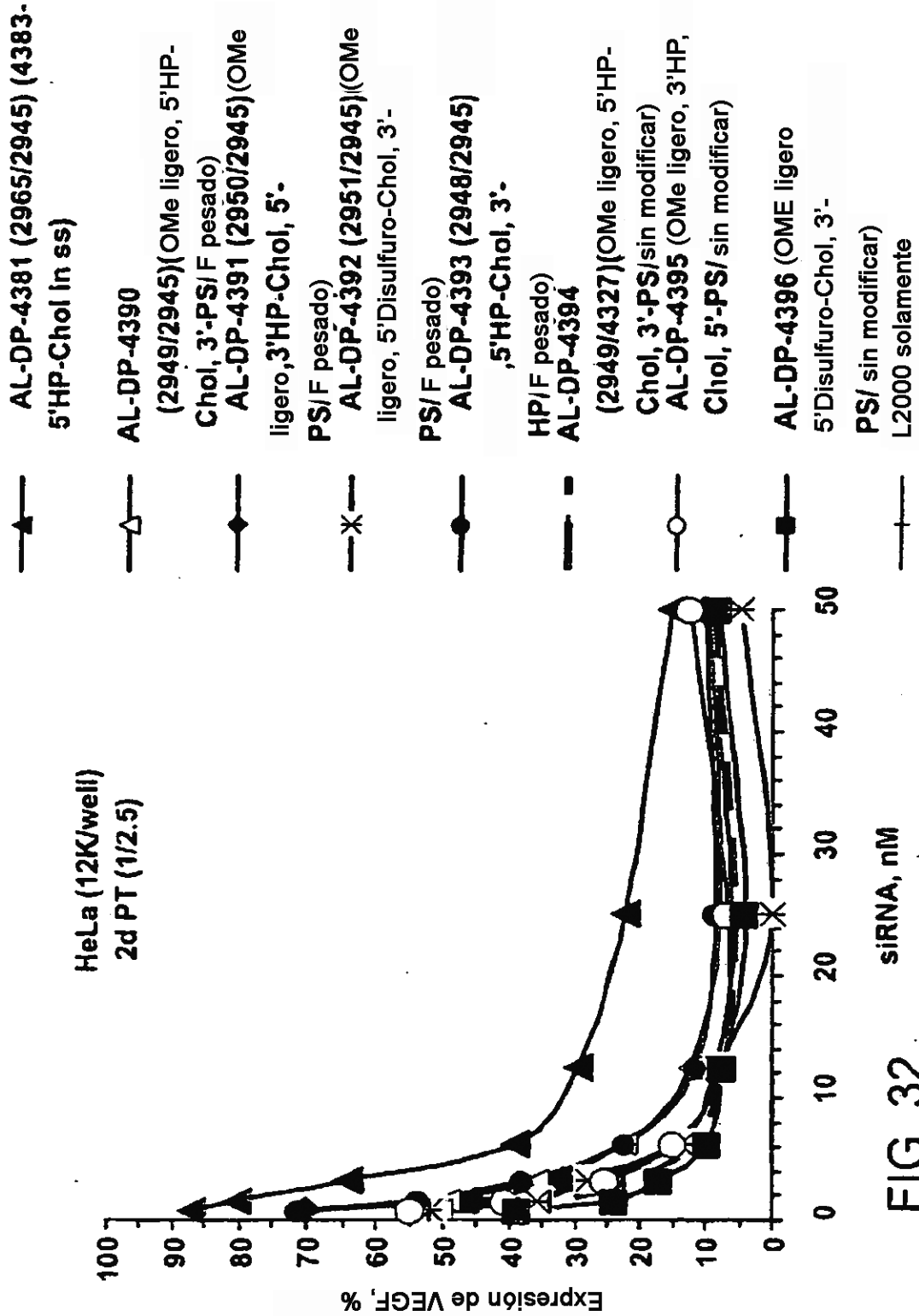


FIG. 32

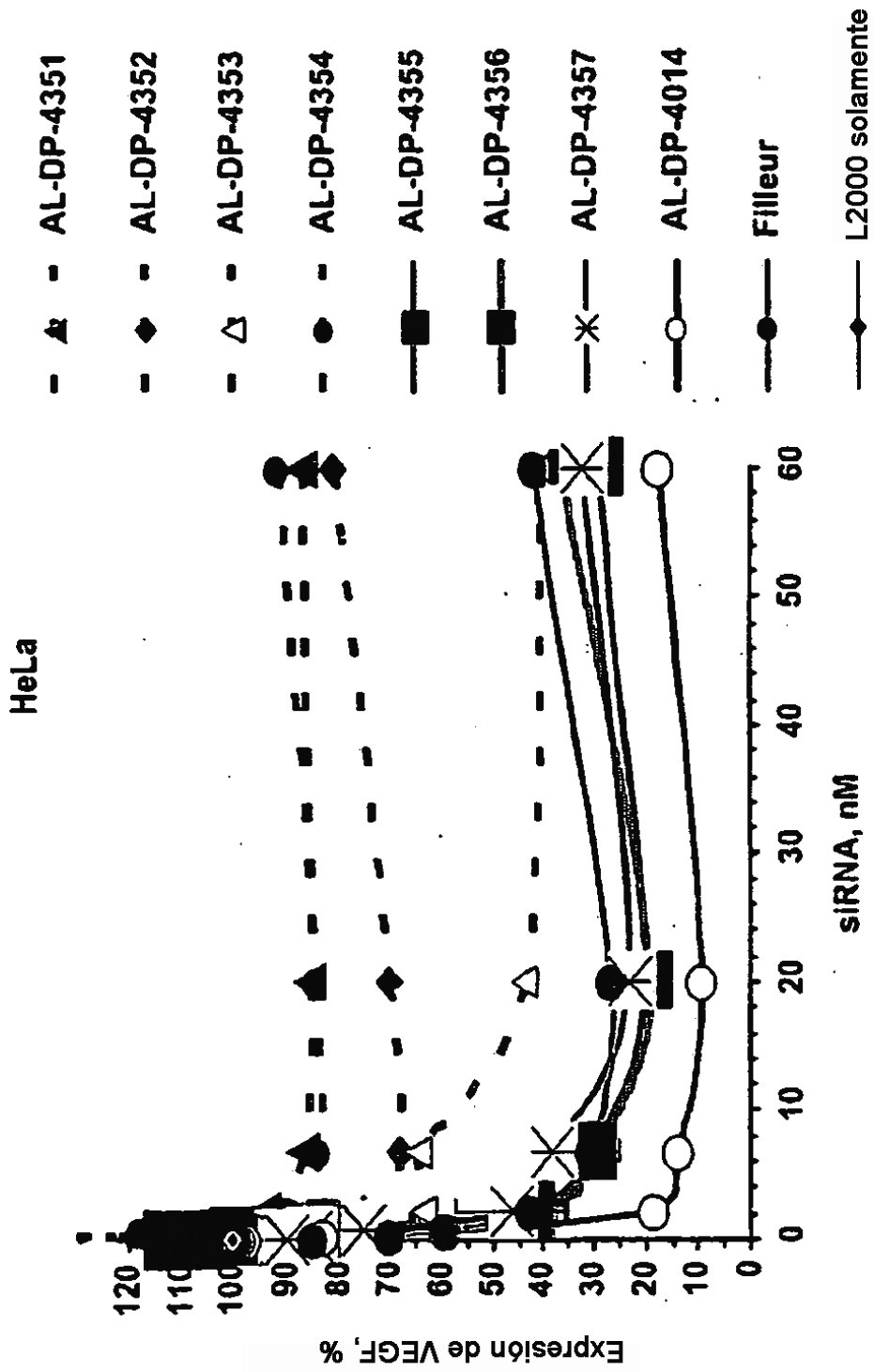


FIG. 33

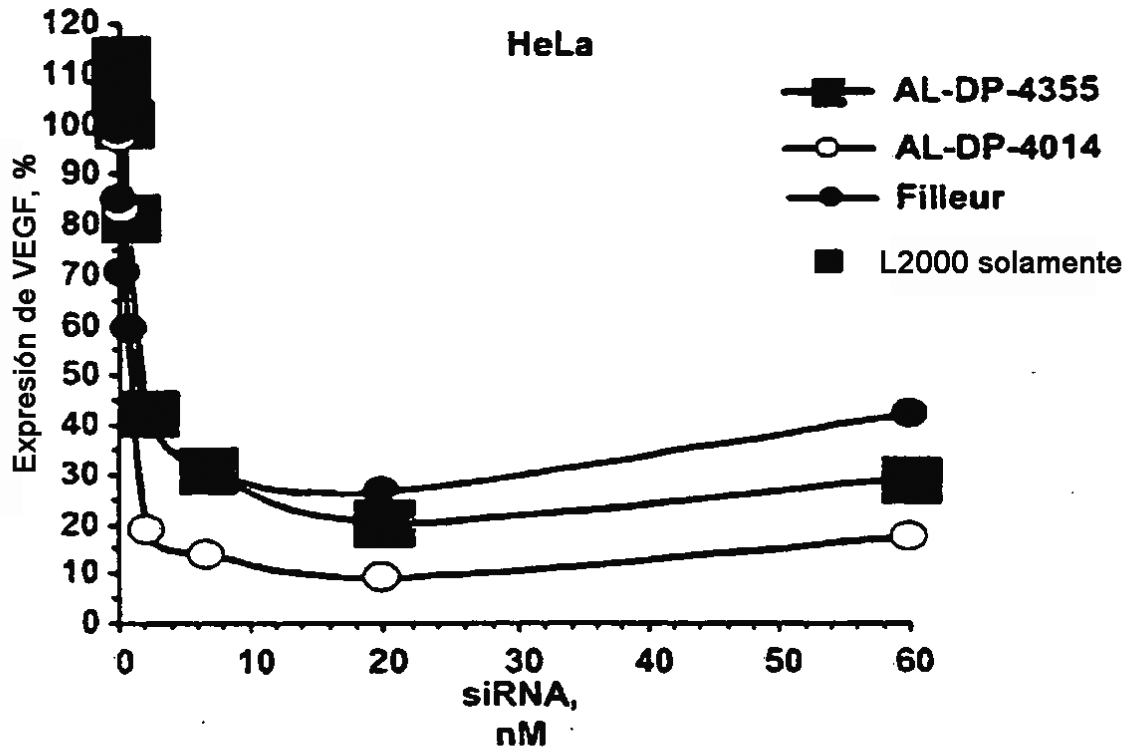
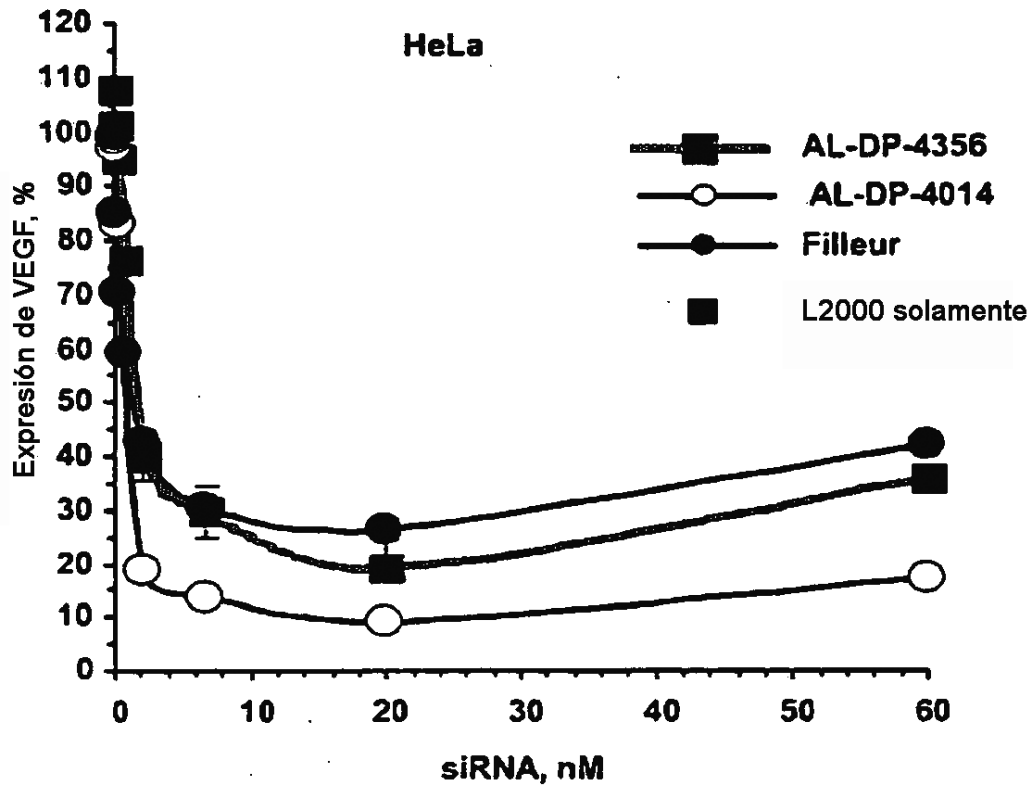


FIG. 34



**FIG. 35**

(A) Conjugados a 5'-retinal (en ss) de 4094 sin modificar y 4094 3'PS

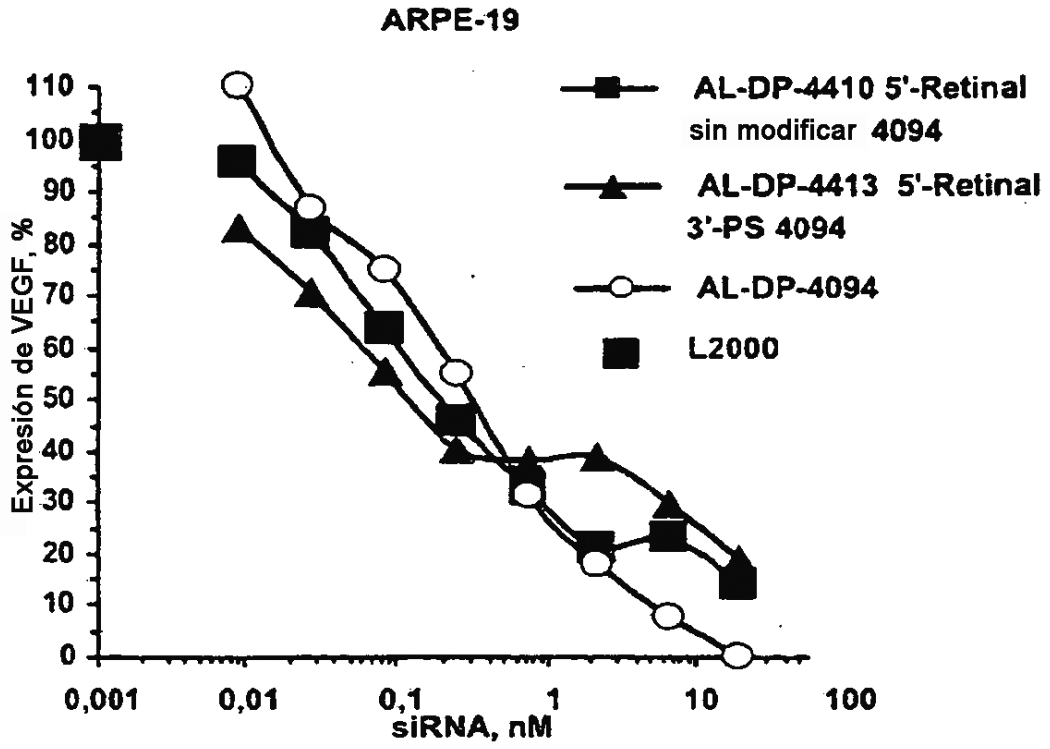


FIG. 36

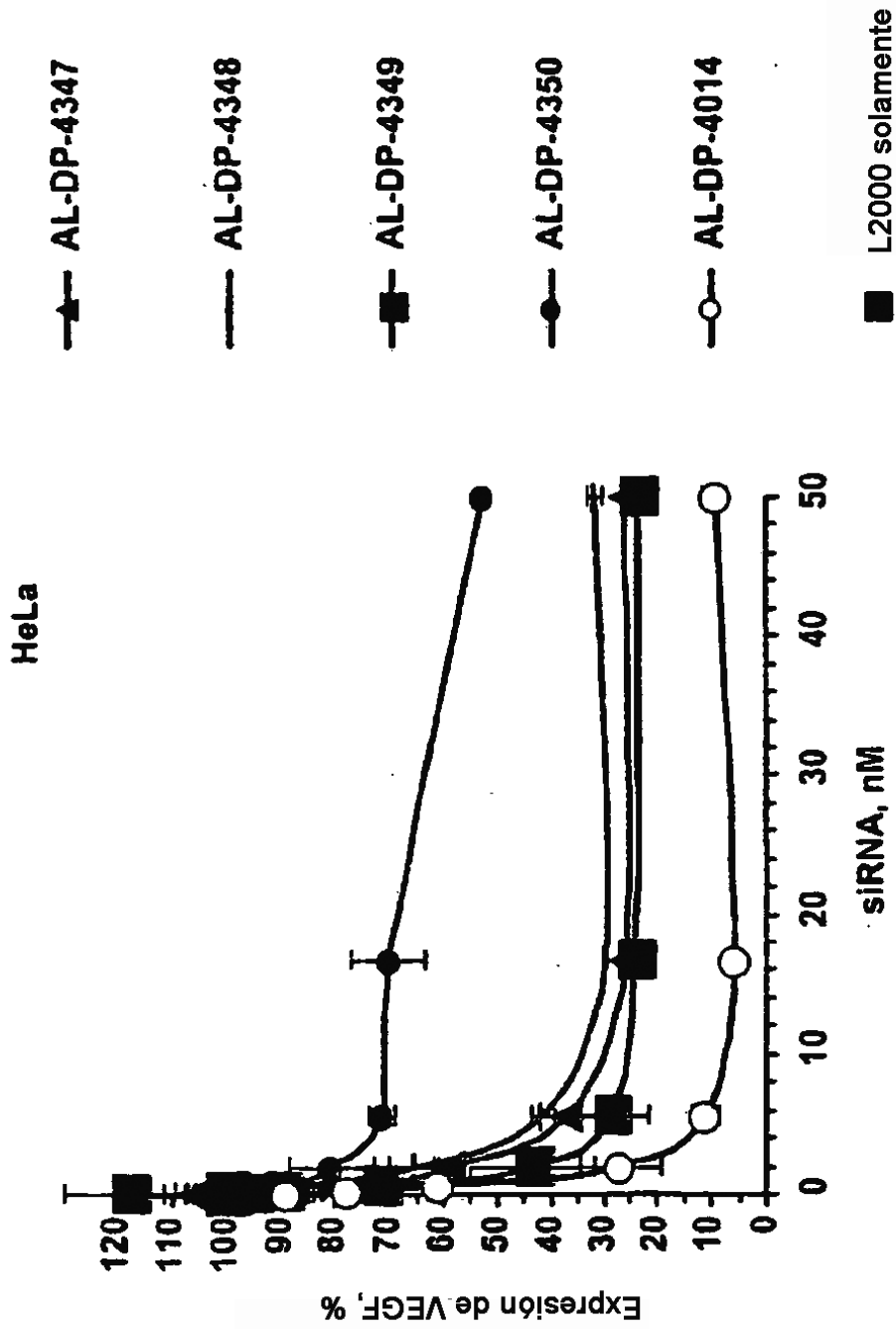


FIG. 37

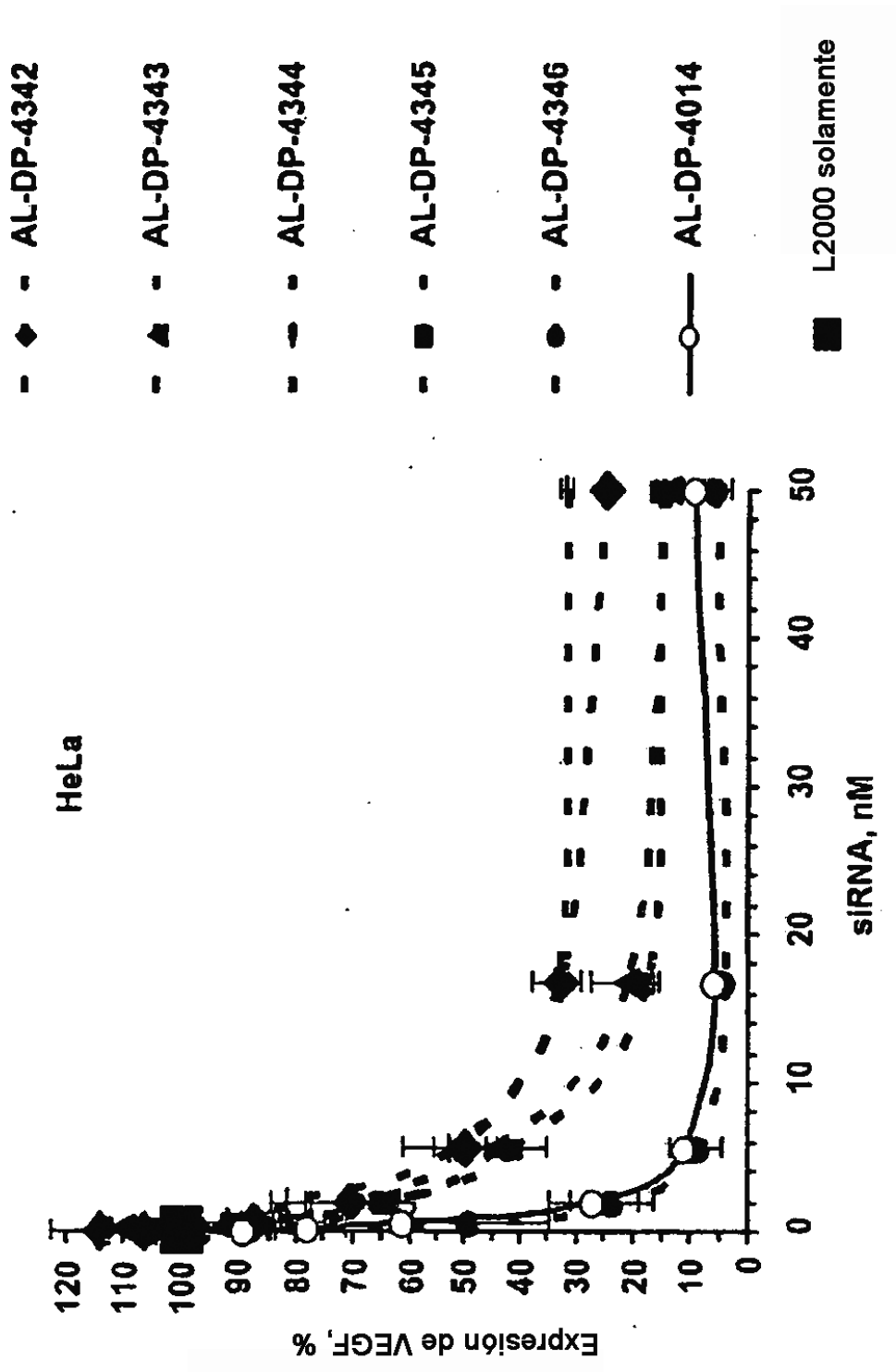
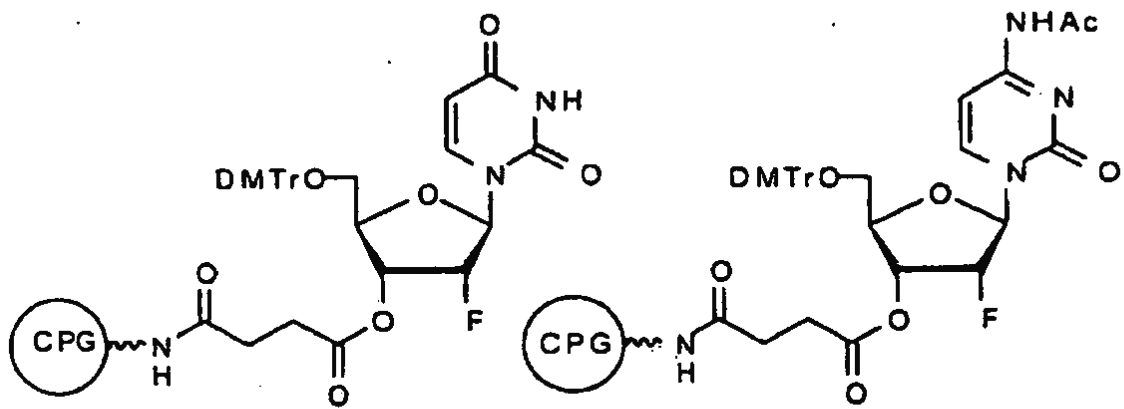
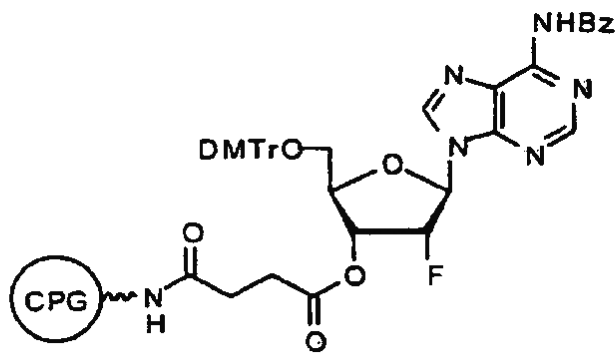


FIG. 38

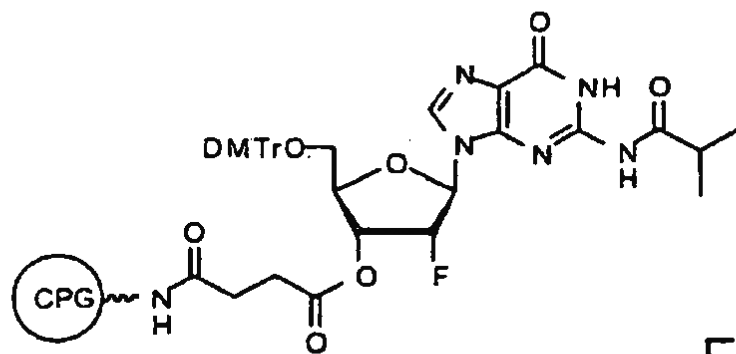


2'-Desoxy-2'-F-U CPG

2'-Desoxy-2'-F-C(N<sup>Ac</sup>) CPG



2'-Desoxy-2'-F-A(N<sup>Bz</sup>) CPG



2'-Desoxy-2'-F-G(N<sup>iBU</sup>) CPG

FIG. 39



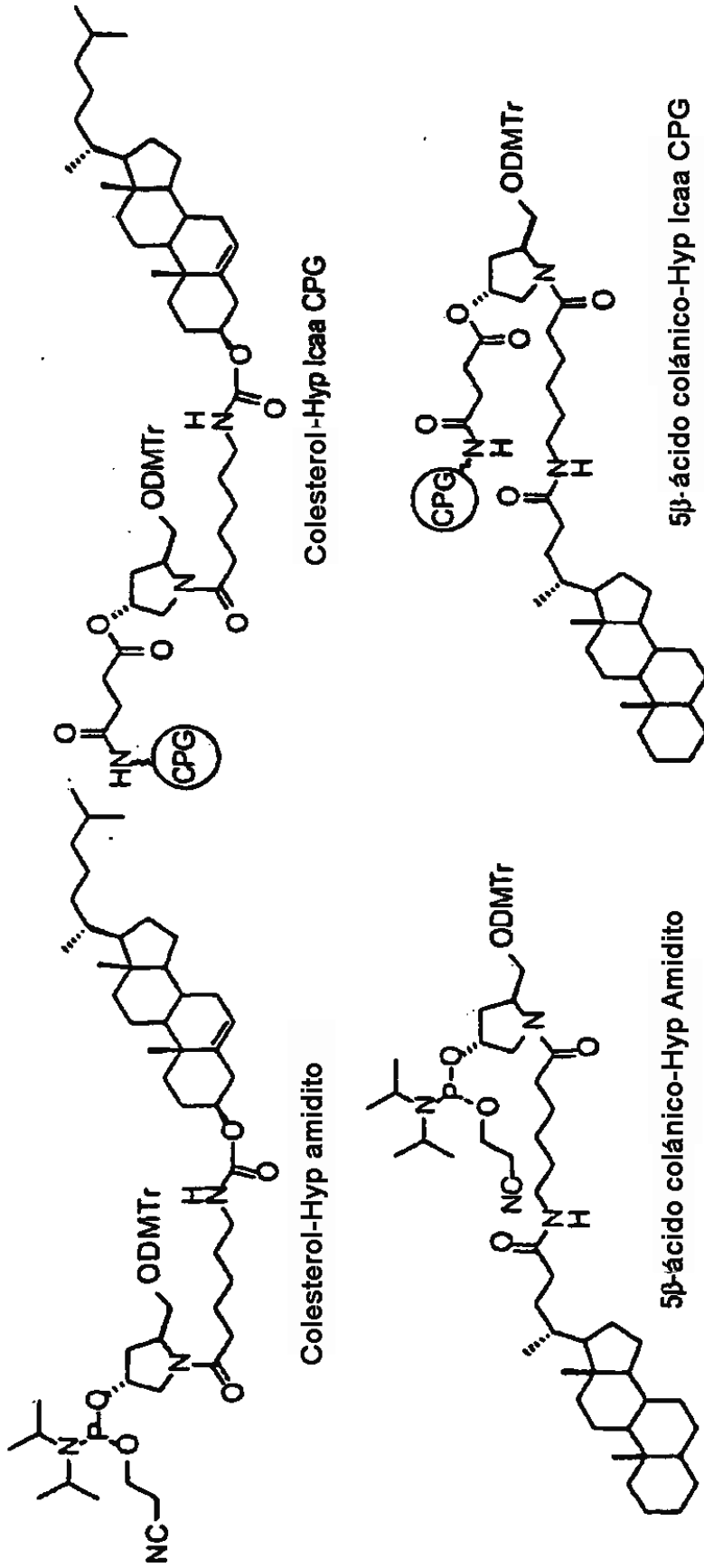


FIG. 40

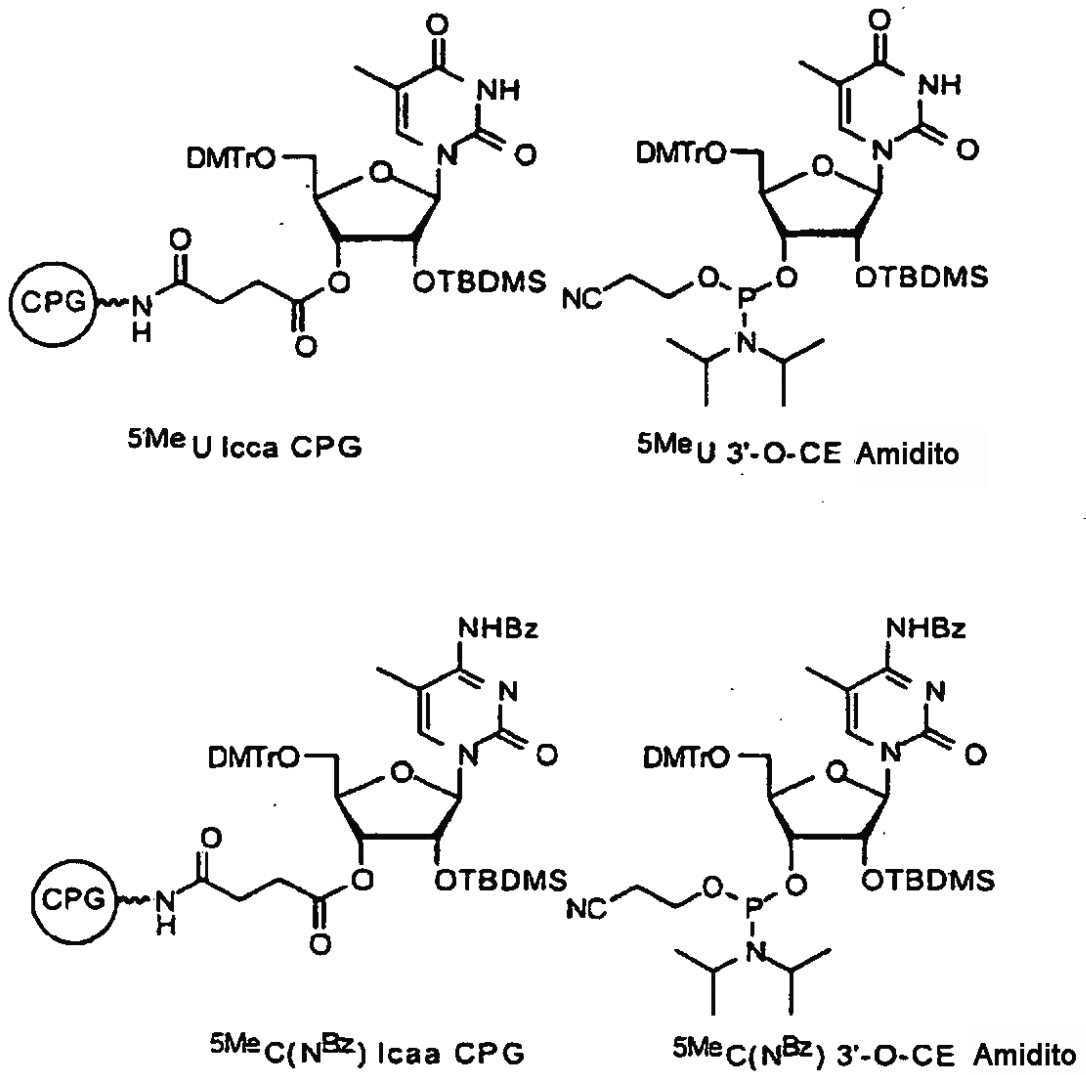
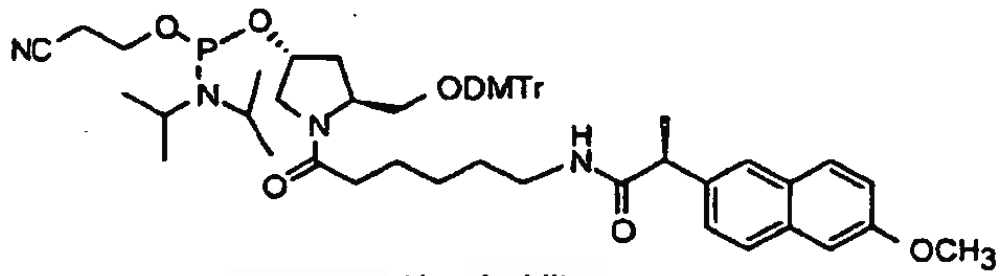
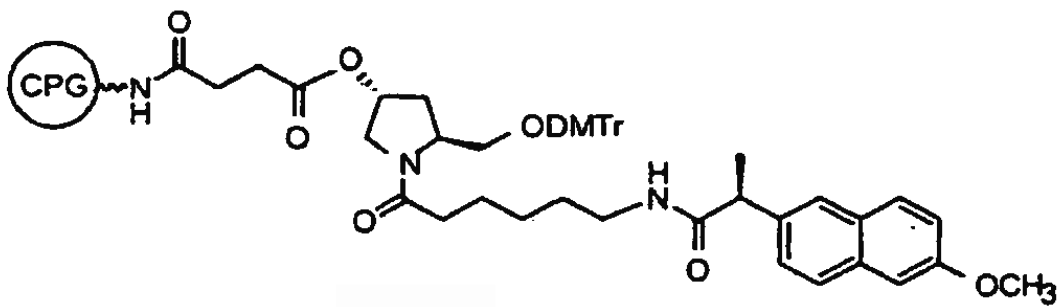


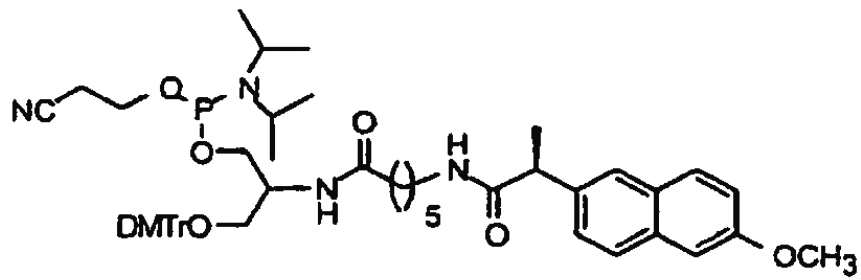
FIG. 41



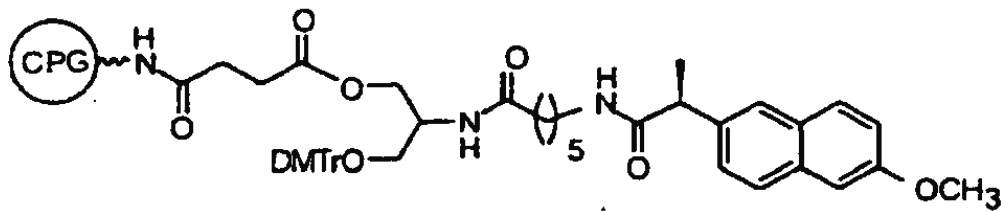
Naproxeno-Hyp Amidito



Naproxeno-Hyp Icaa CPG

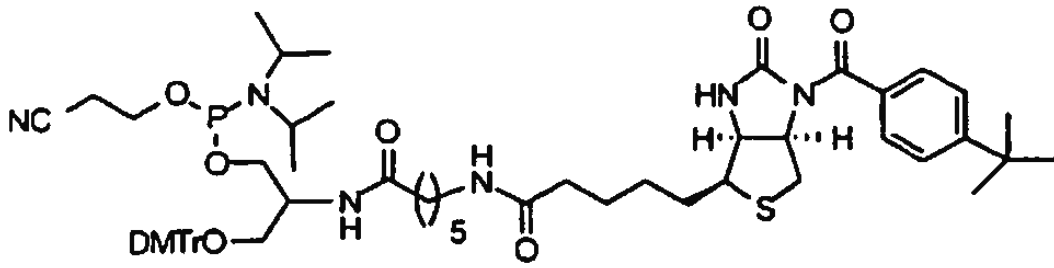


Naproxeno-Serinol Amidito

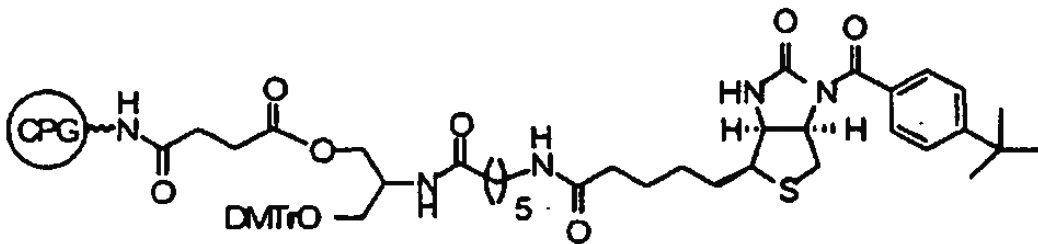


Naproxeno-Serinol Icaa CPG

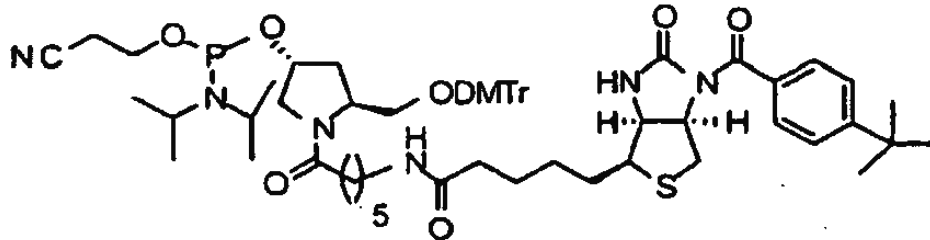
FIG. 42



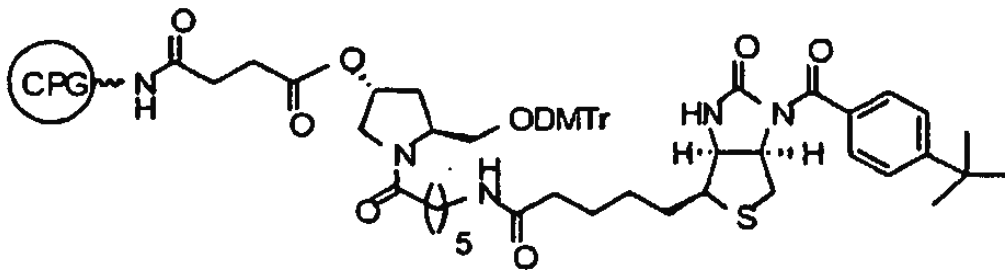
Biotina-Serino Amidito



Biotina-Serino Icaa CPG

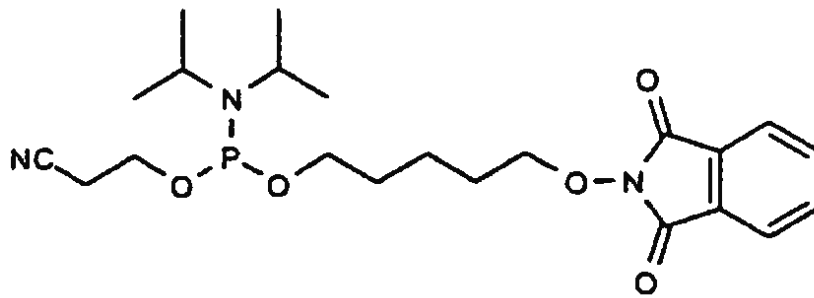


Biotina-Hyp Amidito

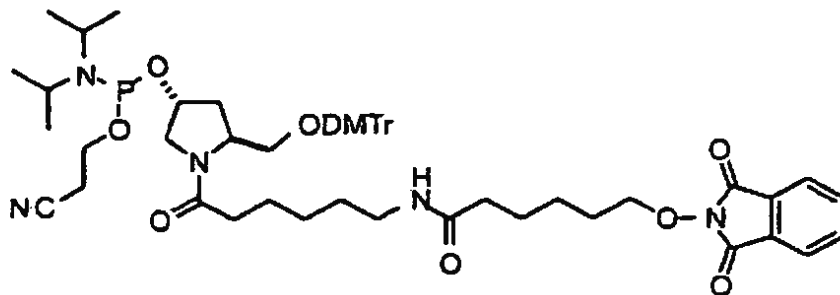


Biotina-Hyp Icaa CPG

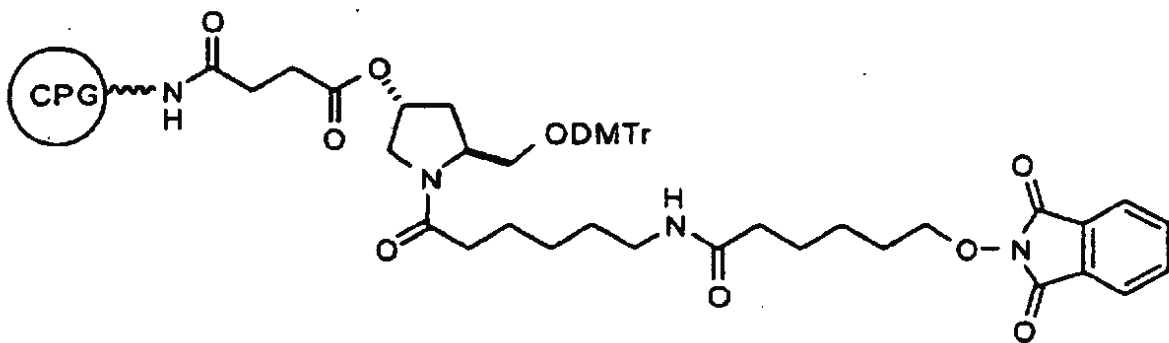
FIG. 43



Bloques de construcción de conjugación postsintética de 5'



Bloques de construcción de conjugación postsintética para conjugación en 5'



Bloques de construcción de conjugación postsintética para conjugación en 3'

FIG. 44

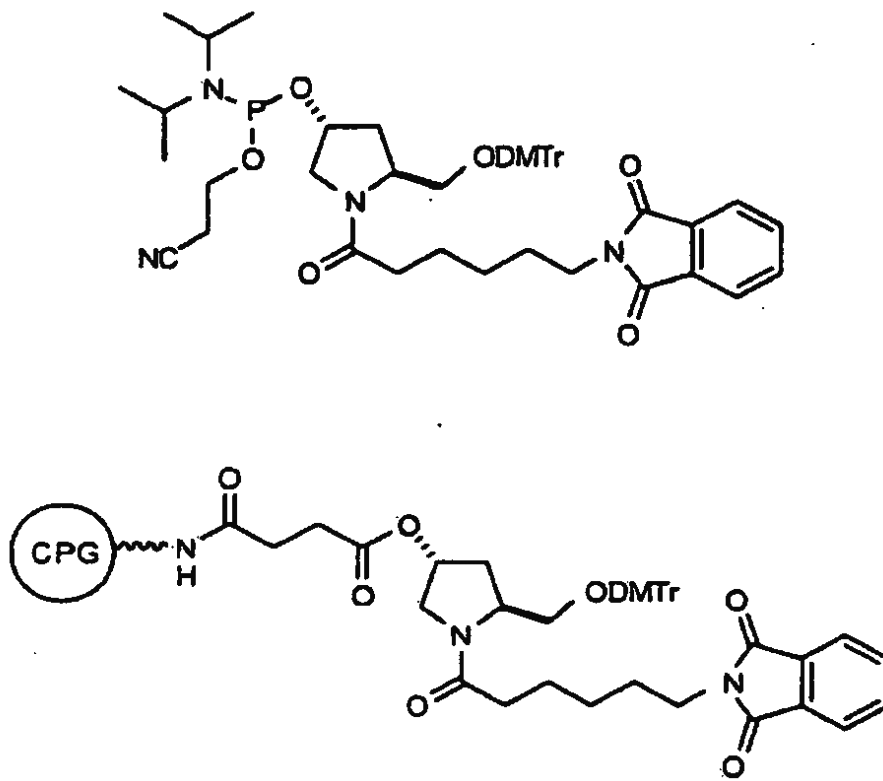
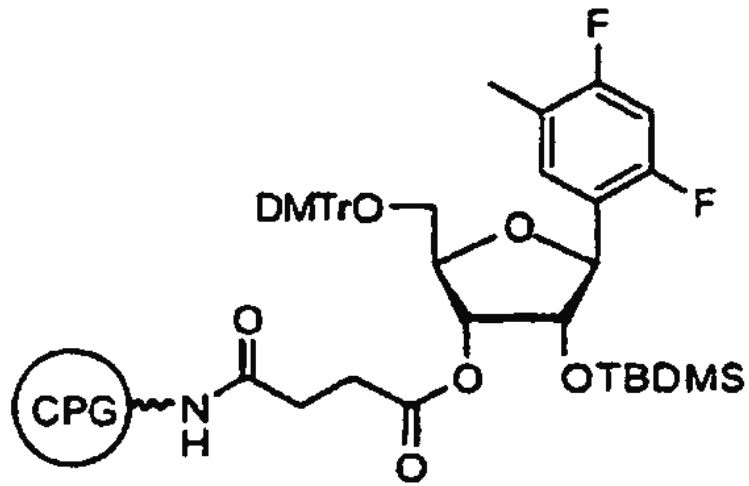
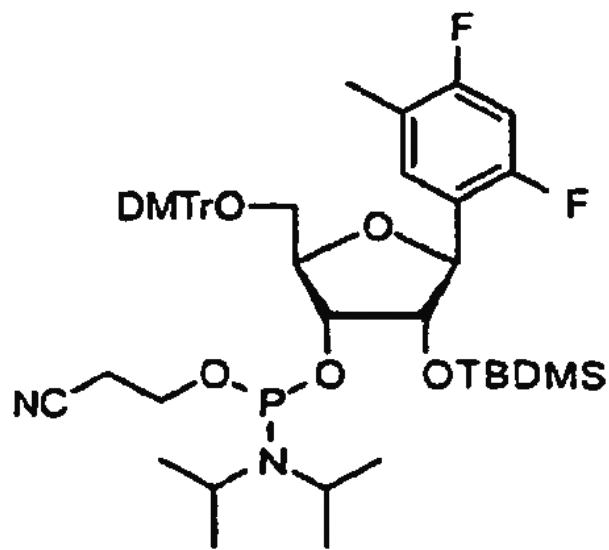


FIG. 45



DFT Icaa CPG



DFT Amidito

FIG. 46

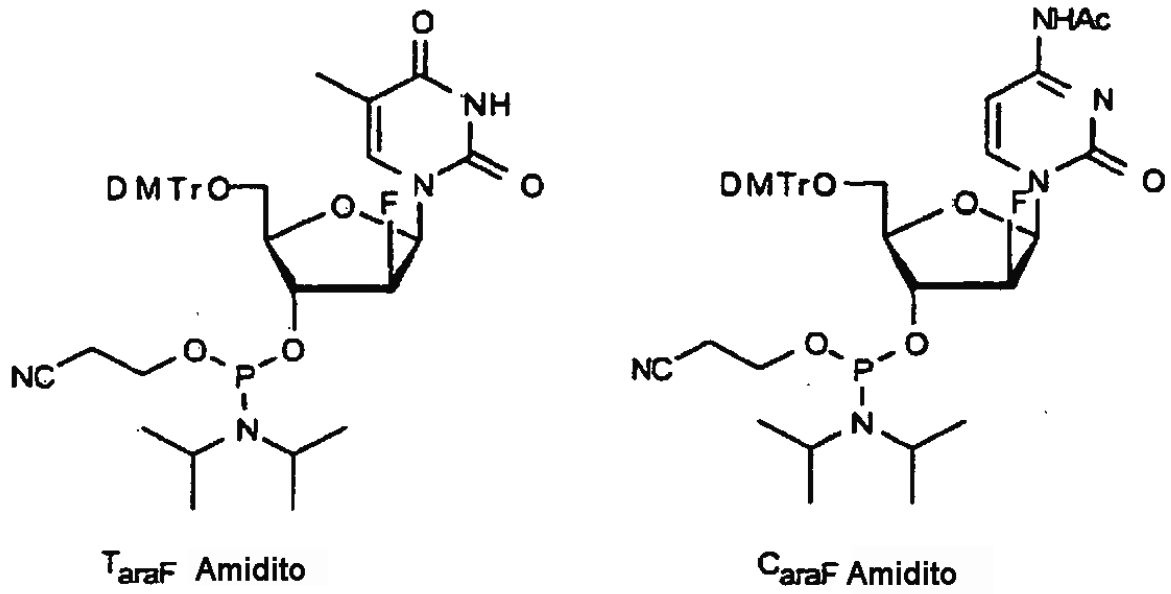


FIG. 47



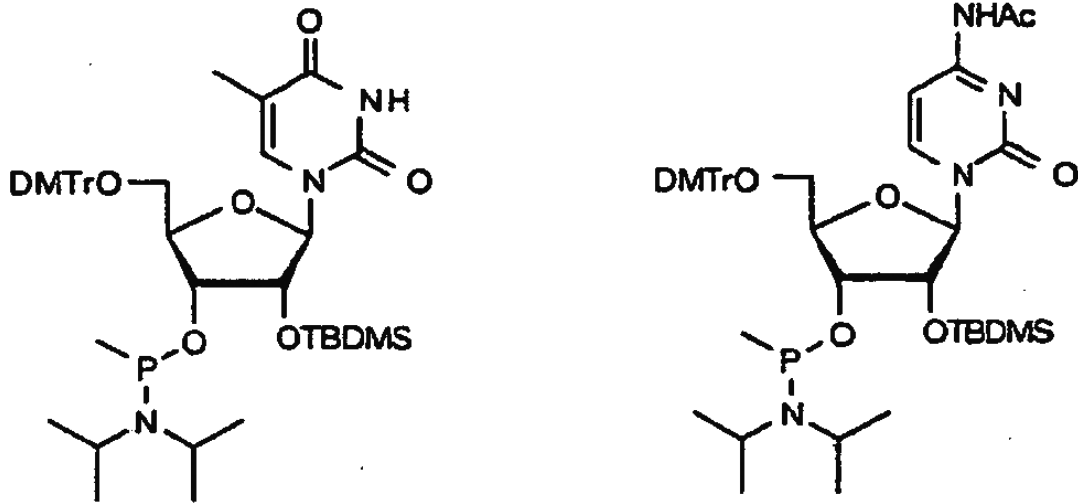


FIG. 48

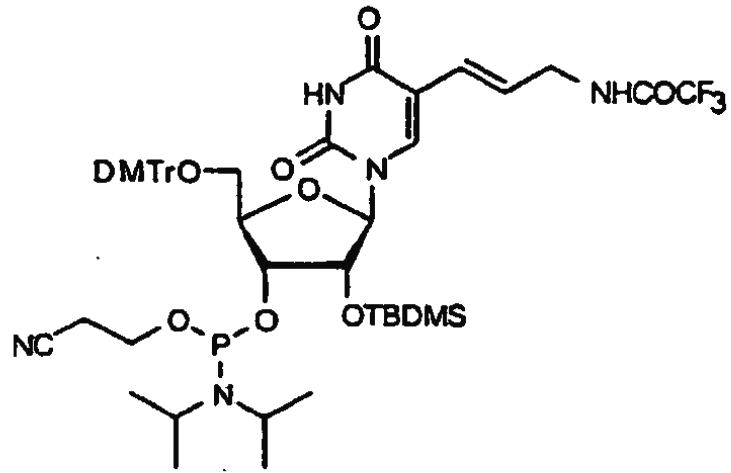


FIG. 49

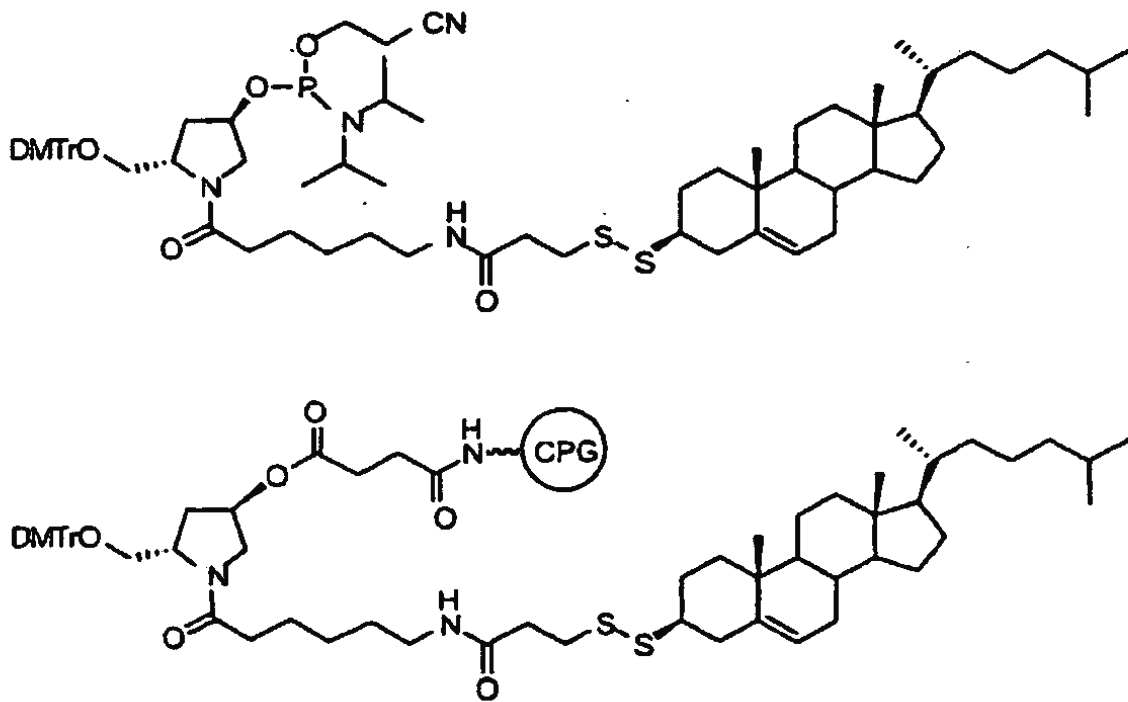


FIG. 50