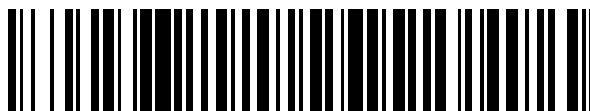


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 426 160**

51 Int. Cl.:

**C07H 21/04** (2006.01)

**C07H 21/02** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

**C12P 19/34** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.1998 E 98920194 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2013 EP 1042348**

54 Título: **Complejos de ligandos de ácidos nucleicos de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)**

30 Prioridad:

**16.12.1997 US 991743**

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

**21.10.2013**

73 Titular/es:

**GILEAD SCIENCES, INC. (100.0%)  
333 Lakeside Drive  
Foster City, California 94404, US**

72 Inventor/es:

**JANJIC, NEBOJSA y  
GOLD, LARRY**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

ES 2 426 160 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

Complejos de ligandos de ácidos nucleicos de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

**[0001]** En este documento se describen ligandos de ADNss y ARN de alta afinidad para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). El procedimiento utilizado en este documento para identificar dichos ligandos de ácidos nucleicos se denomina SELEX, un acrónimo de Evolución Sistemática de Ligandos por Enriquecimiento Exponencial (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment*). En esta invención se incluye adicionalmente un procedimiento para preparar un complejo terapéutico o diagnóstico constituido por un ligando de ácido nucleico de PDGF y un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o un compuesto lipófilo identificando un ligando de ácido nucleico de PDGF mediante la metodología SELEX y uniendo covalentemente el ligando de ácido nucleico de PDGF con un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o un compuesto lipófilo. La invención incluye adicionalmente complejos constituidos por uno o más ligandos de ácido nucleico de PDGF y un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o un compuesto lipófilo. La invención se refiere adicionalmente a mejorar las propiedades farmacocinéticas de un ligando de ácido nucleico de PDGF uniendo covalentemente el ligando de ácido nucleico de PDGF con un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o un compuesto lipófilo para formar un complejo. La invención se refiere adicionalmente a mejorar las propiedades farmacocinéticas de un ligando de ácido nucleico de PDGF usando una construcción lipídica que comprende un ligando de ácido nucleico de PDGF o un complejo que comprende un ligando de ácido nucleico de PDGF y un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o un compuesto lipófilo. Esta invención se refiere adicionalmente a un procedimiento para dirigir un agente terapéutico o de diagnóstico a una diana biológica que expresa PDGF asociando el agente con un complejo constituido por un ligando de ácido nucleico de PDGF y un compuesto lipófilo o un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico, en el que el complejo está asociado adicionalmente con una construcción lipídica y el ligando de ácido nucleico de PDGF está asociado adicionalmente con el exterior de la construcción lipídica.

**ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

30

## A. El Procedimiento SELEX

**[0002]** El dogma durante muchos años fue que los ácidos nucleicos tenían principalmente una función informativa. A través de un procedimiento conocido como Evolución Sistemática de Ligandos por enriquecimiento Exponencial, denominado SELEX, se hizo evidente que los ácidos nucleicos tenían una diversidad estructural tridimensional similar a las proteínas. SELEX es un procedimiento para la evolución *in vitro* de moléculas de ácido nucleico con unión altamente específica a moléculas diana y se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº de Serie 07/536,428, presentada el 11 de junio de 1990, titulada "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment", ahora abandonada, Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº de Serie 07/714.131, presentada el 10 de junio de 1991, titulada "Nucleic Acid Ligands", ahora la Patente de Estados Unidos Nº 5.475.096, Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº de Serie 07/931.473, presentada el 17 de agosto de 1992, titulada "Methods for Identifying Nucleic Acid Ligands", ahora la Patente de Estados Unidos Nº 5.270.163 (véase también el documento WO 91/19813). Cada una de estas aplicaciones, denominadas en conjunto en este documento como las Solicitudes de Patente SELEX, describe un procedimiento fundamentalmente novedoso para preparar un ligando de ácido nucleico para cualquier molécula diana deseada. El proceso SELEX proporciona una clase de productos que se denominan ligandos de ácido nucleico, teniendo cada ligando una única secuencia, y que tiene la propiedad de unirse específicamente a un compuesto o molécula diana deseada. Cada ligando de ácido nucleico identificado por SELEX es un ligando específico de un compuesto o molécula diana determinada. SELEX es basa en la visión única de que los ácidos nucleicos tienen suficiente capacidad para formar una diversidad de estructuras bidimensionales o tridimensionales y una versatilidad química suficiente disponible en sus monómeros para actuar como ligandos (forman pares de unión específicos) virtualmente con cualquier compuesto químico, ya sea monomérico o polimérico. Las moléculas de cualquier tamaño o composición pueden servir como dianas.

**[0003]** El procedimiento SELEX implica la selección de una mezcla de oligonucleótidos candidatos e iteraciones paso a paso de unión, reparto y amplificación, usando el mismo esquema de selección general, para lograr virtualmente cualquier criterio deseado de selectividad y afinidad de unión. Partiendo de una mezcla de ácidos nucleicos, que comprende preferiblemente un segmento de secuencia aleatoria, el procedimiento SELEX incluye las etapas de poner en contacto la mezcla con la diana en condiciones favorables para la unión, separar los ácidos nucleicos no unidos de los ácidos nucleicos que se han unido específicamente a las moléculas diana, disociar los

complejos ácido nucleico-diana, amplificar los ácidos nucleicos disociados de los complejos ácido nucleico-diana para obtener una mezcla enriquecida de ligandos de ácidos nucleicos, a continuación reiterar las etapas de unión, separación, disociación y amplificación durante tantos ciclos como se desee para obtener ligandos de ácidos nucleicos de alta afinidad altamente específicos para la molécula diana.

5

**[0004]** Se ha reconocido por los presentes inventores que el procedimiento SELEX demuestra que los ácidos nucleicos en forma de compuestos químicos pueden formar un amplio conjunto de formas, tamaños y configuraciones, y son capaces de un repertorio mucho más amplio de unión y otras funciones que las mostradas por los ácidos nucleicos en sistemas biológicos.

10

**[0005]** Los presentes inventores han reconocido que los procesos SELEX o similares a SELEX pueden usarse para identificar ácidos nucleicos que puedan facilitar cualquier reacción seleccionada de una manera similar a la que puede identificarse en los ligandos de ácido nucleico para cualquier diana determinada. En teoría, en una mezcla de candidatos de aproximadamente  $10^{13}$  a  $10^{18}$  ácidos nucleicos, los presentes inventores postulan que existe al menos un ácido nucleico con la forma apropiada para facilitar cada una de una amplia diversidad de interacciones físicas y químicas.

15

**[0006]** El procedimiento SELEX básico se ha modificado para conseguir varios objetivos específicos. Por ejemplo, Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 07/960.093, presentada el 14 de octubre de 1992, titulada "Method for Selecting Nucleic Acids on the Basis of Structure", describe el uso de SELEX junto con electroforesis en gel para seleccionar moléculas de ácido nucleico con características estructurales específicas, tal como ADN plegado. Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 08/123.935, presentada el 17 de septiembre de 1993, titulada "Photoselection of Nucleic Acid Ligands", describe un procedimiento basado en SELEX para seleccionar ligandos de ácido nucleico que contienen grupos fotorreactivos capaces de unir y/o fotorreticular a y/o fotoinactivar una molécula diana. Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 08/134.028, presentada el 7 de octubre de 1993, titulada "High-Affinity Nucleic Acid Ligands That Discriminate Between Theophylline and Caffeine", abandonada a favor de la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 08/443.957, ahora la Patente de Estados Unidos N° 5.580.737, describe un procedimiento para identificar ligandos de ácido nucleico altamente específicos capaces de discriminar entre moléculas muy relacionadas, que pueden ser no peptídicas, llamado Counter-SELEX. Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 08/143.564, presentada el 25 de octubre de 1993, titulada "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Solution SELEX", abandonada a favor de la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 08/461.069, ahora la Patente de Estados Unidos N° 5.567.588, describe un procedimiento basado en SELEX que consigue una separación altamente eficaz entre los oligonucleótidos que tienen una afinidad alta y una afinidad baja para una molécula diana.

35

**[0007]** El procedimiento SELEX comprende la identificación de ligandos de ácido nucleico de elevada afinidad que contienen nucleótidos modificados que confieren características mejoradas sobre el ligando, tales como estabilidad *in vivo* mejorada, o características mejoradas de distribución. Ejemplos de estas modificaciones incluyen sustituciones químicas en las posiciones de la ribosa y/o del fosfato y/o de la base. Los ligandos de ácidos nucleicos identificados mediante SELEX que contienen nucleótidos modificados se describen en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de serie 08/117.991, presentada el 8 de septiembre de 1993, titulada "High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides", abandonada a favor de la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 08/430.709, ahora la Patente de Estados Unidos N° 5.660.985, que describe oligonucleótidos que contienen derivados nucleotídicos químicamente modificados en las posiciones 5 y 2' de las pirimidinas. La solicitud de patente de Estados Unidos N° de serie 08/134.028, anteriormente, describe ligandos de ácidos nucleicos altamente específicos que contienen uno o más nucleótidos modificados con 2'-amino (2'-NH<sub>2</sub>), 2'-fluoro (2'-F) y/o 2'-O-metilo (2'-OMe). La solicitud de patente de Estados Unidos N° de serie 08/264.029, presentada el 22 de junio de 1994, titulada "Novel Method of Preparation of Known and Novel 2'-Modified Nucleosides by Intramolecular Nucleophilic Displacement", describe oligonucleótidos que contienen diversas pirimidinas modificadas en 2'.

50

**[0008]** El procedimiento SELEX comprende combinar oligonucleótidos seleccionados con otros oligonucleótidos seleccionados y unidades funcionales que no son oligonucleótidos como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 08/284.063, presentada el 2 de agosto de 1994, titulada "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Chimeric SELEX", ahora la Patente de Estados Unidos N° 5.637.459 y la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 08/234.997, presentada el 28 de abril de 1994, titulada "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Blended SELEX", ahora la Patente de Estados Unidos N° 5.683.867, respectivamente. Estas solicitudes permiten la combinación del amplio espectro de formas y otras propiedades, y las propiedades de amplificación y replicación eficaces de oligonucleótidos con las propiedades deseadas de otras moléculas.

55

**[0009]** El procedimiento SELEX comprende adicionalmente combinar ligandos de ácidos nucleicos seleccionados con compuestos lipófilos o compuestos de alto peso molecular no inmunogénicos en un complejo diagnóstico o terapéutico como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº de Serie 08/434.465, presentada el 4 de mayo de 1995, titulada "Nucleic Acid Ligand Complexes". Los ligandos de ácido nucleico de VEGF que están asociados con un compuesto lipófilo, tal como diacilglicerol o dialquilglicerol, en un complejo diagnóstico o terapéutico, se describen en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº de Serie 08/739.109, presentada el 25 de octubre de 1996, titulada "Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Nucleic Acid Ligand Complexes". Los ligandos de ácido nucleico de VEGF que están asociados con un compuesto lipófilo, tales como lípido de glicerol, o un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico, tal como polietilenglicol, se describen adicionalmente en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº de Serie 08/897.351, presentada el 21 de julio de 1997, titulada "Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Nucleic Acid Ligand Complexes". Los ligandos de ácido nucleico de VEGF que están asociados con un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o un compuesto lipófilo también se describen adicionalmente en el documento PCT/US97/18944, presentado el 17 de octubre de 1997, titulado "Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Nucleic Acid Ligand Complexes". El documento WO 96/38579, titulado "High Affinity Oligonucleotide Ligands to Growth Factors" describe procedimientos para la identificación de ligandos de ácido nucleico de alta afinidad para TGF- $\beta$ , PDGF y hKGF.

#### B. CONSTRUCCIONES LIPÍDICAS

**[0010]** Las vesículas de bicapa lipídica son esferas microscópicas llenas de fluido cerradas que se forman principalmente a partir de moléculas individuales que tienen porciones polares (hidrófilas) y no polares (lipófilas). Las porciones hidrófilas pueden comprender fosfato, glicerilfosfato, carboxi, sulfato, amino, hidroxilo, colina u otros grupos polares. Ejemplos de grupos lipófilos son hidrocarburos saturados o insaturados, tales como alquilo, alqueno u otros grupos lipídicos. También pueden incluirse esteroides (por ejemplo, colesterol) y otros adyuvantes farmacéuticamente aceptables (incluyendo anti-oxidantes como alfa-tocoferol) para mejorar la estabilidad de las vesículas o conferir otras características deseables.

**[0011]** Los liposomas son un subconjunto de estas vesículas de bicapa y están constituidas principalmente de moléculas de fosfolípidos que contienen dos colas hidrófobas que consisten en cadenas de ácidos grasos. Tras la exposición al agua, estas moléculas se alinean espontáneamente para formar membranas bicapa esféricas con los extremos lipófilos de las moléculas en cada capa asociados en el centro de la membrana y los extremos polares opuestos formando la superficie interna y externa respectiva de la membrana o las membranas bicapa. Por lo tanto, cada lado de la membrana presenta una superficie hidrófila mientras que el interior de la membrana comprende un medio lipófilo. Estas membranas pueden disponerse en una serie de membranas esféricas concéntricas separadas por estratos delgados de agua, de una manera no muy diferente a las capas de una cebolla, alrededor de un espacio acuoso interno. Estas vesículas multilamelares (MLV) pueden convertirse en vesículas pequeñas o unilamelares (UV), con la aplicación de una fuerza de cizalladura.

**[0012]** El uso terapéutico de los liposomas incluye la administración de fármacos que normalmente son tóxicos en la forma libre. En la forma liposomal, el fármaco tóxico está oculto, y puede dirigirse lejos de los tejidos sensibles al fármaco y dirigirse a las áreas seleccionadas. Los liposomas pueden usarse terapéuticamente también para liberar fármacos durante un periodo de tiempo prolongado, reduciendo la frecuencia de administración. Además, los liposomas pueden proporcionar un procedimiento para formar dispersiones acuosas de fármacos hidrófobos o anfífilos, que normalmente son inadecuados para administración intravenosa.

**[0013]** Para que muchos fármacos y agentes de formación de imágenes tengan potencial terapéutico o diagnóstico, es necesario que se administren en la ubicación apropiada en el cuerpo y, por lo tanto, el liposoma puede inyectarse fácilmente y formar la base para una liberación sostenida y una administración del fármaco a tipos celulares específicos, o partes del cuerpo. Pueden emplearse varias técnicas para usar liposomas para dirigir fármacos encapsulados a tejidos huésped seleccionados, y lejos de tejidos sensibles. Estas técnicas incluyen la manipulación del tamaño de los liposomas, su carga superficial neta, y su ruta de administración. Las MLV, principalmente por que son relativamente grandes, se recogen rápidamente de forma habitual por el sistema reticuloendotelial (principalmente el hígado y el bazo). Por otro lado, se ha descubierto que las UV muestran un aumento de los tiempos de circulación, un descenso de las velocidades de eliminación y una mayor biodistribución con respecto a las MLV.

**[0014]** La administración pasiva de liposomas implica el uso de diversas rutas de administración, por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular y tópica. Cada ruta produce diferencias en la ubicación de los liposomas.

Dos procedimientos comunes usados para dirigir liposomas activamente a áreas diana seleccionadas implican la unión de anticuerpos o ligandos de receptor específicos a la superficie de los liposomas. Se sabe que los anticuerpos tienen una alta especificidad para su antígeno correspondiente y se han unido a la superficie de los liposomas, pero los resultados han sido menos exitosos en muchos casos. Sin embargo, algunos esfuerzos han tenido éxito en el direccionamiento de liposomas a tumores sin el uso de anticuerpos, véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.019.369, Patente de Estados Unidos N° 5.441.745, o la Patente de Estados Unidos N° 5.435.989.

**[0015]** Un área de desarrollo perseguida agresivamente por los investigadores es la administración de agentes no solo a un tipo celular específico, sino en el citoplasma de la célula y, aún adicionalmente, en el núcleo. Esto es particularmente importante para la administración de agentes biológicos, tales como ADN, ARN, ribozimas y proteínas. Una ocupación terapéutica prometedora en esta área implica el uso de oligonucleótidos de ADN y ARN antisentido para el tratamiento de una enfermedad. Sin embargo, un problema principal encontrado en la aplicación eficaz de tecnología antisentido es que los oligonucleótidos en su forma fosfodiéster se degradan rápidamente en los fluidos corporales y por enzimas intracelulares y extracelulares, tales como endonucleasas y exonucleasas, antes de que se alcance la célula diana. La administración intravenosa también da como resultado una eliminación rápida del torrente sanguíneo por el riñón, y la captación es insuficiente para producir una concentración de fármaco intracelular eficaz. La encapsulación de liposomas protege a los oligonucleótidos de las enzimas degradativas, aumenta la semivida de circulación y aumenta la eficiencia de la captación como resultado de la fagocitosis de los liposomas. De esta manera, los oligonucleótidos son capaces de alcanzar su objetivo deseado y administrarse a células *in vivo*.

**[0016]** Se han indicado unos pocos casos en los que los investigadores han fijado oligonucleótidos antisentido a compuestos lipófilos o compuestos de alto peso molecular no inmunogénicos. Sin embargo, los oligonucleótidos antisentido únicamente son eficaces como agentes intracelulares. Los oligodesoxirribonucleótidos antisentido dirigidos al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF) se han encapsulado en liposomas unidos a folato a través de un espaciador de polietilenglicol (folato-PEG-Liposomas) y se han administrado a células KB en cultivo a través de endocitosis mediada por el receptor de folato (Wang y col. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92: 3318-3322). Además, se han unido alquilendíoles a los oligonucleótidos (Weiss y col., Patente de Estados Unidos N° 5.245.022). Además, se ha demostrado un compuesto lipófilo unido covalentemente a un oligonucleótido antisentido en la bibliografía (documento EP 462 145 B1).

**[0017]** La carga de agentes biológicos en liposomas puede realizarse por inclusión en la formulación lipídica o mediante carga en liposomas preformados. Se ha descrito el anclaje pasivo de ligandos oligopeptídicos y de oligosacáridos a la superficie externa de los liposomas (Zalipsky y col. (1997) Bioconjug. Chem. 8: 111: 118).

#### C. PDGF

**[0018]** El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) se aisló originalmente de lisados de plaquetas y se identificó como la actividad de promoción de crecimiento mayor presente en suero pero no en plasma. Se han identificado dos isoformas homólogas de PDGF, PDGF A y B, que son codificadas por genes separados (en los cromosomas 7 y 22). La especie más abundante de plaquetas es el heterodímero AB, aunque los tres dímeros posibles (AA, AB, y BB) se encuentran de forma natural. Después de la traducción, los dímeros de PDGF se procesan en proteínas secretadas de  $\approx 30$  kDa. Se han identificado dos proteínas de superficie celular que se unen al PDGF con elevada afinidad,  $\alpha$  y  $\beta$  (Heldin y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 78: 3664 (1981); Williams y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 79: 5867 (1981)). Ambas especies contienen cinco dominios extracelulares del tipo inmunoglobulina, un único dominio transmembrana y un dominio tirosina cinasa intracelular separado por un dominio de inserción de quinasa. El receptor funcional de elevada afinidad es un dímero y la unión del dominio extracelular del receptor por el PDGF tiene como resultado la fosforilación cruzada (una tirosina cinasa del receptor fosforila a la otra en el dímero) de diversos residuos de tirosina. La fosforilación del receptor produce una cascada de acontecimientos que tienen como resultado la transducción de la señal mitogénica o quimiotáctica al núcleo. Por ejemplo, en el dominio intracelular del receptor de PDGF  $\beta$ , se han identificado nueve residuos de tirosina que una vez fosforilados interaccionan con diferentes proteínas que contienen dominios de homología src 2 (SH2), incluyendo la fosfolipasa C-g, la fosfatidilinositol 3'-cinasa, la proteína de activación de GTPasa y diversas moléculas de adaptación tales como Shc, Grb2 y Nck (Heldin, Cell, 80: 213 (1995)). En los últimos años se han elucidado las especificidades de las tres isoformas de PDGF para los tres receptores dímeros ( $\alpha\alpha$ ,  $\alpha\beta$  y  $\beta\beta$ ). El receptor  $\alpha$  homodímero se une a las tres isoformas de PDGF con elevada afinidad, el receptor  $\beta$  homodímero se une sólo a PDGF BB con elevada afinidad y a PDGF AB aproximadamente con una afinidad 10 veces menor, y el receptor  $\alpha\beta$  heterodímero se une a PDGF BB y a PDGF AB con elevada afinidad (Westermarck & Heldin, Acta Oncologica, 32: 101 (1993)). El patrón de especificidad

es el resultado de la capacidad de la cadena A para unirse únicamente al receptor  $\alpha$  y de la cadena B a unirse a tanto las subunidades del receptor  $\beta$  como de  $\alpha$  con elevada afinidad.

**[0019]** Se ha establecido la función del PDGF en las enfermedades proliferativas, tales como cáncer, reestenosis, fibrosis, angiogénesis y curación de heridas.

#### PDGF en Cáncer

**[0020]** La primera indicación de que la expresión del PDGF está vinculada a transformación maligna se produjo con el descubrimiento de que la secuencia aminoacídica de la cadena de PDGF-B es virtualmente idéntica al p28<sup>SIS</sup>, la proteína de transformación del virus del sarcoma de simio (SSV) (Waterfield y col., *Nature*, 304: 35 (1983); Johnsson y col., *EMBO J.*, 3: 921 (1984)). El potencial de transformación del gen de la cadena PDGF-B y, en menor medida, el gen PDGF-A se demostró poco después (Clarke y col., *Nature*, 308: 464 (1984); Gazit y col., *Cell*, 39: 89 (1984); Beckmann y col., *Science*, 241: 1346; Bywater y col., *Mol. Cell. Biol.*, 8: 2753 (1988)). Desde entonces se ha observado que muchas líneas celulares tumorales producen y secretan PDGF, algunas de las cuales también expresan receptores de PDGF (Raines y col., *Peptide Growth Factors and Their Receptors*, Springer-Verlag, Parte I, pág. 173 (1990)). Es por tanto posible la estimulación del crecimiento paracrino y, en algunas líneas celulares, autocrino, por PDGF. Por ejemplo, el análisis de biopsias procedentes de gliomas humanos ha demostrado la existencia de dos bucles autocrinos: PDGF-B/receptor  $\beta$  en células endoteliales asociadas a tumores y PDGF-A/receptor  $\alpha$  en células tumorales (Hermansson y col., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 85: 7748 (1988); Hermansson y col., *Cancer Res.*, 52: 3213 (1992)). La progresión a glioma de grado elevado vino acompañada del aumento en la expresión de PDGF-B y del receptor  $\beta$  en células endoteliales asociada a tumores y PDGF-A en células de glioma. La sobreexpresión de PDGF puede por tanto promotor el crecimiento tumoral estimulando directamente las células tumorales o estimulando las células estromales asociadas con el tumor (por ejemplo, células endoteliales). La proliferación de células endoteliales es un sello de la angiogénesis. La expresión aumentada de PDGF y/o receptores de PDGF también se ha observado en otras malignidades, incluyendo fibrosarcoma (Smits y col., *Am. J. Pathol.*, 140: 639 (1992)) y carcinoma de tiroides (Heldin y col., *Endocrinology*, 129: 2187 (1991)).

#### PDGF en Enfermedad Cardiovascular

**[0021]** La angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP) se ha convertido en el tratamiento más común para la enfermedad oclusiva de la arteria coronaria (CAD) que implica una o dos arterias coronarias. Sólo en los Estados Unidos se realizan anualmente aproximadamente 500.000 procedimientos, con proyecciones de más de 700.000 procedimientos para el año 2000 y aproximadamente el doble de esas cantidades en todo el mundo. La ACTP, aunque implica manipulaciones en el interior de las arterias coronarias, no se considera una intervención quirúrgica cardíaca. Durante el procedimiento más común de ACTP, en enrosca un catéter con balón a través de una arteria femoral y se posiciona dentro del segmento de placa cargada de un vaso coronario ocluido; una vez en el lugar, el globo se expande a alta presión, comprimiendo la placa y aumentando el lumen del vaso. Por desgracia, en el 30-50% de los procedimientos de ACTP, se desarrolla gradualmente reoclusión durante un período de varias semanas o meses debido a los eventos celulares en la pared del vaso afectado. Una vez que la reoclusión alcanza una reducción del 50% o mayor del lumen del vaso original, se establece la reestenosis clínica en el vaso.

**[0022]** En vista de la creciente popularidad de la angioplastia coronaria como una alternativa menos invasiva que la cirugía de bypass, reestenosis es un problema médico grave. Las células musculares lisas (CML) representan un componente importante de las lesiones de reestenosis. En las arterias lesionadas, las CML residen principalmente en la capa del vaso medio (túnica media). Tras una lesión del globo que elimina las células endoteliales de la capa íntima (túnica íntima), las CML proliferan y migran a la íntima, formando una característica de engrosamiento de la neoíntima de las lesiones de reestenosis. Cuando ocurre la reestenosis después de la angioplastia, se trata normalmente por angioplastia de repetición, con o sin colocación de un stent, o por cirugía de injerto vascular (bypass).

**[0023]** Un stent es una malla cilíndrica rígida que, una vez colocado y expandido dentro de un segmento de vaso enfermo, retiene mecánicamente la pared del vaso expandido. El stent se despliega por el catéter y, habiendo sido colocado en el sitio deseado, se expande *in situ* por la inflación de un globo de alta presión. Al ser rígido y no compresible, el stent expandido logra y mantiene un diámetro del lumen del vaso comparable al del vaso no enfermo; al presionar firmemente en la íntima/media subyacente, es resistente a la migración dentro del vaso en respuesta al flujo sanguíneo. La ACTP con colocación de stent se ha comparado con la ACTP sola y demuestra que reduce la reestenosis a aproximadamente la mitad y mejora significativamente otros resultados clínicos, tales como el infarto de miocardio (MI) y la necesidad de la cirugía de bypass.

**[0024]** Ahora hay una evidencia considerable de que la cadena B de PDGF contribuye en gran medida a la formación de lesiones de la neoíntima. En un modelo de rata de reestenosis, el engrosamiento de la neoíntima se inhibió con anticuerpos anti-PDGF-B (Ferns (1991) Science 253: 1129-1132; Rutherford y col. (1997) Atherosclerosis 130: 45-51). Por el contrario, la administración exógena de PDGF-BB promueve la migración de CML y provoca un aumento del engrosamiento de la neoíntima (Jawien y col. (1992) J. Clin. Invest. 89: 507-511). El efecto de PDGF-B en las CML se media a través del receptor  $\beta$  de PDGF que se expresa a altos niveles en estas células después de la lesión del globo (Lindner y Reidy (1995) Circulation Res. 76: 951-957). Además, se descubrió que el grado de engrosamiento de la neoíntima tras la lesión del globo estaba inversamente relacionado con el nivel de expresión del receptor  $\beta$  de PDGF en el sitio de la lesión (Sirois y col. (1997) Circulation 95: 669-676).

**[0025]** La Patente de Estados Unidos Nº 5.171.217 desvela un procedimiento y composiciones para administrar un fármaco a un sitio intramural afectado por liberación sostenida junto con o después de procedimientos de catéter con globo, tal como angioplastia. El fármaco puede seleccionarse entre una diversidad de fármacos que se sabe que inhiben la proliferación de células musculares lisas, incluyendo antagonistas del receptor del factor de crecimiento para PDGF.

**[0026]** La Patente de Estados Unidos Nº 5.593.974 desvela procedimientos para tratar trastornos vasculares, tales como reestenosis vascular, con oligonucleótidos antisentido. El procedimiento se basa en la aplicación localizada de los oligonucleótidos antisentido a un sitio específico *in vivo*. Los oligonucleótidos pueden aplicarse directamente al tejido diana en una mezcla con un implante o gel, o mediante inyección o infusión directa.

**[0027]** La Patente de Estados Unidos Nº 5.562.922 desvela un procedimiento para preparar un sistema adecuado para la administración localizada de compuestos biológicamente activos a un sujeto. El procedimiento se refiere a tratar un sustrato revestido con poliuretano con una solución de expansión de revestimiento en condiciones que permitirán la penetración del compuesto biológicamente activo por todo el revestimiento de poliuretano. Los sustratos adecuados para esta invención incluyen, entre otros, stents metálicos. Los compuestos biológicamente activos adecuados para su uso en esta invención incluyen, entre otros, oligonucleótidos modificados por lípidos.

**[0028]** Rutherford y col. (1997, Atherosclerosis 130: 45-51) indican la inhibición sustancial de una respuesta de la neoíntima a una lesión del globo en una arteria carótida de rata usando una combinación de anticuerpos para PDGF-BB y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF).

#### PDGF en Enfermedad Renal

**[0029]** Una gran diversidad de enfermedades renales progresivas se caracterizan por proliferación de células mesangiales glomerulares y acumulación de matriz (Slomowitz y col. (1988) New Eng. J. Med. 319: 1547-1548) lo que conduce a fibrosis. Parece que la cadena B de PDGF tiene una función clave en la activación de ambos de estos procesos dado que 1) las células mesangiales producen PDGF *in vitro* y diversos factores de crecimiento inducen la proliferación mesangial a través de inducción de la síntesis de la cadena B de PDGF autocrino o paracrino; 2) la cadena B de PDGF y su receptor se sobreexpresan en muchas enfermedades glomerulares; 3) la infusión de PDGF-BB o la transfección glomerular con un ADNc de cadena B de PDGF puede inducir la proliferación de células mesangiales selectivas y la acumulación de matriz *in vivo*; y 4) los ratones knock-out del receptor  $\beta$  o de la cadena B de PDGF no son capaces de desarrollar un mesangio (revisado en Floege y Johnson (1995) Miner. Electrolyte Metab. 21: 271-282). Además de contribuir a la fibrosis renal, también se cree que el PDGF desempeña una función en el desarrollo de la fibrosis en otros órganos, tales como los pulmones y la médula ósea, y pueden tener otras asociaciones a enfermedades posibles (Raines y col. (1990) en Experimental Pharmacology, Peptide Growth Factors and Their Receptors, Sporn & Roberts, eds., págs. 173-262, Springer, Heidelberg).

**[0030]** Un estudio examinó el efecto de la inhibición de la cadena B de PDGF en la enfermedad renal: Johnson y col., usando un anticuerpo policlonal neutralizante para PDGF, fueron capaces de reducir la proliferación de células mesangiales y la acumulación de matriz en glomerulonefritis mesangioproliferativa experimental (Johnson y col. (1992) J. Exp. Med. 175: 1413-1416). En este modelo, la inyección de un anticuerpo de células anti-mesangiales (anti-Thy 1.1) en ratas dio como resultado la lisis complementaria-dependiente de las células mesangiales, seguido de una fase reparadora excesiva que se asemejó a la nefritis mesangioproliferativa humana (Floege y col. (1993) Kidney Int. Supl. 39: S47-54). Las limitaciones del estudio de Johnson y col. (Johnson y col. (1992) J. Exp. Med. 175: 1413-1416) incluyeron la necesidad de administrar grandes cantidades de IgG heteróloga y una limitación de la duración del estudio a 4 días debido a la preocupación de que la IgG heteróloga pueda provocar una reacción inmune.

Inhibición de PDGF

**[0031]** La inhibición específica de los factores de crecimiento, tales como PDGF, se ha convertido en un objetivo importante en la medicina clínica y experimental. Sin embargo, este enfoque se ve normalmente obstaculizado por la falta de antagonistas farmacológicos específicos. Los enfoques alternativos disponibles también están limitados, puesto que los anticuerpos neutralizantes a menudo muestran una baja eficacia *in vivo* y normalmente son inmunogénicos, y dado que la terapia génica *in vivo* para estos fines está todavía en sus inicios. Actualmente, los anticuerpos para PDGF (Johnsson y col. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 1721-1725; Ferns y col. (1991) Science 253: 1129-1132; Herren y col. (1993) Biochimica et Biophysica Acta 1173: 294-302; Rutherford y col. (1997) Atherosclerosis 130: 45-51) y los receptores solubles de PDGF (Herren y col. (1993) Biochimica et Biophysica Acta 1173: 294-302; Duan y col. (1991) J. Biol. Chem. 266: 413-418; Tiesman y col. (1993) J. Biol. Chem. 268: 9621-9628) son los antagonistas más potentes y específicos de PDGF. Se ha demostrado que los anticuerpos neutralizantes para PDGF reverían el fenotipo transformado de SSV (Johnsson y col. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 1721-1725) e inhibían el desarrollo de lesiones neointimales posteriores al daño arterial (Ferns y col. (1991) Science 253: 1129-1132). Se han indicado otros inhibidores de PDGF, tales como suramina (Williams y col. (1984) J. Biol. Chem. 259: 287-5294; Betsholtz y col. (1984) Cell 39: 447-457), neomicina (Vassboln y col. (1992) J. Biol. Chem. 267: 15635-15641) y péptidos derivados de la secuencia aminoacídica de PDGF (Engstrom y col. (1992) J. Biol. Chem. 267: 16581-16587), sin embargo, son demasiado tóxicos o les falta suficiente especificidad o potencia para ser buenos candidatos a fármacos. Otros tipos de antagonistas de posible utilidad clínica son moléculas que inhiben selectivamente la tirosina cinasa del receptor de PDGF (Buchdunger y col. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 2558-2562; Kovalenko y col. (1994) Cancer Res. 54: 6106-6114).

RESUMEN DE LA INVENCION

**[0032]** La presente divulgación incluye procedimientos para identificar y producir ligandos de ácido nucleico para el factor del crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y proteínas homólogas y los ligandos de ácido nucleico así identificados y producidas. Para los fines de esta solicitud, PDGF se refiere a las isoformas de PDGF AA, AB y BB y proteínas homólogas. Se incluyen específicamente en la definición isoformas de PDGF AA, AB y BB humanas.

**[0033]** En este documento, se describen ligandos de ADNss y ARN de alta afinidad para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). El procedimiento utilizado en este documento para identificar dichas ligandos de ácido nucleicos se denomina SELEX, un acrónimo para Evolución Sistemática de Ligandos por enriquecimiento Exponencial. Se incluyen en este documento los ligandos evolucionales que se muestran en las Tablas 2-3, 6-7 y 9 y las figuras 1-2A, 2B, 2C, 8A, 8B y 9A. Se incluye adicionalmente en esta divulgación un procedimiento para preparar un complejo que consiste en un ligando de ácido nucleico de PDGF y un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o un compuesto lipófilo por el procedimiento que comprende identificar un ligando de ácido nucleico de una mezcla de candidatos de ácidos nucleicos donde el ácido nucleico es un ligando de PDGF mediante el procedimiento de (a) poner en contacto la mezcla de candidatos de ácidos nucleicos con PDGF, (b) separar los miembros de dicha mezcla de candidatos en base a la afinidad a PDGF, y c) amplificar las moléculas seleccionadas para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecidos por secuencias de ácido nucleico con una afinidad relativamente mayor para la unión a PDGF, y unir covalentemente dicho ligando de ácido nucleico de PDGF identificado con un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o un compuesto lipófilo. La invención comprende un complejo que consiste en un ligando de ácido nucleico de PDGF y un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico.

**[0034]** También se desvela una construcción lipídica que contiene un ligando de ácido nucleico de PDGF o un complejo, y un procedimiento para preparar una construcción lipídica que comprende un complejo en el que el complejo está constituido por un ligando de ácido nucleico de PDGF y un compuesto lipófilo.

**[0035]** En otra realización, esta invención proporciona un procedimiento para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un ligando de ácido nucleico de PDGF mediante uniendo covalentemente el ligando de ácido nucleico de PDGF con un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico para formar un complejo y administrar el complejo a un paciente. La invención se refiere adicionalmente a un procedimiento para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un ligando de ácido nucleico de PDGF mediante la asociación adicional del complejo con una construcción lipídica.

**[0036]** Es un objeto de la presente invención proporcionar complejos que comprenden uno o más ligandos de ácido nucleico de PDGF en asociación con uno o más compuestos de alto peso molecular no inmunogénicos y



procedimientos para producir los mismos. También se proporcionan construcciones lipídicas que comprenden un complejo. Es un objeto adicional de la invención proporcionar uno o más ligandos de ácido nucleico de PDGF en asociación con uno o más compuestos de alto peso molecular no inmunogénicos con propiedades farmacocinéticas mejoradas.

5

**[0037]** En realizaciones de la invención dirigidas a complejos que comprenden un ligando de ácido nucleico de PDGF y un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico, se prefiere que el compuesto de alto peso molecular no inmunogénico sea polialquilenglicol, más preferiblemente, polietilenglicol (PEG). Más preferiblemente, el PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 10-80 K. Mucho más preferiblemente, el PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 20-45 K. En realizaciones de la divulgación dirigidas a complejos que comprenden un ligando de ácido nucleico de PDGF y un compuesto lipófilo, se prefiere que el compuesto lipófilo sea un glicerolípido. La construcción lipídica es preferiblemente una vesícula de bicapa lipídica y mucho más preferiblemente un liposoma. En la realización preferida, el ligando de ácido nucleico de PDGF se identifica de acuerdo con el procedimiento SELEX.

15

**[0038]** En realizaciones de la invención dirigidas a complejos que comprenden un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico unido covalentemente a un ligando o ligandos de ácido nucleico de PDGF, el ligando de ácido nucleico de PDGF o ligandos tienen una capacidad para definir la dirección.

**[0039]** Adicionalmente, el ligando de ácido nucleico de PDGF puede asociarse a través de interacciones covalentes o no covalentes con una construcción lipídica que es parte de un complejo.

**[0040]** También se desvelan construcciones lipídicas que comprenden un ligando de ácido nucleico de PDGF o un complejo de compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o lipófilo/ligando de ácido nucleico de PDGF en el que la construcción lipídica es de un tipo que tiene una membrana que define un compartimento interior, tal como una vesícula de bicapa lipídica, el ligando de ácido nucleico de PDGF o el complejo en asociación con la construcción lipídica pueden asociarse con la membrana de la construcción lipídica o encapsularse dentro del compartimento. En realizaciones en las que el ligando de ácido nucleico de PDGF está en asociación con la membrana, el ligando de ácido nucleico de PDGF puede asociarse con la parte opuesta interior o la parte opuesta exterior de la membrana, de tal forma que el ligando de ácido nucleico de PDGF se proyecte a y fuera de la vesícula. En ciertas realizaciones, un complejo de ligando de ácido nucleico de PDGF puede cargarse pasivamente sobre el exterior de una construcción lipídica preformada. En realizaciones en las que el ligando de ácido nucleico se proyecta fuera de la construcción lipídica, el ligando de ácido nucleico de PDGF tiene una capacidad para definir la dirección.

35

**[0041]** En realizaciones en las que el ligando de ácido nucleico de PDGF de la construcción lipídica tiene una capacidad para definir la dirección, la construcción lipídica puede tener asociados con ésta agentes terapéuticos o de diagnóstico adicionales. En una realización, el agente terapéutico o de diagnóstico está asociado con el exterior de la construcción lipídica. En otras realizaciones, el agente terapéutico o de diagnóstico está encapsulado en la construcción lipídica o asociado con el interior de la construcción lipídica. En una realización adicional más, el agente terapéutico o de diagnóstico está asociado con el complejo. En una realización, el agente terapéutico es un fármaco. En una realización alternativa, el agente terapéutico o de diagnóstico es uno o más ligandos de ácido nucleico adicionales.

**[0042]** Es un objeto adicional de la presente divulgación proporcionar un procedimiento para inhibir enfermedades mediadas por PDGF. Las enfermedades mediadas por PDGF incluye, pero sin limitación, cáncer, angiogénesis, reestenosis y fibrosis. Por lo tanto, es un objeto adicional de la presente divulgación proporcionar un procedimiento para inhibir la angiogénesis mediante la administración de un ligando de ácido nucleico de PDGF o un complejo que comprende un ligando de ácido nucleico de PDGF y un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o compuesto lipófilo o una construcción lipídica que comprende el complejo de la presente invención. Es aún un objeto adicional de la presente divulgación proporcionar un procedimiento para inhibir el crecimiento de tumores mediante la administración de un ligando de ácido nucleico de PDGF o un complejo que comprende un ligando de ácido nucleico de PDGF y un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o un compuesto lipófilo o una construcción lipídica que comprende un complejo de la presente invención. Es todavía un objeto adicional de la invención proporcionar un procedimiento para inhibir la fibrosis mediante la administración de un complejo que comprende un ligando de ácido nucleico de PDGF y un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico de la presente invención. Es todavía un objeto adicional de la divulgación proporcionar un procedimiento para inhibir la reestenosis mediante la administración de un ligando de ácido nucleico de PDGF o un complejo que comprende un ligando de ácido nucleico de PDGF y un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o un compuesto lipófilo

o una construcción lipídica que comprende un complejo de la presente invención.

**[0043]** Es un objeto adicional de la invención proporcionar un procedimiento para dirigir un agente terapéutico o de diagnóstico a una diana biológica que expresa PDGF asociando el agente con un complejo constituido por un  
5 ligando de ácido nucleico de PDGF y un compuesto lipófilo o compuesto de alto peso molecular no inmunogénico.

**[0044]** Estos y otros objetos, así como la naturaleza, alcance y utilización de esta invención, serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica a partir de la siguiente descripción y las reivindicaciones adjuntas.

## 10 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

### **[0045]**

La figura 1 muestra la estructura secundaria consenso para el conjunto de secuencias mostrado en la Tabla 3. R = A  
15 o G, Y = C o T, K = G o T, N y N' indican cualquier par de bases.

Las figuras 2A-2C muestran los ligandos mínimos 20t (SEQ ID NO: 83), 36t (SEQ ID NO: 84) y 41t (SEQ ID NO: 85) plegados de acuerdo con el motivo estructural secundario consenso. [3'T] representa un nucleótido de timidina unido  
20 3'-3' añadido para reducir la degradación por 3'-exonucleasa.

Las figuras 3A-3C muestran la unión de ligandos de ADN de afinidad elevada mínima a PDGF-AA, PDGF-AB y PDGF-BB, respectivamente. Se determinó la fracción de ligandos de ADN marcados en el extremo 5' terminal con <sup>32</sup>P unidos a concentraciones variantes de PDGF mediante el procedimiento de unión a filtro de nitrocelulosa. Los  
25 ligandos mínimos probados fueron 20t (o), 36t (Δ) y 41t (□). Las concentraciones de oligonucleótidos en estos experimentos fueron = 10 pM (PDGF-AB y PDGF-BB) y = 50 pM (PDGF AA). Los datos se ajustaron a la ecuación 1 (para la unión de los ligandos de ADN a PDGF-AA) o a la ecuación 2 (para la unión a PDGF AB y BB) utilizando el procedimiento no lineal menos cuadrados. Las reacciones de unión se realizaron a 37 °C en tampón de unión (PBSM con HSA al 0,01%)

La figura 4 muestra la determinación de la velocidad de disociación para la interacción de alta afinidad entre los ligandos de ADN mínimos y PDGF AB. La fracción de ligandos marcados en el extremo 5' terminal con <sup>32</sup>P 20t (o),  
30 (Δ) y 41t (□), todos a 0,17 nM, unidos a PDGF AB (1 nM) se midió mediante unión a filtro de nitrocelulosa en los tiempos indicados después de la adición de un exceso de 500 veces de un competidor no marcado. Se determinaron los valores de la constante de velocidad de disociación ( $k_{off}$ ) ajustando los datos a la ecuación 3 en el Ejemplo 1. Los  
35 experimentos se realizaron a 37 °C en tampón de unión

La figura 5 muestra los perfiles de desnaturalización térmica para los ligandos de ADN de alta afinidad mínimos para PDGF-AB. El cambio en la absorbancia a 260 nm se midió en PBS que contenía MgCl<sub>2</sub> 1 mM en función de la  
40 temperatura para los ligandos 20t (o), (Δ) y 41t (□).

La figura 6 muestra el efecto de los ligandos de ADN en la unión de <sup>125</sup>I-PDGF-BB a receptores α de PDGF expresados en células PAE.

La figura 7 muestra el efecto de ligandos de ADN sobre el efecto mitogénico de PDGF-BB en células PAE que  
45 expresan los receptores β de PDGF.

Las figuras 8A-8B muestran el patrón de sustitución compatible con la unión de alta afinidad a PDGF-AB. En las figuras 8A-8C los símbolos subrayados indican 2'-O-metil-2'-desoxinucleótidos; los símbolos en cursiva indican 2'-fluoro-2'-desoxinucleótidos; el tipo de letra normal indica 2'-desoxiribonucleótidos; [3'T] indica nucleótidos de timidina  
50 (3'3') de orientación invertida (Glean Research, Sterling, VA); PEG en los bucles de las hélices II y III de la figura 8B indica fosforamidita del espaciador de pentaetilenglicol (Glean Research, Sterling, VA). (Véase la figura 9 para una descripción molecular). La figura 8C muestra la estructura secundaria predicha de una secuencia de ligando de ácido nucleico desordenada que se usó como un control en los Ejemplos 8 y 9. La región desordenada está en un cuadro para acentuar la similitud global del ligando de ácido nucleico desordenado con respecto al ligando de ácido  
55 nucleico mostrado en la figura 8B.

Las figuras 9A-9E muestran las descripciones moleculares NX31975-40K PEG (SEQ ID NO: 146) (figura 9A), NX31976-40K (SEQ ID NO: 147) (figura 9B), fosforamidita de hexaetilenglicol (figura 9C), enlazador aminopentilo (figura 9D) y éster 40K PEG NHS (figura 9E). El grupo fosfato 5' mostrado en el espaciador de PEG de las figuras 9A

y 9B es de la fosforamidita de hexaetilenglicol.

La figura 10 muestra las estabildades de ligandos de ácido nucleico de ADN (36ta) y ADN modificado (NX21568) en suero de rata en el tiempo a 37 °C. 36ta se muestra por el símbolo ●; y NX21568 se muestra por el símbolo ▲.

5

La figura 11 muestra que NX31975-40K PEG inhibió significativamente ( $p < 0,05$ ) aproximadamente el 50% de la formación de la neointima en ratas en base a la relación intima/media para los grupos de control (PBS) y NX31975-40K PEG.

- 10 La figura 12 muestra los efectos de NX31975-40K PEG en la proliferación estimulada por mitógenos de las células mesangiales en el cultivo (se añadieron todos los mitógenos a una concentración final de 100 ng/ml). También se ensayó el ligando de ácido nucleico desordenado NX31976 y 40K PEG. Los datos son densidades ópticas medidas en el ensayo XTT, y se expresan como porcentajes de referencia, es decir, células estimuladas con medio más 200 µg/ml de 40K PEG (es decir, la cantidad equivalente al PEG unido a 50 µg/ml de ligando de ácido nucleico). Los resultados son medias  $\pm$  DT de 5 experimentos separados ( $n = 3$  en el caso de medio más 40K PEG; por lo tanto, la evaluación estadística se confinó a grupos NX31975 y grupos de ligandos de ácido nucleico desordenado).

- 15 Las figuras 13A-13E muestran los efectos de NX31975-40K PEG en la proliferación de células glomerulares (figura 13A), la expresión de la cadena B de PDGF glomerular (figura 13B), la proteinuria en ratas con nefritis anti-Thy 1.1 (figura 13C), la activación de células mesangiales (como se evaluó por la expresión glomerular *de novo* de una actina  $\alpha$  de músculo liso) (figura 13D), e influxo de monocitos/macrófagos (figura 13E). NX31975-40K PEG se muestra en negro, NX31976-40K PEG se muestra con rayas transversales, 40K PEG se muestra en blanco, PBS es muestra con rayallado sencillo, y el intervalo normal se muestra granulado.

- 25 Las figuras 14A-C muestran los efectos de NX31975-40K PEG en la acumulación de matriz glomerular. Se muestran las puntuaciones de inmunotinción glomerular para fibronectina y colágeno de tipo IV, así como las puntuaciones glomerulares para la expresión de ARNm de colágeno de tipo IV (hibridación *in situ*). NX31975-40K PEG se muestra en negro, NX31976-40K PEG se muestra con rayas transversales, 40K PEG se muestra en blanco, PBS se muestra con rayallado sencillo, y el intervalo normal se muestra granulado.

30

## **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

### DEFINICIONES:

- 35 **[0046] "Enlace Covalente"** es el enlace químico formado por electrones compartidos.

**[0047] "Interacciones no Covalentes"** son medios por los que las entidades moleculares se mantienen juntas mediante interacciones distintas de los enlaces covalentes que incluyen interacciones iónicas y enlaces de hidrógeno.

40

- [0048]** Los **"compuestos lipófilos"** son compuestos que tienen la tendencia de asociarse con o dividirse en lípido y/u otros materiales o fases con constantes dieléctricas bajas, incluyendo estructuras que están comprendidas sustancialmente por componentes lipófilos. Los compuestos lipófilos incluyen lípidos, así como compuestos que no contienen lípidos que tienen la tendencia de asociarse con lípidos (y/o otros materiales o fases con constantes dieléctricas bajas). El colesterol, fosfolípidos y lípidos de glicerol, tales como dialquilglicerol, diacilglicerol y lípidos de glicerol amida son ejemplos adicionales de compuestos lipófilos.

- [0049] "Complejo"**, como se usa en este documento, describe la entidad molecular formada por la unión covalente a un ligando de ácido nucleico de PDGF a un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o un compuesto lipófilo. En ciertas realizaciones de la presente invención, el complejo se representa como A-B-Y, en el que A es un compuesto lipófilo o compuesto de alto peso molecular no inmunogénico como se describe en este documento; B es opcional, y comprende un espaciador que puede comprender uno o más enlazadores Z; y Y es un ligando de ácido nucleico de PDGF.

- 50 **[0050]** Las **"construcciones lipídicas"** para los fines de esta divulgación, son estructuras que contienen lípidos, fosfolípidos o derivados de los mismos que comprenden una variedad de disposiciones estructurales diferentes cuyos lípidos se sabe que se adoptan en suspensión acuosa. Estas estructuras incluyen, pero sin limitación, vesículas de bicapa lipídica, micelas, liposomas, emulsiones, lazos o láminas de lípidos, y se pueden complejar con una diversidad de fármacos y componentes que se sabe que son farmacéuticamente aceptables. En una realización

preferida, la construcción lipídica es un liposoma. El liposoma preferido es unilamelar y tiene un tamaño relativo inferior a 200 nm. Los componentes adicionales comunes en construcciones lipídicas incluyen colesterol y alfatocoferol, entre otros. Las construcciones lipídicas se pueden utilizar solas o en cualquier combinación que un experto en la técnica entienda que proporciona las características deseadas para una aplicación particular. Además, los aspectos técnicos de las construcciones lipídicas y la formación de liposomas se conocen bien en la técnica y se puede utilizar cualquiera de los procedimientos usados habitualmente en la técnica.

**[0051] "Ligando de ácido nucleico"**, como se usa en este documento, es un ácido nucleico no natural que presenta una acción deseable sobre una diana. La diana de la presente invención es PDGF, por tanto la expresión ligando de ácido nucleico de PDGF. Una acción deseable incluye, pero sin limitación, la unión a la diana, el cambio catalítico de la diana, la reacción con la diana de manera que modifica/altera la diana o la actividad funcional de la diana, la unión covalente a la diana como en un inhibidor suicida, y facilitar la reacción entre la diana y otra molécula. En la realización preferida, la acción es la afinidad de unión específica para PDGF, donde el ligando de ácido nucleico no es un ácido nucleico que tiene la función fisiológica conocida de estar unido por PDGF.

**[0052]** En realizaciones preferidas de la invención, el ligando de ácido nucleico de PDGF de los complejos y las construcciones lipídicas de la invención se identifican mediante la metodología SELEX. Los ligandos de ácido nucleico se identifican a partir de una mezcla de candidatos de ácidos nucleicos, siendo dicho ligando de ácido nucleico un ligando de PDGF, comprendiendo el procedimiento a) poner en contacto la mezcla de candidatos con PDGF, donde los ácidos nucleicos que tienen una mayor afinidad a PDGF en relación con la mezcla de candidatos se pueden separar del resto de la mezcla de candidatos; b) separar los ácidos nucleicos de mayor afinidad del resto de la mezcla de candidatos, y c) amplificar los ácidos nucleicos de mayor afinidad para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecida en ligandos (véase la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº de Serie 08/479.725, presentada el 7 de junio de 1995, titulada "High Affinity PDGF Nucleic Acid Ligands", ahora la Patente de Estados Unidos Nº 5.674.685, Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº de Serie 08/479.783, presentada el 7 de junio de 1995, titulada "High Affinity PDGF Nucleic Acid Ligands", ahora la Patente de Estados Unidos Nº 5.668.264, y la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº de Serie 08/618.693, presentada el 20 de marzo de 1996, titulada "High Affinity PDGF Ligands", ahora la Patente de Estados Unidos Nº 5.723.564 que se incorporan en la presente por referencia en este documento).

**[0053]** En ciertas realizaciones, las porciones del ligando de ácido nucleico de PDGF (Y) pueden no ser necesarias para mantener la unión, y ciertas porciones del ligando de ácido nucleico de PDGF contiguo pueden reemplazarse por un espaciador o enlazador. En estas realizaciones, por ejemplo, Y puede representarse como Y-B'-Y"-Y", donde Y, Y' e Y" son partes de un ligando de ácido nucleico de PDGF o segmentos de ligandos de ácido nucleico de PDGF diferentes, y B' y/o B" son moléculas espaciadoras o enlazadoras que reemplazan ciertas funciones de ácido nucleico del ligando de ácido nucleico de PDGF original. Cuando B' y B" están presentes e Y, Y' e Y" son partes de un ligando de ácido nucleico de PDGF, se forma una estructura terciaria que se une a PDGF. Cuando B' y B" no están presentes, Y, Y' e Y" representan un ligando de ácido nucleico de PDGF contiguo. Se incluyen ligandos de ácido nucleico de PDGF modificados de tal manera en esta definición.

**[0054]** La "mezcla de candidatos" es una mezcla de ácidos nucleicos de secuencia diferente a partir de la cual se selecciona un ligando deseado. La fuente de la mezcla de candidatos puede ser ácidos nucleicos o fragmentos de los mismos de origen natural, ácidos nucleicos sintetizados químicamente, ácidos nucleicos sintetizados químicamente o ácidos nucleicos producidos mediante la combinación de las técnicas anteriores. En una realización preferida, cada ácido nucleico tiene secuencias fijadas que rodean una región aleatoria para facilitar el proceso de amplificación.

**[0055]** "Ácido nucleico" se refiere a ADN, ARN, de cadena sencilla o de cadena doble y cualquier modificación química de los mismos. Las modificaciones incluyen, pero sin limitación, aquellas que proporcionan otros grupos químicos que incorporan carga adicional, polarizabilidad, enlaces de hidrógeno, interacción electrostática y fluxionalidad a bases de ligandos de ácidos nucleicos o al ligando de ácido nucleico en su conjunto. Dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, modificaciones de azúcares en la posición 2', modificaciones de pirimidina en la posición 5, modificaciones de purina en la posición 8, modificaciones en aminas exocíclicas, sustitución de 4-tiouridina, sustitución de 5-bromo o 5-yodo-uracilo, modificaciones en la estructura, tales como enlaces de internucleósido fosforotioato, metilaciones, combinaciones inusuales de emparejamiento de bases, tales como las isobases isocitidina e isoguanidina y similares. Las modificaciones también pueden incluir modificaciones en 3' y 5', tales como terminadores de cadena.

**[0056]** Un "compuesto de alto peso molecular no inmunogénico" es un compuesto entre aproximadamente

1000 Da a 1.000.000 Da, más preferiblemente aproximadamente de 1000 Da a 500.000 Da, y mucho más preferiblemente aproximadamente de 1000 Da a 200.000 Da, que típicamente no genera una respuesta inmunogénica. Para los fines de esta invención, una respuesta inmunogénica es aquella que provoca que el organismo produzca proteínas de anticuerpo. Los ejemplos de compuestos de alto peso molecular no inmunogénicos incluyen polialquilenglicol y polietilenglicol. En una realización preferida de la invención, el compuesto de alto peso molecular no inmunogénico unido covalentemente al ligando de ácido nucleico de PDGF es un polialquilenglicol y tiene la estructura  $R(O(CH_2)_x)_nO-$ , en la que R se selecciona independientemente entre el grupo que consiste en H y  $CH_3$ ,  $x = 2-S$ , y  $n=PM$  del polialquilenglicol/(16 + 14x). En la realización preferida de la presente invención, el peso molecular es de aproximadamente entre 10-80 kDa. En la realización mucho más preferida, el peso molecular del polialquilenglicol está aproximadamente entre 20-45 kDa. En la realización mucho más preferida,  $x = 2$  y  $n = 9 \times 10^2$ . Puede haber uno o más polialquilenglicoles unidos al mismo ligando de ácido nucleico de PDGF, estando la suma de los pesos moleculares preferiblemente entre 10-80 kDa, más preferiblemente 20-45 kDa.

15 **[0057]** En ciertas realizaciones, el compuesto de alto peso molecular no inmunogénico también puede ser un ligando de ácido nucleico.

**[0058]** Las "vesículas de bicapa lipídica" son esferas microscópicas llenas de líquido cerradas que se forman principalmente a partir de moléculas individuales que tienen porciones polares (hidrófilas) y no polares (lipófilas). Las porciones hidrófilas pueden comprender fosfato, glicerilfosfato, carboxi, sulfato, amino, hidroxilo, colina u otros grupos polares. Ejemplos de grupos lipófilos son hidrocarburos saturados o insaturados, tales como alquilo, alquenilo u otros grupos lipídicos. También pueden incluirse esteroides (por ejemplo, colesterol) y otros adyuvantes farmacéuticamente aceptables (incluyendo anti-oxidantes como alfa-tocoferol) para mejorar la estabilidad de las vesículas o conferir otras características deseables.

25 **[0059]** Los "liposomas" son un subconjunto de estas vesículas de bicapa lipídica y están constituidas principalmente de moléculas de fosfolípidos que contienen dos colas hidrófobas que consisten en cadenas de ácidos grasos. Tras la exposición al agua, estas moléculas se alinean espontáneamente para formar membranas bicapa esféricas con los extremos lipófilos de las moléculas en cada capa asociados en el centro de la membrana y los extremos polares opuestos formando la superficie interna y externa respectiva de la membrana o las membranas bicapa. Por lo tanto, cada lado de la membrana presenta una superficie hidrófila mientras que el interior de la membrana comprende un medio lipófilo. Cuando estas membranas se forman se disponen generalmente en un sistema de membranas cerradas concéntricas separadas por fases acuosas interlamelares, de una manera no muy diferente a las capas de una cebolla, alrededor de un espacio acuoso interno. Estas vesículas multilamelares (MLV) pueden convertirse en vesículas pequeñas o unilamelares (UV), con la aplicación de una fuerza de cizalladura.

**[0060]** Un "liposoma catiónico" es un liposoma que contiene componentes lipídicos que tienen una carga positiva total a pH fisiológico.

40 **[0061]** La metodología SELEX implica la combinación de la selección de ligandos de ácido nucleico que interaccionan con una diana de una manera deseable, por ejemplo, uniéndose a una proteína, con la amplificación de los ácidos nucleicos seleccionados. El ciclo iterativo de las etapas de selección/amplificación permite la selección de uno o un pequeño número de ácidos nucleicos que interaccionan más fuertemente con la diana de un grupo que contiene una cantidad muy elevada de ácidos nucleicos. Se continúa con el ciclo del procedimiento de selección/amplificación hasta que se consigue un objetivo seleccionado. La metodología SELEX se describe en las Solicitudes de Patente de SELEX.

50 **[0062]** "Diana" se refiere a cualquier compuesto o molécula de interés para los que se desea un ligando. Una diana puede ser una proteína (tal como PDGF, trombina u selectina), péptido, carbohidrato, polisacárido, glicoproteína, hormona, receptor, antígeno, anticuerpo, virus, sustrato, metabolito, análogo de estado de transición, cofactor, inhibidor, fármaco, colorante, nutriente, factor de crecimiento, etc., sin limitación. La diana principal de la invención en cuestión es PDGF.

**[0063]** "Propiedades farmacocinéticas mejoradas" significa que el ligando de ácido nucleico de PDGF unido covalentemente a un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o un compuesto lipófilo o en asociación con una construcción lipídica muestra una mayor semivida de circulación *in vivo* con respecto al mismo ligando de ácido nucleico de PDGF que no está en asociación con un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o un compuesto lipófilo o en asociación con una construcción lipídica.

**[0064]** Un "enlazador" es una entidad molecular que conecta dos o más entidades moleculares a través de enlaces covalentes o interacciones no covalentes, y pueden permitir la separación espacial de las entidades moléculas de una manera que conserva las propiedades funcionales de una o más de las entidades moleculares. Un enlazador también se puede conocer como un espaciador. Los ejemplos de enlazadores, incluyen pero sin limitación, las estructuras mostradas en las figuras 9C-9E y el espaciador de PEG mostrado en la figura 9A.

**[0065]** En la realización preferida, el enlazador B' y B'' son pentaetilenglicoles.

**[0066]** "Terapéutico", como se usa en este documento, incluye tratamiento y/o profilaxis. Cuando se usa, terapéutico se refiere a seres humanos y otros animales.

**[0067]** Esta invención incluye ligandos de ADNss y ARN para PDGF. Esta invención incluye adicionalmente los ligandos de ADNss y ARN específicos para PDGF mostrados en las Tablas 2-3, 6-7 y 9 y las figuras 1-2A, 2B y 2C, 8A y 8B (SEQ ID NOS: 4-35, 39-87, 97-144, 148-149). Más específicamente, esta divulgación incluye secuencias de ácidos nucleicos que son sustancialmente homólogas a y que tienen sustancialmente la misma capacidad de unión que los ligandos de ácido nucleico específicos mostrados en las Tablas 2-3, 6-7 y 9 y las figuras 1-2A, 2B y 2C, 8A y 8B (SEQ ID NOS: 4-35, 39-87, 97-144, 148-149). Por sustancialmente homólogas, se entiende un grado de homología de secuencia primaria que supera el 70%, más preferiblemente que supera el 80%, e incluso más preferiblemente que supera el 90%, 95% o 99%. El porcentaje de homología como se describe en este documento, se calcula como el porcentaje de nucleótidos hallados en la menor de las dos secuencias que se alinean con residuos de nucleótidos idénticos en la secuencia que se compara cuando se puede introducir un espacio en una longitud de 10 nucleótidos para ayudar en la alineación. Sustancialmente la misma capacidad de unirse a PDGF significa que la afinidad se encuentra en uno o dos órdenes de magnitud de la afinidad de los ligandos descritos en este documento. Se conoce bien por los expertos en la técnica la determinación de si una secuencia determinada - sustancialmente homóloga con las descritas específicamente en este documento - tiene sustancialmente la misma capacidad de unirse a PDGF.

**[0068]** Una revisión de las homologías de secuencia de los ligandos de ácido nucleico de PDGF mostrados en las Tablas 2-3, 6-7 y 9 y las figuras 1-2A, 2B y 2C, 8A y 8B (SEQ ID NOS: 4-35, 39-87, 97-144, 148-149) muestra que las secuencias con una homología primaria nula o escasa pueden tener sustancialmente la misma capacidad de unirse a PDGF. Por estas razones, esta divulgación también incluye ligandos de ácido nucleico que tienen sustancialmente la misma estructura o motivos estructurales postulados y la capacidad de unirse a PDGF que los ligandos de ácido nucleico mostrados en las Tablas 2-3, 6-7, y 9 y las figuras 1-2A, 2B y 2C, 8A y 8B (SEQ ID NOS: 4-35, 39-87, 97-144, 148-149). Se pueden postular sustancialmente la misma estructura o motivos estructurales mediante la alineación de secuencias utilizando el programa de Zukerfold (véase Zucker (1989) Science 244: 48-52). Como se conoce en la técnica, se pueden utilizar otros programas informáticos para predecir la estructura y motivos estructurales secundarios. También se pueden postular sustancialmente la misma estructura o motivo estructura de ligandos de ácido nucleico en solución o como una estructura unida utilizando RMN u otras técnicas conocidas en la técnica.

**[0069]** Se incluye adicionalmente en esta invención un procedimiento para preparar un complejo que consiste en un ligando de ácido nucleico de PDGF y un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o un compuesto lipófilo por el procedimiento que comprende identificar un ligando de ácido nucleico de una mezcla de candidatos de ácidos nucleicos donde el ácido nucleico es un ligando de PDGF mediante el procedimiento de (a) poner en contacto la mezcla de candidatos de ácidos nucleicos con PDGF, (b) separar los miembros de dicha mezcla de candidatos en base a la afinidad a PDGF, y c) amplificar las moléculas seleccionadas para producir una mezcla de ácidos nucleicos enriquecidos por secuencias de ácido nucleico con una afinidad relativamente mayor para la unión a PDGF, y unir covalentemente dicho ligando de ácido nucleico de PDGF identificado con un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o un compuesto lipófilo.

**[0070]** Es un objeto adicional de la presente invención proporcionar complejos que comprenden uno o más ligandos de ácido nucleico de PDGF unidos covalentemente a un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o compuesto lipófilo. Dichos complejos tienen una o más de las siguientes ventajas sobre un ligando de ácido nucleico de PDGF no en asociación con un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o compuesto lipófilo: 1) propiedades farmacocinéticas mejoradas, y 2) mejor capacidad para administración intracelular, o 3) una mejora capacidad para la dirección. Los complejos asociados adicionalmente con una construcción lipídica tienen las mismas ventajas.

**[0071]** Los complejos o las construcciones lipídicas que comprenden el ligando de ácido nucleico de PDGF o

complejos pueden beneficiarse de una, dos o tres de estas ventajas. Por ejemplo, una construcción lipídica puede comprender a) un liposoma, b) un fármaco que está encapsulado en el interior del liposoma, y c) un complejo que comprende un ligando de ácido nucleico de PDGF y un compuesto lipófilo, en el que el componente del ligando de ácido nucleico de PDGF del complejo se asocia con y se proyecta desde el exterior de la construcción lipídica. En tal caso, la construcción lipídica que comprende un complejo 1) tendrá propiedades farmacocinéticas mejoradas, 2) tendrá una capacidad mejorada para la administración intracelular del fármaco encapsulado, y 3) estará dirigido específicamente a la ubicación preseleccionada *in vivo* que expresa PDGF por el ligando de ácido nucleico de PDGF asociado exteriormente.

- 10 **[0072]** En otra realización, esta invención proporciona un procedimiento para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un ligando de ácido nucleico de PDGF mediante uniendo covalentemente el ligando de ácido nucleico de PDGF con un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico para formar un complejo y administrar el complejo a un paciente. Esta divulgación se refiere adicionalmente a un procedimiento para mejorar las propiedades farmacocinéticas de un ligando de ácido nucleico de PDGF mediante la asociación adicional del complejo con una construcción lipídica.

**[0073]** En otra realización, el complejo de la presente invención está constituido por un ligando de ácido nucleico de PDGF unido covalentemente a un compuesto lipófilo, tal como un glicerolípido, o un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico, tal como polialquilenglicol o polietilenglicol (PEG). En estos casos, las propiedades farmacocinéticas del complejo mejorarán con respecto al ligando de ácido nucleico de PDGF solo. En otra realización, las propiedades farmacocinéticas del ligando de ácido nucleico de PDGF se mejoran con respecto al ligando de ácido nucleico de PDGF solo cuando el ligando de ácido nucleico de PDGF está unido covalentemente a un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o un compuesto lipófilo, y se asocia adicionalmente con una construcción lipídica o el ligando de ácido nucleico de PDGF está encapsulado dentro de una construcción lipídica.

**[0074]** En realizaciones en las que hay múltiples ligandos de ácido nucleico de PDGF, hay un aumento de la avidéz debido a múltiples interacciones de unión con PDGF. Además, en realizaciones en las que el complejo está constituido por múltiples ligandos de ácido nucleico de PDGF, las propiedades farmacocinéticas del complejo se mejorarán con respecto a un ligando de ácido nucleico de PDGF solo. En realizaciones en las que una construcción lipídica comprende múltiples ligandos de ácido nucleico o complejos, las propiedades farmacocinéticas del ligando de ácido nucleico de PDGF pueden mejorarse con respecto a las construcciones lipídicas en las que sólo hay un ligando de ácido nucleico o complejo.

**[0075]** En ciertas realizaciones de la invención, el complejo de la presente invención está constituido por un ligando de ácido nucleico de PDGF unido a uno (dimérico) o más (multimérico) ligandos de ácido nucleico diferentes. El ligando de ácido nucleico puede ser para PDGF o una diana diferente. En realizaciones en las que hay múltiples ligandos de ácido nucleico de PDGF, hay un aumento de la avidéz debido a múltiples interacciones de unión con PDGF. Además, en realizaciones de la divulgación en las que el complejo está constituido por un ligando de ácido nucleico de PDGF unido a uno o más ligandos de ácido nucleico de PDGF diferentes, las propiedades farmacocinéticas del complejo mejorarán con respecto a un ligando de ácido nucleico de PDGF solo.

**[0076]** El compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o un compuesto lipófilo puede estar unido covalentemente a una diversidad de posiciones en el ligando de ácido nucleico de PDGF, tal como a un grupo amino exocíclico en la base, la posición 5 de un nucleótido de pirimidina, la posición 8 de un nucleótido de purina, el grupo hidroxilo del fosfato o un grupo hidroxilo u otro grupo en el extremo 5' ó 3' del ligando de ácido nucleico de PDGF. En realizaciones en las que el compuesto de alto peso molecular no inmunogénico es polialquilenglicol o polietilenglicol, preferiblemente se une al hidroxilo 5' ó 3' del grupo fosfato del mismo. En la realización mucho más preferida, el compuesto de alto peso molecular no inmunogénico está unido al hidroxilo 5' del grupo fosfato del ligando de ácido nucleico. La unión del compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o el compuesto lipófilo al ligando de ácido nucleico de PDGF puede hacerse directamente o con la utilización de enlazadores o espaciadores. En realizaciones en las que la construcción lipídica comprende un complejo, o en las que los ligandos de ácido nucleico de PDGF están encapsulados en el liposoma, se prefiere una interacción no covalente entre el ligando de ácido nucleico de PDGF o el complejo y la construcción lipídica.

**[0077]** Un problema hallado en el uso terapéutico de ácidos nucleicos es que los oligonucleótidos en su forma fosfodiéster se pueden degradar rápidamente en los fluidos corporales mediante enzimas intracelulares y extracelulares, tales como endonucleasas y exonucleasas antes de que se manifieste el efecto deseado. Se pueden realizar varias modificaciones químicas del ligando de ácido nucleico de PDGF para aumentar la estabilidad *in vivo* del ligando de ácido nucleico de PDGF o para potenciar o mediar la liberación del ligando de ácido nucleico de

PDGF. Entre las modificaciones de los ligandos de ácido nucleico de PDGF contempladas en la presente invención se incluyen, pero sin limitación, aquellas que proporcionan otros grupos químicos que incorporan una carga adicional, polarizabilidad, hidrofobicidad, enlace de hidrógeno, interacción electrostática, y fluxionalidad a las bases del ligando de ácido nucleico de PDGF o al ligando de ácido nucleico de PDGF en su conjunto. Dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, modificaciones en la posición 2' del azúcar, modificaciones en la posición 5 de la pirimidina, modificaciones en posición 8 de la purina, modificaciones en las aminas exocíclicas, sustitución de 4-tiouridina, sustitución de 5-bromo o 5-yodo-uracilo, modificaciones del esqueleto, modificaciones de fosforotioato o alquil fosfato, metilaciones, combinaciones inusuales de emparejamientos de bases, tales como las isobases isocitidina e isoguanidina y similares. Las modificaciones también pueden incluir modificaciones 3' y 5', tales como terminadores de cadena.

**[0078]** Cuando se derivan ligandos de ácido nucleico mediante el procedimiento SELEX, las modificaciones pueden ser modificaciones pre-SELEX o post-SELEX. Las modificaciones pre-SELEX producen ligandos de ácido nucleico de PDGF con especificidad para PDGF y una mejor estabilidad *in vivo*. Las modificaciones post-SELEX realizadas a ligandos de ácido nucleico en 2'-OH pueden dar lugar a una mejor estabilidad *in vivo* sin afectar de manera adversa a la capacidad de unión de los ligandos de ácido nucleico. Las modificaciones preferidas de los ligandos de ácido nucleico de PDGF de la invención en cuestión son las terminaciones de cadena con 5' y 3' fosforotioato y/o la unión de fosfodiéster invertida 3'-3' en el extremo 3'. En una realización mucho más preferida, la modificación preferida del ligando de ácido nucleico de PDGF es una unión fosfodiéster invertida 3'-3' en el extremo 3'. Se prefiere la modificación adicional 2'-fluoro (2'-F) y/o 2'-amino (2'-NH<sub>2</sub>) y 2'-Ometil (2'-OMe) de algunos o todos los nucleótidos. En la realización mucho más preferida, la modificación preferida es la modificación 2'-OMe y 2'-F de algunos de los nucleótidos. Adicionalmente, el ligando de ácido nucleico de PDGF puede modificarse post-SELEX para sustituir enlazadores o espaciadores, tales como espaciadores de hexaetilenglicol para ciertas porciones.

**[0079]** En otro aspecto de la presente invención, la unión covalente del ligando de ácido nucleico de PDGF con un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o compuesto lipófilo da como resultado propiedades farmacocinéticas mejoradas (es decir, velocidad de eliminación más lenta) con respecto al ligando de ácido nucleico de PDGF no en asociación con un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o compuesto lipófilo.

**[0080]** En otro aspecto de la presente divulgación, el complejo que comprende un ligando de ácido nucleico de PDGF y un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o compuesto lipófilo puede asociarse adicionalmente con una construcción lipídica. Esta asociación puede dar como resultado propiedades farmacocinéticas mejoradas con respecto al ligando de ácido nucleico de PDGF o el complejo no en asociación con una construcción lipídica. El ligando de ácido nucleico de PDGF o complejo puede asociarse con la construcción lipídica a través de interacciones covalentes o no covalentes. En otro aspecto, el ligando de ácido nucleico de PDGF puede asociarse con la construcción lipídica a través de interacciones covalente o no covalentes. En una realización preferida, la asociación es a través de interacciones no covalentes. En una realización preferida, la construcción lipídica es una vesícula de bicapa lipídica. En la realización mucho más preferida, la construcción lipídica es un liposoma.

**[0081]** Los liposomas para su uso en la presente divulgación pueden prepararse mediante cualquiera de las diversas técnicas conocidas actualmente en la técnica o desarrolladas posteriormente. Típicamente, se preparan a partir de un fosfolípido, por ejemplo, distearoil fosfatidilcolina, y pueden incluir otros materiales, tales como lípidos neutros, por ejemplo, colesterol, y también modificadores de la superficie, tales como compuestos cargados positivamente (por ejemplo, derivados de esterilamina o aminomannosa o aminomannitol de colesterol) o cargados negativamente (por ejemplo, fosfato de diacetilo, fosfatidilglicerol). Los liposomas multilamelares pueden formarse mediante técnicas convencionales, es decir, depositando un lípido seleccionado en la pared interior de un contenedor o recipiente adecuado disolviendo el lípido en un disolvente apropiado, y después evaporando el disolvente para dejar una película fina en el interior del recipiente o secando por pulverización. Después, se añade una fase acuosa al recipiente con un movimiento en remolino o vorticial que da como resultado la formación de MLV. Después, las UV pueden formarse por homogeneización, sonicación o extrusión (a través de filtros) de MLV. Además, las UV pueden formarse mediante técnicas de eliminación del detergente.

**[0082]** En ciertas realizaciones, la construcción lipídica comprende un ligando o ligandos de ácido nucleico de PDGF de dirección asociados con la superficie de la construcción lipídica y un agente terapéutico o de diagnóstico encapsulado. Preferiblemente, la construcción lipídica es un liposoma. Los liposomas preformados pueden modificarse para asociarse con los ligandos de ácidos nucleicos de PDGF. Por ejemplo, un liposoma catiónico se asocia a través de interacciones electrostáticas con el ligando de ácido nucleico de PDGF. Puede añadirse un ligando de ácido nucleico de PDGF unido covalentemente a un compuesto lipófilo, tal como un glicerolípido, a los



liposomas preformados, por lo que el lípido amida glicerolípido, fosfolípido o glicerol se asocia con la membrana liposomal. Como alternativa, el ligando de ácido nucleico de PDGF puede asociarse con el liposoma durante la formulación del liposoma.

5 **[0083]** Se conoce bien en la técnica que los liposomas son ventajosos para encapsular o incorporar una amplia diversidad de agentes terapéuticos y de diagnóstico. Cualquier diversidad de compuestos puede incluirse en el compartimento acuoso interno de los liposomas. Los agentes terapéuticos ilustrativos incluyen antibióticos, nucleósidos antivirales, nucleósidos antifúngicos, reguladores metabólicos, moduladores inmunes, fármacos quimioterapéuticos, antídotos de toxinas, ADN, ARN, oligonucleótidos antisentido, etc. Por la misma razón, las  
10 vesículas de bicapa lipídica pueden cargarse con un radionúclido de diagnóstico (por ejemplo, indio 111, yodo 131, itrio 90, fósforo 32 o gadolinio) y materiales fluorescentes u otros materiales que pueden detectarse en aplicaciones *in vitro* e *in vivo*. Se entenderá que el agente terapéutico o de diagnóstico puede encapsularse por las paredes del liposoma en el interior acuoso. Como alternativa, el agente transportado puede ser una parte de, es decir, disperso o disuelto en los materiales que forman la pared de la vesícula.

15 **[0084]** Durante la formación de liposomas, pueden encapsularse agentes portadores solubles en agua en el interior acuoso incluyéndolos en la solución hidratante, y incorporarse moléculas lipófilas en la bicapa lipídica mediante inclusión en la formulación lipídica. En el caso de ciertas moléculas (por ejemplo, fármacos lipófilos catiónicos o aniónicos), la carga del fármaco en los liposomas preformados puede realizarse, por ejemplo, mediante  
20 los procedimientos descritos en Patente de Estados Unidos Nº 4.946.683, cuya divulgación se incorpora en este documento por referencia. Tras la encapsulación del fármaco, los liposomas se procesan para eliminar el fármaco no encapsulado a través de procedimientos tales como cromatografía en gel o ultrafiltración. Después, los liposomas se filtran típicamente estériles para eliminar cualquier microorganismo que pueda estar presente en la suspensión. Los microorganismos también pueden eliminarse a través de tratamiento aséptico.

25 **[0085]** Si se desea encapsular moléculas hidrófilas grandes con liposomas, pueden formarse vesículas unilamelares mayores mediante procedimientos tales como evaporación de fase inversa (REV) o procedimientos de infusión de disolvente. Se conocen en la técnica otros procedimientos convencionales para la formación de liposomas, por ejemplo, los procedimientos para la producción comercial de liposomas incluyen el procedimiento de  
30 homogeneización descrito en la Patente de Estados Unidos Nº 4.753.788, y el procedimiento de evaporación de película fina descrito en la Patente de Estados Unidos Nº 4.935.171, que se incorporan en este documento por referencia.

**[0086]** Se entenderá que el agente terapéutico o de diagnóstico también puede estar asociado con la superficie de  
35 la vesícula de bicapa lipídica. Por ejemplo, un fármaco puede unirse a un fosfolípido o glicérido (un profármaco). La porción de fosfolípido o glicérido del profármaco puede incorporarse en la bicapa lipídica del liposoma por inclusión en la formulación de lípidos o mediante carga en los liposomas preformados (véanse las patentes de Estados Unidos Nº 5.194.654 y 5.223.263, que se incorporan por referencia en este documento).

40 **[0087]** Es fácilmente evidente para un experto en la técnica que el procedimiento de preparación de liposomas particular dependerá del uso pretendido y el tipo de lípidos usados para formar la membrana bicapa.

**[0088]** Lee y Low (1994, JBC 269: 3198-3204) y DeFrees y col. (1996, J. Am. Chem. Soc. 118: 6101-6104) mostraron en primer lugar que la co-formulación de ligando-PEG-lípido con componentes lipídicos dio liposomas con  
45 orientaciones opuestas tanto hacia el interior como al exterior del ligando PEG. El anclaje pasivo se describió por Zalipsky y col. (1997, Bioconj. Chem. 8: 111-118) como un procedimiento para anclar ligandos de oligopéptidos y oligosacáridos exclusivamente a la superficie externa de los liposomas. El concepto central presentado en su trabajo es que los conjugados oligo-PEG-lípido pueden prepararse y después formularse en liposomas preformados a través de la incorporación espontánea ("anclaje") de la cola del lípido en la bicapa lipídica existente. El grupo lipídico  
50 se somete a esta inserción para alcanzar un estado de energía libre inferior a través de la retirada de su anclaje lipídico hidrófobo de la solución acuosa y su posterior posicionamiento en la bicapa lipídica hidrófoba. La ventaja clave para un sistema de este tipo es que el oligo-lípido está anclado exclusivamente al exterior de la bicapa lipídica. Por lo tanto, no se desperdician oligo-lípidos por no estar disponibles para interacciones con sus dianas biológicas por estar en una orientación hacia el interior.

55 **[0089]** La eficacia de administración de un ligando de ácido nucleico de PDGF a células puede optimizarse usando formulaciones lipídicas y condiciones conocidas para mejorar la fusión de los liposomas con membranas celulares. Por ejemplo, ciertos lípidos cargados negativamente, tales como fosfatidilglicerol y fosfatidilserina, promueven la fusión, especialmente en presencia de otros fusógenos (por ejemplo, cationes multivalentes como  $\text{Ca}^{2+}$ , ácidos

grasos libres, proteínas de fusión vírica, PEG de cadena corta, lisolecitina, detergentes y tensioactivos). También puede incluirse fosfatidiletanolamina en la formulación de liposomas para aumentar la fusión de membrana y, simultáneamente, mejorar la administración celular. Además, pueden usarse ácidos grasos libres y derivados de los mismos, que contienen, por ejemplo, restos carboxilato, para preparar liposomas sensibles al pH que están cargados negativamente a un pH mayor y neutros o protonados a un pH inferior. Se sabe que dichos liposomas sensibles al pH poseen una tendencia mayor para la fusión.

**[0090]** En la realización preferida, los ligandos de ácido nucleico de PDGF de la presente invención se obtienen a partir de la metodología SELEX. SELEX es descrita en la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 07/536.428, titulada "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment", ahora abandonada, Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 07/714.131, presentada el 10 de junio de 1991, titulada "Nucleic Acid Ligands", ahora la Patente de Estados Unidos N° 5.475.096, Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 07/931.473, presentada el 17 de agosto de 1992, titulada "Methods of Identifying Nucleic Acid Ligands", ahora la Patente de Estados Unidos N° 5.270.163 (véase también el documento WO 91/19813). Estas solicitudes se denominan en conjunto las solicitudes de patente de SELEX.

**[0091]** El procedimiento SELEX proporciona una clase de productos que son moléculas de ácido nucleico, teniendo cada una, una única secuencia, cada una de las cuales tiene la propiedad de unirse específicamente a un compuesto o molécula diana deseada. Las moléculas diana son preferiblemente proteínas, pero también pueden incluir, entre otros, carbohidratos, peptidoglicanos y una diversidad de moléculas pequeñas. La metodología SELEX también puede usarse para dirigir estructuras biológicas, tales como superficies celulares o virus, a través de la interacción específica con una molécula que es una parte integrante de esta estructura biológica.

**[0092]** En su forma más básica, el proceso SELEX se puede definir mediante la siguiente serie de etapas:

1) Se prepara una mezcla de candidatos de ácidos nucleicos de secuencias diferentes. La mezcla de candidatos generalmente incluye regiones de secuencias fijas (es decir, cada uno de los miembros de la mezcla de candidatos contiene las mismas secuencias en la misma localización) y regiones de secuencias al azar. Las regiones de secuencia fija se seleccionan: (a) para ayudar en las etapas de amplificación descritas a continuación, (b) para mimetizar una secuencia conocida de unión a la diana, o (c) para aumentar la concentración de una disposición estructural dada de los ácidos nucleicos en la mezcla de candidatos. Las secuencias aleatorias pueden ser totalmente al azar (por ejemplo, la probabilidad de encontrar una base en cualquier posición es de una entre cuatro) o sólo parcialmente al azar (por ejemplo, la probabilidad de encontrar una base en cualquier posición se puede seleccionar a cualquier nivel entre 0 y 100 por cien).

2) La mezcla de candidatos se pone en contacto con la diana seleccionada en condiciones favorables para la unión entre la diana y los miembros de la mezcla de candidatos. En estas circunstancias, la interacción entre la diana y los ácidos nucleicos de la mezcla de candidatos se puede considerar que forma pares de ácido nucleico-diana entre la diana y aquellos ácidos nucleicos que tienen la mayor afinidad para la diana.

3) Los ácidos nucleicos con la mayor afinidad por la diana se separan de los ácidos nucleicos con menor afinidad por la diana. Debido a que sólo existe un número extremadamente pequeño de secuencias (y posiblemente sólo una molécula de ácido nucleico) que corresponda a los ácidos nucleicos de afinidad más elevada en la mezcla de candidatos, generalmente se desea fijar el criterio de separación de modo que una cantidad significativa de los ácidos nucleicos en la mezcla de candidatos (aproximadamente el 5-50%) se conserve durante la separación.

4) Aquellos ácidos nucleicos seleccionados durante la separación de modo que tengan una afinidad relativamente mayor por la diana se amplifican a continuación para crear una mezcla de candidatos nueva que se encuentra enriquecida con ácidos nucleicos que tienen una afinidad relativamente mayor por la diana.

5) Repitiendo las etapas de separación y amplificación anteriores, la mezcla de candidatos recién formada contiene menos y menos secuencias de unión débil, y el grado promedio de afinidad de los ácidos nucleicos por la diana aumentará de forma general. Llevado a su extremo, el procedimiento SELEX producirá una mezcla de candidatos que contenga uno o un número pequeño de ácidos nucleicos únicos que representan aquellos ácidos nucleicos de la mezcla de candidatos original que tenían la mayor afinidad por la molécula diana.

**[0093]** El procedimiento SELEX básico se ha modificado para conseguir varios objetivos específicos. Por ejemplo, la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 07/960.093, presentada el 14 de octubre de 1992, titulada "Method for Selecting Nucleic Acids on the Basis of Structure", describe el uso de SELEX junto con electroforesis en

gel para seleccionar moléculas de ácido nucleico con características estructurales específicas, tales como ADN plegado. La Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº de Serie 08/123.935, presentada el 17 de septiembre de 1993, titulada "Photoselection of Nucleic Acid Ligands", describe un procedimiento basado en SELEX para seleccionar ligandos de ácido nucleico que contienen grupos foto-reactivos capaces de unirse a y/o fotoreticularse a y/o fotoinactivar una molécula diana. La Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº de Serie 08/134.028, presentada el 7 de octubre de 1993, titulada "High-Affinity Nucleic Acid Ligands That Discriminate Between Theophylline and Caffeine", abandonada a favor de la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº de Serie 08/443.957, ahora la Patente de Estados Unidos Nº 5.580.737, describe un procedimiento para identificar ligandos de ácido nucleico altamente específicos capaces de discriminar entre moléculas muy relacionadas, denominado Counter-SELEX. La Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº de Serie 08/143.564, presentada el 25 de octubre de 1993, titulada "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Solution SELEX", abandonada a favor de la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº de Serie 08/461.069, ahora la Patente de Estados Unidos Nº 5.567.588, describe un procedimiento basado en SELEX que consigue una separación altamente eficaz entre oligonucleótidos que tienen alta y baja afinidad para una molécula diana. La Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº de Serie 07/964.624, presentada el 21 de octubre de 1992, titulada "Nucleic Acid Ligands to HIV-RT and HIV-1 Rev", abandonada a favor de la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº 08/462.260, ahora la Patente de Estados Unidos Nº 5.496.938, describe procedimientos para obtener ligandos de ácido nucleico mejorados después de realizar el procedimiento SELEX. La Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº de Serie 08/400.440, presentada el 8 de marzo de 1995, titulada "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Chemi-SELEX", ahora la Patente de Estados Unidos Nº 5.705.337, describe procedimientos para unir covalentemente un ligando a su diana.

**[0094]** El procedimiento SELEX comprende la identificación de ligandos de ácido nucleico de elevada afinidad que contienen nucleótidos modificados que confieren características mejoradas sobre el ligando, tales como estabilidad *in vivo* mejorada, o características mejoradas de distribución. Ejemplos de estas modificaciones incluyen sustituciones químicas en las posiciones de la ribosa y/o del fosfato y/o de la base. Los ligandos de ácidos nucleicos identificados mediante SELEX que contienen nucleótidos modificados se describen en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº de serie 08/117.991, presentada el 8 de septiembre de 1993, titulada "High Affinity Nucleic Acid Ligands Containing Modified Nucleotides", abandonada a favor de la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº de Serie 08/430.709, ahora la Patente de Estados Unidos Nº 5.660.985, que describe oligonucleótidos que contienen derivados nucleotídicos químicamente modificados en las posiciones 5 y 2' de las pirimidinas. La solicitud de patente de Estados Unidos Nº de serie 08/134.028, anteriormente, describe ligandos de ácidos nucleicos altamente específicos que contienen uno o más nucleótidos modificados con 2'-amino (2'-NH<sub>2</sub>), 2'-fluoro (2'-F) y/o 2'-O-metilo (2'-OMe). La solicitud de patente de Estados Unidos Nº de serie 08/264.029, presentada el 22 de junio de 1994, titulada "Novel Method of Preparation of Known and Novel 2'-Modified Nucleosides by Intramolecular Nucleophilic Displacement", describe oligonucleótidos que contienen diversas pirimidinas modificadas en 2'.

**[0095]** El procedimiento SELEX comprende combinar los oligonucleótidos seleccionados con otros oligonucleótidos seleccionados y unidades funcionales no oligonucleotídicas como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº de Serie 08/284.063, presentada el 2 de agosto de 1994, titulada "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Chimeric SELEX", ahora la Patente de Estados Unidos Nº 5.637.459, y la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº de Serie 08/234.997, presentada el 28 de abril de 1994, titulada "Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment: Blended SELEX", ahora la Patente de Estados Unidos Nº 5.683.867, respectivamente. Estas solicitudes permiten la combinación del amplio espectro de formas y otras propiedades, y las propiedades de amplificación y replicación eficaces de oligonucleótidos con las propiedades deseables de otras moléculas.

**[0096]** El procedimiento SELEX comprende adicionalmente combinar ligandos de ácido nucleico seleccionados con compuestos lipófilos o compuestos de alto peso molecular no inmunogénicos en un complejo de diagnóstico o terapéutico como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº de Serie 08/434.465, presentada el 4 de mayo de 1995, titulada "Nucleic Acid Ligand Complexes". El procedimiento SELEX comprende adicionalmente combinar ligandos de ácido nucleico de VEGF seleccionados con compuestos lipófilos, tales como diacilglicerol o dialquilglicerol, como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº de Serie 08/739.109, presentada el 25 de octubre de 1996, titulada "Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Nucleic Acid Ligand Complexes". Los ligandos de ácidos nucleicos de VEGF que están asociados con un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico, tal como polietilenglicol, o un compuesto lipófilo, tal como lípido de amida de glicerolípido, fosfolípido o glicerol, en un complejo de diagnóstico o terapéutico se describen en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Nº de Serie 08/897.351, presentada el 21 de julio de 1997, titulada "Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Nucleic Acid Ligand Complexes". Cada una de las solicitudes de patente que se han descrito anteriormente, que describen modificaciones del procedimiento SELEX básico, se incorporan específicamente por referencia en este documento.

en su totalidad.

**[0097]** SELEX identifica ligandos de ácido nucleico que son capaces de unirse a dianas con alta afinidad y con especificidad excepcional, que representa un logro singular que no tiene precedente en el campo de la investigación de ácidos nucleicos. Por supuesto, estas características son las propiedades deseadas que un experto en la técnica buscará en un ligando terapéutico o de diagnóstico.

**[0098]** Para producir ligandos de ácidos nucleicos deseables para su uso como compuestos farmacéuticos, se prefiere que el ligando de ácido nucleico (1) se una a la diana de un modo capaz de lograr el efecto deseado en la diana; (2) sea tan pequeño como sea posible para obtener el efecto deseado; (3) sea tan estable como sea posible; y (4) sea un ligando específico a la diana seleccionada. En la mayoría de situaciones, se prefiere que el ligando de ácido nucleico tenga la mayor afinidad posible por la diana. Adicionalmente, los ligandos de ácido nucleico pueden tener propiedades auxiliares.

**[0099]** En la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 07/964.624, presentada el 21 de octubre de 1992, ahora la Patente de Estados Unidos N° 5.496.938 ('938), comúnmente asignada, se describen procedimientos para obtener ligandos de ácidos nucleicos mejorados después de realizar el procedimiento SELEX. La patente '938, titulada "Nucleic Acid Ligands to HIV-RT and HIV-1 Rev", se incorpora específicamente en este documento por referencia.

**[0100]** El procedimiento SELEX se ha usado para identificar un grupo de ligandos de ARN de alta afinidad a PDGF de bibliotecas de ADNss al azar y ligandos de ARN con 2'-fluoro-2'-desoxipirimidina de bibliotecas de ADNss al azar (Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 08/618.693, presentada el 20 de marzo de 1996, titulada "High-Affinity PDGF Nucleic Acid Ligands", que es una solicitud de continuación parcial de la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 08/479.783, presentada el 7 de junio de 1995, titulada "High-Affinity PDGF Nucleic Acid Ligands", y la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 08/479.725, presentada el 7 de junio de 1995, titulada "High Affinity PDGF Nucleic Acid Ligands", cada una de las cuales se incorpora en este documento por referencia; véase también Green y col. (1995) Chemistry and Biology 2: 683-695).

**[0101]** En realizaciones en las que el ligando o ligandos de ácido nucleico de PDGF pueden servir para la capacidad de formación de dirección, los ligandos de ácido nucleico de PDGF adoptan una estructura tridimensional que debe retenerse para que el ligando de ácido nucleico de PDGF sea capaz de unirse a su diana. En realizaciones en las que la construcción lipídica comprende un complejo y el ligando de ácido nucleico de PDGF del complejo se protege de la superficie de la construcción lipídica, el ligando de ácido nucleico de PDGF debe orientarse apropiadamente con respecto a la superficie de la construcción lipídica de manera que si capacidad de unión a la diana no se vea comprometida. Esto puede realizarse uniendo el ligando de ácido nucleico de PDGF en una posición que esté distante de la porción de unión del ligando de ácido nucleico de PDGF. La estructura tridimensional y la orientación apropiada pueden conservarse mediante el uso de un enlazador o espaciador como se ha descrito anteriormente.

**[0102]** Cualquier diversidad de agentes terapéuticos o de diagnóstico pueden fijarse al complejo para la administración dirigida por el complejo. Además, cualquier diversidad de agentes terapéuticos o de diagnóstico pueden unirse encapsulados, o pueden incorporarse en la construcción lipídica como se ha analizado anteriormente para la administración dirigida por la construcción lipídica.

**[0103]** En realizaciones en las que el complejo está constituido por un compuesto lipófilo y un ligando de ácido nucleico de PDGF en asociación con un liposoma, por ejemplo, el ligando de ácido nucleico de PDGF puede dirigir células tumorales que expresan PDGF (por ejemplo, sarcoma de Kaposi) para la administración de un fármaco antitumoral (por ejemplo, daunorrubicina) o un agente de formación de imágenes (por ejemplo, radiomarcadores). Debe apreciarse que las células y tejidos que rodean el tumor también pueden expresar PDGF, y la administración dirigida de un fármaco antitumoral a estas células también será eficaz.

**[0104]** En una realización alternativa, el agente terapéutico o de diagnóstico que se administrará a la celda diana puede ser otro ligando de ácido nucleico.

**[0105]** Se contempla adicionalmente que el agente que se administrará puede incorporarse al complejo de tal forma que se asocie con la superficie exterior del liposoma (por ejemplo, un profármaco, un antagonista receptor, o una sustancia radioactiva para tratamiento o formación de imágenes). Al igual que con el ligando de ácido nucleico de PDGF, el agente puede asociarse a través de interacciones covalentes o no covalentes. El liposoma

proporcionará la administración dirigida del agente extracelular, sirviendo el liposoma como un enlazador.

**[0106]** En otra realización, un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico (por ejemplo, PEG) puede unirse al liposoma para proporcionar propiedades farmacocinéticas mejoradas para el complejo. Los ligandos de ácidos nucleicos de PDGF pueden unirse a la membrana del liposoma o pueden unirse a un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico que, a su vez, está unido a la membrana. De esta manera, el complejo puede protegerse de las proteínas de la sangre y, por lo tanto, puede hacerse circular durante extensos periodos de tiempo mientras que el ligando de ácido nucleico de PDGF está todavía lo suficientemente expuesto para entrar en contacto con y unirse a su diana.

**[0107]** En otra realización, más de un ligando de ácido nucleico de PDGF está unido a la superficie del mismo liposoma. Esto proporciona la posibilidad de acercar las mismas moléculas de PDGF en proximidad cercana entre sí y puede usarse para generar interacciones específicas entre las moléculas de PDGF.

**[0108]** En una realización alternativa, los ligandos de ácido nucleico de PDGF y un ligando de ácido nucleico para una diana diferente pueden unirse a la superficie del mismo liposoma. Esto proporciona la posibilidad de acercar PDGF a una diana diferente, y puede usarse para generar interacciones específicas entre el PDGF y la otra diana. Además de usar el liposoma como una forma de acercar dianas en proximidad cercana, los agentes pueden encapsularse en el liposoma para aumentar la intensidad de la interacción.

**[0109]** La construcción lipídica que comprende un complejo permite la posibilidad de múltiples interacciones de unión a PDGF. Por supuesto, esto depende del número de ligandos de ácido nucleico de PDGF por complejo, y el número de complejos por construcción lipídica, y la movilidad de los ligandos de ácido nucleico de PDGF y los receptores en sus respectivas membranas. Puesto que la constante de unión eficaz puede aumentar según el producto de la constante de unión para sitio, hay una ventaja sustancial al tener múltiples interacciones de unión. En otras palabras, teniendo muchos ligandos de ácido nucleico de PDGF unidos a la construcción lipídica y, por lo tanto, creando multivalencia, la afinidad eficaz (es decir, la avidéz) del complejo multimérico para su diana puede llegar a ser tan buena como el producto de la constante de unión para cada sitio.

**[0110]** En ciertas realizaciones, el complejo de la presente invención está constituido por un ligando de ácido nucleico de PDGF unido a un compuesto lipófilo. En este caso, las propiedades farmacocinéticas del complejo se mejorarán con respecto al ligando de ácido nucleico de PDGF solo. Como se ha analizado anteriormente, el compuesto lipófilo puede unirse covalentemente al ligando de ácido nucleico de PDGF en numerosas posiciones en el ligando de ácido nucleico de PDGF.

**[0111]** En otra realización, la construcción lipídica comprende un ligando de ácido nucleico de PDGF o complejo. En esta realización, el glicerolípido puede facilitar la incorporación del ligando de ácido nucleico de PDGF en el liposoma debido a la propensión de un glicerolípido de asociarse con otros compuestos lipófilos. El glicerolípido en asociación con un ligando de ácido nucleico de PDGF puede incorporarse en la bicapa lipídica del liposoma por inclusión en la formulación o mediante carga en liposomas preformados. El glicerolípido puede asociarse con la membrana del liposoma de tal manera que el ligando de ácido nucleico de PDGF se proyecte en o fuera del liposoma. En realizaciones en las que el ligando de ácido nucleico de PDGF se proyecta fuera del complejo, el ligando de ácido nucleico de PDGF puede ser útil para la capacidad de formación de dirección. Se entenderá que compuestos adicionales pueden asociarse con la construcción lipídica para mejorar adicionalmente las propiedades farmacocinéticas de la construcción lipídica. Por ejemplo, un PEG puede unirse a la parte opuesta exterior de la membrana de la construcción lipídica.

**[0112]** En otras realizaciones, el complejo de la presente invención está constituido por un ligando de ácido nucleico de PDGF unido covalentemente a un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico, tal como polialquilenglicol o PEG. En esta realización, las propiedades farmacocinéticas del complejo se mejoran con respecto al ligando de ácido nucleico de PDGF solo. El polialquilenglicol o PEG puede unirse covalentemente a una diversidad de posiciones en el ligando de ácido nucleico de PDGF. En realizaciones en las que se usan polialquilenglicol o PEG, se prefiere que el ligando de ácido nucleico de PDGF esté unido a través del grupo hidroxilo 5' mediante un enlace fosfodiéster.

**[0113]** En ciertas realizaciones, una pluralidad de ligandos de ácido nucleico puede asociarse con un solo compuesto de alto peso molecular no inmunogénico, tal como polialquilenglicol o PEG, o un compuesto lipófilo, tal como un glicerolípido. Los ligandos de ácido nucleico pueden ser todos para PDGF o PDGF y una diana diferente. En realizaciones en las que hay múltiples ligandos de ácido nucleico de PDGF, hay un aumento de la avidéz debido

a múltiples interacciones de unión con PDGF. En otras realizaciones adicionales, una pluralidad de moléculas lipídicas de polialquilenglicol, PEG, glicerol, pueden unirse entre sí. En estas realizaciones, uno o más ligandos de ácido nucleico de PDGF o ligandos de ácido nucleico para PDGF y otras dianas pueden asociarse con cada lípido de polialquilenglicol, PEG o glicerol. Esto también da como resultado un aumento de la avidéz de cada ligando de ácido nucleico para su diana. En realizaciones en las que múltiples ligandos de ácido nucleico de PDGF están unidos a un lípido de polialquilenglicol, PEG o glicerol, existe la posibilidad de acercar moléculas de PDGF en proximidad cercana entre sí para generar interacciones específicas entre PDGF. Cuando múltiples ligandos de ácido nucleico específicos para PDGF y diferentes dianas se unen a un lípido de polialquilenglicol, PEG o glicerol, existe la posibilidad de acercar PDGF y otra diana en proximidad cercana entre sí con el fin de generar interacciones específicas entre el PDGF y la otra diana. Además, en las realizaciones en las que hay ligandos de ácido nucleico para PDGF o ligandos de ácido nucleico para PDGF y diferentes dianas asociadas con un lípido polialquilenglicol, PEG o glicerol, un fármaco también puede estar asociado con el lípido de polialquilenglicol, PEG o glicerol. Por lo tanto, el complejo proporcionar una administración dirigida del fármaco, sirviendo el lípido de polialquilenglicol, PEG o glicerol como un enlazador.

**[0114]** Los ligandos de ácido nucleico de PDGF se unen selectivamente a PDGF. Por lo tanto, un complejo que comprende un ligando de ácido nucleico de PDGF y un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o un compuesto lipófilo o una construcción lipídica que comprende un ligando de ácido nucleico de PDGF o un complejo, son útiles como agentes farmacéuticos o de diagnóstico. Los complejos que contienen ligandos de ácido nucleico de PDGF y las construcciones lipídicas pueden usarse para tratar, inhibir, prevenir o diagnosticar cualquier patología que implique una producción inapropiada de PDGF, por ejemplo, cáncer, angiogénesis, reestenosis y fibrosis. El PDGF se produce y se secreta en cantidades variables mediante muchas células tumorales. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona procedimientos para el tratamiento, inhibición, prevención o diagnóstico de cáncer por administración de un complejo que comprende un ligando de ácido nucleico de PDGF y un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o compuesto lipófilo, una construcción lipídica que comprende un complejo, o un ligando de ácido nucleico de PDGF en asociación con una construcción lipídica sin ser parte del complejo.

**[0115]** La angiogénesis rara vez ocurre en adultos sanos, excepto durante la menstruación y la cicatrización de heridas. Sin embargo, la angiogénesis es un elemento central de diversas patologías, incluyendo, pero sin limitación, cáncer, retinopatía diabética, degeneración macular, psoriasis y artritis reumatoide. Por lo tanto, la presente divulgación proporciona procedimientos para el tratamiento, inhibición, prevención o diagnóstico de la angiogénesis mediante administración de un complejo que comprende un ligando de ácido nucleico de PDGF y un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o compuesto lipófilo, una construcción lipídica que comprende un ligando de ácido nucleico de PDGF o un complejo que comprende un ligando de ácido nucleico de PDGF y un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o compuesto lipófilo.

**[0116]** PDGF también se produce en fibrosis en órganos, tales como el pulmón, la médula ósea y el riñón. La fibrosis puede estar asociada con tratamientos de radiación. Por lo tanto, la presente invención incluye procedimientos para el tratamiento, inhibición, prevención o diagnóstico de fibrosis asociada al pulmón, médula ósea, riñón y un tratamiento de radiación mediante la administración de un complejo que comprende un ligando de ácido nucleico de PDGF y un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o compuesto lipófilo, una construcción lipídica que comprende un ligando de ácido nucleico de PDGF o un complejo que comprende un ligando de ácido nucleico de PDGF y un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o compuesto lipófilo.

**[0117]** El PDGF es un factor de crecimiento importante implicado en la reestenosis. La reestenosis, la reoclusión de un vaso sanguíneo enfermo después de un tratamiento para eliminar la estenosis, es una aparición común que se desarrolla después de intervenciones coronarias y algunas intervenciones de los vasos periféricos. Adicionalmente, se han usado stents en el tratamiento de, o junto con, el tratamiento de los vasos coronarios y no coronarios; sin embargo, la reestenosis también está asociada al uso de stents (denominada reestenosis intrastent). La reestenosis intrastent tiene lugar en aproximadamente el 15-30% de las intervenciones coronarias y, con frecuencia, en algunas intervenciones de los vasos periféricos. Por ejemplo, la reestenosis intrastent es un problema significativo en los vasos pequeños, con frecuencias que varían del 15% al 40% en arterias femoral o popliteales con stent. Los vasos de tamaño intermedio, tales como las arterias renales, tienen una tasa de reestenosis intrastent del 10-20%.

**[0118]** Por lo tanto, la presente divulgación proporciona procedimientos para el tratamiento, inhibición, prevención o diagnóstico de la reestenosis mediante la administración de un complejo que comprende un ligando de ácido nucleico de PDGF y un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o compuesto lipófilo, una construcción lipídica que comprende un ligando de ácido nucleico de PDGF o un complejo que comprende un ligando de ácido nucleico de PDGF y un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o compuesto lipófilo. La presente

invención también incluye procedimientos para el tratamiento, inhibición, prevención o diagnóstico de la reestenosis en vasos coronarios y no coronarios. La presente invención también incluye procedimientos para el tratamiento, inhibición, prevención o diagnóstico de la reestenosis intrastent.

5 **[0119]** Adicionalmente, el cáncer, angiogénesis, reestenosis y fibrosis implican la producción de factores de crecimiento distintos de PDGF. Por lo tanto, se contempla por esta divulgación que un complejo que comprende un ligando de ácido nucleico de PDGF y un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o compuesto lipófilo, una construcción lipídica que comprende un ligando de ácido nucleico de PDGF o un complejo que comprende un ligando de ácido nucleico de PDGF y un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o compuesto lipófilo  
10 puede usarse junto con complejos que comprenden ligandos de ácido nucleico para otros factores de crecimiento (tales como bFGF, TGF $\beta$ , hKGF, etc.) y un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o compuesto lipófilo, una construcción lipídica que comprende un ligando de ácido nucleico de PDGF o un complejo que comprende un ligando de ácido nucleico de PDGF y un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o compuesto lipófilo.

15 **[0120]** En una realización, la construcción lipídica comprende un complejo constituido por un ligando de ácido nucleico de PDGF y un compuesto lipófilo con un agente de diagnóstico o terapéutico adicional encapsulado en la construcción lipídica o asociado con el interior de la construcción lipídica. En una realización, la construcción lipídica es una vesícula de bicapa lipídica, y más preferiblemente un liposoma. El uso terapéutico de los liposomas incluye la administración de fármacos que normalmente son tóxicos en forma libre. En la forma liposomal, el fármaco tóxico  
20 está oculto, y puede dirigirse lejos de los tejidos sensibles al fármaco y dirigirse a áreas seleccionadas. Los liposomas también pueden usarse terapéuticamente para liberar fármacos durante un periodo de tiempo prolongado, reduciendo la frecuencia de administración. Además, los liposomas pueden proporcionar un procedimiento para formar dispersiones acuosas de fármacos hidrófobos o anfifílicos, que normalmente no son aptos para administración intravenosa.

25 **[0121]** Para que muchos fármacos y agentes de formación de imágenes tengan potencial terapéutico o diagnóstico, es necesario que se administren en la ubicación apropiada en el cuerpo y, por lo tanto, el liposoma puede inyectarse fácilmente y formar la base para una liberación sostenida y una administración del fármaco a tipos celulares específicos, o partes del cuerpo. Pueden emplearse varias técnicas para usar liposomas para dirigir  
30 fármacos encapsulados a tejidos huésped seleccionados, y lejos de tejidos sensibles. Estas técnicas incluyen la manipulación del tamaño de los liposomas, su carga superficial neta, y su ruta de administración. Las MLV, principalmente por que son relativamente grandes, se recogen rápidamente de forma habitual por el sistema reticuloendotelial (principalmente el hígado y el bazo). Por otro lado, se ha descubierto que las UV muestran un aumento de los tiempos de circulación, un descenso de las velocidades de eliminación y una mayor biodistribución  
35 con respecto a las MLV.

**[0122]** La administración pasiva de liposomas implica el uso de diversas rutas de administración, por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intramuscular y tópica. Cada ruta produce diferencias en la ubicación de los liposomas. Dos procedimientos comunes usados para dirigir liposomas activamente a áreas diana seleccionadas implican la  
40 unión de anticuerpos o ligandos de receptor específicos a la superficie de los liposomas, y tiene una capacidad para definir la dirección. Los componentes de dirección adicionales, tales como anticuerpos o ligandos de receptor específicos pueden incluirse sobre la superficie del liposoma, como se sabrá por un experto en la técnica. Además, algunos esfuerzos han tenido éxito en el direccionamiento de liposomas a tumores sin el uso de anticuerpos, véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.019.369, la Patente de Estados Unidos N° 5.435.989, y la Patente  
45 de Estados Unidos N° 4.441.775, y se conocerá por un experto en la técnica para incorporar estos procedimientos de dirección alternativos.

**[0123]** Las composiciones terapéuticas o de diagnóstico de un complejo que comprende un ligando de ácido nucleico de PDGF y un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o un compuesto lipófilo, una  
50 construcción lipídica que comprende un complejo constituido por un ligando de ácido nucleico de PDGF y un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico o compuesto lipófilo, y un ligando de ácido nucleico de PDGF en asociación con una construcción lipídica sin ser parte de un complejo pueden administrarse por vía parenteral por inyección, aunque también se prevén otras formas de administración eficaces, tales como inyección intraarticular, polvos de inhalación, formulaciones activas por vía oral, iontoforesis transdérmica o supositorios. También pueden  
55 aplicarse localmente mediante inyección directa, pueden liberarse de dispositivos, tales como stents o catéteres implantados, o pueden administrarse directamente al sitio mediante una bomba de fusión. Un transportador preferido es una solución salina fisiológica, pero se contempla que pueden usarse otros transportadores farmacéuticamente aceptables. En una realización, se prevé que el transportador y el complejo de ligando de ácido nucleico de PDGF constituyan una formulación de liberación lenta fisiológicamente compatible. El disolvente primario en un

transportador de este tipo puede ser de naturaleza acuosa o no acuosa. Además, el transportador puede contener otros excipientes farmacológicamente aceptables para modificar o mantener el pH, la osmolaridad, la viscosidad, la claridad, el color, la esterilidad, la estabilidad, la tasa de disolución, o el olor de la formulación. De forma análoga, el transportador puede contener aún otros excipientes farmacológicamente aceptables para modificar o mantener la

**[0124]** Una vez que la composición terapéutica o de diagnóstico se ha formulado, puede almacenarse en viales estériles en forma de una solución, suspensión, gel, emulsión, sólido o polvo deshidratado o liofilizado. Dichas formulaciones pueden almacenarse de forma listas para usar o que requieran reconstitución inmediatamente antes de la administración. La manera de administrar las formulaciones que contienen un ligando de ácido nucleico de PDGF para administración sistémica puede ser por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, intranasal o vaginal o un supositorio rectal.

**[0125]** Las ventajas de los complejos y construcciones lipídicas de esta divulgación incluyen: i) mejorar la farmacocinética en plasma del ligando de ácido nucleico; ii) presentar ligandos de ácido nucleico en una disposición multivalente con el objetivo de aumentar la avidéz de la dirección con sus dianas; iii) combinar dos o más ligandos de ácidos nucleicos presentes con diferentes especificidades en la misma partícula de liposoma; iv) mejorar la administración de los ligandos de ácido nucleico presentes a tumores aprovechando las propiedades de dirección del tumor intrínsecas de los liposomas; y v) usar la alta afinidad y especificada de los ligandos de ácido nucleico presentes, que es comparable a la de los anticuerpos, para guiar contenidos liposomales a dianas específicas. Los ligandos de ácido nucleico presentes son aptos para los tipos de preparaciones descritas aquí, ya que, a diferencia de la mayoría de las proteínas, la desnaturalización de los ligandos de ácido nucleico presentes por calor, diversos desnaturalizantes moleculares y disolventes orgánicos, es fácilmente reversible.

**[0126]** Los siguientes ejemplos se proporcionan para explicar e ilustrar la presente invención y no han de tomarse como limitantes de la invención. El Ejemplo 1 describe los diversos materiales y procedimientos experimentales usados en los Ejemplos 2-4 para la generación de ligandos de ADNss para PDGF y pruebas asociadas con los mismos. El Ejemplo 2 describe los ligandos de ADNss para PDGF y la estructura secundaria predicha de los ligandos de ácido nucleico seleccionados y un motivo estructural secundario compartido. El Ejemplo 3 describe la secuencia mínima necesaria para una unión de alta afinidad, los sitios en los ligandos de ácido nucleico y PDGF que están en contacto, la inhibición por ligandos de ADN de isoformas de PDGF en células cultivadas, y la inhibición de los efectos mitogénicos de PDGF en las células por ligandos de ADN. El Ejemplo 4 describe sustitución de ligandos derivados de SELEX con nucleótidos modificados. El Ejemplo 5 describe la síntesis de ligandos de ácido nucleico de PDGF modificados por PEG. El Ejemplo 6 describe la estabilidad de los ligandos modificados en suero. El Ejemplo 7 describe la eficacia de un ligando modificado (NX31975-40K PEG) en la reestenosis. El Ejemplo 8 describe los diversos materiales y el procedimiento usados en el Ejemplo 9 para ensayar la inhibición de PDGF en la glomerulonefritis. El Ejemplo 9 describe la inhibición de PDGF en la glomerulonefritis. El Ejemplo 10 describe los procedimientos experimentales usados en la evolución de ligandos de ARN con 2'-fluoro-2'-desoxipirimidina para PDGF y las secuencias de ARN obtenidas.

## EJEMPLO 1. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

**[0127]** Este ejemplo proporciona los procedimientos generales seguidos e incorporados en el **Ejemplos 2-4**.

### A. Materiales

**[0128]** El PDGF-AA (Mr = 29.000), PDGF-AB (Mr = 27.000) y PDGF-BB (Mr = 25.000) humanos recombinantes se adquirieron de R&D Systems (Minneapolis, MN) en forma liofilizada sin proteína portadora. Las tres isoformas se produjeron en *E. coli* a partir de genes sintéticos basados en las secuencias para la forma larga de la cadena A del PDGF humano maduro (Betsholtz y col. (1986) Nature 320: 695-699) y la forma madura natural de la cadena B del PDGF humano (Johnsson y col. (1984) EMBO J. 3: 921-928). Las bibliotecas de ADN al azar, los cebadores de PCR y los ligandos de ADN y los ligandos de ADN sustituidos con 5'-yodo-2'-desoxiuridina se sintetizaron por NeXstar Pharmaceuticals Inc. (Boulder, CO) o por Operon Technologies (Alameda, CA) usando el procedimiento de la fosforamidita en fase sólida estándar (Sinha y col. (1984) Nucleic Acids Res. 12: 4539-4557).

### SELEX DE ADN MONOCATENARIO (ADNss)



- [0129]** Las características esenciales del procedimiento SELEX se han descrito en detalle en las solicitudes de patente SELEX (véanse también, Tuerk y Gold, *Science*, 249: 505 (1990); Jellinek y col. *Biochemistry*, 33: 10450 (1994); Jellinek y col. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 11227 (1993)), que se incorporan por referencia en este documento. La biblioteca de ADNss inicial que contenía una región aleatoria contigua de cuarenta nucleótidos, flanqueada por regiones de reasociación de cebadores (Tabla 1) (SEC ID NOS: 1-3) de secuencia invariante, se sintetizó mediante el procedimiento de la fosforamidita en fase sólida utilizando una mezcla molar igual de las cuatro fosforamiditas para generar las posiciones aleatorias. La biblioteca de ADNss se purificó mediante electroforesis en un gel de urea 7 M/poliacrilamida al 8%. La banda que correspondía al ADN de longitud completa se visualizó bajo luz UV, se cortó del gel, se eluyó mediante el procedimiento de exprimir y remojar, se precipitó con etanol y se obtuvo el gránulo por centrifugación. El gránulo se secó al vacío y se suspendió de nuevo en una solución salina tamponada con fosfato complementada con tampón  $\text{MgCl}_2$  1 mM (PBSM =  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  10,1 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,8 mM, NaCl 137 mM y KCl 2,7 mM,  $\text{MgCl}_2$  1 mM, pH 7,4). Antes de la incubación con la proteína, el ADNss se calentó a 90 °C durante 2 minutos en PBSM y se enfrió en hielo. La primera selección se inició incubando aproximadamente 500 pmol ( $3 \times 10^{14}$  moléculas) de ADNss aleatorio marcado en el extremo 5' con  $^{32}\text{P}$  con PDGF-AB en tampón de unión (PBSM que contenía albúmina de suero humano (HSA) al 0,01%). La mezcla se incubó a 4 °C hasta el día siguiente seguido de una corta (15 minutos) incubación a 37 °C. El ADN unido a PDGF-AB se separó del ADN no unido mediante electroforesis en un gel de poli(acrilamida) al 8% (1:30 de bis(acrilamida):acrilamida) a 4 °C y a 5 V/cm con Tris-borato 89 mM (pH 8,3) que contenía EDTA 2 mM como tampón de elución. La banda que corresponde al complejo PDGF-ADNss, que transcurre aproximadamente con la mitad de la movilidad electroforética que el ADNss libre, se visualizó mediante autorradiografía, se cortó del gel y se eluyó mediante el procedimiento de exprimir y remojar. En las selecciones de afinidad posteriores, el ADNss se incubó con PDGF-AB durante 15 minutos a 37 °C en tampón de unión y el ADNss unido a PDGF se separó del ADN no unido mediante filtración con nitrocelulosa, como se ha descrito previamente (Green y col. (1995) *Chemistry and Biology* 2, 683-695). Todas las agrupaciones de ADNss seleccionadas por afinidad se amplificaron por PCR en el que el ADN se sometió a 12-20 rondas de ciclos térmicos (30 s a 93 °C, 10 s a 52 °C, 60 s a 72 °C) en Tris-Cl 10 mM (pH 8,4) que contenía KCl 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  7,5 mM, 0,05 mg/ml de albúmina de suero bovino, desoxinucleósido trifosfatos 1 mM, cebadores 5  $\mu\text{M}$  (Tabla 1) (SEQ ID NOS: 2, 3) y 0,1 unidades/ $\mu\text{l}$  de Taq polimerasa. El cebador de PCR 5' se marcó en el extremo 5' con polinucleótido cinasa y  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  y el cebador de PCR 3' se biotiniló en el extremo 5' utilizando biotina fosforamidita (Glen Research, Sterling, VA). Después de la amplificación por PCR, se añadió estreptavidina (Pierce, Rockford, IL) a la mezcla de reacción de PCR no purificada en un exceso 10 veces molar sobre el cebador biotinilado y se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente. El ADNds se desnaturalizó añadiendo un volumen igual de solución de terminación (formamida al 90%, dodecilsulfato sódico al 1%, azul de bromofenol al 0,025% y xilen cianol) y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. La cadena radiomarcada se separó de la cadena biotinilada unida a estreptavidina mediante electroforesis en geles de urea 7 M/poliacrilamida al 12%. La cadena de ADNss (no biotinilada) radiomarcada que migraba con mayor velocidad se cortó del gel y se recuperó como se ha descrito anteriormente. Se estimó la cantidad de ADNss a partir de la absorbancia a 260 nm utilizando el coeficiente de extinción de 33  $\mu\text{g/ml/unidad}$  de absorbancia (Sambrook y col. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2 Ed. 3 vols., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York).
- [0130]** **Clonación y Secuenciación.** La reserva enriquecida por afinidad amplificada de la ronda 12 del SELEX se purificó en un gel de poli(acrilamida) al 12% y se clonó entre los sitios *HindIII* y *PstI* en una cepa JM 109 de *E. coli* (Sanibook y col. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2 Ed. 3 vols., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor). Se usaron clones individuales para preparar plásmidos mediante lisis alcalina. Los plásmidos se secuenciaron en la región de inserción utilizando el cebador de secuenciación de orientación directa y Sequenase 2.0 (Amersham, Arlington Heights, IL) según el protocolo del fabricante.
- [0131]** **Determinación de las constantes de disociación de equilibrio aparentes y las constantes de velocidad de disociación.** Se determinó la unión de los ligandos de ADNss a bajas concentraciones, a concentraciones variantes de PDGF mediante el procedimiento de unión a filtro de nitrocelulosa tal como se ha descrito (Green y col. (1995) *Chemistry and Biology* 2: 683-695). Las concentraciones de soluciones de reserva de PDGF (en PBS) se determinaron a partir de las lecturas de absorbancia a 280 nm utilizando los siguientes valores de  $\text{e}_{280}$  calculados a partir de las secuencias aminoácidas (Gill, S. C. y von Hippel, P. H. (1989) *Anal. Biochem.* 182: 319-326): 19.500  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para PDGF-AA, 15.700  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para PDGF-AB y 11.800  $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  para PDGF-BB. El ADNss para todos los experimentos de unión se purificó mediante electroforesis en geles de urea 7 M/poliacrilamida al 12% (<40 nucleótidos) o al 8% (>80 nucleótidos). Todos los ligandos de ADNss se calentaron a 90 °C en tampón de unión en elevada dilución ( $\approx 1$  nM) durante 2 minutos y se enfriaron en hielo antes de diluirlos más en la solución de proteínas. Las mezclas de unión se incubaron típicamente durante 15 minutos a 37 °C antes de separarlas en filtros de nitrocelulosa.

**[0132]** La unión de ligandos de ADN (L) a PDGF-AA (P) se describe de forma adecuada por el modelo de unión

bimolecular para el que la fracción de ADN unido en el equilibrio ( $q$ ) viene dada por la ecuación 1:

$$q = (f/2[L])\{[P]_t + [L]_t + K_d - [(P]_t + [L]_t + K_d)^2 - 4[P]_t[L]_t\}^{1/2} \quad (1)$$

5 en la que  $[P]_t$  y  $[R]_t$  son las concentraciones de proteína total y ADN total,  $K_d$  es la constante de disociación de equilibrio y  $f$  es la eficiencia de retención de los complejos proteína-ADN en filtros de nitrocelulosa (Irvine y col. (1991) J. Mol. Biol. 222: 739-761; Jellinek y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA90: 11227-11231).

10 **[0133]** La unión de ligandos de ADN a PDGF-AB y PDGF-BB es bifásica y se puede describir mediante un modelo en el que el ligando de ADN está compuesto por dos componentes que no se interconvierten ( $L_1$  y  $L_2$ ) y que se unen a la proteína con diferentes afinidades, descritas por las correspondientes constantes de disociación,  $K_{d1}$  y  $K_{d2}$  (Jellinek y col. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11227-11231). En este caso, la solución explícita para la fracción de ADN unido ( $q$ ) viene dada por la ecuación 2:

$$q = f \left( \frac{\chi_1 K_{d1}}{1 + K_{d1} [P]} + \frac{\chi_2 K_{d2}}{1 + K_{d2} [P]} \right) [P] \quad (2)$$

15

con

$$[P] = \frac{[P]_t}{1 + \frac{\chi_1 K_{d1} [L]_t}{1 + K_{d1} [P]} + \frac{\chi_2 K_{d2} [L]_t}{1 + K_{d2} [P]}}$$

20

donde  $\chi_1$  y  $\chi_2$  ( $= 1 - \chi_1$ ) son las fracciones molares de  $L_1$  y  $L_2$ . Los valores de  $K_d$  para la unión de ligandos de ADN a PDGF se calcularon ajustando los datos a la ecuación 1 (para PDGF-AA) o a la ecuación 2 (para PDGF-AB y PDGF-BB) usando el procedimiento no lineal del mínimo cuadrado.

25 **[0134]** Las constantes de velocidad de disociación ( $k_{off}$ ) se determinaron midiendo la cantidad de ligandos mínimos marcados en el extremo 5' con  $^{32}P$  (0,17 nM) unida a PDGF-AB (1 nM) en función del tiempo después de la adición de un exceso molar de 500 veces de ligandos no marcados, utilizando la unión a filtro de nitrocelulosa como el procedimiento de separación. Los valores de  $k_{off}$  se determinaron ajustando los datos a la ecuación de primer orden 3:

30

$$(q - q_{\infty}) / (q_0 - q_{\infty}) = \exp(-k_{off}t) \quad (3)$$

en la que  $q$ ,  $q_0$  y  $q_{\infty}$  representan las fracciones de ADN unidas a PDGF-AB en cualquier tiempo ( $t$ ),  $t = 0$  y  $t = \infty$ , respectivamente.

35

**[0135]** Determinaciones de ligando mínimo. Para generar una población de ligandos de ADN marcados en el extremo 5' truncados en serie a partir del extremo 3', se marcó radioactivamente un cebador complementario a la región de secuencia invariante 3' de una plantilla de ligando de ADN (cebador truncado 5N2, Tabla 1) (SEC ID NO: 3) en el extremo 5' con  $[\gamma\text{-}^{32}P]\text{-ATP}$  y polinucleótido cinasa T4, se reasoció a la plantilla y se extendió con Sequenase (Amersham, Arlington Heights, IL) y una mezcla de los cuatro dNTP y ddNTP. Después de la incubación en tampón de unión durante 15 minutos a 37 °C, se separaron los fragmentos de esta población que conservaban una unión de alta afinidad por PDGF-AB de aquellos con una afinidad más débil mediante separación con filtro de nitrocelulosa. La resolución electroforética de los fragmentos en geles de urea 7 M/poliacrilamida al 8%, antes y después de la selección por afinidad, permite la determinación de la región terminal 3'. Para generar una población de ligandos de

40

ADN marcados en el extremo 3' truncados en serie a partir del extremo 5', los ligandos de ADN se marcaron radioactivamente en el extremo 3' con [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ]-cordicepina-5'-trifosfato (New England Nuclear, Boston, MA) y ARN ligasa T4 (Promega, Madison, WI), se fosforilaron en el extremo 5' con ATP y polinucleótido cinasa T4, y se digirieron parcialmente con exonucleasa lambda (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). La digestión parcial de 10 pmoles de ligando marcado en 3' se llevó a cabo en un volumen de 100  $\mu\text{l}$  con glicina-KOH 7 mM (pH 9,4),  $\text{MgCl}_2$  2,5 mM, BSA 1  $\mu\text{g/ml}$ , ARNt 15  $\mu\text{g}$  y 4 unidades de exonucleasa lambda durante 15 minutos a 37 °C. La región terminal 5' se determinó de un modo análogo al descrito para la región terminal 3'.

**[0136] Mediciones de la temperatura de fusión ( $T_m$ ).** Se obtuvieron los perfiles de fusión para los ligandos de ADN mínimos en un espectrofotómetro Cary Model 1E. Los oligonucleótidos (320-400 nM) se calentaron a 95 °C en PBS, PBSP o PBS con EDTA 1 mM y se enfriaron a temperatura ambiente antes de la determinación del perfil de fusión. Los perfiles de fusión se generaron calentando las muestras a la velocidad de 1 °C/minuto desde 15-95 °C y registrando la absorbancia cada 0,1 °C. Se calculó la primera derivada de los datos utilizando el programa de representación KaleidaGraph (Synergy Software, Reading, PA). Los valores de la primera derivada se allanaron utilizando una función de allanamiento de 55 puntos promediando cada punto con 27 datos en cada lado. Se usó el pico de las curvas allanadas de primera derivada para estimar los valores de  $T_m$ .

**[0137] Entrecruzamiento de ligandos de ADN sustituidos con 5-yodo-2'-desoxiuridina a PDGF-AB.** Se sintetizaron ligandos de ADN que contenían una única o múltiples sustituciones de 5'-yodo-2'-desoxiuridina por timidina utilizando el procedimiento de la fosforamidita en fase sólida. Para evaluar la capacidad de entrecruzamiento, se incubaron cantidades traza de ligandos marcados en el extremo 5' con  $^{32}\text{P}$  con PDGF-AB (100 nM) en tampón de unión a 37 °C durante 15 minutos antes de la irradiación. La mezcla de unión se transfirió a una cubeta de longitud de recorrido de 1 cm termostata a 37 °C y se irradió a 308 nm durante 25-400 s a 20 Hz utilizando un láser de excímero Lumonics Modelo EX748 cargado con XeCl. La cubeta se colocó 24 cm más allá del punto focal de una lente convergente, donde la energía en el punto focal era de 175 mJ/pulso. Después de la irradiación, se mezclaron las alícuotas con un volumen igual de tampón de carga de formamida que contenía SDS al 0,1% y se incubaron a 95 °C durante 5 minutos antes de la resolución del complejo de PDGF/ligando entrecruzado del ligando libre en geles de urea 7 M/poliacrilamida al 8%.

**[0138]** Para identificar el sitio de entrecruzamiento de la proteína para el ligando 20t-14 (SEQ ID NO: 92), se realizó la unión y la asociación a una escala mayor. Se incubaron el PDGF-AB y el ligando marcado en el extremo 5' con  $^{32}\text{P}$ , cada uno a 1  $\mu\text{M}$  en PBSP, y se irradiaron (300 s) tal como se ha descrito anteriormente en dos recipientes de reacción de 1 ml. Se combinaron las mezclas de reacción, se precipitaron con etanol y se suspendieron de nuevo en 0,3 ml de tampón Tris-HCl (100 mM, pH 8,5). El complejo entrecruzado de PDGF-AB/ligando se digirió con 0,17  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de tripsina modificada (Boehringer Mannheim) durante 20 horas a 37 °C. La mezcla de digestión se extrajo con fenol/cloroformo, cloroformo y a continuación se precipitó con etanol. El gránulo se volvió a suspender en agua y un volumen igual de tampón de carga de formamida con  $\beta$ -mercaptoetanol al 5% (v/v) (sin SDS), se incubó a 95 °C durante 5 minutos y se resolvió en un gel de urea 7 M/poliacrilamida al 8% de 40 cm. El péptido tríptico/ligando entrecruzado que migraba como dos bandas separadas por poca distancia de aproximadamente 1,5 cm por encima de la banda del ligando libre se cortó del gel y se eluyó mediante el procedimiento de exprimir y remojar, y se precipitó con etanol. El péptido entrecruzado seco (aproximadamente 160 pmoles en base a la actividad específica) se secuenció mediante degradación Edman (Midwest Analytical, Inc. St. Louis, MO).

**[0139] Ensayo de Unión al Receptor.** La unión de  $^{125}\text{I}$ -PDGF-AA y  $^{125}\text{I}$ -PDGF-BB a células endoteliales aórticas porcinas (PAE) transfectadas con receptores  $\alpha$  o  $\beta$  de PDGF se realizó tal como se ha descrito (Heldin y col. (1988) EMBO J. 7, 1387-1394). Se añadieron diferentes concentraciones de ligandos de ADN al cultivo celular (1,5  $\text{cm}^2$ ) en 0,2 ml de solución salina tamponada con fosfato complementada con 1 mg de albúmina sérica bovina por ml junto con  $^{125}\text{I}$ -PDGF-AA (2 ng, 100.000 cpm) o  $^{125}\text{I}$ -PDGF-BB (2 ng, 100.000 cpm). Después de la incubación a 4 °C durante 90 minutos, se lavaron los cultivos celulares y se determinó la radioactividad asociada a las células en un contador  $\gamma$  (Heldin y col. (1988) EMBO J. 7, 1387-1394).

**[0140] Ensayo de Incorporación de [ $^3\text{H}$ ]timidina.** Se realizó la incorporación de [ $^3\text{H}$ ]timidina en células PAE que expresaban el receptor  $\beta$  de PDGF en respuesta a 20 ng/ml de PDGF-BB o suero fetal de ternera al 10% y en presencia de diferentes concentraciones de ligandos de ADN tal como se ha descrito (Mori y col. (1991) J. Biol. Chem. 266: 21158-21164). Después de la incubación durante 24 horas a 37 °C, se determinó la radioactividad de  $^3\text{H}$  incorporada al ADN utilizando un contador  $\beta$ .

## EJEMPLO 2. Ligandos de ADNss de PDGF

[0141] Se identificaron ligandos de ADN de elevada afinidad de PDGF AB mediante el procedimiento SELEX a partir de una biblioteca de  $\approx 3 \times 10^{14}$  moléculas (500 pmoles) de ADN de cadena única aleatorizado en cuarenta posiciones contiguas (Tabla 1) (SEC ID NO: 1). El ADN unido a PDGF se separó del ADN no unido mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en la primera ronda y mediante unión a filtro de nitrocelulosa en las rondas subsiguientes. Después de 12 rondas de SELEX, la reserva enriquecida en afinidad se unió a PDGF-AB con una constante de disociación aparente ( $K_d$ ) de  $\approx 50$  pM (datos no mostrados). Esto representa una mejora en la afinidad de  $\approx 700$  veces comparado con la biblioteca de ADN inicial aleatorizado. Esta reserva enriquecida en afinidad se utilizó para generar una biblioteca de clones a partir de la cual se secuenciaron 39 aislados. Se descubrió que 32 de estos ligandos tenían secuencias únicas (Tabla 2) (SEC ID NOS: 4-35). Los ligandos que se sometieron a la determinación de secuencia mínima se encuentran marcados con un asterisco (\*) al lado del número del clon. Los números de los clones que se encontró que conservaban la unión de elevada afinidad como ligandos mínimos se encuentran en cursiva. Todos los ligandos mostrados en la Tabla 2 se exploraron para determinar su capacidad de unión a PDGF AB utilizando el procedimiento de unión a filtro de nitrocelulosa. Para identificar los mejores ligandos de este grupo, se determinaron sus afinidades relativas por PDGF-AB midiendo la fracción de ligandos marcados en el extremo 5' con  $^{32}\text{P}$  unidas a PDGF-AB a lo largo de un rango de concentraciones de proteína. Para los ligandos que se unían a PDGF-AB con elevada afinidad, también se examinó la afinidad por PDGF-BB y PDGF-AA; en todos los casos, la afinidad de los ligandos por PDGF-AB y PDGF-BB fue comparable mientras que la afinidad por PDGF-AA fue considerablemente inferior (datos no mostrados).

[0142] Veintiuno de los treinta y dos ligandos únicos se pueden agrupar en una familia de secuencias mostrada en la Tabla 3 (SEQ ID NOS: 4, 5, 7-9, 14-24, 26, 31, 32, 34 y 35). Las secuencias de la región aleatorizada inicial (letras en mayúscula) se encuentran alineadas según el motivo de unión de tres hélices consenso. Los nucleótidos en la región invariante de la secuencia (letras en minúscula) sólo se muestran cuando participan en la estructura secundaria predicha. Se "desconectaron" varios ligandos (símbolo igual) para mostrar su relación con el motivo consenso a través de permutación circular. Los nucleótidos que se predijo que participaban en el apareamiento de bases se indican con flechas invertidas por debajo de la línea, con las puntas de las flechas apuntando hacia la unión de hélice. Las secuencias se dividen en dos grupos, A y B, basándose en el primer nucleótido de la cadena (desde el extremo 5') en la unión de hélice (A o G, entre las hélices II y III). Los emparejamientos erróneos en las regiones de la hélice se muestran con puntos debajo de las correspondientes letras (se permitieron los pares de bases G-T y T-G). En los sitios en los que se producen protuberancias de un único nucleótido, el nucleótido que se emparejaba erróneamente se muestra por encima del resto de la secuencia entre sus vecinos.

[0143] Esta clasificación se basa en parte en la homología de secuencia entre estos ligandos, pero en gran parte en base a un motivo de estructura secundaria compartido: una unión de tres hélices con un bucle de tres nucleótidos en el punto de ramificación (Figura 1) (SEQ ID NO: 82). Estos ligandos se subdividieron en dos grupos; para los ligandos del grupo A, el bucle en el punto de ramificación tiene una secuencia invariante AGC, y en el grupo B, esta secuencia es G(T/G)(C/T). El motivo de estructura secundaria consenso propuesto viene soportado por una covariación en el emparejamiento de bases en los nucleótidos no conservados en las hélices (Tabla 4). Debido a que las uniones de tres cadenas están codificadas en cadenas de ADN continuas, dos de las hélices terminan en bucles en el extremo distal de la unión. Estos bucles son muy variables, tanto en longitud como en secuencia. Además, a través de permutación circular del motivo consenso, los bucles existen en las tres hélices, aunque son más frecuentes en las hélices II y III. En conjunto, estas observaciones sugieren que las regiones distales de la unión de hélice no son importantes para la unión de elevada afinidad a PDGF-AB. Los nucleótidos altamente conservados realmente se encuentran cerca de la unión de hélice (Tabla 3, Figura 1).

### EJEMPLO 3. DETERMINACIONES DE LIGANDO MÍNIMO

[0144] Se determinó la secuencia mínima necesaria para la unión de elevada afinidad para los seis mejores ligandos de PDGF-AB. En general, la información sobre las regiones terminales de secuencia mínima 3' y 5' se puede obtener fragmentando parcialmente el ligando de ácido nucleico y a continuación seleccionando los fragmentos que conservan una elevada afinidad por la diana. Con ligandos de ARN, los fragmentos se pueden generar de forma conveniente mediante hidrólisis alcalina suave (Tuerk y col. (1990) J. Mol. Biol. 213: 749-761; Jellinek y col. (1994) Biochemistry 33: 10450-10456; Jellinek y col. (1995) Biochemistry 34: 11363-11372; Green y col. (1995) J. Mol. Biol. 247: 60-68). Debido a que el ADN es más resistente a las bases, para ADN se requiere un procedimiento alternativo para generar fragmentos. Para determinar la región terminal 3', se generó una población de fragmentos de ligandos truncados en serie en el extremo 3' extendiendo el cebador marcado en el extremo 5' reasociado a la secuencia invariante 3' de un ligando da ADN usando el procedimiento de secuenciación didesoxi. Esta población se seleccionó por afinidad mediante filtración con nitrocelulosa y los fragmentos más cortos

(truncados a partir del extremo 3') que conservaban una unión de elevada afinidad por PDGF-AB se identificaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida. La región terminal 5' se determinó de un modo análogo, excepto que una población de fragmentos de ligandos marcados en el extremo 3' truncados en serie en la posición 5' se generó mediante digestión limitada con exonucleasa lambda. El ligando mínimo se define a continuación como la

5 secuencia entre las dos regiones terminales. Es importante tener en mente que, mientras que la información derivada de estos experimentos es útil, las regiones terminales sugeridas no son en ningún sentido absolutas debido a que las regiones terminales son examinadas un término cada vez. Los términos no truncados (marcados radioactivamente) pueden aumentar, reducir o no tener ningún efecto en la unión (Jellinek y col. (1994) Biochemistry, 33: 10450-10456).

10

**[0145]** De los seis ligandos mínimos para los que se determinaron las regiones terminales de forma experimental, dos (20t (SEC ID NO: 83) (figura 2A) y 41t (SEC ID NO: 85) (figura 2C); versiones truncadas de los ligandos 20 y 41) se unían con afinidades comparables (en un factor de 2) a sus análogos de longitud completa y cuatro tenían afinidades considerablemente inferiores. Los dos ligandos mínimos que conservaban una unión de elevada afinidad

15 a PDGF, 20t y 41t, contenían el motivo de estructura secundaria de unión de tres hélices predicho (figuras 2A-C) (SEQ ID NOS: 83-85). La secuencia del tercer ligando mínimo que se unía a PDGF-AB con elevada afinidad, 36t (SEC ID NO: 84), se dedujo del conocimiento del motivo consenso (figura 2B). En experimentos posteriores, se encontró que la región de cadena única en el extremo 5' del ligando 20t no es importante para la unión de elevada afinidad. Además, los bucles de trinucleótidos en las hélices II y III en el ligando 36t (GCA y CCA) se pueden

20 reemplazar con espaciadores de pentaetilenglicol (a continuación). Estos experimentos proporcionan un soporte adicional de la importancia de la región de unión de hélice en la unión de elevada afinidad a PDGF-AB.

**[0146]** Unión de los ligandos mínimos a PDGF. La unión de los ligandos mínimos 20t, 36t y 41t a concentraciones variantes de PDGF-AA, PDGF-AB y PDGF-BB se muestra en las figuras 3A-3C. De acuerdo con las propiedades de

25 unión de sus análogos de longitud completa, los ligandos mínimos se unen a PDGF-AB y PDGF-BB con una afinidad sustancialmente mayor que a PDGF-AA (figuras 3A-3C, Tabla 4). De hecho, su afinidad por PDGF-AA es comparable a la del ADN aleatorio (datos no mostrados). La unión a PDGF-AA se describe de forma adecuada con una ecuación de unión monofásica mientras que la unión a PDGF-AB y PDGF-BB es notablemente bifásica. En experimentos SELEX previos, se ha encontrado que la unión bifásica es una consecuencia de la existencia de

30 especies de ácidos nucleicos separables que se unen a su proteína diana con diferentes afinidades (Jellinek y col. (1995) Biochemistry, 34: 11363-11372) y resultados no publicados). En estos momentos no se conoce la identidad de las fracciones de alta y baja afinidad. Debido a que estos ligandos de ADN descritos en esta memoria se sintetizaron químicamente, es posible que la fracción que se une a PDGF-AB y PDGF-BB con menor afinidad represente ADN químicamente imperfecto. Como alternativa, las especies de alta y baja afinidad pueden representar

35 isómeros conformacionales estables que se unen a la cadena B de PDGF con diferentes afinidades. En cualquier caso, el componente de unión de elevada afinidad es la especie de ligando más poblada en todos los casos (figuras 3A-3C). Por comparación, un ligando de ADN de 39-mero que se une a la trombina humana con una  $K_d$  de 0,5 nM (ligando 39T (SEC ID NO: 88): 5'- CAGTCCGTGGTAGGGCAGGTTGGGGTGACTTCGTGGAA[3'T], donde [3'T] representa un nucleótido de timidina unido 3'-3' añadido para reducir la degradación por 3'-exonucleasas) y que tiene

40 una estructura predicha de bucle-tallo, se une a PDGF-AB con una  $K_d$  de 0,23  $\mu$ M (datos no mostrados).

**[0147]** Velocidades de disociación de los ligandos mínimos. Para evaluar la estabilidad cinética de los complejos de PDGF-AB/ADN, se determinaron las velocidades de disociación a 37 °C para los complejos de ligandos mínimos 20t (SEQ ID NO:83), 36t (SEQ ID NO:84) y 41t (SEQ ID NO:85) con PDGF-AB midiendo la cantidad de ligandos

45 marcados radioactivamente (0,17 nM) unidas a PDGF-AB (1 nM) como función del tiempo después de la adición de un gran exceso de ligandos no marcados (figura 4). A estas concentraciones de ligando de ADN y proteína, únicamente la fracción de elevada afinidad de los ligandos de ADN se une a PDGF-AB. Se obtuvieron los siguientes valores para las constantes de velocidad de disociación ajustando los datos mostrados en la figura 4 a la ecuación de velocidad de primer orden:  $4,5 \pm 0,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2} = 2,6 \text{ min}$ ) para el ligando 20t,  $3,0 \pm 0,2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2} = 3,8 \text{ min}$ )

50 para el ligando 36t, y  $1,7 \pm 0,1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  ( $t_{1/2} = 6,7 \text{ min}$ ) para el ligando 41t. Las velocidades de asociación calculadas para las constantes de disociación y las constantes de velocidad de disociación ( $k_{on} = k_{off}/K_d$ ) son  $3,1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  para 20t,  $3,1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  para 36t y  $1,2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  para 41t.

**[0148]** Temperaturas de fusión de los ligandos mínimos. Se determinaron temperaturas de fusión ( $T_m$ ) para los

55 ligandos mínimos 20t, 36t y 41t a partir de los perfiles de absorbancia de UV frente a la temperatura (figura 5). En las concentraciones de oligonucleótido usadas en estos experimentos (320-440 nM), únicamente se observaron las especies monoméricas como bandas únicas en geles de poliacrilamida no desnaturizantes. Los valores de  $T_m$  se obtuvieron a partir de las primeras representaciones derivativas de los perfiles de fusión. Los ligandos 20t y 41t mostraron fusión monofásica con valores de  $T_m$  de 44 °C y 49 °C. El perfil de fusión del ligando 36t era bifásico, con

el valor de  $T_m$  de 44 °C para la primera transición (principal) y = 63 °C para la segunda transición. Fotoentrecruzamiento de ligandos de ADN Mínimos sustituidos con 5-yodo-2'-desoxiuridina. Para determinar los sitios de los ligandos de ADN y de PDGF que se encuentran en contacto íntimo, se realizaron una serie de experimentos de fotoentrecruzamiento con los ligandos de ADN 20t, 36t y 41t sustituidos con 5'-yodo-2'-desoxiuridina (IdU). Tras una excitación monocromática a 308 nm, los nucleótidos con pirimidinas sustituidas con 5-yodo y 5-bromo pueblan un estado de triplete reactivo después de un cruce entre sistemas del inicial  $n$  a uno de transición  $\pi^*$ . Las especies del estado triplete excitado reaccionan a continuación con los residuos aminoácidos ricos en electrones (tales como Trp, Tyr e His) que se encuentran cerca para producir un entrecruzamiento covalente. Este procedimiento ha sido ampliamente utilizado en estudios de interacciones ácido nucleico-proteína debido a que permite la irradiación con luz de >300 nm que minimiza el daño producido por la luz (Willis y col. (1994) Nucleic Acids Res. 22: 4947-4952; Stump y Hall (1995) RNA1: 55-63; Willis y col. (1993) Science 262: 1255-1257; Jensen y col. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A. 92: 12220-12224). Se sintetizaron análogos de los ligandos 20t, 36t y 41t en los que se sustituyeron todos los residuos de timidina con residuos de IdU utilizando el procedimiento de la fosforamidita en fase sólida. La afinidad de estos ligandos sustituidos con IdU por PDGF-AB se encontraba de algún modo aumentada comparándola con la de los ligandos no sustituidos y basándose en la aparición de bandas con movilidades electroforéticas más lentas en geles de urea 7 M/poliacrilamida al 8%, los tres ligandos sustituidos con IdU y marcados en el extremo 5' se entrecruzaban con PDGF-AB bajo irradiación a 308 nm (datos no mostrados). La eficiencia de entrecruzamiento mayor se observó con el ligando 20t sustituido con IdU. Para identificar la posición o posiciones de IdU específicas responsables del entrecruzamiento observado, se analizaron siete análogos de 20t sustituidos con una solo IdU o de forma múltiple con varias IdU para determinar su capacidad de fotoentrecruzamiento con PDGF-AB: ligandos 20t-I1 a 20t-I7 (5'-TGGGAGGGCGCGT<sup>1</sup>T<sup>1</sup>CT<sup>1</sup>T<sup>1</sup>CGT<sup>2</sup>GGT<sup>3</sup>T<sup>4</sup>ACT<sup>5</sup>T<sup>6</sup>T<sup>6</sup>AGT<sup>7</sup>CCCG-3' (SEC ID NOS: 89-95) donde los números indican sustituciones de IdU en los nucleótidos de timidina indicados para los siete ligandos). De estos siete ligandos, se observó un entrecruzamiento eficiente a PDGF-AB únicamente con el ligando 20t-I4 (SEQ ID NO: 92). La posición de IdU fotorreactiva corresponde a la timidina proximal 3' en el bucle en la unión de hélice (Figura 2).

**[0149]** Para identificar el residuo o residuos aminoácidos reticulados en PDGF-AB, se incubó una mezcla de 20t-14 marcado en el extremo 5' y PDGF-AB durante 15 minutos a 37 °C seguido de irradiación a 308 nm. A continuación, la mezcla de reacción se digirió con tripsina modificada y los fragmentos reticulados se resolvieron en un gel poliacrilamida al 8%/urea 7 M. La degradación Edman del fragmento peptídico recuperado de la banda que migraba más cerca de la banda de ADN libre reveló la secuencia aminoácida KKPIXKK (SEC ID NO: 96), donde X indica un aminoácido modificado que no se pudo identificar con los 20 estándares aminoácidos derivados. Esta secuencia peptídica, donde X es fenilalanina, corresponde a los aminoácidos 80-86 en la cadena B de PDGF (Johnsson y col. (1984) EMBO J. 3: 921-928) que en la estructura cristalina de PDGF-BB comprende una parte del bucle III expuesto al disolvente (Oefner y col. (1992) EMBO J. 11: 3921-3926). En la cadena A de PDGF, no existe esta secuencia peptídica (Betsholtz y col. (1986) Nature 320: 695-699). Conjuntamente, estos datos establecen un punto de contacto entre un residuo de timidina específico en el ligando 20t y la fenilalanina 84 de la cadena B de PDGF.

**[0150]** Ensayo de Unión al Receptor. Para determinar si los ligandos de ADN para PDGF eran capaces de inhibir los efectos de las isoformas de PDGF en células en cultivo, se determinaron en primer lugar los efectos en la unión de isoformas de PDGF marcadas con <sup>125</sup>I a receptores  $\alpha$  y  $\beta$  de PDGF expresados de forma estable en células endoteliales de la aorta porcina (PAE) mediante transfección. Los ligandos 20t, 36t y 41t inhibían de forma eficiente la unión de <sup>125</sup>I-PDGF-BB a receptores  $\alpha$  de PDGF (figura 6) o a receptores  $\beta$  de PDGF (datos no mostrados), con los efectos de la mitad del máximo alrededor de 1 nM de ligando de ADN. El ligando de ADN T39 (SEQ ID NO: 88) (que se ha descrito anteriormente), dirigido contra trombina e incluido como control, no presentaba ningún efecto. Ninguno de los ligandos fue capaz de inhibir la unión de <sup>125</sup>I-PDGF-AA al receptor  $\alpha$  de PDGF (datos no mostrados), lo que concuerda con la especificidad observada de los ligandos 20t, 36t y 41t para PDGF-BB y PDGF-AB.

**[0151]** Inhibición de los Efectos Mitogénicos por Ligandos Mínimos. Se investigó la capacidad de los ligandos de ADN para inhibir los efectos mitogénicos de PDGF-BB en células PAE que expresan receptores  $\beta$  de PDGF. Como se muestra en la figura 7, el efecto estimulador de PDGF-BB en la incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina se neutralizó por los ligandos 20t, 36t y 41t. El ligando 36t mostró una inhibición de la mitad del máximo a la concentración de 2,5 nM; el ligando 41t era ligeramente más eficiente y el ligando 20t ligeramente menos eficiente. El ligando control T39 no tuvo efectos. Además, ninguno de los ligandos inhibió los efectos estimuladores del suero fetal de ternera en la incorporación de [<sup>3</sup>H]timidina en estas células, mostrando que los efectos inhibidores son específicos para PDGF.

#### EJEMPLO 4. MODIFICACIONES POSTERIORES A SELEX

**[0152]** La estabilidad de los ácidos nucleicos a nucleasas es un aspecto importante a tener en cuenta en los esfuerzos que se realizan para desarrollar compuestos terapéuticos basados en ácidos nucleicos. Diferentes experimentos han mostrado que muchos, y en algunos casos la mayoría, de los nucleótidos en los ligandos derivados de SELEX se pueden sustituir con nucleótidos modificados que resistan la digestión por nucleasas, sin comprometer la unión de alta afinidad (Green y col. (1995) *Chemistry and Biology* 2: 683-695); Green y col. (1995) *J. Mol. Biol.* 247: 60-68).

**[0153]** Se realizó una serie de experimentos de sustitución para identificar posiciones en el ligando 36t que toleren una sustitución con 2'-O-metil (2'-O-Me) o 2'-fluoro (2'-F). Las Tablas 6 y 7 y las Figuras 8A y 8B resumen las sustituciones examinadas y su efecto sobre la afinidad de los ligandos modificados para PDGF-AB o PDGF-BB. Se obtuvieron fosforamiditas de 2-fluoropirimidina nucleósido a partir de JBL Scientific (San Luis Obispo, CA). Se obtuvieron fosforamiditas de 2'-O-metilpurina a partir de PerSeptive Biosystems (Boston, MA). Todas las demás fosforamiditas de nucleósidos fueron de PerSeptive Bio-systems (Boston, MA). No se examinaron todas las combinaciones de sustitución. No obstante, estos experimentos se han usado para identificar el patrón de las sustituciones de 2'-O-Me y 2'-F que son compatibles con la unión de alta afinidad a PDGF-AB o PDGF-BB. Cabe señalar que bucles de trinucleótidos en las hélices II y III en el ligando 36t (figuras 2B y 8B) pueden reemplazarse por espaciadores de pentaetilenglicol (18 átomos) (Spacer Fosforamidita 18, Glen Research, Sterling, VA) (véase el Ejemplo 5 para la descripción de la síntesis de un ligando sustituido con pentaetilenglicol) sin comprometer la unión de alta afinidad a PDGF-AB o -BB. Esto está en consonancia con la noción de que el dominio de unión de hélice del ligando representa el núcleo del motivo estructural requerido para la unión de alta afinidad. En términos prácticos, el reemplazo de seis nucleótidos con dos espaciadores de pentaetilenglicol es ventajoso ya que reduce a cuatro el número de etapas de acoplamiento requeridas para la síntesis del ligando. Además de los experimentos de sustitución, se descubrió que podían eliminarse cuatro nucleótidos de la base de la hélice I sin la perder afinidad de unión (comparar, por ejemplo, el ligando 36t (SEQ ID NO: 84) con 36ta (SEQ ID NO: 141) o el ligando 1266 (SEQ ID NO: 124) con 1295 (SEQ ID NO: 127) en las Tablas 6 y 7).

#### **EJEMPLO 5. SINTESIS DE LIGANDOS DE ÁCIDO NUCLEICO DE PDGF MODIFICADOS POR PEG**

##### **A) Procedimiento General para la Síntesis de NX31975 (SEQ ID NO: 148) en un Soporte Sólido**

**[0154]** La síntesis se realizó en una escala de 1 mmol en un sintetizador automatizado millipore 8800 usando desoxinucleósido fosforamiditas convencionales, 2'-O-metil-5'-O-DMT-N2-terc-butilfenoxiacetilguanosina-fosforamidita, 2'-O-metil-5'-O-DMT-N6-terc-butilfenoxiacetiladenosina-fosforamidita, 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-O-DMT-uridina-fosforamidita, 2'-desoxi-2'-fluoro-5'-O-DMT-N4-acetilcitidina-3'-N,N-diisopropil-(2-cianoetil)-fosforamidita, 18-O-DMT-hexaetilenglicol-1-[N,N-diisopropil-(2-cianoetil)-fosforamidita] (figura 9C), y 5-trifluoroacetamidopentan-1-[N,N-diisopropil-(2-cianoetil)-fosforamidita] (figura 9D). Las síntesis se realizaron usando 4,5-dicianoimidazol como el activador en un soporte de vidrio de poro controlado (CPG) de un tamaño de poro de 600 Å, malla de 80-120, y carga de 60-70 µmol/g con 5'-succinil timidina. Después de la síntesis, los oligos se desprotegeron con NH<sub>4</sub>OH al 40%, a 55 °C durante 16 horas. El soporte se filtró y se lavó con agua y 1:1 de acetonitrilo/agua, y los lavados combinados se evaporaron a sequedad. El contraión de amonio en la estructura se intercambió por ión de trietilamonio por intercambio de sal de fase inversa y el disolvente se evaporó para proporcionar el oligo en bruto en forma de la sal trietilamonio.

**[0155]** Los separadores de hexaetilenglicol en los bucles se fijan a los oligonucleótidos a través de enlaces de fosfato. Las estructuras de los 2 bucles se muestran en las figuras 9A y 9B. El grupo fosfato 5' mostrado es de la fosforamidita de hexaetilenglicol.

##### **B) Conjugación de 40K PEG NHS éster al amino-enlazador en Ligandos de Ácido Nucleico de PDGF**

**[0156]** El oligonucleótido en bruto NX31975 que contenía el grupo amino primario 5' se disolvió en tampón borato sódico 100 mM (pH 9) a una concentración de 60 mg/ml. En un tubo separado se disolvieron 2 equivalentes de PEG NHS éster (figura 9E) (Shearwater Polymers, Inc.) en DMF seca (proporción 1:1 de borato:DMF) y la mezcla se calentó para disolver el PEG NHS éster. Después, la solución oligo se añadió rápidamente a la solución PEG y la mezcla se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante 10 minutos. Aproximadamente el 95% del oligo se conjugó con el PEG NHS éster.

#### **EJEMPLO 6. ESTABILIDAD DE LOS LIGANDOS MODIFICADOS EN SUERO**

**[0157]** Se comparó la estabilidad de los ligandos de ADN (36ta) (SEQ ID NO: 141) y de ADN modificado

(NX21568) (SEQ ID NO: 146) en suero de rata a 37 °C. El suero usado para estos experimentos se obtuvo a partir de una rata Sprague-Dawley y se filtró a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,45 µm y se tamponó con tampón fosfato sódico 20 mM. Al suero se le añadieron los ligandos de prueba (36ta o NX21568) a la concentración final de 500 nM. La concentración en suero final fue del 85% como resultado de la adición del tampón y el ligando.

- 5 De la mezcla de incubación original de 900 µl, se extrajeron 100 µl de alícuotas en diversos puntos de tiempo y se añadieron a 10 µl de EDTA 500 mM (pH 8,0), se agitaron vorticialmente, se congelaron en hielo seco y se almacenaron a -20 °C hasta el final del experimento. La cantidad de ligandos oligonucleotídicos de longitud completa restante para cada uno de los puntos del tiempo se cuantificó mediante análisis por HPLC. Para preparar las muestras para las inyecciones de HPLC, se añadieron 200 µl de una mezcla de formamida al 30%, tampón Tris 25
- 10 mM al 70% (pH 8,0) que contenía acetonitrilo al 1% a 100 µl de muestras descongeladas del momento, se agitaron vorticialmente durante 5 segundos y se centrifugaron durante 20 minutos a 14.000 rpm en una microcentrífuga Eppendorf. El análisis se realizó usando una columna de cromatografía de intercambio iónico (NuceoPac, Dionex, PA-100, 4 x 50 mm) aplicando un gradiente de LiCl. La cantidad de oligonucleótidos de longitud completa restante en cada intervalo de tiempo se determinó a partir de las áreas de pico (figura 10). Con una semivida de
- 15 aproximadamente 500 minutos, el ligando modificado (NX21568) mostró una estabilidad sustancialmente mayor en suero de rata en comparación con el ligando de ADN (36ta), que se degradó con una semivida de aproximadamente 35 minutos (figura 10). Por lo tanto, el aumento en la estabilidad en suero se obtiene de las sustituciones 2'.

#### EJEMPLO 7. EFICACIA DE NX31975-40K PEG (SEQ ID NO: 146) EN REESTENOSIS

- 20 **[0158]** Modelo de Reestenosis de Rata y Resultados de Eficacia. El tiempo de residencia en plasma de los ligandos de ácido nucleico se mejora dramáticamente por la adición de grupos funcionales grandes e inertes, tales como polietilenglicol (véase, por ejemplo, el documento PCT/US 97/18944). Para los experimentos de eficacia *in vivo*, se conjugó 40K PEG con NX31975 para crear NX31975-40K PEG como se describe en el Ejemplo 5B (véase la figura
- 25 9A para una descripción molecular). De forma importante, en base a los experimentos de unión, la adición del grupo PEG de 40 kDa en el extremo 5' del ligando no afecta a su afinidad de unión para PDGF-BB.

- [0159]** El efecto de la inhibición selectiva de PDGF-B por NX31975-40K PEG se estudió en ratas Sprague-Dawley macho de tres meses de edad (370-450 g). Las ratas se alojaron tres por caja con acceso libre a una dieta de laboratorio convencional y agua. Se proporcionó luz artificial 14 horas por día. Los experimentos se realizaron de acuerdo con las directrices institucionales en el Animal Department, Department of Surgery, University Hospital, Uppsala University, Suecia.
- 30

- [0160]** Se asignaron de forma aleatoria un total de 30 ratas a uno de dos grupos de tratamiento: 15 ratas en el grupo uno recibieron 10 mg/kg de peso corporal de NX31975-40K PEG en solución salina tamponada en fosfato (PBS) dos veces al día administrada mediante inyecciones por vía intraperitoneal (i.p.) y 15 ratas en el grupo dos (el grupo de control) recibieron un volumen igual de PBS (aproximadamente 1 ml). La duración del tratamiento fue de 14 días. Las primeras inyecciones en ambos grupos se administraron una hora antes de la lesión arterial.
- 35

- [0161]** Para generar las lesiones arteriales, todos los animales se anestesiaron con una inyección i.p. de una mezcla de una parte de Fentanilo-fluanisona (Hypnorm vet, fluanisona 10 mg/ml, fentanilo 0,2 mg/ml, Janssen Pharmaceutica, Beerse, Bélgica), una parte de midazolam (Dormicum, Midazolam 5 mg/ml. F. Hoffman-La Roche AG, Basel, Suiza) y dos partes de agua estéril, 0,33 ml/100 g de rata. La arterias carótida común izquierda distal y carótida externa se expusieron a través de una incisión de la línea media en el cuello. La arteria carótida común izquierda se traumatizó mediante el pase intraluminal de un catéter de embolectomía 2F Fogarty introducido a través de la arteria carótida externa. El catéter se pasó tres veces con el globo expandido lo suficiente con 0,06 ml de agua destilada para conseguir una distensión de la propia carótida. La carótida externa se ligó después de la retirada del catéter y la herida se cerró. Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron por un cirujano cegado a los grupos de tratamiento.
- 40

- [0162]** Catorce días después de la lesión del catéter, los animales se anestesiaron como anteriormente. Veinte minutos antes de la exposición de la aorta abdominal, los animales recibieron una inyección intravenosa de 0,5 ml de tinte azul Evans al 0,5% (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) para permitir la identificación del segmento del vaso que quedo desendotelializado. Las arterias carótidas se prefundieron con PBS enfriado con hielo *in situ* a 100 mm Hg, a través de una gran cánula colocada retrógrada en la aorta abdominal hasta que el efluente transcurrió transparente a través del ventrículo de la vena cava inferior. Un mitad distal de las arterias carótidas comunes izquierda y derecha, hasta el nivel de la bifurcación, se eliminó y se congeló en nitrógeno líquido. Inmediatamente después de esto, el segmento proximal restante se fijó por perfusión a través de la misma cánula aórtica a 100 mm Hg de presión con glutaraldehído al 2,5% en tampón fosfato, pH 7,3. Antes de comenzar la perfusión con PBS, los
- 45
- 50



animales se sacrificaron por sobredosis de fenobarbital. Después de aproximadamente 15 minutos de la fijación de perfusión, las arterias carótidas comunes izquierda y derecha proximales restantes se recuperaron para una preparación adicional, incluyendo el arco aórtico y la arteria innominada.

- 5 **[0163]** Cinco secciones, separadas aproximadamente 0,5  $\mu\text{m}$ , del centro del segmento teñido de azul Evans de la arteria carótida común izquierda y una sección de la arteria no lesionada contralateral se analizaron por animal con planimetría asistida por ordenador. Se midieron las siguientes áreas: el área cercada por la lámina elástica externa (EEL), la lámina elástica interna (IEL) y la capa celular endoluminal. Se calcularon las áreas para la túnica media y la túnica íntima. Todas las mediciones se hicieron por un individuo ciego a los regímenes de tratamiento.

10

**[0164]** En base a los valores de las relaciones íntima/media para el control y los grupos tratados con ligando de ácido nucleico, el ligando de ácido nucleico de PDGF inhibió significativamente ( $p < 0,05$ ) aproximadamente el 50% de la formación de la neointima (figura 11).

## 15 EJEMPLO 8. ANTAGONISMO DE PDGF EN GLOMERULONEFRITIS POR NX31975-40K PEG

**[0165]** Este ejemplo proporciona los procedimientos generales seguidos e incorporados en el Ejemplo 9.

### Materiales y Procedimientos

20

**[0166]** Todos ligandos de ácido nucleico y sus controles de secuencia desordenada se sintetizaron por el procedimiento de fosforamidita de fase sólida en vidrio de poro controlado usando un sintetizador de ADN 8800 Milligen y se desprotegieron usando hidróxido de amonio a 55 °C durante 16 h. El ligando de ácido nucleico usado en los experimentos descritos en este ejemplo y el Ejemplo 9 es NX31975-40K PEG (SEQ ID NO: 146) (figura 9A).

- 25 Se creó NX31975-40K PEG conjugando NX31975 (SEQ ID NO: 148) (Tabla 7) para 40K PEG como se describe en el Ejemplo 5. En el ligando de ácido nucleico de control de secuencia desordenada se intercambiaron ocho nucleótidos en la región de unión de hélice de NX31975 sin cambiar formalmente la estructura secundaria consenso (véase la figura 8C). La afinidad de unión del ligando de ácido nucleico de control de secuencia desordenada para PDGF-BB es  $\sim 1 \mu\text{M}$ , que es 10.000 veces menor en comparación con NX21617 (SEQ ID NO: 143). Después, el
- 30 ligando de ácido nucleico de control de secuencia desordenada se conjugó para PEG y se nombró NX31976-40K PEG (SEQ ID NO: 147) (véase la figura 9B para la descripción molecular). El acoplamiento covalente de PEG al ligando de ácido nucleico (o al control de secuencia desordenada) se realizó como se describe en el Ejemplo 5.

- [0167]** El PDGF-BB de rata para experimentos de unión de reactividad cruzada se obtuvo a partir de *E. coli* transfectado con el plásmido sCR-Script Amp SK(+) que contiene la secuencia PDGF-BB de rata. La secuencia PDGF-BB de rata se obtuvo de ARN de pulmón de rata poli A+ (Clontech, San Diego, CA) a través de RT-PCR usando cebadores que amplifican la secuencia que codifica la forma madura de PDGF-BB. La expresión y la purificación de la proteína PDGF-BB de rata se realizó en R&D Systems.

## 40 Experimentos de Cultivo de células Mesangiales

- [0168]** Se establecieron células mesangiales humanas en el cultivo, se caracterizó y se mantuvo como se ha descrito previamente (Radeke y col. (1994) J. Immunol. 153: 1281-1292). Para examinar el efecto antiproliferativo de los ligandos sobre las células mesangiales cultivadas, las células se sembraron en placas de 96 pocillos (Nunc, Wiesbaden, Alemania) y crecieron hasta subconfluencia. Después, se detuvo el crecimiento durante 48 horas en medio MCDB 302 (Sigma, Deisenhofen, Alemania). Después de 48 horas se añadieron diversos estímulos junto con 50 ó 10  $\mu\text{g/ml}$  de ligando de ácido nucleico NX31975-40K PEG o 50 ó 10  $\mu\text{g/ml}$  de ligando de ácido nucleico de secuencia desordenada (NX31976-40K PEG): medio solo, 100 ng/ml de PDGF-AA, AB o BB humano recombinante (cedido amablemente por J. Hoppe, University of Wurzburg, Alemania), 100 ng/ml del factor de crecimiento epidérmico recombinante humano (EGF; Calbiochem, Bad Soden, Alemania) o 100 ng/ml del factor 2 de crecimiento de fibroblasto humano recombinante (cedido amablemente por Synergen, Boulder, Colorado). Después de 72 horas de incubación, se determinó el número de células viables usando 2,3-bis[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT; Sigma) como se describe (Lonnemann y col. (1995) Kidney Int. 51: 837-844).

## 55 Diseño Experimental

**[0169]** Se indujo glomerulonefritis proliferativa mesangial Anti-Thy 1.1 en 33 ratas macho Wistar (Charles River, Sulzfeld, Alemania) con un peso de 150-160 g por inyección de 1 mg/kg de anticuerpo anti-Thy 1.1 monoclonal (clon OX-7; European Collection of Animal Cell Cultures, Salisbury, Inglaterra). Las ratas se trataron con ligandos de ácido

- nucleico o PEG (véase a continuación) a partir del día 3 al 8 después de la inducción de la enfermedad. El tratamiento consistió en inyecciones de bolo i.v. dos veces al día de las sustancias disueltas en 400 µl de PBS, pH 7.4. La duración del tratamiento se seleccionó para tratar ratas desde aproximadamente un día después del inicio hasta el pico de proliferación de células mesangiales (Floege y col. (1993) *Kidney Int. Supl.* 39: S47-54). Se estudiaron cuatro grupos de ratas: 1) nueve ratas, que recibieron NX31975-40K PEG (SEQ ID NO: 146) (es decir, un total de 4 mg del ligando PDGF-B acoplado a 15,7 mg de 40K PEG); 2) diez ratas, que recibieron una cantidad equivalente de ligando de ácido nucleico desordenado acoplado a PEG (NX31976-40K PEG) (SEQ ID NO: 147); 3) ocho ratas, que recibieron una cantidad equivalente (15,7 mg) de 40K PEG solo; 4) seis ratas, que recibieron inyecciones de bolo de 400 µl de PBS solo. Las biopsias renales para la evaluación histológica se obtuvieron los días 6 y 9 después de la inducción de la enfermedad. Se realizaron recogidas de orina las veinticuatro horas desde los días 5 a 6 y 8 a 9 después de la inducción de la enfermedad. La 5-bromo-2'-desoxiuridina análoga a timidina (BrdU; Sigma, Deisenhofen, Alemania; 100 mg/kg de peso corporal) se inyectó por vía intraperitoneal 4 horas antes del sacrificio el día 9.
- 15 **[0170]** Se establecieron intervalos normales de proteinuria y un parámetro histológico renal (véase a continuación) en 10 ratas Wistar no manipuladas de edad similar.

### Morfología Renal

- 20 **[0171]** Se fijó un tejido para microscopía de luz y tinción por inmunoperoxidasa en una solución de Carnoy en metilo (Johnson y col. (1990) *Am. J. Pathol.* 136:374) y se embebió en parafina. Se tiñeron secciones de cuatro µm con el reactivo de Schiff de ácido periódico (PAS) y se contratiñeron con hematoxilina. En las secciones teñidas con PAS se determinó el número de mitosis en 100 tufos glomerulares.

### 25 Tinción por Inmunoperoxidasa

- [0172]** Se procesaron secciones de cuatro mm de tejido de biopsia fijado en metilo de Carnoy mediante una técnica de inmunoperoxidasa indirecta como se describe (Johnson y col. (1990) *Am. J. Pathol.* 136: 369-374). Los anticuerpos primarios eran idénticos a los que se han descrito anteriormente (Burg y col. (1997) *Lab. Invest.* 76: 505-516; Yoshimura y col. (1991) *Kidney Int.* 40: 470-476) e incluían un anticuerpo monoclonal murino (clon 1A4) para actina α de músculo liso; un anticuerpo monoclonal murino (clon PGF-007) para la cadena B de PDGF; un anticuerpo de IgG monoclonal murino (clon ED1) para un antígeno citoplasmático presente en monocitos, macrófagos y células dendríticas; IgG de colágeno de tipo IV anti-humano de cabra/bovino policlonal purificado por afinidad preabsorbido con eritrocitos de rata; una fracción IgG purificada por afinidad de un anticuerpo de fibronectina anti-rata de conejo policlonal; más controles negativos apropiados como se ha descrito anteriormente (Burg y col. (1997) *Lab. Invest.* 76: 505-516; Yoshimura y col. (1991) *Kidney Int.* 40: 470-476). La evaluación de todos los portaobjetos se realizó por un observador, que desconocía el origen de los portaobjetos.

- [0173]** Para obtener un número medio de leucocitos infiltrantes en glomérulos, se evaluaron más de 50 secciones cruzadas consecutivas de glomérulos que contenían más de 20 segmentos capilares separados y se calcularon los valores medios por riñón. Para la evaluación de las tinciones de inmunoperoxidasa para actina α de músculo liso, la cadena B de PDGF, el colágeno de tipo IV y la fibronectina, cada área glomerular se clasificó semicuantitativamente, y se calculó la puntuación media por biopsia. Cada puntuación refleja principalmente cambios en la extensión en lugar de la intensidad de la tinción, y depende del porcentaje del área de tufos glomerulares que muestra una tinción positiva focalmente mejorada: I = 0-25%, II = 25-50%, III = 50-75%, IV = >75%. Este sistema de puntuación semicuantitativa puede reproducirse entre diferentes observadores y los datos están altamente correlacionados con los obtenidos por morfometría computerizada (Kliem y col. (1996) *Kidney Int.* 49: 666-678; Hugo y col. (1996) *J. Clin. Invest.* 97: 2499-2508).

### 50 Tinción en Inmunohistoquímica Doble

- [0174]** Se realizó una inmunotinción doble para la identificación del tipo de células proliferativas como se ha indicado previamente (Kliem y col. (1996) *Kidney Int.* 49: 666-678; Hugo y col. (1996) *J. Clin. Invest.* 97: 2499-2508) mediante la tinción en primer lugar de las secciones para la proliferación de células con un anticuerpo monoclonal murino (clon BU-1) frente a bromo-desoxiuridina que contiene nucleasa en una solución salina tamponada Tris (Amersham, Braunschweig, Alemania) usando un procedimiento de inmunoperoxidasa indirecto. Después, las secciones se incubaron con los anticuerpos monoclonales IgG<sub>1</sub> 1A4 frente a actina α de músculo liso y ED1 frente a monocitos/macrófagos. Las células se identificaron como células mesangiales proliferativas o monocitos/macrófagos si mostraban una tinción nuclear positiva para BrdU y si el núcleo estaba completamente rodeado por citoplasma

positivo para actina  $\alpha$  de músculo liso. Los controles negativos incluyeron la omisión de cualquiera de los anticuerpos primarios en cuyo caso no se apreció doble tinción.

#### Hibridación *In Situ* para ARNm de Colágeno de Tipo IV

5 [0175] La hibridación *in situ* se realizó en secciones de 4 mm de tejido de biopsia fijado en formalina tamponada al 10% utilizando una sonda de ARN anti-sentido marcada con digoxigenina para colágeno de tipo IV (Eitner y col. (1997) *Kidney Int.* 51: 69-78) como se describe (Yoshimura y col. (1991) *Kidney Int.* 40: 470-476). La detección de la sonda de ARN se realizó con un anticuerpo anti-digoxigenina acoplado a fosfatasa alcalina (Genius Nonradioactive  
10 Nucleic Acid Detection Kit, Boehringer-Mannheim, Mannheim, Alemania) con un desarrollo de color posterior. Los controles consistían en hibridación con una sonda de detección a secciones seriadas correspondidas, mediante hibridación de la sonda anti-sentido a secciones de tejido que se habían incubado con ARNs A antes de la hibridación, o por delección de la sonda, el anticuerpo o la solución de color descrita (Yoshimura y col. (1991) *Kidney Int.* 40: 470-476). La expresión de ARNm glomerular se evaluó semicuantitativamente usando el sistema de  
15 puntuación que se ha descrito anteriormente.

#### Medidas Diversas

[0176] Se midió la proteína urinaria usando el Ensayo de Proteínas Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Alemania) y albúmina sérica bovina (Sigma) como un estándar.

#### Análisis Estadístico

[0177] Todos los valores se expresan como medias  $\pm$  DT. Se evaluó la significancia estadística (definida como  $p < 0,05$ ) usando ANOVA y pruebas t de Bonferroni.

#### EJEMPLO 9.

[0178] Para todos los experimentos indicados aquí, el ligando de ácido nucleico de ADN modificado se conjugó  
30 para 40K PEG como se describe en el Ejemplos 5 y 8 y se muestra en las figuras 9A y 9B. Ya que la mayor parte de los ligandos de ácido nucleico tienen pesos moleculares que varían entre 8 a 12 kDa (el ligando de ácido nucleico de PDGF modificado tiene un PM de 10 kDa), la adición de una entidad molecular inerte grande, tal como PEG mejora drásticamente los tiempos de residencia de los ligandos de ácido nucleico *in vivo* (véase, por ejemplo, el documento PCT/US 97/18944). De forma importante, la adición del resto PEG al extremo 5' del ligando de ácido nucleico no  
35 tiene efecto sobre la afinidad de unión del ligando de ácido nucleico para PDGF-BB ( $K_d \sim 1 \times 10^{-10}$  M).

#### Reactividad Cruzada de Ligandos de Ácido Nucleico para PDGF-BB de Rata

[0179] La secuencia de PDGF se conserva altamente entre especies, y las secuencias de cadena B de PDGF  
40 humana y de rata son idénticas al 89% (Herren y col. (1993) *Biochim. Biophys. Acta* 1173: 294; Lindner y col. (1995) *Circ. Res.* 76: 951). Sin embargo, en vista de la alta especificidad de los ligandos de ácido nucleico (Gold y col. (1995) *Ann. Rev. Biochem.* 64: 763-797), la interpretación correcta de los experimentos *in vivo* requiere el entendimiento de las propiedades de unión de los ligandos de ácido nucleico a la cadena B de PDGF de rata. Por lo tanto, se ha clonado y se ha expresado la forma madura de un PDGF-BB de rata en *E. coli*. Los ligandos de ácido  
45 nucleico de PDGF se unieron al PDGF-BB recombinante de rata y humano con la misma alta afinidad (datos no mostrados).

#### El Ligando de ADN de Cadena B de PDGF Inhibe Específicamente la Proliferación de Células Mesangiales *in vitro*

50 [0180] En las células mesangiales de crecimiento detenido, se evaluaron los efectos de NX31975-40K PEG (SEQ ID NO: 146) o el ligando de ácido nucleico desordenado (NX31976-40K PEG) (SEQ ID NO: 147) sobre la proliferación inducida por el factor de crecimiento. La velocidad de crecimiento estimulado de las células no se vio afectada por la adición de un ligando de ácido nucleico desordenado (figura 12). Cincuenta  $\mu\text{g/ml}$  de NX31975-40K  
55 PEG redujeron significativamente el crecimiento de células mesangiales inducido por PDGF-BB (figura 12). El crecimiento de las células mesangiales inducido por PDGF-AB y AA también tiene a ser inferior con NX31975-40K PEG, pero estas diferencias no pueden alcanzar una significancia estadística (figura 12). Por el contrario, no se apreció ningún efecto de NX31975-40K PEG sobre el crecimiento inducido por EGF o FGF-2. Se apreciaron efectos similares al usar ligandos de ácido nucleico a una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  (datos no mostrados).

### Efectos del Ligando de ADN de Cadena B de PDGF en Ratas con Nefritis Anti-Thy 1.1

[0181] Tras la inyección del anticuerpo anti-Thy 1.1, los animales tratados con PBS desarrollaron el curso típico de la nefritis, que se caracteriza por mesangiolisis temprana seguido de una fase de proliferación de células mesangiales y acumulación de matriz los días 6 y 9 (Floege y col. (1993) *Kidney Int. Supl.* 39: S47-54). No se apreciaron efectos adversos obvios después de la inyección repetida de ligandos de ácido nucleico o PEG solo, y todas las ratas sobrevivieron y parecían normales hasta el final del estudio.

- 10 [0182] En las secciones renales teñidas con PAS los cambios mesangioproliferativos los días 6 y 9 después de la inducción de la enfermedad fueron graves e indistinguibles entre ratas que recibieron PBS, PEG solo o el ligando de ácido nucleico desordenado (datos no mostrados). Los cambios histológicos se redujeron notablemente y casi se normalizaron en el grupo tratado con el ligando NX31975-40K PEG. Con el fin de evaluar (semi)cuantitativamente los cambios mesangioproliferativos, se analizaron diversos parámetros.

15

#### a) Reducción de la Proliferación de células Mesangiales

- [0183] La proliferación de células glomerulares, como se evaluó mediante el recuento del número de mitosis glomerulares, no fue significativamente diferente entre los tres grupos de control los días 6 y 9 (figura 13A). En comparación con las ratas que recibieron el ligando de ácido nucleico desordenado, el tratamiento con ligando PDGF-B conjunto a una reducción de la mitosis glomerular del 64% el día 6 y del 78% el día 9 (figura 13A). Para evaluar los efectos del tratamiento sobre las células mesangiales, las secciones renales para la actina  $\alpha$  de músculo liso se inmunotñieron, que se expresó únicamente por las células mesangiales activadas (Johnson y col. (1991) *J. Clin. Invest.* 87: 847-858). De nuevo, no hubo diferencias significativas entre los tres grupos de control los días 6 y 9.
- 25 Sin embargo, las puntuaciones por inmunotñición de una actina  $\alpha$  de músculo liso se redujeron significativamente el día 6 y el día 9 en el grupo tratado con NX31975-40K PEG (figura 13D). Para determinar específicamente si se reduce la proliferación de células mesangiales, las ratas tratadas con NX31975-40K PEG y las ratas tratadas con ligando de ácido nucleico desordenado se inmunotñieron doblemente para un marcador de proliferación celular (BrdU) y una actina  $\alpha$  de músculo liso. Los datos confirmaron un descenso marcado de la proliferación de células mesangiales el día 9 después de la inducción de la enfermedad:  $2,2 \pm 0,8$  células positivas de BrdU-/actina  $\alpha$  de músculo liso por sección cruzada glomerular en ratas tratadas con el aptámero PDGF-B frente a  $43,3 \pm 12,4$  células en ratas que recibieron el ligando de ácido nucleico desordenado, es decir, una reducción del 95% de la proliferación de células mesangiales. Por el contrario, no se apreció ningún efecto del aptámero PDGF-B sobre la proliferación de monocitos/macrófagos el día 9 después de la inducción de la enfermedad (ratas tratadas con el aptámero PDGF-B:  $2,8 \pm 1,1$  células BrdU+/ED-1+ por 100 secciones cruzadas glomerulares; ratas tratadas con el aptámero desordenado:  $2,7 \pm 1,8$ ).

#### b) Expresión Reducida de la Cadena B de PDGF Endógeno

- 40 [0184] Mediante inmunohistoquímica, la expresión de la cadena B de PDGF glomerular se reguló por aumento notablemente en los tres grupos de control (figura 13B), similar a las observaciones previas (Yoshimura y col. (1991) *Kidney Int.* 40: 470-476). En el grupo tratado con NX31975-40K PEG la sobreexpresión glomerular de la cadena B de PDGF se redujo significativamente en paralelo con la reducción de las células mesangiales proliferativas (figura 13B).

45

#### c) Reducción del Influjó Glomerular de Monocitos/Macrófagos

- [0185] El influjó glomerular de monocitos/macrófagos se redujo significativamente en las ratas tratadas con NX31975-40K PEG en comparación con las ratas que recibieron ligando de ácido nucleico desorganizado los días 6 y 9 después de la inducción de la enfermedad (figura 13E).

#### d) Efectos en la Proteinuria

- 55 [0186] Había presente una proteinuria moderada de hasta 147 mg/24 h el día 6 después de la inducción de la enfermedad en los 3 grupos de control (figura 13C). El tratamiento con NX31975-40K PEG redujo la proteinuria media el día 6, pero no pudo alcanzar significancia estadística (figura 13C). La proteinuria el día 9 después de la inducción de la enfermedad fue baja o similar en los cuatro grupos (figura 13C).

#### e) Reducción de la Producción y Acumulación de la Matriz Glomerular

[0187] Mediante inmunohistoquímica, se apreció una acumulación glomerular marcada de colágeno de tipo IV y fibronectina en los tres grupos de control (figuras 14A-C). La sobreexpresión de tanto colágeno de tipo IV glomerular como de fibronectina se redujo significativamente en ratas tratadas con NX31975-40K PEG (figuras 14A-C). En las últimas, la puntuación de tinción glomerular alcanzó a la observada en las ratas normales (figuras 14A-C). Mediante hibridación *in situ*, se mostró que el descenso de expresión glomerular de colágeno de tipo IV en ratas tratadas con NX31975-40K PEG estaba asociado con la disminución de la síntesis glomerular de este tipo de colágeno (figura 14A-C).

#### 10 EJEMPLO 10. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL PARA DESARROLLAR LIGANDOS DE ARN CON 2'-FLUORO-2'-DESOXIPIRIMIDINA PARA PDGF Y SECUENCIAS DE ARN OBTENIDAS.

##### SELEX DE ARN CON 2'-FLUORO-2'-DESOXIPIRIMIDINA

[0188] Se realizó el SELEX con ARN con 2'-fluoro-2'-desoxipirimidina dirigido a PDGF AB básicamente como se ha descrito anteriormente (véase anteriormente, y Jellinek y col. (1993, 1994), anteriormente) usando el conjunto de plantillas de cebador mostrado en la Tabla 8 (SEC ID NOS: 36-38). Brevemente, se preparó el ARN con 2'-fluoro-2'-desoxipirimidina para realizar las selecciones de afinidad mediante transcripción *in vitro* a partir de plantillas de ADN sintéticas usando ARN polimerasa T7 (Milligan y col. Nucl. Acids Res., 15: 8783 (1987)). Se usaron las condiciones para la transcripción *in vitro* que se han descrito anteriormente en detalle (Jellinek y col. (1994), anteriormente), excepto que se usó una concentración superior (3 mM) de nucleósido trifosfatos de 2'-fluoro-2'-desoxiproirimidinas (2'-F-UTP y 2'-F-CTP) en comparación con ATP y GTP (1 mM). Se realizaron selecciones por afinidad incubando PDGF AB con ARN con 2'-fluoro-2'-desoxipirimidina durante como mínimo 15 minutos a 37 °C en PBS que contenía albúmina de suero humano al 0,01%. La separación del ARN libre del ARN unido a proteína se realizó mediante filtración con nitrocelulosa como se ha descrito (Jellinek y col. 1993, 1994: anteriormente). Se realizó la transcripción inversa del ARN seleccionado por afinidad y la amplificación por PCR tal como se ha descrito anteriormente (Jellinek y col. (1994) anteriormente). Se realizaron diecinueve rondas de SELEX, típicamente seleccionado entre 1-12% del ARN de entrada. Para las primeras ocho rondas de selección, se incluyó suramina (3-15  $\mu$ M) en el tampón de selección para aumentar la presión de selección. La reserva enriquecida por afinidad (ronda 19) se clonó y se secuenció como se describe (Schneider y col. (1992), anteriormente). Se han identificado cuarenta y seis secuencias únicas, y las secuencias se muestran en la Tabla 9 (SEC ID NOS: 39-81). Los ligandos de secuencia única se exploraron para determinar su capacidad de unión a PDGF AB con elevada afinidad. Mientras que el ARN con 2'-fluoropirimidina aleatorio (Tabla 8) se unía a PDGF con una constante de disociación ( $K_d$ ) de  $35 \pm 7$  nM, muchos de los ligandos seleccionados por afinidad se unían a PDGF AB con afinidades  $\approx 100$  veces superiores. Entre los ligandos únicos, los clones 9 ( $K_d = 91 \pm 16$  pM), 11 ( $K_d = 120 \pm 21$  pM), 16 ( $K_d = 116 \pm 34$  pM), 23 ( $K_d = 173 \pm 38$  pM), 25 ( $K_d = 80 \pm 22$  pM), 37 ( $K_d = 97 \pm 29$  pM), 38 ( $K_d = 74 \pm 39$  pM) y 40 ( $K_d = 91 \pm 32$  pM) presentaban la mayor afinidad para PDGF AB (la unión de todos estos ligandos a PDGF AB es bifásica y se da la  $K_d$  para el componente de unión de mayor afinidad).

**Tabla 1.** ADN de partida y cebadores PCR para el experimento con SELEX de ADNxx

|                                                            | SEQ ID NO: |
|------------------------------------------------------------|------------|
| ADNss de partida:                                          |            |
| 5'-ATCCGCCTGATTAGCGATACT[-40N-]ACTTGAGCAAATCACCTGCAGGGG-3' | 1          |
| Cebador PCR 3N2*:                                          |            |
| 5'-BBBCCCCTGCAGGTGATTTTGTCTCAAGT-3'                        | 2          |
| Cebador PCR 5N2**:                                         |            |
| 5'-CCGAAGCTTAATACGACTCACTATAGGGATCCGCCTGATTAGCGATACT-3'    | 3          |

\*B = biotina fosforamidita (por ejemplo, Glen Research, Sterling, VA)

\*\*Para las rondas 10, 11 y 12, el cebador PCR truncado 5N2 (subrayado) se usó para amplificar la plantilla.

**Tabla 2.** Secuencias Únicas de los ligandos de ADNss de alta afinidad para PDGF.  
5'-ATCCGCCTGATTAGCGATACT [40N] ACTTGAGCAAAATCACCTGCAGGGG-3'

|     |                                            | SEQ ID NO: |
|-----|--------------------------------------------|------------|
| *14 | AGGCTTGACAAAGGGCACCATTGGCTTAGTGGTCCTAGT    | 4          |
| *41 | CAGGGCACTGCAAGCAATTGTGGTCCCAATGGGCTGAGT    | 5          |
| 6   | CCAGGCAGTCATGGTCATTGTTTACAGTCGTGGAGTAGGT   | 6          |
| 23  | AGGTGATCCCTGCAAAGGCAGGATAACGTCCTGAGCATC    | 7          |
| 2   | ATGTGATCCCTGCAGAGGGAGGANACGTCTGAGCATC      | 8          |
| 34  | CACGTGATCCCATAAGGGCTGCGCAAAATAGCAGAGCATC   | 9          |
| 8   | GGTGGACTAGAGGGCAGCAAACGATCCTTGGTTAGCGTCC   | 10         |
| 1   | GGTGCGACGAGGCTTACACAAACGTACACGTTTCCCCGC    | 11         |
| 5   | TGTCGGAGCAGGGGCGGTACGAAAACCTTTACAGTTCCCCCG | 12         |
| *40 | AGTGGAACAGGGCACGGAGAGTCAAACCTTTGGTTTCCCCC  | 13         |
| 47  | GTGGGTAGGGATCGGTGGATGCCTCGTCACTTCTAGTCCC   | 14         |
| 18  | GGGCGCCCTAAACAAAGGGTGGTCACTTCTAGTCCCAGGA   | 15         |
| 30  | TCCGGGCTCGGGATTCTGTGGTCACTTTCACTCCCGGATATA | 16         |
| *20 | ATGGGAGGGCGCGTTCTTCGTGGTTACTTTTAGTCCCCG    | 17         |
| 35  | ACGGGAGGGCACGTTCTTCGTGGTTACTTTTAGTCCCCG    | 18         |
| 13  | GTCGTAGGGGGCGATTCTTTCCCGTTACTTCCAGTCCT     | 19         |
| 16  | GAGGCATGTTAACATGAGCATCGTCTCACGATCCTCAGCC   | 20         |
| *36 | CCACAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATTGATCCTGTG  | 21         |
| 50  | GCGGGCATGGCACATGAGCATCTCTGATCCCGCAATCCTC   | 22         |
| 4   | ACCGGGCTACTTCGTAGAGCATCTCTGATCCCGGTGCTCG   | 23         |
| 44  | AAAGGGCGAACGTAGGTGCGAGGCATCCATTGGATCCCTTC  | 24         |
| 24  | ACGGGCTCTGTCACTGTGGCACTAGCAATAGTCCCGTCGC   | 25         |
| 7   | GGGCAGACCTTCTGGACGAGCATCACCTATGTGATCCCG    | 26         |
| *26 | AGAGGGGAAGTAGGCTGCCTGACTCGAGAGAGTCCTCCCG   | 27         |
| 19  | AGGGGTGCGAAACACATAATCCTCGCGGATTCCCATCGCT   | 28         |
| 48  | GGGGGGGCAATGGCGGTACCTCTGGTCCCCTAAATAC      | 29         |
| 46  | GCGGCTCAAAGTCCTGCTACCCGCAGCACATCTGTGGTC    | 30         |
| 25  | TTGGGCGTGAATGTCCACGGGTACCTCCGGTCCCAAAGAG   | 31         |
| 31  | TCCGCGCAAGTCCCTGGTAAAGGGCAGCCCTAACTGGTC    | 32         |
| 12  | CAAGTTCCCCACAAGACTGGGGCTGTTCAAACCGCTAGTA   | 33         |
| 15  | CAAGTAGGGCGCGACACACGTCCGGGCACCTAAGGTCCCA   | 34         |
| *38 | AAAGTCGTGCAGGGTCCCCTGGAAGCATCTCCGATCCCAG   | 35         |

\*Indica que se realizó un experimento de la región terminal.

Los caracteres en cursiva indican los clones que se descubrió que retenían una unión de alta afinidad como ligandos mínimos.

Tabla 3.

| HÉLICE I           |    |            |
|--------------------|----|------------|
| HÉLICE II          |    | HÉLICE III |
| SEQ ID NO: Grupo A |    |            |
| 8                  | 2  |            |
| 23                 | 4  |            |
| 26                 | 7  |            |
| 20                 | 16 |            |
| 21                 | 36 |            |
| 35                 | 38 |            |
| 24                 | 44 |            |
| 22                 | 50 |            |
| 7                  | 23 |            |
| 9                  | 34 |            |
| 19                 | 13 |            |
| 4                  | 14 |            |
| 34                 | 15 |            |
| 15                 | 18 |            |
| 17                 | 20 |            |
| 31                 | 25 |            |
| 16                 | 30 |            |
| 32                 | 31 |            |
| 18                 | 35 |            |
| 5                  | 41 |            |
| 14                 | 47 |            |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |  |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|------------|
| HÉLICE I                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |  |            |
| HÉLICE II                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |  | HÉLICE III |
| =AGGG---AGGA---TACG-----TCUG-AGC-ATCac3' 5'ATGTGAT-CCCTGCAG=<br>ACCGGG---CTAC---TTC-----GTAG-AGC-ATC-----TCT-----GAT-CCCGGTGCTCG<br>LGGG---CGACC-TTCT-----GGACG-AGC-ATCAC---CTAT---GTGAT-CCCG<br>CEGAGG---CATG---TTAA-----CAUG-AGC-ATCGT---CTC---ACGAT-CCTCAGCC<br>CCACAGG---CTACG-GCA-----CGTAG-AGC-ATCA---CCA---TGAT-CCGTGTG<br>AAAAGTCGTGCAGG---TCC---CCT-----GGA-AGC-ATC-----TCC---GAT-CCCAGactt<br>AAAGGG---CGAAC-GTA-----GGTCG-AGGCATCC---ATT-----GGAT-CCCTTC<br>GCGGG---CATG---GCA-----CATG-AGC-ATC-----TCT-----GAT-CCCGCAATCCTC<br>=AGG---CAGGATAAC-----GTCTG-AGC-ATCac3' 5'AGGTGATCCCTGCAGAA=<br>=GGG---CTGC---GCAAAATA---GCAG-AGC-ATCac3' 5'CACGTGAT-CCCATAA= |  |            |
| GCTCTAGG---GGGCGA-TTCTTT-----TCGCG-GTT-ACT-----TCC-----AGT-CTac<br>LactAGG---CTT---GACA-----AAG-GGC-ACCAT---GGCTTAGTGGT-CTAGTa<br>ctCAAGTAGG---CGGAC-ACAC-----GTCCG-GGC-ACC-----TAA-----GGT-CCCacttgag<br>ctGGG---CGCCCTAAACAA---AGGGTG-GTC-ACT-----TCT-----AGT-CCCAGGA<br>ATGGGAGG---CGCG---TTCTT-----CGTG-GTT-ACT-----TTT-----AGT-CCCG<br>ctTTGGG---CGTG---AATGTC-----CACG-GGT-ACC-----TCC-----GGT-CCCAAGAG<br>TCCGGG---CTCGG-GAT-----TCGTG-GTC-ACT-----TTC-----AGT-CCCGGATATA<br>=AGGG---CAG---CCCTAA-----CTG-GTC-acttgagc3'<br>5'TCCGCGCAAGT-CCCTGGTAA=                                                                                                             |  |            |
| ACGGGAGG---CAGG---TTCTTT-----CGTG-GTT-ACT-----TTT-----AGT-CCCG<br>=GGG---CTGAGTa3' 5'acttcag-GGC-acttcagcaatctggt-cccaat=<br>GTGGGTGGATCggg---ATG-----CTTG-GTC-ACT-----TCT-----AGT-CCcact                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |  |            |

**Tabla 4.** Frecuencia de pares de bases en las regiones de hélice del motivo consenso mostrado en la **figura 1**.

| Posición <sup>a</sup> | Par de bases <sup>b</sup> |    |    |    |    |    |      |
|-----------------------|---------------------------|----|----|----|----|----|------|
|                       | AT                        | TA | GC | CG | TG | GT | otro |
| I-1                   | 0                         | 0  | 21 | 0  | 0  | 0  | 0    |
| I-2                   | 0                         | 0  | 21 | 0  | 0  | 0  | 0    |
| I-3                   | 5                         | 0  | 16 | 0  | 0  | 0  | 0    |
| I-4                   | 3                         | 5  | 1  | 4  | 1  | 0  | 7    |
| I-5                   | 2                         | 3  | 3  | 4  | 0  | 0  | 9    |
| II-1                  | 0                         | 1  | 2  | 17 | 0  | 0  | 1    |
| II-2                  | 5                         | 5  | 5  | 1  | 0  | 4  | 1    |
| II-3                  | 3                         | 4  | 7  | 6  | 0  | 0  | 1    |
| II-4                  | 3                         | 0  | 8  | 5  | 0  | 0  | 4    |
| III-1                 | 21                        | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0    |
| III-2                 | 0                         | 10 | 0  | 11 | 0  | 0  | 0    |
| III-3                 | 0                         | 7  | 0  | 13 | 1  | 0  | 0    |

<sup>a</sup>Las hélices se numeran con números romanos como se muestra en la figura 1. Los pares de bases individuales se numeran con números arábigos partiendo de la posición 1 en la unión de hélice y aumentando con la distancia aumentada desde la unión.

<sup>b</sup>Se incluyeron los pares de bases TG y GT con respecto a los pares de bases de Watson-Crick para este análisis. Hay un total de 21 secuencias en el conjunto

**Tabla 5.** Afinidades de los ligandos de ADN mínimos para PDGF-AA, PDGF-AB y PDGF-BB.

| Ligando | K <sub>d</sub> , nM  |                      |                      |
|---------|----------------------|----------------------|----------------------|
|         | PDGF AA <sup>a</sup> | PDGF AB <sup>b</sup> | PDGF BB <sup>b</sup> |
| 20t     | 47 ± 4               | 0,147 ± 0,011        | 0,127 ± 0,031        |
| 36t     | 72 ± 12              | 0,094 ± 0,011        | 0,093 ± 0,009        |
| 41t     | 49 ± 8               | 0,138 ± 0,009        | 0,129 ± 0,011        |

<sup>a</sup>Los datos mostrados en la figura 3A se ajustan a la ecuación (1) (Ejemplo 1).

<sup>b</sup>Los datos de las figuras 3B y 3C se ajustan a la ecuación (2). Los valores de la constante de disociación (K<sub>d</sub>) mostrados son para el componente de unión de mayor afinidad. La fracción en mol de ADN que se une a PDGF-AB o PDGF-BB como el componente de alta afinidad varía entre 0,58 a 0,88. Los valores de K<sub>d</sub> para la interacción de afinidad inferior varían entre 13 a 78 nM.



Tabla 6. Afinidad relativa para PDGF-AB de variantes de ligando 36t

| Ligando | SEQ ID NO: | Composición*                                                                       | Kd <sup>ligando</sup> /Kd <sup>36t</sup> ** |
|---------|------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| 36t     | 84         | CACAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTGTG <sup>[3]T</sup>                            | 1,0                                         |
| 1073    | 97         | <b>CAC</b> AGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTGTG <sup>[3]T</sup>                    | 11,8                                        |
| 1074    | 98         | CACAGGCTAC <b>CGGCACGU</b> AGAGCATCACCATGATCCTGTG <sup>[3]T</sup>                  | 3,1                                         |
| 1075    | 99         | CACAGGCTACGGCACGTAGAGCATC <b>ACCAU</b> GATCCTGTG <sup>[3]T</sup>                   | 10                                          |
| 1076    | 100        | <b>CACAGGCTAC</b> GGCACGU <b>AGAGCATC</b> ACCAU <b>GATCCTGTG</b> <sup>[3]T</sup>   | 440                                         |
| 1145    | 101        | CACAGGCTACGGCACGTAGAGCAT <b>CACCA</b> TGATCCTGTG <sup>[3]T</sup>                   | 0,27                                        |
| 1148    | 102        | CAC <b>AGGCUA</b> CGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTGTG <sup>[3]T</sup>                   | 281                                         |
| 1144    | 103        | CACAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGAUCCUGTG <sup>[3]T</sup>                            | 994                                         |
| 1142    | 104        | CACAGGCTACGGCACGUAGAGC <b>AU</b> CACCATGATCCTGTG <sup>[3]T</sup>                   | 12,9                                        |
| 1149    | 105        | CACAGGCTACGGCACGTAG <b>AGC</b> ATCACCATGATCCTGTG <sup>[3]T</sup>                   | 2,9                                         |
| EVI     | 106        | CACAGGCTACGGCACGTAG <b>AGC</b> ATCACCATGATCCTGTG <sup>[3]T</sup>                   | 35,1                                        |
| EV2     | 107        | CACAGGCTACGGCAC <b>GU</b> AGAGCATCACCATGATCCTGTG <sup>[3]T</sup>                   | 5,3                                         |
| EV3     | 108        | CACAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTGTG <sup>[3]T</sup>                            | 1,5                                         |
| EV4     | 109        | <b>CACAGGCTAC</b> GGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTGTG <sup>[3]T</sup>                    | 4,5                                         |
| EV5     | 110        | CACAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCC <b>UGUG</b> <sup>[3]T</sup>                    | 2,3                                         |
| 1157    | 111        | CACAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTGTG <sup>[3]T</sup>                            | 1,0                                         |
| 1160    | 112        | CACAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTGTG <sup>[3]T</sup>                            | 1,4                                         |
| 1161    | 113        | CACAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTGTG <sup>[3]T</sup>                            | 0,22                                        |
| 1162    | 114        | CACAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTGTG <sup>[3]T</sup>                            | 0,52                                        |
| 1165    | 115        | CACAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTGTG <sup>[3]T</sup>                            | 0,61                                        |
| 1164    | 116        | CACAGGCUACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTGTG <sup>[3]T</sup>                            | 0,45                                        |
| 1166    | 117        | CACAGGCTACGGCACGUAGAGCATCACCATGATCCTGTG <sup>[3]T</sup>                            | 0,76                                        |
| 1159    | 118        | CACAGGCTACGGCACGTAGAGCAUCACCATGATCCTGTG <sup>[3]T</sup>                            | 0,37                                        |
| 1163    | 119        | CACAGGCTACGGCACGTAGAGCATC <b>ACCAU</b> GATCCTGTG <sup>[3]T</sup>                   | 1,3                                         |
| 1158    | 120        | CACAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGAUCCUGTG <sup>[3]T</sup>                            | 2,4                                         |
| 1255    | 121        | CACAGGCUACGGCACGUAGAGCAUCACCATGAUCCUGTG <sup>[3]T</sup>                            | 24,2                                        |
| 1257    | 122        | CACAGGCTAC <b>CGGCAC</b> GTAGAGCATC <b>ACCA</b> TGATCCT <b>GUG</b> <sup>[3]T</sup> | 1,3                                         |
| 1265    | 123        | CACAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCUGUG <sup>[3]T</sup>                            | 1,4                                         |
| 1266    | 124        | CACAGGCUAC <b>CGGCAC</b> GTAGAGCAUC <b>ACCA</b> TGATCCUGUG <sup>[3]T</sup>         | 1,0                                         |
| 1267    | 125        | CACAGGCTAC <b>CGGCAC</b> GTAGAGCAT <b>CACCA</b> TGATCCUGUG <sup>[3]T</sup>         | 4,2                                         |
| 1269    | 126        | CACAGGCUAC <b>CGGCAC</b> GTAGAGCAT <b>CACCA</b> TGATCCUGUG <sup>[3]T</sup>         | 0,87                                        |
| 1295    | 127        | CAGGCUAC <b>CGGCAC</b> GTAGAGCAUC <b>ACCA</b> TGATCCUG <sup>[3]T</sup>             | 0,9                                         |
| 1296    | 128        | CAGGCU <b>CGGCAC</b> CG-AGAGCAUC <b>ACCA</b> TGATCCUG <sup>[3]T</sup>              | 2,1                                         |
| 1297    | 129        | CAGGCU <b>CGGCAC</b> CG-AGAGCAUC <b>CCA</b> -GATCCUG <sup>[3]T</sup>               | 2,9                                         |
| 1303    | 130        | CAGGCUAC <b>CGGCAC</b> GTAGAGCAUC <b>ACCA</b> TGATCCUG <sup>[3]T</sup>             | 5,8                                         |
| 1304    | 131        | CAGGCUAC <b>CGGCAC</b> GTAGAGCAUC <b>ACCA</b> TGATCCUG <sup>[3]T</sup>             | 607                                         |
| 1305    | 132        | CAGGCUAC <b>CGGCAC</b> GTAGAGCAUC <b>ACCA</b> TGATCCUG <sup>[3]T</sup>             | 196                                         |
| 1306    | 133        | CAGGCUACGGCACGTAGAGCAUC <b>ACCA</b> TGATCCUG <sup>[3]T</sup>                       | 4,4                                         |
| 1327    | 134        | CAGGCU <b>ACGGCAC</b> GTAGAGCAUC <b>ACCA</b> TGATCCUG <sup>[3]T</sup>              | 0,63                                        |
| 1328    | 135        | CAGGCUAC <b>CGGCAC</b> GTAGAGCAUC <b>ACCA</b> TGATCCUG <sup>[3]T</sup>             | 2,2                                         |
| 1329    | 136        | CAGGCUAC <b>CGGCAC</b> GTAGAGCAUC <b>ACCA</b> TGATCCUG <sup>[3]T</sup>             | 0,72                                        |
| 1369    | 137        | CAGGCUACGGCAC <b>CGT</b> AGAGCAUCACCATGATCCUG <sup>[3]T</sup>                      | 0,37                                        |
| 1374    | 138        | CAGGCU <b>ACGGCAC</b> GTAGAGCAUC <b>ACCA</b> TGATCCUG <sup>[3]T</sup>              | 1,5                                         |
| 1358    | 139        | CAGGCUACG-S-C <b>GTAGAG</b> CAUCA-S-TGATCCUG <sup>[3]T</sup>                       | 0,54                                        |
| 1441    | 140        | CAGGCUACG-S-C <b>GTAGAG</b> CAUCA-S-TGATCCUG <sup>[3]T</sup>                       | 0,33                                        |

\*A,C,G,T = desoxi-A,C,G,T; A,C,G,U = 2'-OMe-A,C,G,T; C,U = 2'-fluoro-C,U; S = espaciador de hexaetilenglicol; [3'T] = T invertida (3'-3').

\*\*El valor de Kd<sup>36t</sup> de 0,178 ± 88 pM usado para el cálculo es la media, con desviación típica, de cuatro mediciones independientes (94 ± 11, 161 ± 24, 155 ± 30 y 302 ± 32 pM).

**Tabla 7.** Afinidad relativa para PDGF-BB de variantes de ligando 36ta  
El efecto de diversas sustituciones en la afinidad del ligando 36ta para PDGF

| Ligando | Composición*                                              | $KD^{ligando}/KD^{36ta**}$ | SEQ ID NO: |
|---------|-----------------------------------------------------------|----------------------------|------------|
| 36ta    | CAGGCTACGGCACGTAGAGCATCACCATGATCCTG <sup>[3'T]</sup>      | 1,0                        | 141        |
| NX21568 | CAGGCUACG-S-CGTAGAGCAUCA-S-TGATCCUG <sup>[3'T]</sup>      | 0,63                       | 142        |
| NX21617 | [L1]CAGGCUACG-S-CGTAGAGCAUCA-S-TGATCCUG <sup>[3'T]</sup>  | 0,54                       | 143        |
| NX21618 | [L1]CAGGCUACG-S-CGTAGAGCAUCA-S-TGAUCCTG <sup>[3'T]</sup>  | 418                        | 144        |
| NX31975 | [L2] CAGGCUACG-S-CGTAGAGCAUCA-S-TGATCCUG <sup>[3'T]</sup> | 0,54                       | 148        |
| NX31976 | [L2] CAGCGUACG-S-CGTACCGATUCA-S-TGAAGCUG <sup>[3'T]</sup> |                            | 149        |

\*A,C,G,T = desoxi-A,C,G,T; **A,G** = 2'-OMe-A,G; C,U = 2'-F-C,U; S = espaciador de hexaetilenglicol (de Spacer Fosforamida 18, Glen Research, Sterling, VA); [3'T] = T invertida (3'-3'); [L1] = amina dT (Glen Research, Sterling, VA); [L2] = enlazador amino pentilo.

\*\* $KD^{36ta} = 0,159 \pm 13$  pM.

**Tabla 8.** ARN de partida y cebadores PCR para el experimento por SELEX de ARN con 2'-fluoropirimidina  
SEQ ID NO:

ARN con 2'-fluoropirimidina de partida:

ARN de partida:

5'-GGGAGACAAGAAUACGCUCAA[-50 N-JUUCGACAGGAGGCUCACAACAGGC-3' 36

Cebador PCR 1:

5'-TAATACGACTCACTATAGGGAGACAAGAATAACGCTCAA-3' 37

Cebador PCR 2:

5'-GCCTGTTGTGAGCCTCCTGTGCGAA-3' 38

Tabla 9. Secuencias de la región evolucionada de ligandos de ARN de alta afinidad con 2'-fluoropirimidina para PDGF-AB. No se muestran las secuencias de la fijación fija (Tabla 8)

|    |                                                               | SEQ ID NO: |
|----|---------------------------------------------------------------|------------|
| 1  | CGGUGGCAUUUCUUCACUUCUUCUCGCUUUCUCGCGUUGGGCNCGA                | 39         |
| 2  | CCAACCUUCUGUCGGCGUUGCUUUUUGGACGGCACUCAGGCUCCA                 | 40         |
| 3  | UCGAUCGGUUGUGUGCCGGACAGCCUUAACCAGGGCUGGGACCGAGGCC             | 41         |
| 4  | CUGAGUAGGGGAGGAAGUUGAAUCAGUUGUGGCGCCUCUCAUUCGC                | 42         |
| 5  | CAGCACUUCGCUUUUCAUCAUUUUUUCUUCACUGUUGGGCGCGGAA                | 43         |
| 6  | UCAGUGCUGGGGCUAUGUCUCGAUGGGGAUUUUUCUUCAGCACUUUGCCA            | 44         |
| 7  | UCUACUUUCCAUUUCUUCUUUUUCUUCACGAGCGGGUUUCCAGUGAACCA            | 45         |
| 8  | CGAUGAGUACUACGAUGACGAAGGCCGCGGUUGGAUGCCCGCAUUGA               | 46         |
| 10 | GUCGAUACUGGGGACUUGCUCCAUUGGCCGAUUAACGAUUCGGUCAG               | 47         |
| 13 | GUGCAAACUUAACCCGGGAACCGCGCGUUCGAUCGACUUUCCUUUCCA              | 48         |
| 15 | AUUCGCGCUUCCGAUUAUCCUGUGCUCGGAUUCGGUAGCCAUAGUGCA              | 49         |
| 16 | CGAACGAGGAGGGAGUGGCAAGGGAUGGUUGGAUAGGCUCUACGCUCA              | 50         |
| 17 | GCGAAACUGGGGACUUGCUCCAUUGGCCGAUUAACGAUUCGGUUCAU               | 51         |
| 18 | CGAACGAGGAGGGAGUCGCAAGGGAUGGUUGGAUAGGCUCUACGCUCAA             | 52         |
| 19 | CGAGAAGUGACUACGAUGACGAAGGCCGCGGUUGAAUCCCUCAUUGA               | 53         |
| 20 | AAGCAACGAGACCGUGACGCCUGAUGUGACUGUGCUUGCACCCGAUUCUG            | 54         |
| 21 | GUGAUUCUCAUUCUCAUUGCUUUCUACAACUUUUUCCACUUCAGCGUGA             | 55         |
| 22 | AAGCAACGAGACUCGACGCCUGAUGUGACUGUGCUUGCACCCGAUUCU              | 56         |
| 23 | UCGAUCGGUUGUGUGCCGGACAGCUUUGACCAUGAGCUGGGACCGAGGCC            | 57         |
| 24 | NGACGNGUGGACCUGACUAAUCGACUGAUCAAAGAUCCCGCCAGAUUGG             | 58         |
| 26 | CACUGCGACUUGCAGAAGCCUUGUGUGGCGGUACCCCUUUGGCCUCG               | 59         |
| 27 | GGUGGCAUUUCUUAUUUCCUUCUCGCUUUCUCCGCCGUUGGGCGCG                | 60         |
| 29 | CCUGAGUAGGGGGGAAGUUGAAUCAGUUGUGGCGCUCUACUCAUUCGCC             | 61         |
| 30 | GUCGAAACUGGGGACUUGCUCCAUUGGCCGAUUAACGAUUCGGUUCA               | 62         |
| 31 | GCGAUACUGGGGACUUGCUCCAUUGGCCGAUUAACGAUUCGGCUCAG               | 63         |
| 32 | ACGUGGGGCACAGGACCGAGAGUCCUCCGGCAUAGCCGCUACCCACC               | 64         |
| 33 | CACAGCCUNANAGGGGGGAAGUUGAAUCAGUUGUGGCGCUCUACUCAUUCGC          | 65         |
| 34 | ANGGGNUAUGGUGACUUGCUCCAUUGGCCGAUUAACGAUUCGGUUCAG              | 66         |
| 35 | CCUGCGUAGGGNGGGAAGUUGAAUCAGUUGUGGCGCUCUACUCAUUCGCC            | 67         |
| 39 | CGAACGAGGAGGGAGUGGCAAGGGAUGGUUGGAUAGGCUCUACGCUCA              | 68         |
| 41 | GUGCAAACUUAACCCGGGAACCGCGCGUUCGAUUCGCUUUCNUAUUC               | 69         |
| 42 | CGAACGAGGAGGGAGUGGCAAGGGACGGUNNAUAGGCUCUACGCUCA               | 70         |
| 43 | UCGGUGUGGCUAGAAACUGACACGCGUGAGCUUCGCACACAUCUGC                | 71         |
| 44 | UAUCGCUUUUCAUCAAUCCACUUUUUACUCUNUAACUUGGGCGUGCA               | 72         |
| 45 | GUGCAAACUUAACCCGGGAACCGCGCGUUCGAUUCGCUUUCNUAUUC               | 73         |
| 46 | UCGNUCGGUUGUGUGCCGCGAGCUUUGUCCAGCGUUGGGCCGAGGCC               | 74         |
| 47 | AGUACCAUCUCAUCUUUUCCUUUUUUAAGGCACAUUGAGGGU                    | 75         |
| 49 | CCUGAGUAGGGGGGAAGUUGAACCAGUUGUGGCGNCCUACUCAUUCNCCA            | 76         |
| 51 | CCNNCCUNCUGUCGGC <sub>6</sub> CUUGUCUUUUUGGACGGGCAACCCAGGGCUC | 77         |
| 52 | CCAACCUNCUGUCGGCGCUUGUCUUUUUGGACGAGCAACUCAAGGCUCGU            | 78         |
| 53 | CCAGCGCAGAUCCCGGGCUGAAGUGACUGCCGGCAACGGCCGCUCCA               | 79         |
| 54 | UUCGCGUAACAACUUUUUCAUUUUUACUUUUUACUCCAACCAGUGAGCAGCA          | 80         |
| 55 | UAUCGCUUUCACUAAAUCCACUCCWCACUUCUWAACUUGGGCGUGCA               | 81         |

#### LISTA DE SECUENCIAS

#### 5 [0189]

##### (1) INFORMACIÓN GENERAL:

- (i) SOLICITANTE: NEBOJSA JANJIC, LARRY GOLD
- 10 (ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: LIGANDOS DE ÁCIDO NUCLEICO DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE PLAQUETAS (PDGF)
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 149
- (iv) DIRECCIÓN DE CORRESPONDENCIA:

- (A) DESTINATARIO: Swanson and Bratschun, L.L.C.
- (B) CALLE: 8400 East Prentice Avenue, Suite #200
- (C) CIUDAD: Denver
- 5 (D) ESTADO: Colorado
- (E) PAÍS: ESTADOS UNIDOS
- (F) CÓDIGO POSTAL: 80111

(v) FORMULARIO LEGIBLE POR ORDENADOR:

- 10 (A) TIPO DE MEDIO: Disquete, 3,5 pulgadas, 1,4 Mb de almacenamiento
- (B) ORDENADOR: IBM compatible
- (C) SISTEMA OPERATIVO: MS-DOS
- (D) SOFTWARE: WordPerfect 6.1

15 (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:

- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: PCT/US98/
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
- 20 (C) CLASIFICACIÓN:

(vii) DATOS DE SOLICITUD ANTERIOR:

- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: 08/991.743
- 25 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 16 DE DICIEMBRE DE 1997

(vii) DATOS DE SOLICITUD ANTERIOR:

- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: 08/618.693
- 30 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 20 DE MARZO DE 1996

(vii) DATOS DE SOLICITUD ANTERIOR:

- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: 08/479.783
- 35 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 7 DE JUNIO DE 1995

(vii) DATOS DE SOLICITUD ANTERIOR:

- (A) NÚMERO DE SOLICITUD: 08/479.725
- 40 (B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 7 DE JUNIO DE 1995

(viii) INFORMACIÓN SOBRE EL ABOGADO/AGENTE:

- (A) NOMBRE: Barry J. Swanson
- 45 (B) NÚMERO DE REGISTRO: 33.215
- (C) REFERENCIA/NÚMERO DE EXPEDIENTE: NEX66/PCT

(ix) INFORMACIÓN DE TELECOMUNICACIÓN:

- 50 (A) TELÉFONO: (303) 793-3333
- (B) TELEFAX: (303) 793-3433

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 1:

55 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 86 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:

5

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN | 50 |
| NNNNNNNNNN NACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG                | 86 |

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 2:

10 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 28 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

15 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: N en las posiciones 1-3 es biotina

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

20 NNNCCCCTGC AGGTGATTTT GCTCAAGT 28

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

25

(A) LONGITUD: 49 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

30

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 3:

CCGAAGCTTA ATACGACTCA CTATAGGGAT CCGCCTGATT AGCGATACT 49

35 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 84 pares de bases

40 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

45 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TAGGCTTGAC AAAGGGCACC ATGGCTTAGT | 50 |
| GGTCCTAGTA CTTGAGCAAA ATCACCTGCA GGGG                  | 84 |

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 5:

50

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 85 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

5 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TCAGGGCACT GCAAGCAATT GTGGTCCCAA | 50 |
| TGGGCTGAGT ACTTGAGCAA AATCACCTGC AGGGG                 | 85 |

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 6:

10

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 86 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 6:

20

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TCCAGGCAGT CATGGTCATT GTTTACAGTC | 50 |
| GTGGAGTAGG TACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG                | 86 |

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 7:

25 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 85 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

30 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TAGGTGATCC CTGCAAAGGC AGGATAACGT | 50 |
| CCTGAGCATC ACTTGAGCAA AATCACCTGC AGGGG                 | 85 |

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

40

(A) LONGITUD: 83 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

45

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 8:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TATGTGATCC CTGCAGAGGG AGGANACGTC | 50 |
| TGAGCATCAC TTGAGCAAAA TCACCTGCAG GGG                   | 83 |

50

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 86 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 9:

|                                                       |    |
|-------------------------------------------------------|----|
| ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TCACGTGATC CCATAAGGGC TCGCAAAAT | 50 |
| AGCAGAGCAT CACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG               | 86 |

15 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 86 pares de bases
- 20 (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 10:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TGGTGGACTA GAGGGCAGCA AACGATCCTT | 50 |
| GGTTAGCGTC CACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG                | 86 |

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 11:

30

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 85 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 35 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 11:

40

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TGGTGCGACG AGGCTTACAC AAACGTACAC | 50 |
| GTTTCCCCGC ACTTGAGCAA AATCACCTGC AGGGG                 | 85 |

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 12:

45 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 86 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- 50 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 12:

|            |            |            |            |            |    |
|------------|------------|------------|------------|------------|----|
| ATCCGCCTGA | TTAGCGATAC | TTGTCGGAGC | AGGGGCGTAC | GAAAACCTTA | 50 |
| CAGTTCCCCC | GACTTGAGCA | AAATCACCTG | CAGGGG     |            | 86 |

5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 10 (A) LONGITUD: 86 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO:13:

|            |            |            |            |             |    |
|------------|------------|------------|------------|-------------|----|
| ATCCGCCTGA | TTAGCGATAC | TAGTGGAACA | GGGCACGGAG | AGTCAAACCTT | 50 |
| TGGTTTCCCC | CACTTGAGCA | AAATCACCTG | CAGGGG     |             | 86 |

20 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 86 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 14:

|            |            |            |            |            |    |
|------------|------------|------------|------------|------------|----|
| ATCCGCCTGA | TTAGCGATAC | TGTGGGTAGG | GATCGGTGGA | TGCCTCGTCA | 50 |
| CTTCTAGTCC | CACTTGAGCA | AAATCACCTG | CAGGGG     |            | 86 |

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 15:

35

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 40 (A) LONGITUD: 86 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 15:

45

|            |            |            |            |            |    |
|------------|------------|------------|------------|------------|----|
| ATCCGCCTGA | TTAGCGATAC | TGGGCGCCCT | AAACAAAGGG | TGGTCACTTC | 50 |
| TAGTCCCAGG | AACTTGAGCA | AAATCACCTG | CAGGGG     |            | 86 |

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 16:



(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 87 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 5 (C) TIPO DE CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 16:

10

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TTCCGGGCTC GGGATTCTG GTCACCTTCA 50  
 GTCCCGGATA TAACTTGAGC AAAATCACCT GCAGGGG 87

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 17:

15 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 84 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla  
 20 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 17:

25

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TATGGGAGGG CGCGTTCTTC GTGGTTACTT 50  
 TTAGTCCCGA CTTGAGCAAA ATCACCTGCA GGGG 84

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

30

- (A) LONGITUD: 84 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

35

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 18:

40

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TACGGGAGGG CACGTTCTTC GTGGTTACTT 50  
 TTAGTCCCGA CTTGAGCAAA ATCACCTGCA GGGG 84

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 45 (A) LONGITUD: 86 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

50 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 19:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TGCTCGTAGG GGGCGATTCT TTCGCCGTTA 50  
CTTCCAGTCC TACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG 86

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 20:

5 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 86 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 20:

15 ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TGAGGCATGT TAACATGAGC ATCGTCTCAC 50  
GATCCTCAGC CACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG 86

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 21:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

20

(A) LONGITUD: 86 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

25

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 21:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TCCACAGGCT ACGGCACGTA GAGCATCACC 50  
ATGATCCTGT GACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG 86

30

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 22:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

35 (A) LONGITUD: 86 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 22:

ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TGCGGGCATG GCACATGAGC ATCTCTGATC 50  
CCGCAATCCT CACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG 86

45 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 23:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 86 pares de bases

- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN  
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 23:

|                                                       |    |
|-------------------------------------------------------|----|
| ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TACCGGGCTA CTCGTAGAG CATCTCTGAT | 50 |
| CCCGGTGCTC GACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG               | 86 |

- 10 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 24:

- (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 86 pares de bases

- 15 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

- 20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 24:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TAAAGGGCGA ACGTAGGTCG AGGCATCCAT | 50 |
| TGGATCCCCTT CACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG               | 86 |

- (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 25:

25

- (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 86 pares de bases

- (B) TIPO: ácido nucleico  
 30 (C) TIPO DE CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 25:

35

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TACGGGCTCT GTCAGTGTGG CACTAGCAAT | 50 |
| AGTCCCGTCG CACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG                | 86 |

- (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 26:

- 40 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 85 pares de bases

- (B) TIPO: ácido nucleico  
 45 (C) TIPO DE CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 26:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TGGGCAGACC TTCTGGACGA GCATCACCTA | 50 |
| TGTGATCCCG ACTTGAGCAA AATCACCTGC AGGGG                 | 85 |

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 27:

5 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 86 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla

10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 27:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TAGAGGGGAA GTAGGCTGCC TGACTCGAGA | 50 |
| GAGTCCTCCC GACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG                | 86 |

15

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 28:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

20

- (A) LONGITUD: 86 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 28:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TAGGGGTGCG AAACACATAA TCCTCGCGGA | 50 |
| TTCCCATCGC TACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG                | 86 |

30

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 29:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 83 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 29:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TGGGGGGGCA ATGGCGGTAC CTCTGGTCCC | 50 |
| CTAAATACAC TTGAGCAAAA TCACCTGCAG GGG                   | 83 |

45 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 30:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 85 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

5

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 30:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TGCGGCTCAA AGTCCTGCTA CCCGCAGCAC | 50 |
| ATCTGTGGTC ACTTGAGCAA AATCACCTGC AGGGG                 | 85 |

10

- (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 31:

- (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 86 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 31:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TTTGGGCGTG AATGTCCACG GGTACCTCCG | 50 |
| GTCCCAAAGA GACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG                | 86 |

- 25 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 32:

- (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 85 pares de bases
- 30 (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
- 35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 32:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TTCCGCGCAA GTCCCTGGTA AAGGGCAGCC | 50 |
| CTAACTGGTC ACTTGAGCAA AATCACCTGC AGGGG                 | 85 |

- (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 33:

40

- (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 86 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 45 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 33:

50

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TCAAGTTCCC CACAAGACTG GGGCTGTTCA | 50 |
| AACCGCTAGT AACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG                | 86 |

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 34:

5 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 86 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- 10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 34:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TCAAGTAGGG CGCGACACAC GTCCGGGCAC | 50 |
| CTAAGGTCCC AACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG                | 86 |

15

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 35:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

20

- (A) LONGITUD: 86 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 35:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| ATCCGCCTGA TTAGCGATAC TAAAGTCGTG CAGGGTCCCC TGGAAGCATC | 50 |
| TCCGATCCCA GACTTGAGCA AAATCACCTG CAGGGG                | 86 |

30

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 36:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 96 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 36:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| GGGAGACAAG AAUAACGCUC AANNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN | 50 |
| NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC     | 96 |

45 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 37:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 39 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
5 (C) TIPO DE CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 37:  
10 TAATACGACT CACTATAGGG AGACAAGAAT AACGCTCAA 39

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 38:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 24 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 38:  
20 GCCTGTTGTG AGCCTCCTGT CGAA 24

25 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 39:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 93 pares de bases  
30 (B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

- 35 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 39:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACGGUGGCA UUUCUUCACU UCCUUCUCGC 50  
UUUCUCGCGU UGGGCNCGAU UCGACAGGAG GCUCACAACA GGC 93

40 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 40:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 91 pares de bases  
45 (B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

- 50 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 40:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACCAACCUU CUGUCGGCGU UGCUUUUUGG 50  
ACGGCACUCA GGCUCCAUUC GACAGGAGGC UCACAACAGG C 91



(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 41:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 95 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 41:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAUCGAUCGG UUGUGUGCCG GACAGCCUUA | 50 |
| ACCAGGGCUG GGACCGAGGC CUUCGACAGG AGGCUCACAA CAGGC      | 95 |

15

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 42:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 92 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 42:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACUGAGUAG GGGAGGAAGU UGAAUCAGUU | 50 |
| GUGGCGCCUC UCAUUCGCUU CGACAGGAGG CUCACAACAG GC         | 92 |

30

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 43:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 95 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 43:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACAGCACUU UCGCUUUUCA UCAUUUUUUC | 50 |
| UUUCCACUGU UGGGCGCGGA AUUCGACAGG AGGCUCACAA CAGGC      | 95 |

45

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 44:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 50 (A) LONGITUD: 96 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico



(C) TIPO DE CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

- 5 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 44:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAUCAGUGCU GGCGUCAUGU CUCGAUGGGG | 50 |
| AUUUUUCUUC AGCACUUUGC CAUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC     | 96 |

- 10 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 45:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 96 pares de bases

- 15 (B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

- 20 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 45:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAUCUACUUU CCAUUUCUCU UUUCUUCUCA | 50 |
| CGAGCGGGUU UCCAGUGAAC CAUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC     | 96 |

- 25 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 46:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 94 pares de bases

- 30 (B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

- 35 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 46:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACGAUAGUG ACUACGAUGA CGAAGGCCGC | 50 |
| GGGUUGGAUG CCCGCAUUGA UUCGACAGGA GGCUCACAAC AGGC       | 94 |

- 40 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 47:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 93 pares de bases

- 45 (B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

- 50 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 47:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAGUCGAUAC UGGCGACUUG CUCCAUUGGC | 50 |
| CGAUUAACGA UUCGGUCAGU UCGACAGGAG GCUCACAACA GGC        | 93 |

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 48:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 95 pares de bases
- 10 (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

- 15 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 48:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAGUGCAAAC UUAACCCGGG AACCGCGCGU | 50 |
| UUCGAUCGAC UUUCUUUCC AUUCGACAGG AGGCUCACAA CAGGC       | 95 |

20 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 49:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 96 pares de bases
- 25 (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

- 30 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 49:

|                                                      |    |
|------------------------------------------------------|----|
| GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAAUCCGCG UUCGGAUUA UCCUGUGCUC | 50 |
| GGAAAUCGGU AGCCAUAGUG CAUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC   | 96 |

35 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 50:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 94 pares de bases
- 40 (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

- 45 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 50:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACGAACGAG GAGGGAGUGG CAAGGGAUGG | 50 |
| UUGGAUAGGC UCUACGCUA UUCGACAGGA GGCUCACAAC AGGC        | 94 |

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 51:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 94 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 51:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAGCGAAACU GGCGACUUGC UCCAUGGGCC | 50 |
| GAUAUAACGA UUCGGUUCU UUCGACAGGA GGCUCACAAC AGGC        | 94 |

15

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 52:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 95 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 52:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACGAACGAG GAGGGAGUCG CAAGGGAUGG | 50 |
| UUGGAUAGGC UCUACGCUCA AUUCGACAGG AGGCUCACAA CAGGC      | 95 |

30

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 53:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 94 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 53:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACGAGAAGU GACUACGAUG ACGAAGGCCG | 50 |
| CGGGUUGAAU CCCUCAUUGA UUCGACAGGA GGCUCACAAC AGGC       | 94 |

45

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 54:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 50 (A) LONGITUD: 95 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

5 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 54:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAAAGCAACG AGACCUGACG CCUGAUGUGA | 50 |
| CUGUGCUUGC ACCCGAUUCU GUUCGACAGG AGGCUCACAA CAGGC      | 95 |

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 55:

10

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 96 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 55:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAGUGAUUCU CAUUCUCAAU GCUUUCUCAC | 50 |
| AACUUUUUCC ACUUCAGCGU GAUUCGACAG GAGGCUCACA CAGGC      | 96 |

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 56:

25

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 94 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

30 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 56:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAAAGCAACG AGACUCGACG CCUGAUGUGA | 50 |
| CUGUGCUUGC ACCCGAUUCU UUCGACAGGA GGCUCACAA AGGC        | 94 |

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 57:

40

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 96 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

45 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 57:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAUCGAUCGG UUGUGUGCCG GACAGCUUUG 50  
ACCAUGAGCU GGGACCGAGG CCUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC 96

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 58:

5 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 96 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 58:

15

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AANGACGNGU GGACCUGACU AAUCGACUGA 50  
UCAAGAUAUC CGCCAGAUU GGUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC 96

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 59:

20 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 94 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

25 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 59:

30

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACACUGCGA CUUGCAGAAG CCUUGUGUGG 50  
CGGUACCCCC UUUGGCCUCG UUCGACAGGA GGCUCACAAC AGGC 94

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 60:

35 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 94 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

40 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 60:

45

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAGGUGGCAU UUCUUCAUUU UCCUUCUCGC 50  
UUUCUCCGCC GUUGGGCGCG UUCGACAGGA GGCUCACAAC AGGC 94

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 61:

50 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 96 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

5 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 61:

10

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACCUGAGUA GGGGGGAAAG UUGAAUCAGU | 50 |
| UGUGGCGCUC UACUCAUUCG CCUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC     | 96 |

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 62:

15 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 94 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

20 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 62:

25

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAGUCGAAAC UGGCGACUUG CUCCAUUGGC | 50 |
| CGAUUAACG AUUCGGUUA UUCGACAGGA GGCUCACAAC AGGC         | 94 |

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 63:

30 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 94 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

35 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 63:

40

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAGCGAUACU GGCAGCUUGC UCCAUUGGCC | 50 |
| GAUAUAACGA UUCGGCUCAG UUCGACAGGA GGCUCACAAC AGGC       | 94 |

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 64:

45 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 96 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

50 (D) TOPOLOGÍA: lineal



(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 64:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAACGUGGGG CACAGGACCG AGAGUCCCUC 50  
CGGCAAUAGC CGCUACCCCA CCUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC 96

5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 65:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 98 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 65:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACACAGCCU NANAGGGGGG AAGUUGAAUC 50  
AGUUGUGGCG CUCUACUCAU UCGCUUCGAC AGGAGGCUCA CAACAGGC 98

20

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 66:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

25

(A) LONGITUD: 94 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

30

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 66:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAANGGGNUA UGGUGACUUG CUCCAUUGGC 50  
CGAUUAUACG AUUCGGUCAG UUCGACAGGA GGCUCACAAC AGGC 94

35

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 67:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

40

(A) LONGITUD: 96 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

45

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 67:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACCUGCGUA GGGNGGGAAG UUGAAUCAGU 50  
UGUGGCGCUC UACUCAUUCG CCUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC 96

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 68:

5 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 94 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 68:

15

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACGAACGAG GAGGGAGUGG CAAGGGAUGG 50  
UUGGAUAGGC UCUACGCUCA UUCGACAGGA GGCUCACAAC AGGC 94

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 69:

20 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 97 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

25 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 69:

30

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAGUGCAAAC UUAACCCGGG AACCGCGCGU 50  
UUCGAUUCGC UUUCCNUAUU CCAUUCGACA GGAGGCUCAC AACAGGC 97

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 70:

35 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 93 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

40 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 70:

45

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACGAACGAG GAGGGAGUGG CAAGGGACGG 50  
UNNAUAGGCU CUACGCUCAU UCGACAGGAG GCUCACAACA GGC 93



(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 71:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 93 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 71:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAUCGGUGUG GCUCAGAAAC UGACACGCGU | 50 |
| GAGCUUCGCA CACAUCUGCU UCGACAGGAG GCUCACAACA GGC        | 93 |

15

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 72:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 95 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 72:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAUAUCGCUU UUCAUCAAUU CCACUUUUUC | 50 |
| ACUCUNUAAC UUGGGCGUGC AUUCGACAGG AGGCUCACAA CAGGC      | 95 |

30

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 73:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 96 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 73:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAGUGCAAAC UUAACCCGGG AACCGCGCGU | 50 |
| UUCGAUCCUG CAUCCUUUUU CCUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC     | 96 |

45

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 74:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 50 (A) LONGITUD: 93 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

5 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 74:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAUCGNUCGG UUGUGUGCCG GCAGCUUUGU | 50 |
| CCAGCGUUGG GCCGAGGCCU UCGACAGGAG GCUCACAACA GGC        | 93 |

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 75:

10

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 95 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 75:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAAGUACCCA UCUCUUCUUU UCCUUUCCUU | 50 |
| UCUUCUAGGC ACAUUGAGGG UUUCGACAGG AGGCUCACAA CAGGC      | 95 |

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 76:

25

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 97 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

30 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 76:

|                                                        |    |
|--------------------------------------------------------|----|
| GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACCUGAGUA GGGGGGGAAG UUGAACCAGU | 50 |
| UGUGGCNGCC UACUCAUUCN CCAUUCGACA GGAGGCUCAC AACAGGC    | 97 |

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 77:

40

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 94 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

45 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 77:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACNNCCUN CUGUCGGCGC UUGUCUUUUU 50  
GGACGGGCAA CCCAGGGCUC UUCGACAGGA GGCUCACAAC AGGC 94

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 78:

5 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 96 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla

10 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 78:

15

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACCAACCUN CUGUCGGCGC UUGUCUUUUU 50  
GGACGAGCAA CUCAAGGCUC GUUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC 96

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 79:

20 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 93 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla

25 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 79:

30

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AACCAGCGCA GAUCCCGGGC UGAAGUGACU 50  
GCCGGCAACG GCCGCUCCAU UCGACAGGAG GCUCACAACA GGC 93

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 80:

35 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA: (A) LONGITUD: 96 pares de bases

- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 80:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAUCCCGUA ACAACUUUUC AUUUUCACUU 50  
UUCAUCCAAC CAGUGAGCAG CAUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC 96

45

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 81:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

50

- (A) LONGITUD: 96 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

5

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ARN
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Todas las pirimidinas están modificadas con 2'-F
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 81:

GGGAGACAAG AAUAACGCUC AAUAUCGCUU UCAUCAAAUU CCACUCCUUC 50  
ACUUCUUUAA CUUGGGCGUG CAUUCGACAG GAGGCUCACA ACAGGC 96

10

- (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 82:

- (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

15

- (A) LONGITUD: 23 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

20

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: N en las posiciones 1 y 23 es cualquier par de bases.
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: N en las posiciones 5 y 10 es cualquier par de bases.
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: N en las posiciones 6 y 9 es cualquier par de bases.
- 25 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: N en las posiciones 7 y 8 es cualquier par de bases.
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 82:  
NGGCNNNNNN GRKYAYYRRT CCN 23

- (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 83:

30

- (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 38 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 35 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 38 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado)

40

- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 83:  
TGGGAGGGCG CGTTCTTCGT GGTACTTTT AGTCCCGT 38

- (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 84:

45

- (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 40 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 50 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 40 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado)

55

- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 84:  
CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCTGTGT 40

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 85:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

5

- (A) LONGITUD: 45 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 45 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado)

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 85:

15 TACTCAGGGC ACTGCAAGCA ATTGTGGTCC CAATGGGCTG AGTAT 45

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 86:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

20

- (A) LONGITUD: 36 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 11, 25 y 26 es 2'-O-Metil-2'-desoxicitidina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 9, 10, 17, 19 y 35 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.

30 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en las posiciones 12, 24 y 27 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 6, 22 y 34 es 2'-fluoro-2'-desoxiuridina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 8, 23, 32 y 33 es 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.

35 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 36 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 86:

CAGGCUACGG CACGTAGAGC AUCACCATGA TCCUGT 36

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 87:

40

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 32 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

45

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 9, 15, 17 y 31 es 2'-O-metil-2'-desoxiguanosina.

50

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en la posición 22 es 2'-O-metil-2'-desoxiadenosina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 6, 20 y 30 es 2'-fluoro-2'-desoxiuridina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 8, 21, 28 y 29 es 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.

55 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: N en las posiciones 10 y 23 es un espaciador fosforamidita de hexaetilenglicol.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 32 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 87:

CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT 32

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 88:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

5

- (A) LONGITUD: 39 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 39 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 88:

15 CAGTCCGTGG TAGGGCAGGT TGGGGTGACT TCGTGGAAT 39

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 89:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

20

- (A) LONGITUD: 37 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: T en las posiciones 13, 14, 16 y 17 está sustituido con IdU.

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 89:

30 TGGGAGGGCG CGTTCTTCGT GGTACTTTT AGTCCCG 37

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 90:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 37 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: T en la posición 20 está sustituido con IdU.

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 90:

TGGGAGGGCG CGTTCTTCGT GGTACTTTT AGTCCCG 37

45 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 91:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 50 (A) LONGITUD: 37 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

55 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: T en la posición 23 está sustituido con IdU.

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 91:

TGGGAGGGCG CGTTCTTCGT GGTACTTTT AGTCCCG 37

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 92:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 37 pares de bases

5 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

10 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: T en la posición 24 está sustituido con IdU.

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 92:

TGGGAGGGCG CGTTCCTTCGT GGTACTTTT AGTCCCG 37

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 93:

15

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 37 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

20 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: T en la posición 27 está sustituido con IdU.

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 93:

TGGGAGGGCG CGTTCCTTCGT GGTACTTTT AGTCCCG 37

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 94:

30 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 37 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

35 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) CONFIGURACIÓN:

(D) OTRA INFORMACIÓN: T en las posiciones 28-30 está sustituido con IdU.

40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 94:

TGGGAGGGCG CGTTCCTTCGT GGTACTTTT AGTCCCG 37

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 95:

45 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 37 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

50 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: T en la posición 33 está sustituido con IdU.

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 95:

55 TGGGAGGGCG CGTTCCTTCGT GGTACTTTT AGTCCCG 37

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 96:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 7 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- 5 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO MOLECULAR: Péptido

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: Xaa en la posición 5 es un aminoácido modificado que no puede identificarse.

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 96:

Lys Lys Pro Ile Xaa Lys Lys  
5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 97:

15

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

20 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 1 y 3 es 2'-O-Metil-2'-desoxicitidina.

25 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en la posición 2 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 37 y 39 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en la posición 38 es 2'-O-Metil-2'-desoxiuridina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 40 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 97:

CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCTGUGT 40

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 98:

35 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

40 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 10, 13 y 15 es 2'-O-Metil-2'-desoxicitidina.

45 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 11, 12 y 16 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en la posición 14 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en la posición 17 es 2'-O-Metil-2'-desoxiuridina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 40 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 98:

CACAGGCTAC GGCACGUAGA GCATCACCAT GATCCTGTGT 40

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 99:

55 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases



- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en las posiciones 26 y 29 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 27 y 28 es 2'-O-Metil-2'-desoxicitidina.
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en la posición 30 es 2'-O-Metil-2'-desoxiuridina.
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 40 está en una T en orientación inversa (3'-3'-

10 enlazado).

- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 99:  
CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAU GATCCTGTGT 40

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 100:

15

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 40 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

20

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 1, 3, 10, 13, 15, 27 y 28 es 2'-O-Metil-2'-desoxicitidina.
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en las posiciones 2, 14, 26 y 29 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 11, 12 y 16 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.

25

- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 17 y 30 es 2'-O-Metil-2'-desoxiuridina.
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 40 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

30

- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 100:  
CACAGGCTAC GGCACGUAGA GCATCACCAU GATCCTGTGT 40

35

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 101:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 40 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

40

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 25, 27 y 28 es 2'-O-Metil-2'-desoxicitidina.
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en las posiciones 26 y 29 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 40 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

45

- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 101:  
CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCTGTGT 40

50

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 102:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 40 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla

55

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en las posiciones 4 y 9 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.

5 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 5 y 6 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en la posición 7 es 2'-O-Metil-2'-desoxicitidina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en la posición 8 es 2'-O-Metil-2'-desoxiuridina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 40 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

10 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 102:

CACAGGCUAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCTGTGT 40

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 103:

15 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

(B). TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

20 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en la posición 31 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en la posición 32 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.

25 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 33 y 36 es 2'-O-Metil-2'-desoxiuridina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 34 y 35 es 2'-O-Metil-2'-desoxicitidina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 40 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 103:

30 CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GAUCCUGTGT 40

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 104:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

35

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

40

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 17 y 24 es 2'-O-Metil-2'-desoxiuridina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en la posición 23 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.

45 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 40 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 104:

CACAGGCTAC GGCACGUAGA GCAUCACCAT GATCCTGTGT 40

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 105:

50

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

55 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 19 y 21 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.

- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en la posición 20 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en la posición 22 es 2'-O-Metil-2'-desoxicitidina.
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 40 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

5 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 105:  
CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCTGTGT 40

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 106:

10 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 40 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla

15 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en la posición 20 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en la posición 21 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.
- 20 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en la posición 22 es 2'-O-Metil-2'-desoxicitidina.
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 40 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 106:  
CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCTGTGT 40

25

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 107:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 30 (A) LONGITUD: 40 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 12 y 16 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 13 y 15 es 2'-O-Metil-2'-desoxicitidina.
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en la posición 14 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en la posición 17 es 2'-O-Metil-2'-desoxiuridina.
- 40 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 40 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 107:  
CACAGGCTAC GGCACGUAGA GCATCACCAT GATCCTGTGT 40

45 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 108:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 50 (A) LONGITUD: 40 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

- 55 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 10 y 13 es 2'-O-Metil-2'-desoxicitidina.
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 11 y 12 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en la posición 14 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 40 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 108:  
CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCTGTGT 40

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 109:

5

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

10 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 1 y 3 es 2'-O-Metil-2'-desoxicitidina.

15 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en las posiciones 2 y 4 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 40 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 109:

CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCTGTGT 40

20

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 110:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

25 (A) LONGITUD: 40 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 36 y 38 es 2'-O-Metil-2'-desoxiuridina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 37 y 39 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 40 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 110: CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATC-CUGUGT 40

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 111:

40 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

45 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en la posición 7 es 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 40 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

50 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 111:

CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCTGTGT 40

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 112:

55 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en la posición 22 es 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.

5 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 40 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 112:

CACAGGCTAC GGCACGTAGG GCATCACCAT GATCCTGTGT 40

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 113:

10

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en la posición 25 es 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.

20 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 40 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 113:

CACAGGCTAC GGCACGTAGG GCATCACCAT GATCCTGTGT 40

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 114:

25

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

30 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en la posición 34 es 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.

35 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 40 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 114:

CACAGGCTAC GGCACGTAGG GCATCACCAT GATCCTGTGT 40

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 115:

40

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

45 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en la posición 35 es 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.

50 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 40 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 115:

CACAGGCTAC GGCACGTAGG GCATCACCAT GATCCTGTGT 40

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 116:

55

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en la posición 8 es 2'-fluoro-2'-desoxiuridina.

5 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 40 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 116:

CACAGGCUAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCTGTGT 40

10 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 117:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

15 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en la posición 17 es 2'-fluoro-2'-desoxiuridina.

20 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 40 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 117:

CACAGGCTAC GGCACGUAGA GCATCACCAT GATCCTGTGT 40

25 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 118:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

30 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en la posición 24 es 2'-fluoro-2'-desoxiuridina.

35 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 40 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 118:

CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCAUCACCAT GATCCTGTGT 40

40 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 119:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

45 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en la posición 30 es 2'-fluoro-2'-desoxiuridina.

50 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 40 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 119:

CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAU GATCCTGTGT 40

55 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 120:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

- 5 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en la posición 33 es 2'-fluoro-2'-desoxiuridina.  
(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 40 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 120:  
CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GAUCCTGTGT 40

10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 121:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 40 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

- 20 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 7, 22, 25, 34 y 35 es 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.  
(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 8, 17, 24, 33 y 36 es 2'-fluoro-2'-desoxiuridina.  
(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 40 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).  
25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 121:  
CACAGGCUAC GGCACGUAGA GCAUCACCAT GAUCCUGTGT 40

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 122:

30

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 40 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
35 (C) TIPO DE CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 10, 13, 27 y 28 es 2'-O-Metil-2'-desoxicitidina.  
40 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 11, 12, 37 y 39 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.  
(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en las posiciones 14, 26 y 29 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.  
(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en la posición 34 es 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.  
45 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en la posición 38 es 2'-O-Metil-2'-desoxiuridina.  
(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 40 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 122:  
CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCTGUGT 40

50

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 123:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 55 (A) LONGITUD: 40 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 10, 13, 25, 27 y 28 es 2'-O-Metil-2'-desoxicitidina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 11, 12, 37 y 39 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.

5 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en las posiciones 14, 26 y 29 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en la posición 34 es 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 36 y 38 es 2'-O-Metil-2'-desoxiuridina.

10 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 40 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 123:

CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCUGUGT 40

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 124:

15

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

20 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 8 y 24 es 2'-fluoro-2'-desoxiuridina.

25 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 10, 13, 27 y 28 es 2'-O-Metil-2'-desoxicitidina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 11, 12, 37 y 39 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en las posiciones 14, 26 y 29 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.

30 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 25, 34 y 35 es 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 36 y 38 es 2'-O-Metil-2'-desoxiuridina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 40 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 124:

35 CACAGGCUAC GGCACGTAGA GCAUCACCAT GATCCUGUGT 40

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 125:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

40

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

45

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 10, 13, 25, 27 y 28 es 2'-O-Metil-2'-desoxicitidina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 11, 12, 37 y 39 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.

50 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en las posiciones 14, 26 y 29 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 34 y 35 es 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 36 y 38 es 2'-O-Metil-2'-desoxiuridina.

55 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 40 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 125:

CACAGGCTAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCUGUGT 40

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 126:



(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 40 pares de bases

5 (B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en la posición 8 es 2'-fluoro-2'-desoxiuridina.

10 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 10, 13, 25, 27 y 28 es 2'-O-Metil-2'-desoxicitidina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 11, 12, 37 y 39 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.

15 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en las posiciones 14, 26 y 29 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en la posición 34 es 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 36 y 38 es 2'-O-Metil-2'-desoxiuridina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 40 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 126:

CACAGGCUAC GGCACGTAGA GCATCACCAT GATCCUGUGT 40

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 127:

25 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

30 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 6 y 22 es 2'-fluoro-2'-desoxiuridina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 8, 11, 25 y 26 es 2'-O-Metil-2'-desoxicitidina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 9, 10, y 35 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.

35 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en las posiciones 12, 24 y 27 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 23, 32 y 33 es 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en la posición 34 es 2'-O-Metil-2'-desoxiuridina.

40 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 36 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 127:

CAGGCUACGG CACGTAGAGC AUCACCATGA TCCUGT 36

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 128:

45

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 34 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

50 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 6 y 20 es 2'-fluoro-2'-desoxiuridina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 7, 10, 23 y 24 es 2'-O-Metil-2'-desoxicitidina.

55 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 8, 9, y 33 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en las posiciones 11, 22 y 25 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 21, 30 y 31 es 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en la posición 32 es 2'-O-Metil-2'-desoxiuridina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 34 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 128:  
CAGGCUCGGC ACGAGAGCAU CACCATGATC CUGT 34

5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 129:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

10 (A) LONGITUD: 32 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 6 y 20 es 2'-fluoro-2'-desoxiuridina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 7, 10, 22 y 23 es 2'-O-Metil-2'-desoxicitidina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 8, 9 y 31 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en las posiciones 11 y 24 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 21, 28 y 29 es 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.

20 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en la posición 30 es 2'-O-Metil-2'-desoxiuridina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 32 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 129:

CAGGCUCGGC ACGAGAGCAU CCCAGATCCU GT 32

25

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 130:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

30 (A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

35 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 8, 11, 23, 25, 26, 32 y 33 es 2'-O-Metil-2'-desoxicitidina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 9, 10, y 35 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en las posiciones 12, 24 y 27 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.

40 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en la posición 6 es 2'-fluoro-2'-desoxiuridina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 22 y 34 es 2'-O-Metil-2'-desoxiuridina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 36 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 130: CAGGCUACGG CACGTAGAGC AUCACCATGA

45 TCCUGT

36

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 131:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

50

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

55

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 5, 8, 11, 23, 25, 26, 32 y 33 es 2'-O-Metil-2'-desoxicitidina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 6, 22 y 34 es 2'-O-Metil-2'-desoxiuridina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en las posiciones 7, 12, 24 y 27 es 2'-O-Metil-2'-

desoxiadenosina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 9, 10, y 35 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 36 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

5 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 131:  
CAGGCUACGG CACGTAGAGC AUCACCATGA TCCUGT 36

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 132:

10 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

15 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 5, 8, 11, 23, 25, 26, 32 y 33 es 2'-O-Metil-2'-desoxicitidina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 6, 22 y 34 es 2'-O-Metil-2'-desoxiuridina.

20 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en las posiciones 12, 18, 24 y 27 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 9, 10, y 35 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 36 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 132:  
CAGGCUACGG CACGTAGAGC AUCACCATGA TCCUGT 36

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 133:

30 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

35 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 5, 8, 11, 23, 25, 26, 32 y 33 es 2'-O-Metil-2'-desoxicitidina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 6, 22 y 34 es 2'-O-Metil-2'-desoxiuridina.

40 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 9, 10, 19 y 35 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en las posiciones 12, 24 y 27 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.

45 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 36 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 133:  
CAGGCUACGG CACGTAGAGC AUCACCATGA TCCUGT 36

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 134:

50

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 36 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

55 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 6 y 22 es 2'-fluoro-2'-desoxiuridina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 8, 11, 25 y 26 es 2'-O-Metil-2'-desoxicitidina.

- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 9, 10, 19 y 35 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.  
 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en las posiciones 12, 24 y 27 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.
- 5 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 23, 32 y 33 es 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.  
 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en la posición 34 es 2'-O-Metil-2'-desoxiuridina.  
 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 36 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).  
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 134:
- 10 CAGGCUACGG CACGTAGAGC AUCACCATGA TCCUGT 36
- (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 135:
- (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:
- 15 (A) LONGITUD: 36 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 20 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 6 y 22 es 2'-fluoro-2'-desoxiuridina.  
 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 8, 11, 20, 25 y 26 es 2'-O-Metil-2'-desoxicitidina.  
 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 9, 10, 19 y 35 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.
- 25 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en las posiciones 12, 24 y 27 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.  
 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 23, 32 y 33 es 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.  
 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en la posición 34 es 2'-O-Metil-2'-desoxiuridina.
- 30 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 36 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).  
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 135:  
 CAGGCUACGG CACGTAGAGC AUCACCATGA TCCUGT 36
- 35 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 136:
- (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 36 pares de bases
- 40 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 6 y 22 es 2'-fluoro-2'-desoxiuridina.
- 45 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 8, 11, 20, 25 y 26 es 2'-O-Metil-2'-desoxicitidina.  
 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 9, 10, 17, 19 y 35 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.  
 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en las posiciones 12, 24 y 27 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.
- 50 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 23, 32 y 33 es 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.  
 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en la posición 34 es 2'-O-Metil-2'-desoxiuridina.  
 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 36 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).
- 55 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 136:  
 CAGGCUACGG CACGTAGAGC AUCACCATGA TCCUGT 36
- (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 137:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 36 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 5 (C) TIPO DE CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 6 y 22 es 2'-fluoro-2'-desoxiuridina.  
 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 8, 11, 25 y 26 es 2'-O-Metil-2'-desoxicitidina.  
 10 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 9, 10, 17, 19 y 35 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.  
 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en las posiciones 12, 24 y 27 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.  
 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 23, 32 y 33 es 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.  
 15 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en la posición 34 es 2'-O-Metil-2'-desoxiuridina.  
 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 36 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).  
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 137: CAGGCUACGG CACGTAGAGC AUCACCATGA  
 TCCUGT 36  
 20
- (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 138:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 36 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla  
 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- 30 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 6 y 22 es 2'-fluoro-2'-desoxiuridina.  
 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en las posiciones 7, 12, 24 y 27 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.  
 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 8, 11, 25 y 26 es 2'-O-Metil-2'-desoxicitidina.  
 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 9, 10, 17, 19 y 35 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.  
 35 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 23, 32 y 33 es 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.  
 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en la posición 34 es 2'-O-Metil-2'-desoxiuridina.  
 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 36 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).  
 40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 138:  
 CAGGCUACGG CACGTAGAGC AUCACCATGA TCCUGT 36  
 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 139:

45 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 32 pares de bases  
 (B) TIPO: ácido nucleico  
 (C) TIPO DE CADENA: sencilla  
 50 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 6 y 20 es 2'-fluoro-2'-desoxiuridina.  
 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en la posición 8 es 2'-O-Metil-2'-desoxicitidina.  
 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 9, 17 y 31 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.  
 55 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: S en las posiciones 10 y 23 es un espaciador de hexaetilenglicol.  
 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 21, 28 y 29 es 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.  
 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en la posición 22 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.  
 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en la posición 30 es 2'-O-Metil-2'-desoxiuridina.  
 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 32 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

enlazado).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 139:  
CAGGCUACGS CGTAGAGCAU CASTGATCCU GT 32

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 140:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 32 pares de bases  
10 (B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 6 y 20 es 2'-fluoro-2'-desoxiuridina.  
15 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en la posición 8 es 2'-O-Metil-2'-desoxicitidina.  
(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 9, 15, 17 y 31 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.  
(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: S en las posiciones 10 y 23 es un espaciador de hexaetilenglicol.  
(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 21, 28 y 29 es 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.  
20 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en la posición 22 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.  
(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en la posición 30 es 2'-O-Metil-2'-desoxiuridina.  
(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 32 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 140:  
25 CAGGCUACGS CGTAGAGCAU CASTGATCCU GT 32

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 141:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 30 (A) LONGITUD: 36 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 35 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 36 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 141:  
CAGGCTACGG CACGTAGAGC ATCACCATGA TCCTGT 36

40 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 142:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- 45 (A) LONGITUD: 32 pares de bases  
(B) TIPO: ácido nucleico  
(C) TIPO DE CADENA: sencilla  
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 50 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 6, 20 y 30 es 2'-fluoro-2'-desoxiuridina.  
(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 8, 21, 28 y 29 es 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.  
(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 9, 15, 17 y 31 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.  
(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: S en las posiciones 10 y 23 es un espaciador de hexaetilenglicol.  
55 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en la posición 22 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.  
(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 32 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).  
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 142:  
CAGGCUACGS CGTAGAGCAU CASTGATCCU GT 32

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 143:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

5

- (A) LONGITUD: 32 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

10

- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 6, 20 y 30 es 2'-fluoro-2'-desoxiuridina.
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 8, 21, 28 y 29 es 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 9, 15, 17 y 31 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.
- 15 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: N en las posiciones 10 y 23 es un espaciador de hexaetilenglicol.
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en la posición 22 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 32 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

20 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 143:

CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT 32

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 144:

25 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 32 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- 30 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 3, 4, 12, y 25 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 6, 20 y 27 es 2'-fluoro-2'-desoxiuridina.
- 35 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: N en las posiciones 10 y 23 es un espaciador de hexaetilenglicol.
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 11, 18, 21 y 29 es 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en la posición 16 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 32 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

40 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 144:

CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGAUCCT GT 32

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 145:

45

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 32 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- 50 (C) TIPO DE CADENA: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 4, 8, 21 y 29 es 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 6, 20 y 30 es 2'-fluoro-2'-desoxiuridina.
- 55 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 5, 9, 17 y 31 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en la posición 22 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.
- (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: N en las posiciones 10 y 23 es una fosforamidita de hexaetilenglicol.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 32 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 145:

CAGCGUACGN CGTACCGATU CANTGAAGCU GT 32

5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 146:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

10 (A) LONGITUD: 32 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 6, 20 y 30 es 2'-fluoro-2'-desoxiuridina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 8, 21, 28, y 29 es 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 9, 15, 17 y 31 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en la posición 22 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.

20 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: N en las posiciones 10 y 23 es de una fosforamidita e hexaetilenglicol.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 32 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 146:

25 CAGGCUACGN CGTAGAGCAU CANTGATCCU GT 32

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 147:

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

30

(A) LONGITUD: 32 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

35

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 4, 8, 21 y 29 es 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 6, 20 y 30 es 2'-fluoro-2'-desoxiuridina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 5, 9, 17 y 31 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.

40 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en la posición 22 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: N en las posiciones 10 y 23 es una fosforamidita de hexaetilenglicol.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 32 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

45 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 147:

CAGCGUACGN CGTACCGATU CANTGAAGCU GT 32

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 148:

50 (i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 32 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADENA: sencilla

55

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 6, 20 y 30 es 2'-fluoro-2'-desoxiuridina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 8, 21, 28 y 29 es 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 9, 15, 17 y 31 es 2'-O-Metil-2'-



desoxiguanosina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: S en las posiciones 10 y 23 es un espaciador de hexaetilenglicol.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en la posición 22 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 32 está en una T en orientación inversa (3'-3'-5  
5  
enlazado).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 148:

CAGGCUACGS CGTAGAGCAU CASTGATCCU GT 32

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 149:

10

(i) CARACTERIZACIÓN DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 32 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

15 (C) TIPO DE CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: C en las posiciones 4, 8, 21 y 29 es 2'-fluoro-2'-desoxicitidina.

20 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: G en las posiciones 5, 9, 17 y 31 es 2'-O-Metil-2'-desoxiguanosina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: U en las posiciones 6, 20 y 30 es 2'-fluoro-2'-desoxiuridina.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: N en las posiciones 10 y 23 es un espaciador de hexaetilenglicol.

(ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: A en la posición 22 es 2'-O-Metil-2'-desoxiadenosina.

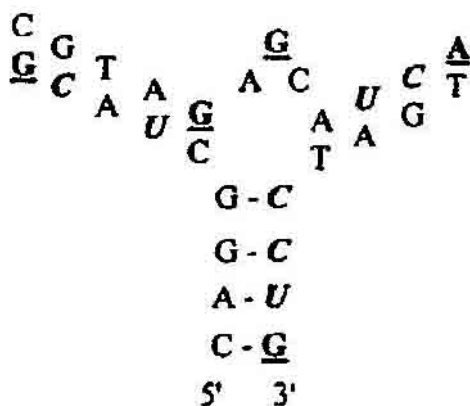
25 (ix) CONFIGURACIÓN: (D) OTRA INFORMACIÓN: El nucleótido 32 está en una T en orientación inversa (3'-3'-enlazado).

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 149:

CAGCGUACGN CGTACCGATU CANTGAAGCU GT 32

# REIVINDICACIONES

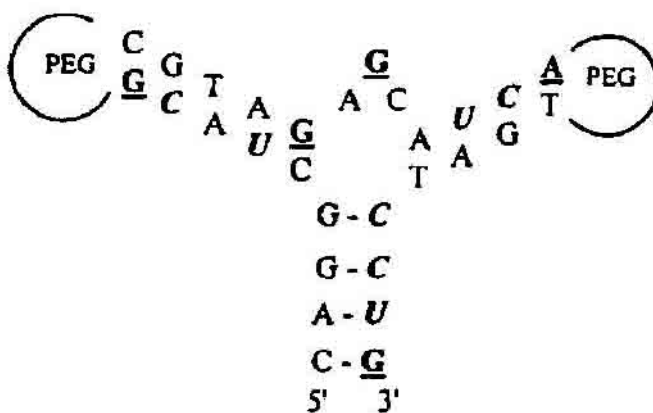
1. Un complejo constituido por un compuesto de alto peso molecular no inmunogénico y un ligando de ácido nucleico que se une específicamente a PDGF, en el que el ligando de ácido nucleico es monocatenario y comprende la secuencia:



en la que A, C, G, T = desoxi-A, C, G, T; A,G = 2'OMe-A,G; y C,U = 2'-F-C,U.

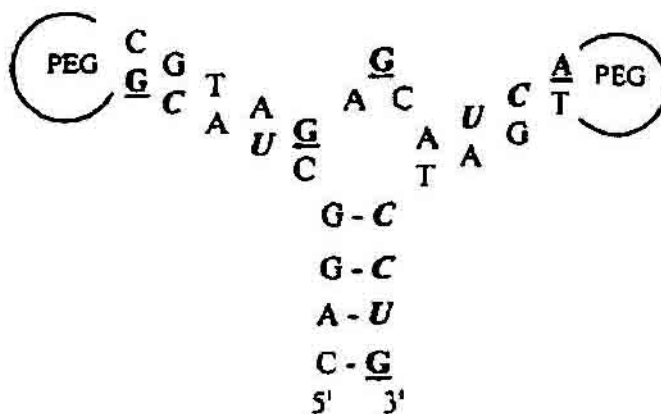
10

2. El complejo de la reivindicación 1, en el que el ligando de ácido nucleico comprende la secuencia:



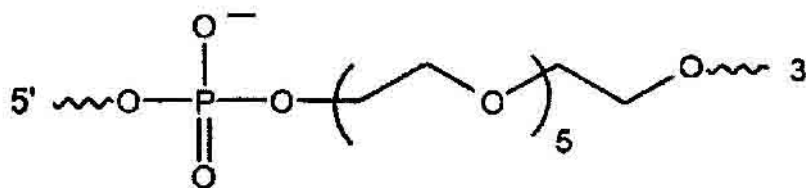
15 en la que PEG es pentaetilenglicol.

3. El complejo de la reivindicación 1, en el que el ligando de ácido nucleico comprende la secuencia:



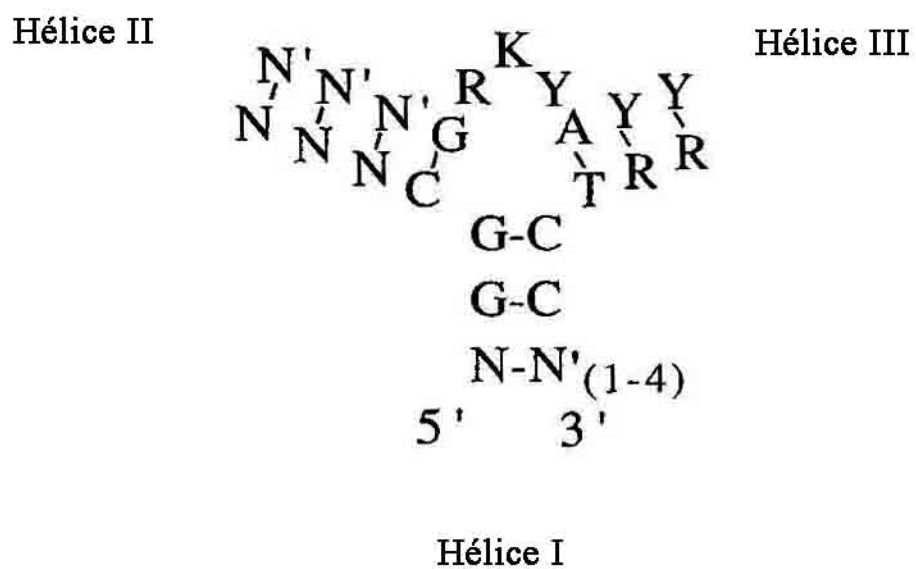
en la que PEG es hexaetilenglicol.

- 5 4. El complejo de la reivindicación 2, en el que PEG es:



5. El complejo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la secuencia de ligando de  
10 ácido nucleico comprende adicionalmente una T en orientación inversa en la dirección 3'.
6. El complejo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende adicionalmente un enlazador  
entre el ligando de ácido nucleico y el compuesto de alto peso molecular no inmunogénico.
- 15 7. El complejo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el compuesto de alto peso molecular  
no inmunogénico está unido al ligando de ácido nucleico a través de un enlazador.
8. El complejo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el compuesto de alto peso molecular  
no inmunogénico comprende uno o más polialquilenglicoles.
- 20 9. El complejo de la reivindicación 8, en el que cada uno de los polialquilenglicoles es polietilenglicol.
10. El complejo de la reivindicación 9, en el que el compuesto de alto peso molecular no inmunogénico  
comprende más de un polietilenglicol y la suma del peso molecular de los polietilenglicoles está entre 10-80 K.
- 25 11. El complejo de la reivindicación 9, en el que el compuesto de alto peso molecular no inmunogénico  
comprende más de un polietilenglicol y la suma del peso molecular de los polietilenglicoles está entre 20-45 K.
12. Un procedimiento para la preparación de un complejo de acuerdo con una cualquiera de las  
30 reivindicaciones anteriores, comprendiendo el procedimiento: asociar el ligando de ácido nucleico con el compuesto  
de alto peso molecular no inmunogénico.
13. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la etapa de asociación comprende unir de forma  
35 covalente, a través de un enlazador, el ligando de ácido nucleico con el compuesto de alto peso molecular no  
inmunogénico.

14. Una composición terapéutica que comprende el complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
- 5 15. Un complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en un procedimiento de inhibición de una enfermedad mediada por PDGF, en el que la enfermedad mediada por PDGF se selecciona entre cáncer, reestenosis, fibrosis, enfermedad renal o enfermedad cardiovascular.
16. Un complejo para su uso en un procedimiento de inhibición de la enfermedad mediada por PDGF de  
10 acuerdo con la reivindicación 15, en el que el complejo es para su uso en la inhibición del crecimiento de tumores.
17. Un complejo para su uso en la inhibición del crecimiento de tumores de acuerdo con la reivindicación 16, en el que los tumores o células o tejidos que rodean los tumores expresan PDGF o receptores de PDGF.
- 15 18. Un complejo para su uso en un procedimiento de inhibición de una enfermedad mediada por PDGF de acuerdo con la reivindicación 17, en el que el complejo es para su uso en la inhibición de fibrosis.
19. Un complejo para su uso en un procedimiento de inhibición de una enfermedad mediada por PDGF de acuerdo con la reivindicación 18, en el que la fibrosis se selecciona entre el grupo que consiste en fibrosis renal,  
20 fibrosis pulmonar, fibrosis de la médula ósea y fibrosis asociada a un tratamiento de radiación.
20. Un complejo para su uso en un procedimiento de inhibición de una enfermedad mediada por PDGF de acuerdo con la reivindicación 15, en el que el complejo es para su uso en la inhibición de la reestenosis.
- 25 21. Un complejo para su uso en la inhibición de reestenosis de acuerdo con la reivindicación 20, en el que la reestenosis se selecciona entre el grupo que consiste en reestenosis intrastent, reestenosis de la arteria coronaria y reestenosis de los vasos no coronarios.
22. Uso de un complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en la fabricación de  
30 una composición terapéutica para su uso en la inhibición de una enfermedad mediada por PDGF, en el que la enfermedad mediada por PDGF es cáncer, reestenosis, fibrosis, enfermedad renal o enfermedad cardiovascular.
23. Un complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 que comprende adicionalmente un agente terapéutico o diagnóstico para su uso en el direccionamiento del agente terapéutico o de  
35 diagnóstico a una diana biológica específica predeterminada que expresa PDGF.
24. Uso de un complejo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende adicionalmente un agente terapéutico o de diagnóstico en la fabricación de una composición terapéutica para dirigir el agente terapéutico o de diagnóstico a una diana biológica específica predeterminada que expresa PDGF.
- 40



SEQ ID NO: 82

FIGURA 1

|                                                      |                                                                    |
|------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| 20t                                                  | 36t                                                                |
| CTT<br>TGG<br>CCG<br>GTC<br>TGA<br>TTT<br>TCT<br>TTT | CAC<br>GGC<br>GTT<br>ATC<br>TAC<br>GTC<br>GTC<br>ATC<br>CCG<br>ATC |
| 5' TGGGA GCG [3'T]                                   | 5' CCG [3'T]                                                       |
| SEQ ID NO: 83                                        |                                                                    |

94

FIGURA 2B

SEQ ID NO: 84

41t

5' T A C T C A G T C G C G C G C  
[3'T]A T G A G T C G C G C G C G C  
G C A A T A  
C C T G T  
T G T  
G C  
G C  
T A

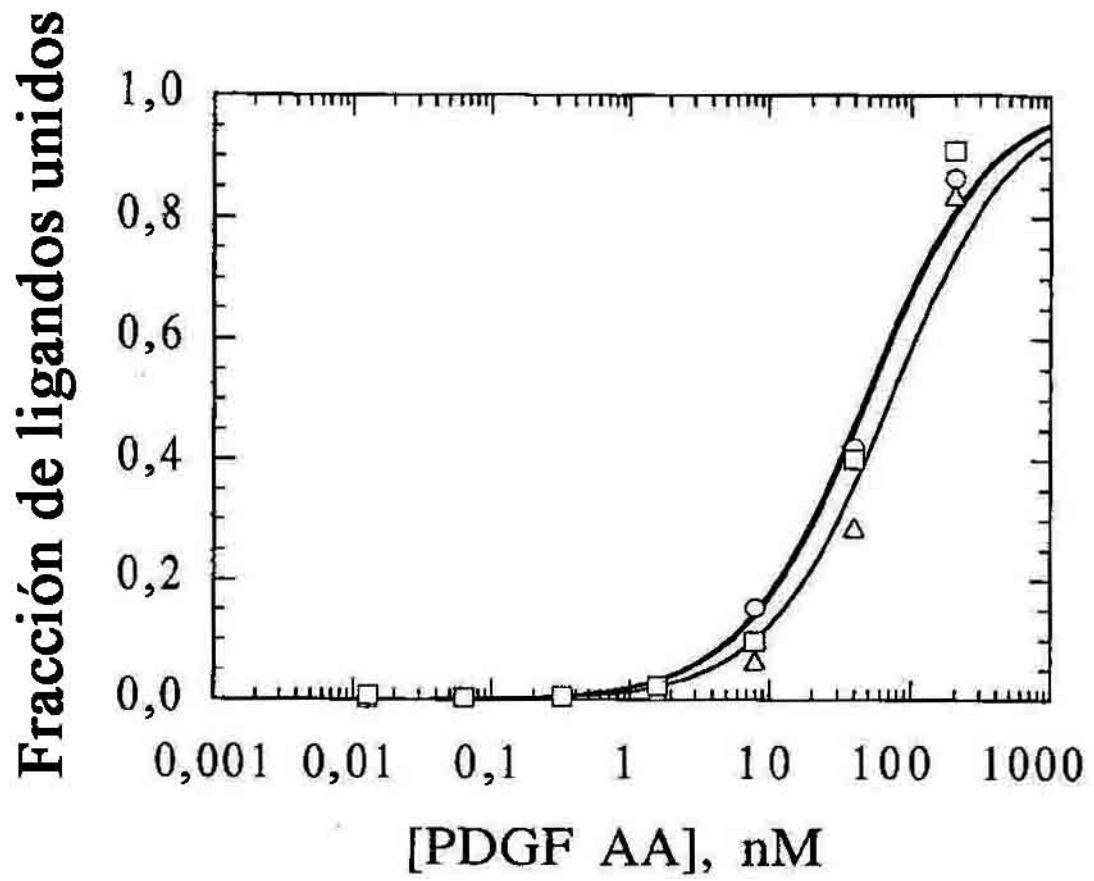


FIGURA 3A

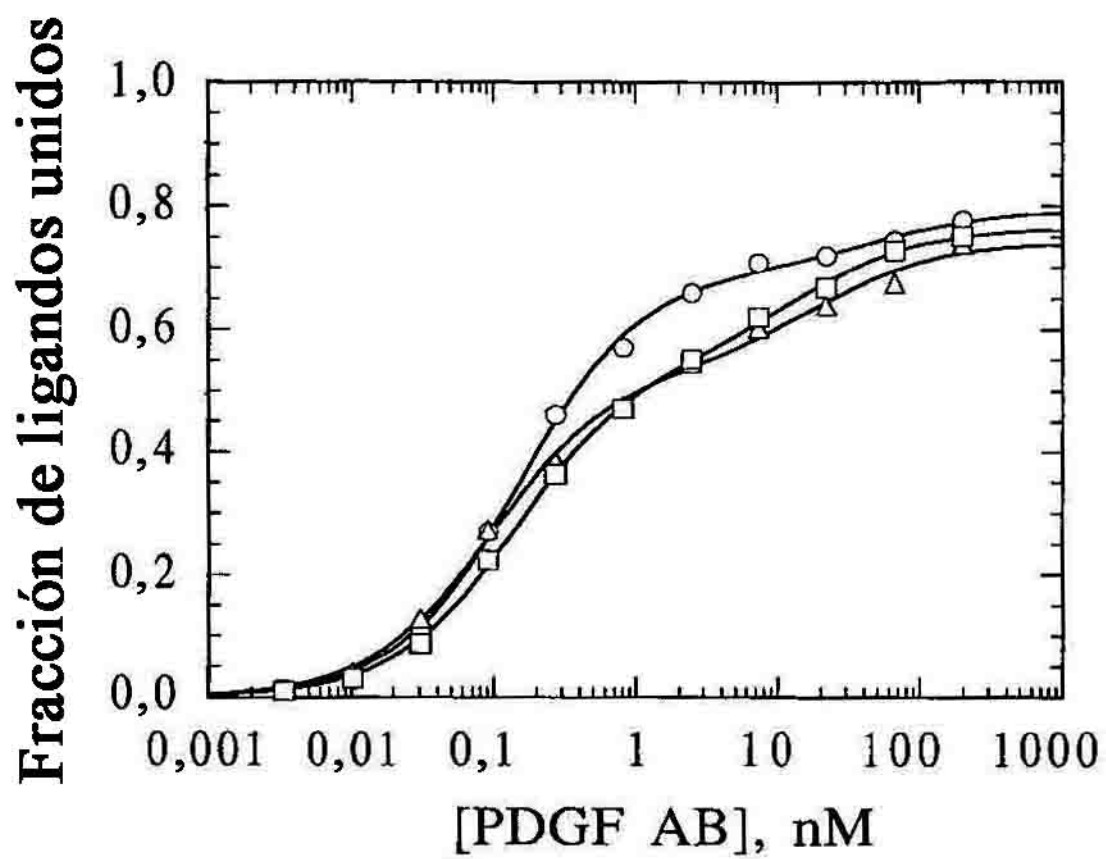


FIGURA 3B



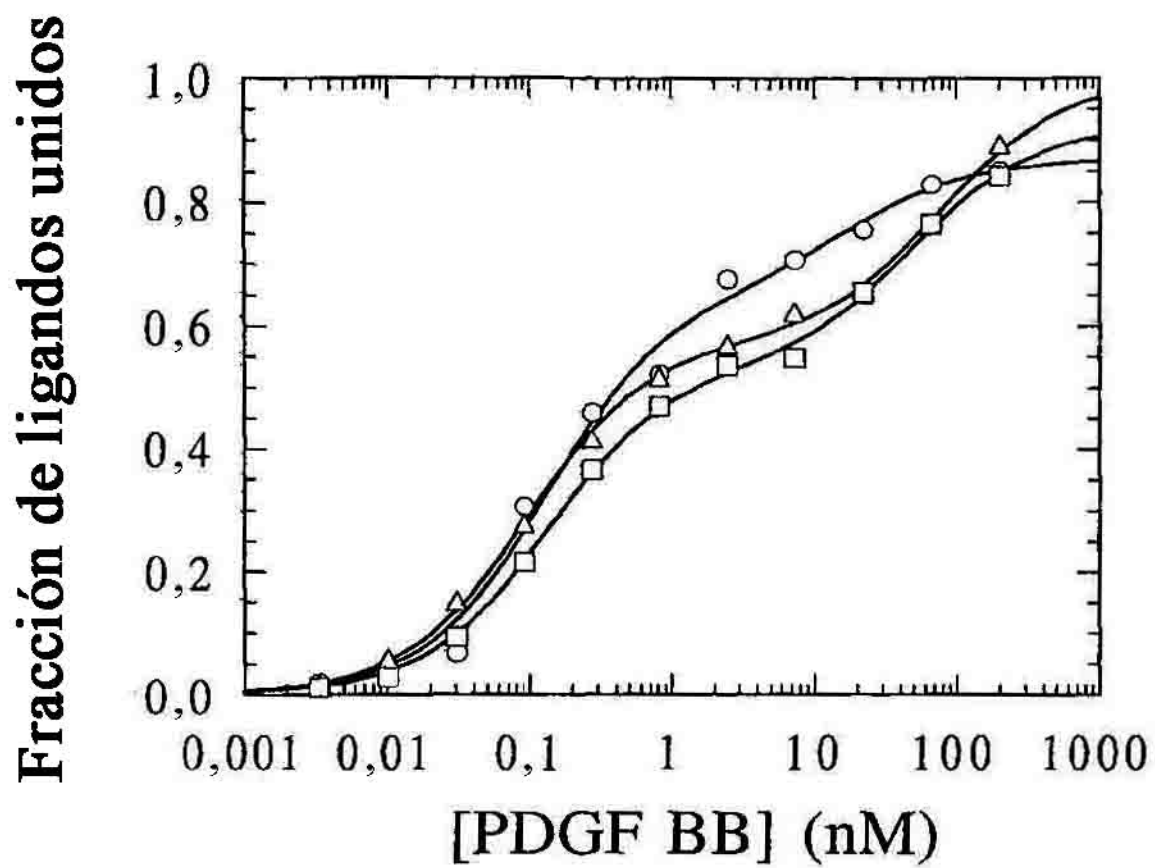
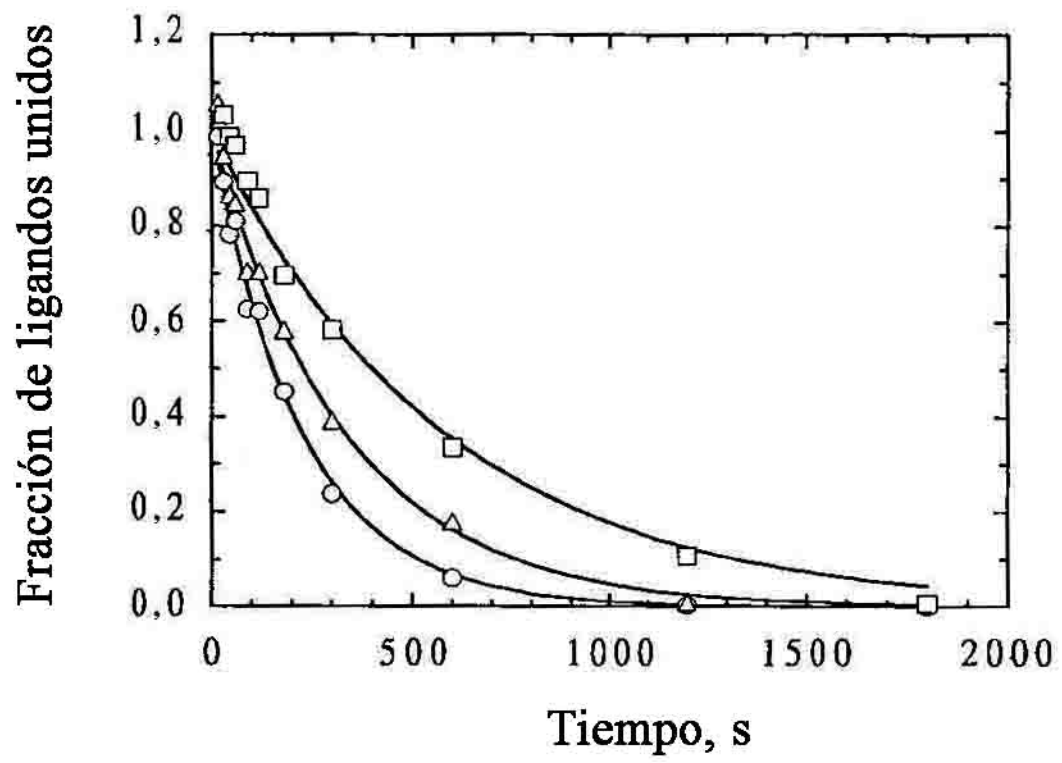


FIGURA 3C



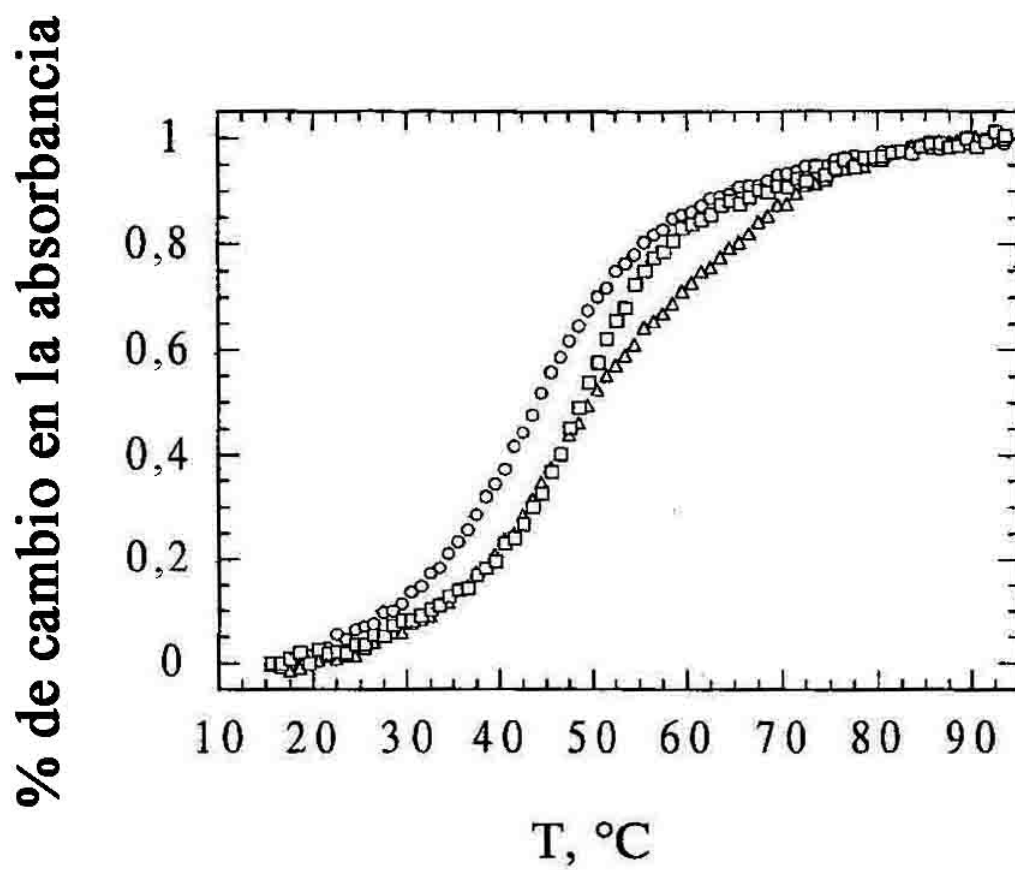


FIGURA 5

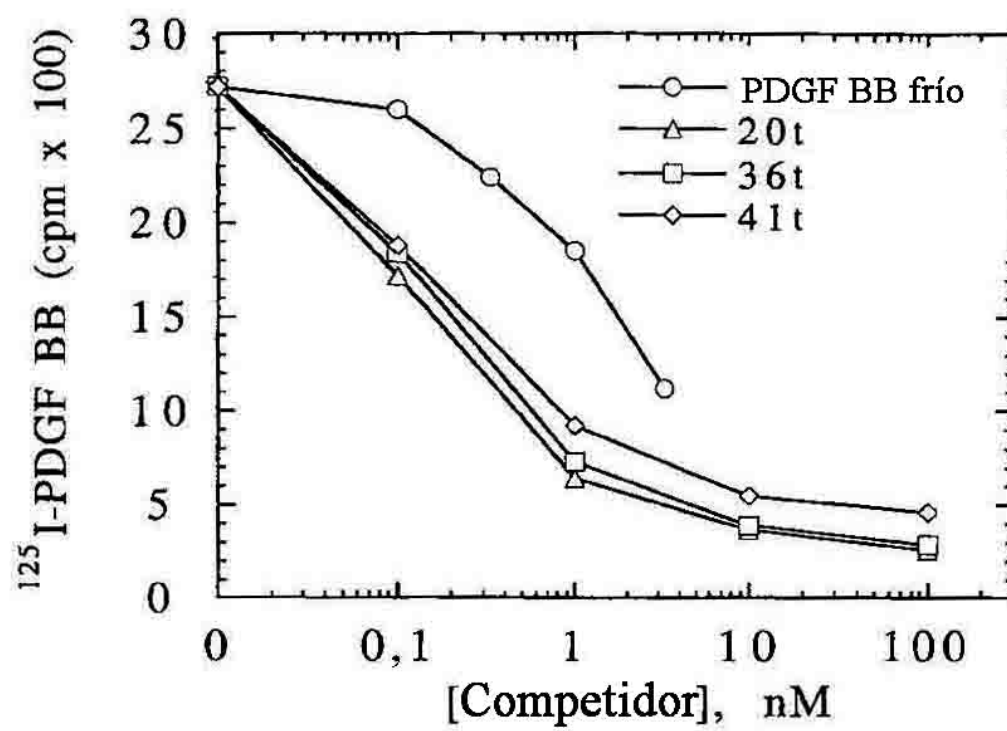


FIGURA 6

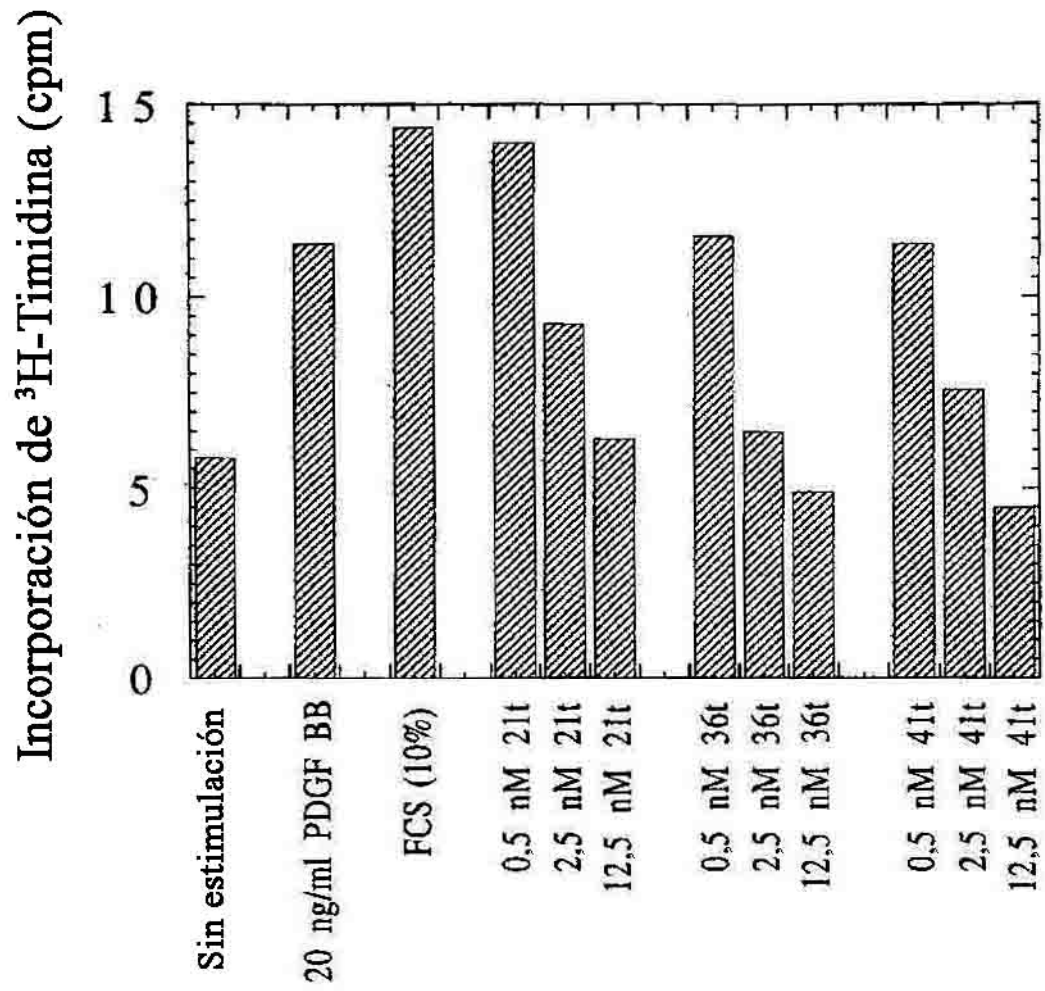


FIGURA 7

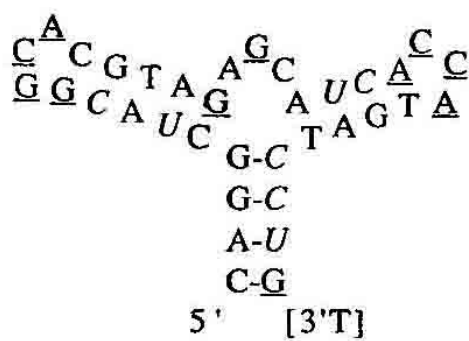


FIGURA 8A

$K_d=0.065$  nM

SEQ ID NO: 86

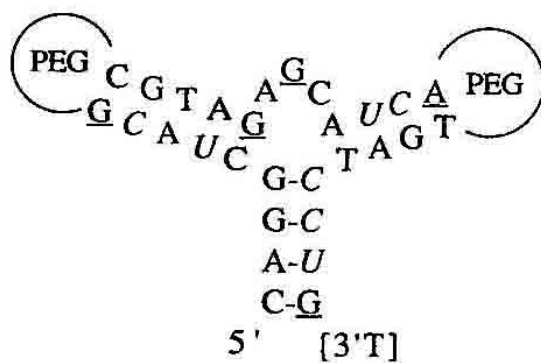
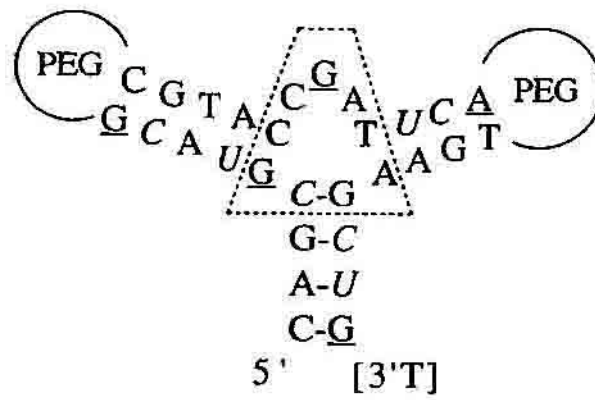


FIGURA 8B

$K_d=0.097$  nM

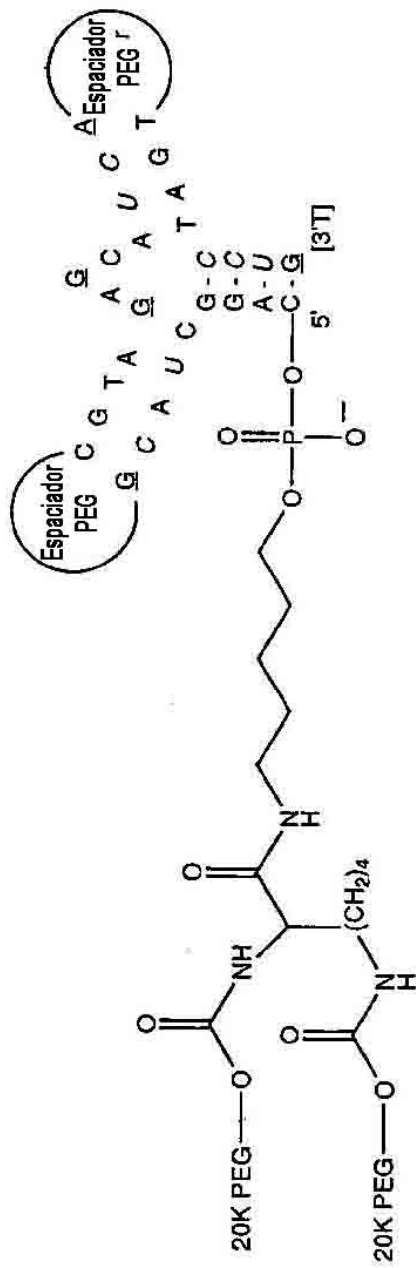
NX21568

SEQ ID NO: 87



SEQ ID NO: 145

FIGURA 8C



NX31975 40K PEG  
SEQ ID NO: 146

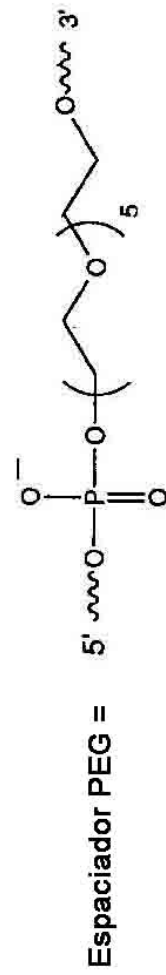
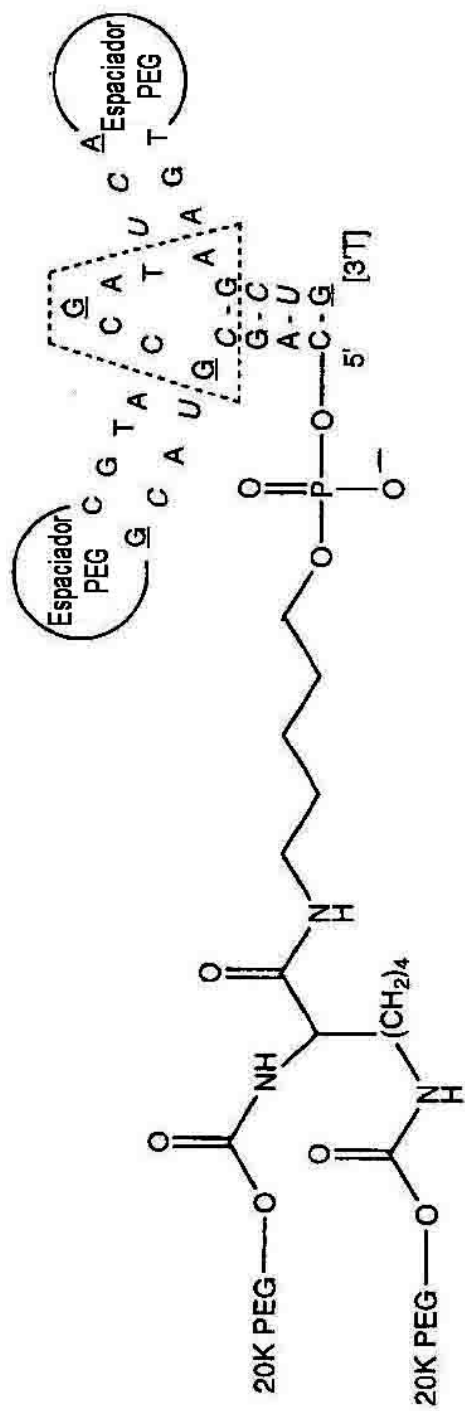


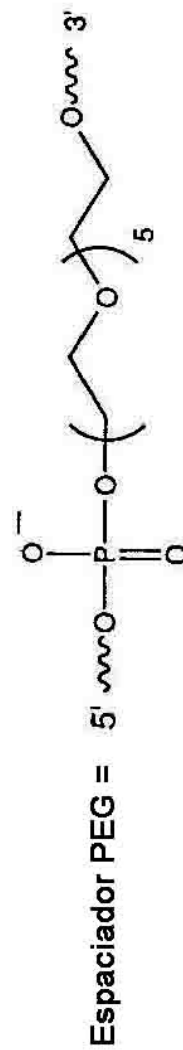
Figura 9A





**NX31976 40K PEG**

SEQ ID NO: 147



**Figura 9B**

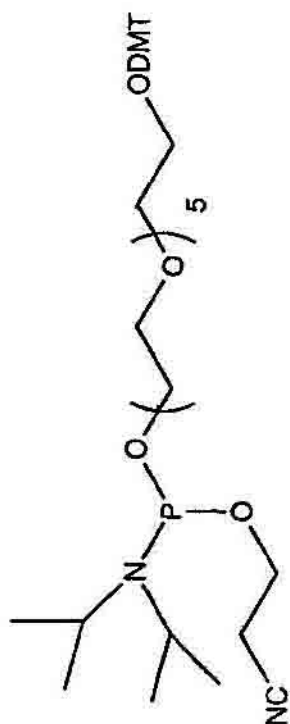


Figura 9C

**Fosforamidita del espaciador de hexaetilenglicol**

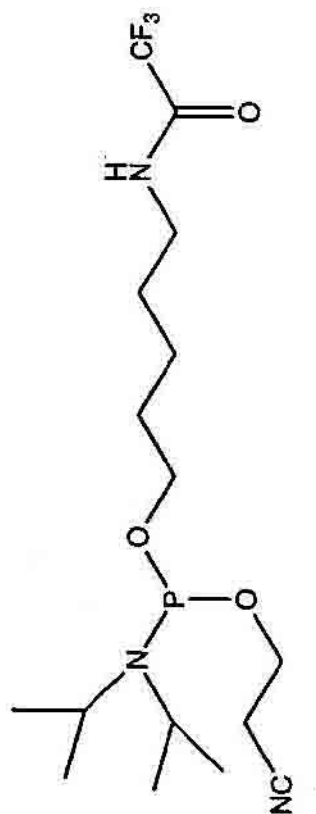
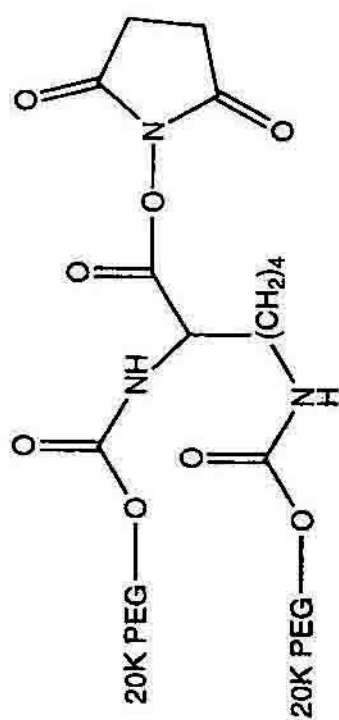


Figura 9D

**Enlazador pentil amino**



Éster 40K PEG NHS

Figura 9E

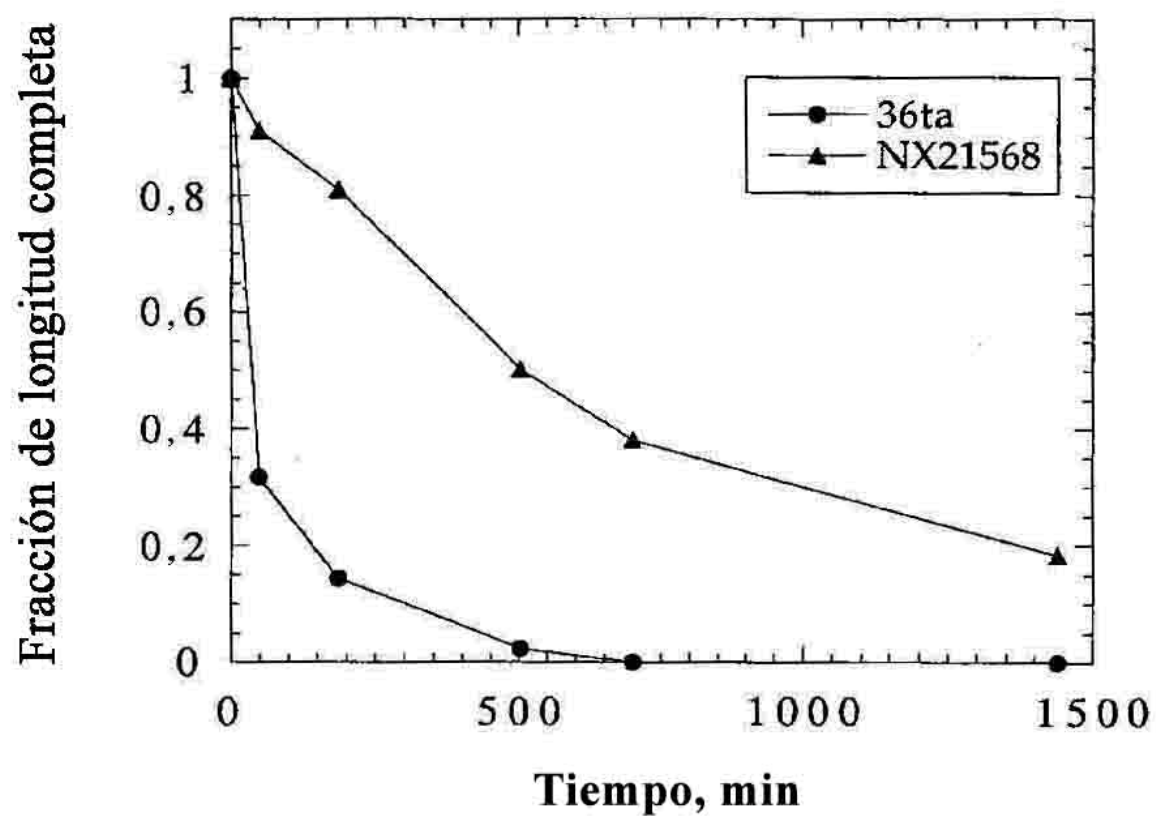


FIGURA 10

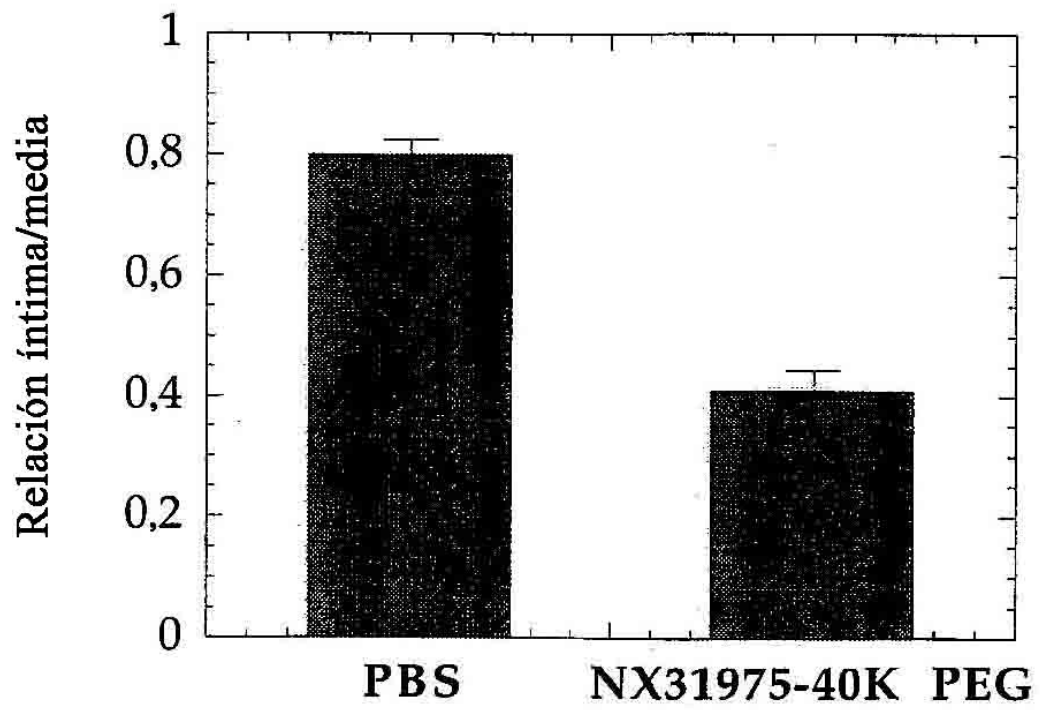


FIGURA 11

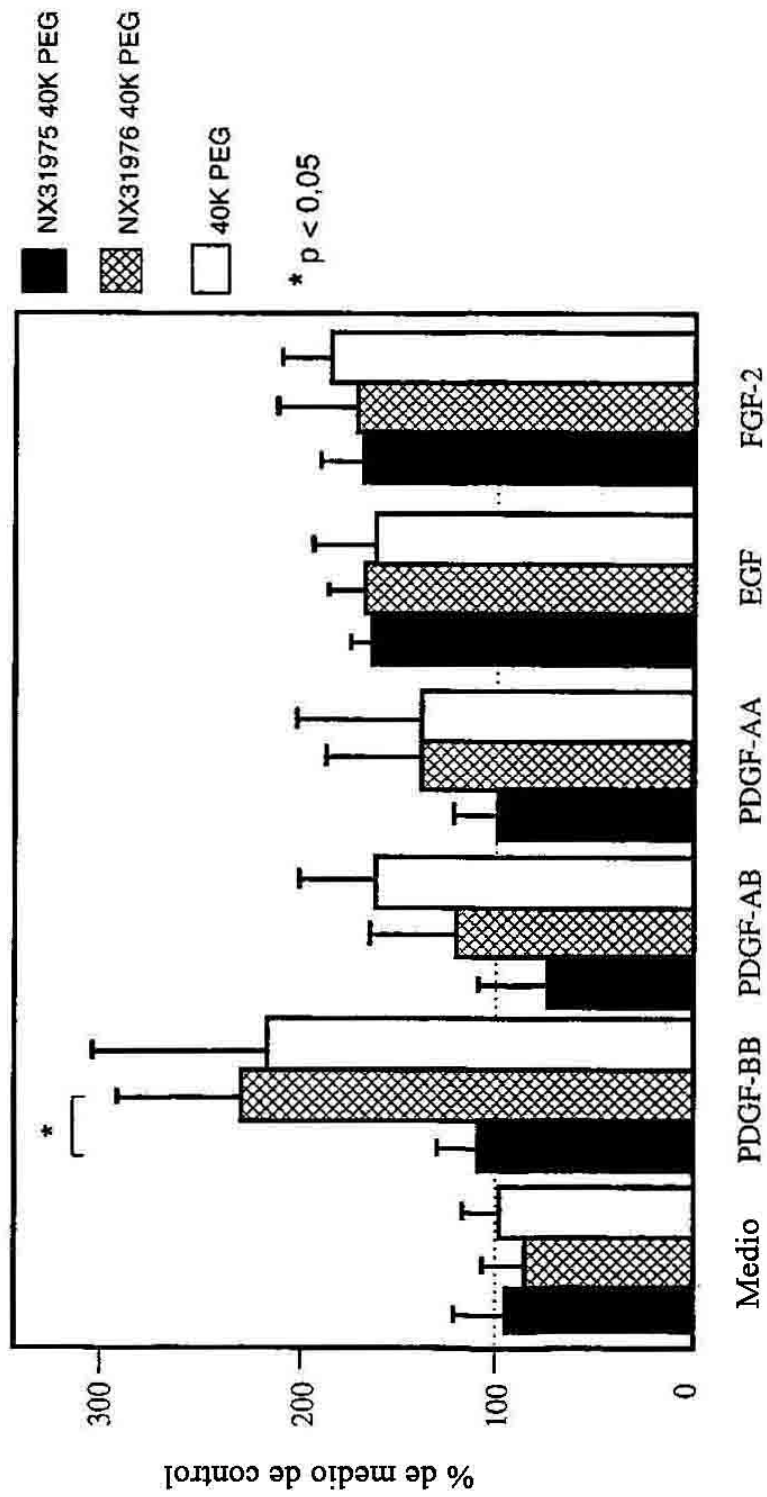


Figura 12

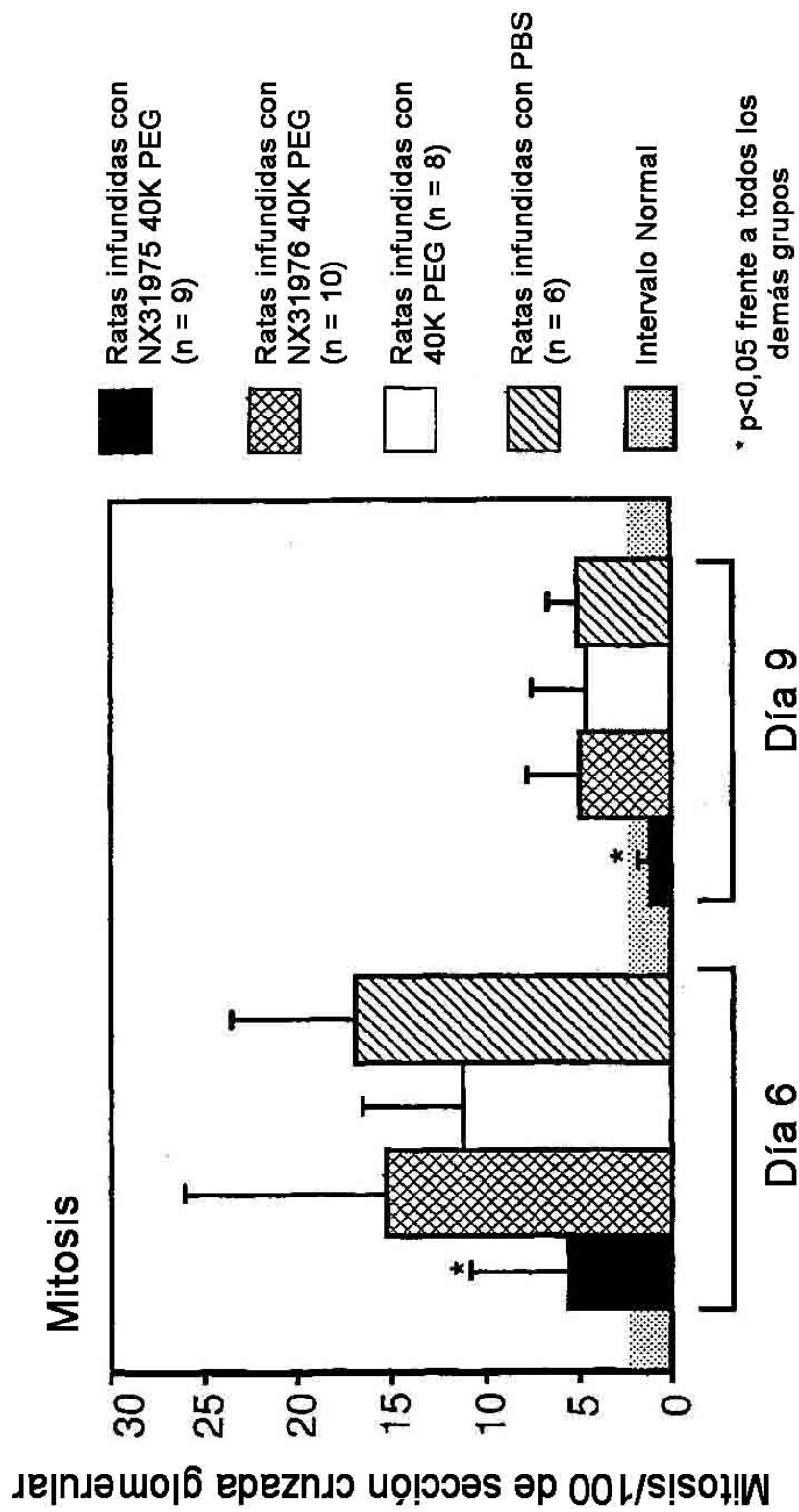


Figura 13A

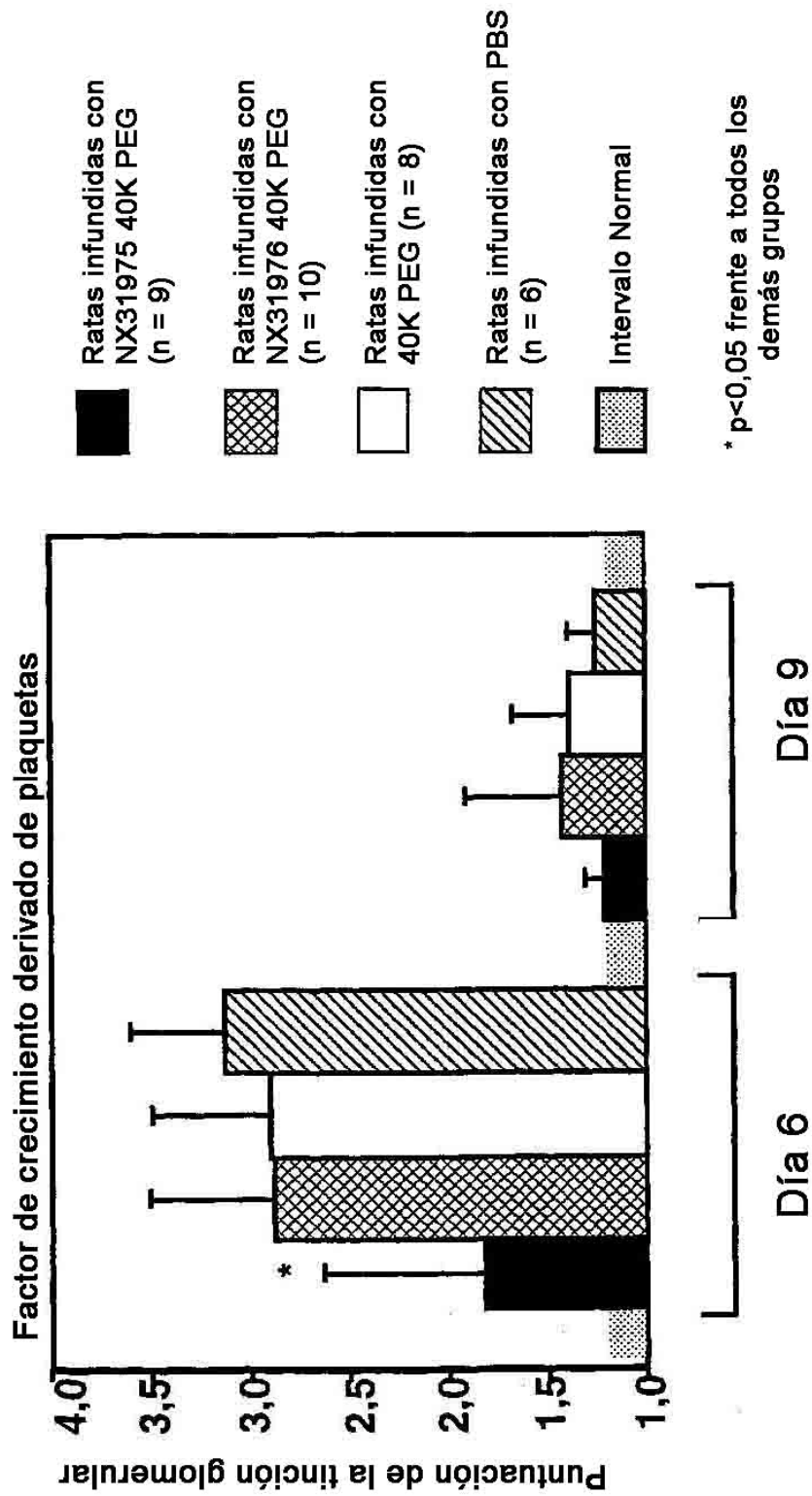


Figura 13B



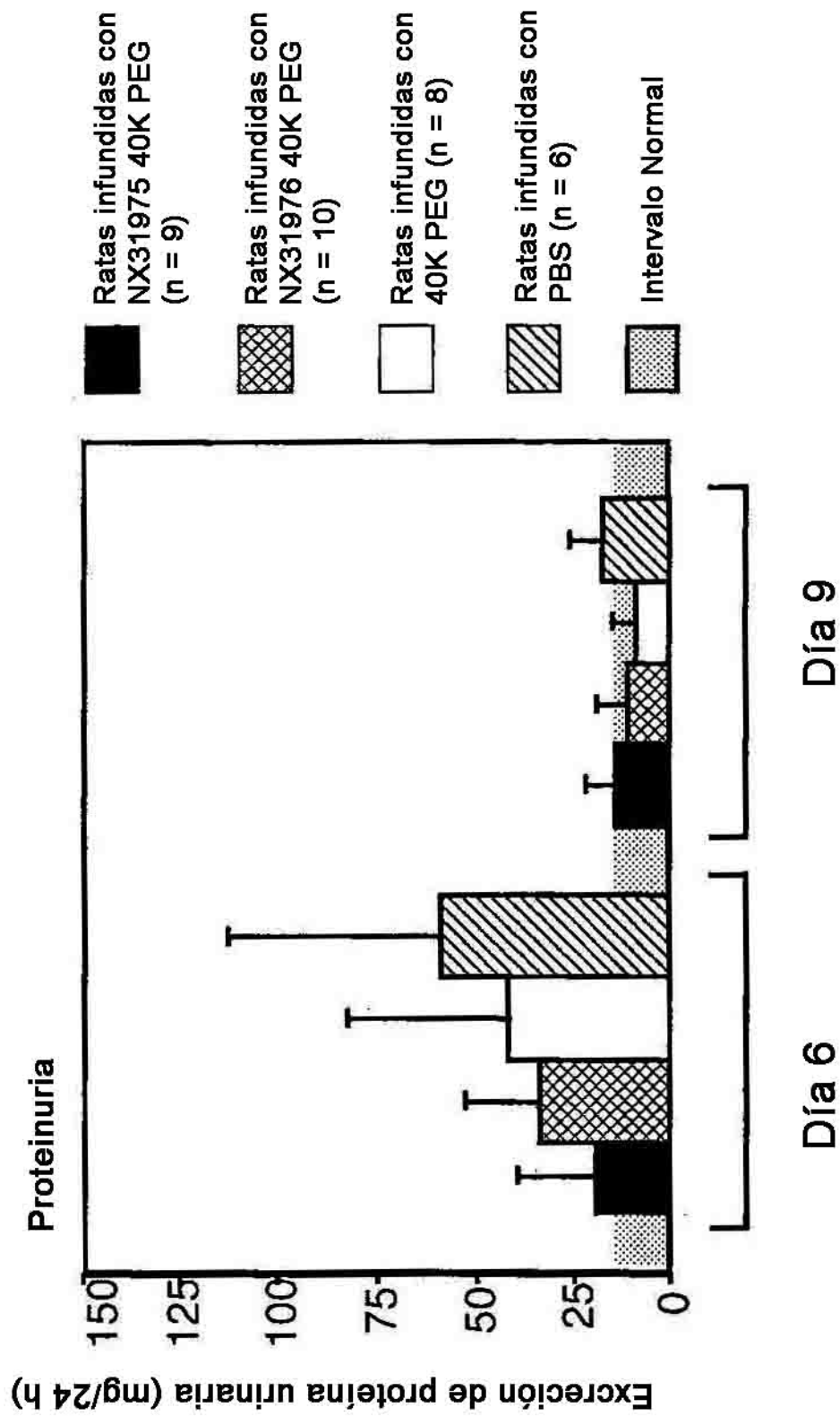


Figura 13C

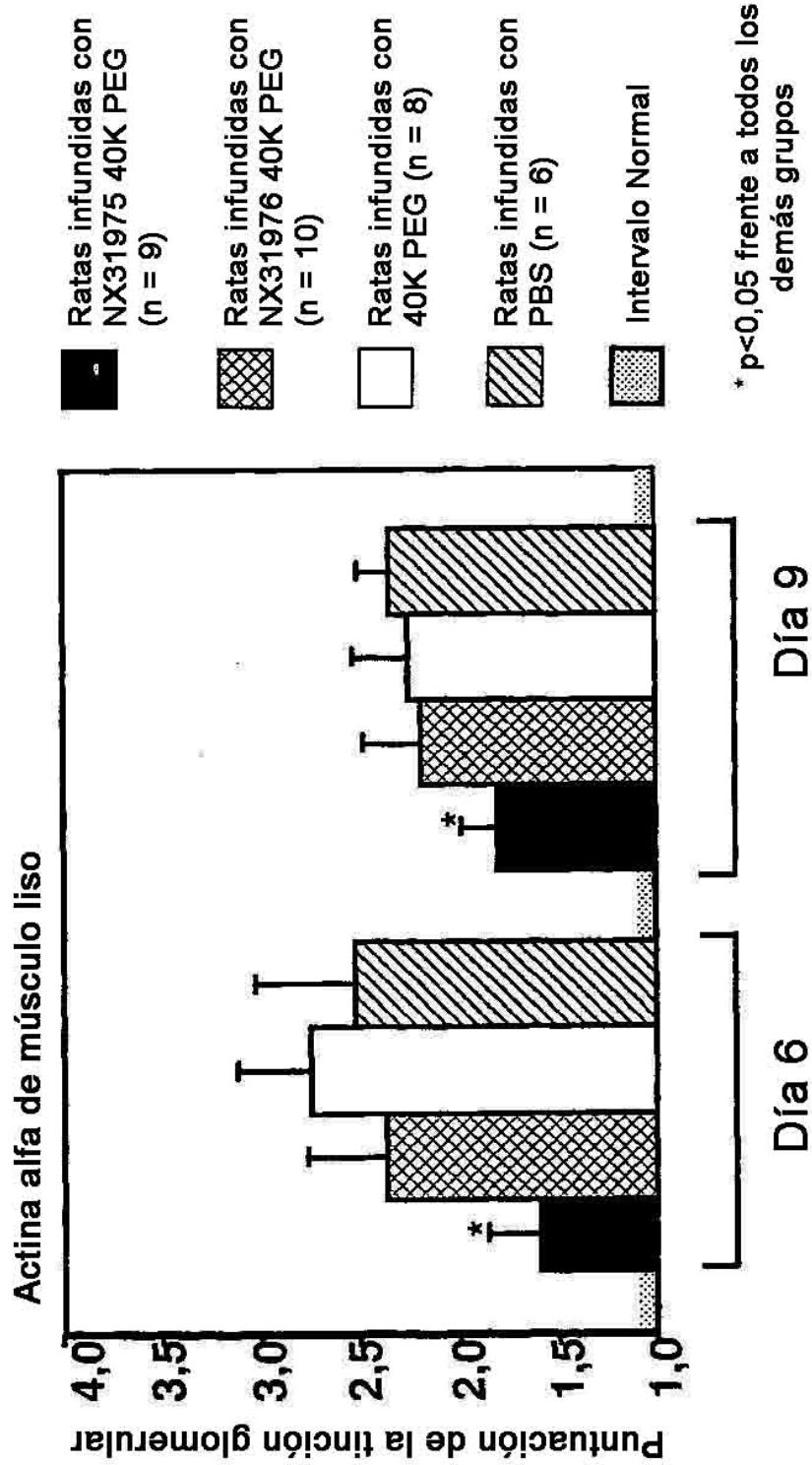


Figura 13D

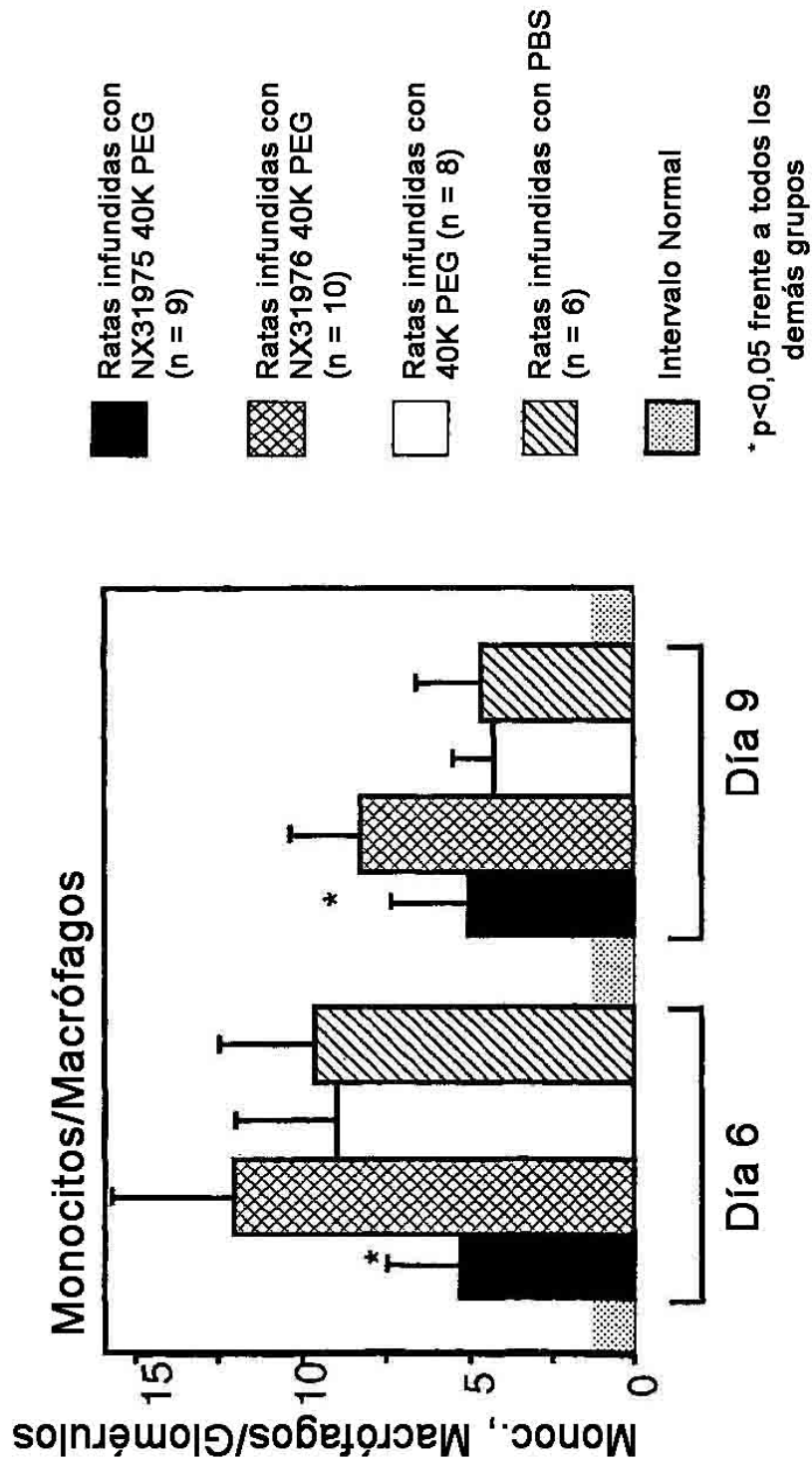
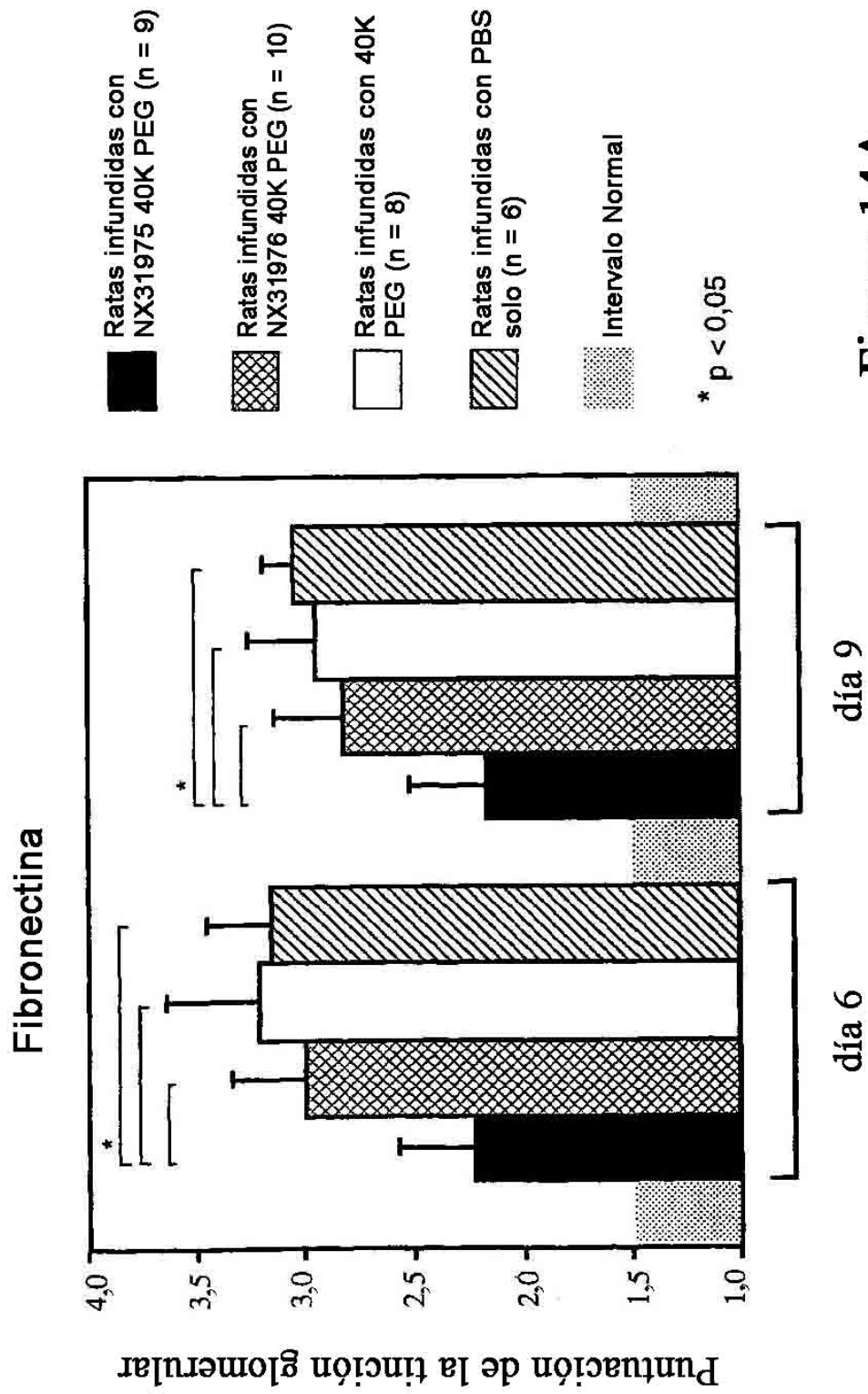
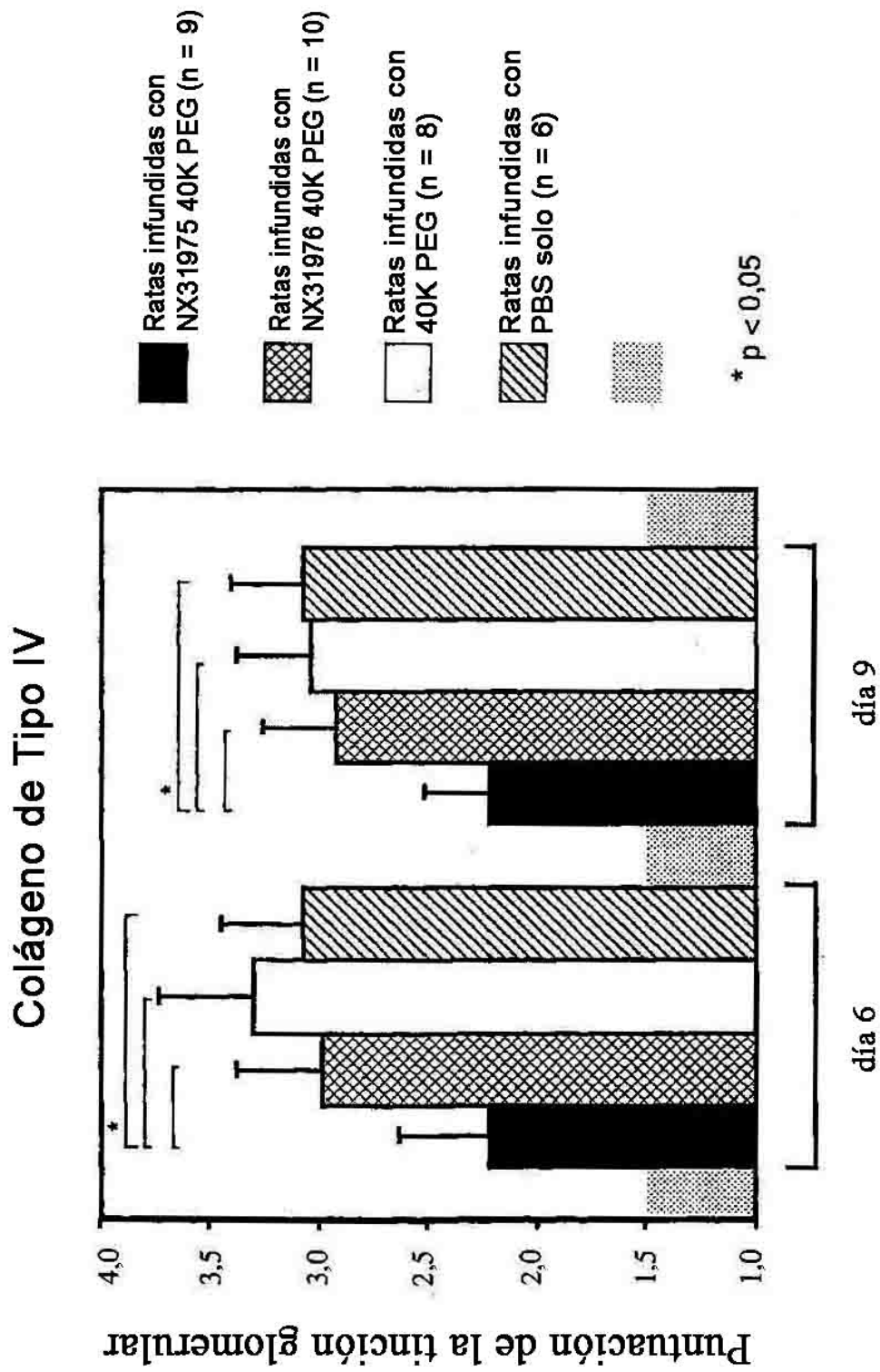


Figura 13E



**Figura 14A**



**Figura 14B**

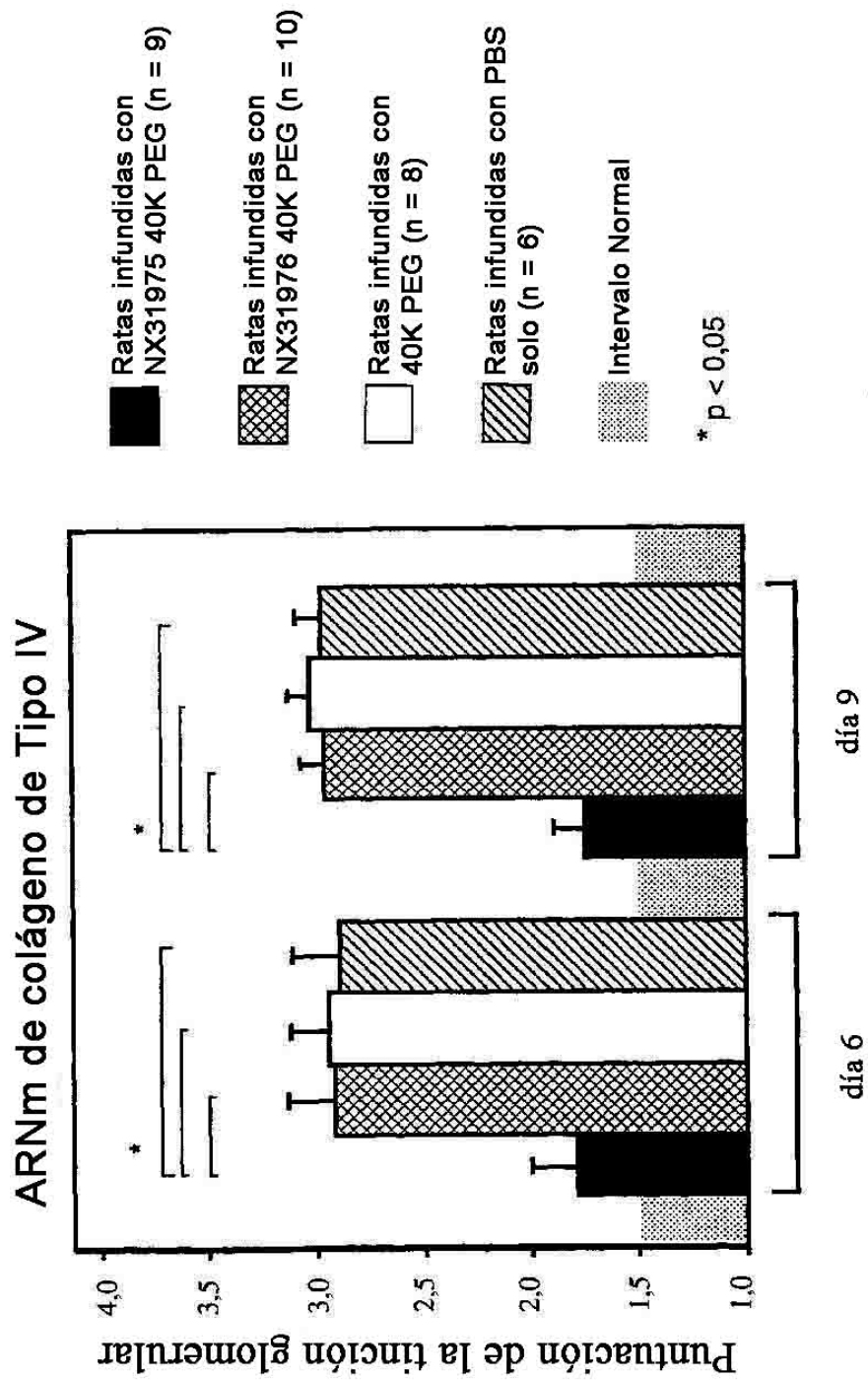


Figura 14C